

613.016
11.530

Иммунология

1

Издательство «Мир»

Иммунология

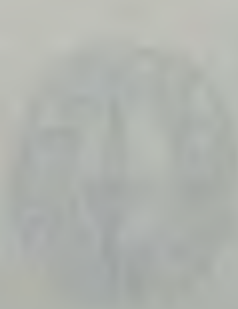
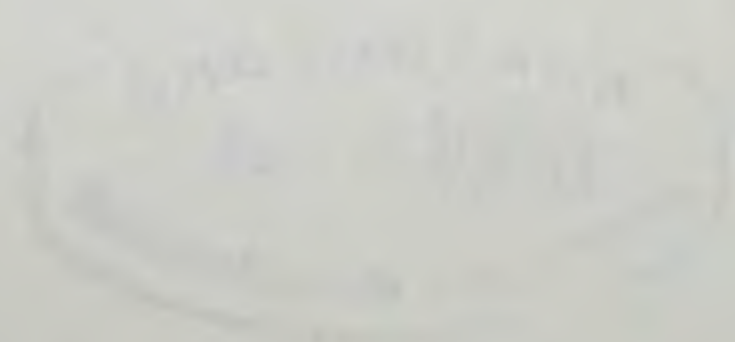
1

PLASMA

PLASMA

PLASMA

PLASMA



PLASMA

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

И 537

Иммунология

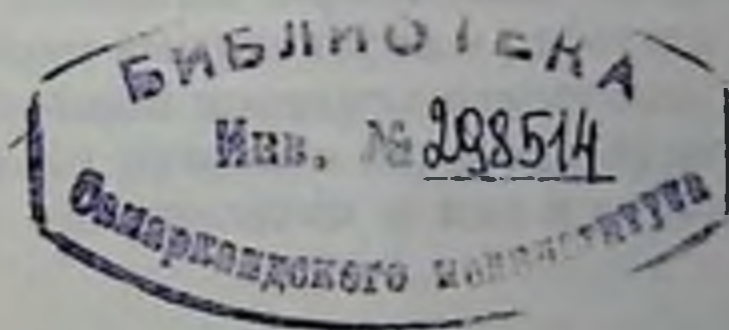
Под редакцией У. Пола

В ТРЕХ ТОМАХ

Том 1

Перевод с английского
канд. биол. наук *Т. Н. Власик*,
А. А. Нейфаха,
д-ра биол. наук *Р. С. Незлина*,
канд. хим. наук *В. А. Несмеянова*,
Л. Г. Николаева

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



Москва «Мир» 1987

ББК 28.073
И53
УДК 575+57.063

Пол У., Сильверстайн А., Купер М. и др.

Иммунология: В 3-х т. Т. 1. Пер. с англ./ Под ред. У. Пола. —
И53 М.: Мир, 1987—1988. 476 с., ил.

Монография, написанная коллективом ведущих специалистов-иммунологов США. В т. 1 изложены общие представления о клетках иммунной системы, структуре, функции и молекулярной генетике антител, а также рецепторах лимфоцитов.

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

И 2007020000—450 подписн. изд.
041(01)—87

ББК 28.073

Редакция литературы по биологии

© 1984 by Raven Press Books, Ltd.

© перевод на русский язык, «Мир», 1987

Предисловие редакторов перевода

Коллективная монография «Иммунология», вышедшая в свет в оригинале в 1984 г. под редакцией известного иммунолога Уильяма Пола, — наиболее полное в мировой литературе современное руководство по теоретической иммунологии. Стремительное и крайне разностороннее развитие этой науки, начавшееся в первой половине шестидесятых годов, не давало возможности остановиться и создать капитальное руководство по этой области биологии. Но сейчас уже четко обозначились контуры общей теории иммуногенеза и ее частных разделов, уже прояснены и сформулированы основные принципы иммунологического распознавания, расшифрована субмолекулярная структура антигенов и выявлены уникальные генетические механизмы, контролирующие их синтез, установлено клональное строение лимфоидной ткани и определены основные функционально различные субпопуляции лимфоцитов и принципы их взаимодействия.

Эти результаты и представления легли в основу предлагаемого руководства, которое полно и гармонично отражает состояние иммунологии к моменту выхода книги. Главы, посвященные перечисленным проблемам, составляют костяк книги, и можно с уверенностью считать, что они не будут сколько-нибудь серьезно изменены в последующих ее изданиях. Однако успехи иммунологии настолько стремительны, что с момента выпуска этого руководства уже получены новые, принципиально важные данные — например о структуре антигенсвязывающих рецепторов Т-лимфоцитов, об их сходстве и отличии от иммуноглобулинов. Эти сведения читателю придется извлекать из периодической литературы, и в первую очередь из ежегодников «Annual Review of Immunology», издаваемых также под редакцией Пола с 1983 г.

Настоящее руководство написано на самом высоком научном уровне; его авторы — активно работающие авторитетные ученые. Изложенный материал примерно соответствует кандидатскому минимуму по иммунологии. Книга может служить энциклопедическим справочным пособием для всех, кто хочет серьезно войти в круг проблем иммунологии и работать в этой области. «Иммунология» Пола уже стала основным всемирно известным руководством по теоретической иммунологии, и выход русского перевода будет несомненно способствовать успешному развитию иммунологии у нас в стране.

Г. И. Абелев

Р. С. Незлин

Е. С. Сидорова

Предисловие

«Иммунология» представляет собой руководство повышенного типа, задуманное так, чтобы дать читателю сложную картину наиболее существенных разделов современной теоретической иммунологии. При составлении книги мы старались сделать ее доступной читателям, с различным уровнем иммунологических знаний. В вводных главах, т. е. гл. 1 («Иммунная система: введение») и гл. 2 («История иммунологии»), рассматриваются основные сведения о современных иммунологических концепциях. Они предназначены для тех, кто обладает лишь небольшими познаниями в иммунологии и позволят лучше понять последующий материал. Второй раздел — «Клетки иммунной системы» — следует рассматривать как расширенное введение, которое должно помочь как новичкам, так и специалистам познакомиться с основными клеточными компонентами (лимфоцитами и макрофагами), играющими главную роль в иммунологических механизмах. Последующие главы посвящены основным разделам современной иммунологической науки: «Антитела и рецепторы», «Иммуногенетика», «Регуляция иммунного ответа» и «Эффекторные механизмы иммунитета». В последних главах книги описываются наиболее важные методики, которые во многом способствовали современным успехам иммунологии: получение гибридом и моноклональных антител, современные методы идентификации и разделения специфических клеток иммунной системы и методы размножения лимфоцитов в длительных культурах, а также клонирование этих функционально важных клеток.

Авторами каждой из глав являются ученые, которые сами активно участвуют в исследованиях, обсуждаемых в соответствующих главах. Читатель может отметить некоторые различия во взглядах между авторами, а также тот факт, что по ряду важных проблем существуют даже противоположные мнения между специалистами. Я убежден, что это неизбежно в любой быстро развивающейся области науки. Поэтому, вместо того чтобы пытаться как-то сгладить эти разногласия, я призываю читателя самому вынести определенные суждения или же, что более разумно, подождать и посмотреть, как решатся существующие противоречия в процессе дальнейшего развития науки.

У. Е. Пол

Введение

Среди других биологических дисциплин иммунология — относительно молодая наука. В основе наших представлений о строении иммуноглобулинов и генетических основ их специфичности лежат главным образом исследования, выполненные за последние три десятилетия. Сходным образом такие важные успехи, как выяснение функций клеток иммунной системы и роли продуктов генов главного комплекса гистосовместимости, регулирующих их дифференцировку и специфические взаимодействия, были достигнуты за самые последние годы. Многие авторы глав этого своевременно появившегося руководства внесли собственный вклад в те замечательные открытия, которые преобразили иммунологию.

Возникнув как прикладная наука, тесно связанная с бактериологией после выдающихся открытий Дженнера и Пастера, иммунология с самого начала представляла собой одну из наиболее многообещающих и сложных биологических дисциплин. Она развивалась как новый терапевтический подход к предупреждению инфекционных заболеваний. Раннюю феноменологическую стадию развития иммунологии характеризовала оживленная и острая дискуссия между защитниками гуморальной теории иммунитета Бернга и сторонниками клеточной теории иммунитета Мечникова. С теоретической точки зрения весьма примечательно, что обе теории оказались в принципе правильными.

Исследование иммунологических феноменов было продолжено затем уже на молекулярном уровне, причем основной упор был сделан на изучении антител и антигенов — их специфичности, участков связывания и детальной молекулярной структуры. Два открытия положили начало этому периоду: во-первых, Гейдельбергер показал, что антитела являются белками и, следовательно, их можно подвергнуть молекулярному анализу, во-вторых, Ландштейнер, а также Эвери и Гейдельбергер охарактеризовали антигенные детерминанты. На протяжении этого периода была получена точная и детальная информация о классах антител, структуре этих белков, зависимости специфичности антител от аминокислотной последовательности и взаимоотношения структуры и функций у иммуноглобулинов.

В то время как иммунохимики успешно изучали молекулы антител, возник новый период в развитии иммунологии, охарактеризованный Эрне как клеточный. Интерес к клеткам, ответственным за гуморальные и клеточные иммунологические феномены, был вызван открытием Ландштейнера и Чейза, установивших решающую роль сенсibilизированных лимфоидных клеток в переносе чувствительности к туберкулину от иммунного донора к реципиенту. Основные успехи клеточного периода обязаны следующим важным достижениям: 1) созданию сэром Макфарлейном Бернетом клонально-селекционной теории специфического иммунитета, которая впоследствии была подтверждена Носселом и Грином, Вассалли, Нуссенцвайгом и Бенацерафом, 2) идентификации циркулирующих лимфоцитов как клеток, ответственных за иммунологические феномены, и 3) идентификации Фагрэус и Кунсом плазматических клеток как клеток, которые образуют и секретируют антитела.

Клеточный период в развитии иммунологической мысли позволил также понять механизм синтеза антител, который, как мы сейчас знаем, управляется

теми же законами, что и синтез менее разнообразных белков. Этот период ознаменовался идентификацией различных типов клеток, участвующих в тех или иных иммунологических феноменах, — Т-клеток, или лимфоцитов, ведущих свое происхождение из тимуса, В-лимфоцитов, являющихся предшественниками клеток, секретирующих антитела, и плазматических клеток.

Вся эта работа подготовила почву для современного периода иммунологии, изучающей прежде всего взаимоотношения между различными клетками иммунной системы, а также между этими клетками и антиген-презентирующими клетками. Такая «многоклеточная фаза» иммунологических исследований позволила выяснить регуляторные механизмы, контролирующие иммунный ответ и защищающие от развития аутоиммунитета. Среди важнейших достижений, положивших начало современным направлениям исследований, нужно упомянуть: 1) идентификацию регуляторных функций Т-клеток в иммунном ответе, 2) открытие хелперных Т-клеток Митчисоном и Раевским и супрессорных Т-клеток Гершоном и 3) выяснение Бенаццерафом и Мак-Девиттом той роли, которую выполняют продукты генов главного комплекса гистосовместимости в специфичности и регуляции зависящего от Т-клеток иммунного ответа.

Другим регуляторным механизмом, иллюстрирующим важную роль клеточных взаимодействий в иммунной системе, является ответ организма хозяина на идиотипическую специфичность, характерную как для антител, так и для продуцирующих их иммунных клеток. Этот вид регуляции, постулированный Ерне в его изящной теории иммунологической сети, был подтвержден работами многих лабораторий.

Наконец, идентификация и клонирование Тонегавой и Лидером генов, кодирующих переменные и константные сегменты иммуноглобулинов, позволили детально понять происхождение разнообразия узнающих участков антител и учесть вклад генетических и соматических механизмов.

В этой книге рассматриваются современные представления теоретической иммунологии, а также важнейшие методы исследований. Мы полагаем, что она представит интерес не только для иммунологов, но и для биологов и врачей. Мы надеемся, что достижения в области иммунологии покажутся им волнующими и увлекательными.

Б. Бенаццераф

Благодарности

Создание и подготовка «Иммунологии» потребовала работы большого числа лиц, вклад каждого из которых был очень важным. Я хочу прежде всего поблагодарить Anne Patterson, ранее работавшую в издательстве Raven Press. Она тесно сотрудничала со мной с первых же этапов работы над проектом данного руководства и активно содействовала тому, чтобы каждый из авторов, и я в том числе, закончили наши главы к сроку. Приношу также благодарность Ann Berlin, помощнику издателя, курировавшей выпуск книги. Особенно я благодарен секретарю Kay McMahon, чьи полезные советы и здравые суждения оказывали неоценимую услугу на разных стадиях работы над книгой.

Список авторов

Robert F. Ashman
Departments of Medicine
(Rheumatology) and Microbiology
University of Iowa
College of Medicine
Iowa City.

Baruj Benacerraf
Department of Pathology
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts.

Ira J. Berkower
Metabolism Branch
National Cancer Institute
National Institutes of Health
Bethesda, Maryland.

Jay A. Berzofsky
Metabolism Branch
National Cancer Institute
National Institutes of Health
Bethesda, Maryland.

Constantin A. Bona
Department of Microbiology
Mount Sinai School of Medicine
New York.

Jonathan S. Bromberg
Department of Pathology
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts.

Kathryn Brooks
Department of Microbiology
University of Texas Health
Science Center
Dallas, Texas.

Eric J. Brown
Clinical Immunology Section
Laboratory of Clinical
Investigation
National Institute of Allergy
and Infections Diseases

National Institutes of Health
Bethesda, Maryland.

Eugene C. Butcher
Department of Pathology
Stanford University Medical Center
Stanford California.

Harvey Cantor
Department of Pathology
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts.

J. Donald Capra
Department of Microbiology
University of Texas Health Science
Center
Dallas, Texas.

Robert E. Cone
Department of Pathology
Yale University School of Medicine
New Haven, Connecticut.

Max D. Cooper
Department of Pediatrics and
Microbiology
Cellular Immunobiology Unit of
the Tumor Institute, and
Comprehensive Cancer Center
University of Alabama
Birmingham, Alabama.

Joseph M. Davie
Department of Microbiology and
Immunology
Washington University School
of Medicine
St. Louis, Missouri.

C. Garrison Fathman
Division of Immunology
Department of Medicine
Stanford University Medical School
Stanford, California.

Frank W. Fitch

Department of Pathology
University of Chicago
Chicago, Illinois.

Julian B. Fleischman

Department of Microbiology and
Immunology
Washington University School
of Medicine
St. Louis, Missouri.

Michael M. Frank

Clinical Immunology Section
Laboratory of Clinical
Investigation
National Institute of Allergy and
Infections Diseases
National Institutes of Health
Bethesda, Maryland.

Steven Gillis

Immunex Corporation
Seattle, Washington.

Mark I. Greene

Department of Pathology
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts.

Christopher S. Henney

Immunex Corporation
Seattle, Washington.

P. Mark Hogarth

Department of Pathology
Research Centre for Cancer and
Transplantation
University of Melbourne
Parkville, Victoria Australia.

Peter Isakson

Department of Microbiology
University of Texas Health
Science Center
Dallas, Texas.

Charles A. Janeway, Jr.

Department of Pathology
Yale University School of Medicine
New Haven, Connecticut.

Debra J. Jeske

Department of Microbiology
University of Texas Health
Science Center
Dallas, Texas.

Ketih A. Joiner

Clinical Immunology Section
Laboratory of Clinical
Investigation
National Institute of Allergy and
Infectious Diseases
National Institutes of Health
Bethesda, Maryland.

John F. Kearney

Department of Microbiology
Cellular Immunobiology Unit of
the Tumor Institute, and
Comprehensive Cancer Center
University of Alabama
Birmingham, Alabama.

Thomas J. Kindt

Laboratory of Immunogenetics
National Institute of Allergy
and Infectious Diseases
National Institutes of Health
Bethesda, Maryland.

Norman R. Klinman

Scripps Clinic and Research
Foundation
10666 North Torrey Pines Road
La Jolla, California.

Judith Layton

Department of Microbiology
University of Texas Health Science
Center
Dallas, Texas.

Michael G. Mage

Laboratory of Biochemistry
National Cancer Institute
National Institutes of Health
Bethesda, Maryland.

Edward E. Max

Laboratory of Immunogenetics
National Institute of Allergy and
Infectious Diseases

National Institutes of Health
Bethesda, Maryland.

Ian F. C. McKenzie
Department of Pathology
Research Centre for Cancer
and Transplantation
University of Melbourne
Parkville, Victoria Australia.

Frances L. Owen
Center for Cancer Research
Tufts University School of
Medicine
Boston, Massachusetts.

Charles W. Parker
Howard Hughes Medical Institute
Laboratory and
Department of Internal Medicine
Division of Allergy and Immunology
Washington University School of
Medicine
St. Louis, Missouri.

William E. Paul
Laboratory of Immunology
National Institute for Allergy
and Infectious Diseases
National Institutes of Health
Bethesda, Maryland.

Benvenuto Pernis
Department of Microbiology
Columbia University College of
Physicians and Surgeons
New York.

Ellen Puré
Department of Microbiology
University of Texas Health Science
Center
Dallas, Texas.

Mary Ann Robinson
Laboratory of Immunogenetics
National Institute of Allergy and
Infectious Diseases
National Institutes of Health
Bethesda, Maryland.

David H. Sachs
Transplantation Biology Section
Immunology Branch
National Cancer Institute
National Institutes of Health
Bethesda, Maryland.

Sam Schatten
Department of Pathology
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts.

Irwin Scher
Department of Immunology
Merck Sharp and Dohme
Rahway, New Jersey.

Ronald H. Schwartz
Laboratory of Immunology
National Institute of Allergy and
Infectious Diseases
National Institutes of Health
Bethesda, Maryland.

Ethan M. Shevach
Laboratory of Immunology
National Institute of Allergy and
Infectious Diseases
National Institutes of Health
Bethesda, Maryland.

Arthur M. Silverstein
Department of Ophthalmic Immunology
The Wilmer Institute
Johns Hopkins University
School of Medicine
Baltimore, Maryland.

Gregory W Siskind
Department of Medicine
Division of Allergy and Immunology
Cornell University Medical College
New York.

Kendall A. Smith
Department of Medicine
Dartmouth Medical School
Hanover, New Hampshire.

Tomio Tada
Department of Immunology

Faculty of Medicine
University of Tokyo
Tokyo Japan.

Judy M. Teale
Scripps Clinic and Research
Foundation
La Jolla, California.

Ellen S. Vitetta
Department of Microbiology
University of Texas Health

Science Center
Dallas, Texas.

Irving L. Weissman
Department of Pathology
Stanford University Medical Center
Stanfor, California.

Dorothy Yuan
Department of Microbiology
University of Texas Health
Science Center
Dallas, Texas.

*Во всех творениях природы есть что-то
непостижимое.*

Аристотель ("О частях животных",
книга 1, гл. 5)

Часть I

Введение

Глава 1

Иммунная система

Уильям Е. Пол

(William E. Paul)

Данная глава представляет собой общее введение в иммунологическую науку. Мы надеемся, что она послужит читателю вступлением к другим главам, в которых каждый из разделов иммунологии рассматривается детально. Чтобы облегчить изучение, мы приводим здесь ссылки на соответствующие главы.

1.1. Клетки иммунной системы

Главы 3—6

Иммунную систему можно рассматривать как совокупность лимфоцитов, макрофагов, ряда сходных с макрофагами клеток, включая дендритные клетки селезенки и эпителиальные клетки Лангерганса, а также специализированные эпителиальные клетки, сходные с теми, которые были найдены в тимусе. Клеточные элементы иммунной системы организованы в тканевые и органы структуры, к которым относятся селезенка, лимфатические узлы, пейеровы бляшки кишечника, миндалины, тимус и костный мозг. Кроме того, весьма значительная часть лимфоцитов и макрофагов составляет рециркулирующую популяцию клеток крови и лимфы.

Индивидуальные лимфоциты представляют собой клетки, специализированные в том смысле, что они способны (коммитированы) отвечать лишь на ограниченную группу структурно сходных антигенов. Эта коммитированность, существующая еще до первого контакта иммунной системы с данным антигеном, выражается в наличии у лимфоцита мембранных рецепторов, специфических для детерминант этого антигена. Каждый индивидуальный лимфоцит, по-видимому, обладает популяцией рецепторов с одинаковыми антигенсвязывающими

центрами (возможное исключение из этого правила мы рассмотрим при обсуждении Т-лимфоцитов, «рестриктированных по гистосовместимости». Таким образом, одна группа, или клон, лимфоцитов будет отличаться от другой группы или клона, структурой антигенсвязывающего центра своих рецепторов и, следовательно, тем набором антигенов, которые могут стимулировать ответ этих клеток. Способность организма отвечать практически на любой антиген обеспечивается наличием весьма большого числа различных групп лимфоцитов, каждая из которых имеет специфические рецепторы для определенных антигенов. В результате лимфоциты составляют исключительно *неоднородную популяцию клеток*. Здесь трудно назвать точные цифры, но вполне вероятно, что число рецепторов лимфоцитов с различными антигенсвязывающими центрами в организме взрослого человека превышает 10^6 .

Лимфоциты различаются между собой не только по специфичности своих рецепторов, но также и по их функциональным свойствам. Различают два основных класса лимфоцитов: В-лимфоциты, которые служат предшественниками антителообразующих клеток, и Т- или тимусзависимые лимфоциты. Т-лимфоциты подразделяются на ряд подклассов. Часть из них опосредует важные регуляторные функции, в частности может «помогать» (хелперы) или «подавлять» (супрессоры) развитие иммунного ответа, в том числе образование антител. Другие Т-лимфоциты выполняют эффекторные функции, например вырабатывают растворимые вещества, запускающие разнообразные воспалительные реакции, или осуществляют прямое разрушение клеток, несущих на себе антигены («киллерная» функция). В соответствии с этим мы различаем Т-хелперы, Т-супрессоры, Т-киллеры, а также Т-клетки, участвующие в реакции замедленной гиперчувствительности и связанных с нею иммунологических явлениях.

Кроме лимфоцитов этих двух главных классов известны еще лимфоциты, осуществляющие некоторые «неспецифические» цитотоксические реакции (гл. 25). К ним относятся так называемые природные киллеры (ПК или НК — от англ. natural killer), способные убивать некоторые виды опухолевых клеток, используя при этом совершенно иные системы распознавания по сравнению с теми, которые используются Т- и В-лимфоцитами. Другой тип неспецифического разрушения клеток-мишеней имеет место при антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ- или ADCC — от англ. antibody-dependent cellular cytotoxicity), которая является функцией лимфоцитов (или — в некоторых условиях — и клеток некоторых других типов), способных разрушать покрытые антителами клетки-мишени благодаря способности распознавать константную часть этих антител. Пока еще неясно, является ли АЗКЦ функцией клеток, опосредующих активность ПК.

1.2. В-лимфоциты

Глава 3

В-лимфоциты, являющиеся, как упоминалось выше, предшественниками антителообразующих клеток, первоначально развиваются из гемопоэтических стволовых клеток. По-видимому, существует клетка — предшественник В-лимфоцитов, способная к самовоспроизведению; однако ее свойства мало изучены. Такую специализированную стволовую клетку находят у взрослой мыши в костном мозге и реже в селезенке. В ряду дифференцировки В-лимфоцитов первым элементом, который можно выявить прямым наблюдением, является предшественник В-клетки (пре-В-клетка) (рис. 1.1). На мембране пре-В-клетки нет

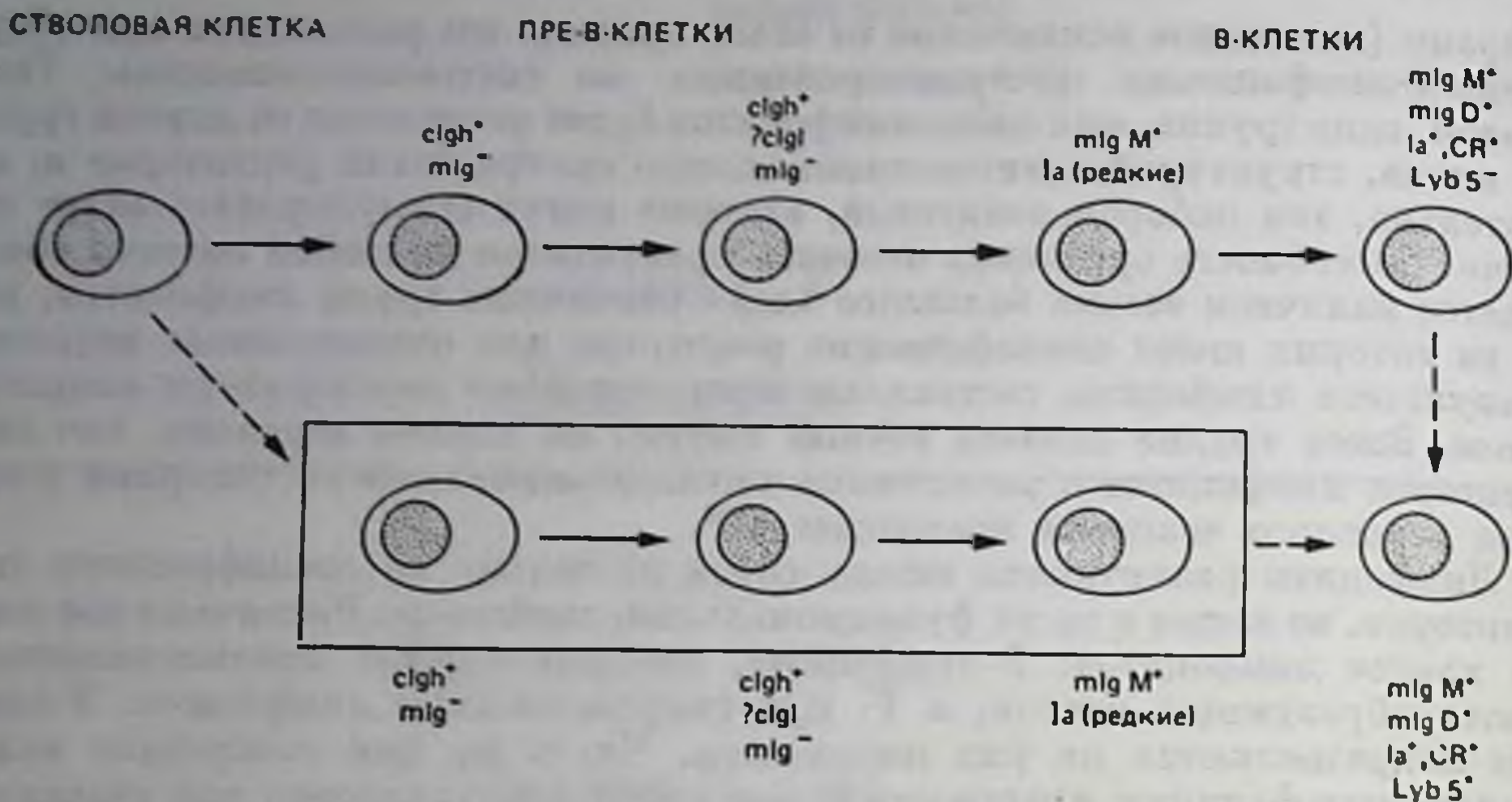


Рис. 1.1. Дифференцировка и онтогенез В-лимфоцитов.

В-лимфоциты развиваются из стволовой клетки, которую пока не удалось выделить и свойства которой пока еще изучены недостаточно полно. Первым опознаваемым элементом в ряду дифференцировки В-лимфоцита является пре-В-клетка. Это крупная циркулирующая клетка, в цитоплазме которой содержатся тяжелые цепи иммуноглобулинов (сIgh) μ -класса, но не имеется мембранного иммуноглобулина (mIg). Позднее пре-В-клетки меньше по размерам, и некоторые из них могут содержать в цитоплазме легкие (сIgl) и тяжелые (сIgh) цепи. Пре-В-клетки дифференцируются в В-клетки, отличительной особенностью которых является экспрессия мембранного иммуноглобулина (mIg). Незрелые В-клетки обычно экспрессируют mIgM, но не mIgD и нередко

обладают сравнительно небольшим количеством молекул главного комплекса гистосовместимости класса II (МНС). Молекулы класса II часто обозначают как Ia-антигены. В более зрелых В-клетках обнаруживаются mIgM и mIgD, а Ia-антигены имеют большую плотность. У этих клеток появляются также рецепторы для компонентов комплекса (CR). У некоторых зрелых В-лимфоцитов мыши имеется также дифференцировочный антиген Lyb 5, тогда как у других его нет. Для активации клеток Lyb 5⁺ и Lyb 5⁻ нужны разные условия. Пока еще неясно, возникают ли В-клетки Lyb 5⁺ из В-клеток Lyb 5⁻ или же это разные линии развития В-клеток, дающие в конце концов В-клетки Lyb 5⁺ и Lyb 5⁻. (Stein. J. Textbook of Medicine, Little Brown Co.; печатается с разрешения.)

рецепторов для антигена, но в цитоплазме содержится по крайней мере одна из цепей молекулы антитела — тяжелая цепь иммуноглобулина (Ig). У плода мыши пре-В-клетки впервые обнаруживаются в печени примерно на 12—14-й день внутриутробного развития и продолжают появляться в постнатальном периоде. Как у человека, так и у мыши существуют злокачественные формы пре-В-клеток, а именно некоторые виды клетки острых лимфолейкозов и опухолей, индуцированных вирусом Абельсона.

Зрелая В-клетка отличается от пре-В-клетки тем, что на ее мембранах имеются рецепторы для антигена; при связывании антигена с этими рецепторами клетка активируется. Для такой активации обычно нужно, чтобы одновременно со связыванием антигена В-клетка вступила во взаимодействие со специфической хелперной (клеткой-помощником) Т-клеткой или чтобы она связала определенные растворимые факторы роста и дифференцировки. В противном случае, когда связывание антигена не сопровождается поступлением сигналов от растворимых факторов роста или от хелперных Т-клеток, может произойти инактивация В-клетки, особенно незрелых форм этой клеточной линии. В этих условиях может развиваться состояние В-клеточной толерантности (гл. 20).

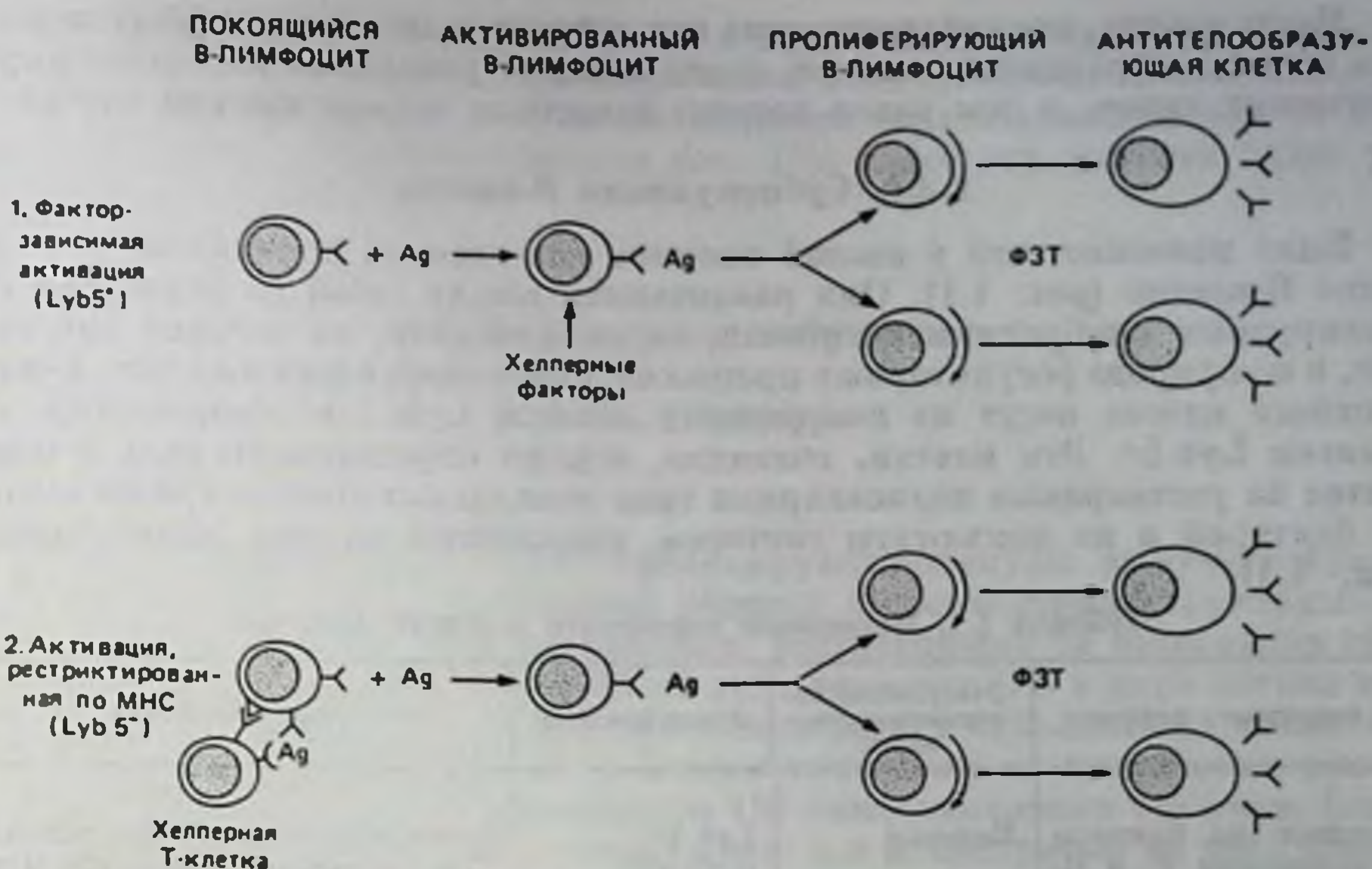


Рис. 1.2. Активация В-клеток.

Известны два различных механизма, активирующие пролиферацию и последующую дифференцировку покоящихся В-клеток. Один механизм, называемый факторзависимой активацией, по-видимому, функционирует лишь в клетках Lub^{5+} . В этом случае активирующий агент вызывает агрегацию рецепторов покоящейся В-клетки, индуцируя таким путем ее активацию и переход в фазу G_1 . На такую стимулированную клетку действуют растворимые факторы, в том числе факторы роста В-клеток и интерлейкин 1 (IL-1), и она вступает в фазу S. В этом состоянии клетка становится объектом действия факторов дифференцировки, часто называемых факторами, замещающими Т-клетки (ЗФ); под их влиянием начинают синтез и секреция иммуноглобулина. Второй основной механизм активации покоя-

щихся В-клеток включает в себя их взаимодействие с хелперными Т-клетками, «рестриктивными по главному комплексу гистосовместимости». Последние распознают находящиеся на поверхности В-клеток антиген и молекулу класса II, что способствует стимуляции В-клетки. Такая активация, часто называемая «когнатной», обнаружена в случае В-клеток Lub^{5-} . Возможна ли она в случае клеток Lub^{5+} , пока неясно. Дальнейшее развитие стимулированных В-клеток может зависеть от их последующего взаимодействия с хелперными Т-лимфоцитами или с растворимыми факторами. Вероятно, для их дифференцировки в клетки, секретирующие иммуноглобулин, необходимы факторы дифференцировки. (Annual Review of Immun., 1, 1983. Печатается с разрешения.)

Активация В-клеток состоит из двух различных фаз: пролиферации и дифференцировки (рис. 1.2) (гл. 12). В результате пролиферации увеличивается число клеток, способных реагировать с введенным в организм чужеродным антигеном. Значение пролиферации велико, поскольку в неиммунизированном организме очень мало В-клеток, специфичных для любого из отдельных антигенов. Проллиферация имеет два последствия: 1) увеличение числа клеток, способных немедленно дифференцироваться в антителообразующие клетки и 2) накопление В-клеток, во многом похожих на исходные клетки-предшественники. Это обеспечивает при повторной иммунизации иммунологический ответ большей силы, чем при первичном ответе. Иначе говоря, увеличение числа предшественников ведет к появлению иммунологической памяти. Проллиферативная фаза В-клеточного ответа находится (по крайней мере отчасти) под управлением продукта Т-клеток, называемого фактором роста (ФР) В-клеток (гл. 21).

Часть клеток, пролиферирующих под действием антигена, дифференцируется в антителообразующие клетки, среди которых различают несколько морфологических типов, в том числе хорошо известные плазматические клетки.

1.2.1. Субпопуляции В-клеток

Было показано, что у мышей имеются две главные популяции, т. е. два класса В-клеток (рис. 1.1). Они различаются между собой по характеру экспрессируемых мембранных антигенов, по иммуногенам, на которые они отвечают, и по природе регуляторных процессов, контролирующих их ответ. В-клетки одного класса несут на поверхности антиген Lyb 5 и обозначаются как В-клетки Lyb 5⁺. Эти клетки, очевидно, играют определенную роль в ответе антител на растворимые полисахариды типа капсульных полисахаридов прогенных бактерий и на конъюгаты гаптенов, выделенных из этих полисахаридов (табл. 1.1)

Таблица 1.1. Механизмы хелперного действия Т-клеток

Тип хелперного действия	Рестрикция по гистосовместимости	Класс В-клеток	Типы антигенов
Основанное на близком расположении Т- и В-клеток (когнатное)	Имеется	Lyb 5 ⁻ (Lyb 5 ⁺ ?)	Тимусзависимые (TD), например растворимые белки, клеточные антигены
Зависящее от фактора	Отсутствует ¹⁾	Lyb 5 ⁺	Тип 1 — например поликлональные активаторы В-клеток (ЛПС) Тип 2 — например растворимые полисахариды Некоторые тимусзависимые антигены

¹⁾ При «факторзависимом» ответе взаимодействие Т- и В-клеток не ограничено антигенами гистосовместимости. Однако такая рестрикция имеет место на стадии активации Т-лимфоцитов клетками, «презентирующими» антиген.

Гаптенами называют низкомолекулярные вещества, не способные самостоятельно стимулировать иммунный ответ. Однако если гаптен присоединить к иммуногенной молекуле, то можно получить антитела против гаптена. Хелперное действие Т-клеток на В-клетки Lyb 5⁺ может осуществляться с помощью растворимых неспецифических лимфокинов типа фактора роста В-клеток и ряда факторов дифференцировки (гл. 21). Большая часть современных представлений о функциях В-клеток была получена при исследовании мышей с X-сцепленным иммунодефицитом (мыши «xid»), у которых эта субпопуляция лимфоцитов отсутствует.

В-клетки Lyb 5⁻ обеспечивают ответ на растворимые белковые антигены, многие клеточные антигены и некоторые вещества типа бактериального липополисахарида, являющиеся митогенами В-клеток. На растворимые полисахариды В-клетки Lyb 5⁻ не отвечают. Механизмы хелперного действия Т-лимфоцитов на В-клетки Lyb 5⁻, по-видимому, совершенно иные, чем механизм действия на В-клетки Lyb 5⁺. Для В-клеток Lyb 5⁻ нужно прямое физическое взаимодействие с Т-клеткой, специфической для того же антигена, что и дан-

ная В-клетка. Такое взаимодействие Т- и В-клеток часто называют когнатной помощью (гл. 18). Важная особенность такой помощи состоит в том, что в ней проявляется генетическая рестрикция межклеточных взаимодействий по главному комплексу гистосовместимости (гл. 15); ниже это явление будет рассмотрено более детально.

1.3. Иммуноглобулины

1.3.1. Структура

Глава 7

Антителообразующие клетки продуцируют молекулы иммуноглобулинов (Ig) — группу белков с некоторыми общими особенностями структуры. Они могут быть мономерами либо полимерами, построенными из нескольких субъединиц. Каждая субъединица состоит из двух тяжелых (H) и двух легких полипептидных цепей (рис. 1.3). У каждого мономера или субъединицы имеются два антигенсвязывающих центра. H- и L-цепи построены из нескольких доменов, каждый из которых состоит примерно из 110 аминокислотных остатков. L-цепи, среди которых различают два главных типа: κ и λ , построены из двух доменов. С-концевой домен у L-цепей одного типа имеет в основном одинаковое строение и носит название *постоянной*, или *константной* (C) области. N-концевой домен L-цепей варьирует у разных антител. Именно этот домен ответствен за построение участка связывания молекулы антитела. Ввиду разнообразия структуры его называют *варибельным* (V) доменом. Варибельность этого домена сосредото-

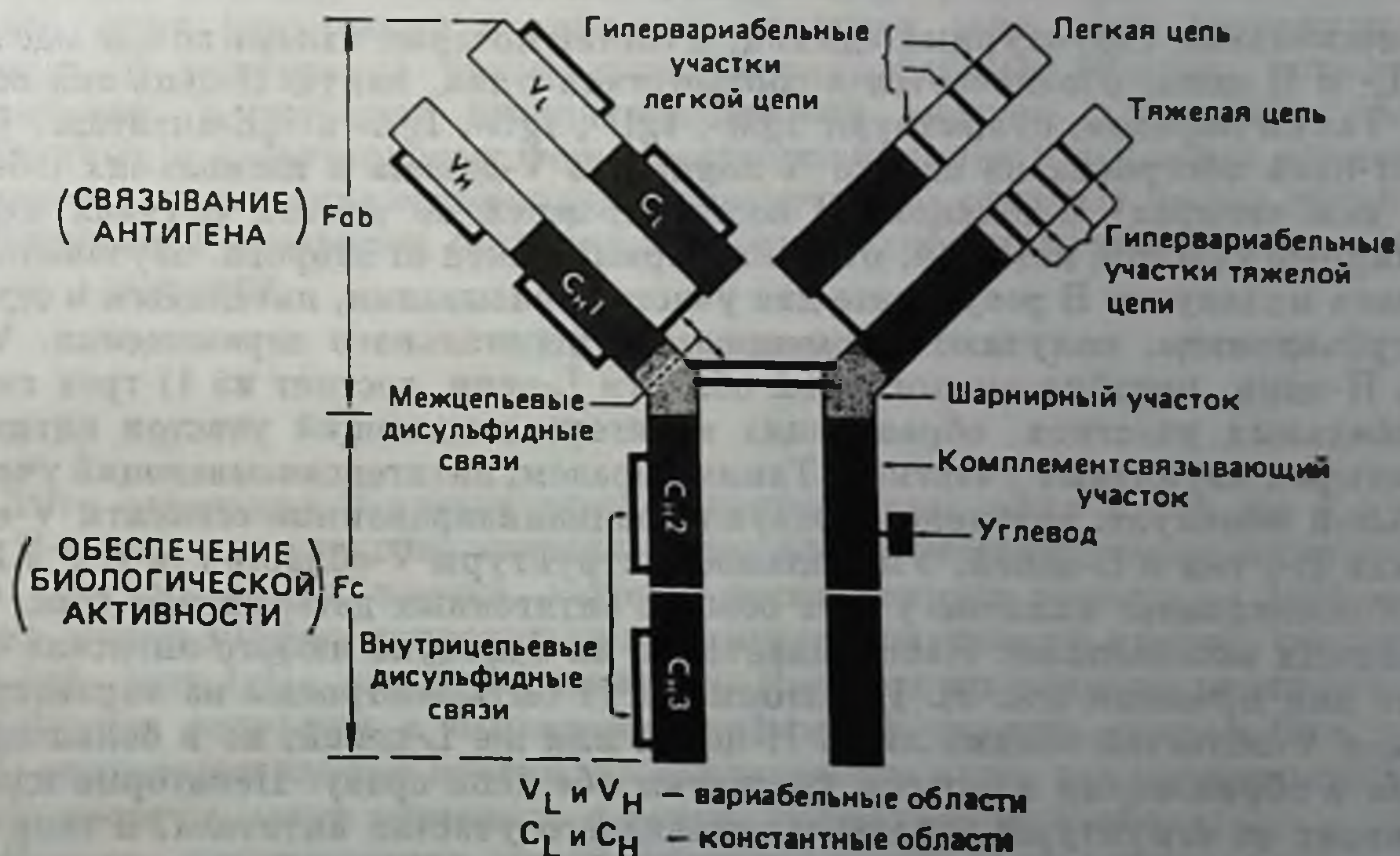


Рис. 1.3. Структура молекулы иммуноглобулина.

На схеме молекулы IgG обозначены цепи и домены, а также гиперварибельные участки варибельных областей H- и L-цепей (этот рисунок будет приведен в более подроб-

но объяснен в гл. 8). (Wasserman R. L., Capra J. D. Immunoglobulins. In: The Glycoconjugates, ed. by M. I. Horowitz and W. Pigman. Academic Press, New York, 1977, pp. 323—348; печатается с разрешения.)

чена в основном в трех его участках, называемых гиперварпабельными или определяющими комплементарность. В этих участках, по-видимому, содержатся аминокислоты, из которых строится антигенсвязывающий участок антитела. Три гиперварпабельных участка перемежаются со значительно менее варпабельными участками, названными каркасными. Таких участков четыре. Варпабельные области L-цепей (и H-цепей) иммуноглобулинов можно подразделить на отдельные группы, исходя из структурного сходства их каркасных участков.

H-цепи молекул иммуноглобулинов делятся на несколько классов, в том числе на классы μ , α и γ (которые сами распадаются на несколько подклассов), а также классы ϵ и δ . Полная молекула иммуноглобулина, состоящая из одной

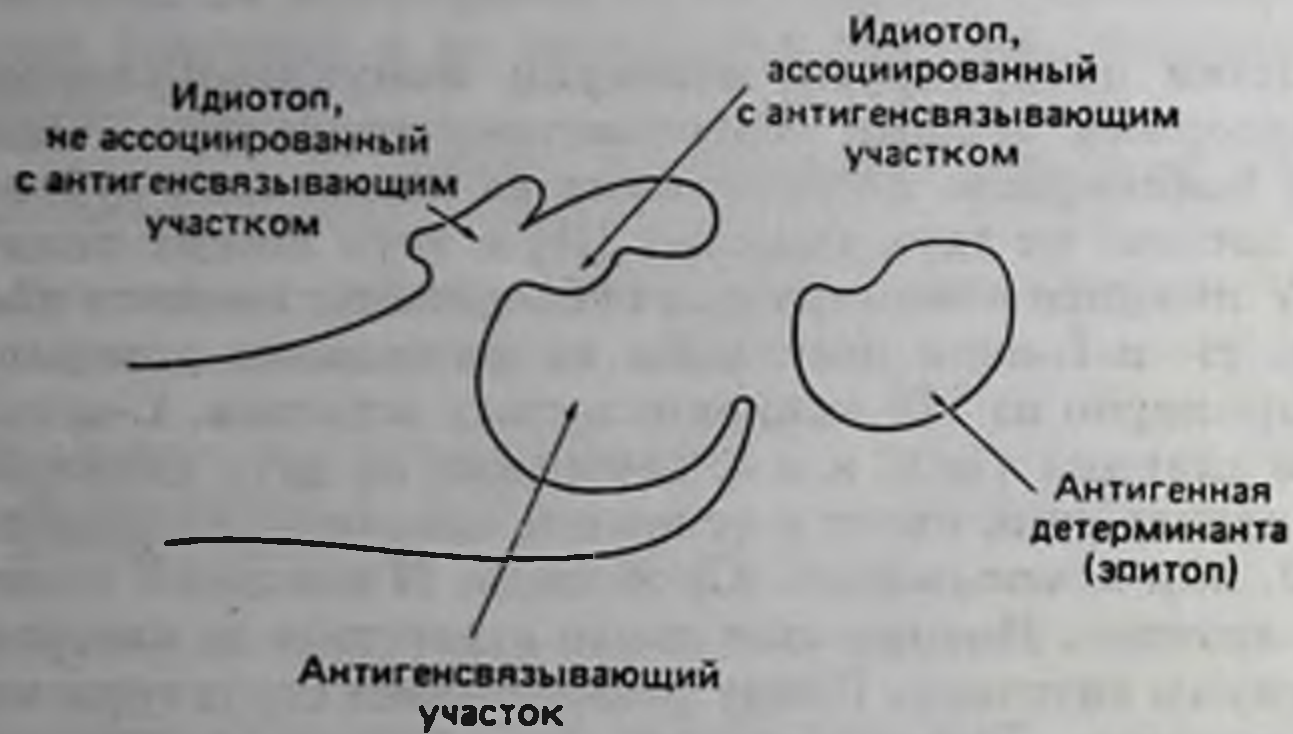


Рис. 1.4. Идиотопы.

Молекулы антител имеют участки, связывающие антигенные детерминанты (эпитопы). Различные антитела отличаются друг от друга своими варпабельными областями и сами могут иметь антигенные свойства и вызывать образование антител. Антигенные детерминанты варпабельных областей антител называются идиотопами. Они могут относиться к антигенсвязывающему участку (сайт-ассоциированные идиотопы) или не иметь к нему отношения (неассоциированные идиотопы).

или нескольких структурных единиц, в состав которых входит по две идентичные L- и H-цепи, обозначается в соответствии с тем, какую H-цепь она содержит. Таким образом, существуют IgM-, IgD-, IgG-, IgA- и IgE-антитела. Каждая H-цепь построена из одного N-концевого V-домена и нескольких (обычно трех или четырех) C-доменов. В состав H-цепей во многих случаях входит шарнирный участок, который, отделяя первый домен от второго, обуславливает гибкость молекулы. В результате два участка связывания, имеющиеся в отдельной субъединице, получают возможность относительного перемещения. V-область H-цепи, подобно аналогичной области L-цепи, состоит из 1) трех гиперварпабельных участков, образующих антигенсвязывающий участок антитела, и 2) четырех каркасных участков. Таким образом, антигенсвязывающий участок отдельной молекулы антитела образуют специализированные сегменты V-областей как H-, так и L-цепей. Уникальность структуры V-областей (и H-, и L-цепей) обуславливает наличие у них особых антигенных детерминант (рис. 1.4), называемых *идиотопами*. Набор идиотопов на молекуле любого антитела обозначают как *идиотип* (гл. 9). Идиотопы могут быть построены из характерных участков V-областей только лишь H-цепей или же L-цепей, но в большинстве случаев в образовании идиотопа участвуют обе цепи сразу. Некоторые идиотопы зависят от структуры антигенсвязывающего участка антитела, и если этот участок занят антигеном, то антиидиотопическое антитело уже не может реагировать с антителом, имеющим данный идиотоп. Такие идиотопы называют «сайт-ассоциированными». Другие идиотопы, по-видимому, не имеют такой тесной связи с антигенсвязывающими участками. Вполне возможно, что специфические для идиотопов T-клетки и антитела играют важную роль в регуляции иммунной системы (гл. 22). Согласно теории иммунной сети, антиидиотипичес-

кие антитела могут служить главными регуляторными элементами иммунной системы.

Константные области H-цепей, будучи различными у разных классов иммуноглобулинов, определяют особые биологические функции каждого класса антител: а) IgM-антитела могут активировать систему комплемента (гл. 24); б) IgA-антитела секретируются в различные жидкости тела и обеспечивают секреторный иммунитет; в) IgE-антитела прикрепляются к специфическим рецепторам на поверхности тучных клеток и базофилов; и если они связываются с антигеном, из клеток начинают высвобождаться заключенные в них биологически активные вещества, вызывая аллергические явления (гл. 27); д) IgD-антитела функционируют почти исключительно в качестве мембранных рецепторов для антигена (гл. 10), и наконец, е) IgG-антитела проявляют разнообразные виды активности, в том числе способность проникать через плацентарный барьер.

IgD-, IgG- и IgE-антитела, как правило, представляют собой момеры, построенные из двух H- и двух L-цепей. IgM-антитела построены из пяти таких мономеров, но в тех случаях, когда используются в качестве мембранных рецепторов, они бывают представлены лишь одним мономером. Антитела IgA-класса могут быть мономерными или полимерными. Молекулы антител, состоящие из нескольких мономеров, содержат дополнительную полипептидную цепь, так называемую J-цепь, удерживающую момеры вместе.

Молекулы каждого класса иммуноглобулинов могут существовать как в виде секретируемых антител, так и в виде молекул, прикрепленных к клеточной мембране, — в этом случае они служат рецепторами В-лимфоцитов (гл. 10). Рецепторы подавляющего большинства В-лимфоцитов относятся к IgM- и IgD-классам. Способность иммуноглобулинов функционировать в виде секретируемых белков и в виде стабильных мембранных рецепторов обеспечивается структурными различиями в концевых участках этих двух разновидностей молекул. В мембранной форме имеются гидрофобный участок, встроенный в мембрану, и короткий цитоплазматический участок. Остальные области мембранных и секретируемых форм иммуноглобулинов в основном одинаковы. Именно эти химические особенности и обеспечивают сходство между рецепторами В-клетки и продуктом секреции тех антителообразующих клеток, которые из нее возникают.

1.3.2. Переключение

Главы 7, 8 и 19

Хотя отдельная В-клетка всегда экспрессирует один и тот же V-участок L- и H-цепей, она способна «переключать» класс синтезируемого иммуноглобулина. Так, например, клетка, которая экспрессирует рецепторы IgM- и IgD-класса, может дифференцироваться в антителообразующую клетку, секретирующую IgA- (или IgG-, или IgE-) антитела. После переключения молекула иммуноглобулина содержит в основном такой же V-участок, какой был у IgM- и IgD-рецепторов данной клетки, за исключением лишь тех мутационных изменений, которые могут возникать в генах, кодирующих V-область.

Процесс переключения имеет фундаментальное значение для иммунной системы. Наиболее очевидное его следствие состоит в том, что ранние этапы иммунного ответа (как на протяжении жизни животного, так и в ответе отдельного клона) связаны преимущественно с IgM, в то время как на более поздних этапах преобладает один или несколько других классов иммуноглобулинов. Регуляторные процессы, контролирующие экспрессию разных классов иммуно-

глобулинов, пока еще очень плохо изучены. Накапливается все больше данных о том, что существует специализированная группа Т-клеток, управляющих экспрессией IgE- и IgA-антител. Они либо обеспечивают переключение клеток-предшественников на экспрессию IgE- или IgA-антител, либо вызывают пролиферацию и дифференцировку уже переключенных клеток (гл. 18 и 19).

1.3.3. Генетика

Главы 8 и 9

В настоящее время установлено, что каждая Н- и L-полипептидная цепь иммуноглобулинов кодируется несколькими генетическими элементами, которые в ДНК первичных половых клеток физически разобщены, но объединяются в В-лимфоцитах и антителообразующих клетках, образуя единый активный ген (рис. 1.5). Вариабельные домены L-цепей κ -типа контролируются двумя разными



Рис. 1.5. Организация и трансляция *Igh*-генов. Н-цепи иммуноглобулинов кодируются четырьмя различными генетическими элементами — *Igh-V* (*V*), *Igh-D* (*D*), *Igh-J* (*J*) и *Igh-C*. Гены *V*, *D* и *J* совместно кодируют вариабельную (*V*) область Н-цепи, ген *Igh-C* кодирует С-область. Одну и ту же *V*-область можно обнаружить в сочетании с любой из С-областей (μ , δ , γ_3 , γ_1 , γ_{2b} , γ_{2a} , ϵ и α). В геноме первичных половых клеток *V*-, *D*- и *J*-гены находятся далеко друг от друга, в каждый из них существует во

многих вариантах. В ходе развития лимфоцита происходит транслокация отдельных *V*- и *D*-генов, так что они оказываются вблизи одного из *J*-генов; промежуточные гены вырезаются, и возникает единый генный комплекс *VDJ*. Вначале этот комплекс экспрессируется вместе с С-генами μ и δ , но в дальнейшем может произойти его транслокация, и он окажется вблизи от одного из других С-генов, например α , — в этом случае будет экспрессироваться цепь *VDJ α* .

ми генами, *Igh-V* (V_x) и *Igh-J* (J_x). У мыши V_x -ген кодирует первые 95 аминокислот *V*-области, а J_x — остальные 12 аминокислот. В первичных половых клетках эти V_x - и J_x -гены находятся на большом расстоянии друг от друга, но в ходе развития лимфоцита они объединяются. При ассоциации с геном константной части κ -цепи, расположенным сравнительно близко к J_x -гену, получается единый активный ген. Количество V_x -генов, способных участвовать в формировании κ -цепей, довольно велико — возможно, около 300. Различных J_x -генов имеется пять. Соответственно комбинаторное объединение V_x - и J_x -генов может обеспечить примерно 1500 вариантов L-цепей. Еще большее разнообразие может возникнуть в том случае, если транслокация, приводящая к объединению V_x - и J_x -генов, происходит не вполне точно, и в результате на стыке этих

двух генов кодируются разные аминокислоты. Количество различных L_H -цепей, которые могут быть построены в результате комбинаторного объединения, может увеличиваться еще больше в результате соматических мутаций. Таким образом, при довольно ограниченном количестве генетической информации, имеющейся в первичных половых клетках (гаметах), число различных L_H -цепей может быть весьма большим.

Гены H-цепей организованы в принципе так же, но отличаются еще более сложной организацией (рис. 1.5). Прежде всего V-домен H-цепей образуется благодаря комбинаторному объединению трех типов гаметных генов: *Igh-V* (V_H), *Igh-D* (D_H) и *Igh-J* (J_H). Это обеспечивает еще большее разнообразие H-цепей по сравнению с L-цепями. Кроме того, один и тот же генный комплекс *VDJ* может быть экспрессирован вместе с любым из генов, кодирующих C-области H-цепи (*Igh-C* гены).

J_H -гены расположены недалеко от *Igh-μ*-гена, поэтому сборка генного комплекса *VDJ* происходит рядом с $μ$ -геном константной области. Этим объясняется тот факт, что в ходе иммунного ответа первыми синтезируются именно IgM-антитела, и они же содержатся в мембране большинства В-лимфоцитов в качестве рецепторов. У мыши C-гены H-цепей расположены в следующем порядке, начиная с 5'-конца: $μ$, $δ$, $γ_3$, $γ_1$, $γ_{2a}$, $γ_{2b}$, $ε$, $α$. Вероятно, в процессе транскрипции образуется единая первичная РНК, которая соответствует *VDJ*-, $μ$ - и $δ$ -гену, а также большим отрезкам ДНК, разделяющим эти гены. Последующее формирование зрелой РНК для синтеза $μ$ - или $δ$ -цепи осуществляется путем сплайсинга. Такая схема хорошо объясняет совместную экспрессию IgM и IgD в качестве мембранных иммуноглобулинов на поверхности большинства клеток.

Для возникновения генов, обеспечивающих синтез IgG, IgA и IgE, требуется, по-видимому, какой-то другой генетический механизм (рис. 1.5). Очевидно, что при этом происходит транслокация гена *VDJ* из положения 5' по отношению к гену $μ$ в аналогичное положение 5' по отношению к генам $γ$, $α$ или $ε$. Действительно, на 5'-концах всех генов константной области (за исключением $δ$) были обнаружены характерные последовательности, обеспечивающие транслокацию. Их обозначили как участки переключения (S-районы). Таким образом, биологический феномен переключения обусловлен рекомбинациями, касающимися C-областей иммуноглобулинов. Способы регуляции этих рекомбинаций ДНК являются в настоящее время предметом интенсивных исследований.

1.3.4. Аллельное исключение и экспрессия единичной L-цепи

Главы 8 и 9

Как правило, рекомбинация, ведущая к образованию активного гена H-или L-цепи, происходит только в одной из двух аллельных хромосом. В результате большинство В-клеток и антителообразующих клеток продуцирует L-и H-цепи только одной из двух альтернативных аллотипических форм, которые детерминированы соответствующими аллельными генами. Этот феномен экспрессии только одного аллеля в каждой клетке носит название *аллельного исключения*. Пока неизвестно, является ли аллельное исключение активным процессом, иначе говоря — не вызывает ли успешная рекомбинация в одной хромосоме угнетения рекомбинационных событий в аллельной хромосоме, или это пассивный процесс. Последнее означало бы, что рекомбинация сопряжена

с высокой частотой ошибок и что вероятность успешной рекомбинации сразу в двух хромосомах одной клетки очень мала.

Наряду с данными о том, что в любой клетке только одна хромосома образует активный *H*- или *L*-ген, имеются данные об упорядоченности процесса рекомбинации во времени. Так, в ряду В-лимфоцитов человека рекомбинация *H*-гена предшествуют рекомбинации κ -гена, а последние осуществляются раньше, чем рекомбинация λ -гена. Успешная рекомбинация κ -гена, по-видимому, препятствует рекомбинации λ -гена. В результате в клетке экспрессируется только один тип *L*-цепи.

Практический результат всех этих событий состоит в следующем: единичная В-клетка экспрессирует рецепторы, состоящие из одного типа *L*-цепи и одного типа вариабельных областей *H*-цепи. Эти данные как будто подтверждают крайние варианты клональной теории иммунного ответа хотя бы в отношении В-лимфоцитов, у которых потомки каждой родоначальной для клона клетки экспрессируют антитела одной специфичности.

1.3.5. Связывание антигена

Глава 23

Каждая пара цепей *H* — *L* в молекуле иммуноглобулина образует антигенсвязывающий центр. Связывание антигена такими центрами основано на нековалентных взаимодействиях и может быть понято в рамках представлений о равновесных термодинамических процессах (рис. 1.6). Константу равновесия (аффинность, сродство) при взаимодействии между простым моновалентным антигеном и антителами можно измерить несколькими разными способами. Антигенсвязывающие центры данной молекулы могут связать несколько разных антигенов. Как правило, такие антигены обладают структурным сходством и носят название перекрестнореагирующих. Иногда оказывается, что гомогенная популяция молекул антител (например, продуцируемых гибридомой или миеломой) способна связывать различные молекулы с очень малым структурным сходством или вовсе несхожие. В этом случае говорят о мультиспецифическом связывании, которое объясняют образованием связей в различных участках внутри антигенсвязывающего центра (субсайтах).

Биологические последствия связывания антигена, такие, как активация системы комплемента или освобождение медиаторов анафилаксии, по-видимому, обусловлены главным образом перекрестным связыванием иммуноглобулиновых молекул при их взаимодействии с мультивалентными антигенами. Пока неясно, приводит ли связывание антигена к существенным аллостерическим изменениям в молекуле иммуноглобулина, которые ведут к проявлению биологических функций.

В большинстве случаев популяции антител, появляющиеся в сыворотке иммунизированных животных, представляют собой гетерогенный набор молекул с разными антигенсвязывающими центрами и с различной аффинностью к антигену. Это относится даже к антителам, специфическим для отдельной антигенной детерминанты или эпитопа. В связи с этим определение аффинности такой популяции молекул дает усредненную оценку. Как правило, приводят среднюю характеристическую константу ассоциации (K_0) для связывания антителами моновалентного антигена в условиях, когда занята половина антигенсвязывающих центров.

Гетерогенность популяции антител по аффинности и специфичности отражает гетерогенность клеток, секретирующих антитела. Каждая антителообразу-



Рис. 1.6. Равновесное связывание одновалентных лигандов с антителом. Показана величина отношения связанного лиганда со свободным $[B/F]$ в зависимости от концентрации связанного лиганда $[B]$. Специфические антитела к данному лиганду, содержащиеся в сыворотке, гетерогенны. Поэтому зависимость между $[B/F]$ и $[B]$ изображается не прямой, а кривой линией. Для вычисления «средней» константы ассоциации, характеризующей популяцию анти-

тел (K_0), берут точку, где замещена половина антигенсвязывающих участков антител (т. е. при $[B] = [S_0/2]$). Для популяции антител, полученных вскоре после иммунизации («ранние» антитела), K_0 обычно ниже, чем для популяции антител, появляющихся на поздних сроках иммунизации («поздние» антитела). Это явление («созревания аффинности») объясняется, по крайней мере частично, процессом отбора среди клонов предшественников антителообразующих клеток.

ющая клетка вырабатывает гомогенную популяцию молекул. Часто отмечают, что с увеличением срока после иммунизации происходит повышение средней аффинности антител (рис. 1.6). Это «созревание иммунного ответа» отражает отбор клеток, образующих более аффинные антитела, и, вероятно, несет определенный биологический смысл, так как позволяет очень малому количеству антител более эффективно реагировать с антигеном и создавать защиту при введении микроорганизмов в организм, который уже встречался ранее с данным возбудителем.

Тот факт, что отдельная антителообразующая клетка продуцирует антитела лишь одной специфичности, позволил создать метод, обеспечивающий получение практически неограниченного количества гомогенных, или моноклональных антител (гл. 28). Слияние активированных В-клеток с клетками плазматоциты приводит к возникновению гибридов соматических клеток (гибридом). Гибридома растет в культуре ткани подобно родительской злокачественной плазматоцитоме и секретирует большое количество иммуноглобулина, специфичность которого определяется генами нормальной В-клетки, участвовавшей в слиянии. В настоящее время для слияния используют такие плазматоцитомы, которые утратили свои иммуноглобулиновые гены. Соответственно возникающие гибриды проду-

цируют только иммуноглобулины нормальной В-клетки. Получаемые этим методом антитела имеют неоценимое значение для обнаружения антигенов (гл. 17 и 29), для очистки белков, а также в качестве диагностических и терапевтических средств.

1.4. Т-лимфоциты

1.4.1. Развитие Т-клеток

Главы 4 и 6

Тимусзависимые лимфоциты, как и В-лимфоциты, образуются из стволовых клеток кроветворной ткани. Предшественники Т-лимфоцитов поступают в тимус, где происходит их созревание (рис. 1.7). Поскольку главная особен-

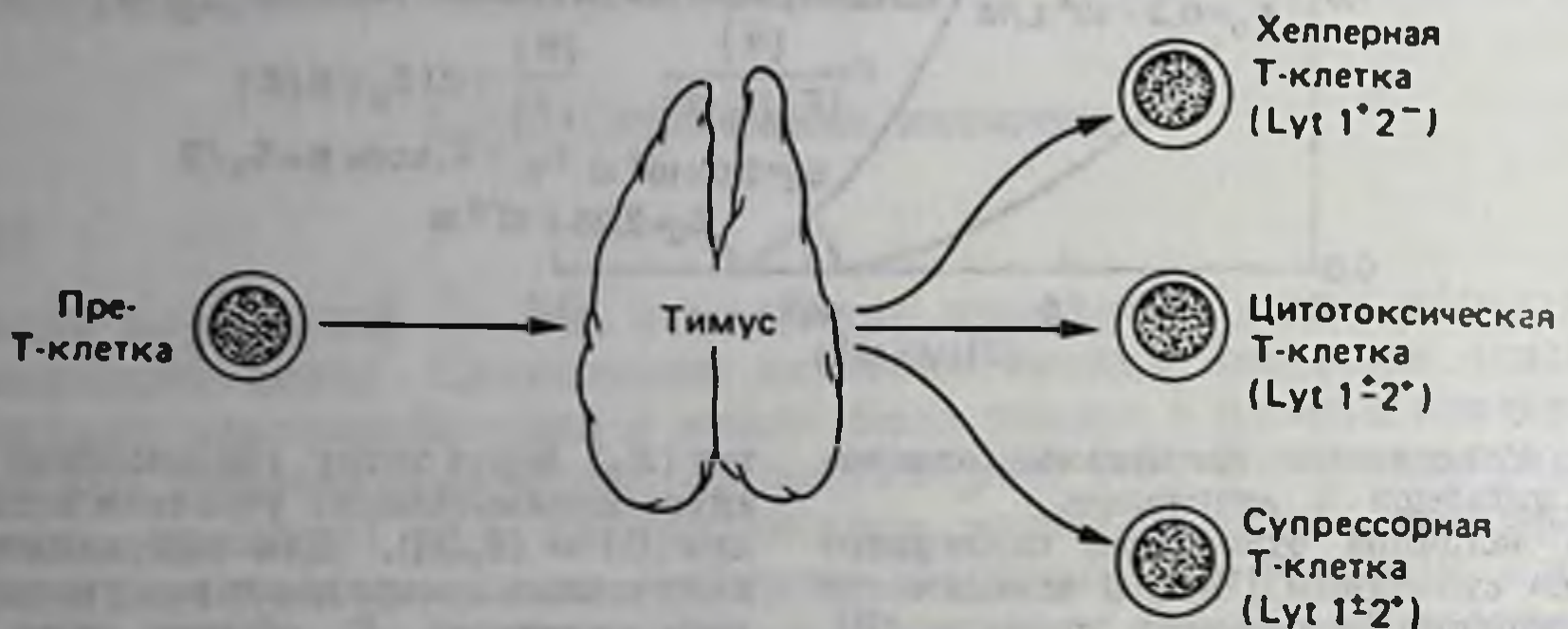


Рис. 1.7. Дифференцировка Т-клеток. Предшественники Т-клеток, обнаруживаемые в гематопозитической ткани, поступают в тимус, претерпевают там дифференцировку и выходят из тимуса уже в виде клеток с различными функциями, несущих на себе характерные маркеры. Пока неизвестно, может ли единая пре-Т-клетка превращаться в любой из показанных на рисунке вариантов Т-клеток.

или существуют три разных вида пре-Т-клеток. Цитотоксические и супрессорные Т-клетки изображены как клетки с маркерами $Lyt\ 1^{\pm}2^{+}$. Последние данные говорят о том, что у них действительно имеется небольшое количество маркера $Lyt\ 1$, но антитела к $Lyt\ 1$ не вызывают лизиса этих клеток в присутствии комплемента.

ность специфических Т-клеток — это их гетерогенность (хелперные, супрессорные и цитотоксические Т-клетки), было бы очень важно установить, имеется ли для Т-клетки каждого типа особая самообновляющаяся стволовая клетка, а если ее не существует, то на какой стадии развития происходит дивергенция клеток, предназначенных для выполнения разных функций. Этот важный вопрос пока еще не решен.

В тимусе имеются две разные зоны: корковая и мозговая. Раньше считали, что незрелые тимоциты сначала появляются в периферической части коркового слоя, распространяются к центру, проникают в мозговое вещество, где заканчивают свою дифференцировку, и затем уже в качестве зрелых Т-клеток мигрируют в периферические лимфоидные ткани. Однако последние данные дают основание думать, что эта простая схема не совсем точна и что многие тимоциты мозговой зоны, возможно, принадлежат к другому ряду дифференцировки, чем тимоциты корковой зоны.

В тимусе происходят важные события, определяющие специфичность периферических Т-клеток организма. Было показано, что в тимусе может осуществ-

вляться элиминация клеток, способных реагировать против собственных антигенов, что и приводит к возникновению состояния Т-клеточной толерантности (гл. 20). Столь же важными представляются некоторые явления положительного отбора, происходящие в тимусе. Из главных субпопуляций Т-лимфоцитов две — Т-хелперы и Т-супрессоры — обнаруживают комплексный тип антигенной специфичности, при котором имеет место одновременное распознавание чужеродного антигена и аутологичного мембранного белка, кодируемого главным комплексом гистосовместимости (МНС). Это лежит в основе явления, обозначаемого иногда как «рестрикция по главному комплексу гистосовместимости» в клеточных взаимодействиях (гл. 15). Т-клетки, способные к одновременному распознаванию продуктов собственных МНС-генов вместе с чужеродными антигенами, могут подвергаться в тимусе положительному отбору. Это, вероятно, происходит в результате распознавания ими собственных МНС-молекул на поверхности эпителиальных клеток тимуса.

1.4.2. Субпопуляции Т-клеток

Главы 4 и 6

Клетки, созревание которых в тимусе завершилось, покидают его и присоединяются к периферической популяции Т-лимфоцитов. Существует несколько различных популяций периферических лимфоцитов, которые можно идентифицировать благодаря наличию характерных антигенов на их мембранах. Так, хелперные Т-клетки мыши имеют большое количество Lyt 1-антигена, тогда как супрессоры и их предшественники экспрессируют антигены Lyt 2; цитотоксические Т-клетки и их предшественники также являются Lyt 2⁺. Из человеческих Т-клеток хелперные имеют детерминанту ОКТ4, а супрессоры — ОКТ8.

1.4.2.1. Хелперные Т-клетки

Главы 4 и 18

Одна из наиболее важных регуляторных функций Т-лимфоцитов — это их способность стимулировать В-клетки к пролиферации и дифференцировке в антителообразующие клетки. Ответ В-клеток на большинство белковых антигенов полностью зависит от помощи Т-клеток. Такие антигены обычно обозначают как тимусзависимые (ТД) антигены, поскольку они не способны индуцировать ответ у мышей с врожденным отсутствием тимуса, у которых нельзя обнаружить периферические Т-лимфоциты. Хотя не исключено, что для других типов антигенов, таких, как растворимые полисахариды и бактериальные липосахариды (ЛПС), стимуляция антителообразования может происходить и без участия Т-клеток или их продуктов, работы, проведенные сравнительно недавно, показали, что даже и в таких случаях ответ зависит от влияния Т-клеток, по крайней мере в определенных условиях. В связи с особенностями своего стимулирующего действия бактериальный ЛПС и родственные ему антигены получили название антигенов типа 1 (или иногда Т1-1), а растворимые полисахариды — антигенов типа 2, или Т1-2 (гл. 3 и 10).

Помощь Т-клеток может осуществляться по крайней мере двумя различными способами (табл. 1.1; рис. 1.2). Один из них требует прямого взаимодействия хелперной Т-клетки и реагирующей В-клетки (когнатная помощь). По-видимому, Т-клетка распознает детерминанты антигенной молекулы, кото-

рая уже фиксирована на В-клетке в результате взаимодействия со специфическим В-клеточным рецептором. Эта Т-клетка одновременно распознает также и продукт МНС-гена на поверхности В-клетки, называемой молекулой МНС класса II. Природа медиатора, передаваемого от Т-клетки к В-клетке при такой помощи (когнатной), пока не вполне установлена. Несколько групп исследователей сообщили о растворимых факторах, выделенных из Т-клеток, которые, по-видимому, сочетают специфичность в отношении антигена и способность к одновременному распознаванию молекул класса II (гл. 11).

Начальная активация Т-клетки зависит от одновременного распознавания ею антигена и молекулы класса II, происходящего обычно на поверхности специализированной антиген-презентирующей клетки (гл. 5 и 15). Антиген-презентирующей активностью обладают макрофаги, несущие антигены класса II, эпителиальные клетки Лангерганса, клетки Купфера, дендритные клетки и клетки некоторых линий В-лимфом. Остается неясным, какую роль в начальной активации Т-клеток играют нормальные В-клетки. Не до конца выяснена также функция антиген-презентирующих клеток в этом процессе; однако установлено, что важное значение имеет здесь продуцирование этими клетками интерлейкина-1 (IL-1), который, очевидно, способствует прохождению Т-клетками фаз клеточного цикла S_0 или S_1 (гл. 5 и 12).

Хелперная функция Т-клеток в активации В-клеток может осуществляться также путем образования растворимых неспецифических хелперных факторов, часто называемых лимфокинами (гл. 21). К ним относятся и оба фактора роста, в первую очередь фактор, регулирующий пролиферацию В-клеток в ответ на антигенную стимуляцию, и факторы дифференцировки, иногда обозначаемые как Т-замещающие факторы, которые обеспечивают превращение пролиферирующих В-клеток в антителообразующие клетки. Недавно полученные данные в опытах с клонированными долгоживущими линиями антиген-специфических Т-клеток (гл. 30) говорят о том, что одна и та же Т-клетка может осуществлять хелперную функцию как на основе близкого (когнатного) взаимодействия, так и с помощью медиатора. Как уже упоминалось выше, среди В-клеток имеются такие (В-клетки L_{ub} 5⁻), которые нечувствительны к фактор-зависимому хелперному действию и нуждаются в когнатной помощи, по крайней мере при ответе на тимусзависимые антигены.

Существует предположение, что кроме этих форм хелперного действия некоторые Т-клетки могут играть роль усилителя, способствуя избирательному росту и (или) дифференцировке В-клеток, обладающих рецепторами с особым идиотопом или набором идиотопов (гл. 18 и 22). Действием этих хелперных Т-клеток можно в некоторых случаях объяснить, почему при антительном ответе на простые антигены преимущество получают некоторые клетки-предшественники, несущие особые идиотопы. Так, например, у мышей линии BALB/c при иммунизации гаптеном фосфорилхолином большую часть специфических антител составляют молекулы с особым идиотопом (T15). Было показано, что существуют специфические хелперные Т-клетки, усиливающие активацию T15⁺-предшественников. Эти хелперные клетки, очевидно, не способны заменить обычную Т-клетку, помощь которой основана на близком (когнатном) взаимодействии или на продуцировании соответствующих факторов: по-видимому, они избирательно действуют на некоторые В-клетки, уже стимулированные обычными Т-клетками. Чтобы объяснить Т-клеточную регуляцию экспрессии различных классов иммуноглобулинов, было высказано предположение о существовании еще Т-клеток, специфических не для идиотопов, а для классов иммуноглобулинов. В настоящее время получены данные, подтверждающие это предположение.

1.4.2.2. Супрессорные Т-клетки

Главы 4 и 18

Другая важная регуляторная функция Т-клеток состоит в их способности угнетать иммунный ответ. Эта супрессорная активность — свойство популяции супрессорных Т-клеток. Современные исследования показали, что в действительности для активации супрессорных Т-клеток и выполнения ими этой функции необходимы другие клетки, принимающие участие в дифференцировке супрессора. В одном случае исходной клеткой, по-видимому, является индукторная Т-клетка $Lyt\ 1^+$, которая экспрессирует антиген, кодируемый $I-J$ -субобластью МНС. Такая клетка $Lyt\ 1^+$, $I-J^+$, индуцирующая супрессор, воздействует на вторую клетку — Т-лимфоцит $Lyt\ 1^+2^+$, который называют клеткой-предшественником супрессора. В результате последний дифференцируется в эффекторную супрессорную клетку $Lyt\ 2^+$, которая, по-видимому, и дей-

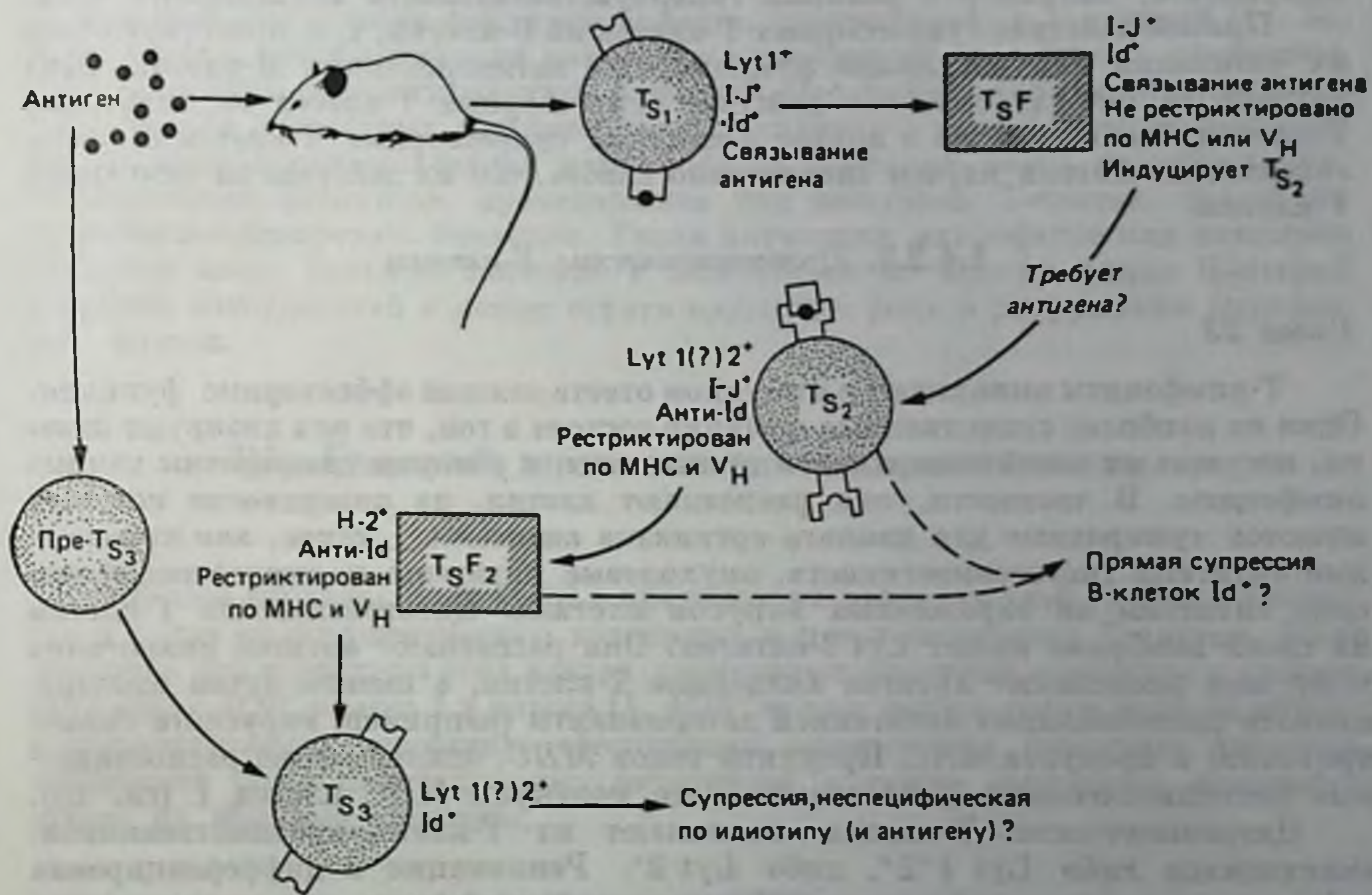


Рис. 1.8. Взаимодействие T_{S1} -, T_{S2} - и T_{S3} -супрессоров. При иммунизации антигеном у мышей возникает группа антиген-специфических T_{S1} -клеток $Lyt\ 1^+$, $I-J^+$, которые вырабатывают антиген-специфический фактор (T_{SF1}), имеющий идиотипические детерминанты и детерминанты $I-J$. Фактор T_{SF1} действует на клетки T_{S2} , проявляющие в некоторых случаях специфичность к идиотипическим детерминантам на T_{SF1} . Клетки T_{S2} имеют маркеры $Lyt\ 2^+$ и $I-J^+$. Они вырабатывают свой фактор T_{SF2} , специфический для идиотипа и действующий только на клетки соответствующего МНС- и Igh -

V -типа (т. е. рестриктированные по МНС и IgV_H). T_{SF2} действует на антиген-специфические клетки T_{S3} , имеющие на поверхности идиотипические детерминанты. По-видимому, клетки T_{S3} могут опосредовать супрессирующее действие T_{SF2} только в том случае, если они подверглись примиряющему действию антигена и были активированы. Само по себе супрессивное действие T_{S3} -клеток не является специфическим. (Germain R. N. et al. In: Immunoglobulin Idiotypes, ed by C. Janeway, E. E. Sercarz and H. Wigzell, Academic Press, New York, 1981, p. 712; печатается с разрешения.)

ствует на хелперные Т-клетки. Таким образом, этот тип супрессии осуществляется путем регуляции численности хелперных Т-клеток, вовлекаемых в иммунный ответ. Хорошо изучена и другая супрессорная система, включающая в себя три различные клеточные формы, часто обозначаемые как клетки Ts1, Ts2 и Ts3 (рис. 1.8). Клетка Ts1 специфична для антигена и вырабатывает специфический фактор TsF1, который обладает антигенсвязывающей активностью и экспрессирует антигенную детерминанту I-J. Функция TsF1 состоит, по-видимому, в том, чтобы активировать следующую клетку, называемую Ts2. В некоторых случаях специфичность клетки Ts2 направлена не против антигена, как у клеток Ts1, а против идиотопов, имеющих, как у клеток TsF1, так и у антител, против той антигенной детерминанты, которая стимулировала клетку Ts1. Недавно полученные данные показывают, что клетки Ts2 продуцируют фактор (TsF-2), активирующий антиген-специфическую клетку Ts3, а уже она фактически осуществляет супрессорное действие, подавляя неспецифически хелперные Т-клетки и некоторые Т-клетки, участвующие в клеточном иммунитете, например в реакции гиперчувствительности замедленного типа.

Прямое действие супрессорных Т-клеток на В-клетки, т. е. предотвращение их активации или регуляция функции уже активированных В-клеток, пока изучено не так глубоко, как действие супрессорных Т-клеток на хелперные Т-клетки. Точно так же и вопрос о влиянии супрессорных Т-клеток на цитотоксические клетки изучен значительно слабее, чем их действие на хелперные Т-клетки.

1.4.2.3. Цитотоксические Т-клетки

Глава 25

Т-лимфоциты выполняют в иммунном ответе важные эффекторные функции. Одна из наиболее существенных функций состоит в том, что они лизируют клетки, несущие на своей поверхности те антигены, к которым специфичны данные лимфоциты. В частности, они распознают клетки, на поверхности которых имеются чужеродные для данного организма антигены — такие, как чужеродные антигены гистосовместимости, опухолевые антигены и вирусоспецифические антигены на зараженных вирусом клетках. Цитотоксические Т-клетки на своей мембране имеют Lyt 2-антиген. Они распознают антиген аналогично тому, как распознают антиген хелперные Т-клетки, а именно путем одновременного распознавания антигенной детерминанты (например, вирусного гликопротеина) и продукта МНС. Продукты генов МНС, одновременно распознаваемые цитотоксическими Т-клетками, — это молекулы МНС класса I (гл. 15).

Цитотоксические Т-клетки возникают из Т-клеток-предшественников, являющихся либо Lyt 1⁺2⁺, либо Lyt 2⁺. Репликация и дифференцировка этих клеток происходит с участием некоторых хелперных, или усиливающих Т-клеток, действие которых осуществляется с основным с помощью растворимых факторов. Самый изученный из них — это интерлейкин-2 (IL-2), иногда называемый фактором роста Т-клеток (см. гл. 21). В самом деле, для поддержания длительно живущих линий цитотоксических Т-клеток зачастую бывает достаточно простого прибавления IL-2.

Лизис клетки-мишени цитотоксическими Т-лимфоцитами — процесс сложный. После первой стадии, которая, по-видимому, состоит в распознавании Т-клеткой соответствующего антигена и молекул класса I, имеющих на поверхности клетки-мишени, наступает вторая стадия, обозначаемая как программирование для лизиса. Она заключается в следующем: Т-клетка вызывает повреждение клетки-мишени, а затем и явный ее лизис. Отдельная цито-

токсическая Т-клетка может участвовать в нескольких циклах лизиса, но разрушаясь при этом сама.

Согласно существующим представлениям, цитотоксические Т-клетки играют особенно важную роль при защите от вирусных заболеваний, разрушая вируссодержащие клетки, а также при некоторых формах противоопухолевого иммунитета. Их значение в отторжении аллогенных трансплантатов пока не выяснено.

1.4.2.4. Другие виды Т-зависимого иммунного ответа

Глава 26

Т-клетки играют ключевую роль в ряде весьма важных иммунных реакций, включая гиперчувствительность замедленного типа (туберкулинового типа) и контактную чувствительность. Большое значение имеет активация макрофагов являющаяся аналогом гиперчувствительности замедленного типа. Активация макрофагов обусловлена действием веществ, продуцируемых Т-клеткой (гл. 5). В результате такой активации макрофаги приобретают способность разрушать некоторые виды фагоцитированных бактерий. Это особенно сильно проявляется в отношении облигатных внутриклеточных паразитов типа *Listeria monocytogenes*. В нормальных моноцитах и макрофагах листерии легко размножаются, но активация фагоцитов, происходящая под действием Т-клеток, делает их способными лизировать бактерии. Такая активация макрофагов под влиянием Т-клеток имеет большое значение в иммунитете ко многим видам бактерий и других возбудителей и может играть ключевую роль в разрушении опухолевых клеток.

1.5. Главный комплекс гистосовместимости

Глава 13

Мы уже касались роли МНС в предыдущих разделах этой главы, в частности в связи со специфичностью хелперных и цитотоксических Т-клеток. Было отмечено, что рецепторы этих клеток распознают антигены совместно с продуктами генов МНС класса I и класса II. МНС играет центральную роль во многих иммунологических явлениях, обеспечивая кодирование антигенов гистосовместимости (трансплантационных антигенов), а также регуляцию иммунного ответа на обычные антигены.

1.5.1. Молекулы МНС класса I

Главы 13 и 14

МНС расположен в хромосоме 17 у мыши и хромосоме 6 у человека (рис. 1.9); он состоит из генов нескольких различных типов, среди которых имеются гены, кодирующие молекулы МНС класса I. Эти молекулы представляют собой мембранные гликопротеины, обнаруживаемые на поверхности практически всех клеток. Они построены из двух полипептидных цепей: одной тяжелой с мол. массой 45 000 Да, кодируемой геном МНС, и связанной с ней нековалентно легкой цепью с мол. массой 12 000 Да (β_2 -микроглобулин) (рис. 1.10). У мыши β_2 -микроглобулин кодируется геном, расположенным

в хромосоме 2. Тяжелая цепь высокополиморфна, что обуславливает антигенные различия между молекулами класса I у индивидуумов, принадлежащих к одному биологическому виду. Напротив, аллельный полиморфизм у β_2 -микроглобулина проявляется лишь в очень небольшой степени.

Молекулы класса I, по-видимому, состоят из трех внеклеточных областей или доменов примерно одинаковой длины, обозначаемых N, C1 и C2. Кроме

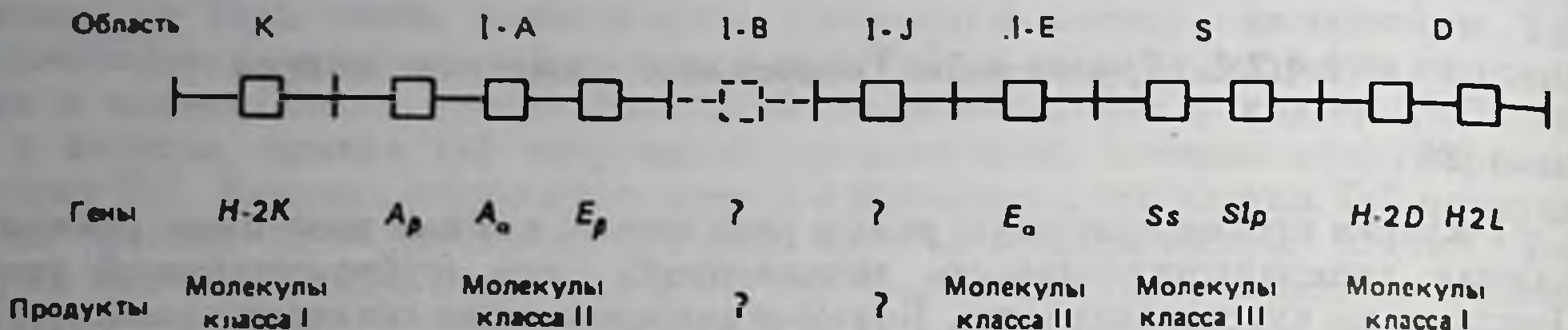


Рис. 1.9. Структура главного комплекса гистосовместимости (МНС) мыши.

МНС мыши находится в 17-й хромосоме. Он состоит из набора хромосомных сегментов, или областей, границы между которыми выявляются при рекомбинациях и которые содержат один или несколько четко охарактеризованных генетических локусов. Области обозначаются соответственно K, A, B, J, E, S и D. На рисунке показаны «маркерные» гены каждого участка и природа их продуктов. Молекулы класса I и II подробно описаны в тексте. Молекулы класса III —

это компоненты комплемента и близкие им белки. Для I-A характерен набор I γ -генов, которые картируются в этом участке. Не обнаружено кодирующих генов или кодируемых ими продуктов, и поэтому некоторые исследователи полагают, что этой области не существует. Возникли также неясности относительно I-J. Антитела к области I-J были получены, однако при использовании молекулярно-генетических методов не удалось обнаружить в этом участке полиморфный ген.

того, они имеют гидрофобную часть, которая пронизывает мембрану, и короткий С-концевой цитоплазматический «хвост». Существует ограниченная гомология первичной структуры отдельных внеклеточных доменов с таковой С-области иммуноглобулинов. β_2 -Микроглобулин по размерам сходен с иммуноглобулиновыми доменами и также обладает гомологией с доменами С-области иммуно-



Рис. 1.10. Структура молекул класса I и II. Молекулы МНС класса I состоят из двух цепей. Одна цепь, кодируемая геном МНС (мол. масса 45 000 Да), построена из трех внеклеточных доменов N, C1 и C2, трансмембранного и цитоплазматического доменов. Эпитопы, распознаваемые антителами к антигенам класса I, расположены на N-, C1- и C2-доменах, а участки, распознаваемые цитотоксическими Т-клетками, по-видимому, находятся на N- и C1-доменах. Вторая цепь (β_2 -микроглобулин) кодируется геном, расположенным вне МНС. Молекулы МНС класса II состоят из двух цепей (α и β), которые кодируются I-областью МНС. Каждая цепь имеет два внеклеточных домена, трансмембранную часть и цитоплазматический участок.

глобулинов. Из этого можно сделать два вывода: либо гены иммуноглобулинов, молекул класса I и β_2 -макроглобулина происходят от общего исходного предшественника, либо они претерпели конвергентную эволюцию с возникновением структур, свойственных мембранным молекулам.

У мышей выявлено три локуса, кодирующих высокополиморфные молекулы МНС класса I. Они обозначаются как H-2K, H-2D и H-2L. Соответствующие

докусы у человека — это *HLA-A*, *HLA-B* и *HLA-C*. Существуют и другие молекулы МНС, но они не обладают полиморфизмом, характерным для описанных выше молекул. Некоторые из этих молекул экспрессируются только у конкретного типа клеток, т. е. выступают в качестве дифференцировочных антигенов. К ним относятся антигены Qa и T1a.

Структура генов, кодирующих антигены класса I, в настоящее время является предметом интенсивных исследований. Клонированные ДНК-зонды для индивидуальных молекул класса I перекрестно гибридизуются с генами

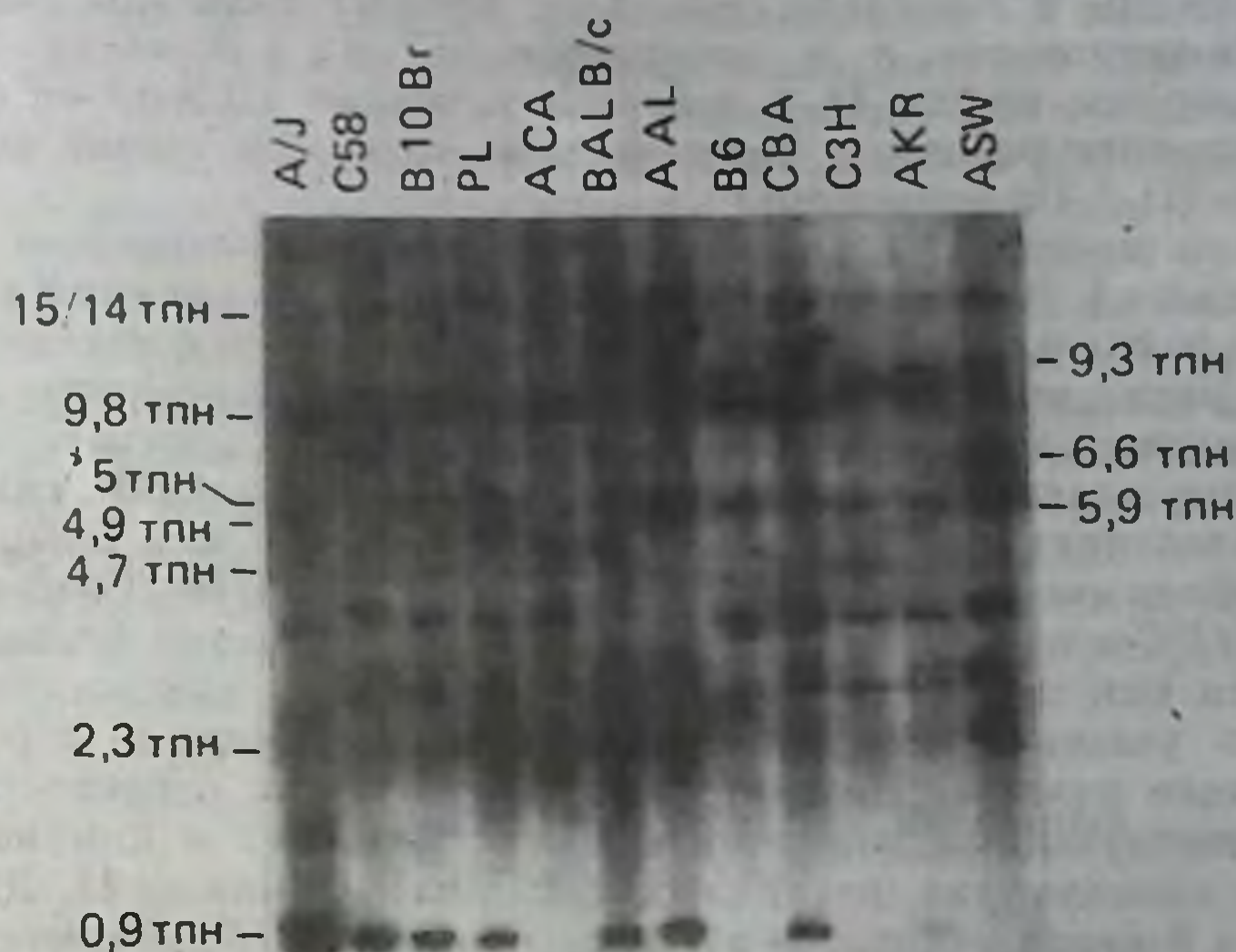


Рис. 1.11. Блот-гибридизация ДНК мыши по Саузерну после расщепления рестриктазой с использованием в качестве зонда клонированной кДНК класса I.

Геномную ДНК от нескольких линий мышей обработали рестрикционной эндонуклеазой BamHI и фракционировали электрофорезом в агарном геле. Фрагменты ДНК перенесли на нитроцеллюлозный фильтр и гибридизовали с клонированным фрагментом класса I (H-2L) ДНК, меченным ^{32}P . После гиб-

ридизации и отмывания была проведена радиоавтография. Большое количество радиоактивных фрагментов говорит о том, что имеется несколько отдельных генов, которые гибридизуются с клонированным зондом класса I. Различный размер меченых фрагментов ДНК у разных линий мышей свидетельствует об очень большом полиморфизме в структуре генов у животных с различными типами МНС. (Nature, 1982, 295, 168—170.)

каждого варианта цепей класса I. Блот-гибридизация по Саузерну геномной ДНК выявляет множество рестрикционных фрагментов, которые гибридизуются с любым кДНК-зондом класса I (рис. 1.11). Имеются прямые данные в пользу существования большого числа различных МНС-генов класса I. Их может быть больше, чем в настоящее время известно белков этого же класса. Для некоторых генов класса I уже известна нуклеотидная последовательность. Как правило, ген имеет прерывистое строение: последовательности, кодирующие домены (экзоны), перемежаются интронами (некодирующими последовательностями).

Молекулы класса I определяют специфичность узнавания мишени аллогенными клетками-киллерами и распознаются вместе с вирусными, опухолевыми и другими мембранными антигенами цитотоксическими Т-клетками, формально являющимися специфическими для этих антигенов (гл. 15).

1.5.2. Молекулы МНС класса II

Глава 13 и 14

Молекулы класса II кодируются отдельным набором генов. У мыши такие гены обнаружены в I-области (рис. 1-9); поэтому молекулы класса II часто называют Ia-антигенами, т. е. ассоциированными с I-областью. Аналогичным образом молекулы класса II у человека называют HLA-Dг-антигенами (как показали недавние работы, у человека существует еще второй набор молекул класса II — HLA-Dс-молекулы).

Молекулы класса II распространены в тканях значительно меньше, чем молекулы класса I. В основном их обнаруживают на поверхности клеток иммунной системы, в том числе В-клеток, на некоторых клетках моноцитарно-макрофагального ряда, включая эпителиальные клетки Лангерганса, дендритные клетки и тимусный эпителий, а также на некоторых Т-клетках.

Молекулы класса II представляют собой мембранные гликопротеины, построенные из двух полипептидных цепей (α и β) (рис. 1.10). Альфа-цепи имеют мол. массу около 33 000 Да, а бета-цепи — 28 000 Да. Обе цепи являются продуктом МНС-генов. Первые структурные исследования молекул класса II показали, что как α -, так и β -цепь состоит из двух внеклеточных доменов, гидрофобного участка, который пронизывает мембрану, и короткого цитоплазматического участка. Внеклеточные домены имеют ограниченную гомологию с соответствующими доменами молекул класса I и иммуноглобулинов.

У мыши описано два различных типа молекул класса II. Для одного из них гены α - и β -цепей находятся в I-A-субобласти МНС; соответственно молекулу этого типа обозначают как I-A молекулу класса II. У другой молекулы класса II α -цепь закодирована в I-E-субобласти МНС, а β -цепь — в I-A-субобласти, но отличается от β -цепи, участвующей в построении I-A молекул класса II. Этот тип носит название I-E-молекулы класса II.

Альфа-цепи I-A (A_α -цепи) могут образовывать пары с β -цепями молекул I-A (A_β -цепями), которые кодируются в той же или в аллельной хромосоме. Это правило справедливо также для взаимодействия цепей E_α и E_β . Однако A_α -цепи не способны образовывать пары с E_β -цепями, а E_α -цепи — с A_β -цепями. В результате образования пар между цепями, которые кодируются в аллельных хромосомах, в гетерозиготном организме могут возникать такие молекулы класса II, в которых экспрессированы антигены, не обнаруживаемые ни у одного из родителей.

Гены, кодирующие A_α -, A_β -, E_α - и E_β -цепи, были недавно клонированы, и в настоящее время ведется интенсивная работа по определению структуры полиморфных форм этих генов.

Молекулы класса II играют решающую роль в стимулировании пролиферации аллогенных Т-клеток, составляющей основу иммунного ответа в смешанной культуре лимфоцитов. Вместе с обычными антигенами эти молекулы распознаются хелперными Т-клетками и другими Т-клетками $Lyt\ 1^+$, в частности участвующими в реакции гиперчувствительности и теми, которые вырабатывают IL-2 и усиливают таким образом ответ цитотоксических Т-лимфоцитов (гл. 15 и 18).

1.5.3. Другие молекулы, кодируемые МНС

Глава 13

Гены МНС кодируют также другие молекулы, имеющие важное иммунологическое значение. Среди них — несколько компонентов системы комплемента, включающей в себя примерно 19 различных белков. Эта система обычно запускается в результате взаимодействия антиген — антитело и действует по принципу каскадной амплификации, выполняя целый ряд важных биологических функций (гл. 24). МНС кодирует три компонента системы комплемента, из которых два участвуют в классическом пути активации (С2 и С4), а третий — в альтернативном пути (фактор В). У мышей компонент С2 известен также под названием «белок Ss», а структурно близкий белок, который лишен функции С2 и кодируется тесно сцепленным структурным геном, — как «белок Slp». Гены белков Ss и Slp были обнаружены в S-области мышьяного МНС (рис. 1.9).

Особый интерес привлекает антигенная детерминанта (или набор детерминант), закодированная в субрайоне I-области, обозначаемом I-J. Обусловлен такой интерес тем, что эти детерминанты экспрессированы на клетках супрессорного ряда (гл. 18). Кроме того, детерминанты, кодируемые субобластью I-J, были обнаружены в составе растворимых антиген-специфических факторов как TsF1, так и TsF2 типа. Поскольку растворимые факторы этого типа, возможно, соответствуют секреторным аналогам мембранных рецепторов на клетках Ts1 и Ts2, эти данные могут означать, что антигенные детерминанты I-J ассоциированы с антигенсвязывающими рецепторами некоторых Т-клеток. До настоящего времени обнаружить молекулярно-генетическими методами локус для генов I-J в I-области не удалось.

1.5.4. Роль молекул класса II в клеточных взаимодействиях

Глава 15

Система распознавания антигена у ряда Т-клеток имеет сложную природу. Хелперные Т-клетки, Т-клетки, пролиферирующие при антигенной стимуляции, Т-клетки, вырабатывающие факторы типа IL-2, а также другие Т-клетки $Lyt1^+$, участвующие в клеточных взаимодействиях, по-видимому, одновременно распознают антигенную детерминанту (эпитоп) и некоторые структуры на молекулах МНС класса II (рис. 1.12). Последние получили недавно название «гистотопов». Таким образом, Т-клетка $Lyt 1^+$, которая номинально обладает специфичностью к эпитопу овальбумина, в действительности распознает этот эпитоп вместе с гистотопом молекулы класса II. Т-клетки, специфические в отношении овальбумина и сингенного гистотопа класса II, как правило, нельзя стимулировать овальбумином, который находится в комплексе с чужеродными молекулами класса II.

Процесс распознавания антигена Т-клетками и последующей активации этих клеток раскрыт еще не полностью. Однако в большинстве случаев Т-клетка нуждается в том, чтобы антиген находился на специализированной антиген-презентирующей клетке, на поверхности которой имеются молекулы класса II (гл. 5). При иммунизации животного будут стимулироваться только те Т-клетки, которые специфичны для антигена, ассоциированного с собственными гистотопами класса II, поскольку *in vivo* все клетки, презентующие антиген, разумеется, принадлежат иммунизированному животному. Если примированные Т-клетки стимулировать *in vitro*, то они реагируют на антиген только

в том случае, если презентирующая его клетка имеет такой же МНС-тип, как и донор Т-клеток. Это явление часто называют рестрикцией клеточных взаимодействий по антигенам гистосовместимости.

Можно считать доказанным, что клетки, способные реагировать на антиген в сочетании с гистотопами собственных антигенов класса II, составляют большую часть непримированных Т-клеток. Последние данные показывают, что это обусловлено какими-то внутритимусными процессами, имеющими, возможно, природу отбора и приводящими к формированию такой популяции Т-клеток, которая способна распознавать антиген вместе с собственными молекулами

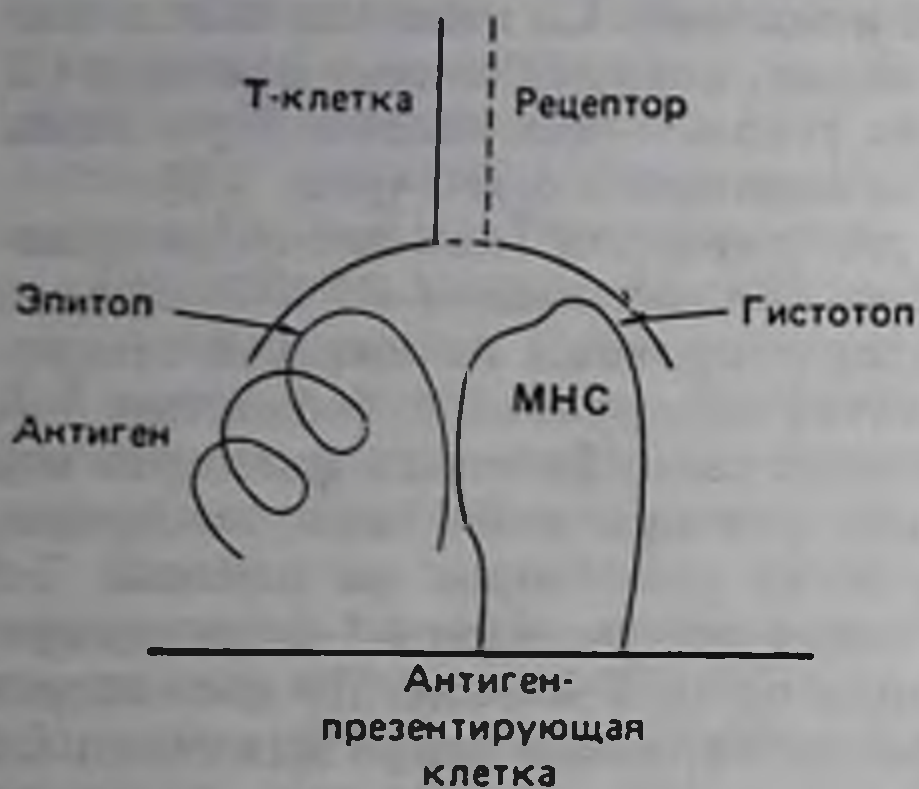


Рис. 1.12. Одновременное распознавание эпитопов и гистотопов рецепторами Т-клеток, рестриктированных по МНС.

У Т-клеток, у которых при взаимодействии с В-клетками и макрофагами проявляется «рестрикция по гистосовместимости», имеется сложная система распознавания антигена. Эти клетки распознают антигенную детерминанту чужеродной молекулы (эпитоп) вместе с участком собственной молекулы МНС (гистотопом). Хелперные и другие Т-клетки типа Lyt 1+2- обычно распознают эпитопы вместе с гистотопами МНС молекул класса II. Цитотоксические Т-клетки и их предшественники, как правило, распознают эпитопы вместе с МНС-молекулами класса I. Антигенраспознающим элементом Т-клеток могут быть либо единый рецептор, специфический для эпитопа и гистотопа, либо два сцепленных рецептора, один из которых специфичен для эпитопа, а второй — для гистотопа.

класса II (гл. 6). Становится все более ясно, что Т-клетки с такой специфичностью часто могут распознавать некоторые чужеродные гистотопы класса II независимо от антигена. Это означает, что имеется сходство между комплексом антигенного эпитопа с собственным гистотопом класса II, с одной стороны, и специфическим чужеродным гистотопом класса II — с другой. Этим объясняется тот факт, что многие Т-клетки данного животного обладают специфичностью к чужим гистотопам класса II и могут быть стимулированы аллогенными клетками, давая положительную реакцию в смешанной культуре лимфоцитов.

У гетерозиготной мыши $[(a + b)F_1]$ может существовать целый набор молекул класса II (гл. 13 и 14). Например, молекулы I-A класса II могут быть четырех типов. Две из них принадлежат к родительским типам: одна состоит из A_α - и A_β -цепей типа а (A_α^a и A_β^a), а вторая — из A_α^b - и A_β^b -цепей. Кроме того, могут встречаться смешанные, « F_1 -специфические» молекулы: $A_\alpha^a A_\beta^b$ и $A_\alpha^b A_\beta^a$. Поэтому популяция Т-клеток, специфических для данного эпитопа, может на самом деле состоять из целого набора клеток, каждая из которых имеет свою распознающую специфичность. Иначе говоря, каждая распознает эпитоп вместе с гистотопами одной из четырех молекул I-A класса II, а также эпитоп вместе с гистотопами различных молекул I-E класса II.

1.5.5. Молекулы класса I как элементы рестрикции

Глава 15

Примерно такой же характер распознавания антигена имеется у цитотоксических Т-клеток. Они распознают эпитопы антигена, например вирусного гликопротеина, вместе с «гистотопами» молекул МНС класса I. В результате

такого распознавания цитотоксическая клетка уничтожает мишень определенного МНС-типа, которая несет на себе соответствующий антиген. Сама феноменология одновременного распознавания в этом случае такая же, как у хелперных Т-клеток, с той лишь разницей, что распознаваемым элементом являются молекулы класса I (их иногда обозначают как элементы рестрикции). Действительно, между типом элементов рестрикции и фенотипом специфических Т-клеток имеется весьма тесная связь. Для Т-клеток Lyt 1 элементами рестрикции служат гистотопы класса II, в то время как для Т-клеток Lyt 2⁺ — молекулы класса I.

1.5.6. Физиологическое значение одновременного распознавания эпитопов и гистотопов

Главы 15, 16, 18 и 25

Комплексная специфичность Т-клеток, рестриктированных по главному комплексу гистосовместимости, имеет важное физиологическое значение. То обстоятельство, что клетки распознают антиген вместе с продуктами генов МНС, фактически означает, что процессы распознавания осуществляются путем взаимодействия с клетками другого типа. Учитывая, что такое взаимодействие — условие, необходимое для осуществления Т-клетками функций хелперного и цитотоксического типа, легко понять, насколько важную роль играет обеспечение межклеточных взаимодействий в процессе распознавания специфичности антигена. Благодаря этому взаимодействию осуществляется при вирусных инфекциях функция цитотоксических Т-лимфоцитов, разрушающих клетки, которые несут на своей мембране вирусные антигены и способны образовать множество вирусных частиц. Цитотоксические Т-клетки почти или вовсе неспособны разрушать вирусные частицы как таковые; поэтому очень важно направить их действие на зараженные вирусом клетки: одновременное распознавание вирусных антигенов и молекул класса I обеспечивает эффективность действия Т-клеток. Точно так же хелперные Т-клетки, особенно при когнатном взаимодействии, могут выполнить эту функцию только потому, что они способны распознать В-клетки, на поверхности которых имеется связанный с рецепторами антиген, и содействовать ответу этих клеток на антиген. Распознавание антигена вместе с мембранными молекулами на В-лимфоцитах и на отдельных клетках других типов представляет собой эффективный метод концентрирования активности хелперных Т-клеток на тех именно клетках, которые способны воспринять их помощь.

1.5.7. Гены специфического иммунного ответа

Глава 16

Было установлено, что способность отвечать на множество простых антигенов зависит от тех полиморфных генов класса II (или иногда генов класса I), которыми обладает данный организм. Например, при наличии аллельного *b*-варианта генов *I-A* организм обладает способностью отвечать на инсулин свиньи, но не на цитохром с голубя. Напротив, способность отвечать на цитохром с детерминируется наличием *a*-аллеля генов *I-E*, кодирующего α - и β -цепи. В то же время такие молекулы класса II не обеспечивают способности к ответу на инсулин свиньи.

Работы последних лет показывают, что процессы, контролируемые генами иммунного ответа (*Ir*), являются отражением некоторых общих закономерностей

стей, имеющих ключевое значение для Т-зависимых реакций на все антигены. По существу зависимость иммунологических реакций от *Ir*-генов представляет собой частный случай одновременного распознавания эпитопов антигена с гистотопами молекул МНС. Способность индивидуумов одного МНС-типа отвечать на данный антиген, к которому животные или люди другого МНС-типа ареактивны, отражает тот факт, что не все пары эпитоп — гистотоп являются



Рис. 1.13. Функциональные основы действия генов *Ir* при иммунном ответе.

Рестриктированные по главному комплексу гистосовместимости Т-клетки $Lyt\ 1^+$ одновременно распознают эпитопы чужеродного антигена и гистотопы молекул класса II (Ia). Животное может быть ареактивным к данному антигену из-за отсутствия у него соответствующего гена иммунного ответа (*Ir*), контролирующего в норме иммунную реакцию на этот антиген. В организме ареактив-

ного животного данный антиген в сочетании с Ia-молекулами на антиген-презентирующих клетках и В-лимфоцитах образует «непермиссивные» пары. Это может означать, что либо не возникает комплекса между антигеном и Ia-молекулами ареактивного животного («ареактивность из-за неспособности к образованию комплекса антиген-Ia»), либо комплекс образуется, но нет специфических к нему Т-клеток («ареактивность из-за пробела в репертуаре Т-клеток»).

эффективными иммуногенами. Объяснить это можно одним из следующих двух способов (рис. 1.13). В соответствии с первым для стимуляции Т-зависимого ответа необходимо взаимодействие между антигеном и рестриктирующими элементами, закодированными в МНС. Произойдет ли такое взаимодействие, фактически зависит от структуры двух взаимодействующих молекул, и если его не будет, то, следовательно, данный рестриктирующий элемент не обеспечит презентирование этого эпитопа популяции Т-клеток данного организма. Если же все МНС-рестриктирующие элементы, которыми располагает индивидуум, будут неспособны представить все эпитопы данного антигена, то и организм в целом окажется неспособным к ответу на этот антиген. Другое объяснение действию продуктов *Ir*-генов в качестве рестриктирующих элементов состоит в том, что в данном организме отсутствуют Т-клетки, способные распознавать определенную пару эпитоп — гистотоп. Естественно, отсутствие таких Т-клеток делает невозможным распознавание данного антигена в сочетании с несущими гистотоп рестриктирующими элементами. Если в организме отсутствуют Т-клетки, способные распознавать все возможные «пары» эпитопов данного антигена и гистотопов данного организма, то и организм окажется неспособным к ответу на антиген. Ареактивность будет связана с «пробелом в репертуаре». Отсутствие

Т-клеток, способных распознавать данную пару эпитоп — гистотоп, может быть следствием либо отсутствия в геноме тех генов, которые соответствуют данным рецепторам, либо элиминации Т-клеток с соответствующими рецепторами в ходе индукции толерантности к своим антигенам. Такая элиминация может быть обусловлена тем, что пары, состоящие из чужеродного эпитопа и «собственного» гистотопа, дают перекрестные реакции с некоторыми аутологичными эпитопами в сочетании с «собственными» гистотопами. Последние данные говорят о том, что общая феноменология иммунорегуляторных генов обеспечивается обоими механизмами: и неспособностью организма к образованию некоторых пар эпитоп — гистотоп, и отсутствием Т-клеток, способных распознавать данную пару эпитоп — гистотоп.

Большинство упомянутых выше *Ig*-генов являются генами МНС-молекул класса II. Это связано с тем, что в большинстве случаев изучали растворимые белки и полипептидные антигены и определяли ответ Т-клеток $Lyt\ 1^+$, реагирующих на антиген пролиферацией. Между тем *Ig*-гены контролируют также способность к иммунологическим реакциям, протекающим с участием специфических цитотоксических Т-клеток. Как было упомянуто выше, рестриктирующими элементами для таких клеток являются молекулы МНС класса I. Из этого следует, что *Ig*-гены, контролирующие специфический цитотоксический ответ, кодируют молекулы класса I.

1.6. Рецептор Т-клеток

Глава 11

Одна из самых спорных проблем современной иммунологии касается характеристики и выделения Т-клеточного рецептора для антигена. Мы не обсуждали эту проблему раньше, чтобы рассмотреть ее вместе с вопросом о распознавании Т-клетками пар эпитоп—гистотоп.

Основная информация о рецепторах Т-клеток была получена при исследовании тех субпопуляций, которые распознают свободный антиген, в частности Т-клеток супрессорного типа. Об антигенных рецепторах клеток, распознающих пары эпитоп—гистотоп, известно значительно меньше.

В этих исследованиях было использовано два общих подхода. Первый состоит в том, что функцию Т-клеток стремятся заблокировать с помощью специфических антител, распознающих те антигенные детерминанты, которые могут быть связаны с Т-клеточными рецепторами. В частности, много раз пытались выяснить, может ли антиген, связавшийся с переменными участками специфических антител (т. е. идиотопами), вступать в связь с Т-клетками, которые специфичны для этого же антигена (гл. 9 и 22). Как сообщалось, в некоторых случаях антиидиотипические антитела вызывали несомненную блокаду функции Т-клеток или связывания ими антигена. Многие из этих работ убедительно показали, что сходство между идиотопами на Т-клетках и на антителах проявляется лишь в том случае, если те и другие получены от доноров с одинаковым аллелем *Igh-V*. Эти результаты являются сильным аргументом в пользу того, что Т-клетки, в частности супрессорные, используют при построении своих рецепторов гены *Igh-V*, близкие тем, которые кодируют V-области антител. Однако молекулярно-генетические исследования антиген-специфических Т-клеточных линий и Т-клеточных гибридом, полученных слиянием таких идиотоп-положительных антиген-специфических Т-клеток с опухолевыми Т-клеточными линиями, говорят против этого. Было показано, что гены *Igh-V*, кодирующие

V-области антител с данным идиотопом, не перестраиваются в T-клетках, имеющих тот же идиотоп. В антиген-специфических T-клетках не удалось обнаружить ДНК, способной гибридизоваться с клонированной ДНК, которая соответствовала упомянутым генам *Igh-V*. Химические исследования связанных с идиотопами молекул поверхности T-клеток также не принесли значительного успеха.

Высказывалось и другое предположение: растворимые антиген-специфические продукты супрессорных T-клеток должны служить клеточными рецепторами, подобно тому как у B-клеток такую роль играют антитела в мембранно-связанной форме (гл. 4 и 11). Этот подход оказался более плодотворным. Было установлено, что TsF1-продукт Ts1-клеток состоит из одной полипептидной цепи с мол. массой примерно 29 000 Да. Согласно полученным данным, такой полипептид обладает антиген-связывающей специфичностью, имеет идиотоп, сходный с таковым антител той же специфичности, и содержит антигенные детерминанты, кодируемые генами *I-J*. Второй тип T-супрессорного фактора, возможно типа TsF2, построен из двух цепей. Одна из них обладает антиген-связывающей активностью, а другая содержит антигены, кодируемые генами *I-J*.

В наших представлениях о молекулярных основах распознавания антигена хелперными T-клетками (и близкими к ним T-клетками $\text{Lyt } 1^+$), а также цитотоксическими T-лимфоцитами еще больше неясного. Особенность данной проблемы состоит в том, что рецепторы этих клеток должны узнавать пары эпитоп — гистотоп. Исходя из общих соображений, это можно объяснить двумя способами. Либо следует принять, что T-клетки имеют два независимых рецептора (или антигенсвязывающих участка), один из которых распознает эпитоп, а другой — идиотоп, либо предположить, что у T-клетки имеется единый рецептор, узнающий совместно пару эпитоп — гистотоп. Для решения этой проблемы нужно выделить рецептор T-клеток. Недавно несколькими лабораториям удалось получить антисыворотки и моноклональные антитела, которые реагируют с уникальными антигенными детерминантами на специфических T-клонах и блокируют таким образом активацию этих клонов. Эти реагенты, очевидно, позволят проанализировать и очистить рецептор T-клеток.

1.7. Регуляция иммунного ответа и иммунологическая сеть

Главы 18—20 и 22

Элементы иммунной системы находятся между собой в сложных, но упорядоченных отношениях, в результате которых ни один отдельный клон не может в нормальных условиях занять доминирующего положения в популяции лимфоидных клеток. Чтобы создать такое равновесие элементов, нужно не просто обеспечить контакт данного клона с антигеном, к которому клетки этого клона специфичны, а иметь более сложные механизмы регуляции. Действительно, если бы единственным элементом, регулирующим иммунный ответ, был антиген, то преимущество получили бы те клоны, которые специфичны к антигенам, присутствующим в организме постоянно или в высоких концентрациях. Можно ожидать, что такие клоны стали бы расти беспредельно и могли бы проявить опухолевые свойства. Регуляторные системы, предотвращающие нерегулируемую экспансию клонов при обычном иммунном ответе, действуют на основе нескольких общих механизмов.

Первый механизм — это иммунологическая толерантность. Она представляет собой такой тип регуляции, при котором клетки, специфические для антигенов данного организма (аутологических антигенов), элиминируются или подвергаются инактивации (гл. 20). Такой исход наблюдается при особых условиях контакта клеток с этими антигенами, например тогда, когда в контакт с антигеном вступают незрелые клетки, при особом физическом состоянии антигена, а также в случае отсутствия некоторых кофакторов при взаимодействии клеток с антигеном. Индукция толерантности имеет решающее значение для предотвращения аутоиммунных явлений.

Вторую важную регуляторную систему, предотвращающую доминирование клонов, часто обозначают собирательным выражением «система супрессии» (гл. 18). Как правило, супрессия означает специфическое или неспецифическое угнетение функции антиген-специфических хелперных Т-клеток. При некоторых условиях интенсивность супрессии определяется количеством доступных хелперов, так что возникает своеобразное угнетение по типу обратной связи, зависящее от силы самого иммунного ответа. Как уже упоминалось, супрессия представляет собой сложный феномен, в который последовательно вовлекается целый ряд различных типов клеток. В последние годы был обнаружен еще более сложный тип контроля, при котором определенная группа Т-клеток делает Т-хелперы нечувствительными к действию супрессорных Т-клеток. Такие системы были названы *контрасупрессорными*, а Т-клетки с подобной активностью — *контрасупрессорами*. В некоторых случаях клетки регуляторных систем (например, супрессорной линии, хелперной линии или контрасупрессорной линии) обладают специфичностью к тому же антигену, который распознают регулируемые ими эффекторные Т-клетки. Однако в других случаях Т-клетки-регуляторы распознают некоторую уникальную антигенную детерминанту на регулируемых клетках или идиотоп рецептора последних.

Представления о регуляторных системах, основанных на распознавании идиотопов клеточных рецепторов, легли в основу разработанной Н. Эрне *теории иммунной сети* (гл. 22). Эта теория утверждает, что каждый специфический элемент иммунной системы (например, антитела, рецепторы, специфический Т-клеточный фактор) связан с другими элементами этой системы и находится под их регуляторным влиянием, которое осуществляется на основе реакций комплементарности. Говоря точнее, Н. Эрне постулировал, что идиотопы каждого антитела или рецептора распознаются антигенсвязывающими участками («паратопами») другого антитела или рецептора, а паратопы каждого антитела или рецептора распознают идиотопы какого-нибудь антитела или рецептора (рис. 1.14). Н. Эрне полагает, что стимуляция данного лимфоцита возникает в том случае, когда к паратопам его рецепторов присоединяются идиотопы, а супрессия — если к идиотопам рецепторов присоединяются паратопы. Из этого вытекает общее представление о том, что лимфоцит находится в состоянии динамического равновесия, подвергаясь одновременно сбалансированным стимулирующим и супрессивным воздействиям. Отсюда следует, что роль иммунизации состоит в том, что она изменяет уровень стимулирующего и (или) супрессорного сигнала, обеспечивая таким образом экспансию клона до возникновения нового равновесия и поддерживая затем равновесное состояние размножившегося клона. Эта изящная теория регуляции оказала глубокое влияние на развитие проблемы иммунорегуляции. Однако некоторые ее главные посылы оказались неверными. Например, взаимодействие между лигандом и рецептором может оказать стимулирующее или супрессивное влияние независимо от того, как произошло связывание — с паратопом или с идиотопом рецептора. Следовательно, не нужно, чтобы все паратопы могли распознавать

идиотопы (а также эпитопы чужеродных антигенов). Кроме того, большинство покоящихся лимфоцитов, по-видимому, находится не в состоянии динамического равновесия, обусловленного действием сбалансированных стимулирующих и супрессивных сигналов, а в состоянии нестимулированном, или в фазе G_0 .



Рис. 1.14. Взаимодействие рецепторов с эпитопами, идиотопами и паратопами. Рецепторы лимфоцитов могут взаимодействовать с внешними элементами различными способами: а) связывающий участок рецептора (паратоп) может узнавать детерминанту (эпитоп) чужеродного антигена; б) паратоп этого же рецептора может узнавать идиотоп на молекуле антитела, на рецепторе В-клетки, на рецепторе Т-клетки или на антиген-специфическом продукте Т-клетки. Поскольку такой идиотоп связывается с антиген-специфическими рецепторами, его иногда называют «внутренним отображением антигена». с) Идиотоп на рецепторе рассматриваемых лимфоцитов может быть распознан паратопом молекулы антитела, специфического продукта Т-клеток, рецептора В- или Т-клеток.

Представляется вероятным, что система регуляции, связанной с рецепторами (идиотопами), приводится в действие лишь после того, как данный лимфоцит будет активирован антигеном.

1.8. Эффекторные механизмы иммунитета

Главы 23, 25—27

Главное назначение иммунной системы заключается в том, чтобы обеспечить реакции, защищающие организм от инфекций, вызванных патогенными микроорганизмами, и от развития и распространения злокачественных опухолей. Реакции, которые непосредственно вызывают разрушение указанных выше патогенных факторов (например, бактерий, вирусов, паразитов, опухолевых клеток), составляют в совокупности эффекторные механизмы иммунной системы. В их число входят цитотоксические Т-клетки, в том числе клетки, специфические для данного антигена (например, вирусспецифические цитотоксические Т-клетки), клетки, разрушающие покрытые антителами клеточные мишени (антителозависимая клеточная цитотоксичность, АЗКЦ), и клетки, которые «неспецифически» разрушают опухолевые и другие клеточные мишени (ПК, природные киллеры, — см. гл. 25). Вторая важная группа эффекторных механизмов состоит в том, что с помощью продуктов иммунной системы в процесс вовлекаются мощные воспалительные процессы, включая активацию и привлечение макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов, базофилов и других сходных типов клеток. Одним из важных примеров действия этой системы может служить активация макрофагов продуктом Т-клеток (макрофаг-активирующим фактором), которая значительно повышает способность этих клеток лизировать захваченные бактерии. Детальное обсуждение этой группы механизмов приводится в гл. 27. Третий ключевой механизм иммунитета осуществляется в резуль-

тате взаимодействия антиген — антитело, которое приводит к активации системы комплемента — системы белков, вызывающих образование медиаторов воспаления и способных обеспечить прямой лизис клеток-мишеней, несущих на себе антиген, в частности бактерий, вирусов и опухолевых клеток.

1.8.1. Система комплемента

Глава 24

Система комплемента представляет собой сложный комплекс протеолитических ферментов, регуляторных белков и белков, способных лизировать клетки. Ее можно представить в виде трех наборов белковых молекул (рис. 1.15). Первые два набора обеспечивают разные пути для активации C3 (третьего компонента комплемента), играющего ключевую роль в опсонизации (т. е. в подготовке для фагоцитоза) бактерий и других частиц. Один из фрагментов C3 (C3b) активирует третий набор белков, который внедряется в биологическую мембрану и вызывает осмотический лизис клеток. Кроме того, фрагменты, возникающие из некоторых компонентов системы комплемента (например, C3a и C5a), обладают сильным биологическим действием (гл. 27).

Существуют два пути активации комплемента: классический и альтернативный. При классическом пути происходит связывание первого компонента комплемента C1 с агрегированными антителами IgM- и IgG-класса, обычно

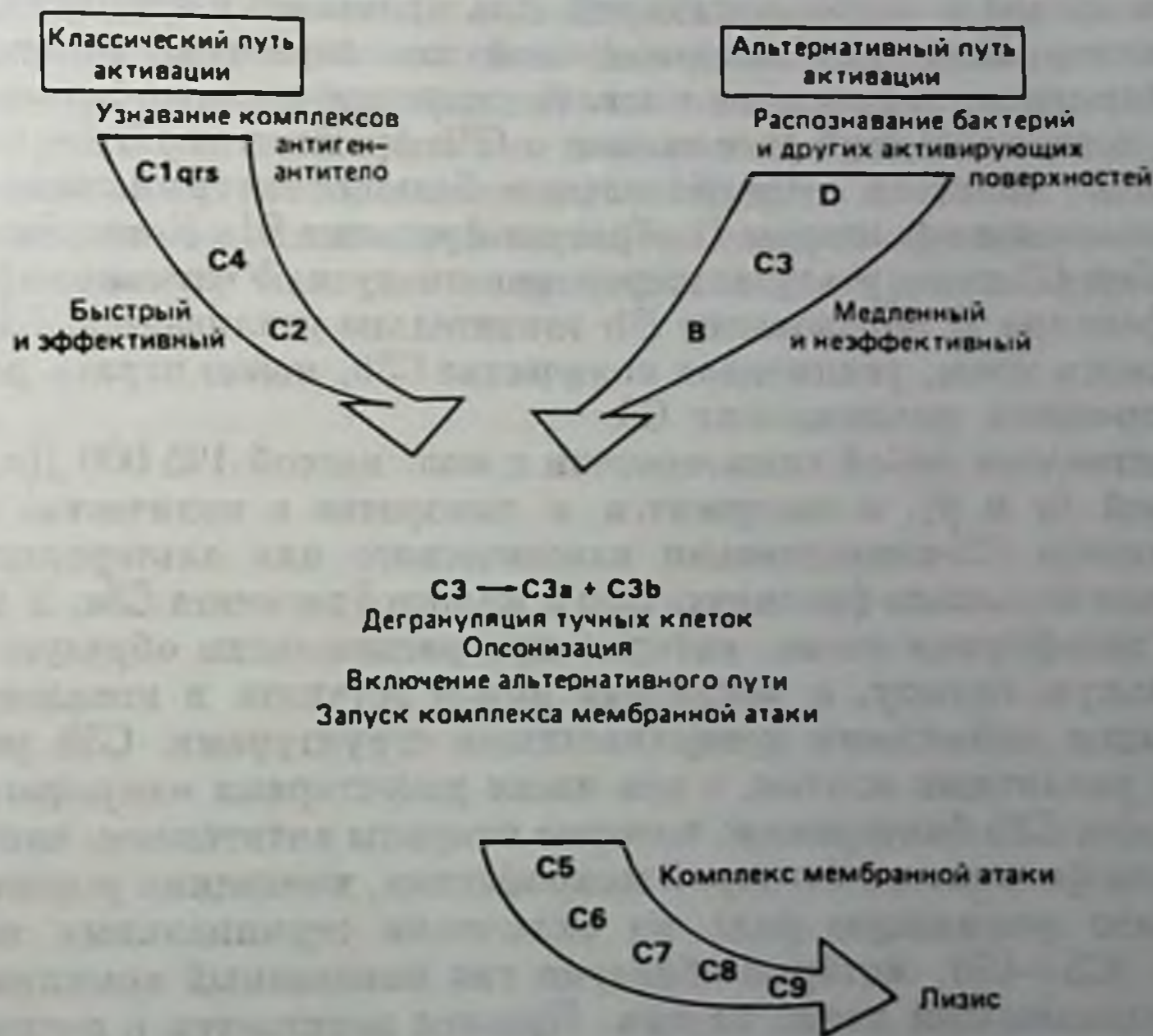


Рис. 1.15. Система комплемента.

Система комплемента состоит из трех семейств белковых молекул. Классический и альтернативный путь активации вызывают расщепление C3 на два фрагмента — C3b и C3a. Эти фрагменты обладают важной биологической активностью. Кроме того, C3b вместе с компонентами классического

(C4b, C2a) или альтернативного пути (Bb, пропердин) образуют ферменты (C5-конвертазы), расщепляющие C5-компонент терминального семейства белков. Расщепление C5 приводит к образованию комплекса мембранной атаки, что может закончиться осмотическим лизисом клеток.

входящими в состав комплекса антиген — антитело. Молекула C1 в нормальных условиях включает в себя три субъединицы C1q, C1r и C1s. Связывающий участок для антител находится в C1q, а в результате связывания происходит расщепление как C1r, так и C1s, которое влечет за собой активацию этих полипептидных цепей. Активированный C1 является протеолитическим ферментом — C1-эстеразой, которая способна расщепить следующие два компонента классического пути — C4 и C2. Молекула C4 построена из трех цепей (α , β и γ). При действии C1-эстеразы α -цепь расщепляется, высвобождая небольшой фрагмент C4a и более крупную активную молекулу C4b. Эта последняя связывается с поверхностью в непосредственной близости от комплекса антиген — антитело — C1-эстераза, образуя ковалентную связь. Одна молекула C1-эстеразы может обеспечить прикрепление множества молекул C4.

Следующий компонент классического пути — C2 — состоит из одной полипептидной цепи, которая присоединяется к C4b. C1 расщепляет связанный C2 и освобождает C2b, а комплекс C4b с оставшейся частью C2 (C2a) является сериновой протеназой, расщепляющей C3. Этот комплекс C4b2a носит название C3-конвертазы классического пути.

Расщепление C3 может вызвать также конвертаза, образующаяся при альтернативном пути активации комплемента. Для активации альтернативного пути не требуется участия антител, хотя комплексы антиген — антитело и могут запускать этот путь. К другим факторам, способным активировать альтернативный путь, относятся нерастворимый препарат клеточных стенок дрожжей (зимозан) и липополисахарид. Альтернативный путь включает группу белков. Фактор D — это одноцепочечный гликопротеин, который является активным ферментом и способен вызвать гидролиз другого белка этого пути, фактора B, если последний уже связан с C3b-фрагментом C3.

Фактор B является одноцепочечным белком, который после связывания с C3b и расщепления фактором D образует фрагмент Bb. Комплекс C3Bb представляет собой C3-конвертазу альтернативного пути. Учитывая, что при наличии C3b и фактора D образование Bb значительно усиливается, C3-конвертаза альтернативного пути, увеличивая количество C3b, может играть роль важного усилителя процесса расщепления C3.

C3 представляет собой гликопротеин с мол. массой 195 000 Да, состоящий из двух цепей (α и β), и содержится в сыворотке в количестве 1—2 мг/мл. Он расщепляется C3-конвертазами классического или альтернативного пути с образованием большого фрагмента C3b и малого фрагмента C3a. У C3b имеется внутренняя тиоэфирная связь, которая при расщеплении образует свободную сульфгидрильную группу, а последняя может вступать в ковалентную связь с находящимися поблизости поверхностными структурами. C3b распознается рецепторами различных клеток, в том числе рецепторами макрофагов и В-клеток. Связывание C3b бактериями, которые покрыты антителами, часто является важным этапом фагоцитоза бактерий макрофагами, имеющими рецептор для C3b.

C3b играет решающую роль во включении терминальных компонентов комплемента (C5—C9), которые образуют так называемый комплекс мембранной атаки, вызывающий лизис клетки. Процесс начинается с расщепления C5 (мол. масса 200 000 Да) — молекулы, построенной из двух цепей. Катализируют это расщепление C5-конвертазы: либо C5-конвертаза классического пути (комплекс C4b2a3b), либо C5-конвертаза альтернативного пути, состоящая из C3b, Bb и белка, называемого пропердином (P). В результате расщепления C5 возникает C5b, который вступает в комплекс с C6, а затем с C7, C8 и C9. Такой комплекс C5b-C9 ведет себя как типичный мембранный белок и вызывает образование характерных для комплемента повреждений мембраны, напоминающих

бублик. Недавние наблюдения говорят о том, что его кольцо составляют молекулы С9.

Наряду с той ролью, которую играет система комплемента в опсонизации и механизмах лизиса, некоторые фрагменты, возникающие при активации компонентов комплемента, служат мощными медиаторами воспалительной реакции (гл. 27). Так, при действии С3-конвертаза на С3 происходит освобождение фрагмента С3а с мол. массой 9000 Да, который, присоединяясь к рецепторам тучных клеток и базофилов, вызывает освобождение серотонина и других медиаторов анафилаксии. В связи с этим С3а называют анафилотоксином, как и фрагмент С5а с мол. массой 11 000 Да, образующийся под действием С5-конвертаза. С5а является также аттрактантом для хемотаксиса нейтрофилов и моноцитов.

И последнее, что важно отметить, — это высокая степень регуляции каскадных процессов активации компонентов комплемента; существует несколько регуляторных белков (например, ингибитор С1-эстеразы, инактиватор С3b), функция которых заключается в том, чтобы предотвратить неконтролируемую активацию комплемента. Аномалии в регуляторных белках часто приводят к различным клиническим расстройствам.

Заключение

Эта вступительная глава должна дать читателю представление об общей организации иммунной системы и о свойствах ключевых клеточных и молекулярных компонентов данной системы. Она должна показать, что иммунная система является чрезвычайно сложной, что она способна выполнять широкий круг эффекторных функций и что в ее деятельности участвуют мощные и пока не вполне понятые регуляторные процессы. Будучи наиболее разносторонним и мощным механизмом защиты у высших организмов, иммунная система дает ключ к эффективному лечению и профилактике широкого круга болезней.

История иммунологии

Артур М. Сильверстайн

(Arthur M. Silverstein)

2.1. Ранние теории приобретенного иммунитета

Самые ранние памятники древних культур свидетельствуют о том, что уже в начале своего социального развития человечество встретилось с опустошающими последствиями эпидемий. Так, вавилонский эпос о Гильгамеше, относящийся примерно к 2000 г. до н. э., повествует о нашествиях мора и чумы; также же упоминания можно встретить в хрониках древних египетских царств. Как на заре развития человеческого общества, так и сейчас среди примитивных народов существует убеждение, что человек и природа постоянно находятся под магическим воздействием духов и демонов либо под таинственным влиянием богов. Поэтому не приходится удивляться, что болезнь рассматривали как наказание за какое-то нарушение племенных табу или за прегрешения против богов. И у вавилонян, и у древних египтян бог болезни входил в пантеон богов, и во всем Ветхом завете бог то и дело поражает грешников, насылая на них заразные болезни. Так, например, в наказание за грех Давида, составившего перепись подданных, господь наслал на избранный народ моровую язву (2-я Книга царств, 24) и такую же кару насылал на разных его врагов, включая египтян (Исход, 9,9), филистимлян (1-я Книга царств, 5, 6) и царя ассирийского Сеннахирима (Книга пророка Исаи, 36, 37). Даже древнегреческого бога солнца Аполлона Феба считали причиной чумы, посланной им на Фивы, которые царь Эдип запятнал своими преступлениями. Утверждали также, что Феб осыпал греческое войско под Троей чумными стрелами за то, что их вождь Агамемнон отверг дочь жреца Аполлона.

Хотя действительная природа различных эпидемий и связь между ними оставались неизвестными, внимательные очевидцы не могли не заметить, что новая волна болезни часто шадит тех людей, которые уже перенесли эту болезнь прежде. Это явление прекрасно описал в 430 г. до н. э. историк Фукидид: «Больше всего страдание и смерть шадят тех, кто уже оправился от болезни. Они знакомы с болезнью и уже не боятся ее, ибо знают, что чума никогда не поражает человека дважды, по крайней мере смертельно». На самом деле «чума», о которой говорит Фукидид, могла быть вызвана не *Pasterella pestis*, а другим возбудителем, но чума времен Юстиниана, примерно на тысячу лет позже, скорее всего была настоящей бубонной чумой. Историк Прокопий пишет о ней: «Потом она (чума) вернулась, и тех обитателей этой земли, кто прежде был поражен ею особенно тяжело, она не коснулась вовсе». Со временем устойчивость к повторному заражению стали обозначать словом иммунитет, от латинского *immunitas*, что в древнем Риме первоначально означало освобождение гражданина от некоторой государственной повинности или службы.

Представление о болезни как о каре мстительного божества содержит в скрытом виде теорию иммунитета. Если болезнь есть наказание за грех,

то быть незатронутым ею в разгар эпидемии (т. е. обладать естественным иммунитетом) автоматически воспринималось как свидетельство благочестивой жизни. Однако во времена раннего христианства эти представления заметно изменились. Теперь болезнь уже была не только божья кара за грехи, но и средство их искупления. А раз болезнь есть искупление и очищение, то выздоровление от смертоносной болезни должно означать, что грехи были легкими, а кроме того, что искупивший грехи человек не подлежит новому наказанию, когда чума повторится (приобретенный иммунитет). Учитывая глубокую религиозность тех времен, такое представление об иммунитете, вероятно, казалось настолько естественным, что не требовало каких-либо объяснений.

Только в последнем тысячелетии стали появляться теории, которые стремились объяснить приобретенный иммунитет, причем многие из них имели умозрительный характер и каждая вполне соответствовала господствовавшим тогда представлениям о патогенезе болезней. Натуральная оспа была одной из болезней, которая раньше других была определена клинически, а вызываемый ею пожизненный иммунитет трудно было не заметить. Поэтому вполне естественно, что наиболее ранние теории иммунитета были сформулированы в связи с этим заболеванием.

2.1.1. Теории изгнания

Первое четкое описание клиники оспы дал мусульманский врач Разес. Он не только впервые дифференцировал оспу от кори и других инфекционных заболеваний, но и уверенно утверждал, что выздоровление от оспы вызывает длительный иммунитет. Чтобы объяснить этот феномен, он предложил теорию иммунитета, которая является первой в известной нам литературе. Как и его современники, Разес следовал традиции Гиппократов, которая связывала болезнь либо с количественными нарушениями равновесия четырех главных соков — крови, флегмы, желтой желчи и черной желчи, — либо с изменением их температуры и консистенции, либо даже с их брожением. Считалось, что оспа поражает кровь, и Разес утверждал, что болезнь связана с брожением крови, которое помогает избавиться от «избытка влаги», свойственной, по его мнению, крови молодых. Он полагал, что оспенные пустулы, которые возникают на коже, а потом лопаются с истечением жидкости, — это тот механизм, который освобождает тело от излишка влаги в крови. Он сравнивал созревание организма с превращением виноградного сока в вино и даже утверждал, что само заболевание оспой может способствовать этому нормальному процессу! Так, например, он писал:

«Итак, я утверждаю, что каждый человек от своего рождения и до старости постоянно приближается к сухости и по этой причине кровь детей и младенцев значительно более влажная, чем кровь юношей, и еще более влажна по сравнению с кровью стариков. И тут возникает оспа, при которой кровь загнивает и начинает бродить, и она выбрасывает избыток паров, и из крови младенцев, которая подобна виноградному суслу, она превращается в кровь юношей, которая подобна хорошему созревшему вину; что же касается крови стариков, то ее можно сравнить с вином, которое уже утратило свою силу и вкус и стало прокисать; а саму оспу можно сравнить с брожением и шипением созревающего виноградного сусла. И именно поэтому дети, особенно мальчики, редко избегают этой болезни, потому что нельзя помешать переходу крови из одного состояния в другое, как нельзя помешать... превращением виноградного сусла».

Любопытно, что для Разеса оспа десятого столетия представляется почти безобидной детской болезнью и даже желательным явлением, которое способствует нормальному переходу из детства в возраст зрелости. Тем не менее эта занятная теория, по-видимому, хорошо объясняла все, что было известно об оспе: 1) она поражает практически всех, особенно в молодом возрасте (когда кровь отличается особой влажностью); 2) болезнь редко наблюдается у взрослых и почти никогда не поражает стариков (поскольку нормальный процесс старения уже достаточно высушил кровь и она не может больше поддерживать инфекцию), и 3) однократное заражение приводит к длительному иммунитету, и повторное заболевание становится невозможным (так как первая болезнь уже изгнала «избыток влаги», в котором эта теория видит необходимую предпосылку к развитию болезни).

В XI в. Авиценна предложил другую интересную теорию приобретенного иммунитета, которая спустя примерно 500 лет была развита итальянским врачом Джироламо Фракастро (Gigolamo Fracastoro) в его книге «О заразе» (Contagion), написанной в 1546 г. Он утверждал, что все болезни вызываются мелкими семенами или зародышами (seminaria), которые могут передаваться от человека человеку, причем каждый обладает особым сродством к определенному растению или животному, а также к определенному органу или жидкости тела. Фракастро писал, что возбудитель оспы имеет сродство (и разлагает) только к остаткам менструальной крови, которая, по его мнению, примешивается ко всем зародышам млекопитающих еще in utero. Когда (молодой) человек заражается оспой, то менструальная примесь начинает бродить, выступает на поверхность кожи в виде пустул и изгоняется вон, когда пустулы лопаются. «Это вскипание есть своего рода очищение крови... В результате такого вскипания и нагноения то заражение, которое возникло у ребенка из-за менструальной крови, попавшей к нему в чреве матери, ограничивается, и в этом особом кризисе, вызванном самой природой, происходит очищение крови. Именно поэтому почти все мы подвержены этой болезни ... и сама эта лихорадка редко вызывает смерть (sic!), но скорее очищение... болезнь обычно не возвращается, так как зараза уже удалена при первом приступе».

Таким образом, теория Фракастро также, по-видимому, хорошо укладывается в существовавшие представления об оспе. С этой точки зрения в основе приобретенного иммунитета лежит удаление при первом заболевании примеси менструальной крови, с которой, по его мнению, все мы рождаемся и без которой болезнь не может возобновиться. Но Фракастро полагал, что его теория объясняет приобретенный иммунитет к другим инфекционным заболеваниям, например к кори, а это встретило критику со стороны Геронимуса Меркуриалиса (Hieronymus Mercurialis), которому принадлежит, может быть, самое первое высказывание об иммунологической специфичности. Меркуриалис утверждал, что теория Фракастро неверна, и наряду с другими возражениями указывал, что примесь менструальной крови не может быть общей основой для оспы и кори, поскольку заражение одной из этих болезней должно очистить кровь от этой примеси и создать иммунитет также и к другой болезни; между тем, замечает Меркуриалис, такой «перекрестный иммунитет» противоречит фактам.

Нужно упомянуть, что существовало еще несколько вариантов теории изгнания менструальной крови, каждый из которых предлагал сходную картину патогенеза оспы и сходное объяснение приобретенного иммунитета. Так, некоторые из них считали источником зла не примесь менструальной крови, а амниотическую жидкость или пуповинную кровь. В каждом случае суть болезни видели в загнивании попавшей в организм примеси и изгнании ее через

пустулы, результатом чего является пожизненный иммунитет, основанный на отсутствии в организме субстрата для возникновения болезни при новом заражении.

2.1.2. Теория истощения

Введение прививки, т. е. инокуляции материала от пораженного оспой больного, в качестве профилактического средства в начале 18-го столетия снова вызвало интерес к природе и механизмам приобретенного иммунитета. В народной медицине многих племен Азии, Африки и даже в сельских областях Европы корки из пустул от больных с «благоприятным» течением болезни применяли достаточно широко. Этот обычай, вероятно, возник у китайцев, которые рекомендовали вдвухать через серебряную трубочку зараженный материал в нос реципиенту, мужчинам — через левую ноздрю, а женщинам — через правую. В других местах обычай состоял в том, чтобы сделать маленький надрез в коже и ввести в него заразную корку или нитку, которую заранее окунали в заразную пустулезную жидкость.

Хотя практика инокуляции встретила яростное сопротивление как по религиозным, так и по медицинским мотивам, она получила определенное применение, особенно в Англии, где в 1722 г. пример подали принц и принцесса Уэльские, позволившие сделать инокуляцию своим детям. Особенно популярной стала инокуляция во время эпидемий оспы, когда показатель летальности нередко достигал 15—20% заболевших, а количество обезображенных было еще больше. Между тем инокуляция хорошо защищала от заболевания, чаще всего не давала рубцов на лице, и смертность от нее составляла самое большее 2—3%. Знаменитый Вольтер (Voltaire) во время своих путешествий в Англию наблюдал эту процедуру и в своих «Философских письмах» выразил восторг по поводу ее эффективности, приписав при этом (вероятно, по ошибке) честь ее введения в Англии леди Мэри Уортли Монтегю (Mary Wortley Montagu). По версии Вольтера, инокуляция, возможно, зародилась у черкесов как средство сохранения красоты своих дочерей, которых со следами оспы на лице уже нельзя было продавать в гаремы Османской империи.

И вот случилось так, что после одобрения инокуляции на страницах «Философских записок» Королевского общества и особенно в результате того впечатления, которое произвела на всех инокуляция королевской семьи, появилось много желающих испытать новый метод, а некоторые попытались понять его смысл. Еще в 1721 г. священник из Новой Англии Коттон Мезер (Cotton Mather) убедил своего друга доктора Зебдила Бойлстона проводить инокуляцию во время эпидемии в Бостоне. В дальнейшем он выдвинул теорию приобретенного иммунитета, которую выразил в таком напыщенном стиле:

«Хотя Миазмам Оспы и был открыт Путь Инокуляции, их Проникновение было ограничено Внешними Укреплениями Крепости, которые расположены далеко от ее Центра. И вправду, Враг (оспа) добивается успеха и захватывает Некоторые Трофеи, он поглощает их, не оставляя в Теле Больного никакой Добычи, чтобы завладеть ею потом... и дело не обходится без Сдачи тех Соков Крови, которыми Захватчик уже завладел, но они заставляют его отступить той же дорогой, какой он пришел, и теперь уж можно не сомневаться, что он никогда больше не причинит беды».

Тем самым Мезер утверждал, что и естественная инфекция, и инокуляция приводят к истощению некоего неизвестного субстрата и из-за его отсутствия болезнь не может возникнуть повторно.

И вот на таком фоне спустя три четверти века после оспенных инокуляций Эдуард Дженнер (Edward Jenner) опубликовал в 1798 г. свое эпохальное сооб-

шение о более безопасной и еще более эффективной противооспенной вакцине, получаемой из пустул при коровьей оспе. Скорость, с которой дженнеровская вакцинация (от лат. *vaccus* — корова) завоевала мир, поистине поразительна. Всего через несколько лет, когда Дженнер обратился к враждебной Франции с ходатайством об одном английском пленнике, Наполеон ответил, что величайшему благодетелю всего человечества он не может отказать ни в чем. К сожалению, Дженнер, по-видимому, никогда не делал попытки объяснить, почему его вакцина создает иммунитет; может быть, он находился под влиянием давнего совета своего выдающегося учителя Джона Хантера: «Зачем размышлять? Почему не поставить опыт?»

Одна из самых фантастических концепций о происхождении болезней и соответственно об иммунитете к ним возникла в XVII и XVIII вв. Это была теория «врожденного зачатка или семени». Согласно ей, люди (и животные) уже от рождения содержат в себе семя или яйцеклетку (овулу) для любой из различных болезней, которым они подвержены, и каждая из них может быть оплодотворена соответствующим контагиозным агентом, что и приводит к развитию определенной болезни. Эту теорию изящно сформулировал Томас Фулер (Thomas Fuller):

«Поскольку эти Овулы принадлежат к различным Видам ... постольку Чума никогда не породит Оспы, а Оспа не породит Кори. ... Тихо лежат Овулы, не давая потомства, пока не дождутся зачатья, и именно потому так редко возникают Болезни, если не придет Возбудитель, который служит как бы Мужским Началом и активным Толчком. И чаще всего множество Овул этой Болезни будут оплодотворены все вместе и каждая в отдельности... И когда оплодотворит он их и породят они свой болезненный Плод, то наступит Конец им. ... И в том заключена Причина, почему ни один Человек... не может быть поражен любой из этих Болезней более чем один раз».

Таким образом, Фулер не только утверждал этиологическую самостоятельность заболеваний, но предложил также стройное объяснение приобретенного иммунитета, который одновременно является и специфическим, и длительным.

Идея о том, что иммунитет связан с истощением какой-то субстанции, необходимой для поддержания болезни, часто повторялась в 18-м столетии. Так, в литературе можно найти утверждения вроде того, которое высказано М. Мати (M. Maty) в 1755 г.: «Недавно я проделал этот опыт (инокуляцию) на себе... и он не оказал никакого влияния на мою кровь, потому что она уже была достаточно *очищена* 15 лет назад». Точно так же другой автор того времени Анджело Гатти (Angello Gatti) сравнивал чувствительность к оспе со стеблем, который может возгореться от одной искры, но после того становится «невоспламеняем», хотя и окружен огнем, и так возникает иммунитет к новому заражению.

В 70-х годах прошлого столетия все большее распространение стала получать теория о микробах как возбудителях болезней, и благодаря работам Луи Пастера, Роберта Коха (Louis Pasteur, Robert Koch) и других были установлены специфические возбудители многих заболеваний и определен способ их действия. Все ранние представления о механизмах иммунитета были отброшены с приходом новейших идей о патогенезе заболеваний и особенно после того, как в 1880 г. Пастер показал, что с помощью ослабленного (аттенуированного) штамма куриной холеры можно создать приобретенный иммунитет к этому заболеванию. Исходя из своих наблюдений над иммунитетом, Пастер, с его богатым воображением и некоторыми познаниями о кинетике роста бактерий в культуре, предложил свое собственное объяснение приобретенного иммунитета. Зная, что

рост бактерий *in vitro* после начальной логарифмической фазы размножения быстро прекращается, Пастер связывал это с истощением в среде тех специфических веществ, которые нужны для роста бактерий данного вида. В то время были известны только такие вакцины, которые состояли из живых аттенуированных микробов, и Пастер предположил, что при естественном заражении или при введении живой вакцины в организме происходит быстрое истощение тех уникальных питательных веществ, которые нужны для поддержания роста возбудителя инфекции. При отсутствии этих необходимых для роста веществ второе заражение тем же самым возбудителем не сможет вызвать заболевания, и приобретенный иммунитет будет сохраняться в организме до тех пор, пока эти вещества не образуются вновь. Однако вскоре Теобальд Смит (Theobald Smith) показал, что вакциной могут служить и убитые микробы, а Эмиль Беринг и Шибасабуро Китагато (Emil Behring, Shibasaburo Kitasato) обнаружили, что даже надосадочные жидкости из бульонных культур возбудителей дифтерии и столбняка могут вызывать иммунитет. Эти открытия наглядно показали несостоятельность предложенной Пастером теории истощения.

2.2 Рождение иммунологии как науки

Одним из наиболее важных факторов в возникновении научной медицины в 19-м столетии было все более широкое признание существования возбудителей болезней. Согласно этой теории, возбудители инфекций возникают не путем самопроизвольного зарождения, а воспроизводятся из себе подобных и являются этиологическими факторами конкретных и воспроизводимых нозологических форм. Луи Пастер (Louis Pasteur), развивая свои великолепные исследования о природе и способах предотвращения болезни шелковичных червей, а также болезней вина и пива, вступил в борьбу, чтобы убедить ученый мир в правильности своей теории возбудителя. Его сообщение в 1880 г. о возможности профилактической иммунизации против куриной холеры знаменует возникновение научной иммунологии. В последующие десятилетия по мере обнаружения новых возбудителей каждый из них становился объектом интенсивных исследований, ставивших целью найти вакцину для предотвращения той болезни, которую он вызывает. И это нигде не проявилось так сильно и ярко, как в разработке вакцины против сибирской язвы. Роберт Кох (Robert Koch) был первым, кто выделил и изучил возбудителя сибирской язвы, а затем он и Пастер вступили в продолжительный и временами ожесточенный спор об этиологии, патогенезе и профилактике сибирской язвы. И в конце концов именно Пастер продемонстрировал эффективный подход к иммунизации против сибирской язвы в своих знаменитых опытах на коровах, которые были проведены в 1881 г. в Пуийле-Фор (Pouilly-le-Fort) на глазах у представителей международной прессы. Убедительная демонстрация эффективности предупредительных прививок аттенуированными микробами — и даже, как было показано позже, убитыми бактериями, — казалось, открывала перспективу получения аналогичных средств профилактики для любой инфекционной болезни, возбудитель которой удалось выделить. К числу таких болезней относилось большинство наиболее смертоносных и опустошительных заболеваний человека и животных.

2.2.1. Иммунизация и сывороточная терапия

В конце 80-х годов прошлого столетия, особенно в последнее десятилетие, открытия новых бактериальных возбудителей болезней следовали одно за другим с нарастающей частотой, и доказательства их этиологической роли обыч-

но удовлетворяли требованиям коховской триады. Как только удавалось получить культуру возбудителя на искусственной питательной среде, возникала возможность приготовить соответствующую вакцину из ослабленных или убитых микробов для профилактики данной болезни. Но как показал Пастер (Pasteur) в 1885 г. в своих знаменитых работах по бешенству, выделение возбудителя не является абсолютно необходимым. Так и не добившись успеха в выделении возбудителя бешенства, Пастер тем не менее сознавал, что тот должен присутствовать в головном и спинном мозге зараженных животных, поскольку введение такого мозга нормальным животным вызывало у них заболевание. Вслед за этим Пастер предложил метод ослабления (аттенуации) возбудителя бешенства путем хранения его в течение разных сроков и вскоре показал, что курс вакцинации с введением материала все более высокой вирулентности обеспечивает защиту от бешенства, даже если оно вызвано укусом бешеного животного.

Итак, на протяжении 80—90-х годов прошлого столетия осуществимость профилактической иммунизации была доказана для целого ряда инфекционных заболеваний. Однако попытки применить эти новые иммунологические подходы ко всем болезням принесли во многих случаях отрицательный результат. В частности, некоторые возбудители, позднее названные вприсаму и риккетсиями, было невозможно выделить существовавшими тогда методами. В других случаях, как, например, при поражении *Treponema pallidum*, вызывающей сифилис, хотя возбудитель и мог быть обнаружен при гистопатологическом исследовании, вырастить его на искусственной питательной среде для приготовления вакцины не удавалось. И наконец, были такие заболевания, как дифтерия и туберкулез, при которых сам возбудитель можно было вырастить и использовать для иммунизации, но это не обеспечивало защиты от инфекции, а иммунизация микробами типа холерного вибриона для профилактики холеры у человека оказалась малоприменимой.

Значительный успех был достигнут в 1888 г., когда Эмиль Ру и Александр Йерсен (Emile Roux, Alexandre Yersin) сумели выделить растворимый токсин из надосадочной жидкости культур дифтерийной палочки. Этот токсин при введении экспериментальным животным вызывал всю картину дифтерии; стало очевидным, что по крайней мере иногда болезнь вызывает не сам микроб как таковой, а вырабатываемый им экзотоксин. После этого понадобилось немного времени, чтобы Беринг (Behring) и его сотрудник Китасато (Kitasato) развили эти наблюдения, и в 1890 г. они сообщили, что после иммунизации дифтерийным или столбнячным токсином в крови животных появляется нечто, способное нейтрализовать или разрушить токсин и тем самым предотвратить заболевание. Антитоксические сыворотки животных вскоре испытали на больных детях. Эффект был поразительным. Дети быстро выздоравливали, особенно если сыворотка вводилась на ранних сроках заболевания. Вещество, которое вызывало обезвреживание токсина, получило название *анти-токсина*, а вскоре для обозначения этого нового класса веществ был введен более общий и менее обязывающий термин — *анти-тело*. То, что вызывает образование этих *анти-тел* стали называть *анти-геном*.

Данные фон Беринга об эффективности терапевтического применения антитоксина сразу же убедили медицинский мир, а всеобщий характер этого явления был подтвержден наблюдениями Пауля Эрлиха (Paul Ehrlich), который показал, что иммунизация животных токсинами растительного происхождения — ридином и абрином — также приводит к образованию нейтрализующих антитоксинов. Аналогичные токсины стали искать при других инфекционных заболеваниях, но вскоре было установлено, что этот новый терапевтический

подход эффективен в основном при двух заболеваниях, для которых он был описан вначале. Одно время Роберт Кох (Robert Koch) полагал, что туберкулин, выделенный из жидкой части культуры туберкулезных бактерий, может быть эффективным средством для лечения и предупреждения туберкулеза, и поспешил объявить о своем открытии, которого ожидал весь мир. Однако предсказания Коха не сбылись — туберкулин не только оказался неэффективным при профилактическом применении, но попытки использовать его в терапевтических целях часто приводили к тяжелым системным аллергическим реакциям, а иногда и к местной активации дремлющих очагов инфекции.

Поиск новых и более совершенных вакцин против наиболее важных болезней человека и животных продолжался, хотя разработка часто задерживалась вплоть до выделения и идентификации соответствующего возбудителя или до появления новых методов его культивирования. Особенно это касалось вирусов: только предложенный Гудпастуром (Goodpasture) метод культивирования на куриных эмбрионах и введенные Эндерсом (Enders) и его сотрудниками методы тканевых культур обеспечили возможность разработки вакцин против желтой лихорадки, полиомиелита, кори, гриппа и многих других возбудителей.

2.2.2. Реакция антиген — антитело: иммунохимия

Было очевидно, что в антитоксических сыворотках содержатся особые вещества, которые способны специфически нейтрализовать токсический антиген, вызвавший их образование. Затем оказалось, что даже безобидные нетоксичные вещества вроде молока и различных других белков могут вызвать образование специфических антител, и стало ясно, что «иммунный» ответ представляет собой феномен, который выходит далеко за границы антитоксического и антибактериального иммунитета. В 1896 г. Грубер и Дархэм (Gruber, Durham) открыли специфическую агглютинацию бактерий, а спустя несколько лет Жюль Борде (Jules Bordet) — агглютинацию эритроцитов. В 1897 г. Крауз (Kraus) описал реакцию преципитации между антигеном и антителом. В результате появилась возможность проводить количественное и качественное изучение антител *in vitro* и практически наблюдать их действие. Но каким образом они образуются и как объяснить их строгую специфичность? Все эти вопросы поставил со свойственным ему богатым воображением Пауль Эрлих (Paul Ehrlich) в своей классической статье о количественной оценке дифтерийных антисывороток. Эта публикация представляет большой исторический интерес с нескольких точек зрения. Во-первых, в ней была заложена основа для развития иммунохимии и определены пути для количественного изучения реакции антиген — антитело на последующие примерно 50 лет. Во-вторых, в ней декларировалось, что специфичность антител и их реакции опираются на законы структурной химии. В-третьих, в этой статье была предложена теория образования антител, оказавшая сильное влияние на иммунологическое мышление в течение многих последующих лет.

Непосредственная практическая сторона исследований Эрлиха состояла в том, что в них было показано, как следует проводить количественное определение дифтерийного токсина и антитоксина, что позволило создать рациональную основу для важной в те годы иммунотерапии. При этом Эрлих ввел в молодую область иммунологии множество терминов, которые стали потом общепринятыми. Он утверждал, что антитело — это самостоятельный вид молекул, существующих вначале в виде *рецепторов* (боковых цепей) на поверхности клеток и обладающих особой химической конформацией, которая обеспечивает

специфическое взаимодействие с комплементарной конфигурацией на молекуле антигена. Он полагал, что как у антигена, так и у антител имеются функциональные *домены*, каждый из которых обладает гаптофорной группировкой, обеспечивающей химическое взаимодействие в результате взаимного соответствия по типу «замка и ключа», т. е. аналогично взаимодействию фермент—субстрат, которое такой образной метафорой охарактеризовал Эмиль Фишер (Emil Fischer). Антигенная молекула токсина имеет также отдельную токсофорную группировку, разрушение которой превращает ее в *токсоид*, сохраняющий способность к специфическому взаимодействию с антителом. Эрлих установил единицы для количественного определения токсина и антитоксина и полагал, что *валентность* последнего равна примерно 200. В связи с вариабельностью *кривых титрования* для различных препаратов токсина Эрлих предположил, что они представляют собой смесь не только токсина и токсоида, но и других веществ с различным *сродством* к антительному рецептору. Принималось также, что молекула антитела имеет различные домены, один из которых отвечает за присоединение к антигену, а другие обеспечивают такие вторичные биологические явления, как агглютинация, преципитация и связывание комплемента. [На протяжении нескольких десятилетий антитела с разной биологической активностью считали различными видами молекул, пока не восторжествовала унитарная теория Ганса Цинсера (Hans Zinsser), согласно которой одно и то же антитело может обуславливать разнообразные биологические эффекты.]

Эрлиховская теория взаимодействия антиген—антитело основывалась на положениях структурной органической химии тех дней. Эрлих не только полагал, что специфичность антитела зависит от химического состава и конфигурации молекулы, но считал взаимодействие антигена с антителом необратимой реакцией, основанной на образовании прочных химических связей определенного типа, названных позднее *ковалентными*. Это встретило решительные возражения со стороны Борде (Bordet), а позднее Карла Ландштейнера (Karl Landsteiner) и других, которые утверждали, что иммунологическое взаимодействие связано не с химическими, а скорее с физическими свойствами реагирующих макромолекул, и их взаимодействие, как и сама иммунологическая специфичность, лучше объясняется с точки зрения процессов «коллоидальной» адсорбции. Они полагали, что на самом деле взаимодействие антиген—антитело является частично обратимым и в подтверждение этого указывали на феномен Даниша (Danysz). Даниш показал, что степень нейтрализации дифтерийного токсина антитоксином зависит от того, как добавлять токсин — сразу или постепенно, а это значит, что реакция не обязательно имеет необратимый характер. Эта дискуссия между сторонниками химической и физической теорий взаимодействия антиген—антитело бушевала на протяжении многих лет и составила интересную главу в истории иммунологических представлений. В конечном итоге химическая концепция Эрлиха (Ehrlich) была в основном подтверждена, за исключением его утверждения, что связывание антигена антителом основано на образовании необратимой химической связи.

Подобная же дискуссия возникла между Эрлихом и Борде по поводу природы и способа фиксации комплемента комплексами антиген—антитело. Эрлих предполагал, что имеется множество комплексов, каждый из которых связывается со своим собственным рецептором на молекуле антитела, подобно тому как разные антигены специфически реагируют с соответствующими участками антитела. В противоположность этому Борде утверждал, что связывание антигена антителом (которое он называл «сенсibiliзирующим веществом») приводит к такому изменению конфигурации последнего, которое обеспечивает

неспецифическое связывание одного и того же компонента. Теория Борде в конечном счете оказалась правильной.

В центре внимания оказалась также природа взаимодействия антиген—антитело. По мнению Сванте Аррениуса и Торвальда Мадсена (Svante Arrhenius, Thorvald Madsen), взаимодействие токсинов—антитоксинов в высокой степени обратимо и напоминает нейтрализацию слабой кислоты слабой щелочью. Эта идея получила дальнейшее развитие в написанной Аррениусом в 1907 г. книге «Иммунохимия», которая дала название новому разделу иммунологии. Соответственно Эрлиху эти исследователи утверждали, что взаимодействие антиген—антитело является строго стехиометрическим и подчиняется закону действующих масс. Однако вскоре было обнаружено, что соотношение между антигеном и антителами, которые участвуют в реакции, может сильно варьировать, и наконец в конце двадцатых и начале тридцатых годов Марак и Гейдельбергер (Marack, Heidelberger) выдвинули положение о том, что антиген и антитела являются мультивалентными и поэтому могут образовывать «решетку», содержащую антиген и антитела в разных пропорциях.

2.2.3. Серология и иммунодиагностика

Уже вскоре после открытия в 1896 г. бактериальной агглютинации стало очевидным, что эта реакция дает в руки бактериолога мощный инструмент исследования. С ее помощью можно не только идентифицировать бактерии и дифференцировать их по агглютинации с соответствующими антисыворотками, но можно исследовать сыворотку больных на способность агглютинировать данный микроб и выяснить, был ли у человека контакт с этим микробом и какова у данного человека степень иммунитета к инфекции. Открытие реакции преципитации еще больше расширило возможности такой оценки, позволив определять антигены и антитела в таких системах, которые содержат растворимые продукты бактерий и даже вещества небактериальной природы. Пожалуй, никто не применил этот метод с такой элегантностью, как Г. Наттолл (Nuttall), который, исследовав специфические и перекрестные реакции антисывороток против сывороток животных и против растворимых белков, продемонстрировал, что иммунология может быть с успехом использована для изучения таксономических взаимоотношений и даже в судебной медицине.

Работы Борде (Bordet), показавшего, что антиэритроцитарные антитела и компонент могут вызвать иммунный гемолиз, а компоненты реакции поддаются количественному определению, открыли новый подход к диагностике заболеваний. Теперь стало возможным определять в крови больных даже такие антитела, которые неспособны вызывать агглютинацию или преципитацию соответствующих антигенов и таким способом не только выявлять сам факт контакта с возбудителем, но и проследивать серологически течение болезни. Этот подход блестяще использовал Август фон Вассерман (August von Wassermann) и его сотрудники, разработавшие метод серодиагностики сифилиса в реакции связывания компонента. Вскоре после этого было предложено еще много других способов применения реакции связывания компонента для качественного и количественного анализа как антител, так и антигенов.

2.2.4. Аллергия и иммунопатология

После своего открытия в 1882 г. туберкулезных бактерий Кох (Koch) провел широкие исследования в области патогенеза, диагностики и лечения туберкулеза. Из многих сделанных им важных находок две оказали значительное влия-

ние на последующее развитие иммунологии. Первая из них — это знаменитый феномен Коха, который состоит в том, что введение туберкулезных бактерий в кожу зараженного туберкулезом животного вызывает сильное местное воспаление с образованием гранулы, в то время как у нормальных животных такая инъекция приводит лишь к очень слабой и кратковременной местной реакции. Аналогичным образом проявляется реакция на внутрикожное введение филтраты, приготовленного из культуры туберкулезных бактерий *in vitro*, т. е. туберкулина. У нормальных животных его действие было незначительным, а у зараженных бактериями туберкулеза он вызвал сильную воспалительную реакцию. Вначале механизм этих местных воспалительных реакций был непонятным, и сам Кох ошибочно считал их токсическими реакциями. Он полагал, что ткани нормального животного способны переносить туберкулезный токсин, в то время как у зараженных туберкулезом животных ткани уже и так загружены токсином, поэтому дополнительное введение должно привести к превышению количественного предела и вызвать токсическое воспаление. Прошло еще несколько лет, прежде чем открытия в других областях знания позволили более правильно иммунологически объяснить эти феномены при туберкулезе.

Системный анафилактический шок (от греч. *ана* — излишний и *филаксис* — охранять) впервые наблюдали Шарль Рише и Поль Портье (Charles Richet, Paul Portier) во время своих исследований по биологии моря, которые они начали проводить на борту яхты принца Монако. Вначале этот феномен был обнаружен для токсических веществ, и его связывали непосредственно с действием токсинов. Однако вскоре было показано, что вызвать анафилактический шок может почти любой нетоксичный антиген, если вводить его сначала соответствующим образом для сенсибилизации животного, а потом сделать разрешающую инъекцию. Вскоре было показано, что анафилактическая реакция подчиняется всем законам иммунной специфичности. Спустя короткое время была установлена связь анафилаксии с такими заболеваниями человека, как сенная лихорадка и астма, и они получили общее наименование аллергии (что по-гречески означает «измененная реактивность»). Кроме того, было обнаружено, что если разрешающую инъекцию антигена делать сенсибилизированному животному не внутривенно, а внутрикожно, то у него разовьется местная анафилактическая реакция в виде быстро появляющегося на месте введения покраснения и волдыря, как при крапивнице. Эта кожная реакция получила широкое применение у аллергологов в качестве диагностического метода, позволяющего испытать большое количество потенциальных аллергенов и выявить тот из них, который послужил причиной аллергии у больного.

Значительный шаг вперед был сделан в 1921 г., когда Карл Праусниц и Хайнц Кюстнер (Karl Prausnitz, Heinz Küstner) разработали метод обратной пассивной анафилаксии. Кюстнер страдал аллергией к некоторым сортам рыбы, и было показано, что его сыворотка, введенная в небольшом количестве в кожу Праусница, перенесла последнему способность отвечать на рыбный экстракт, введенный в этот же участок кожи, характерным покраснением и образованием волдыря. Этот метод открыл дорогу для широкого исследования факторов, обуславливающих гиперчувствительность такого типа. Из этих исследований возникла концепция связанных с тканями, или цитофильных, антител, называемых *реагинами* (реактивными антителами), которые считают антителами особого класса, способными прикрепляться к тканевым клеткам и обеспечивать при взаимодействии с аллергеном высвобождение фармакологически активных веществ типа гистамина и серотонина.

Вскоре после открытия системной анафилаксии Морис Артис (Maurice Artigues) опубликовал в 1903 г. сообщение об одной из форм местной анафилаксии,

которая с тех пор стала известной как реакция Артюса. При этом в кожу повторно вводится безвредный антиген; первые инъекции вызывают лишь слабые реакции или совсем их не дают, но в дальнейшем введение антигена приводит иногда к интенсивной инфильтрации полиморфно-ядерными лейкоцитами вместе с геморрагической реакцией и сосудистым некрозом. Позднее было показано, что в патогенезе реакции Артюса значительную роль играют иммунные комплексы, и это послужило моделью различных заболеваний человека, в которых подозревали участие иммунных комплексов.

Еще один феномен, связанный с аллергической реакцией на нетоксичные белки, был обнаружен при широком применении лошадиных противодифтерийной и противостолбнячной сывороток для лечения соответствующих заболеваний. Нередко лошадиную сыворотку нужно было использовать в больших количествах; в этих случаях на поздних этапах лечения иногда развивалось системное заболевание, сопровождающееся лихорадкой, высыпаниями, а в ряде случаев и поражениями суставов и почек. Это состояние Клеменс фон Пирке и Бела Шик (Clemens von Pirquet, Bela Schick) назвали сывороточной болезнью, так как было показано, что оно связано с образованием антител против белков введенной сыворотки.

Все эти аллергические реакции имеют две общие черты: любую из них можно пассивно передать нормальному реципиенту путем введения сыворотки гиперчувствительного донора, а сама реакция развивается в течение нескольких минут или, самое большее, в течение нескольких часов, почему и была названа *гиперчувствительностью немедленного типа*. В противоположность этому кожные и системные аллергические реакции, которые направлены против бактериальных продуктов и сопровождают инфекционное заболевание, как, например, кожную туберкулиновую реакцию, обычно нельзя пассивно перенести с помощью сывороточных антител. Для развития таких реакций, как правило, нужно несколько дней; отсюда и их название — *гиперчувствительность замедленного типа*. Только в 1942 г. Ландштейнер и Мерил Чейз (Landsteiner, Merrill Chase) смогли доказать, что замедленную гиперчувствительность и близкие ей реакции на токсин из плюща и другие вещества можно перенести интактным реципиентам с помощью неразрушенных сенсибилизированных клеток, но не с помощью циркулирующих антител. Впоследствии было установлено, что механизмы клеточного иммунитета (более широкий термин, включающий замедленную гиперчувствительность) участвуют не только в патогенезе многих инфекций и аутоаллергических заболеваний, но также в отторжении трансплантатов аллогенных тканей и имеют первостепенное значение в протективном (защитном) иммунитете ко многим вирусам и другим инфекционным агентам.

Любопытна та неоднозначность оценки, которая существовала на заре иммунологии при рассмотрении многих проявлений аллергии или гиперчувствительности. В ней видели механизм, предназначенный для выполнения защитных функций, но каким-то образом «сбившийся с пути» и вызывающий различные патологические состояния. Такой теологический взгляд на иммунитет укоренился настолько глубоко, что более полувека механизмы аллергии рассматривали как совершенно отличные от механизмов иммунитета. И лишь углубление знаний об участии иммунологических процессов в патогенезе таких заболеваний, как туберкулез и проказа, и создание таких экспериментальных моделей, как нефрит Мазуги (Masugi), экспериментальный аллергический энцефаломиелит и лимфоцитарный хориоменингит, привело к включению иммунопатологии в более широкую категорию иммунологических явлений.

2.2.5. Аутоиммунитет

Когда в 90-х годах прошлого столетия осознали, что вызвать образование антител можно даже с помощью веществ небактериальной природы типа растительных и сывороточных белков или эритроцитов, то для получения специфических антител стали вводить экспериментальным животным чуть ли не все мыслимые вещества, какие только попадались в руки иммунологам. Животных иммунизировали не только веществами чужеродного происхождения, но также неизменными компонентами своего собственного организма. В ранних работах с введением животному собственной сыворотки и других жидкостей организма неизменно получались отрицательные результаты, и это позволило Эрлиху (Ehrlich) сформулировать его знаменитое выражение: *страх самоотравления* (hogrog autotoxicus), согласно которому по неизвестным причинам организм не способен к иммунному ответу против собственных компонентов. Однако другие исследователи не ограничивались изучением одних только растворимых веществ, и вскоре Мечников и другие показали, что иммунизация животных их собственными сперматозоидами и клетками многих других органов ведет к образованию антител с цитотоксическими свойствами в отношении вводившихся клеток и часто специфичных к тому органу, из которого получены клетки. Этим было положено начало изучению феноменов аутоаллергии, при которых механизмы протективного иммунитета могут парадоксальным образом обратиться против человека, включаясь в пагубную для него реакцию, направленную против собственных элементов организма. Экспериментально показанная возможность аутоаллергического заболевания вскоре получила клиническое подтверждение — были открыты два глазных заболевания, в основе которых, по-видимому, лежали именно такие патогенетические механизмы. Первое из них, ставшее самым ярким примером этого рода страданий, получило название *факоанафиллаксии*. При этом у человека, получившего травму капсулы хрусталика, возникает сенсбилизация к освободившимся белкам и развивается воспалительная реакция на эти белки. Специфическая иммунологическая сенсбилизация менее заметна при другой клинической форме глазных заболеваний — симпатической офтальмии, при которой травма одного глаза, очевидно, сенсбилизирует человека таким образом, что у него развивается аллергическое заболевание как поврежденного глаза, так и другого.

С самого начала и далее, на протяжении многих десятилетий, было очевидно, что аутоиммунные процессы действительно существуют и притом имеют важное клиническое значение. Вскоре возникло предположение, что местом развития аутоиммунных реакций могут быть многие органы и клетки, в том числе щитовидная железа (болезнь Хашимото), мозг (аллергический энцефаломиелит), эритроциты (приобретенные гемолитические анемии) и ряд других. При многих из этих болезней (например, при гемолитических анемиях) лишь изредка удавалось доказать существенное патогенетическое значение циркулирующих антител. Значительно чаще они только сопутствовали заболеванию, как это бывает при аллергическом тиреоидите. Позднее было установлено, что многие из этих болезней можно перенести интактному животному не с сывороточными антителами, а с помощью сенсбилизированных клеток, как это было убедительно показано впервые при аллергическом энцефаломиелите. Подобные эксперименты внесли ясность в проблему и прочно обосновали значение клеточного иммунитета как главного фактора в патогенезе многих заболеваний.

Другая трудность в изучении природы и патогенеза аутоаллергических заболеваний связана с тем, что при некоторых из них обнаруживают циркулирующие аутоантитела, связь которых с основным патологическим процессом

установить не удастся. Так, ревматоидный фактор, который часто обнаруживают при ревматоидном артрите, по-видимому, представляет собой специфические антитела к сывороточному гамма-глобулину, но совершенно непонятно, почему они возникают и в чем заключается их действие. Аналогичным образом при так называемых коллагенозах типа системной красной волчанки и дерматомпозита часто находят циркулирующие антиядерные антитела против ДНК или комплексов ДНК с гистонами, однако и в этом случае происхождение и функции аутоантител остаются неясными.

2.2.6. Иммуногематология

После того как в конце 90-х г. прошлого столетия было показано, что антитела к эритроцитам могут вызывать их агглютинацию и гемолиз, эти клетки многократно использовались как антигены для иммунизации многих видов животных. Вскоре было обнаружено, что во многих сыворотках животных содержатся «естественные» изоантитела, способные агглютинировать эритроциты некоторых других представителей данного вида животных. В серии работ, начатых в 1901 г. и удостоенных впоследствии Нобелевской премии, Карл Ландштейнер (Karl Landsteiner) показал, что людей можно разделить на несколько групп по наличию в их сыворотках агглютининов, которые специфичны по отношению к эритроцитам других индивидуумов. Такое разделение на группы было очень четким и послужило основой для типирования по системе АВО, которая, судя по более поздним данным, детерминирована тремя аллельными генами. Теоретическое значение этих данных о генетически детерминированном антигенном полиморфизме вскоре было отодвинуто в тень важными последствиями для медицинской практики, послужившими основой для рационального подхода к типированию крови и разработки современных методов переливания крови. Развивая свои исследования, Ландштейнер открыл в 20-е годы вместе с Филипом Левином (Philip Levin) группы крови М и N, а в 1940 г. он вместе с Александром Винером (Alexander Wiener) обнаружил резус-фактор, который имеет важное практическое значение как при переливаниях крови, так и в качестве основной причины гемолитической болезни новорожденных (эритробластоз плода). С тех пор в эритроцитах обнаружено много других минорных антигенов, и иммуногематология внесла значительный вклад в развитие теоретической иммунологии, судебной медицины и способствовала прогрессу лечебной медицины.

2.2.7. Противоречие между клеточным и гуморальным иммунитетом

Историкам науки хорошо известно, что периоды наиболее значительного прогресса в какой-либо области очень часто бывают отмечены дискуссией между двумя противостоящими школами, каждая из которых стремится провести эксперименты, подтверждающие ее собственную точку зрения и опровергающие противоположный взгляд. Мы уже видели, как в ранний период развития иммунологии такие споры возникали вокруг природы взаимодействия антиген—антитело и способа действия комплемента, и именно в этом был заключен важный стимул для быстрого развития иммунологических знаний. Но, пожалуй, ни один спор не был таким долгим и не имел таких важных последствий для дальнейшего развития иммунологии, как спор между приверженцами клеточной теории иммунитета и теми, кто считал гуморальные факторы единственной основой иммунологических процессов. Вместе с тем этот иммунологический диспут не был изолированным явлением; его следует рассматривать скорее как

часть более широкой революции идей, которая происходила в медицине XIX в. и затронула самые основы понимания физиологических и патологических процессов. Более двух тысячелетий в медицине господствовали представления древнегреческих гуморалистов, видевших в болезни результат количественных и качественных нарушений равновесия главных жидкостей организма. Только в XIX в. было признано значение клеток, из которых состоят различные органы и которые образуют различные жидкости тела. Вирховской (Virchow) клеточной патологии (утверждающей, что в основе болезней лежит нарушение функции клеток) едва исполнилось 30 лет, когда иммунологам пришлось выбирать, чью сторону они займут в их собственном варианте этого большого конфликта.

Зоолог Мечников был первым, кто четко сформулировал представление о важной роли лейкоцитов в защите организма от инфекционных заболеваний, которая реализуется благодаря их способности к фагоцитозу (1884 г.). Это свое положение Мечников аргументировал тем, что даже у морских беспозвоночных имеются макрофаги, способные поглощать и разрушать чужеродные вещества или внедрившиеся бактерии или по крайней мере изолировать их с помощью грануломатозных реакций или образования гигантских клеток. Мечников полагал, что такую же защитную функцию несут фагоцитирующие клетки позвоночных, являющиеся наиболее важными участниками и естественного, и приобретенного иммунитета. Эта работа произвела глубокое впечатление на Пастера (Pasteur), и он пригласил Мечникова в свой недавно образованный Пастеровский институт в Париже, где Мечников с целым рядом выдающихся учеников провел следующие 28 лет в плодотворной и полной творческого воображения работе, стремясь подтвердить и расширить клеточную (фагоцитарную) теорию иммунитета.

Клеточная теория Мечникова сразу наткнулась на сопротивление. Прежде всего она была предложена в то время, когда большинство патологов видели в воспалительной реакции, а также в связанных с ней микрофагах и макрофагах не защитную, а вредоносную реакцию. В то время считали даже, что, хотя фагоцитирующие клетки действительно способны поглощать болезнетворные микроорганизмы, это приводит не к разрушению возбудителя, а к переносу его в другие части тела и распространению болезни. Позднее в 1888 г. Наттолл (Nuttall) нашел в сыворотке нормальных животных вещества, токсичные для некоторых микроорганизмов, и показал, что такие антибактериальные свойства значительно повышаются в результате иммунизации животного. В дальнейшем было обнаружено, что в сыворотке имеются два разных вещества, совместное действие которых приводит к лизису бактерий: термостабильный фактор, затем идентифицированный как сывороточные антитела, и термолабильный фактор, названный комплементом или алексином (от греч. *aleksein* — защищать)... Позднее студент Коха Ричард Пфайфер (Koch, Pfeiffer) описал получивший его имя феномен, при котором циркулирующие антитела вызывают специфический лизис холерных вибрионов, введенных в брюшную полость иммунизированных морских свинок. Такое же явление наблюдалось при пассивном переносе антител нормальному реципиенту.

Но, пожалуй, самый сильный удар по клеточной теории иммунитета был нанесен открытием Беринга и Китасато (Behring, Kitasato), которые в 1890 г. показали, что иммунитет к дифтерии и столбняку явно основан на циркулирующих антителах, а не на фагоцитирующих клетках. Со временем были обнаружены циркулирующие антитела к большинству вновь открываемых патогенных микроорганизмов, количество которых быстро увеличивалось. На примере дифтерийного антитоксина Пауль Эрлих (Paul Ehrlich) не только нашел способ количественного определения антител, но предложил также схему их строения,

которая помогла понять, что они из себя представляют и как действуют. Наконец ученик самого Мечникова Борде (Bordet) описал лизис эритроцитов гуморальными антителами и комплементом, и большинство исследователей стали соглашаться с Кохом (Koch), что победу одержали гуморалисты.

Несмотря на столь сильные аргументы против фагоцитарной теории, Мечников и его ученики отнюдь не собирались сдаваться. В своих статьях они вновь и вновь показывали, что устойчивость организма к данной инфекции часто может не совпадать с бактерицидной способностью крови. Вместе с тем видовая резистентность часто прямо коррелирует со способностью фагоцитов поглощать данный возбудитель, как в случае сибирской язвы. Были поставлены простые опыты, в которых микробы, помещенные в маленький мешочек из фильтровальной бумаги, защищающий их от фагоцитов, сохраняли свою вирулентность, хотя буквально купались в тканевой жидкости, богатой антителами. Мечников показал также, что образование богатого макрофагами перитонического экссудата и сопровождающая его активация макрофагов могут защищать организм от внутрибрюшного введения смертельной для нормальных животных дозы различных бактериальных возбудителей. Это был прообраз неспецифической иммунотерапии, применяемой в наши дни. Но в 90-е годы прошлого столетия общее настроение явно было не в пользу фагоцитарной теории, и попытка Мечникова восстановить престиж фагоцитоза публикацией в 1901 г. его знаменитой книги «Иммунитет к инфекционным болезням» оказалась запоздалой. Книга вызвала всеобщее восхищение своей эрудицией, но из неверующих она убедила лишь немногих.

Если обратиться к иммунологической литературе первого десятилетия нашего века, то становится очевидным, что, выбирая предмет изучения, большинство исследователей отдавали предпочтение не клеточной, а гуморальной теории иммунитета. Большая часть иммунологов, за исключением самого Мечникова и его ближайших последователей, избрали предметом своих исследований антитела, которые легче определять количественно и с которыми проще работать, чем с клетками. Тем не менее в этот период времени было сделано две попытки примирить противоречия между гуморальным и клеточным направлениями. В 1908 г. Шведская академия удостоила Нобелевской премии по медицине совместно Мечникова — основателя клеточного направления и Эрлиха — олицетворявшего гуморалистские идеи того времени. Несколько ранее в Англии сэр Элмрот Райт и С. Р. Дуглас (Almroth Wright, S. R. Douglas) попытались примирить различия между этими двумя школами в своих капитальных исследованиях процесса опсонизации (от греч. *opsonein* — делать съедобным). Эти ученые утверждали, что клеточный и гуморальный факторы являются одинаково важными и взаимозависимыми в том отношении, что гуморальные антитела, специфически реагируя со своей мишенью — микроорганизмом, подготавливают его к фагоцитозу макрофагами.

Приверженность Райта этой идее была в Англии настолько известна, что его друг Бернард Шоу использовал это в качестве сюжета для своей пьесы «Врач перед дилеммой». Этой едкой насмешке над деятелями медицинской профессии Шоу предпослал «Предисловие о докторах», в котором выразил взгляды Райта следующим образом: «Следуя одной из самых плодотворных биологических фантазий Мечникова, сэр Элмрот Райт обнаружил, что белые кровяные шарики, или фагоциты, которые атакуют и пожирают возбудителей наших болезней, делают это лишь в том случае, если мы для аппетита намажем этих возбудителей естественным соусом, который сэр Элмрот назвал опсонием». Однако предложенные Райтом опсонический индекс и терапевтические подходы вскоре вышли из употребления отчасти из-за того, что сами методы были слиш-

ком сложными для применения, а получаемые результаты было трудно воспроизвести. Старания Райта оживить клеточную теорию иммунитета не оказали значительного влияния на дальнейшее развитие иммунологии.

Тот факт, что на рубеже нашего столетия гуморальная теория иммунитета одержала верх над клеточной теорией, на долгое время определил дальнейшее развитие молодой иммунологической науки. Так уж часто происходит в науке, что самые одаренные и продуктивные исследователи выбирают себе направление, основываясь на том, что они (или их учителя) считают наиболее важным в своей области знания, а в первые десятилетия XX в. большинству исследователей было очевидно, что ключ к пониманию иммунитета заложен в антителах. Поэтому с точки зрения гуморалистских представлений тех времен многие заслуживающие внимания проблемы клеточной иммунологии воспринимались как «неинтересные». Разумеется, некоторые исследователи, такие, как Ханс Зинссер (Hans Zinsser) и позднее Арнольд Рич (Arnold Rich) продолжали изучать «бактериальную аллергию», а Дienes (Dienes) и его сотрудники в 20-х годах исследовали «замедленную гиперчувствительность» к простым белковым антигенам, вводимым в туберкулезные бугорки (прообраз адьюванта Фрейнда), но в общем потоке исследований все это были единичные исключения, не оказавшие заметного влияния на развитие иммунологических представлений того времени. И даже много лет спустя, в 1951 г., в своей классической книге «Патогенез туберкулеза» Рич (Rich) имел все основания утверждать, что сущность бактериальной аллергии, ее связь с иммунитетом и даже степень участия в ней хорошо известных макрофагов и вездесущих, но загадочных лимфоцитов остаются очень мало понятными. Даже сообщение Ландштейнера и Чейза (Landsteiner, Chase), которые в 1942 г. показали, что туберкулиновую и контактную гиперчувствительность можно пассивно перенести клетками, не произвело большого впечатления, и вплоть до 50—60-х гг. «клеточный иммунитет» продолжал оставаться в тени. И только тогда возникла новая волна интереса к клеткам, которая была стимулирована данными Медавара о трансплантации тканей, работами Биллингхема, Брента и Медавара (Billingham, Brent, Medawar), описавших иммунологическую толерантность, настойчивыми утверждениями важной роли клеток в теориях образования антител, которые предлагал Макфарлейн Бернет (Macfarlane Burnett), и открытием роли тимуса при заболеваниях, связанных с иммунологической недостаточностью.

2.3. Теории образования антител

Вначале в термин антитело (antikörper) не вкладывалось какого-то определенного смысла. Этим словом обозначали любое начало, присутствовавшее в иммунной сыворотке и способное нейтрализовать токсины и патогенные бактерии. Однако возможность пассивного переноса иммунитета с помощью сыворотки показала, что антитела должны быть особым веществом, которое каким-то образом возникает в иммунизированном организме. Механизм их образования сразу же явился предметом для теоретических построений и исследований. Вначале возникла вполне правдоподобная версия, что информацию, определяющую специфичность антител, несет сам антиген, который каким-то образом включается в молекулу антитела и придает ей способность специфически реагировать с другими молекулами антигена, имеющими сходное строение. Эта теория не смогла просуществовать долго, потому что уже ранние количественные исследования показали, что в организме образуется значительно больше антител, чем это может быть обусловлено количеством введенного антигена, а сам

процесс образования антител, единожды начавшись, продолжается без дополнительных инъекций антигена. И наконец, в 1897 г. Пауль Эрлих (Paul Ehrlich) предложил всеобъемлющую теорию образования антител, которая сначала была дополнением к его выдающимся работам по количественному определению дифтерийного токсина и антитоксина, а затем была детально разработана самим Эрлихом и его учениками.

2.3.1. Теория боковых цепей Эрлиха

Эрлих (Ehrlich) полагал, что антитела представляют собой макромолекулы, специфичность которых для антигена и комплемента зависит от присутствия определенных стереохимических конфигураций, обладающих комплементарностью к аналогичным структурам антигена, что обеспечивает специфическое взаимодействие между ними. По его мнению, антитела — это естественный компонент организма, играющий роль специфического рецептора поверхностной мембраны клеток, где они выполняют в норме такие же физиологические функции, как гипотетические рецепторы для питательных веществ или как рецепторы для лекарственных препаратов, существование которых утверждал Эрлих в своих более поздних теориях химиотерапии. Один из постулатов Эрлиха заключался в том, что антиген специфически отбирает соответствующие антительные рецепторы, отрывающиеся затем от поверхности клеток. Это приводит к компенсаторной гиперпродукции рецепторов, которые накапливаются в крови в виде циркулирующих антител. Блестящая теория, предложенная Эрлихом, оказала глубокое и длительное влияние и — особенно в Германии — определила развитие идей в самых разных областях медицины. В те времена мало кто был обеспокоен мыслью о том, какую проблему составляет обширный иммунологический репертуар антигенов и антител, ибо единственным видом антител, известных в середине 90-х годов, были антитоксины против довольно ограниченного числа возбудителей болезней человека и животных. Однако в последующие десятилетия в иммунологии произошли два события, бросившие тень сомнения на теорию Эрлиха. Первым из них был целый поток исследований, показавших, что антитела можно получить против огромного количества разнообразных вполне безвредных природных веществ животного и растительного происхождения, в том числе тех, с которыми организм в обычных условиях никогда не встречался. Кроме того, в двадцатые годы появились данные Ф. Обермайера и Е. П. Пика (F. Obermeyer, E. P. Pick), значительно развитые затем Карлом Ландштейнером (Karl Landsteiner), согласно которым антитела могут образовываться против почти любого искусственного химического соединения, если его присоединить в качестве гаптена к белку-носителю. После этого стало казаться невероятным, чтобы организм мог вырабатывать специфические антитела против такого огромного количества чужеродных и даже искусственно созданных структур.

Второе обстоятельство, которое способствовало отмиранию эрлиховской теории, заключалось в общем изменении взглядов, определявших требования к теории образования антител. Если первые десятилетия иммунологии можно назвать эпохой бактериологии, то период после первой мировой войны можно с полным основанием обозначить как эпоху иммунохимии. Это отчасти связано с теми сдвигами, которые произошли в результате работ Ландштейнера по искусственным гаптенам, а также исследований Майкла Гейдельбергера (Michael Heidelberger) по пневмококковым полисахаридам и количественной иммунохимии. Поскольку в иммунологии того времени доминировали химический подход и химический образ мышления, предлагавшиеся тогда теории образования

антител неизменно стремились в первую очередь объяснить строгую серологическую специфичность и широкий репертуар возможных специфичностей антител. Такие теории зачастую пренебрегали более общими биологическими аспектами антителообразования, такими, как длительность иммунного ответа и присущая ему способность к анамнестической реакции на повторное введение антигена.

2.3.2. Инструктивные теории образования антител

Вполне естественно, что в тот период времени, когда так мало было известно о структуре белков и еще меньше о пути их образования, все было под впечатлением широты иммунологического репертуара и разнообразия химических структур, способных вызвать их образование. Именно это и привлекало внимание к антигену как носителю иммунологической информации. Сложилось убеждение, что именно антиген управляет образованием специфических антител, направляя механизмы белкового синтеза на изготовление тех уникальных молекулярных конфигураций, которые определяют иммунологическую специфичность. Тем или иным способом антиген должен передать новообразованной молекуле белка информацию о своей специфичности, чтобы придать этой молекуле функции антитела. Наиболее известная из этих инструктивных теорий, созданная в 1930 г. Ф. Брейнем и Ф. Гауровицем (F. Breinl, F. Haurowitz), утверждала, что антиген играет роль матрицы, которая обеспечивает сборку уникальных аминокислотных последовательностей полипептидной цепи антител. Позднее инструктивная теория была развита Лайнусом Полингом (Linus Pauling), поддержавшим ее всем авторитетом, которым он пользовался в области физической химии. Утверждалось, что антиген может служить тем шаблоном, на котором происходит свертывание предобразованной полипептидной цепи с возникновением соответствующей третичной конфигурации, заключающей в себе стереохимическую специфичность. В течение нескольких десятилетий подобные теории прямой матрицы пользовались большой популярностью, так как казалось, что они предлагают единственное разумное объяснение тому многообразию антител, которое, как показали Ландштейнер (Landsteiner) и другие, может образовываться в организме позвоночных.

Однако, исходя из этих химических теорий, биологи не могли представить, каким образом образование антител может продолжаться при видимом отсутствии антигена, и даже не пытались понять, почему повторное введение антигена должно вызывать вторичный (бустерный) ответ. Более того, эти теории совсем не могли объяснить последних данных о том, что при повторной иммунизации происходит изменение качества антител, которое в одних случаях приводит к сужению специфичности, а в других — к значительному расширению диапазона перекрестных серологических реакций. С точки зрения биолога, теории матрицы обладали значительными недостатками, и именно это привело вирусолога Макфарлейна Бернета (Macfarlane Burnet) к созданию в 1941 г. другого варианта инструкционистской теории. В условиях растущего признания той роли, которую ферменты играют в процессах синтеза и расщепления, Бернет предположил, что функция антигена может заключаться в том, что он стимулирует адаптивную модификацию тех ферментов, которые необходимы для синтеза глобулина, вызывая в результате образование уникальной белковой молекулы с нужной специфичностью. Эта теория адаптивных ферментов имела то преимущество, что с позиций первичной инструктивной роли антигена она объясняла не только широту иммунологического репертуара, но и длительное образование антител и усиленный вторичный иммунный ответ. Предполагалось, что эти явления связаны с репликацией адаптивных ферментов в увеличиваю-

щейся популяции пролиферирующих дочерних клеток, которые сохраняют способность образовывать антитела. Этот последний момент имеет особое значение, поскольку Бернет (Burnet) является, по-видимому, первым, кто подчеркнул важную роль длительного функционирования клеток и клеточной пролиферации в процессе образования антител.

С развитием представлений о возможной генетической роли нуклеиновых кислот Бернет и Франк Феннер (Burnet, Frank Fenner) в 1949 г. предложили модификацию этой теории, по-прежнему исходя из биологических соображений. На этот раз они предположили, что антиген может вносить информацию о своей специфической детерминанте прямо в геном (РНК?). Это приводит затем к образованию непрямого матрицы для специфических антител. Новая копия гена будет не только сохраняться в клетке, но в условиях клеточной пролиферации будет воспроизводиться в дочерних клетках, что и объясняет длительное антителообразование и повышенную интенсивность вторичного ответа.

2.3.3. Селективные теории образования антител

Теория непрямого матрицы Бернета и Феннера (Burnet, Fenner) указала на другое чрезвычайно важное биологическое явление, имеющее критическое значение, которое обязана была учитывать любая теория образования антител — недавно открытый феномен приобретенной иммунологической толерантности. Теперь в теоретическом объяснении нуждались не только то, как стимулируется образование антител, но и механизм, предотвращающий эту реакцию.

Первую, чисто биологическую, селективную теорию образования антител сформулировал в 1955 г. Нильс Эрне (Niels Jerne), который назвал ее теорией «естественного отбора». Эрне, как и раньше Пауль Эрлих (Paul Ehrlich), предположил, что в организме действительно синтезируется полный набор антител, но каждое из них образуется в небольшом количестве и независимо от какого-либо стимула поступает в кровь в виде «естественных антител». Функция этих антител должна состоять в том, чтобы избирательно связываться с соответствующим антигеном и таким способом доставлять этот антиген неким клеткам организма, для которых антитела служат сигналом к воспроизведению таких же молекул, т. е. к образованию большого количества специфических антител. С этой точки зрения вторичный антительный ответ получал простое объяснение как результат появления после первой иммунизации увеличенного числа антител-«носителей», присутствие которых будет одновременно способствовать селекции антигеном антител с более высоким сродством, что объясняет изменение качества антител при многократной иммунизации. Это была первая теория, которая объясняла также феномен иммунологической толерантности, принимая, что любые естественные антитела, направленные против собственных антигенов, будут немедленно адсорбироваться тканями организма и, таким образом, не смогут запустить образование аутоантител.

Теория естественного отбора, предложенная Эрне, привлекла на свою сторону лишь немного приверженцев инструктивных теорий, однако она имела большое историческое значение, так как дала стимул для теоретиков биологического направления. Действие этого стимула проявилось очень скоро, когда на протяжении трех лет Бернет, Дэвид Толмедж и Джошуа Ледерберг (Burnet, David Talmadge, Joshua Lederberg) создали клоновально-селекционную теорию образования антител. Основа этой концепции заключается в том, что антитела представляют собой естественный продукт, присутствующий на поверхности клеток в качестве рецептора, с которым антиген может вступать в избирательное (селективное) взаимодействие. Это взаимодействие служит сигналом для кло-

нальной пролиферации популяции клеток, которые фенотипически отличаются от остальных тем, что специфичны именно к данному антигену. Среди дочерних клеток клона часть дифференцируется в сторону антителообразующих клеток, а остальные сохраняются в качестве клеток иммунологической памяти, которые могут в последующем обеспечить усиленный вторичный ответ. И наконец, теория утверждала, что иммунологическая толерантность возникает в результате «элиминации клонов», происходящей вследствие специфического воздействия собственных антигенов, или в том случае, когда антигены попадают извне в течение критической стадии эмбрионального созревания клональных предшественников.

Спустя очень короткое время стало ясно, что клонально-селекционная теория образования антител получила широкое признание. Это отчасти было связано с разработкой новых методов, позволивших выявлять в обширной популяции клеток единичные иммуноциты (с помощью иммуногистохимического определения с флуоресцирующими антителами и методами гемолитических бляшек). Определенную роль сыграли также успехи в новых направлениях генетики, показавшие, что передача информации происходит только от нуклеиновых кислот к белкам, но не наоборот, и что третичная структура белков находится под строгим генетическим контролем. Однако положение о том, что структура антител закодирована в ДНК, и данные об аминокислотной последовательности полипептидных цепей молекул иммуноглобулинов привели клонально-селекционную теорию к противоречию, связанному с разнообразием иммунологического репертуара. В результате возникла длительная дискуссия между теми, кто считал, что весь специфический репертуар закодирован в ДНК половых клеток, и теми, кто связывал иммунологическое разнообразие с действием соматических мутаций или рекомбинаций строго ограниченного числа генов, находящихся в половой клетке.

2.4. Нобелевские лауреаты в иммунологии

1901

Первой Нобелевской премии по медицине был удостоен Эмиль фон Беринг (Emil von Behring; 1854—1917). Свои исследования фон Беринг проводил у Роберта Коха (Robert Koch) в Коховском институте в Берлине. После того как в 1883 г. Леффлер (Löffler) выделил дифтерийную бациллу, а Ру и Йерсин (Roux, Yersin) в 1888 г. обнаружили дифтерийный экзотоксин, фон Беринг со своими сотрудниками Китасато и Вернике (Kitasato, Wernicke) в 90—92 гг. прошлого столетия показали, что иммунитет к дифтерии и столбняку зависит от образования антитоксинов, циркулирующих в крови. Он показал, что пассивное введение антитоксической сыворотки может обеспечить выздоровление больных, и этим положил начало сывороточной иммунотерапии разнообразных болезней. Премия была присуждена ему «за его исследования по сывороточной терапии, и, в частности, за применение ее против дифтерии, в результате чего он открыл новый путь в области медицинской науки и дал в руки врача победоносное оружие против болезни и смерти».

1905

Премия присуждена Роберту Коху (Robert Koch; 1843—1910) «за его исследования и открытия, связанные с туберкулезом». Кох был врачом в маленьком немецком городе, когда в 1876 г. его исследования о жизненном цикле бацилл

спбирской язвы и этиологии этого заболевания привлекли к нему внимание специалистов-медиков. Сначала он получил лабораторию, а затем и институт в Берлине, и именно здесь с помощью замечательной плеяды учеников он превратил бактериологию в подлинную науку, разработав строгие методы выделения и культивирования бактерий и выдвинув знаменитые свои постулаты как критерий этиологической роли возбудителя. Кох посвятил себя изучению многих различных болезней, но присуждение ему Нобелевской премии было связано с открытием возбудителя туберкулеза, изучением туберкулина и непрекращающимся интересом к исследованию туберкулеза. Иммунодиагностика с помощью туберкулинового теста и «феномен Коха», который состоит в повышенной кожной реакции на туберкулезные бациллы при введении их в кожу сенсibilизированных животных, сыграли решающую роль в изучении механизмов клеточного иммунитета.

1908

Премию этого года разделили Илья Мечников (1845—1916) и Пауль Эрлих (Paul Ehrlich; 1854—1915), получившие ее в качестве «признания их работ по иммунитету». Мечников родился на Украине, изучал зоологию и специализировался по сравнительной эмбриологии. В 1884 г., работая в Италии, в лаборатории по исследованию биологии моря, он сделал первые наблюдения по фагоцитирующим клеткам личинок морской звезды, которые составили основу его клеточной (фагоцитарной) теории иммунитета. Когда по политическим мотивам Мечников покинул Россию, Пастер (Pasteur) предложил ему место в своем новом институте в Париже, где Мечников посвятил остаток своей жизни великолепной серии исследований в поддержку своей фагоцитарной теории и решительному отражению многочисленных атак со стороны тех, кто видел основу иммунитета в гуморальных механизмах, т. е. в антителах и комплементе.

Пауль Эрлих (Paul Ehrlich) родился в Германии, изучал медицину и, рано заинтересовавшись методами окрашивания клеток, предложил некоторые весьма полезные красители для туберкулезных бацилл и лейкоцитов крови. В 1890 г. он стал работать ассистентом у Коха (Koch) в Институте инфекционных болезней, где и провел свои иммунологические исследования. Вначале он изучал образование антител в ответ на введение токсинов растительного происхождения — рицина и абрина. В 1897 г. Эрлих внес свой наиболее значительный для того времени вклад в иммунологию, опубликовав статью с описанием первого практического метода стандартизации препаратов дифтерийного токсина и антитоксина. В этой публикации содержался также набросок его знаменитой теории боковых цепей, объясняющей образование антител, которая в течение нескольких десятилетий оказывала значительное влияние на иммунологические теории. В самом начале двадцатого столетия Эрлих в основном оставил свои исследования по иммунологии, заинтересовавшись химиотерапией, и сделал важные открытия в лечении трипаносомоза и сифилиса («магическая пуля» — сальварсан), чем способствовал созданию основ научной фармакологии.

1913

Премия присуждена Шарлю Рише (Charles Richet; 1850—1935) «за исследования по анафилаксии». Рише изучал медицину в Париже и особенно интересовался физиологией. Этот интерес побудил его во время круиза на яхте принца Монако заняться исследованием физиологических реакций, возникающих при введении животным ядов, полученных от морских беспозвоночных.

Вместе со своим коллегой Полем Портье (Paul Portier) он открыл феномен анафилаксии, обусловленный не токсическими свойствами вводимых веществ, а их действием как антигенов в предварительно сенсibilизированном организме. Тем самым он открыл новое и в то время весьма неожиданное направление в медицине, показав, что «защитные» механизмы иммунитета могут также вызывать развитие болезни. Позднее Рише показал связь между экспериментальной анафилаксией и другими, более известными, видами аллергии у человека, и его наблюдения приобрели большое значение не только для теоретической, но и для клинической иммунологии.

1919

Премия присуждена Жюлю Борде (Jules Bordet; 1870—1961) «за его исследования по иммунитету». Борде был бельгийским врачом, в возрасте 24 лет он отправился в Пастеровский институт в Париже, чтобы работать с Мечниковым. Вскоре он сделал важный вклад в понимание механизма комплементзависимого бактериолиза, а в 1898 г. открыл феномен специфического гемолиза. Спустя некоторое время, работая вместе со своим помощником и зятем Октавом Жангу (Octave Gengou), Борде описал феномен фиксации комплемента и диагностические возможности этой реакции. Вскоре она превратилась в мощный инструмент диагностики инфекционных болезней, особенно в руках Августа Вассермана (August Wasserman) и его сотрудников, разработавших пробу связывания комплемента для диагностики сифилиса. Борде внес еще много ценного в иммунологию и прославился также своей знаменитой дискуссией с Эрлихом (Ehrlich) относительно природы взаимодействия между антигеном, антителами и комплементом.

1930

Премии удостоен Карл Ландштейнер (Karl Landsteiner; 1868—1943) «за открытие групп крови у человека». До своей иммунологической карьеры Ландштейнер был врачом в Вене и питал глубокий интерес к структурной органической химии.

Кажется, что Ландштейнер с самого начала умел выбирать для своей работы наиболее важные направления или делать важными те проблемы, на которые он обращал внимание. В своих ранних исследованиях по антиэритроцитарным антителам он описал в 1901 г. ряд изогемагглютининов человека, которые в наше время составляют систему групп крови АВО. В 1926 г. Ландштейнер и Филип Левин (Philip Levin) открыли систему MNP, а в 1940 г. вместе с Альбертом Винером (Albert Wiener) — систему групп крови Rh. Ландштейнер впервые показал, что полиомиелит можно воспроизвести на нечеловекообразных обезьянах и одним из первых сделал аналогичные наблюдения в отношении сифилиса. Во время первой мировой войны Ландштейнер заинтересовался образованием антител к гаптенам с известным химическим строением и более четверти века, работая в основном в Рокфеллеровском институте в Нью-Йорке, внес весьма значительный вклад в понимание химических основ взаимодействия между антителами и антигеном, обобщив свои наблюдения в своей знаменитой книге «Специфичность серологических реакций». Отдавая должное значение своему открытию групп крови, Ландштейнер заметил, что, с его точки зрения, премию 1930 г. следовало бы скорее присудить за его исследования по взаимодействию гаптен — антитело.

1951

Премия присуждена Максу Тейлеру (Max Theiler; 1899—) «за разработку вакцины против желтой лихорадки». Тейлер родился в Южной Африке, изучал медицину в Англии и затем в 1922 г. переехал в Соединенные Штаты, где работал сначала в отделении тропической медицины в Гарвардском университете, а затем в Рокфеллеровском институте в Нью-Йорке. Именно он показал, что возбудителем желтой лихорадки является фильтрующийся вирус, и описанный им тест защиты мышей (при котором сывороточные антитела в смеси с вирусом защищают мышью от гибели при внутримозговом заражении) стал весьма важным инструментом в эпидемиологических и других исследованиях желтой лихорадки. В конце 30-х годов ему удалось получить аттенуированные штаммы вируса желтой лихорадки; для этого он применил серийные пассажи *in vitro* на культурах ткани мышей и куриных эмбрионов. Этими методами были созданы штаммы, которые сохраняли свою иммуногенность, но были лишены патогенности и составили основу современных эффективных вакцин против желтой лихорадки.

1957

Премия присуждена Даниэлю Бове (Daniel Bovet; 1907—), швейцарскому физиологу и фармакологу, «за разработку антигистаминных препаратов для лечения аллергии». Открытие феномена Шульца — Дейла (Schultz, Dale) (сокращенно кусочка матки под влиянием антигена) позволило моделировать *in vitro* аллергические реакции и изучать участвующие в них физиологические механизмы. В результате этого было обнаружено, что среди факторов, которые освобождаются при анафилаксии, наиболее важными являются гистамин, серотонин и другие биологически активные вещества. Бове, по-видимому, познакомился с иммунологией и аллергией в период своей работы у Эмиля Ру (Emile Roux) в Пастеровском институте в Париже, когда он опубликовал много работ о действии различных химических соединений на вегетативную нервную систему. Эти исследования привели его к поиску веществ, способных подавлять действие гистамина; в результате появились лекарственные препараты, оказавшиеся эффективным средством лечения астмы и сенной лихорадки. Если бы даже Бове не прославился работой над антигистаминными препаратами, он все равно бы занял прочное место в истории медицины благодаря своим исследованиям южноамериканского кураре и способа его действия, разработке курареподобных релаксантов, транквилизаторов и обезболивающих препаратов.

1960

Премия присуждена Ф. Макфарлейну Бернету (Macfarlane Burnet; 1899— 1985) и Питеру Медавару (Peter Medawar; 1915—) «за открытие приобретенной иммунологической толерантности». Вторая мировая война послужила толчком для фундаментальных исследований в различных областях науки, в том числе для поиска путей улучшения приживляемости кожных и других тканевых трансплантатов при лечении ран и ожогов, а также для выяснения механизмов их отторжения. Медавар, англичанин, работавший в Оксфорде в области зоологии и патологии, интересовался репарацией тканей и в связи с этим — проблемами трансплантации тканей. В его первоначальной работе было убедительно показано, что отторжение чужеродного кожного трансплантата подчиняется всем правилам иммунологической специфичности и в основе

его лежат такие же механизмы, как и при защите от бактериальных и вирусных инфекций. Последующая работа, которую он провел вместе с рядом выдающихся учеников (особенно следует отметить Руперта Биллингхема и Лесли Брента — Rupert Billingham, Leslie Brent), заложила прочную основу для развития трансплантационной иммунологии, которая стала важной научной дисциплиной и в дальнейшем обеспечила многие достижения в области клинической трансплантации органов. В 45—47 гг. Рэй Оуэн (Ray Owen) сообщил о любопытном наблюдении, заключавшемся в том, что у двуяйцевых телят-близнецов, которые во время внутриутробного развития имеют общую систему кровообращения, развиваются химеризм по клеткам крови и неспособность к иммунологической реакции на антигены партнера. Это наблюдение было подхвачено Макфарлейном Бернетом — австралийским исследователем, врачом-вирусологом, который не только вел интенсивные экспериментальные исследования, но был также теоретиком широкого профиля. Бернет ранее опубликовал интересную книгу «Образование антител» (1941 г.) и в тот момент вместе со своим коллегой Франком Феннером (Frank Fenner) готовил пересмотренное издание этой книги. Новая книга (1949) не только предлагала новый вариант теории непрямои матрицы для объяснения образования антител, но и дала теоретическое объяснение наблюдениям Оуэна (Owen). Бернет и Феннер утверждали, что способность к иммунологическим реакциям возникает на сравнительно поздних стадиях эмбрионального развития и при этом происходит запоминание существующих маркеров «своего» у антигенов, присутствующих в данный момент. Организм в последующем приобретает к ним толерантность и не способен отвечать на них иммунологической реакцией. Все антигены, которые не запомнились, будут восприниматься как «не свои» и смогут в дальнейшем вызывать иммунологический ответ. Было высказано предположение, что любой антиген, введенный в течение этого критического периода развития, будет затем восприниматься как свой и вызывать толерантность, в результате чего не сможет в дальнейшем активировать иммунную систему. Эти идеи были далее развиты Бернетом в его клонально-селекционной теории образования антител. Предположения Бернета и Феннера о толерантности были подвергнуты экспериментальной проверке в исследованиях Медавара (Medawar) и его сотрудников, которые в 1953 г. на мышах чистых линий получили четкое подтверждение гипотезы Бернета — Феннера, описав феномен, которому Медавар дал название приобретенной иммунологической толерантности.

1972

Премия присуждена Роднею Р. Портеру (Rodney R. Porter; 1917—1985) из Оксфордского университета и Джералду М. Эдельману (Gerald M. Edelman; 1929—) из Рокфеллеровского университета за их исследования по химической структуре антител. Данные А. Тизелиуса и Э. А. Кабата (A. Tiselius, E. A. Kabat) о том, что антитела являются гамма-глобулинами с большой молекулярной массой, показали, насколько трудным будет установить химическую основу для их первичной иммунологической специфичности и их вторичных биологических свойств. Расщепляя молекулу антитела ферментами, Портер стремился получить более мелкие активные фрагменты, и в 1958 г. он добился успеха. При расщеплении папаином из молекулы антитела удалось выделить три составляющие ее фрагмента: два идентичных Fab-фрагмента и третий Fc-фрагмент. Fab-фрагмент содержит антительные участки связывания антигена, а Fc обеспечивает вторичную биологическую активность антитела. Затем Эдельман (Edelman) показал, что, восстанавливая гомогенный миеломный белок,

можно выделить составляющие его полипептидные цепи — легкие (L) и тяжелые (H). Он показал также, что L-цепи различных антител, полученных от морских свинок, имеют разную электрофоретическую подвижность, а белок Бенс-Джонса, обнаруживаемый в моче больных с множественной миеломой, обладает сходством с L-цепями антител. Далее Портер и его сотрудники показали, что молекула иммуноглобулина образована двумя легкими и двумя тяжелыми цепями. На основе этих данных была создана теперь уже общепризнанная модель строения IgG. Выделение из иммуноглобулина цепей и фрагментов открыло возможность изучения их аминокислотной последовательности; такие исследования стали проводиться с большой интенсивностью в лабораториях Портера, Эдельмана и многих других исследователей. В результате этих работ было установлено, что в L- и H-цепях существуют как переменные, так и константные области, и появилась возможность сравнивать первичную структуру антител разной специфичности, различных изотипов и даже разных видов животных. Наконец в 1969 г. Эдельман и его сотрудники сумели расшифровать полностью первичную структуру одной молекулы иммуноглобулина, что позволило не только установить положение антиген-связывающего участка, но также локализовать те «домены», которые обеспечивают вторичные биологические функции антител.

1980

Премия присуждена Баруху Бенацерафу (Baruj Benacerraf; 1920—), Жану Доссе (Jean Dausset; 1916—) и Джорджу Снеллу (George Snell; 1903—) «за их работу по генетически детерминированным структурам клеточной поверхности, регулирующим иммунологические реакции». Наблюдения о том, что способность мыши отторгнуть пересаженную опухоль зависит от генетических факторов, стимулировали генетика Снелла на поиски методов, которые позволили бы исследовать гены, ответственные за данное явление. Это привело его в середине 40-х годов к идее конгенных мышей — животных, которые генетически идентичны во всем, за исключением лишь одного какого-то локуса или генетической области. Работая вместе с Питером Горером (Peter Gorer), Снелл идентифицировал локус, наиболее важный для отторжения аллотрансплантата и обозначенный как *H-2* (*H*, от англ. *h*istocompatibility — гистосовместимость). В дальнейшем было показано, что он представляет собой комплекс многих тесно сцепленных генов с множеством различных аллелей для каждого локуса. С тех пор усилиями многих исследователей было достигнуто глубокое понимание структуры и функции этого сложного участка ДНК, обозначаемого в настоящее время как главный комплекс гистосовместимости. В 50-е годы француз Жан Доссе (Jean Dausset) обнаружил, что после гемотрансфузии в крови реципиентов появляются изоантитела против лейкоцитарных антигенов. Таким образом была выявлена аналогия между комплексом *H-2* у мыши и системой лейкоцитарных антигенов (HLA — от англ. *h*uman *l*eukocyte *a*ntigen) у человека, что создало возможность для определения индивидуальных HLA антигенов. В 1965 г. Доссе (Dausset) и его сотрудники описали систему примерно из 10 антигенов человека, закодированных в главном комплексе гистосовместимости, который включает «сублокусы», определяющие ограниченное число антигенных аллелей. Именно этот подход в конечном итоге открыл путь к определению главных и минорных антигенов, связанных с гистосовместимостью, и выяснению их генетической локализации. Однако значение генов, входящих в состав комплексов HLA и *H-2*, все еще не выходит за пределы нефизиологических условий, возникающих при пересадке тканей или при переливании крови. Именно Бенацераф (Benacerraf) и его сотрудники показали, что многие из генов,

локализуемых в главном комплексе гистосовместимости (МНС), могут также контролировать активный иммунный ответ на различные антигенные стимулы. Используя простые антигены типа синтетических полипептидов, Бенаццераф установил, что способность животного к иммунологическому ответу на данный антиген находится под контролем особых генов, названных *Ir* (immune response genes — гены иммунного ответа). В дальнейшем другие исследователи показали, что эти гены расположены в *I*-области МНС. В последующем работами многих лабораторий, и в том числе лаборатории Бенаццерафа и других, было установлено важное значение генов *I*-области в контроле взаимодействия иммуноцитов, осуществляющих регуляцию иммунологического ответа, и значение некоторых МНС-генов в предрасположенности к некоторым хроническим заболеваниям.

ЛИТЕРАТУРА

Основная

1. Arrhenius S. *Immunochemistry*. Macmillan, New York (1907).
2. Bordet J. *Studies on Immunity*, translated by F. Gay. John Wiley, New York (1909).
3. Bordet J. *Traité de l'Immunité dans les Maladies Infectieuses*. Masson, Paris (1920).
4. Burnet F. M. *The Production of Antibodies*, 1st ed. Macmillan, Melbourne (1941).
5. Burnet F. M. *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*. The University Press, Cambridge (1959).
6. Burnet F. M., Fenner F. *The Production of Antibodies*, 2d ed. Macmillan, Melbourne (1949).
7. Ehrlich P. The Croonian lecture: On immunity. *Proc. R. Soc. Lond. [Biol.]*, 66, 424 (1900).
8. Ehrlich P. *Collected Studies in Immunity*. John Wiley, New York (1905).
9. Ehrlich P. *Collected Papers of Paul Ehrlich*, Vol. 2. Pergamon, New York (1957).
10. Landsteiner K. *The Specificity of Serological Reactions*. Harvard University Press, Boston (1945).
11. Marrack J. R. *The Chemistry of Antigens and Antibodies*. H. M. Stationery Office, London (1934).
12. Metchnikoff E. *Lectures on the Comparative Pathology of Inflammation*. Kegan, Paul, Trench, Trübner, London (1893).
13. Metchnikoff E. *Immunity in the Infectious Diseases*. Macmillan, New York (1905).
14. Nuttall G. H. F. *Blood Immunity and Blood Relationships*. University Press, Cambridge (1904).
15. Von Pirquet C., Schick B. *Serum Sickness*. Williams and Wilkins, Baltimore (1951).

Дополнительная

1. Bulloch W. *The History of Bacteriology*, Oxford University Press, London (1938).
2. Castiglioni A. *A History of Medicine*. Knopf, New York (1947).
3. Foster W. D. *A History of Medical Bacteriology and Immunology*. Heinemann, London (1970).
4. Marks G. M., Beatty W. K. *Epidemics*, Scribner, New York (1976).
5. Marquardt M. Paul Ehrlich. Schuman, New York (1957).
6. Mazumdar P. M. H. Immunity in 1890, *J. Hist. Med. Allied Sci.*, 27, 312 (1972).
7. Mazumdar P. M. H. The antigen-antibody reaction and the physics and chemistry of life, *Bull. Hist. Med.*, 48, 1 (1974).
8. Mazumdar P. M. H. The purpose of immunity: Landsteiner's interpretation of the human isoantibodies, *J. Hist. Biol.*, 8, 115 (1975).
9. Metchnikoff O. *Life of Elie Metchnikoff*. Houghton Mifflin, Boston (1921).
10. Miller G. *The Adoption of Inoculation for Smallpox in England and France*. University of Pennsylvania Press, Philadelphia (1957).
11. Parascandola J. Jasensky R. Origins of the receptor theory of drug action, *Bull. Hist. Med.*, 48, 199 (1974).
12. Parrish H. J. *A History of Immunization*, Livingstone, Edinburgh (1965).
13. Rubin L. P. Styles in scientific explanation. Paul Ehrlich and Svante Arrhenius on immunochemistry, *J. Hist. Med.*, 35, 397 (1980).
14. Silverstein A. M. Cellular vs. humoral immunity. Determinants and consequences of an epic 19th century battle, *Cell. Immunol.*, 48, 208 (1979).

15. Silverstein A. M. Development of the concept of immunologic specificity, *Cell. Immunol.*, 67, 396, 71, 183 (1982).
16. Silverstein A. M., Bialasiewicz A. A. A history of theories of acquired immunity, *Cell. Immunol.*, 51, 151 (1980).
17. Silverstein A. M., Miller G. The royal experiment on immunity, 1721–1722, *Cell. Immunol.*, 61, 437 (1981).
18. Speiser P., Smekal F. G. Karl Landsteiner. Brüder Hollinek, Vienna (1975).
19. Topley W. W. C., Wilson C. S. *The Principles of Bacteriology and Immunity*, 2d. ed. Wood, Baltimore (1936).
20. Vallery-Radot R. *Life of Pasteur*, Constable, London (1906).
21. Zinsser H. *Infection and Resistance*, Macmillan, New York (1914).

Клетки иммунной системы

Глава 3

В-лимфоциты

Макс Д. Купер, Джон Керни, Ирвин Шер

(Max D. Cooper, John Kearney, Irwin Scher)

Термин В-клетки образован по первой букве английского названия органов, в которых эти клетки формируются, — фабрициева сумка (bursa of Fabricius) у птиц и костный мозг (bone marrow) у млекопитающих. Наиболее важный продукт В-клеток — это обладающие огромным разнообразием антитела, называемые также иммуноглобулинами. Молекулы иммуноглобулинов не синтезируются никакими другими клетками организма, и все их многообразие обусловлено образованием нескольких миллионов клонов В-клеток. В каждом из этих клонов генетически запрограммирована способность продуцировать иммуноглобулины одной определенной антигенной специфичности.

На ранних этапах дифференцировки каждая В-клетка синтезирует молекулы иммуноглобулинов с гидрофобным трансмембранным хвостом и антиген-связывающими участками, расположенные на наружной поверхности клеточной мембраны. Эти связанные с мембраной антитела служат рецепторами, с помощью которых антигены могут избирательно взаимодействовать со специфичными к ним клонами В-клеток. Антигенная стимуляция В-клеток, происходящая при их взаимодействии с антиген-презентирующими (антиген-представляющими) вспомогательными клетками и Т-хелперами (клетками-помощниками), может привести к пролиферации и созреванию В-клеток. Индуцированная антигеном пролиферация приводит к образованию многочисленных клональных В-клеток памяти, а созревание продолжается до достижения последней стадии дифференцировки — образования плазматических клеток. Для плазматических клеток характерна высокая скорость синтеза и секреции антител, имеющих гидрофильные хвосты. В остальном секретируемые антитела идентичны иммуноглобулинам, ассоциированным с мембраной клетки-предшественника. Промежуточные стадии дифференцировки В-клеток отмечены меняющейся экспрессией разнообразных белков клеточной поверхности, необходимых для взаимодействия В-клеток с другими клетками. Эти взаимодействия в значительной мере определяют пути распространения В-клеток в организме, их размножение и дифференцировку.

Схема развития В-клеток приведена на рис. 3.1. В этой главе рассмотрены основные стадии их дифференцировки. По всей видимости, не все клетки дифференцируются до конечных форм: потеря их может быть значительной на стадии

как пре-В, так и В-клеток. С другой стороны, на некоторых этапах дифференцировки В-клеток могут происходить клеточные деления, приводящие к увеличе-

Рис. 3.1. Гипотетическая схема развития В-клеток.

Для характеристики различных стадий дифференцировки могут быть использованы изменения в экспрессии генов иммуноглобулинов. Другие дифференцировочные маркеры В-клеток приведены на рис. 4. Стадии дифференцировки В-клеток, обладающие заметной пролиферативной активностью, представлены в виде больших кружков со стрелками.



нию числа клеток данного клона. Вследствие этого в стимулированном антигеном клоне В-клеток наименее дифференцированные клетки могут составлять меньшинство.

3.1. История исследования и филогенетическое распространение В-клеток

Вскоре после того, как было обнаружено, что антитела представляют собой сывороточные гамма-глобулины [1], возникло предположение, что их образование связано с плазматическими клетками [2]. Было замечено, что у больных с различными видами иммунодефицита исчезновение плазматических клеток коррелирует с агаммаглобулинемией [3]. Прямо показать, что плазматические клетки продуцируют иммуноглобулины, удалось при использовании иммуофлуоресцентного метода, разработанного Кунсом и др. [4].

Возникновение плазматических клеток из циркулирующих в крови малых лимфоцитов было продемонстрировано в опытах, в которых облученным крысам-реципиентам в кровотоки вводили радиоактивно меченные лимфоциты. Радиоактивный изотоп был затем обнаружен в клетках, морфологически сходных с плазматическими клетками [5]. Позднее было показано, что малые лимфоциты относятся к одному из двух основных путей дифференцировки лимфоидных клеток [6, 7]. Часть лимфоцитов, образуемая в тимусе (зобной железе), участвует в реакциях клеточного иммунитета. Другая часть в организме птиц образуется в фабрициевой сумке. Эти лимфоциты служат предшественниками для секретирующих антитела плазматических клеток. Затем выяснилось, что лимфоциты-предшественники плазматических клеток у взрослых мышей формируются в костном мозге [8], а при развитии мышинных эмбрионов — в печени [9, 10]. Термином Т-клетки стали обозначать лимфоциты, образующиеся в тимусе, а термином В-клетки — лимфоциты, образующиеся в фабрициевой сумке или эквивалентных ей органах [11].

В-клетки, их зрелые потомки — плазматические клетки, а также продуцируемые ими антитела были обнаружены у всех исследованных представителей позвоночных, включая пресмыкающихся, земноводных, костных и хрящевых рыб [12, 13]. Эксперименты на лягушках показали, что В-клетки у земноводных, как и у млекопитающих, образуются в кровяной ткани, а не в тимусе [14]. О В-клеточном пути дифференцировки у рыб известно мало, но даже на этом этапе эволюции обнаруживается большое клональное разнообразие В-клеток. У беспозвоночных В-клетки и антитела до сих пор обнаружены не были.

3.2. Стволовые клетки — предшественники В-клеток

В-клетки, как и все другие клетки крови, возникают из плюрипотентных стволовых кроветворных клеток [15]. Это было показано в опытах с использованием генетических маркеров. Маркеры одновременно обнаруживались у всех клеток, развивающихся по дифференцировочным путям, показанным на рис. 3.2.

Клетку называют *стволовой*, если одна из возникающих в результате ее деления дочерних клеток дифференцируется, а другая остается недифференцированной и служит источником образования последующих поколений дифферен-



Рис. 3.2. Гипотетическая схема дифференцировки стволовой кроветворной клетки. Плюрипотентная стволовая кроветворная клетка (СКК, HSC) может превратиться в самообновляющуюся клетку-предшественник с более ограниченными возможностями. Так, коммитированная стволовая лимфоидная клетка (СКЛ) дает начало Т- и В-клеткам. Более дифференцированная миелоидная стволовая клетка (СКМ) служит непосредственным предшественником других клеток крови, к которым относятся эритроциты, гранулоциты, мегакариоциты, тромбоциты и моноциты/макрофаги.

цированных клеток. Такое асимметричное деление характерно не только для плюрипотентных стволовых клеток. Клетки, сохранившие способность лишь к одному пути дифференцировки, также могут оставаться способными к самообновлению. Например, стволовые клетки, из которых могут возникать клетки миелоидной дифференцировки, но не лимфоциты, были экспериментально выведены в самоподдерживающуюся линию. Можно предполагать, что предшественники Т-клеток и предшественники В-клеток способны к самообновлению, поскольку у человека обнаруживаются наследуемые дефекты, затрагивающие избирательно Т- или В-клетки. Однако прямых экспериментальных доказательств существования общей лимфоидной стволовой клетки пока еще нет.

Плюрипотентная стволовая клетка — это мезенхимная клетка, возникающая, по всей видимости, в области первичной почки на ранних этапах эмбрионального развития [16]. После миграции в желточный мешок эти клетки начинают дифференцироваться по эритроидному и миелоидному путям [17]. Дифференцировка стволовой клетки в Т- и В-клетки начинается позже, после ее попадания в особое индуцирующее дифференцировку микроокружение, имеющееся в таких органах, как тимус и фабрициева сумка.

3.3. Микроокружение, в котором образуются В-клетки

3.3.1. Птицы

В-клетки образуются из стволовых клеток-предшественников, которые по кровеносным сосудам попадают в имеющуюся у птиц фабрициеву сумку [17]. Она представляет собой мешковидный орган, образующийся в раннем эмбриогенезе как дорсальное впячивание заднего отдела кишечника. Стволовые клетки проникают в мезенхимную ткань сумки куриного эмбриона начиная

с восьмого дня развития [18]. (Цыплята вылупляются через 20 дней после начала инкубирования.) Попав в мезенхиму фабрициевой сумки, часть стволовых клеток дифференцируется по эритроидному и миелоидному путям. Остальные клетки-предшественники из мезенхимы мигрируют в эпителий, выстилающий полость сумки. Их можно обнаружить рассеянными по эпителию на десятый день развития. Эти клетки размножаются и дифференцируются, образуя в эпителии колонии В-клеток. Формирующиеся в сумке лимфоциты синтезируют тяжелые цепи иммуноглобулинов класса μ и легкие цепи, образуя тем самым молекулы антител с изотипом IgM (см. гл. 7). Антитела можно обнаружить как в цитоплазме, так и на поверхности этих В-клеток [19]. Поскольку гены тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов расположены в разных хромосомах (см. гл. 8), у птиц, по всей видимости, имеется механизм, синхронизирующий экспрессию этих двух мультигенных семейств.

Средняя продолжительность клеточного цикла у незрелых В-клеток, образующихся в фабрициевой сумке птиц, составляет от 8 до 10 ч. Эта относительно быстрая пролиферация, происходящая в яйце без какого-либо контакта с антигеном, приводит к образованию тысяч лимфоидных фолликулов, каждый из которых содержит около тысячи В-лимфоцитов. Внутри фолликулов наблюдается гетерогенность В-клеток по их антигенной специфичности. Поскольку каждый фолликул содержит потомство одной или по крайней мере немногих стволовых клеток, очевидно, что каждая стволовая клетка дает начало сразу многим клонам лимфоцитов [19]. Похоже, что последовательность формирования различных клонов В-клеток генетически запрограммирована.

В-клетки покидают фабрициеву сумку, проникая в кровеносные сосуды, питающие лимфоцитарные фолликулы. До 16 дня развития миграция В-клеток в другие лимфоидные ткани незначительна: хирургическое удаление сумки в этот период может привести к тому, что образование в организме В-клеток будет предотвращено [20]. В нормальных условиях выход В-клеток из сумки продолжается и в первые недели после вылупления. Удаление сумки в это время прерывает распространение В-клеток, а количество циркулирующих В-клеток оказывается пропорциональным времени нормального функционирования фабрициевой сумки до ее удаления [21]. У птиц, у которых прерывали развитие фабрициевой сумки, разнообразие клонов В-клеток было также ограничено [22]. Удаление фабрициевой сумки у эмбрионов или та же операция, проведенная после вылупления, но сочетающаяся с одновременным уничтожением всех мигрировавших ранее из сумки В-клеток, полностью прекращают развитие В-клеток и образование антител [23]. В нормальных же условиях фабрициева сумка полностью исчезает на стадии полового созревания, когда значительно повышается содержание половых гормонов. Итак, фабрициева сумка служит единственным источником разнообразных клонов В-клеток и снабжает ими весь организм птицы в течение самых первых месяцев жизни.

3.3.2. Млекопитающие

У млекопитающих В-клетки образуются в кроветворной ткани, где формируются и другие типы клеток крови, за исключением Т-клеток [24, 25]. Образование В-клеток начинается в эмбриональной печени, а затем перемещается в костный мозг, когда тот становится важнейшим кроветворным органом.

Идентификация эмбриональной печени и костного мозга как органов, эквивалентных фабрициевой сумке, потребовала значительного труда, и до сих пор в наших представлениях о механизме образования В-клеток у млекопитающих имеются существенные пробелы. Это связано с рядом особенностей кроветвор-

ных органов млекопитающих. В отличие от фабрициевой сумки эмбриональная печень и костный мозг являются жизненно важными органами и не могут быть удалены при экспериментировании. Кроме того, в кроветворных органах В-клетки маскированы огромным числом незрелых миелоидных и эритроидных клеток. Наконец, зрелые Т- и В-клетки могут проникать в костный мозг из кровотока, создавая дополнительную гетерогенность клеточной популяции. Вследствие этого для изучения первых этапов развития В-клеток у млекопитающих потребовались методы культивирования тканей эмбриональной печени и костного мозга в условиях, близких к физиологическим, а также обнаружение маркерных признаков, позволяющих отличать В-клетки от других клеток.

В первых исследованиях было обнаружено, что костный мозг содержит много делящихся лимфоцитов. Анализ кинетики популяции лимфоцитов после импульсного мечения ДНК радиоактивным тимидином показал, что каждый день в костном мозге морских свинок в результате деления образуется около 10^8 лимфоцитов [26]. Было также обнаружено, что лимфоидных предшественников плазматических клеток в костном мозге значительно больше, чем Т-клеток [27]. После того как выяснилось, что для В-лимфоцитов характерно наличие связанных с мембраной иммуноглобулинов, применение этого маркера совместно с тимидиновым мечением вновь синтезированной ДНК показало, что В-лимфоциты, содержащие поверхностные иммуноглобулины (pIg^+), возникают в костном мозге из больших лимфоцитов, имеющих фенотип pIg^- [8].

Во время эмбрионального развития печень представляет собой активный кроветворный орган. Позднее эту функцию берет на себя костный мозг. У мышей (период беременности — 20 дней) кроветворение начинается в печени примерно на 11-й день эмбрионального развития и продолжается еще несколько дней после рождения. В-клетки, продуцирующие иммуноглобулины, появляются в печени у 16—17-дневных эмбрионов [9]. В культурах, полученных из печени 11—12-дневных мышьяных эмбрионов через 5—6 дней культивирования, также появляются В-клетки. Аналогично в костно-мозговой полости образуются В-клетки после нескольких дней культивирования костей 15-дневных мышьяных эмбрионов [27]. Другие лимфоидные и кроветворные ткани эмбриона, а именно тимус и желточный мешок, В-клеток в культуре не образуют.

3.3.3. Земноводные

Клетки, экспрессирующие иммуноглобулины, впервые появляются у лягушек в кроветворных тканях на стадии личинки (у головастиков). Культуры печени из головастиков *Xenopus laevis* способны образовывать В-клетки [28].

3.4. Стадии дифференцировки В-клеток

Программу дифференцировки В-клеток грубо можно разделить на две фазы: антигеннезависимую и антигензависимую. Первые этапы дифференцировки, приводящие к образованию pIg^+ -В-лимфоцитов, характеризуются клональным разнообразием, происходят, как и в случае миелоидной и эритроидной дифференцировок, под влиянием локального окружения. У млекопитающих эта антигеннезависимая фаза включает стадию пре-В-клеток, в которой происходит перестройка генов иммуноглобулинов и их экспрессия. У пре-В-клеток нет поверхностных иммуноглобулинов; их появление означает переход к стадии В-клеток. Таким образом, клональное разнообразие возникает среди пре-В-клеток, не имеющих иммуноглобулиновых рецепторов, способных взаимодействовать с антигеном. Напротив, активация, пролиферация и дифференци-

ровка В-клеток в плазматические клетки индуцируются контактом с антигеном и Т-хелперами или же подклональными митогенами, полученными с пищей или внесенными в организм микробами (см. гл. 12, 15 и 18).

3.4.1. Пре-В-клетки

Термин пре-В-клетки относится к предшественникам В-лимфоцитов и объединяет несколько типов клеток, расположенных в эмбриональной печени и костном мозге (рис. 3.3). Наименее зрелые пре-В-клетки не синтезируют ни тяжелых, ни легких цепей иммуноглобулинов [29], хотя они имеют по крайней мере один поверхностный антигенный маркер, общий с более зрелыми пре-В-клетками и В-лимфоцитами [30]. Большие, не содержащие иммуноглобулинов пре-В-клетки делятся, образуя большие пре-В-клетки, в цитоплазме которых имеются тяжелые цепи иммуноглобулинов класса μ [24, 29]. Большие пре-В-клетки с фенотипом μ^+ в свою очередь делятся, образуя малые пре-В-клетки, также содержащие в цитоплазме μ -цепи. Постмитотические пре-В-клетки затем приобретают способность к синтезу легких цепей [31, 32], что служит признаком их превращения в малые незрелые В-клетки с расположенными на мембране молекулами иммуноглобулинов. Хотя известно, что пре-В-клетки проходят несколько циклов деления, степень клональной экспансии на стадии пре-В пока точно не определена. Перестройки генов иммуноглобулинов происходят несплошно: вначале перестраивается ген тяжелых, а затем легких цепей. Подробно эти перестройки описаны в гл. 8. Изучение строения генов иммуноглобулинов в малигнизированных клонах пре-В-клеток показывает, что не во всех клетках этого типа осуществляется функциональная перестройка обоих генов иммуноглобулинов [33]. Непродуктивное развитие пре-В-клеток, лишенных

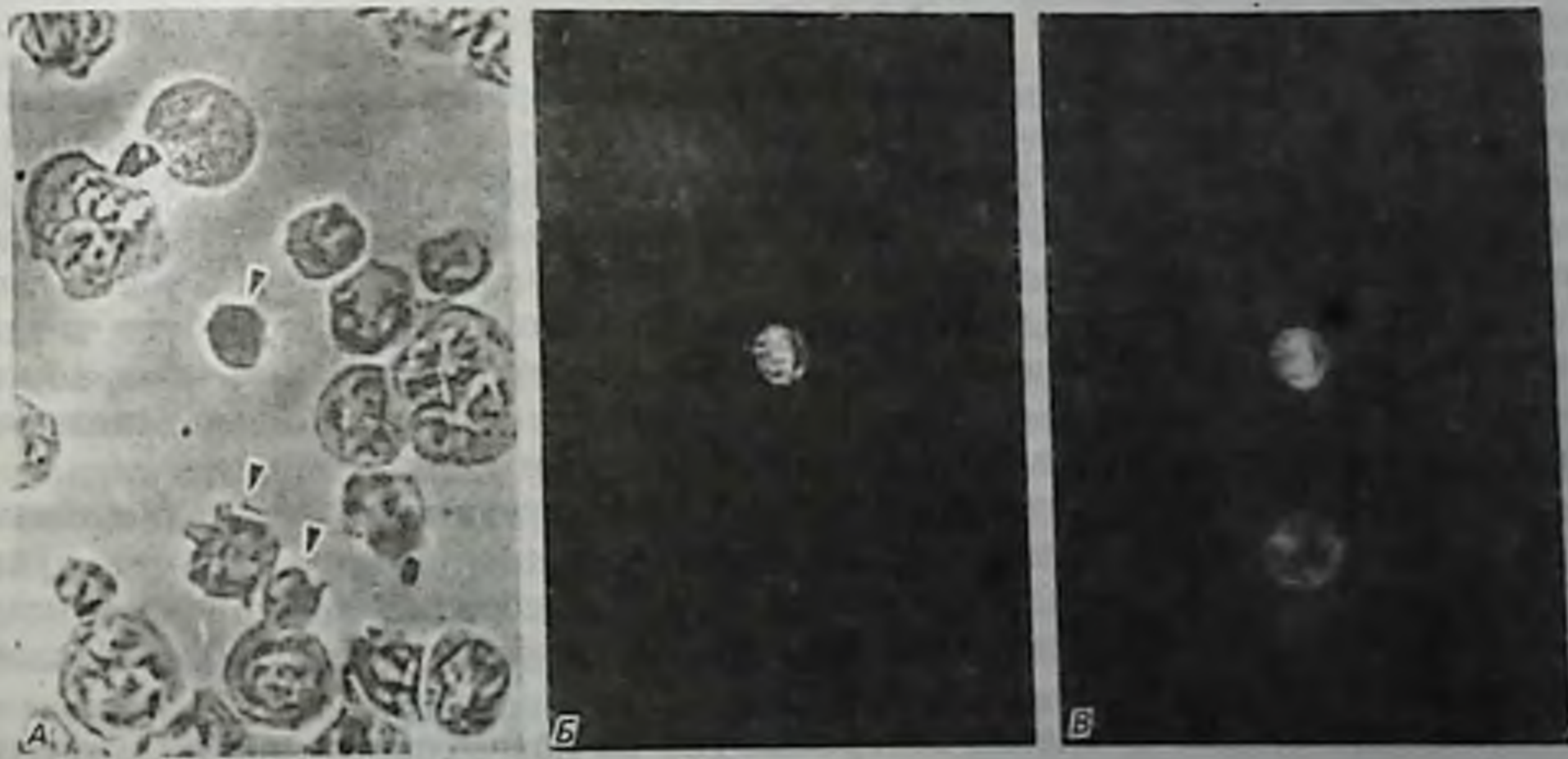


Рис. 3.3. Микрофотография клеток эмбриональной печени мыши. Клетки окрашивали на поверхностные иммуноглобулины козьими антителами к μ -цепям, конъюгированными с флуоресцеинизотiocанатом, затем осаждали центрифугированием на предметное стекло, фиксировали и окрашивали на цитоплазматические μ -цепи теми же антителами, конъюгированными с рода-

минизотиоцианатом. Центральная клетка, указанная стрелкой (А), окрашивается как на поверхностные (Б), так и на цитоплазматические (Б') μ -цепи. У малой и большой пре-В-клеток, отмеченных стрелкой правее, не выявляются поверхностные детерминанты μ , но обнаруживается типичная слабая околоядерная флуоресценция при окраске цитоплазматических μ -цепей.

функционально перестроенных генов тяжелых или легких цепей, по-видимому, является частым событием, но пока неизвестно, какая часть пре-В-клеток теряется на этой стадии.

Эмбриологические исследования показывают, что на стадии пре-В в печени мышинного эмбриона клетки находятся около 5 дней [25]. Начиная с 12-го дня развития мышинного эмбриона количество пре-В-клеток увеличивается по логарифмическому закону, но вскоре после рождения рост их числа прекращается. Пре-В-клетки образуются в рыхлых скоплениях, расположенных среди более многочисленных эритроидных и миелоидных клеток в экстрасинусоидальных отделах рядом с клетками печеночной паренхимы [34]. Превращение пре-В-клетки в незрелые В-клетки, продуцирующие IgM, начинается примерно на 17-й день эмбрионального развития мыши. Эта волна превращений пре-В-клеток в В-клетки продолжается в печени и после рождения и начинает затихать лишь через несколько дней. Похожая волна образования пре-В и В-клеток в печени человеческого эмбриона наблюдается с конца третьего по шестой месяц беременности.

Позднее в эмбриогенезе пул стволовых клеток перемещается из печени в костный мозг, где их дифференцировка в клетки крови продолжается в течение всей жизни. Дифференцировка пре-В-клеток в костном мозге происходит примерно так же, как и в эмбриональной печени; обнаруживаются лишь небольшие различия. В костном мозге клетки минуют стадию пре-В на день быстрее [8] и экспрессируют некоторые поверхностные белки, отсутствующие у пре-В-клеток печени. К ним относится, например, дифференцировочный антиген Lyb-2 у мышей [35]. Превращение пре-В-клеток в В-клетки в эмбриональной печени и костном мозге может усиливаться под действием разных типов вспомогательных клеток.

3.4.2. В-клетки

Для всех В-клеток характерна экспрессия мембранных иммуноглобулинов, что позволяет осуществляться клональному отбору под действием антигена. Вскоре после образования в костном мозге или эмбриональной печени В-клетки попадают в кровотоки и мигрируют в селезенку, лимфатические узлы и другие вторичные лимфоидные органы (см. гл. 4). У млекопитающих в течение всей жизни постоянно происходит быстрый обмен В-клеток [36], что требует значительного поступления незрелых В-клеток из мест их образования. Только что сформированные незрелые В-клетки скапливаются в основном в селезенке. Лимфатические узлы заселяются их более зрелыми формами.

При созревании, антигенной стимуляции и получении от Т-клеток сигнала к пролиферации и дифференцировке в плазматические клетки меняются функциональные свойства В-клеток и набор их поверхностных компонентов (маркеров) (см. гл. 18). Некоторые поверхностные маркеры, образуемые зрелыми В-клетками, показаны на рис. 3.4.

Наименее зрелые В-клетки экспрессируют на поверхности молекулы иммуноглобулинов изотипа М [23]. По мере созревания на их поверхности появляются антитела изотипа IgD и другие мембранные гликопротеины, такие, как рецепторы компонентов комплемента и рецепторы Fc-фрагмента секретируемых IgG-антител (см. гл. 10). Важное свойство образующихся В-клеток — уникальная чувствительность к сшиванию их поверхностных молекул, что приводит к инактивации незрелых В-клеток [37], в то время как тот же стимул приводит к вхождению зрелых В-клеток в клеточный цикл, их росту и размножению [38]. Негативный сигнал, получаемый незрелыми В-клетками, может служить важным

механизмом, с помощью которого собственные антигены организма предотвращают развитие аутореактивных клонов В-клеток.

Одним из наиболее важных поверхностных компонентов В-клеток являются молекулы Ia (см. гл. 13). Эти генетические полиморфные гликопротеины служат узнающими элементами при взаимодействии В-клеток с активированными антигеном Т-клетками. Такое взаимодействие — необходимое условие индуцированной антигеном активации В-клеток. У разных видов млекопитающих Ia-молекулы экспрессируются на различных стадиях дифференцировки В-клеток. У мыши детерминанты Ia появляются при созревании В-клеток [39], а у человека эквивалентные им молекулы HLA-DR экспрессируются как на В-, так

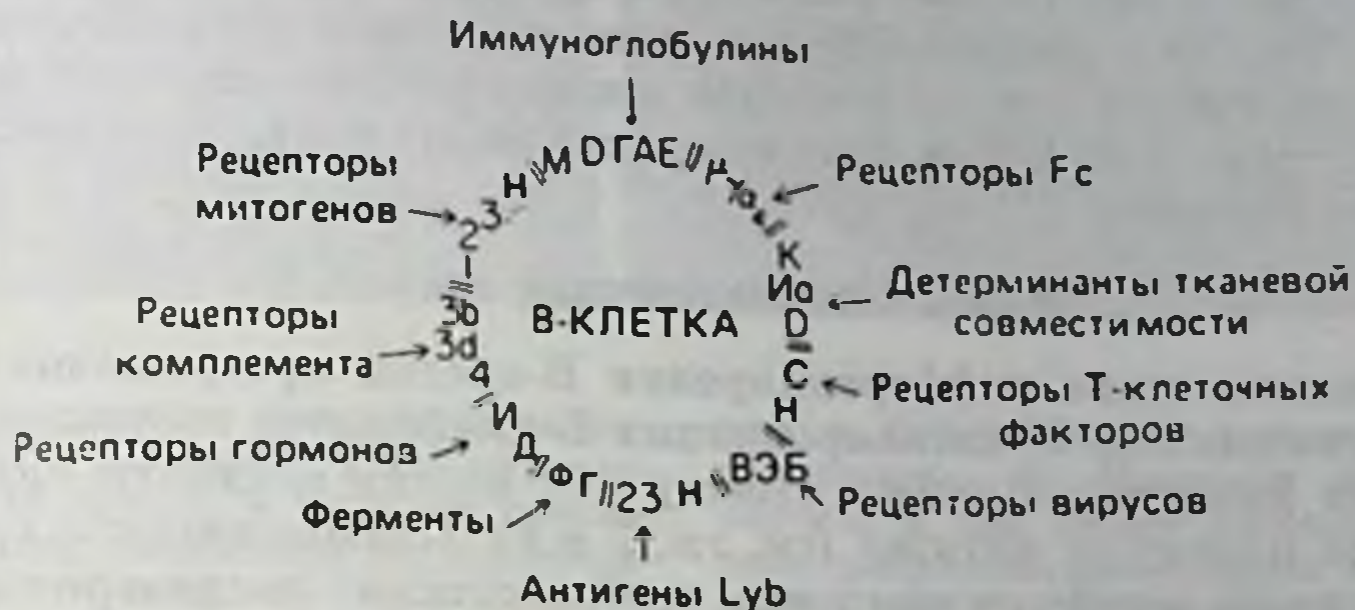


Рис. 3.4. Зрелые В-клетки экспрессируют набор разнообразных связанных с мембраной молекул, преимущественно гликопротеинов.

На схеме показаны (сверху, по часовой стрелке): один или несколько изотипов иммуноглобулинов, рецепторы Fc-фрагмента экзогенно-продуцируемых молекул IgG или иммуноглобулинов других изотипов, детерминанты тканевой совместимости, рецепторы антиген-специфических (С) и неспецифических (Н) факторов Т-клеток, рецепторы вирусов (например, рецепторы вируса Эпштей-

на — Барр (ВЭБ) на В-клетках человека), антигены, служащие дифференцировочными маркерами В-лимфоцитов, гликозидазы (Г) и фосфорилирующие ферменты (Ф), рецепторы инсулина (И) и других гормонов (Д), рецепторы различных протеолитических фрагментов третьего компонента компонента и четвертого компонента компонента, участки связывания митогенов/бактериальных липополисахаридов, липопропейнов, декстрана и экстракта (фитолакки американской, лаковоса).

и на пре-В-клетках [34]. Экспрессия Ia постепенно прекращается при дифференцировке в плазматические клетки. Аналогично рецепторы компонентов компонента появляются у зрелых В-клеток, а затем при дифференцировке в плазматические клетки также теряются [40]. Другие поверхностные рецепторы, например рецепторы антиген-неспецифических Т-клеточных факторов, стимулирующих пролиферацию и дифференцировку в плазматические клетки, могут экспрессироваться только после активации В-клеток [41]. Роль этих и других поверхностных рецепторов В-клеток в их функционировании подробно рассматривается в гл. 10 и 12.

Внутри каждого клона часть В-клеток переключается с экспрессии IgM (и IgD) на экспрессию иммуноглобулинов изотипов IgG, IgA и IgE. В-лимфоциты, у которых происходит переключение изотипов тяжелых цепей, могут одновременно экспрессировать до трех изотипов иммуноглобулинов, например IgM, IgD и IgA [42]. При переключении изотипов тяжелых цепей экспрессия генов, определяющих антигенсвязывающий участок молекулы иммуноглобулина, не изменяется. Более подробно механизм переключения с одних тяжелых цепей на другие описан в гл. 10 и 19.

3.4.3. В-клетки памяти

При активации размножения зрелых В-клеток под действием антигенной стимуляции и при помощи Т-клеток часть клеток клона вновь превращается в малые лимфоциты и не дифференцируется в плазматические клетки. Это относительно долгоживущие клетки [43], которые активируются при повторной стимуляции антигеном гораздо легче, чем исходные В-клетки. Из-за этого свойства они были названы В-клетками памяти. В-клетки памяти при участии Т-клеток обеспечивают быстрый синтез большого количества антител при повторном введении антигена (см. гл. 19). Клетки памяти гетерогенны по размеру, изотипам поверхностных иммуноглобулинов и степени экспрессии Ia. Эти свойства отчасти определяются продолжительностью взаимодействия с антигеном. Например, у большинства В-клеток памяти в конце иммунного ответа отсутствуют поверхностные IgD [44]. У В-клеток могут также исчезать с поверхности рецепторы Fc и комплемента.

3.4.4. Плазматические клетки

На последнем этапе дифференцировки В-клетки превращаются в зрелые плазматические клетки. У активированных В-лимфоцитов постепенно исчезают поверхностные иммуноглобулины. Вместо них клетки начинают синтезировать секретлируемые молекулы антител (см. гл. 7 и 8). Плазматические клетки обладают несколькими морфологическими особенностями: эксцентрично расположенным ядром, хорошо развитым аппаратом Гольджи и занимающим почти всю цитоплазму эндоплазматическим ретикулумом, необходимым для эффектив-

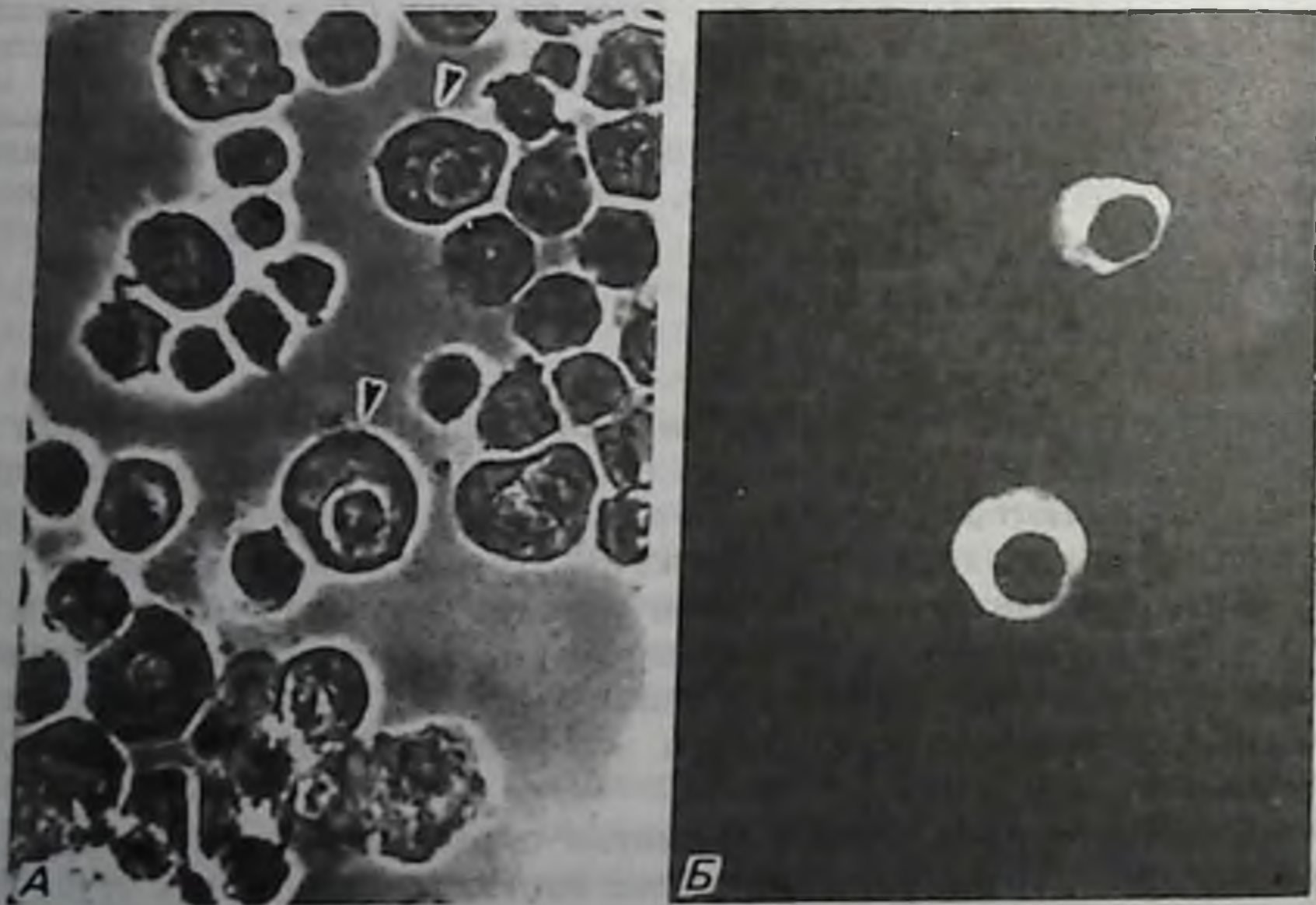


Рис. 3.5. Микрофотография клеток костного мозга мыши, фиксированных и окрашенных козьими антителами к мышьяковому IgG_{2b} , конъюгированными с роданинизотиоцианатом.
А. Фазово-контрастное изображение; стрел-

ки указывают на типичные плазматические клетки с эксцентрично расположенным ядром. Б. Флуоресценция роданина в том же поле зрения. Для зрелых плазматических клеток характерна яркая цитоплазматическая флуоресценция.

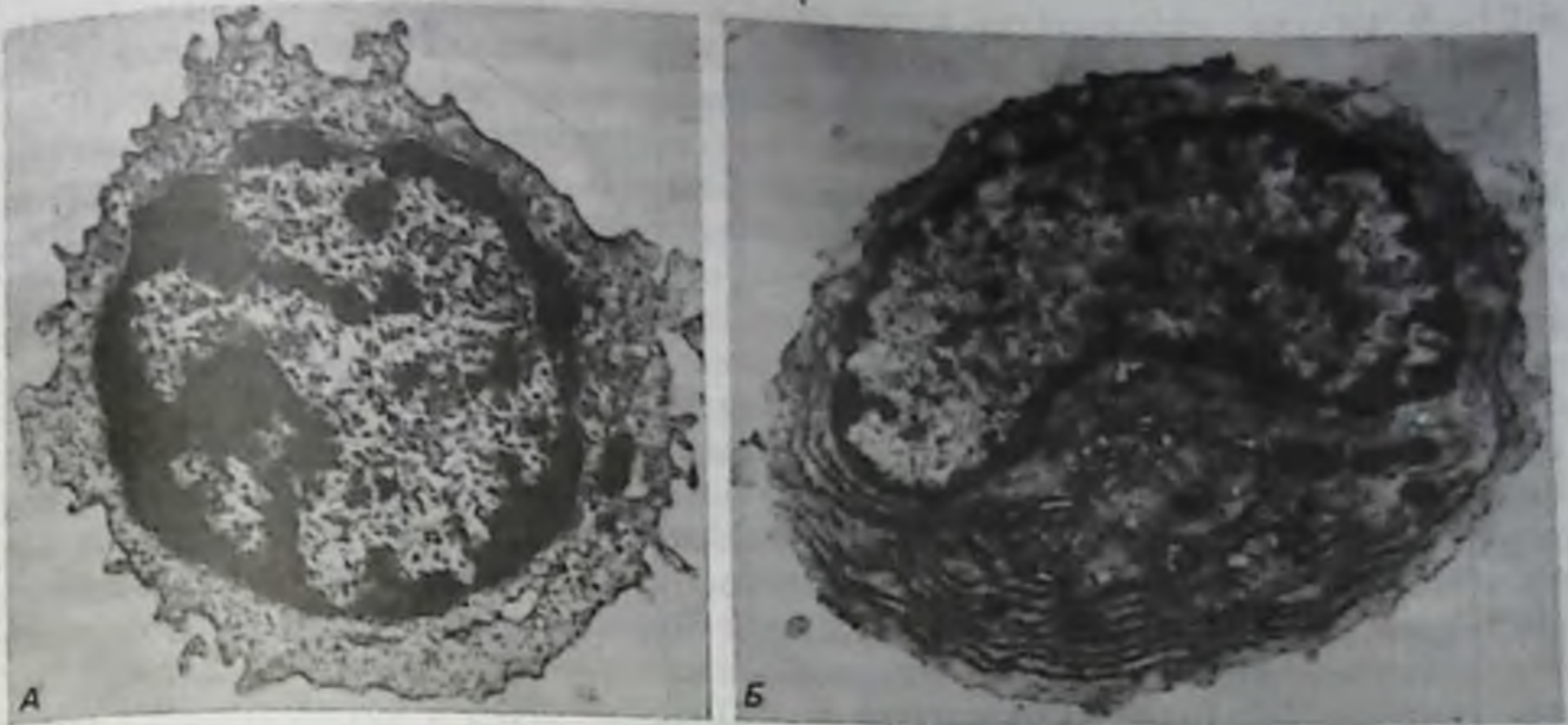


Рис. 3.6. Электронные микрофотографии, иллюстрирующие различие ультраструктуры малого В-лимфоцита и незрелой плазматической клетки, выделенной из периферической крови человека.

А. Малый В-лимфоцит с одной митохондрией (на этом срезе), плотным ядерным хромати-

ном и без развитого эндоплазматического ретикулама. Б. Незрелая плазматическая клетка; в ней много цитоплазмы, богатой митохондриями, полисомами и организованной в ламеллы шероховатым эндоплазматическим ретикулом с хорошо развитым аппаратом Гольджи. Увеличение $\times 8250$.

ного синтеза и секреции антител (рис. 3.5). Вообще у зрелых плазматических клеток в отличие от В-лимфоцитов хорошо развит секреторный аппарат, что позволяет им синтезировать и секретировать несколько тысяч молекул иммуноглобулинов в секунду (рис. 3.6). Такая продуктивность сочетается с короткой продолжительностью жизни: плазматические клетки редко делятся и существуют в среднем 2—3 дня.

3.5. Гетерогенность В-клеток: различия в степени зрелости и функциональные различия

На стр. 78 мы в общих чертах описали В-клеточный путь дифференцировки. Вполне возможно, что в этом ряду дифференцирующихся форм наиболее важное значение имеют сами В-клетки. Как стало ясно в последнее время, незрелые и зрелые В-клетки характеризуются значительной гетерогенностью. Любые гипотезы о механизмах активации и функционировании В-клеток должны учитывать эту гетерогенность.

3.5.1. Изменение поверхностных иммуноглобулинов В-клеток при дифференцировке

В-клетки отличаются от других лимфоидных клеток наличием на поверхности иммуноглобулинов (pIg), что позволяет осуществляться клональному отбору под действием антигена. Поскольку pIg необходимы для функционирования В-клеток как при отборе В-клеточных клонов, так и при их активации, исследование изменений pIg в ходе дифференцировки В-клеток представляет значительный интерес. В первых исследованиях для определения изотипа pIg

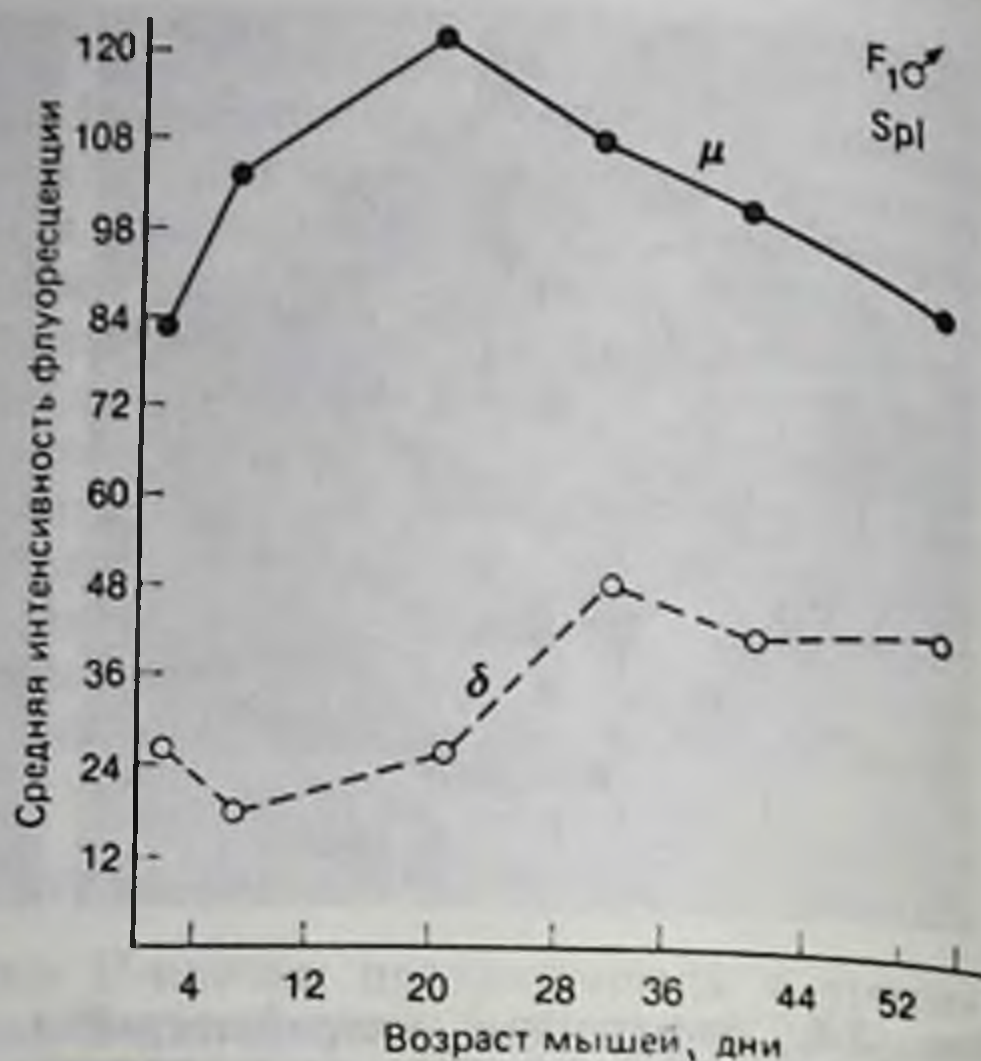
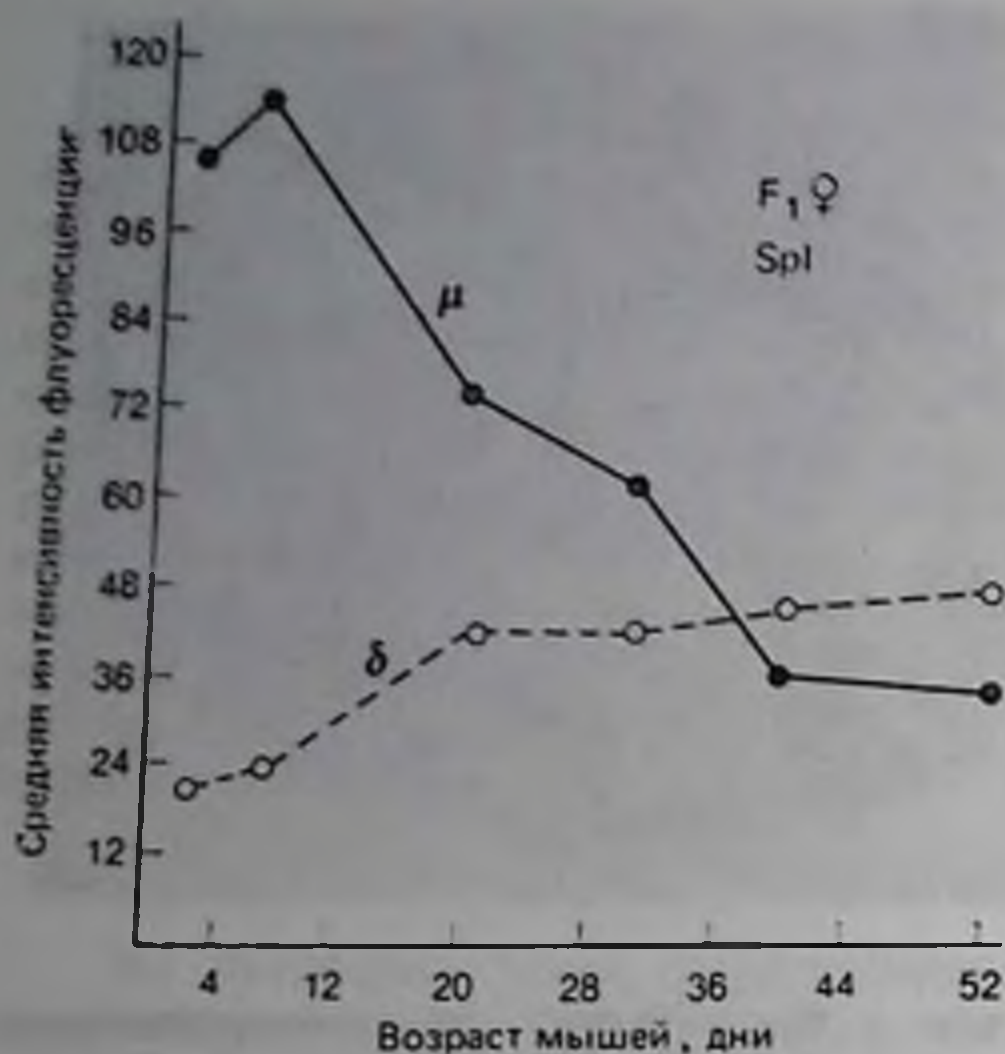


Рис. 3.7. Средняя интенсивность флуоресценции В-клеток селезенки, несущих μ (●—●) и δ -цепи (○----○), у иммуно-

логически нормальных самок F_1 и иммунологически дефектных xid -самцов F_1 в зависимости от возраста мышей.

поверхностные компоненты В-клеток новорожденных мышей метили радиоактивным иодом в реакции, катализируемой лактопероксидазой, затем выделяли Ig методом иммунопреципитации и подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [45]. Этот метод позволяет различать тяжелые цепи мышинных Ig изотипов μ и δ по разнице в их молеку-

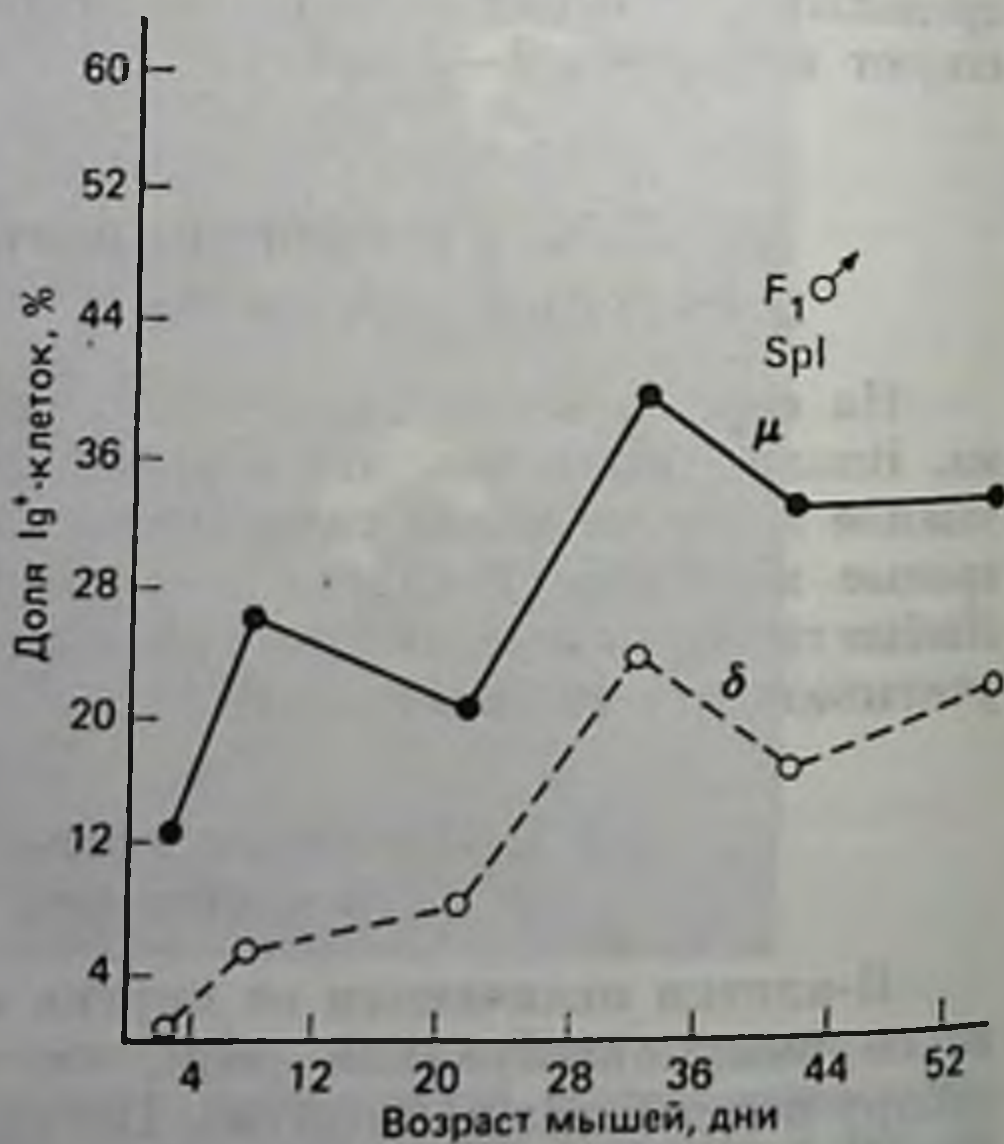
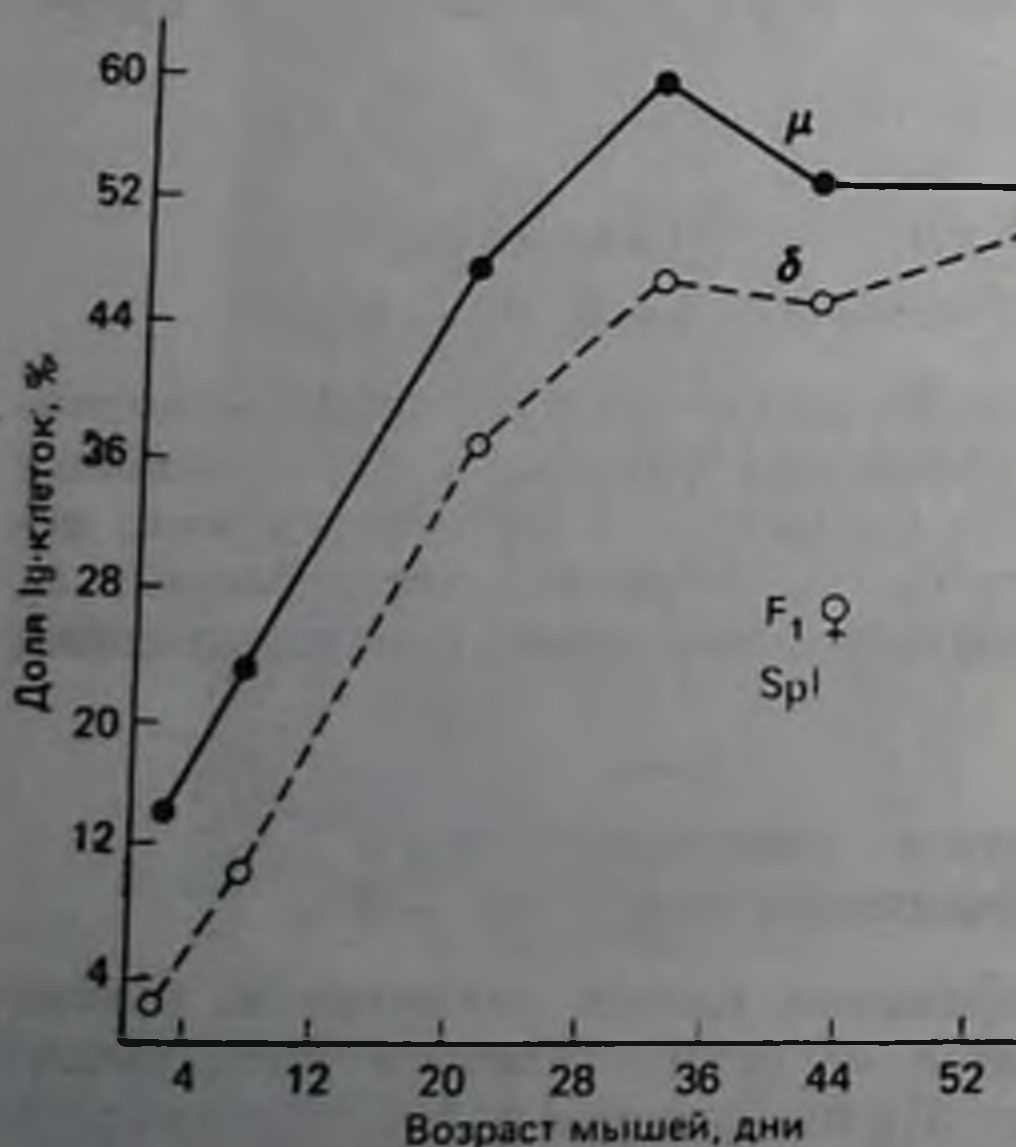


Рис. 3.8. Доля В-клеток селезенки, несущих μ (●—●) и δ -цепи (○----○) у иммуно-

логически дефектных xid -самцов F_1 в зависимости от возраста мыши.

лярных массах. С помощью этого метода было установлено, что на 8—12-й неделе жизни δ -цепи начинают доминировать над μ -цепями.

Проточный микрофлуориметрический анализ (см. гл. 29) показал, что В-клетки молодых мышей более гетерогенны и содержат больше μIgM , чем В-клетки взрослых животных (рис. 3.7) [46]. Относительно большое количество μIgM на В-клетках из селезенки новорожденных мышей свидетельствует о том, что IgM накапливается в мембране образующихся В-клеток крайне быстро: у непосредственных предшественников В-клеток μIgM очень мало. В ходе развития среднее количество IgM на В-клетках селезенки уменьшается по мере того, как появляются клетки, экспрессирующие IgD (рис. 3.8). В возрасте 8—12 недель доля IgM^+ -клеток лишь немного превышает долю IgD^+ -клеток [46, 47] (рис. 3.8). Хотя преобладающая часть В-клеток у взрослых мышей экспрессирует одновременно как IgM , так и IgD , могут быть выделены две группы В-клеток: клетки с небольшим количеством μIgD и различным содержанием μIgM и клетки с малым или средним количеством μIgM и средним или большим количеством μIgD .

Анализ развития В-клеток показывает, что μIgM^{3+} -, μIgD^- -клетки постепенно превращаются в μIgM^{3+} -, μIgD^+ -, а затем в μIgM^+ -, μIgD^{3+} -клетки. При активации покоящихся В-клеток и их дифференцировке в плазматические клетки экспрессия IgD прекращается раньше, чем экспрессия IgM . В результате большие активированные В-клетки и большинство В-клеток памяти не экспрессируют IgD [48, 49]. В гл. 10 и 19 описан характер экспрессии IgM и IgD в клетках, которые позднее образуют иммуноглобулины других классов.

3.5.2. Приобретение развивающимися В-клетками поверхностных Ia-молекул (μIa)

Ia-молекулы — это генетически полиморфные гликопротеины, выполняющие роль узнающих элементов при взаимодействии В- и Т-клеток с антиген-презентирующими клетками. Незрелые В-клетки фенотипа IgM^+ из печени, костного мозга или селезенки новорожденных мышей не экспрессируют Ia в заметных количествах [54]. Доля IgM^+ -клеток, экспрессирующих Ia, увеличивается после рождения [49]; у 90% В-клеток мышей двухнедельного возраста на поверхности имеется заметное количество Ia. Такая последовательность событий подтверждается результатами введения новорожденным мышам антител к мембранным антигенам. Если введение антител к IgM препятствует появлению всех типов IgM^+ -клеток [50], то введение антител к IgD подавляет образование Ia^+ - и IgD^+ -клеток, но не В-клеток с фенотипом IgM^+ , Ia^- или IgD^- [51]. Аналогично введение новорожденным мышам антител к Ia подавляет образование Ia^+ -клеток и большинства, но не всех IgD^+ - и IgM^+ -клеток [51]. Хотя развитие В-клеток у человека и мыши протекает в целом сходно, одно из различий заключается в том, что молекулы HLA-DR (аналог Ia-молекул у человека) экспрессируются не только на В-клетках, но и на пре-В-клетках [34].

3.5.3. Развитие других поверхностных маркеров и рецепторов В-клеток

Рецепторы Fc (подробности см. в гл. 10) и антиген мышинных В-лимфоцитов (MBLA) обнаруживаются в эмбриональной печени практически на всех В-клетках с фенотипом Ig^+ [53]. В то же время рецепторы комплемента (PK, CR) и минорные антигены, стимулирующие лимфоциты (Mls) экспрессируются не всеми мышинными В-клетками. CR будут более подробно описаны в гл. 10 и 24. Клетки, несущие CR, обычно обнаруживают по их способности прикреплять

ся к эритроцитам, покрытым (сенсibilизированным) комплементсвязывающими антителами и инкубированным затем с источником комплемента, что приводит к образованию комплекса эритроцит — антитело — комплемент (ЭАК) [54]. При инкубации клеток селезенки взрослой мыши с ЭАК большая часть В-клеток связывает эритроциты, образуя розетки. В то же время В-клетки селезенки новорожденных мышей (в возрасте до 2 недель) и В-клетки из костного мозга мышей любого возраста не образуют розеток при инкубации с ЭАК. Следовательно, CR характерны только для В-клеток на поздних стадиях развития [55].

При определении свойств π Ig В-клеток, разделенных на популяции CR⁺ и CR⁻, обнаружилось, что в популяции CR⁺ доля клеток, экспрессирующих π IgM, примерно равна доле клеток, экспрессирующих π IgD. В то же время в популяции CR⁻ число π IgM⁺-клеток обычно вдвое превышает число π IgD⁺-клеток (T. Lindsten, F. D. Finkelman and I. Scher, неопубликованные данные). Итак, экспрессия CR, по всей видимости, начинается сразу после того, как IgM⁺-клетки приобретают IgD, так что лишь немногие CR⁻-клетки экспрессируют иммуноглобулины обоих классов. Большая часть В-клеток в селезенке новорожденных мышей и костном мозге взрослых животных имеет на поверхности много IgM, небольшое количество IgD, экспрессирует Ia и очень мало CR (π IgM³⁺, π IgD⁺, π Ia⁺, CR[±]). Такие клетки составляют лишь небольшую долю В-клеток селезенки взрослой мыши, среди которых преобладают лимфоциты с фенотипом π IgM⁺, π IgD³⁺, π Ia⁺, CR²⁺. После активации В-клетки перестают экспрессировать CR.

3.5.4. Субпопуляции В-клеток, различающиеся поверхностными антигенами и Ia-антигенами

У мышей линии CBA/N в X-хромосоме имеется ген *xid*, который вызывает нарушение некоторых функций В-клеток [56]. У этих мышей лишь небольшая часть В-клеток селезенки экспрессирует π Ig, что связано с полным отсутствием описанной выше наиболее зрелой субпопуляции клеток с фенотипом π IgM⁺, π IgD²⁺, π Ia⁺, CR²⁺. При иммунизации самцов (CBA/N × BALB/c) F₁, у которых выражен дефект иммунитета, определяемый геном *xid*, клетками селезенки мышей одной из родительских линий BALB/c образуется антисыворотка, не реагирующая с клетками селезенки нормальных новорожденных мышей или взрослых *xid*-мышей, но реагирующая с 50% В-клеток из селезенки взрослых нормальных животных и с 15—20% клеток 18-дневных мышей [57]. Антиген В-клеток, с которым реагирует эта антисыворотка, был назван Lyb 3.

Иммунопреципитация мембранных белков В-клеток, меченных радиоактивным подом, анти-Lyb 3, показала, что антиген представляет собой полипептид с молекулярной массой 68 000 [58]. Если самцов (CBA/N × C57BL/6) F₁ проиммунизировать клетками селезенки мышей C57BL/6, то образуется антисыворотка, содержащая антитела со свойствами анти-Lyb 3. Кроме того, эта антисыворотка содержит цитотоксические антитела, убивающие 25—30% В-клеток мышей с генотипом *H-2^b* [59]. Эти цитотоксичные антитела выявляют белок (маркер), ген которого расположен в субрайоне I-A главного комплекса гистосовместимости (MHC). Хотя «обычные» Ia-антигены обнаруживаются на всех В-клетках как нормальных взрослых мышей, так и *xid*-мышей, эта детерминанта, закодированная в субрайоне I-A и названная Ia.W39, выявляется только на 50% В-клеток и не экспрессируется на В-клетках *xid*-мышей.

Вторая цитотоксическая антисыворотка, распознающая детерминанту В-клеток, отсутствующую на *xid*-клетках, была получена путем истощения сыво-

ротки мышей C57BL/6, иммунизированных клетками селезенки мышей DBA/2, клетками тимуса и селезенки *xid*-мышей [60]. Эта антисыворотка реагирует с 30% тотальных клеток селезенки нормальной взрослой мыши, с 60% Ig⁺-клеток и с 75% Ig⁺, CR⁺-клеток. Антитела, обозначенные анти-Lyb 5, выявляют антиген Lyb 5 на 81% селезеночных В-клеток, несущих мало IgM, и лишь на 21% клеток, несущих IgM. Эти данные показывают, что в зрелых субпопуляциях В-клеток обнаруживаются два аллоантигена, Lyb 3 и Lyb 5, отсутствующие у нормальных новорожденных мышей и *xid*-мышей.

3.5.5. Функциональные различия между В-клетками

Для понимания процесса дифференцировки В-клеток необходимо определить природу сигналов, получаемых В-клетками, выяснить механизмы влияния этих сигналов на свойства В-клеток, а также механизмы активации или супрессии образования антител. Поскольку на иммунную систему большинства экспериментальных животных и человека постоянно воздействуют внешние антигены, их В-клетки постоянно активируются под влиянием тех самых сигналов, которые мы бы хотели изучать.

Члены разных популяций В-клеток могут по-разному реагировать на эти сигналы. В результате общее состояние функций В-клеток оказывается достаточно сложным и отражает результат активации разных типов В-клеток. Использование анти-Lyb-антисывороток или моноклональных антител, специфичных к В-клеткам, фракционирование В-клеток по размеру или на основе других физических параметров в сочетании с использованием иммунодефицитных линий мышей делают возможным детальный анализ этих В-клеточных субпопуляций. В частности, поскольку у *xid*-мышей отсутствует одна из крупных субпопуляций В-клеток (клетки Lyb 5⁺), то исследование реакций этих мышей на различные стимуляторы можно использовать для выяснения функций В-клеток Lyb 5⁺ и Lyb 5⁻.

3.5.5.1 Восприимчивость к индукции толерантности

Было показано, что В-клетки взрослых и новорожденных мышей заметно отличаются по чувствительности к функциональной инактивации, т. е. к индукции толерантности [61, 62]. Наиболее незрелые В-клетки чрезвычайно чувствительны к сшиванию их мембранных иммуноглобулинов с антителами к IgM [50] или антиидиотипическими антителами. Контакт таких клеток с этими антителами приводит к постоянному дефициту В-клеток или к исчезновению функциональных клонов В-клеток [61—63]. После обработки В-клеток новорожденных мышей гаптенированными белками [например, человеческим гамма-глобулином, конъюгированным с флуоресцеином (Флу)] популяция В-клеток становится нечувствительной к повторной иммунизации Т-независимыми Флу-антигенами, такими, как Флу-липополисахарид или Флу-полимеризованный флагеллин. Эти результаты показывают, что инактивация антигеном происходит независимо от Т-клеток, хотя более поздние данные свидетельствуют об участии других вспомогательных клеток в этом процессе. В отличие от незрелых В-клеток, которые полностью инактивируются при индукции толерантности, В-клетки взрослых животных теряют чувствительность после обработки лишь на короткое время [64, 65].

Причины различной чувствительности В-клеток новорожденных и взрослых животных к индукции толерантности не вполне ясны. Более подробно механизмы индукции толерантности у незрелых и зрелых В-клеток обсуждаются в гл. 20.

3.5.5.2 Реакция различных субпопуляций В-клеток на митогены

В-клетки мышей и человека реагируют на множество митогенных агентов. Эти вещества, многие из которых встречаются в естественных условиях, оказывают значительное действие на В-клетки, индуцируя поликлональную пролиферацию и (или) дифференцировку в зрелые клетки, секретирующие иммуноглобулины, т. е. вызывают активацию, сходную с активацией специфическим антигеном. Липополисахарид, декстрансульфат, очищенный белковый компонент туберкулина и многие другие агенты активируют нормальные субпопуляции В-клеток к дифференцировке в клетки, секретирующие антитела [66]. Однако у *xid*-мышей ответ на эти неспецифические митогены, в частности на липополисахарид, нарушен¹.

Различные субпопуляции В-клеток значительно различаются по способности давать пролиферативный ответ на антитела к IgM [67]. В-клетки мышей в возрасте до четырех недель не размножаются в ответ на введение этих антител, а В-клетки более взрослых мышей (4—8 недель) размножаются. В-клетки нормальных взрослых мышей типа Lyb 5⁻ и все В-клетки *xid*-мышей не реагируют на антитела к IgM. Эти результаты показывают, что митогенный эффект этих антител проявляется только на В-клетках типа Lyb 5⁺.

3.5.5.3. Ответ В-клеточных субпопуляций на антигены типа I и II

Клетки селезенки новорожденных мышей не способны отвечать на многие полисахариды и родственные антигены, индуцирующие сильный иммунный ответ у клеток селезенки взрослых мышей [68]. Эти антигены, называемые антигенами типа II, обычно представляют собой растворимые полисахариды и конъюгаты полисахаридов с гаптенами. Такие молекулы не вызывают поликлональной активации клеток, и для индукции ими иммунного ответа не требуется участия антиген-специфических Т-клеток.

Вторая группа антигенов — антигены типа I — вызывают образование антител клетками селезенки как взрослых, так и новорожденных животных. Эти антигены способны индуцировать поликлональную активацию В-клеток. Как и антигены типа II, они вызывают сильный иммунный ответ у наследственно бестимусных мышей (*nu/nu*). В-клетки взрослых нормальных мышей и мышей, несущих ген *xid*, различаются по способности реагировать на антигены типов I и II: В-клетки *xid*-мышей, как и В-клетки нормальных новорожденных мышей, отвечают на антигены типа I, но не антигены типа II. В-клетки нормальных взрослых мышей, имеющие фенотип Lyb 5⁻, также, естественно, отвечают лишь на антигены типа I.

3.5.5.4 Ответ В-клеточных популяций на тимусзависимые антигены

In vivo первичный иммунный ответ на тимусзависимые антигены у *xid*-мышей значительно слабее, чем у нормальных мышей [56]. Тимусзависимые антигены в субоптимальной концентрации вообще не индуцируют образования антител у *xid*-мышей, хотя остаются иммуногенными для нормальных мышей.

¹ У *xid*-мышей нарушен главным образом ответ на Т-независимые антигены типа II, на липополисахариды они отвечают. — Прим. ред.

Ослабление иммунного ответа связано, по-видимому, с функциональными нарушениями В-клеток *xid*-мышей, поскольку их Т-клетки и макрофаги способны поддерживать иммунный ответ В-клеток нормальных животных.

При усилении помощи со стороны Т-клеток, вызванном в опытах *in vivo* повторными иммунизациями, а в опытах *in vitro* — в системе селезеночных узелков при же добавлением сингенных активированных Т-хелперов, иммунный ответ В-клеток *xid*-мышей значительно усиливается и достигает величины, характерной для нормальных мышей. Однако антитела, продуцируемые *xid*-мышами в ответ на конъюгат динитрофенола (ДНФ) с гемоцианином фиссуреллы (КЛН — от англ. keyhole limpet hemocyanin), значительно отличаются от антител нормальных мышей по изотипу и сродству. *xid*-Мыши после иммунизации ДНФ-КЛН практически не образуют антител к ДНФ изотипов IgG_{2a} и IgG₃ [69, 70].

3.5.5.5. Способность В-клеточных популяций взаимодействовать со вспомогательными клетками, Т-клетками и продуктами Т-клеток

Из сказанного очевидно, что В-клетки взрослых *xid*-мышей и новорожденных нормальных мышей лишь ограниченно способны отвечать на митогены, антитела к Ig, антигены типа II и тимусзависимые антигены и могут легко быть переведены в толерантное состояние. При изучении способности этих клеток воспринимать при иммунном ответе помощь макрофагов и (или) Т-клеток также обнаружилось определенное ограничение. При активации Т-клеток селезенки мыши конканавалином А образуется фактор, замещающий Т-клетки (ТЗФ). Его добавления достаточно для получения у клеток селезенки, из которых были удалены Т-клетки, иммунного ответа на тимусзависимые антигены. В то же время ТЗФ не оказывает никакого влияния на иммунный ответ В-клеток из селезенки *xid*-мышей [71]. Кроме того, введение антител к Lyb 3 усиливает иммунный ответ на субоптимальные дозы тимусзависимых антигенов у нормальных мышей, но не сказывается на иммунном ответе у *xid*-мышей [57]. Наконец, В-клетки *xid*-мышей отличаются от нормальных клеток по способности воспринимать помощь Т-клеток. В-клетки *xid*-мышей воспринимают помощь, рестриктированную по МНС, но не воспринимают нерестриктируемую факторзависимую помощь. Возможно, у нормальных мышей хелперные факторы, нерестриктированные по МНС, действуют также только на В-клетки Lyb 5⁺.

3.5.5.6. Заключение: функциональные свойства В-клеток Lyd 5⁺ и Lyd 5⁻

Основная функция В-клеток заключается в том, чтобы в ответ на антиген размножаться и дифференцироваться в клетки, образующие антитела. Очевидно, что антигены отбирают соответствующие клоны В-клеток, взаимодействуя с их pIg. Происходящие затем события в значительной мере зависят от свойств В-клеток. Так, В-клетки, экспрессирующие мало pIgM, много pIgD и аллоантиген Lyb 5, могут активироваться антителами к Ig и антигенами типа II. Эти клетки трудно сделать толерантными, они восприимчивы к помощи макрофагов, могут взаимодействовать с Т-клетками не рестриктированным по МНС способом, а также восприимчивы к помощи со стороны антител к Lyb 3 и ТЗФ. Клетки Lyb 5⁻ ни одним из перечисленных свойств не обладают. У нормальных мышей клетки Lyb 5⁺ появляются в процессе развития позднее, чем клетки Lyb 5⁻. У мышей СВА/Н с иммунным дефектом *xid* они вообще не появляются.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Tiselius A.* Electrophoresis of serum globulin. II. Electrophoretic analysis of normal immune serum, *Biochem. J.*, 31, 1464 (1937).
2. *Fagrens A.* La correlation entre la reaction reticuloplasma-cytaire et la formation des anticorps, *Sang*, 21, 480 (1950).
3. *Good R. A.* Agammaglobulinemia. An experimental study, *Am. J. Dis. Child.*, 88, 626 (1954).
4. *Coons A. H., Leduc E. H., Connolly J. M.* Study on antibody production. I. A method for the histological demonstration of specific antibody and its application to a study of the hiperimmune rabbit, *J. Exp. Med.*, 102, 49 (1955).
5. *Gowans J. L.* The fate of parental strain small lymphocytes in F₁ hybrid rats, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 99, 432 (1962).
6. *Warner N. L.* The immunological role of different lymphoid organs in the chicken: IV. Functional differences between thymic and bursal cells, *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 43, 439 (1965).
7. *Cooper M. D., Peterson R. D. A., South M. A., Good R. A.* The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken, *J. Exp. Med.*, 123, 75 (1966).
8. *Osmond D. G., Nossal G. J. V.* Differentiation of lymphocytes in mouse bone marrow. II. Kinetics of maturation and renewal of antiglobulin-binding cells studied by double labeling, *Cell. Immunol.*, 13, 132 (1974).
9. *Owen J. J. T., Cooper M. D., Raff M. C.* In vitro generation of B lymphocytes in mouse fetal liver: A mammalian «bursa equivalent», *Nature*, 249, 361 (1974).
10. *Melchers F., von Boehmer H., Phillips R. A.* B lymphocyte subpopulations in the mouse. Organ distribution and ontogeny of immunoglobulinsynthesizing and mitogen sensitive cells, *Transplant. Rev.*, 25, 26 (1975).
11. *Roitt I. H., Greaves M. F., Torrigiani G., Brostoff G., Playfair J. H. L.* The cellular basis of immunological response: A synthesis of some current views, *Lancet*, 2, 367 (1969).
12. *Good R. A., Finstad J., Pollara B., Gabrielsen A.* Morphologic studies on the evolution of the lymphoid tissues among the lower vertebrates. In: *Phylogeny of Immunity*, edited by R. T. Smith, P. A. Miescher, and R. A. Good, p. 149, University of Florida Press, Gainesville, 1967.
13. *Cooper E. L.* Comparative Immunology, Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.J., 1976.
14. *Zettergren L. D.* Ontogeny and distribution of cells in B lineage in the American leopard frog (*Rana pipiens*), *Dev. Comp. Immunol.*, 6, 311 (1982).
15. *Phillips R. A., Melchers R., Miller R. G.* Stem cells and the ontogeny of B lymphocytes. In: *Progress in Immunology*, III, edited by T. E. Mandel, C. Cheers, C. G. Hosking, I. F. C. McKenzie, and G. J. V. Nossal, p. 155, Australian Academy of Science, Canberra City, 1977.
16. *Dieterlen-Lievre F.* L'origine des cellules souches hemematopöietiques definitives chez l'embryon d'oiseau: Analyse experimentale á l'aide de combinaisons, *C.R. Acad. Sci. [D] (Paris)*, 279, 915 (1974).
17. *Moore M. A. S., Owen J. J. T.* Stem cell migration in developing myeloid and lymphoid, *Lancet*, 2, 658 (1967).
18. *Le Douarin N. M., Houssaint E., Jotereau F. V., Belo M.* Origin of haemopoietic stem cells in the embryonic bursa of Fabricius and bone marrow studied through interspecific chimaeras, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 2701 (1975).
19. *Lydyard P. M., Grossi C. E., Cooper M. D.* Ontogeny of B cells in the chicken: I. Sequential development of clonal diversity in the bursa, *J. Exp. Med.*, 144, 79 (1976).
20. *Cooper M. D., Cain W. A., Van Alten P. J., Good R. A.* Development and function of the immunoglobulin-producing system: I. Effect of bursectomy at different stages of development on germinal centers, plasma cells, immunoglobulins and antibody production, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 35, 242 (1969).
21. *Kincade P. W., Self K. S., Cooper M. D.* Survival and functions of bursa-derived cells in bursectomized chicken, *Cell. Immunol.*, 8, 83 (1973).
22. *Huang H. V., Dreyer W. J.* Bursectomy in vivo blocks generation of immunoglobulin diversity, *J. Immunol.*, 121, 1738 (1978).
23. *Cooper M. D., Kearney J. F., Gathings W. E., Lawton A. R.* Effects of anti-Ig antibodies on the development and differentiation of B cells. In: *Immunological Reviews*, Vol. 52, edited by G. Moller, p. 29, Munksgaard, Copenhagen, 1980.
24. *Osmond D. G.* Production and differentiation of B lymphocytes in the bone marrow. In: *Immunoglobulin Genes and B Cell Differentiation*, edited by J. R. Battisto and K. L. Knight, p. 135, Elsevier/North-Holland, New York, 1980.
25. *Cooper M. D.* Pre-B cells: Normal and abnormal development, *J. Clin. Immunol.*, 1, 81 (1981).

26. Rosse C. Perspectives of lymphocyte production and cellular traffic in the bone marrow. In: Handbook of Cancer Immunology, Vol. 6, edited by H. Waters, p. 250, Garland STPM Press, New York, 1981.
27. Owen J. J. T., Raff M. C., Cooper M. D. Studies on the generation of B lymphocytes in the mouse embryo, Eur. J. Immunol., 5, 468 (1975).
28. Irandokht H. A., Schwager J., Thiebaud C. B lymphocyte differentiation in *Xenopus laevis* larvae, Dev. Biol., 90, 253 (1982).
29. Landreth K. S., Rosse C., Clagett J. Myelogenous production and maturation of B lymphocytes in the mouse, J. Immunol., 127, 2027 (1981).
30. Kincade P. W., Lee G., Watanabe T., Sun L., Scheid M. P. Antigens displayed on murine B lymphocyte precursors, J. Immunol., 127, 2262 (1981).
31. Burrows P. D., LeJeune M., Kearney J. F. Asynchrony of immunoglobulin chain synthesis during B cell ontogeny: Evidence from cell hybridization that murine pre-B cells synthesize μ heavy chains but no light chain, Nature, 280, 838 (1979).
32. Gathings W. E., Mage R. G., Cooper M. D., Young-Cooper G. W. A subpopulation of small pre-B cells in rabbit bone marrow expressed kappa light chains and exhibits allelic exclusion of b locus allotypes, Eur. J. Immunol., 12, 76 (1982).
33. Korsmeyer S. J., Hieter P. A., Ravetch J., Poplack D. G., Waldmann T. A., Leder P. Developmental hierarchy of immunoglobulin gene rearrangements in human leukemic pre-B cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 2096 (1981).
34. Kamps W. A., Cooper M. D. Microenvironmental studies of pre-B and B cell development in human and mouse fetuses, J. Immunol., 129, 526 (1982).
35. Kincade P. W. Formation of B lymphocytes in fetal and adult life, Adv. Immunol., 31, 177 (1981).
36. Freitas A. A. de, Coutinho A. Very rapid decay of mature B lymphocytes in the spleen, J. Exp. Med., 154, 994 (1981).
37. Raff M. C., Owen J. J. T., Cooper M. D., Lawton A. R., III, Megson M., Gathings W. E. Differences in susceptibility of mature and immature mouse B lymphocytes to anti-immunoglobulin-induced immunoglobulin suppression in vitro: Possible implications for B-cell tolerance to self, J. Exp. Med., 142, 1052 (1975).
38. Franco A. L. de, Raveche E. S., Asofsky R., Paul W. E. Frequency of B lymphocytes responsive to anti-immunoglobulin, J. Exp. Med., 155, 1523 (1982).
39. Kearney J. F., Cooper M. D., Klein J., Abney E. R., Parkhouse R. M. E., Lawton A. R. Ontogeny of Ia and IgD on IgM bearing lymphocytes in mice, J. Exp. Med., 146, 297 (1977).
40. Gelfand M. C., Elfenbein G. J., Frank M. M., Paul W. E. Ontogeny of B lymphocytes. II. Relative rates of appearance of lymphocytes bearing surface immunoglobulin and complement receptors, J. Exp. Med., 139, 1128 (1974).
41. Melchers F., Anderson J., Lernhardt W., Schreier M. H. Roles of surface-bound immunoglobulin molecules in regulating the replication and maturation to immunoglobulin secretion of B lymphocytes, Immunol. Rev., 52, 89 (1980).
42. Abney E. R., Cooper M. D., Kearney J. F., Lawton A. R., Parkhouse R. M. E. Sequential expression of immunoglobulin on developing mouse B-lymphocytes. A systematic survey which suggests a model for the generation of immunoglobulin isotype diversity, J. Immunol., 120, 2041 (1978).
43. Askonas B. A., Williamson A. R. Factors affecting the propagation of a B cell clone forming antibody to the 2,4 dinitrophenyl group, Eur. J. Immunol., 2, 487 (1972).
44. Black J. J., Tokuhisa T., Herzenberg L. A., Herzenberg L. A. Memory B cells at successive stages of differentiation: Expression of surface IgD and capacity for self-renewal, Eur. J. Immunol., 10, 846 (1980).
45. Vitetta E. S., Melcher U., McWilliams M., Lamms M. E., Phillips-Quagliata J. M., Uhr J. W. Cell surface immunoglobulin. IX. The appearance of an IgD like molecule on murine lymphoid cells during ontogeny, J. Exp. Med., 141, 206 (1975).
46. Scher I., Berning A. K., Kessler S., Finkelman F. D. Development of B lymphocytes in the mouse; studies of the frequency and distribution of surface IgM and IgD in normal and immune-defective CBA/N F₁ mice, J. Immunol., 125, 1686 (1980).
47. Lafrenz D., Teale J. M., Strober S. Role of IgD in immunological memory. In: Immunoglobulin D: Structure and Function, edited by G. J. Thorbecke and G. A. Leslie, pp. 375—388, New York Academy of Science, New York, 1982.
48. Pernis B. Lymphocyte membrane IgD, Immunol. Rev., 37, 210 (1977).
49. Kearney J. F., Cooper M. D., Klein J., Abney E. R., Parkhouse R. M. E., Lawton A. R. Ontogeny of Ia and IgD on IgM-bearing B lymphocytes in mice, J. Exp. Med., 146, 297 (1977).
50. Lawton A. R., Asofsky R., Hylton M. B., Cooper M. D. Suppression of immunoglobulin class synthesis in mice. I. Effects of treatment with antibody to mu-chain, J. Exp. Med., 135, 277 (1972).

51. Metcalf E. S., Mond J. J., Scher I., LaVeck M. A., Finkelman F. D. B-cell function in mice treated with anti-IgD from birth. In: Immunoglobulin D: Structure and Function, edited by G. J. Thorbecke and G. A. Leslie, pp. 351-359, New York Academy of Sciences, New York, 1982.
52. Fultz M. J., Scher I., Finkelman F. D., Kincade P., Mond J. J. Neonatal suppression with anti-Ia antibody. I. Suppression of murine B lymphocyte development, *J. Immunol.*, 129, 992 (1982).
53. Bianco C., Patrick R., Nussenzweig V. A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody-complement complexes. I. Separation and characterization, *J. Exp. Med.*, 132, 702 (1970).
54. Gelfand M. C., Elfenbein G. J., Frank M. M., Paul W. E. Ontogeny of B lymphocytes. II. Relative rates of appearance of lymphocytes bearing surface immunoglobulin and complement receptors, *J. Exp. Med.*, 139, 1125 (1974).
55. Scher I. The CBA/N mouse strain: An experimental model illustrating the influence of the X-chromosome on immunity. In: Advances in Immunology, Vol. 33, edited by H. G. Kunkel and F. J. Dixon, pp. 1-71, Academic Press, New York, 1981.
56. Huber B. R., Gershon R. K., Cantor H. Identification of a B cell surface structure involved in antigen-dependent triggering: Absence of this structure on B cells from CBA/N mutant mice, *J. Exp. Med.*, 145, 10 (1977).
57. 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 (1978).
58. Huber B. T. Antigenic marker on a functional subpopulation of B cells, controlled by the I-A subregion of the H-2 complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 3460 (1979).
59. Ahmed A., Scher I., Sharrow S. O., Smith A. H., Paul W. E., Sachs D. H., Sell K. W. B lymphocyte heterogeneity: Development and characterization of an alloantiserum which distinguishes B lymphocyte differentiation alloantigens, *J. Exp. Med.*, 145, 110 (1977).
60. Metcalf E. S., Schrater A. F., Klinman N. R. Murine models of tolerance induction in developing and mature B cells, *Immunol. Rev.*, 43, 142 (1979).
61. Nossal G. J. V., Pike B. L., Teale J. M., Layton J. E., Kay T. W., Battye F. L. Cell fractionation methods and the target cells for clonal abortion of B lymphocytes, *Immunol. Rev.*, 43, 185 (1979).
62. Strayer D. S., Lee W. M. F., Rowley D. A., Kohler H. Anti-receptor antibody. II. Induction of long-term unresponsiveness in neonatal mice, *J. Immunol.*, 114, 728 (1975).
63. Metcalf E. S., Sigal N. H., Klinman N. R. In vitro tolerance induction of neonatal murine B cells as a probe for the study of B cell diversification, *J. Exp. Med.*, 145, 1382 (1977).
64. Raff M. C. Development and modulation of B lymphocytes: Studies on newly formed B cells and their putative precursors in the hemopoietic tissue of mice, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Vol. XLI, p. 159, Cold Spring Harbor, New York, 1977.
65. Melchers F. Immunoglobulin synthesis and mitogen reactivity: Markers for B lymphocyte differentiation. In: The Development of Host Defenses, edited by D. H. Dayton, Academic Press, New York, 1977.
66. Sieckmann D. G. The use of anti-immunoglobulins to induce a signal for cell division in B lymphocytes via their membrane IgM and IgD, *Immunol. Rev.*, 52, 55 (1980).
67. Mosier D. E., Zitron I. M., Mond J. J., Ahmed A., Scher I., Paul W. E. Surface IgD as a functional receptor for a subclass of B lymphocytes, *Immunol. Rev.*, 37, 89 (1977).
68. Press J. L. The CBA/N defect defines two classes of T-dependent antigens, *J. Immunol.*, 126, 1234 (1981).
69. Huber B. T., Tokuhisa T., Herzenberg L. A. Primary and secondary in situ antibody response: Abnormal affinity maturation pattern in mice carrying the xid gene, *Eur. J. Immunol.*, 11, 353 (1981).
70. Yaffe L., Scher I. Analysis of receptiveness of B cells to the T cell factors TRF and AEF in CBA/N and DBA/2Ha immune-defective mice, *Fed. Proc.*, 40, 1112 (1981).
71. Singer A., Morrissey P. J., Hathcock K. S., Ahmed A., Scher I., Hodes R. J. Role of the major histocompatibility complex in T cell activation of B cell subpopulations. Lyb-5⁺ and Lyb-5⁻ B cell subpopulations differ in their requirement for major histocompatibility complex-restricted T cell recognition, *J. Exp. Med.*, 154, 501 (1981).

Т-лимфоциты

Харви Кантор

(Harvey Cantor)

Лимфоциты свободно циркулируют по кровеносным и лимфатическим сосудам организма и непосредственно отвечают за все специфические иммунные реакции. На поверхности каждого лимфоцита экспрессируются молекулы рецепторов, способные связывать определенные химические детерминанты. Популяция лимфоцитов разделяется на два класса: Т-лимфоциты (или Т-клетки), названные так от слова тимус, в котором происходит их созревание, и В-лимфоциты (или В-клетки), постоянно образующиеся в костном мозге и продуцирующие антитела.

События на молекулярном и клеточном уровнях, обеспечивающие образование специфических антител после проникновения в организм микробов, пока еще недостаточно изучены. Первое разумное объяснение было предложено клонально-селекционной теорией, согласно которой законы, управляющие ростом клона прокариотических клеток, могут быть применимы и к эукариотическим клеткам. По этой теории каждый лимфоцит несет молекулы рецепторов, связывающих уникальную химическую детерминанту, расположенную, например, на поверхности вируса или бактерии. Клетки, несущие рецепторы, прочно связывающиеся с данной детерминантой, стимулируются к быстрому размножению. В результате образуется клон, состоящий из тысяч дочерних клеток; в дальнейшем размножаются наиболее «приспособленные» иммунные клетки. Все клетки данного клона несут одинаковые поверхностные рецепторы. Каждая В-клетка секретирует в кровотоки измененную форму своего поверхностного рецептора — антитело. Сила иммунного ответа на химическую детерминанту («антиген») зависит от числа лимфоцитов, несущих рецепторы, способные «хорошо» взаимодействовать с этой детерминантой. Особи, неспособные отвечать на чужеродный белок, по всей видимости, лишены клеток, рецепторы которых прочно связываются с этим белком. Такое представление об иммунной системе как о защитной сети, необходимой для уничтожения чужеродных микробов, сыграло важную роль в медицине. Оно создало теоретическую основу для программ широкой вакцинации и искоренения многих острых инфекционных заболеваний, решив таким образом важнейшую проблему здравоохранения. В наши дни основной причиной смерти и физических недугов стали хронические и дегенеративные заболевания.

Для выяснения природы этих новых и непонятных болезней концепция, рассматривающая иммунную систему как набор клеток, способных отвечать лишь на проникающие в организм чужеродные агенты, оказалась менее плодотворной. С точки зрения клонально-селекционной теории иммунная система неспособна реагировать на собственные ткани организма («свое»), поскольку в ней нет клеток, распознающих белки или сахара, представленные в самом организме. Считается, что такие клетки, специфичные к собственным компо-

нентам, исчезают в раннем развитии: тяжелые иммунные реакции против собственного организма (аутоиммунитет) по этой теории вызываются лимфоцитами, избежавшими ранних механизмов контроля.

Эти положения клонально-селекционной теории сами по себе не могут объяснить полученные в последнее время экспериментальные данные. Так, например, сейчас стало очевидно, что в норме среди лимфоцитов людей имеется много В-клеток, взаимодействующих с собственными белками организма. *In vitro* эти В-клетки можно стимулировать к образованию антител, атакующих ткани хозяина. Каким образом эта реакция предотвращается в нормальном организме? Многие важные ответы на эти вопросы получены при изучении класса лимфоцитов, называемых Т-клетками.

4.1. Субпопуляции Т-клеток: определение

Результаты первых экспериментов хорошо укладывались в представление о том, что Т-клетки образуют однородную популяцию, способную выполнять различные иммунологические функции, включая как активацию, так и подавление иммунных реакций. Отсюда вытекает, что экспрессируемая функция Т-клеток должна определяться внешними условиями, такими, как тип антигена и характер антигенной стимуляции. Согласно другой гипотезе, Т-клетки состоят из субпопуляций, специализированных для выполнения одной определенной Т-клеточной функции [1—3]. Этот вопрос сводился к практической проблеме: можно ли разделить популяцию Т-клеток на различные субпопуляции, каждая из которых при контакте с антигеном способна осуществлять одну определенную Т-клеточную реакцию? Наиболее эффективный метод идентификации и разделения субпопуляций периферических Т-клеток был разработан в результате изучения таких поверхностных гликопротеинов, которые экспрессируются клетками, подвергающимися тимусзависимой дифференцировке. В основе предложенной классификации лежало использование антител, полученных Бойзом и др. [4, 5]. Эти антитела связываются с поверхностными антигенами мышинных лимфоцитов (например, с антигенами *Lu* и *TL*; см. ниже), экспрессирующимися на тимоцитах, но не на клетках других тканей, таких, как мозг, почка, печень, или клетках эпидермиса. Бойз и его коллеги пришли к выводу, что эти антигены детерминируются генами, экспрессирующимися исключительно при дифференцировке тимоцитов. Гликопротеин *Lu1*, кодируемый геном, расположенным на 19-й хромосоме, и гликопротеины *Lu2* и *Lu3*, кодируемые генами, расположенными на 6-й хромосоме, экспрессируются также на некоторых периферических Т-клетках. Эти последние продукты гена *Lu* (*Lu2* и *Lu3*) обычно не различают при экспериментальном исследовании, поскольку их гены тесно сцеплены и между этими двумя продуктами пока не найдено каких-либо различий, кроме лишь того факта, что они кодируются разными генетическими локусами. Второй тип тимус-специфических антигенов, гликопротеин *TL*, также экспрессируется на тимоцитах, но не экспрессируется на периферических Т-клетках [6]. Общий подход к определению антигенных маркеров Т-клеток включает в себя анализ цитотоксичности, аналогичный тестам комплементзависимого гемолиза, используемого для идентификации маркеров эритроцитов. В последнее время для «положительной» селекции клеток стали применяться антитела, иммобилизованные на бусинках или поверхности культуральной посуды.

В результате такого анализа было установлено, что периферические Т-клетки содержат по крайней мере три различные субпопуляции. Эти субпопуляции,

обозначаемые $Ly123$, $Ly1$ и $Ly23$, составляют соответственно 50, 30 и 10% пула периферических Т-клеток [7]. Таким образом, исходя из критерия избирательной экспрессии продуктов генов на клеточной поверхности, Т-клетки можно разделить на три группы клеток, каждая из которых следует своей генетической программе. Тогда возникает следующий вопрос: содержат ли эти разные генетические программы информацию, определяющую функцию каждой субпопуляции Т-клеток? Исследования в этом направлении показали, что клетки субпопуляции $Ly1$ генетически запрограммированы «помогать», т. е. индуцировать размножение и (или) дифференцировку клеток других типов. Например, они индуцируют В-клетки к секреции антител и стимулируют моноциты, тучные клетки и предшественники Т-киллеров (клеток-убийц) к участию в клеточных иммунных реакциях. Напротив, клетки субпопуляции $Ly23$ генетически запрограммированы для уничтожения или супрессии других клеток [8—11].

И по своим различным функциональным способностям, и по фенотипу своей поверхности клетки $Ly1$ и $Ly23$ представляют собой отличные друг от друга и специализированные клетки. Не исключено, что они относятся к двум стадиям одной линии дифференцировки; в этом случае одна субпопуляция должна превращаться в другую. Возможно также, что они представляют две ветви тимусзависимой дифференцировки. Эту проблему решили Хубер и др. [12], выделившие клетки $Ly1$ и $Ly23$ и предоставившие им возможность заселить лимфоидные ткани сингенных «В-мышей» (сингенных мышей, получивших летальную дозу облучения с последующим введением клеток костного мозга, не содержащих Т-лимфоцитов). За реципиентами, названными «В- $Ly1$ -мышами» и «В- $Ly23$ -мышами», наблюдали более шести месяцев. У В- $Ly1$ -мышей обнаруживались индукторные (хелперные), но не киллерные функции; у В- $Ly23$ -мышей обнаруживались киллерные, но не хелперные (индукторные) функции. Таким образом, даже после продолжительного культивирования в В- $Ly1$ -хозяине, лишённом клеток $Ly23$, у которого все физиологические контролирующие механизмы должны были бы быть настроены на распространение популяции $Ly23$, не происходило образования этой популяции из клеток $Ly1$. Аналогично у В- $Ly23$ -мышей не происходило заметного образования клеток $Ly1$; такие мыши оставались лишёнными хелперной функции. Эти результаты показывают, что клетки $Ly1$ и $Ly23$ уже выбрали свой путь дифференцировки и это препятствует их взаимному превращению. Иными словами, эти две субпопуляции относятся к различным путям дифференцировки клетки, а не являются последовательными стадиями одной клеточной прогрессии.

4.1.1. Совместное распознавание субпопуляциями Т-клеток

Фундаментальное свойство Т-клеток, их специфичность по отношению к продуктам главного комплекса гистосовместимости (МНС — от англ. major histocompatibility complex), также может быть предсказана по их Ly -маркерам. Индукторные клетки $Ly1$ узнают набор продуктов генов МНС, называемых молекулами класса II, представленными преимущественно на поверхности В-клеток и макрофагов. В частности, молекулы класса II экспрессированы на субпопуляции макрофагов («антиген-представляющих или антиген-презентирующих клеток»), стимулирующей размножение индукторных клеток и синтез ими индукторных белков. Для индукторных клеток продукты МНС класса II служат маркерами клеток своего организма. Активация индукторных клеток

происходит в результате совместного распознавания молекул класса II и обычных антигенов [7, 8, 13]. Это совместное распознавание может в действительности представлять собой связывание индукторными клетками «вариантов» молекул класса II, которые образуются в результате тесной ассоциации этих молекул с антигенами, например вирусными белками. Молекулы класса II экспрессируются также на многих клетках, на которые действуют активированные индукторные клетки. При индукции образования антител молекулы класса II, презентированные на В-клетках, позволяют индукторным клеткам, стимулированным совместным распознаванием молекул класса II и вирусных белков, находить В-клетки, имеющие тот же комплекс молекулы класса II, — антиген. У некоторых из этих В-клеток на поверхности обнаруживается вирус, так как у них имеется мембранный Ig, специфичный для вирусного белка. Такие клетки предпочтительно активируются и секретируют антитела, специфичные к этому вирусному белку.

Молекулы класса II плохо распознаются второй популяцией зрелых Т-клеток — клетками Ly23. Многие из этих клеток представляют собой эффектор-ные клетки, распознающие антиген, ассоциированный с продуктами генов *MHC* класса I. Молекулы класса I экспрессируются практически на всех клетках организма. Таким образом, цитотоксические клетки Ly2⁺ могут лизировать любую соматическую клетку, несущую на поверхности измененную молекулу класса I или другой ее вариант [8, 14].

В целом эти данные показывают, что тимусзависимая дифференцировка приводит к образованию по крайней мере двух независимых субпопуляций зрелых Т-клеток. Одна запрограммирована на то, чтобы индуцировать (помогать) другие типы клеток. Эта субпопуляция активируется антигенами, ассоциированными с продуктами генов *MHC* класса II. Вторая субпопуляция запрограммирована для киллерной/супрессорной активности и отвечает преимущественно на продукты генов *MHC* класса I. В результате образуются две защитные системы. Избирательное воздействие на любую из них чужеродным или измененным собственным продуктом *MHC* активирует иммунные реакции, заранее запрограммированные в каждой субпопуляции Т-клеток.

4.1.2. Антиген-реактивные Т-клетки (АРК): клетки Ly 123

Наиболее многочисленная субпопуляция Т-клеток, имеющая фенотип Ly123, оказалась наименее изученной. Связано это, по-видимому, с тем, что многие клетки этой популяции относятся к промежуточному типу: они не несут прямых иммунологических функций, но имеют рецепторы и могут развиваться в зрелые клетки Ly1 и Ly23. Так, например, клеточные линии, полученные из клеток Ly123 в результате непрерывной стимуляции *in vitro* обычными антигенами или продуктами генов *MHC* или же поддерживаемые добавлением «факторов роста» [15, 16], дают начало клеткам Ly23, составляющим 90—100% клеток с цитолитической или супрессорной активностью, а так же, как показали Шен и др. [17], — Т-хелперным клеткам Ly1. Эти результаты позволяют предположить, что постепенная потеря предшественниками с фенотипом Ly123 антигенов Ly1 или Ly23 коррелирует с приобретением ими зрелой цитолитической или индукторной функции.

мер, практически все лимфоциты в суставной щели больных ревматоидным артритом представляют собой активированные индукторные клетки; супрессорные клетки совершенно не выявляются. Более того, эти индукторные клетки секретируют пептиды, активирующие разрушение хряща и кости тучными клетками и моноцитами. Хотя этот процесс частично подавляется стероидными гормонами и ингибиторами синтеза простагландинов, эти препараты неэффективны для постоянного контроля за последствиями хронического нарушения регуляции индукторной активности Т-клеток.

Мы привели только один пример межклеточных взаимодействий типа индуктор — акцептор. Активированные индукторные Т-клетки или клоны этих клеток стимулируют размножение и (или) созревание клеток многих других типов, в том числе В-клеток, супрессорных и цитотоксичных Т-лимфоцитов, макрофагов и предшественников кроветворных клеток. Перечень клеток, функции которых регулируются сигналами клеток-индукторов, приведены в табл. 4.1.

Таблица 4.1. Некоторые клетки-мишени, функции которых регулируются индукторными сигналами

Кооперирующие популяции		Индукцируемая функция	Источник данных
акцептор	индуктор		
В-клетка	Ly1	Антитела (деление В-клеток?)	[7, 19, 34]
В-клетка	Ly1 ¹⁾	Антитела (секреция В-клеток?)	[7, 19, 34]
Ly123: АРК	Ly1 ¹⁾	Помощь: дифференцировка Ly123 в Ly1(хелп)	[17]
Ly123: АРК	Ly1 ²⁾	Супрессия (первичный путь)	[18, 21, 35]
Ly23	Ly1 ²⁾	Супрессия (вторичный путь)	[18, 21, 35]
Ly123: АРК	Ly1	Образование цитолитических Т-клеток	[16]
Ly23	Ly1	То же	[8]
КОЕ _к ³⁾	Ly1	Образование гранулоцитов/макрофагов	[36]
Моноцит	Ly1	Синтез супероксидов	[37]
Тучная клетка	Ly1	Размножение, активация	[33, 39]
Моноцит	Ly1	Воспалительные реакции	[40]

1) Экспрессируют также Qa1-маркер.

2) Экспрессируют Qa1 и, возможно, «I-J».

3) Клетки, образующие колонии макрофагов *in vitro*.

4.3. Образование Т-клеток в онтогенезе

Тимус играет важнейшую роль в развитии Т-клеток. Как он образуется? Тимус (зобная железа) можно рассматривать как продукт слияния клеток двух различных типов, происходящего в процессе эмбриогенеза. У мышей «собственно» тимус представляет собой эпителиальный зачаток, образующийся из третьего жаберного мешка на десятый день развития. Через два дня в нем появляются и начинают быстро размножаться лимфоидные клетки. Эти лимфоциты, или «тимоциты», возникают не из эпителиального зачатка; эмбриональная печень и желточный мешок образуют лимфоидные клетки-предшественники, мигрирующие в зачаток тимуса на 11—12-й день развития [3]. Фонтен-Перу и др. [41] получили наиболее прямые данные о процессах миграции лимфоцитов и колонизации ими тимуса в ходе эмбриогенеза у птиц, а в последнее

время и у мышей. Эти исследователи извлекали зачаток тимуса на десятый день развития (как только он образуется из третьего жаберного мешка) и культивировали его *in vitro*. Если в культуру не добавляли других клеток, то лимфоциты в зачатке не возникали и он оставался полностью эпителиальным. Если же зачаток тимуса инкубировали совместно с эмбриональной печенью в двух соединенных между собой камерах, то зачаток заселялся клетками эмбриональной печени и развивался гистологически нормально. Если зачатки печени и тимуса были получены от мышей разных линий, то возникал химерный орган. По данным анализа маркеров клеточной поверхности и изоферментов в развившемся органе клетки стромы (т. е. эпителиальные и соединительно-тканые) возникали из эксплантата тимусного зачатка, а лимфоциты — из эмбриональной печени.

Следует остановиться на двух моментах. Во-первых, миграция клеток в новое микроокружение, индуцирующее следующий этап дифференцировки, — это один из важнейших процессов в эмбриогенезе; дифференцировка Т-клеток не является исключением. Во-вторых, описанная модель может быть использована для прямого выяснения роли продуктов генов *MHC* класса II, экспрессируемых стромой тимуса, в образовании популяции индукторов, распознающих эти молекулы класса II в периферической лимфоидной ткани, как маркеры собственного организма.

Какова роль эпителиального зачатка в образовании тимоцитов? У мутантных мышей *ni/ni* не образуется ни тимуса, ни индукторных Т-клеток. Однако на десятый день эмбрионального развития у этих мышей появляется эпителиальный зачаток, а костный мозг взрослых мышей *ni/ni* содержит стволовые клетки, способные заселять тимус нормальных реципиентов. Можно предположить, что эмбриональный зачаток тимуса мышей *ni/ni* дефектен: например, он не способен индуцировать некий критический этап дифференцировки мигрировавших стволовых клеток. В чем заключается этот этап? Хотя анализ антигенов *Lu*, экспрессируемых тимоцитами новорожденных мышей, показал, что большинство тимоцитов имеет фенотип $TL^+Thy1^+Lu123^+$ и лишь меньшинство — TL^+Lu1^+ , выяснилось, что до рождения клетки TL^+Lu1^+ предшествуют клеткам TL^+Lu123^+ . Возможно, тимусный зачаток мышей *ni/ni* не стимулирует превращения стволовых клеток TL^-Lu^- в индукторные клетки TL^+Lu1^{+2-} , которые в свою очередь должны стимулировать рост и дифференцировку других тимоцитов и клеток стромы при морфогенезе.

Взаимодействуют ли размножающиеся индукторные Т-клетки с антигенами, находящимися в крови? Обычно тимус оказывается полностью развит к моменту рождения; он состоит из лимфоцитов и матрикса, построенного из соединительной ткани и эпителиальных клеток. В принципе эти клетки могут распознавать переносимые кровью белки, способные оказать влияние на созревание соответствующих клонов. Кора тимуса снабжается кровью исключительно по капиллярам, выстилающим кортико-медуллярную границу [3]; эти капилляры образуют плотные контакты с макрофагоподобными клетками. К сожалению, данные о том, поглощают ли макрофагоподобные клетки сывороточные молекулы, которые в результате этого способны влиять на образование антиген-специфических тимоцитов, весьма противоречивы.

Требуется ли созревание в тимусе для всех популяций Т-клеток? Клетки $Thy1^-$ из селезенки мышей *ni/ni*, наследственно лишенных тимуса (см. выше), могут быть стимулированы индукторными клетками к приобретению цитотоксической и, возможно, супрессорной активности. Эти индуцированные клетки несут маркеры *Lu*, соответствующие их функциональному состоянию [43]. Этот результат, а также приведенные выше данные показывают, что, хотя

тимус и требуется для дифференцировки, а может быть, и размножения индукторных клеток, он не необходим для дифференцировки предшественников цитолитических и супрессорных Т-клеток $Ly2^+$. Возможно, часть клеток $Ly2^+$ мигрирует аналогично В-клеткам из костного мозга в селезенку и их дальнейшее созревание зависит от стимуляции под действием сформировавшихся в тимусе индукторных клеток.

Каким образом в тимусе отбираются и размножаются индукторные клетки, специфичные к молекулам класса II? Клетки тимуса, экспрессирующие продукты генов МНС класса II, влияют на образование и рост популяции индукторных клеток. Одно из доказательств этого получено при исследовании облученных мышей, которым трансплантировали костный мозг от аллогенных доноров. У таких мышей строма тимуса и костный мозг должны быть химерными, происходящими от доноров, различающихся по МНС. На основе иммунных функций, обнаруживаемых у таких «радиационных костно-мозговых химер», трудно делать определенные выводы, что отчасти объясняется побочными эффектами облучения и трансплантации, а также тем, что в большинстве методов анализа Т-клеток исследуются киллерные клетки $Ly2^+$, получаемые из периферических лимфоидных органов. Другая трудность заключается в том, что в тимусе некоторых облученных мышей (но не среди стромальных клеток эмбрионального тимуса) могут содержаться клетки Ia^+ , происходящие из костного мозга донора. Несмотря на это, убедительно доказано, что находящиеся на стромальных клетках тимуса продукты генов МНС класса II отбирают те индукторные клетки, которые распознают антиген, ассоциированный с этими молекулами класса II [44—48].

Механизм, с помощью которого в тимусе отбираются индукторные клетки, способные к совместному распознаванию «собственных» молекул класса II и большого набора химических детерминант, неизвестен. Лимфоидные клетки в тимусе быстро размножаются. Многие из этих клеток погибают либо в тимусе, либо вскоре после миграции в периферические лимфоидные ткани. Согласно одной интересной гипотезе, в тимусе избирательно стимулируется размножение клеток, прочно связывающихся с молекулами класса II тимусной стромы. Размножение сопровождается мутациями в генах, кодирующих рецепторы продуктов класса II. В результате этого индукторные клетки приобретают набор специфичностей, на который значительное влияние оказывают гены, кодирующие рецепторы собственных молекул класса II. Единственные данные о возможном механизме мутаций, избирательно работающем в тимусе, получены при исследовании ДНК-полимераз. Тимоциты и про-тимоциты содержат ДНК-полимеразу, называемую терминальной дезоксирибонуклеотидтрансферазой, полимеризующую нуклеотиды на затравках в отсутствие матрицы [49]. Этот фермент избирательно экспрессируется в тимусе. По данным, полученным на животных нескольких видов, он практически не обнаруживается в других тканях [49, 50]. В принципе этот фермент может вызывать появление ошибок, а в сочетании с избирательными и специфическими эндонуклеазами — возникновение мутаций в определенных генах [51].

4.4. Координированное программирование Т-клеток в онтогенезе

Приведенные выше данные иллюстрируют тот принцип, что в генетической программе каждого специализированного типа клеток сочетается информация об уникальных гликопротеинах клеточной поверхности («маркерах»)

и об определенной физиологической функции. Соответствие между фенотипом клеток LyT и их функцией и специфичностью к продуктам генов *MHC*, описанное впервые для популяции Т-клеток, было обнаружено при анализе как аллореактивных, так и антиген-специфических клонов Т-клеток [52—55].

Клоны $Ly1^{+2-}$ (хелперы/индукторы) специфично («совместно») распознают продукты *MHC* класса II, в то время как клоны $Ly1^{-2+}$ (цитолитические) распознают продукты генов *MHC* класса I.

В то же время после первичной стимуляции чужеродными антигенами I класса реактивные клетки всех функциональных категорий имеют фенотип $Ly1^{+2+}$ [15, 16, 56—58]. В смешанной культуре лимфоцитов после стимуляции клетками, несущими антигены класса I (мутантные), образуются бластные клетки, экспрессирующие по данным иммуофлуоресцентного анализа антиактивности могут быть подавлены обработкой антителами как к $Ly1$, так и к $Ly2$ в сочетании с комплементом [56—58].

Некоторые из этих наблюдений согласуются с предположением о том, что клетки $Ly123$ могут сами по себе действовать как хелперы для В-клеток после распознавания аллогенных молекул *MHC* класса I [56, 57]. Наиболее убедительное доказательство того, что клетки $Ly1^{+2+}$ могут оказывать подавление к $Ly2$ образование такими Т-клетками хелперных факторов в культуре [57].

Тем не менее недавнее исследование смесей клонов Т-клеток с фенотипами $Ly1$ и $Ly23$, отличающихся по локусам *MHC* класса I, показало, что хелперные лимфокины освобождаются из клеток $Ly1$. Это происходит в результате связывания с ними и (или) их лизиса клетками $Ly23$, специфичными к детерминантам класса I, расположенным на клетках $Ly1$ [59]. Этот выход лимфокинов блокируется антителами к $Ly2$. При получении гетерогенных клеток, различающихся по локусам *MHC* класса I, не исключается присутствие в стимулируемой популяции отличных от В-лимфоцитов клеток. Эти загрязняющие популяцию клетки также могут выделять лимфокины в присутствии клеток $Ly2^{+}$, связывающиеся с их детерминантами класса I.

Второе кажущееся исключение из представления о соответствии между фенотипом Ly , функцией и *MHC*-специфичностью Т-клеток — существование цитолитических Т-клеток, специфичных к аллоантигенам II класса [16, 58, 60].

В этих случаях цитолитические клетки специфичны к белкам класса II, закодированным в области I-A мышинного *MHC*. Они экспрессируют большие количества $Ly1$ и мало $Ly2$. Имеется, однако, важное наблюдение, заключающееся в том, что литическая активность как коротко, так и долгоживущих неклонированных клеточных линий с таким фенотипом почти полностью подавляется моноклональными антителами к $Ly2$, но не $Ly1$ [61]. Пока неясно, рестриктирован ли этот лизис по продуктам генов класса I. Хотя до сих пор у мышей не обнаружены клоны киллерных клеток, специфичных к белкам класса II, существует, видимо, и другой механизм лизиса. Недавние исследования Рао [59] показали, что некоторые клоны индукторных клеток $Ly1$ стимулируют аутолизис моноцитов, несущих молекулы класса II. При этом лизируются как сама индукторная клетка, так и любые другие клетки, оказавшиеся рядом.

4.4.1. Клональный анализ координированного программирования Т-клеток

Возможность использования маркеров Ly для предсказания функции и МНС-специфичности клеток, вообще говоря, требует строгой проверки, что важно как по практическим, так и по теоретическим соображениям. Прямой подход к этой задаче может состоять в отборе Т-клеток исключительно по их фенотипу Ly, получении из них клонов и определении того, насколько соответствуют фенотипу Ly функция и антигенная специфичность этих клонов.

В большой серии таких экспериментов Т-клетки стимулировали клетками, полностью или почти полностью отличающимися от них по МНС [59]. Т-клетки разделяли исключительно по их фенотипу и помещали в культуру для получения большого числа клонов. Более 30 таких клонов периодически исследовали в ходе 18-месячного культивирования. Те клоны, которые исходно отбирали на фенотип $Ly1^{+2-}$ («Ly1-клоны»), более года оставались $Ly1^{+2-}$, а клоны, отобранные на фенотип $Ly1^{-2+}$ («Ly2-клоны»), на протяжении того же времени сохраняли свой фенотип.

Все Ly1-клоны выполняли индукторные функции: после стимуляции они продуцировали интерлейкин-2. Все проверенные клоны выделяли также замещающий Т-клетки фактор (фактор или факторы, вызывающие дифференцировку В-клеток) (табл. 4.2). Все Ly1-клоны были проверены на способность

Таблица 4.2. Функция и антигенная специфичность клонов Т-клеток, отобранных по фенотипу Ly¹)

Фенотип, отобранный из СКЛ	Фенотип			Функция		Специфичность МНС	
	Фенотип клонов Ly, отобранных из СКЛ			выработка индуцирующих факторов	лизис клетки	класс I	класс II
	Ly 1 ⁺	Ly 1 ⁺²⁺	Ly 1 ⁻²⁺				
Ly 1 ⁺²⁻	16/16	0	0	16/16	0	0	16/16 ³⁾
Ly 1 ⁻²⁺	0	0 ²⁾	6/6	0	6/6	6/6 ⁴⁾	0

1) Из четырех независимых смешанных культур лимфоцитов (СКЛ) было получено 26 Т-клеточных клонов.

2) Все клоны в большом количестве имели маркер Ly 2, хотя большинство клеток не экспрессировали маркер Ly 1, выявляемый в иммунофлуоресцентной реакции с использованием флуоресцентного клеточного сортера; у части клеток в некоторых тестах флуоресценция превышала фон.

3) Примерно половина клонов отвечала на продукты гена I-A, а половина — на продукты гена I-E. Специфичность определяли, блокируя реакцию моноклональными антителами к Ia и используя стимулирующие клетки из соответствующих инбредных линий мышей.

4) Все клоны были анти-H-2^d и обладали специфичностью к детерминантам D^d и L^d. Специфичность определяли, блокируя реакцию моноклональными антителами или по взаимодействию с клетками мутантных мышей H-2^d.

к лизису клеток-мишеней как по отдельности, так и в смеси друг с другом, в присутствии и в отсутствие Кон А. Даже при высоком соотношении эффекторных клеток и клеток-мишеней никакого лизиса замечено не было. В то же время все клоны Ly2 лизировали мишени, несущие соответствующие антигены класса I, и ни один из них не выделял интерлейкин-2 после стимуляции. Таким образом, тщательная проверка более чем 30 клонов в течение 16—18 месяцев их культивирования выявила полную корреляцию между фенотипом Ly и функцией. Не было обнаружено ни одного клона, который бы мог проявлять как хелперную, так и цитолитическую активность. Корреляция между фенотипом

Ly и распознаванием МНС также была полной. Все клоны Ly1 распознавали продукты генов МНС класса II, а все клоны Ly2 распознавали продукты класса I. Эти данные приведены в табл. 2.

Эти результаты подтверждают на клональном уровне обнаруженную ранее устойчивую корреляцию между маркерами Ly, МНС-специфичностью и клеточной функцией. *Экспрессия Т-клетками антигенов Ly составляет часть сложной генетической программы, определяющей также функцию клетки и МНС-специфичность.*

Полученные на мышинной модели результаты непосредственно касаются исследований субпопуляций Т-клеток человека. За последние несколько лет было получено большое количество антител, по-разному реагирующих с индукторными, цитолитическими и супрессорными Т-клетками человека. Некоторые из них узнают поверхностные молекулы, которые, как утверждается, являются «эволюционными аналогами» продуктов генов Ly, обнаруживаемых у мышей. Эта точка зрения требует, однако, пересмотра. Существуют достоверные данные о том, что Т-клетки человека, которые, как считается, по поверхностным антигенам аналогичны индукторным клеткам мышей (Ly1⁺2⁻-клеткам), способны лизировать клетки-мишени, несущие продукты генов МНС. Для проверки пригодности использования как этих, так и других поверхностных антигенов для классификации Т-клеток необходимо точно установить: а) стабильна ли экспрессия этих антигенов на каждой популяции Т-клеток и б) можно ли предсказать функции этих клеток и их специфичность в отношении продуктов МНС. Для этого необходимы клоны человеческих Т-клеток, отобранных только по экспрессии данного поверхностного антигена. Как указывалось выше, у каждого клона могут быть определены стабильность фенотипа, иммунологическая функция и МНС-специфичность. Такие тесты необходимы для развития наших представлений о механизмах Т-клеточной регуляции иммунного ответа у здоровых людей, а также у больных хроническими заболеваниями.

4.5. Молекулярные продукты Т-клеток

Последние 10 лет отмечены важными достижениями в иммунологии. Тем не менее в идентификации эндогенных регуляторных молекул, образуемых супрессорными и индукторными Т-клетками, успехи невелики. Для прогресса в этой области необходимо иметь неограниченно растущие гомогенные популяции клеток, секретирующих большие количества регуляторных веществ. Так, например, гомогенные опухоли, секретирующие иммуноглобулины (миеломы), позволили выяснить строение молекул антител. К сожалению, опухолевые Т-клетки оказались менее полезны. Многие из них плохо растут в культуре, и лишь небольшая часть сохраняет способность выполнять иммунологические функции.

Основным методическим достижением в этой области стала разработка общих методов получения клонов, все клетки которых произошли из одной родительской клетки [62, 63]. Клонированные клетки можно хранить в замороженном состоянии: после размораживания они сохраняют молекулярные маркеры и функциональные свойства антиген-специфических индукторных или супрессорных клеток. Процедура клонирования не обязательно требует гибридизации с опухолевыми клетками, хотя в некоторых случаях такая гибридизация может оказаться полезной. Изолированные индукторные или супрессорные клоны продолжают секретировать белки, специфически индуцирующие или подавляющие иммунные реакции. Клоны Т-супрессоров уже позволили

идентифицировать и очистить молекулы, подавляющие иммунный ответ на чужеродные агенты [64]. Цель этих работ заключается в определении структурной и генетической основы различной активности эндогенных иммунорегуляторных молекул. Ниже приведено несколько примеров использования техники клонирования.

4.6. Молекулы, синтезируемые клонами индукторных Т-клеток

4.6.1. Неспецифические пептиды, секретлируемые индукторными клетками

Стимулированные клоны индукторных Т-клеток в свою очередь стимулируют размножение, а также созревание клеток многих типов: В-клеток, супрессорных и цитотоксичных Т-лимфоцитов, макрофагов и предшественников кроветворных клеток. Клоны индукторных Т-клеток активируют те или иные клеточные популяции, секретлируя набор пептидов. Каждому типу активированных клеток соответствует свой пептид [34, 36, 38, 39, 63].

Практически все исследованные к настоящему времени индукторные клоны секретлируют определенный набор из 8—12 пептидов, отличающийся от набора пептидов, секретлируемых супрессорными Т-клетками [34, 36]. Один из этих пептидов по данным хроматографии на сефакриле имеет кажущуюся молекулярную массу 30 кДа и по своим свойствам соответствует предварительно описанным факторам, стимулирующим рост цитотоксических, а также, возможно, супрессорных Т-клеток. Дальнейшее биохимическое исследование показало, однако, что он состоит из двух субъединиц с молекулярной массой 16 и 14 кДа. Митогенной активностью обладает полипептидная цепь массой 14 кДа, а субъединица массой 16 кДа обеспечивает связывание 14 кДа-рост-стимулирующего пептида только с Т-лимфоцитами, но не с другими клетками-мишенями [34].

Были также исследованы индукторные молекулы, активирующие деление В-клеток и секрецию ими антител (см. гл. 21, где содержится подробный обзор этих работ). Полипептид с кажущейся молекулярной массой 45 кДа и изоэлектрической точкой 6,0 стимулирует секрецию В-клетками иммуноглобулинов, но не их деление [34, 62]. Этот 45К-белок обычно ассоциирован с описанным выше 14Кда-митогенным пептидом. Интактная молекула (45Кда + 14Кда) избирательно активирует деление В-клеток и секрецию иммуноглобулинов, но не действует на лимфоциты других классов [34, 62]. Эти пептиды так же, как и другие индукторные молекулы, ответственные за стимуляцию кроветворных клеток, были очищены до гомогенного состояния, достаточного для их секвенирования и для определения в будущем генетической и структурной основы их биологической активности.

4.6.2. Антиген-специфически индукторные молекулы: в поисках методологии

В настоящее время отсутствует удовлетворительное объяснение молекулярного механизма совместного распознавания индукторными клетками антигена и молекул МНС класса II. Это вызвано двумя причинами. Во-первых, трудно сделать какие-либо выводы о механизме специфического распознавания из работ, в которых показано, что вещества, секретлируемые Т-клетками, теряют свою биологическую активность, будучи пропущены через колонку

с антигеном. Во-вторых, сам вопрос обычно не формулируется в точных молекулярно-генетических терминах.

Полезно рассмотреть явление специфичности и сродства вначале на примере молекул, изученных лучше, чем рецепторы Т-клеток. Триумфом совре-
вания молекул антител с антигеном. Около десяти лет назад стало ясно, что, как и сывороточные антитела, миеомные белки могут связываться с простыми химическими детерминантами, такими, как гаптены и простые сахара. Вначале считалось, что эти антитела связываются исключительно с гаптенем или опре-
деленным остатком сахара. Вскоре, однако, стало ясно, что сродство в зна-
чительной степени зависит от соседних аминокислот и сахаров. В сущности, связывание можно рассматривать как сумму двух качественно различных ти-
пов взаимодействия V-района антител с лигандом: одно взаимодействие опре-
деляется аминокислотными остатками, обеспечивающими комплементарность (CDR), второе — всеми другими участками V-домена иммуноглобулина. Оста-
вим на время в стороне вклад легких цепей. Оказалось, что участки связывания тяжелых цепей кодируются тремя генами, названными V, D и J. Участие не-
скольких генов или «минигенов» было предсказано Кабетом, анализирував-
шим первичные последовательности тяжелых цепей иммуноглобулинов различ-
ных биологических видов [71].

От степени сродства иммуноглобулина к антигену критическим образом зависит поведение некоторых типов клеток. Например, от сродства поверхност-
ных молекул IgE к тому или иному антигену зависит специфическая актива-
ция тучных клеток, использующих сорбированные молекулы IgE как рецепторы антигена. Для стабильного связывания лиганда, обеспечивающего достаточную степень сшивания рецепторов IgE и активацию тучной клетки, необходима довольно высокая степень сродства.

Пока в нашем распоряжении нет нуклеотидной последовательности гена Т-клеточного рецептора. Сейчас важно тщательно сформулировать те во-
просы, на которые удастся получить ответ, когда последовательность станет известна. Как указывалось выше, основной вопрос состоит в том, сохраняет ли антиген в комплексе с продуктами генов MHC класса II свою интактную струк-
туру, даже будучи ковалентно с ними связанным. Если это так, то тем самым накладываются важные ограничения на генетическую и молекулярную основу связывания: это значит, что рецептор должен содержать по меньшей мере два участка связывания. Хотя эти участки могут принадлежать одному и тому же пептиду, они по аналогии с иммуноглобулинами, вероятно, должны кодировать-
ся разными генами. Если же структурная целостность антигена изменяется или вовсе теряется при соединении с Ia, то комплекс можно рассматривать как один новый лиганд, который в принципе может распознаваться продуктом одного гена. Данные последнего времени, по-видимому, подтверждают первую модель.

Далее мы рассмотрим результаты работ, в которых использовались гомогенные индукторные клетки и хорошо изученные антигены. Следует подчерк-
нуть, что строгие выводы могут быть получены только после интенсивного химического анализа, но обсудить преимущества и недостатки предлагаемого подхода полезно уже сейчас.

4.6.3. Гаптен-специфические клоны Т-клеток

О том, что специфичность активации индукторных клеток продуктом класса II и антигеном требует сохранения структурной целостности антигена, свидетельствуют, в частности, результаты исследования индукторных клонов,

специфичных к гаптену азобензиларсенату (АБА) (статья готовится для публикации, а также [37]). Активация клон под действием АБА не зависит от белка-носителя, с которым конъюгирован этот гаптен. Тем не менее реакция высокоспецифична: белки, конъюгированные со сходным гаптенем, таким, как азобензилсульфонат (АБС), не активируют этот клон. Маловероятно, чтобы такая тонкая специфичность была связана с необходимостью правильного «присоединения» или «присоединения» АБА к молекулам класса II на антиген-презентирующих клетках; клон можно стимулировать клетками селезенки, экспрессирующими молекулы класса II, к которым химически присоединен АБА, но не АБС. Эти результаты показывают, что в содержащем гаптен лиганде для активации индукторных клеток должны сохраняться антигенные свойства гаптена. Хотя при прямой химической конъюгации высокомолекулярного АБА гаптена АБС с клетками, несущими молекулы класса II, образуется много сходных эпитопов, этого недостаточно для совместного распознавания и активации индукторной клетки. По аналогии с антителами можно предположить, что рецептор индукторной клетки обязательно должен содержать специальный участок, отличающий антигенную детерминанту от близкородственных химических аналогов независимо от того, расположена ли эта детерминанта на растворимом белке или конъюгирована с клетками, несущими молекулы класса II.

4.6.4. Распознавание инсулинов

Бычий и бараний инсулины имеют совершенно одинаковую третичную структуру и различаются лишь одной аминокислотой (остаток 9 в А-цепи). Клоны индукторных клеток мыши, иммунизированной бычьим инсулином, активируются под действием бычьего, но не бараньего инсулина; клоны, полученные от мышей, иммунизированных бараньим инсулином, обладают обратной специфичностью. Эти данные наряду с другими показывают, что индукторная Т-клетка может отличить ассоциированные с молекулой класса II белки, различающиеся всего по одной аминокислоте [65].

Хотя ясно, что специфичность активации индукторных клонов исключительно высока, значительно хуже доказано, что эти клоны синтезируют растворимые белки, способные различать два антигена, не связанные с молекулами класса II. Одной из причин, дающих основание подозревать, что такие индукторные молекулы могут играть роль в антиген-специфической стимуляции В-клеток, служат результаты исследования молекул, синтезируемых и, вероятно, секретлируемых клонами Т-клеток, специфически активированных бычьим или бараньим инсулином. Пептиды, синтезируемые клетками, специфичными к бычьему инсулину, связываются с ним в растворе с K_D , в 10—100 раз большей, чем при связывании с инсулином барана. Обратная ситуация наблюдается в случае пептидов, синтезируемых индукторными клетками, специфичными к бараньему инсулину.

При исследовании пептидов, синтезируемых индукторными клетками, специфичными к тринитрофениловому (ТНФ) или нитрофенилацетиловому (НФА) гаптенам, выяснилось, что биосинтетически меченная связывающаяся с гаптенем фракция пептидов в присутствии белков, конъюгированных одновременно с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) и ТНФ или НФА, активирует В-клетки, специфичные к ФИТЦ. В то же время эти пептиды не способны активировать ФИТЦ-специфичные В-клетки в присутствии смеси ФИТЦ-белков с ТНФ- или НФА-белками. Наиболее вероятное объяснение этих результатов состоит в том, что индукторные клетки выделяют антигенсвязывающие моле-

кулы, которые находят и активируют только те В-клетки, на поверхности которых, возможно в комплексе с молекулой класса II, находится антигенная детерминанта (см. гл. 13—15). Исследования, проведенные совсем недавно, показали, что эти антиген-специфические индукторные пептиды стимулируют только те В-клетки, которые несут специфические продукты генов *MHC* класса II: это наводит на мысль о том, что секретирется рецептор Т-клеток, который связывается с продуктами класса II и антигеном, расположенными на В-клетках [71].

В целом эти исследования показали, что индукторные клетки синтезируют и, возможно, секретируют молекулы, способные к специфическому связыванию. Этим может объясняться специфичность активации клеток под действием антигена и продуктов класса II. Вообще говоря, связанные с клетками рецепторные молекулы, ответственные за специфическую активацию индукторных клеток, могут быть продуктами генов, отличающихся от генов, кодирующих эти пептиды. Однако наиболее простая интерпретация этих данных заключается в том, что секретлируемые антигенсвязывающие индукторные молекулы представляют собой модифицированную форму рецептора.

Если эти результаты отражают общее свойство индукторных клеток, то они означают, что совместное распознавание индукторными клетками продуктов генов *MHC* класса II и антигенных детерминант происходит с помощью различных участков связывания. Описанные результаты не дают ответа на вопрос, находятся ли участки связывания молекул класса II и антигена на одном пептиде или расположены на разных пептидах. Первая возможность лучше согласуется с некоторыми другими наблюдениями и была подтверждена Кэплером и др. [67] в изящных экспериментах по слиянию разных клонов Т-клеток.

Важно отметить, что в отличие от пептидов, синтезируемых и секретлируемых индукторными клонами, в отношении самих индукторных клеток трудно показать, что они специфично связывают свободные антигены (хотя они могут связывать комплексы антигена и молекул класса II). В этом отношении интересны следующие два наблюдения. Во-первых, специфичность связывания секретлируемыми индукторными молекулами полностью соответствует специфичности определяемого *MHC* процесса активации клонированных индукторных клеток под действием антигена. Во-вторых, по данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии восстановителя и додецилсульфата натрия секретлируемые индукторные молекулы, связывающие свободные антигены, построены по меньшей мере из двух полипептидных цепей. Связывание секретлируемых пептидов с антигеном может определяться вкладом обеих тесно взаимодействующих цепей. В этом случае для специфического связывания антигена необходимо соединение двух этих полипептидов и в мембране индукторной клетки.

Две антигенсвязывающие цепи могут, например, в нормальных условиях существовать в липидном бислое мембраны индукторной клетки отдельно и соединяться только при одновременном распознавании молекул класса II и антигена на поверхности антиген-презентирующих клеток (АПК). Их соединение может сопровождаться энзиматической реакцией сшивания цепей между собой и последующей секрецией антигенсвязывающих индукторных молекул. Нет необходимости указывать на весьма спекулятивный характер этого объяснения — для получения окончательного ответа необходимы дальнейшие исследования.

4.6.5. Распознавание индукторными клетками в онтогенезе

Характер иммунного ответа на инсулин у мышей, различающихся по МНС, показывает, что а) аллельные продукты класса II одинаковым образом взаимодействуют с константным участком молекулы инсулина и б) это приводит к уникальному и предсказуемому презентированию детерминант А-цепи инсулина индукторным Т-клеткам. Например, мыши с гаплотипом $H-2^k$ или $H-2^d$ способны к иммунному ответу на инсулин барана, но не на инсулин быка, что связано с различием между этими инсулинами по одной аминокислоте в положении 9 А-цепи. Этому различию в иммунореактивности может быть дано следующее объяснение. На ранней стадии онтогенеза на молекулах Ia^k класса II антиген-презентирующих клеток экспонируется мышный инсулин. При этом на комплексе Ia^k —инсулин презентруется серин в положении 9 А-цепи. У взрослых мышей $H-2^k$ сохраняются только те клоны индукторных клеток, которые реагируют на молекулы инсулина с иной, чем серин, аминокислотой в положении А9 (например, инсулин барана или лошади). Эти клоны могут размножаться и индуцировать иммунный ответ. Чужеродные молекулы инсулина, содержащие серин в положении А9 (например, инсулин быка или свиньи), оказываются неиммуногенными, так как соответствующие им высокоаффинные индукторные клоны были элиминированы в раннем развитии.

4.7. Клетки и молекулы, осуществляющие специфичную иммунологическую супрессию

Более строгая и информативная техника Т-клеточных клонов (без использования гибридизации) была с успехом применена в исследовании Т-супрессорного клона ($Ly1^{-2+}$) «С1. LY23.4», экспрессирующего на поверхности рецепторы гликофорина эритроцитов барана [68—70]. Анализ свойств этого Т-клона показал, что его клетки во многом сходны с образующими антитела В-клетками. Оба типа клеток имеют примерно равное число поверхностных рецепторов, взаимодействующих с антигеном в отсутствие продуктов МНС, и отвечают на сигналы индукторных клеток секрецией антигенсвязывающих белков. Клетки клона С1. LY23.4 секретируют белки с молекулярной массой 70 кДа, которые связываются с антигеном и осуществляют супрессию. Пикограммовые количества очищенного антигенсвязывающего белка специфично подавляют уже начавшийся иммунный ответ на антиген.

Для изучения структурной основы этой активности была использована деградация очищенных Т-супрессорных молекул (Тс) под действием протеолитических ферментов. Хотя белок с весом 70 кДа чувствителен к различным протеиназам, включая трипсин и пепсин, наиболее воспроизводимые результаты дает обработка папаином: этот фермент расщепляет почти 100% антигенсвязывающего 70 кДа белка на две субъединицы с молекулярной массой 45 и 24 кДа. Обе субъединицы оказались резистентными к дальнейшему протеолизу и в сумме по массе составляли 70—85% продуктов протеолиза 70 кДа белка. Для обоих продуктов протеолиза была определена их биологическая активность. Субъединица с молекулярной массой 45 кДа сохраняла супрессорную активность, но не связывалась с антигеном; пептид с массой 24 кДа специфично связывался с антигеном, но не обладал супрессорными свойствами.

Замечательно, что связывание нативного белка 70 кДа с антигеном само приводит к расщеплению и образованию тех же субъединиц 45 и 24 кДа. Они

обладают теми же биологическими активностями, что и пептиды, образующиеся после ферментативного протеолиза исходной молекулы. Субъединицы с весом 45 и 24 кДа можно различить серологически. Антитела, полученные против миеломных белков и узнающие V_H -последовательность иммуноглобулинов, реагируют с исходной 70 кДа молекулой, а также с ее субъединицей 24 кДа, но не реагируют с 45 кДа субъединицей. Кроличьи антитела, реагирующие с некоторыми другими 70 кДа молекулами Тс, обладающими различной антигенной специфичностью, связываются с 45 кДа субъединицей, но не реагируют с 24 кДа субъединицей Тс.

Таким образом, биологическая активность исходной молекулы определяется суммой активностей 45 кДа и 24 кДа пептидов. Эти два пептида представляют собой, видимо, два различных домена белка Тс (табл. 4.3). В принципе возмож-

Таблица 4.3. Свойства двух различных доменов Т-супрессорных молекул

	Молекулярная масса	ИЭТ	Связывание с антигеном	Супрессия		Серологические детерминанты	
				специфическая	неспецифическая	СФ	V_H (Ig)
Очищенные Тс	70 000	5,0	++	++	-	+	+
Пептид А	45 000	5,6	-	-	+	+	-
Пептид В	24 000	?	+	-	-	-	+

но, хотя и очень маловероятно, что 24 кДа пептид представляет собой продукт дегградации 45 кДа пептида. Для окончательного доказательства того, что эти пептиды соответствуют независимым доменам исходной 70 кДа молекулы, необходимо определить аминокислотную последовательность и проанализировать мРНК, кодирующую 70 кДа белок (см. гл. 18, где приводится подробный обзор на эту тему).

4.7.1. Аналогии между Ig и 70 кДа Тс-молекулой

При протеолитическом расщеплении Ig папаинном образуются два фрагмента: Fc и Fab. Фрагменты цепей Ig, содержащиеся в препаратах Fab, имеют молекулярную массу около 22 кДа, соответствуют антигенсвязывающему участку Ig и содержат последовательности, закодированные в генах V_H . Фрагмент Fc имеет молекулярную массу около 50 кДа, отвечает за биологическую активность различных классов иммуноглобулинов и кодируется С-генами. Каждый продукт гена С обладает характерными «изотипическими» детерминантами, которые серологически можно обнаружить с помощью антител. Молекулы Тс, полученные из клонированных Т-клеток, как показывают результаты протеолиза папаинном, по-видимому, также состоят из двух функционально различных доменов: V-района (24 кДа), специфически связывающегося с антигеном, но не обладающего супрессорной активностью, и С-района (45 кДа), который не связывается с антигеном, но неспецифически подавляет синтез антител. Как указывалось выше, 45 кДа субъединица, по-видимому, имеет общие серологические детерминанты с частично очищенными Тс-белками, специфичными к другим антигенам. Поскольку эти детерминанты не обнаруживаются на Т-индукторных белках, они могут представлять собой изотипические детерминанты Т-клеточных молекул, подавляющих иммунный ответ.

4.7.2. Функциональные свойства Тс-молекул

Пикограммовые количества очищенного 70 кДа Тс-белка полностью подавляют иммунный ответ на сложный клеточный антиген, даже будучи введенными после антигена. На основании структурных свойств этих молекул можно предположить следующий механизм осуществления биологической активности. Соединение 70 кДа молекул с Т-индукторными клетками, связавшими специфическую антигенную детерминанту, приводит к повышению чувствительности Тс-молекул к протеиназе, расположенной на поверхности индукторной клетки. В результате высвобождается 45 кДа субъединица. Эта субъединица подавляет активность всех Т-индукторных клеток, связывающих молекулы, содержащие узнаваемый Тс-белком эпитоп. В результате этой реакции моноклональная Тс-молекула подавляет иммунный ответ даже на сложно устроенные чужеродные клетки, если они содержат хотя бы один участок, узнаваемый Тс-белком. Важная особенность этого механизма заключается как раз в том, что он обеспечивает эффективную супрессию иммунного ответа на сложные чужеродные клетки или молекулы с помощью небольшого числа Т-супрессорных клонов. Практическое значение имеет тот факт, что Т-хелперные клетки, специфичные к любому белку, ковалентно связанному с эритроцитом барана, подавляются Тс-молекулой, специфичной к эритроциту. Это наблюдение может найти терапевтическое применение для лечения аутоиммунных заболеваний, если окажется, что Т-хелперные клетки, специфичные к аутологичному белку, супрессируются конъюгатом этого белка с эритроцитами барана и 70 кДа Тс-молекулой.

Заключение

Последние достижения в методах культивирования лимфоцитов позволяют получать большие количества гомогенных Т-клеток, секретирующих иммунорегуляторные пептиды. Это означает, что теперь появилась возможность обнаруживать и выделять нетоксичные пептиды, специфично активизирующие или подавляющие иммунный ответ. Например, моноклональные пептиды, синтезируемые индукторными клетками, активируют размножение и дифференцировку специфичных клеток-мишеней. Один пептид активирует дифференцировку стволовых клеток в красные и белые клетки крови, другой стимулирует секрецию антител В-клетками, третий индуцирует размножение и, возможно, дифференцировку тучных клеток. Может быть, наиболее важный результат этих исследований заключается в том, что каждый пептид, полученный от Т-клеточных клонов, может оказывать сильное регуляторное воздействие как на интенсивность, так и на характер иммунного ответа. Можно надеяться, что некоторые из этих иммунорегуляторных молекул или их аналоги будут использованы в качестве мощных терапевтических агентов для лечения некоторых хронических заболеваний. Поскольку через несколько лет очищенные индукторные и супрессорные пептиды будут доступны в больших количествах, это направление их использования скоро можно будет критически оценить.

Гомогенные популяции Т-клеток, осуществляющие антиген-специфическую помощь или супрессию, являются чрезвычайно привлекательным объектом для биохимического анализа. Исследование иммунологической активности клонов Т-клеток, обладающих известной функцией и специфичностью, интересно и еще с одной точки зрения. Наши знания о факторах, регулирующих молекулярные каскады, контролирующие свертывание крови или активацию комплемента, были получены при анализе вклада каждого очищенного компонента в био-

логическую реакцию. Такой редуccionистский анализ позволил точно определить те критические молекулярные события, которые усиливают или подавляют эти две биологические системы.

Этот подход в скором времени может быть применен для исследования каскада межклеточных взаимодействий, регулирующих гуморальный и клеточный иммунные ответы. Стратегия заключается в построении или синтезе минимального набора клеточных компонентов, требующихся для иммунного ответа, с использованием хорошо охарактеризованных клонов лимфоцитов, относящихся к различным регуляторным популяциям Т-клеток, гомогенных популяций В-клеток и моноцитов. Каковы основные генетические и молекулярные факторы, влияющие на такую искусственную систему? Подчиняются ли взаимодействия в таком наборе клеток законам, установленным при анализе гетерогенных клеточных популяций?

ЛИТЕРАТУРА

1. Gershon R. K. T-cell control of antibody response, *Contemp. Top. Immunol.*, 3, 1 (1974).
2. Cantor H., Asofsky R. Synergy among lymphoid cells mediating the GVH response. III. Evidence for interaction between two classes of thymus-derived cells, *J. Exp. Med.*, 135, 764 (1972).
3. Cantor H., Weissman I. Development and function of subpopulations of thymocytes and T lymphocytes, *Prog. Allergy*, 20, 1 (1976).
4. 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 (1968).
5. 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).
6. Boyse E. A., Stockert E., Old L. J. Isoantigens of the H-2 and Tla loci of the mouse. Interactions affecting their representation on thymocytes, *J. Exp. Med.*, 128, 85 (1968).
7. Cantor H., Boyse E. A. Functional subclasses 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 (1975).
8. Cantor H., Boyse E. A. Functional subclasses of T lymphocytes bearing different Ly antigens. II. Cooperation between subclasses of Ly⁺ cells in the generation of killer activity, *J. Exp. Med.*, 141, 1390 (1975).
9. Jandinski J., Cantor H., Tadakuma T., Peavy D. L., Pierce C. W. Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components. I. Polyclonal activation: Suppressor and helper activities are inherent properties of distinct T cell subclasses, *J. Exp. Med.*, 143, 1382 (1976).
10. Cantor H., Shen F. W., Boyse E. A. Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components. II. Activation by antigen: After immunization, antigen-specific suppressor and helper activities are mediated by distinct T cell subclasses, *J. Exp. Med.*, 143, 1391 (1976).
11. Huber B., Devinsky O., Gershon R. K., Cantor H. Cell-mediated immunity: Delayed type hypersensitivity and cytotoxic responses are mediated by different T cell subclasses, *J. Exp. Med.*, 143, 1534 (1976).
12. Huber B., Cantor H., Shen F. W., Boyse E. A. Independent differentiative pathways of Ly1 and Ly23 subclasses of T cells. Experimental production of mice deprived of selected T-cell subclasses, *J. Exp. Med.*, 144, 1128 (1978).
13. Paul W. E., Benacerraf B. Functional specificity of thymus-dependent lymphocytes, *Science*, 195, 1293 (1977).
14. Alter B. J., Schendel D., Bach M. L., Bach F. H., Klein J., Stimpfling J. Cell-mediated lympholysis. Importance of serologically defined H-2 regions, *J. Exp. Med.*, 137, 1303 (1977).
15. Nagy Z. A., Kusnierczyk P., Klein J. Terminal differentiation of T cells specific for mutant H-2K antigens. Conversion of Lyt-1,2 cells into Lyt-2 but not Lyt-1 cells, *in vitro*, *Eur. J. Immunol.*, 11, 167 (1981).
16. Hardt C., Pflizenmaier K., Rollinghoff M., Klein J., Wagner H. Alloreactive and H-2 restricted Lyt 23 cytotoxic T lymphocytes derive from a common pool of antecedent Lyt 123 precursors, *J. Exp. Med.*, 152, 1413 (1980).

17. Shen F. W., McDougal J. S., Bard J., Cort S. P. Developmental and communicative interactions of Ly123 and Ly1 cells sets, *J. Exp. Med.*, 151, 566 (1980).
18. Eardley D. D., Hugenberg J., McVay-Boudreau L., Shen E. W., Gershon R. K., Cantor H. Immunoregulatory circuits among T cell sets. I. T-helper cells induce other T cells to exert feedback inhibition, *J. Exp. Med.*, 147, 1106 (1978).
19. Cantor H., Hugenberg J., McVay-Boudreau L., Eardley D. D., Kemp J., Shen F. W., Gershon R. K. Immunoregulatory circuits among T cell sets: Identification of a subpopulation of T helper cells that induce feedback inhibition, *J. Exp. Med.*, 148, 871 (1978).
20. Cantor H., Gershon R. K. Immunological circuits: Cellular composition, *Fed. Proc.*, 38, 2058 (1979).
21. Eardley D. D., Shen F. W., Cantor H., Gershon R. K. Genetic control of immunoregulatory circuits. Genes linked to the Ig locus govern communication between regulatory T-cell sets, *J. Exp. Med.*, 150, 44-50 (1979).
22. Cantor H., McVay-Boudreau L., Hugenberg J., Naidorf K., Shen F. W., Gershon R. K. Immunoregulatory circuits among T cell sets. II. Physiologic role of feedback inhibition in vitro; Absence in NZB mice, *J. Exp. Med.*, 120, 1733 (1978).
23. Gershon R. K., Eardley D. D., Naidorf K., Cantor H. Association of defective feedback suppressor T cell activity with autoimmunity in NZB mice, *Arthritis Rheum.*, 21, S180 (1978).
24. Strelkauskas A. J., Schauf V., Chen L., Schlossman S. F. Isolation and characterization of subsets of human T-cells with distance regulatory functions and surface markers, *J. Immunol.*, 120, 1278 (1978).
25. Reinherz E., Kamp P. F. C., Goldstein G., Schlossman S. F. Separation of functional subsets of human T-cells using monoclonal antibody, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4061 (1979).
26. Haynes G. V., Eisenborth G. S., Fauci A. S. Human lymphocyte antigens: A monoclonal antibody that defines functionally different human T-cell subsets, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 5829 (1979).
27. Evans R. L., Beard J. M., Schlossman S. F., Chess L. Detection isolation and functional characterization of two human T-cell subsets bearing unique differentiate antigens, *J. Exp. Med.*, 145, 221 (1977).
28. Strelkauskas A. J., Callery R. T., McDowell J., Borel Y., Schlossman S. F. Direct evidence for loss of human suppressor cells during active autoimmune disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 5150 (1978).
29. Chattopadhyay C., Chattopadhyay H., Natvig J. V., Michaelsen T. E., Mellbye O. J. Lack of suppressor cell activity in rheumatoid synovial lymphocytes, *Scand. J. Immunol.*, 10, 309 (1979).
30. Antel J. P., Arnason B. G. W., Medof M. E. Suppressor cell function in multiple sclerosis: correlation with clinical disease activity, *Ann. Neurol.*, 5, 338 (1978).
31. Gonzalez R. L., Dau P. C., Spittler L. E. Altered regulation of mitogen responsiveness by suppressor cells in multiple sclerosis, *Clin. Exp. Immunol.*, 36, 78 (1979).
32. Reinherz E. L., Weiner H. L., Hauser S. L., Cohen J. A., Distaso J. A., Schlossman S. F. Loss of suppressor T-cells in active multiple sclerosis, *N. Engl. J. Med.*, 303, 125 (1980).
33. Morimoto C., Reinherz E. L., Borel Y., Mantzourais E., Steinberg A. D., Schlossman S. F. An autoantibody to an immunoregulatory inducer population in patients with juvenile rheumatoid arthritis, *N. Engl. J. Med.*, 285, 110 (1980).
34. Fresno M., Der Simonian H., Nabel G., Cantor H. Proteins synthesized by inducer T cells: Evidence for a mitogenic peptide shared by inducer molecules that stimulate different cell types, *Cell*, 30, 707 (1982).
35. Eardley D. D., Murphy J., Kemp J., Cantor H., Gershon R. K. Inducer and acceptor cells in the feedback suppression circuit bear an I-J controlled determinant, *Immunogenetics*, 11, 459 (1980).
36. Nabel G., Greenberger J., Sakakeeny M., Cantor H. Multiple biologic activities of a cloned inducer T cell population, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 1157 (1981).
37. Rao A., Faas S., Cantor H. Lysis of inducer cells by activated macrophages and macrophage-like lines, *J. Exp. Med.* (in press) (1983).
38. Nabel G., Galli S. J., Dvorak A. M., Dvorak H. F., Cantor H. Inducer T lymphocytes synthesize a factor that stimulates proliferation of cloned mast cells, *Nature*, 291, 322 (1981).
39. Galli S. J., Dvorak A. M., Ishizaka T., Nabel G., Der Simonian H., Cantor H., Dvorak H. F. A cloned cell with natural killer function resembles basophils by ultrastructure and expresses IgE receptors, *Nature* (in press). (1983).
40. Huber B., Devinsky O., Gershon R. K., Cantor H. Cell-mediated immunity: Delayed type hypersensitivity and cytotoxic responses are mediated by different T cell subclasses, *J. Exp. Med.*, 143, 1534 (1978).
41. Fontaine-Perus J. C., Calman F. M., Kaplan C., Le Douarin N. M. Seeding of the 10-day mouse embryo thymic rudiment by lymphocyte precursors in vitro, *J. Immunol.*, 126, 2310-2316 (1981).

42. 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).
43. Zinkernagel R. M., Althage A., Waterfield E., Kindred B., Welsch R. M., Callahan G., Pinceth P. Restriction specificities, alloreactivity, and allotolerance expressed by T cells from nude mice reconstituted with H-2-compatible or -incompatible thymus grafts, *J. Exp. Med.*, 151, 376 (1980).
44. Kruisbeek A. M., Sharrow S. O., Mathieson B. J., Singer A. The H-2 phenotype of the thymus dictates the selfspecificity expressed by thymic but not splenic cytotoxic T lymphocyte precursors in thymus-engrafted nude mice, *J. Immunol.*, 127, 2168 (1981).
45. Glimcher L. H., Longo D. L., Green I., Schwartz R. H. The murine syngeneic mixed lymphocyte response. I. The target antigens are self Ia molecules, *J. Exp. Med.*, 154, 1652 (1981).
46. 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).
47. Glimcher L., Singer A. Chimers and autologous MLC, *J. Immunol.*, 129, 1022 (1982).
48. Kruisbeek A. M., Hodes R. J., Singer A. Cytotoxic T lymphocyte responses by chimeric thymocytes, *J. Exp. Med.*, 153, 13 (1981).
49. Yoneda M., Bollum F. J. Deoxynucleotide-polymerizing enzymes of calf thymus gland. I. Large scale purification of terminal and replicative deoxynucleotidyl transferase, *J. Biol. Chem.*, 240, 3385 (1965).
50. Silverstone A. E., Cantor H., Goldstein G., Baltimore D. Terminal deoxynucleotidyl transferase is found in prothymocytes, *J. Exp. Med.*, 144, 543 (1976).
51. Baltimore D., Silverstone A. E., Kung P. C., Harrison T. A., McCaffrey R. P. What cells contain terminal transferase? In: *The Generation of Antibody Diversity: A New Look*, edited by A. Cunningham, Academic Press, New York, 1976.
52. Glasebrook A. L., Sarmiento M., Loken M. R., Dialynas D. P., Quintans J., Eisenberg L., Lutz C. T., Wilde D., Fitch F. W. Murine T lymphocyte clones with distinct immunological functions, *Immunol. Rev.*, 54, 225 (1981).
53. Schreier M. H., Iscove N. N., Tees R., Aarden L., von Boehmer H. Clones of killer and helper T cells: Growth requirements, specificity and retention of function in long term culture, *Immunol. Rev.*, 51, 315 (1980).
54. Sredni B., Schwartz R. H. Alloreactivity of an antigen specific T cell clone. *Nature*, 287, 855 (1980).
55. Nabel G., Fresno M., Chessman A., Cantor H. Use of cloned populations of mouse lymphocytes to analyse cellular differentiation, *Cell*, 23, 19 (1981).
56. Swain S. L., Bakke A., English M., Dutton R. W. Ly phenotypes and MHC recognition The allohelper that recognizes K or D is a mature Ly123 cell, *J. Immunol.*, 123, 2716 (1979)
57. Swain S. L. Significance of Lyt phenotypes: Lyt2 antibodies block activities of T cells that recognize class I major histocompatibility complex antigens regardless of their function, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 7101 (1981).
58. Wettstein P. J., Bailey D. W., Mobraaten L. E., Klein J., Frelinger J. A. T-lymphocyte response to H-2 mutants. Proliferation is dependent on Ly1⁺2⁺, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 3455 (1979).
59. Rao A., Allard W. J., Hogan P. G., Rosenson R. S., Cantor H. Alloreactive T-cell clones: Ly phenotype predicts both function and specificity for MHC products, *Immunogenetics*, 17, 147 (1983).
60. Vidovic D., Juretic A., Nagy Z. A., Klein J. Lyt phenotypes of primary cytotoxic T cells generated across the A and E regions of the H-2 complex, *Eur. J. Immunol.*, 123, 2716 (1981).
61. Miller R. A., Stutman O. Monoclonal antibody to Ly2 antigen blocks H-2I- and H-2K-specific mouse cytotoxic T cells, *Nature*, 296, 76 (1982).
62. Nabel G., Fresno M., Chessman A., Cantor H. Use of the cloned populations of mouse lymphocyte to analyze cellular differentiation, *Cell*, 23, 19 (1981).
63. Fathman C. G., Fitch F. W., eds. *Isolation and Utilization of T-Cell Clones*, Academic Press, New York, 1982.
64. Fresno M., Nabel G., McVay-Boudreau L., Furthmayer H., Cantor H. Antigen specific T cell clones: II. Purification and biological characterization of an antigen-specific suppressive protein synthesized by cloned T-cells, *J. Exp. Med.*, 153, 1260 (1981).
65. Leeman S., Cantor H. Specificity of T-cell clones for antigen and MHC products determines specificity for foreign MHC products, *J. Exp. Med.* (in press). (1983).
66. Clayberger C., De Kruyff R., Cantor H. Hapten reactive inducer cells. I. Definition of two classes of hapten specific inducer T-cells, *J. Exp. Med.*, 157, 1906 (1983).

67. Kappler J. W., Skidmore B., White J., Marrack P. Antigen inducible, H-2 restricted interleukin-2-producing T cell hybridomas. Lack of independent antigen and H-2 recognition, *J. Exp. Med.*, 153, 1198 (1981).
68. Fresno M., Nabel G., McVay-Boudreau L., Furthmayer H., Cantor H. Antigen specific T cell clones: I. Characterization of a T-cell clone expressing antigen-specific suppressive activity, *J. Exp. Med.*, 153, 1246 (1981).
69. Fresno M., Nabel G., McVay-Boudreau L., Furthmayer H., Cantor H. Antigen specific T cell clones: II. Purification and biological characterization of an antigen-specific suppressive protein synthesized by cloned T-cells, *J. Exp. Med.*, 153, 1260 (1981).
70. Fresno M., McVay-Boudreau L., Cantor H. Antigen specific T lymphocyte clones. III. Papain splits purified T-suppressor molecules into two functional domains, *J. Exp. Med.*, 155, 981 (1981).
71. DeKruyff R., Clayberger C., Cantor H. Hapten reactive inducer cells. II. Evidence that a secreted form of the T-cell receptor induces antibody production, *J. Exp. Med.* (in press). (1983).

Макрофаги и другие вспомогательные клетки

Итан М. Шевак

(*Ethan Shevach*)

Мононуклеарные фагоциты — это третий тип клеток, непосредственно участвующих в формировании гуморального и клеточного иммунных ответов. Самое первое событие, происходящее при попадании в организм чужеродного материала, — это его поглощение фагоцитами, происходящее обычно неспецифическим образом. Впервые роль фагоцитирующих клеток в защите организма хозяина была осознана Ильей Мечниковым около 100 лет назад. Вот как он сам описывает это важное теоретическое достижение.

«Однажды, когда моя семья отправилась в цирк на какое-то необычное представление с дрессированными обезьянами, а я остался один у микроскопа, наблюдая за поведением движущихся клеток прозрачной личинки морской звезды, мне в голову пришла неожиданная мысль. Я сообразил, что подобные клетки могут защищать организм от вторжения других существ. Чувствуя, что в этом есть нечто чрезвычайно интересное, я так возбудился, что начал быстро ходить по комнате из угла в угол, а потом даже пошел к морскому берегу, чтобы привести в порядок мысли.

Я подумал, что если мое предположение верно, то какой-нибудь обломок, введенный в тело личинки морской звезды, лишенное кровеносных сосудов и нервной системы, будет вскоре окружен движущимися клетками так же, как это происходит у человека, всадившего в палец занозу. Сказано — сделано.

У нас перед домом был небольшой сад, в котором несколько дней назад мы устроили для детей «рождественскую елку» из небольшого дерева мандарина; я вырвал там несколько розовых шипов и ввел их под кожу красивейшей прозрачной, как вода, личинки морской звезды.

В ожидании результата моего эксперимента я был так взволнован, что не мог уснуть в эту ночь, а на следующий день рано утром я убедился, что мое предположение полностью подтвердилось.

Этот эксперимент лег в основу фагоцитарной теории, развитию которой я посвятил дальнейшие двадцать пять лет моей жизни.» (Из кн: О. Мечникова, «Жизнь Ильи Мечникова», Houghton Mifflin, 1921.)

Сейчас эти воззрения совершенно для нас естественны. Молекулы антигена, попадающие в лимфоидную ткань, быстро поглощаются фагоцитами, выстилающими синусы или разбросанными в лимфоидных органах. Ассоциированный с макрофагами антиген играет ключевую роль в инициации иммунного ответа, осуществляемого лимфоидными клетками.

Клетки из дифференцировочного ряда мононуклеарных фагоцитов участвуют в иммунном ответе разными способами: а) защищая от микроорганиз-

мов, особенно от облигатных внутриклеточных микроорганизмов; б) в качестве мусорщиков, удаляя поврежденные или умирающие клетки, а также разрушая неметаболизируемые неорганические материалы; в) участвуя в двусторонних клеточных взаимодействиях с лимфоцитами; г) в качестве важных секреторных клеток, продуцируя биологически активные вещества, регулирующие другие клеточные функции; д) убивая другие клетки, что, возможно, играет важную роль в контроле за новообразованиями.

Эта глава посвящена детальному анализу роли макрофагов в афферентном звене иммунного ответа, в частности в индукции Т-клеточного иммунитета. В гл. 27 обсуждаются многие аспекты эфферентного действия макрофагов. В отличие от Т-клеток и В-клеток макрофаги не имеют клонально заданных свойств и не обладают антигенной специфичностью, а действуют как неспецифичные вспомогательные клетки. Хотя мононуклеарные фагоциты хорошо охарактеризованы, это не единственные клетки, функционирующие как вспомогательные клетки при индукции иммунного ответа. Клетки других типов, включая В-лимфоциты, могут брать на себя некоторые функции макрофагов. Определенные типы клеток, имеющие специфическое тканевое распределение *in vivo*, могут быть даже более эффективными вспомогательными клетками, чем макрофаги при анализе *in vitro*.

В последние два десятилетия произошел взрыв в интересе, проявляемом к макрофагам и появилось много исчерпывающих монографий. Мы отсылаем читателя к списку рекомендуемой литературы, расположенному в конце главы.

5.1. Биологические свойства вспомогательных клеток

5.1.1. Мононуклеарные фагоциты

В ходе развития мыши стволовая кроветворная клетка мезенхимального происхождения возникает в желточном мешке и на второй неделе онтогенеза мигрирует в эмбриональную печень, где возникают незрелые мононуклеарные фагоциты. На третьей неделе развития кроветворение начинается в костном мозге. Хотя фагоциты есть во всех тканях, в нормальных условиях пролиферирующие фагоциты можно обнаружить только в костном мозге. Наиболее незрелая клетка этого ряда, представляющая собой, по-видимому, прямой потомок коммитированной стволовой клетки, — это монобласт; при делении этой клетки образуются промоноциты — непосредственные предшественники моноцитов [1]. Моноциты остаются в костном мозге очень короткое время, а затем попадают в кровоток, откуда проникают в различные ткани, чтобы превратиться в макрофаги. С помощью костномозговых химер и экспериментов по парабриозу было прямо показано, что в нормальном состоянии макрофаги, локализуемые в разных тканях организма, образуются из циркулирующих в крови моноцитов. В целом в нормальном состоянии пролиферация макрофагов в тканях не играет никакого значения для обновления этой популяции клеток. Однако во многих исследованиях *in vivo* в экссудатах тканей обнаруживается небольшой процент (2—5%) делящихся клеток. Таким образом, вопрос о самообновлении макрофагов в тканях не вполне ясен.

Созревание в ряду мононуклеары — фагоциты характеризуется появлением набора мембранных маркеров, новых рецепторов и функций [2]. Присутствие или отсутствие одного или многих таких маркеров позволяет разработать критерии для характеристики мононуклеарных фагоцитов (табл. 5.1).

Таблица 5.1. Маркеры вспомогательных клеток [3]

	Моноциты-макрофаги	Клетки Лангерганса	Вуалевые клетки, ОКР ¹⁾	Дендритные клетки
Поверхностные маркеры				
Рецепторы Fc	+	+	?	—
Рецепторы C3	+	+	?	—
Ia-антигены	+	+	+	+
Ферменты-маркеры				
Неспецифическая эстераза	+	+	?	—
АТРаза	+	+	+	—
Пероксидаза	+	—	+	—
Фагоцитоз (латекс)	+	—	?	—
Пиноцитоз	+	+	+	+
Гранула Бирбека	—	+	иногда	—
Презентация антигена	+	+	?	+
Костномозговое происхождение	+	+	?	+

1) ОКР — отростчатые клетки ретикулула.

Без использования этих маркеров на основании только морфологических критериев было бы крайне трудно различать между собой моноциты, лимфоциты, предшественники моноцитов (монобласты и промоноциты) и предшественники гранулоцитов (миелобласты и промиелоциты).

Одним из наиболее надежных маркеров для идентификации мононуклеарных фагоцитов у человека и животных служит фермент неспецифическая эстераза. При использовании в качестве субстрата α -нафтилбутирата или α -нафтилацетата все моноциты и макрофаги дают положительную реакцию, хотя ее интенсивность зависит от вида животного, стадии развития, а также условий культивирования и функционального состояния клеток. В макрофагах неспецифическая эстераза расположена диффузно в цитоплазме. Иногда этот фермент обнаруживается в Т-клетках, но там он выявляется в виде положительных точек в гранулах. Фагоциты содержат также другой фермент — лизоцим, который легко обнаруживается с помощью флуоресцентно-меченных антител. Третий ферментативный маркер фагоцитов — пероксидаза. Она особенно удобна для идентификации различных стадий развития фагоцитов, так как внутриклеточная локализация пероксидазы в монобластах, промоноцитах, моноцитах и макрофагах различна. Гранулы, содержащие пероксидазу, обнаруживаются только в монобластах, промоноцитах, моноцитах и макрофагах экссудата — в неактивированных макрофагах методом световой микроскопии пероксидаза не выявляется. Поверхностный фермент 5'-нуклеотидаза также удобен для различения покоящихся и активированных макрофагов: его активность высока в покоящихся клетках и крайне мала в активированных. Активность двух других поверхностных ферментов лейцинаминопептидазы и щелочной фосфодиэстеразы I, наоборот, при активации увеличивается.

Мононуклеарные фагоциты имеют рецепторы к Fc-району IgG и к третьему компоненту комплемента (C3), а также обладают такой функциональной характеристикой, как активный эндоцитоз. Считается, что клетку можно отнести к мононуклеарным фагоцитам, лишь проверив ее способность к иммун-

ному фагоцитозу: поглощению опсонизированных бактерий или эритроцитов, покрытых IgG. Способность к поглощению эритроцитов, покрытых комплексом, приобретается только при активации мононуклеарных фагоцитов. Все мононуклеарные фагоциты способны к пиноцитозу, причем различают две формы пиноцитоза. При макропиноцитозе возникают выросты поверхностной мембраны клетки, в результате чего образуются относительно крупные пузырьки (0,1—1 мкм). В макрофагах этот механизм доминирует, и с его помощью обеспечиваются почти все поглощение растворенных веществ и интерпорация мембраны. Возможно, эти пузырьки играют роль также в транспорте веществ из клетки наружу. Для микропиноцитоза характерно образование мельчайших впячиваний плазматической мембраны (размер пузырьков меньше 0,1 мкм). Поглощение растворенных молекул в пузырьках называют микропиноцитозом в жидкой фазе, а поглощение молекул, прикрепившихся к клеточной поверхности с помощью неспецифических рецепторов, — поверхностным микропиноцитозом. Последний сопровождается образованием окаймленных пузырьков.

В последние пять лет стали доступны моноклональные антитела, что дает возможность идентифицировать члены дифференцировочного ряда моноциты — макрофаги. Эти маркеры моноцитов-макрофагов очень удобны для определения числа макрофагов в суспензии клеток, избирательного удаления макрофагов с помощью комплементзависимого лизиса или флуоресцентного сортера клеток (ФАКС), идентификации клеток-предшественников макрофагов, имеющих набор общих антигенов, а также для диагностики опухолей ретикулоэндотелиального происхождения, относящихся к ряду макрофагов.

Одним из первых реагентов, узнающих поверхностный антиген макрофагов, были крысиные антимышьи моноклональные антитела М1/70 [4]. Иммунофлуоресцентный анализ с помощью клеточного сортировщика (ФАКС) показал, что антиген (МАС-1), узнаваемый этими антителами, в большом количестве экспрессируется перитонеальными макрофагами, активированными тиогликолятом, и в несколько меньшем количестве моноцитами и гранулоцитами периферической крови (8% клеток селезенки и 50% клеток костного мозга). МАС-1 обнаруживался также на поверхности мышинных природных киллеров, но отсутствовал у тимоцитов, клеток периферических лимфоузлов и клеток В- и Т-лимфоидных линий. Иммунопреципитация меченных ^{125}I белков поверхности макрофагов показала, что МАС-1 содержит полипептиды с молекулярной массой 170 и 95 кДа. М1/70 перекрестно реагировали с антигеном, экспрессируемым человеческими моноцитами крови, и в меньшей степени гранулоцитами и природными киллерами. МАС-1 представляет собой удобный маркер для различения макрофагов и лимфоцитов, поскольку его экспрессия не зависит от дифференцировочных сигналов, воспринимаемых макрофагами. Он, например, экспрессируется более чем 86% неактивированных перитонеальных макрофагов, так же как и макрофагами, активированными тиогликолятом, конканавалином А (Кон А), липополисахаридом (ЛПС), *Listeria monocytogenes* или пептоном; во всех случаях популяции макрофагов экспрессируют одинаковое количество МАС-1 на клетку.

Два других структурно отличных антигена макрофагов, МАС-2 и 54-2, по-разному экспрессируются разными популяциями макрофагов [5]. МАС-2 в изобилии выявляется на поверхности макрофагов, активированных тиогликолятом, но не на макрофагах, ничем не активированных или активированных Кон А, ЛПС или *Listeria*. Антиген 54-2 экспрессируется макрофагами, активированными тиогликолятом, макрофагами культивируемого костного мозга, тучными клетками, но не «оседлыми» перитонеальными макрофагами или моноцитами.

Присутствие этого антигена на поверхности макрофагов, активированных другими агентами, не изучалось.

Большое количество мышинных моноклональных антител, реагирующих с неполиморфными антигенами клеток ряда моноцитов-макрофагов, было получено при иммунизации человеческими тканями. Некоторые антигены выявляются у большинства моноцитов, изолированных из периферической крови, в то время как другие характерны для небольших, по-видимому функционально различных, популяций. Многие антитела выявляют антигены, общие для моноцитов и других элементов периферической крови: гранулоцитов, Т-лимфоцитов, тромбоцитов и природных киллеров.

В заключение следует отметить, что пока нет четкого критерия, определяющего, сколько клеток в данной популяции должны быть положительными по данному маркеру, чтобы считать эту популяцию мононуклеарными фагоцитами. Ни один из используемых сейчас маркеров, за исключением разве что некоторых моноклональных антител, не выявляется у 100% клеток. Как указывалось выше, необходимо учитывать стадию клеточной дифференцировки, а также уровень активации. В незрелых клетках некоторые характеристики могут быть выражены слабо или совсем отсутствовать, у активированных клеток эти же свойства могут появляться, усиливаться после активации или, наоборот, исчезать. Моноклональные антитела позволяют идентифицировать антигены, различающиеся у разных членов ряда моноциты — макрофаги. По-видимому, макрофаги, как и лимфоциты, можно подразделять на субпопуляции, различные в антигенном и функциональном отношении.

5.1.2. Тканевые макрофаги

Несколько популяций тканевых макрофагов, потомков мононуклеарных фагоцитов, также были охарактеризованы по поверхностным маркерам и биологическим функциям. В гранулемах обычно обнаруживаются эпителиоидные клетки, которые, по-видимому, образуются из моноцитов крови, активированных в ходе иммунного ответа на чужеродный антиген, например при кожной реакции гиперчувствительности замедленного типа. Эпителиоидные клетки обладают многими морфологическими признаками макрофагов и несут рецепторы Fc и C3. В целом они обладают меньшей фагоцитирующей активностью, чем макрофаги. Другой тип клеток, многоядерные гигантские клетки, образуются, по всей видимости, за счет слияния макрофагов, а не за счет деления ядер в отсутствие цитоплазматического деления. Были идентифицированы два типа таких клеток: клетки Ланганса с относительно небольшим числом ядер на периферии цитоплазмы, и клетки типа инородного тела, у которых множество ядер распределено по всей цитоплазме. Судьба моноцитов, проникающих в участки воспаления, может быть различной: они могут превратиться в оседлые макрофаги, трансформироваться в эпителиоидные клетки или слиться с другими макрофагами и стать многоядерными гигантскими клетками. Когда воспаление спадает, макрофаги исчезают — каким образом, пока неясно. Их число может уменьшаться в результате либо гибели, либо их миграции из участка воспаления.

Купферовские клетки представляют собой оседлые макрофаги печени. Они граничат с кровотоком, что позволяет им постоянно контактировать с чужеродными антигенами и другими иммуностимулирующими агентами. Анатомическое расположение между венами, несущими кровь от желудочно-кишечного тракта, и собственным кровотоком печени приводит к тому, что купфе-

ровские клетки одними из первых в ряду мононуклеарных фагоцитов взаимодействуют с иммуногенами, поглощаемыми из кишечника [6, 7].

Как и другие тканевые макрофаги, купферовские клетки являются долгоживущими потомками моноцитов, которые поселились в печени и дифференцировались в макрофаги. Они живут в печени в среднем около 21 дня. Важнейшая функция купферовских клеток заключается в поглощении и деградации растворенных и нерастворимых материалов в портальной крови. Купферовские клетки играют важнейшую роль в очистке кровотока от множества потенциально вредных биологических материалов, включая бактериальные эндотоксины, микроорганизмы, активированные факторы свертывания и растворимые иммунные комплексы. В соответствии со своей функцией купферовские клетки содержат необычайно большое количество лизосом, содержащих кислые гидролазы и способных к активному внутриклеточному перевариванию.

Ранее считалось, что способность купферовских клеток осуществлять какие-либо функции помимо фагоцитарных относительно мала. Поэтому можно было думать, что, поглощая и переваривая большие потенциально иммуногенные соединения, позволяя оставаться в кровотоке лишь небольшим с трудом поглощаемым фрагментам, купферовские клетки участвуют в создании состояния толерантности. Однако недавние исследования высокоочищенных купферовских клеток *in vitro* показали, что они способны функционировать как антиген-презентирующие клетки во многих известных тестах на способность активировать Т-клетки. Видимо, анатомические и физиологические особенности нормального печеночного микроокружения накладывают ограничения на активность купферовских клеток, не позволяя им участвовать в индукции иммунного ответа *in vivo*.

Альвеолярные макрофаги выстилают альвеолы и являются первыми иммунологически компетентными клетками, поглощающими вдыхаемые патогены. Важно было поэтому выяснить, способны ли к функционированию в качестве вспомогательных клеток макрофаги из такого органа, как легкие, имеющие обширную эпителиальную поверхность, постоянно контактирующую с внешними антигенами [8]. Находящиеся на поверхности альвеол макрофаги идеально расположены для того, чтобы взаимодействовать с антигеном и затем представлять его Т-лимфоцитам. Альвеолярные макрофаги морской свинки оказались весьма активными вспомогательными клетками в тестах на пролиферацию Т-клеток, индуцированную как антигеном, так и митогеном. Затем было показано, что антиген, введенный животному в трахею, может индуцировать первичный иммунный ответ и вызывать избирательное обогащение специфичных к нему Т-клеток в легких [9].

5.1.3. Нефагоцитирующие дендритные вспомогательные клетки

Другая группа клеток, включающая клетки Лангерганса в коже, вуалевые клетки в афферентной лимфе и отростчатые клетки ретикулума в лимфоузлах, не обладает фагоцитарной активностью и поэтому не может быть с уверенностью отнесена к дифференцированному ряду мононуклеарных фагоцитов. Однако, как будет ясно из последующего изложения, эти клетки имеют много общих свойств, указывающих на их тесное родство. Весьма вероятен следующий путь образования этих клеток: моноциты крови → клетки Лангерганса в эпидермисе → вуалевые клетки в афферентной лимфе → отростчатые клетки ретикулума в лимфоузлах.

У всех исследованных видов животных клетки Лангерганса — это единственные клетки эпидермиса, несущие рецепторы Fc-IgG, рецепторы C3 и экспрессирующие антигены Ia [3]. Кроме того, у клеток Лангерганса нет ассоциированных с мембраной поверхностных иммуноглобулинов и маркеров Т-клеток, так что маловероятно их В-клеточное или Т-клеточное происхождение. Клетки Лангерганса имеют морфологию дендритных клеток, светлую цитоплазму и ядро с мелкими лопастями; у них есть также относительно специфичный маркер — расположенная в цитоплазме так называемая гранула Бирбека (Birbeck). Было показано, что у морских свинок клетки Лангерганса представляют собой единственную популяцию клеток, способную заменить Ia-содержащие макрофаги по способности презентировать антигены Т-лимфоцитам.

Отростчатые клетки ретикулума обнаружены в тимусзависимой внутренней части периаартериолярных слоев селезенки, в медуллярной части тимуса и в паракортикальных участках лимфоузлов. Они морфологически сходны с макрофагами, несут антигены Ia, окрашиваются при выявлении АТРаза (как и клетки Лангерганса) и в некоторых случаях содержат гранулы Бирбека. Через 6 недель после перевязки всех афферентных лимфатических сосудов паракортикальные отростчатые клетки ретикулума лимфоузлов исчезают, на основании чего был сделан вывод, что эти клетки возникают из афферентной лимфы. В лимфе, дренирующей кожу, обнаруживаются вуалевые клетки, большие одноядерные клетки с длинными цитоплазматическими отростками — вуалями. Эти клетки могут представлять собой промежуточную стадию дифференцировки между клетками Лангерганса и отростчатыми клетками. После антигенной стимуляции количество отростчатых клеток ретикулума увеличивается, причем быстрый рост их числа наблюдается в кожных лимфатических сосудах и узлах, дренирующих участки с реакцией контактной гиперчувствительности.

Еще один тип клеток, которые можно выделить из описанной группы клеток, — это дендритные клетки, обнаруженные в селезенке и впервые описанные Стейнманом и др. [10]. Эти клетки первоначально были найдены в популяции клеток мышинной селезенки, прикрепляющихся к культуральным сосудам. Они составляют менее 1% общего числа клеток в лимфоидных органах. Дендритные клетки можно отличить от лимфоцитов, поскольку у них нет поверхностных Ig или маркеров Т-клеток и они не реагируют *in vitro* на митогены Т- и В-клеток. Их легко также отличить морфологически от обычных мононуклеарных фагоцитов. Дендритные клетки представляют собой клетки неправильной формы, имеющие множество фазово-контрастных сферических митохондрий и неправильной формы ядра. Макрофаги, напротив, имеют вытянутые митохондрии, много пиноцитозных пузырьков и лизосом, овальное ядро с небольшим количеством гетерохроматина и множество складок на поверхности. Суспендированные дендритные клетки образуют трубчатые или пузырьвидные выросты и (или) длинные тонкие вуалевидные тяжи цитоплазмы. Дендритные клетки постоянно образуют и втягивают цитоплазматические отростки, а их ядра совершают резкие пульсирующие движения. В отличие от дендритных, клетки фагоцитирующие клетки образуют преимущественно складки на поверхности.

У дендритных клеток отсутствуют эндогенная пероксидаза, гранулы гомосидерина, поверхностная АТРаза, неспецифическая эстераза и гранулы Бирбека. Эти клетки не эндоцитируют ни *in vivo*, ни *in vitro* и не могут поглотить опсонизированные частицы. Вдобавок при исследовании с помощью моноклональных антител к Fc-рецептору этот рецептор у них не обнаруживается. Большая часть дендритных клеток элюируется со стеклянных или пластиковых культуральных поверхностей после культивирования в течение 16 ч. Элюиро-

важные дендритные клетки, хотя и сохраняют жизнеспособность, вновь к поверхности прочно не прикрепляются. Макрофаги же способны прочно прикрепляться к стеклу или пластику при пересеве. Культивируемые *in vitro* дендритные клетки сохраняют все особенности своего фенотипа и не превращаются в клетки других типов. Дендритные клетки образуются в костном мозге, причем у бестимусных мышей их количество остается нормальным. В обычных условиях в костном мозге мыши число зрелых дендритных клеток невелико. В селезенке дендритные клетки впервые обнаруживаются на второй неделе жизни, к 6-недельному возрасту их количество достигает того уровня, который поддерживается в течение всей жизни. Для этих клеток характерна высокая скорость обмена: уже через сутки после общего облучения их число заметно снижается. Количество дендритных клеток не увеличивается при иммунизации эритроцитами барана, БЦЖ, или липополисахаридом.

Недавние исследования показали, что дендритные клетки не реагируют с моноклональными антителами анти-МАС-1, которые, как указывалось выше, взаимодействуют со всеми макрофагами. В то же время дендритные клетки экспрессируют общий антиген лейкоцитов в тех же количествах, что и клетки других типов. Этот антиген обнаруживается на всех лейкоцитах, но не на клетках эритроидного ряда, фибробластах, клетках плотных тканей и тромбоцитах. Недавно были получены крысиные моноклональные антитела к дендритным клеткам мыши [11]. Они реагируют с 80—90% дендритных клеток селезенки и лимфатических узлов, но не взаимодействуют с макрофагами из селезенки, брюшной полости или периферической крови, а также с лимфоцитами, гранулоцитами, эритроидными клетками и тромбоцитами.

Дендритные клетки обладают сильным активирующим действием на аллогенную реакцию смешанных лимфоцитов (РСЛ) так же, как и на сингенную РСЛ [12]. Кроме того, они могут в качестве вспомогательных клеток участвовать в образовании антитринитрофенильных цитотоксичных Т-лимфоцитов. Сообщалось также, что они могут активировать пролиферацию иммунных Т-лимфоцитов в ответ на кратковременную инкубацию с растворимыми белковыми антигенами. Интересно, что обработка гетерогенной популяции неразделенных клеток селезенки моноклональными антителами к дендритным клеткам в присутствии комплемента снижает способность к стимуляции РСЛ на 75—90%, что сравнимо с тем действием, которое оказывают антитела к Ia с комплементом. Из этих данных следует вывод, что дендритные клетки, хотя и составляют лишь очень небольшую долю клеток селезенки, могут представлять собой необходимый компонент для стимуляции первичной РСЛ. Этот результат важен также для практики пересадок нелимфоидных трансплантатов. Трансплантат может содержать небольшое число дендритных клеток, запускающих первичную реакцию отторжения. Недавно было показано, что большинство нелимфоидных органов крысы, включая сердце и почки, содержат Ia-положительные клетки, имеющие морфологию дендритных клеток.

Из приведенных данных вытекает, что дендритные клетки образуются, по-видимому, не из моноцитов; в противном случае следовало бы говорить о двух различных путях дифференцировки моноцитов. На одном пути моноциты созревают в тканевые макрофаги, сохраняя весь набор функциональных свойств и свойств поверхности; на другом пути дифференцировки для превращения моноцитов в дендритные клетки их поверхностные и функциональные свойства должны самым существенным образом измениться. С другой стороны, дендритные клетки, клетки Лангерганса, отростчатые клетки ретикулума и вуалевые клетки имеют много общего в морфологии, и все они в большом количестве содержат антигены Ia. Хотя у дендритных клеток нет Fc-рецепторов и C3,

эти маркеры представляют собой динамичные мембранные структуры и их экспрессия может меняться при развитии, дифференцировке и активации лейкоцитов, функционирующих в афферентной фазе иммунного ответа, когда иммунная система приобретает чувствительность к антигену. Одно из важнейших свойств этих клеток — способность презентировать антиген Т-лимфоцитам как *in vivo*, так и *in vitro* — может объясняться их способностью связывать полностью отсутствующей пиоцитозной и фагоцитозной активности.

5.1.4. В-лимфоциты как вспомогательные клетки

Одна из основных теорий, объясняющих взаимодействие Т- и В-клеток, — это теория связи через антигенный мостик. Согласно этой модели, антиген вначале процессируется В-лимфоцитами, а затем презентруется специфическим к носителю хелперным Т-лимфоцитам в комплексе с Ia-молекулами В-клеток. Удивительно поэтому, что обычно, за редкими исключениями, покоящиеся В-лимфоциты оказываются чрезвычайно неэффективными антиген-презентирующими клетками при активации большинства функций Т-лимфоцитов, включая Т-хелперную активность. Недавно, впрочем, было показано, что Барр линии В-клеток человека могут презентировать антиген Т-лимфоцитам [13, 14]. В этих экспериментальных системах не требовалось связывания антигена с В-клетками через иммуноглобулиновый рецептор — одна В-клеточная лимфома могла презентировать Т-клеткам множество не реагирующих перекрестно антигенов. Презентация антигена и аллостимуляция, осуществляемые опухолевой В-клеточной линией, обладали теми же особенностями, что и процессы, осуществляемые обычными вспомогательными клетками типа макрофагов. Презентация антигена антиген-специфическим Т-клеткам опухолевыми клетками была рестриктирована по МНС, и ее можно было подавить, добавляя в культуру моноклональные антитела к Ia. Опухолевые клетки были способны презентировать растворимый антиген даже после кратковременной инкубации с ним, и по своей активности в пересчете на клетку они не отличались от обычных антиген-презентирующих клеток селезенки.

Когда нормальные В-лимфоциты активировали поликлональным В-клеточным митогеном, липополисахаридом (ЛПС), то через 3 суток после стимуляции они презентировали антиген так же эффективно, как и в В-лимфомы [15]. Отсюда можно заключить, что способность В-клеток действовать как антиген-презентирующие клетки может зависеть от стадии их дифференцировки: лимфобласты после трех дней активации липополисахаридом и В-клеточные лимфомы находятся, очевидно, как раз на этой стадии созревания. Способность В-лимфом и В-лимфобластов в отличие от покоящихся В-клеток презентировать растворимые белковые антигены может быть обусловлена тем, что эти клетки могут более эффективно связывать антиген. Не исключено, однако, что покоящиеся В-клетки не способны вырабатывать растворимый фактор, необходимый для активации Т-клеток, такой, как интерлейкин-1, а лимфобласты, находящиеся на более высокой степени дифференцировки, очевидно, способны к синтезу необходимых лимфокинов. Возможен и третий вариант: В-лимфомы и лимфобласты в отличие от покоящихся В-клеток могут осуществлять некий важный этап в процессинге антигена. Четвертая возможность состоит в том, что активированные В-клетки в отличие от покоящихся имеют в мембране какие-то структуры, необходимые для тесного физического взаимодействия В- и Т-клеток.

5.2. Роль вспомогательных клеток в активации лимфоцитов

5.2.1. Антиген-специфическая пролиферация Т-клеток

Необходимость участия макрофагов в активации иммунного ответа впервые была продемонстрирована в опытах *in vitro*. Доступность культуральных методов для измерения индуцируемой антигеном пролиферации Т-клеток и образования антител в смешанных культурах Т- и В-клеток позволила точнее оценить процессы, приводящие к индукции иммунного ответа. Одно из первых наблюдений, свидетельствующих о важной роли макрофагов в активации лимфоцитов, было сделано Оппенгеймом и др. [16]. Они обнаружили, что лимфоциты человека, пропущенные через колонку со стеклянными шариками (в результате чего удаляются клетки, способные прикрепляться к твердым поверхностям), не подвергаются бласт-трансформации, вызываемой такими антигенами, как стрептолизин-О, очищенный белковый компонент туберкулина или оспенная вакцина. Позднее было показано, что аутологичные, способные к прикреплению моноциты восстанавливают чувствительность к антигену лимфоцитов, пропущенных через такую колонку. При этом необходим прямой контакт лимфоцитов и макрофагов: способность макрофагов восстанавливать чувствительность культивируемых лимфоцитов терялась, если их разделяли миллипоровым фильтром. Макрофагам не свойственна иммунологическая специфичность. Выяснилось, что нормальные макрофаги, макрофаги толерантного донора и макрофаги иммунных людей функционируют одинаково хорошо.

Исследования, проведенные на лимфоцитах человека, были повторены Уэлдромом и др. [17] на морских свинках инбредных линий 2 и 13. Схематическое описание этих опытов показано на рис. 5.1. Выяснилось, что первыми клетками, связывающими антиген, в клеточной популяции из лимфоидной ткани являются именно макрофаги, и не составило труда показать, что этот первичный захват антигена макрофагами имеет важное иммунологическое значение. Макрофаги короткое время (15—60 мин) инкубировали с растворимыми белковыми антигенами, затем отмывали от несвязавшегося антигена и помещали в культуру иммунных лимфоцитов. Такие макрофаги индуцировали пролиферативный ответ, гораздо более сильный, чем тот, который наблюдался при добавлении к смешанной культуре лимфоцитов и макрофагов того количества антигена, которое было захвачено макрофагами при кратковременной инкубации. Более того, лимфоциты, аналогичным образом подвергавшиеся импульсному (кратковременному) мечению антигеном, не пролиферировали даже при добавлении

Таблица 5.2. Роль макрофагов в презентации антигена иммунным Т-лимфоцитам [17]

Группа	Т-лимфоциты, иммунизированные ОБПТ	Неиммунные макрофаги	Постоянное присутствие ОБПТ ¹⁾	Включение ³ H-тимидина, имп/мин
I	+	—	—	500
II	+	—	+	500
III	+	+	—	600
IV	+	+	+	8500

¹⁾ ОБПТ — очищенное белковое производное туберкулина.

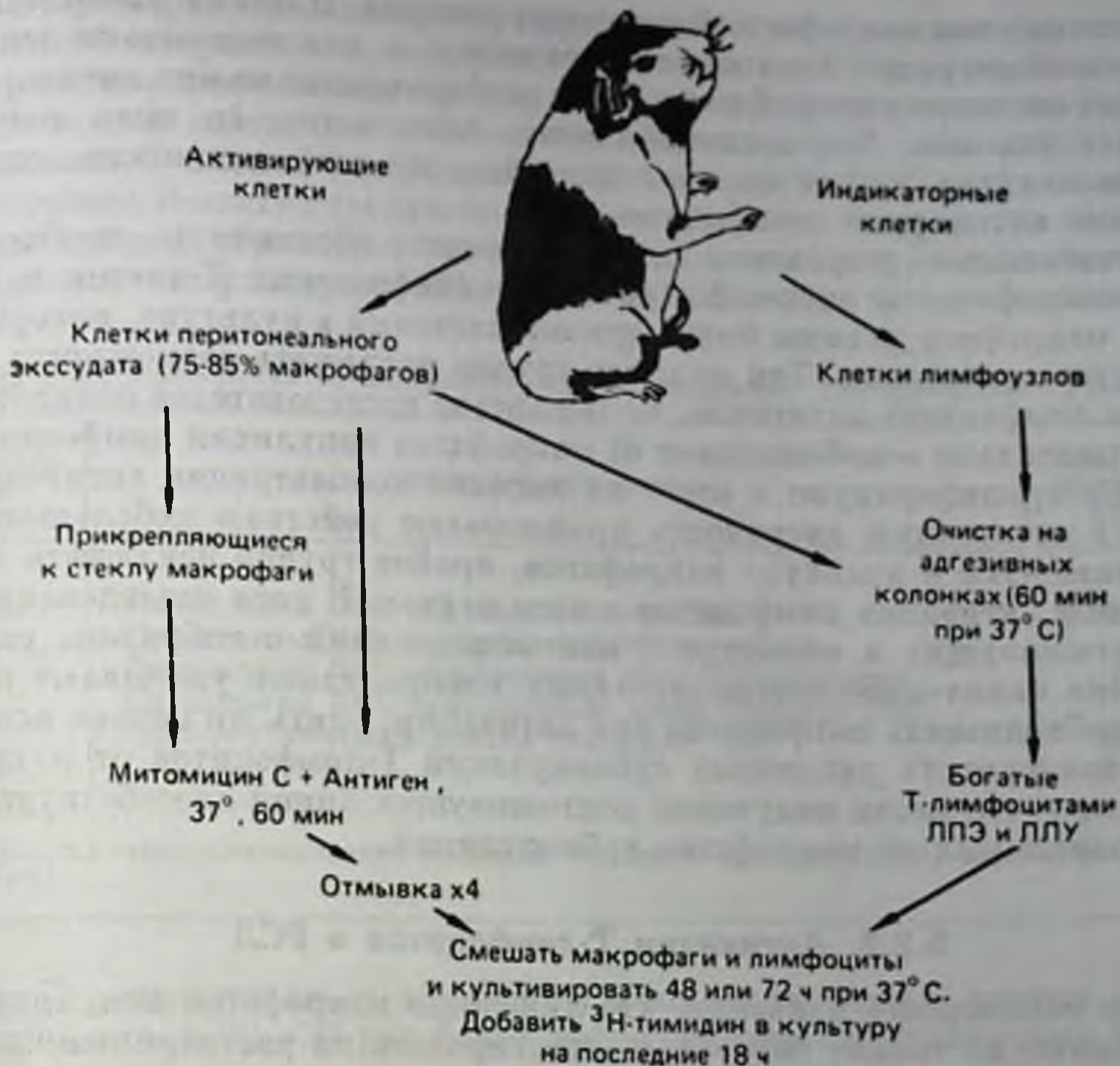


Рис. 5.1. Схема процедуры оценки осуществляемой макрофагами антигенной активации синтеза ДНК в Т-лимфоцитах морской свинки. ЛПЭ — лимфоциты перитонеального

экссудата; ЛЛУ — лимфоциты лимфатических узлов ([35]; печатается с разрешения издательства).

к ним макрофагов (табл. 5.2). Этот последний эксперимент исключает возможность того, что функция макрофагов сводится к поддержанию жизнеспособности клеток. Однако он не исключает предположения о том, что прямой контакт антигена с предполагаемым рецептором Т-лимфоцита вызывает состояние толерантности. Для проверки этого предположения инкубированные с антигеном макрофаги добавляли к контрольным лимфоцитам и лимфоцитам, предварительно инкубированным с антигеном. В обеих популяциях лимфоцитов наблюдалась одинаковая степень активации синтеза ДНК; иными словами, в этих экспериментальных условиях прямой контакт с антигеном не приводил к потере чувствительности у лимфоцитов.

Способность неиммунных макрофагов морской свинки презентировать антиген иммунным Т-клеткам была обычно такой же, как и у макрофагов, полученных от иммунных доноров. Из этого правила обнаружилось одно исключение [18]. Хотя очевидно, что макрофаги могут связывать антиген неиммунным специфическим путем, ясно также, что иммунные макрофаги могут связывать антиген с помощью специфических цитофильных антител, соединенных с ними через Fc-рецепторы. И действительно, оказалось, что в условиях, когда концентрация антигена ограничена, например когда инкубацию макрофагов проводят с антигеном в низкой концентрации, макрофаги иммунных доноров и макрофаги, пассивно нагруженные антиген-специфическими антителами, функционировали

гораздо лучше, чем макрофаги неиммунных доноров. *In vivo* в физиологических условиях концентрация антигена обычно низка, и, как показывают эти опыты, связывание антигена с макрофагами через сорбированные на них антитела может быть более важным, чем неспецифическое связывание. *In vitro* макрофаги, связавшие антиген любым из этих способов, по всей видимости, одинаково эффективно активируют лимфоциты.

Перечисленные результаты демонстрируют абсолютную необходимость участия макрофагов в активации антиген-специфических Т-клеток и показывают, что макрофаги должны быть первыми клетками в культуре, которые взаимодействуют с антигеном. Тем не менее трудно исключить возможность прямой активации лимфоцитов антигеном. Большинство исследователей обнаруживало, что даже тщательно освобожденные от макрофагов популяции лимфоцитов хотя и слабо, но пролиферируют в ответ на высокие концентрации антигена. Хотя обычно эту остаточную активность приписывают действию небольшого количества оставшихся в культуре макрофагов, крайне трудно исключить возможность прямой активации лимфоцитов в этом случае. И хотя исследования активации долгоживущих в культуре Т-клеточных линий и гибридом, растущих в отсутствие каких-либо вспомогательных клеток, также указывают на абсолютную необходимость макрофагов для активации, опять же нельзя исключить того, что зависимость различных субпопуляций Т-лимфоцитов от макрофагов неодинакова и что метод получения долгоживущих линий способствует отбору наиболее зависимых от макрофагов субпопуляций.

5.2.2. Активация Т-лимфоцитов в РСЛ

Ранее наблюдения показали, что лишенные макрофагов популяции лимфоцитов теряют не только способность реагировать на растворимые антигены, но и способность реагировать в смешанной культуре лейкоцитов, причем обе способности восстанавливаются при добавлении макрофагов. Проанализировать роль макрофагов в РСЛ крайне важно, поскольку она, видимо, представляет собой более прямой механизм активации Т-клеток, чем активация под действием митогенов и антигенов. Во многих ранних работах предполагалось, что презентации аллоантигенов макрофагами для РСЛ не требуется, поскольку иммунный ответ в лишенной макрофагов однонаправленной РСЛ мог быть восстановлен одинаково эффективно макрофагами как стимулирующей, так и реагирующей линий. Более тщательный анализ роли макрофагов в РСЛ как на клетках человека, так и на клетках морской свинки показал, что макрофаги в 10—80 раз более эффективно, чем очищенные лимфоциты, стимулируют аллогенную пролиферацию Т-клеток [19]. В исследованиях на морских свинках было показано, что реакция на аллогенные Т-лимфоциты может быть восстановлена только аллогенными макрофагами, а не макрофагами, сингенными реагирующим Т-клеткам, что свидетельствует о малой роли Т-лимфоцитов в стимуляции РСЛ.

Одной из возможных причин способности макрофагов функционировать в качестве единственных стимуляторов РСЛ может быть то, что это единственная популяция среди стимулирующих клеток, которая несет необходимые антигены гистосовместимости. В исследованиях на мышах было показано, что детерминанты, стимулирующие РСЛ, представляют собой антигены, ассоциированные с I-районом (Ia), которые экспрессируются главным образом на клетках, отличных от Т-лимфоцитов. Обработка популяции этих клеток антителами к Ia и компонентом значительно снижала стимулирующую активность. Природа и свойства стимулирующих клеток остаются предметом разногласий.

В некоторых работах делается вывод, что Т-клетки распознают закодированные в МНС детерминанты, экспрессирующиеся на В-клетках. Более недавние эксперименты показывают, однако, что Т-клетки распознают не В-клетки, а вспомогательные клетки, не относящиеся ни к классу Т, ни к классу В [20]. Как очищенные Т-клетки (неприкрепляющиеся к найлону клетки селезенки), так и очищенные В-клетки (полученные путем удаления макрофагов на колонке G10 с последующей обработкой антителами к Т-клеткам и комплементом) оказались слабыми стимуляторами РСЛ (табл. 5.3). В то же время не относящиеся

Таблица 5.3. Способность субпопуляций клеток селезенки стимулировать РСЛ [20]

Реагирующие клетки	Стимулирующие клетки	Включение ³ H-тимидина, имп/мин
Спленоциты B10.BR	Спленоциты B10, нефракционированные	59 932 ¹⁾
	Спленоциты B10, пропущенные через пайлон	7059
	Спленоциты B10, обработанные анти-Т-антителами	50 317
	Спленоциты B10, пропущенные через сефадекс G10	6151
	Прикрепляющиеся клетки селезенки B10	165 182

1) Реакция на субпопуляции клеток селезенки сингенных мышей (B10.BR) варьирует от 1000 до 6000 имп/мин.

к классу Т резистентные к облучению прикрепляющиеся клетки селезенки (ПКС) оказались в 20—50 раз более эффективными стимуляторами РСЛ, чем неочищенные клетки селезенки, и они-то, по всей видимости, и являются основными стимулирующими клетками в популяции клеток селезенки (спленоцитов). Мышиные ПКС, как оказалось, экспрессируют антигены Ia, закодированные как в I-A-, так и в I-E-районах.

Природа специфических стимулирующих клеток в популяции ПКС неясна. Эта популяция содержит 50—80% клеток, поглощающих латексные шарики, 8—15% нефагоцитирующих клеток, несущих иммуноглобулины, менее 1% Т-клеток и небольшое число нуль-клеток, не реагирующих с проверенными антителами. Стейнман и Уитмер [12] показали, что прикрепляющиеся, не относящиеся к Т-клеткам нефагоцитирующие и не несущие поверхностных иммуноглобулинов Ia-положительные селезеночные дендритные клетки являются сильными стимуляторами РСЛ и по крайней мере в 100 раз более эффективны, чем другие основные субклассы клеток. Соответствуют ли дендритные клетки эффективным стимулирующим клеткам в популяции ПКС, неясно. Добавление ПКС, сингенных реагирующим клеткам, не восстанавливает их реакцию на стимулирующую популяцию, лишенную прикрепляющихся клеток, т. е. ПКС выполняют не просто вспомогательную функцию. Нельзя, однако, исключить того, что РСЛ стимулируют не только ПКС, но и другие клетки, но делают это только в присутствии соответствующих ПКС. В этом случае ПКС могут выполнять и вспомогательную функцию в дополнение к своей уже доказанной стимулирующей функции. Таким образом, если аллореактивная Т-клетка и способна распознавать Ia на В-клетках, то это распознавание происходит только в присутствии аллогенных ПКС. Весьма вероятно, что ПКС генерируют некий сигнал, необходимый реагирующей популяции Т-клеток, чтобы они могли распознавать детерминанты I-района на В-клетках.

Учитывая, что продукты I-района являются основными стимулирующими детерминантами РСЛ из всего H-2-комплекса, не удивительно, что клетки, стимулирующие РСЛ, должны быть Ia-положительными. Интересно в этой связи было выяснить, какие клетки стимулируют ответ на аллоантигены, закодированные отдельно в K- или D-районе H-2, или же на аллоантигены, закодированные в Mls [21]. Как ни странно, популяции лимфоцитов, лишённые прикрепляющихся клеток, в том числе обогащенные субпопуляции T- и B-лимфоцитов, слабо стимулировали РСЛ в ответ на различия по K-, D- или Mls-районам. В то же время Ia-положительные ПКС оказались сильными стимуляторами во всех трех случаях. И напротив, при различиях по K- или D-району Ia-негативные ПКС теряли способность стимулировать образование аллогенных цитотоксических T-лимфоцитов в той же популяции реагирующих клеток. Таким образом, Ia-положительные прикрепляющиеся клетки являются основными стимуляторами T-клеточного пролиферативного ответа на различия в аллоантигенах независимо от того, затрагивают ли эти различия детерминанты, закодированные в I-районе или других районах MHC.

Исходя из этих результатов, можно предположить, что чужеродные аллодетерминанты, в том числе закодированные в Mls, K или D, могут распознаваться T-клетками только в сочетании с собственными антигенами Ia. Некоторые исследования показывают, что при распознавании T-клетками чужеродных детерминант Mls необходимо окружение собственных Ia, хотя этот результат и подвергается сомнению. Если распознавание T-клетками Mls требует совместного распознавания Mls и Ia, то можно предположить, что стимуляция продуктами генов K или D, расположенными на Ia-положительных ПКС, также включает совместное распознавание этих продуктов и собственных Ia. B-клетки, несущие продукты генов K, D, Mls и Ia, являются, однако, очень слабыми стимуляторами. Общий вывод, который можно сделать из всей этой совокупности данных, заключается в том, что для активации T-клеток в РСЛ требуются не только аллоантигены и детерминанты Ia, но и дополнительные сигналы или особые способы презентации аллоантигенов, которые пока плохо изучены. Возможно, они обеспечиваются одной или несколькими функционально уникальными популяциями Ia-положительных прикрепляющихся клеток.

5.2.3. Активация T-клеток, индуцированная митогенами

Поскольку митогены в отличие от растворимых белковых антигенов могут прочно связываться с поверхностью реагирующих T-клеток, естественно предположить, что эти агенты способны активировать T-клетки без участия вспомогательных клеток. Хотя множество ранних исследований показывало, что лимфоциты, освобожденные от макрофагов, полностью сохраняют способность отвечать на митогены, сейчас уже есть основания думать, что это объяснялось, по всей видимости, неполным удалением макрофагов. Левис и Робинс [22] первыми показали, что бластогенный ответ человеческих клеток на различные дозы фитогемагглютинаина (ФГА) заметно снижается после удаления прикрепляющихся клеток с помощью двухступенчатой процедуры, включающей пропускание через колонку с нейлоновой ватой и последующую инкубацию на большой стеклянной поверхности. Пролиферативный ответ восстанавливался после добавления аутологичных или аллогенных макрофагов.

Эти исследования были продолжены на морских свинках [23]. Клетки лимфатических узлов очищали, пропуская через колонку с нейлоновой ватой и мелкими стеклянными шариками, а затем через вторую колонку с нейлоновой

ватой. Т-лимфоциты получали медленной элюцией клеток со второй колонки. Только 0,3% элюируемых клеток относились к макрофагам, которые идентифицировали по поглощению частиц латекса или наличию неспецифической эстеразы. Менее 2% элюируемых клеток составляли В-клетки. Их обнаруживали по наличию поверхностных иммуноглобулинов и рецепторов СЗ. Когда такие очищенные Т-клетки культивировали с Кон А или ФГА, то они никак не реагировали на присутствие этих митогенов. Когда же к этим Т-клеткам добавили 20% сингенных облученных макрофагов, они стали сильнейшим образом отвечать на оба митогена. Вспомогательными клетками могли быть не только сингенные макрофаги — аллогенные макрофаги были столь же эффективны. Более того, жизнеспособность покоящихся лимфоцитов и их функциональные свойства поддерживались добавлением в среду 2-меркаптоэтанола столь же эффективно, как и добавлением макрофагов. В то же время этот восстанавливающий агент не увеличивал ответа лимфоцитов на митоген. Описанные результаты не оставляют сомнения в том, что индуцированная митогеном активация Т-лимфоцитов зависит от макрофагов.

Макрофаги играют также важную роль в реакции Т-лимфоцитов на клетки, поверхность которых модифицирована химическими агентами и ферментами [24]. Образование на поверхности лимфоцитов альдегидных групп при мягкой обработке метапериодатом натрия (NaIO_4) или при последовательной инкубации с нейраминидазой и галактозооксидазой приводит к интенсивному бластогенезу у лимфоцитов некоторых видов. Макрофаги оказались необходимы для получения бласт-трансформации под влиянием как NaIO_4 , так и смеси ферментов. Если обрабатывались очищенные Т-лимфоциты, то образования бластов не происходило, пока в культуру не добавляли нормальные немодифицированные макрофаги. Если же обрабатывали макрофаги, то на их поверхности появлялись альдегидные группы, которые затем запускали пролиферацию добавляемых к ним нормальных Т-лимфоцитов. Необходимость в макрофагах специфична и не сводится к увеличению жизнеспособности лимфоцитов: ни фибробласты, ни 2-меркаптоэтанол, хотя и поддерживали жизнеспособность лимфоцитов в этих культурах, не могли заменить макрофагов. Индуцированная альдегидами пролиферация лимфоцитов возникала при использовании как сингенных, так и аллогенных макрофагов.

Хотя вспомогательные клетки были необходимы для поддержания пролиферации, индуцированной как антигеном, так и митогеном, между этими двумя случаями выявилось и одно существенное различие [24]. Если макрофаги предварительно инкубировать с митогеном ФГА, а затем добавить в культуру к нормальным Т-лимфоцитам, то они чрезвычайно эффективно стимулируют пролиферативную реакцию. В противоположность тому, что было продемонстрировано в опытах с Т-лимфоцитами, предварительно инкубированными с антигеном (табл. 5.4), Т-лимфоциты, обработанные ФГА, оказываются способны к пролиферации даже при добавлении свежих, ничем не меченных макрофагов. Очевидно, ФГА непосредственно связывается с поверхностью Т-клетки, но для ее активации необходим дополнительный сигнал, сообщаемый макрофагами. Необходимо было выяснить, является ли этот сигнал растворимым фактором, выделяемым макрофагами, или же для активации необходим контакт лимфоцита с макрофагом. Легко показать, что пролиферативную реакцию можно восстановить с помощью фактора, выделяемого нестимулированными макрофагами и имеющего биохимические свойства интерлейкина-1 (ИЛ-1). Напрашивается вывод, что в условиях, когда стимулятор связывается непосредственно с Т-клеткой, единственной функцией макрофагов является выделение растворимого фактора, такого, как ИЛ-1, действующего в качестве второго сигнала.

Таблица 5.4. Восстановление пролиферативной реакции Т-лимфоцитов, инкубированных с ФГА, при добавлении макрофагов или ИЛ-1 [23]

Реагирующие клетки	Добавлено	Включение ³ H-тимидина, имп/мин	
		без ФГА	в присутствии ФГА
Т-лимфоциты	—	96	342
	Макрофаги ИЛ-1	320	13 572
Т-лимфоциты, инкубированные с ФГА	—	170	15 990
	Макрофаги	915	928
	ИЛ-1	31 330	38 177
		7468	7853

Свойства клеток, способствующих осуществлению индуцированной митогеном пролиферативной реакции, были проанализированы в нескольких исследованиях на мышах. Хэбу и Рафф [25] показали, что мышинные лимфоидные клетки, тщательно очищенные от макрофагов, не размножаются при культивировании с Кон А и что пролиферативная реакция может быть восстановлена при добавлении всего лишь 1% клеток брюшной полости, имеющих фенотип Thy-1⁻Ia⁺. Более того, обработка клеток селезенки антителами к Ia и комплементом значительно подавляет пролиферативный ответ на Кон А. Роль Ia-положительных вспомогательных клеток была также доказана в опытах, где к культуре клеток селезенки, обработанной антителами к Ia, добавляли прикрепляющиеся к стеклу клетки, не относящиеся к классу Т (не-Т), облученные в дозе 1000 рад, и обнаружили, что эти клетки восстанавливали пролиферативную реакцию на Кон А (табл. 5.5). В то же время популяция, обогащенная Т-клет-

Таблица 5.5. Восстановление пролиферативного ответа на Кон А Ia-содержащими прикрепляющимися клетками селезенки (ПКС) [26]

Обработка реагирующих клеток селезенки 1)	ПКС	Обработка ПКС	Включение ³ H-тимидина, имп/мин
—	—	—	42 000
Анти-Ia + К	—	—	2000
Анти-Ia + К	+	—	90 000
Анти-Ia + К	+	Анти-Ia + К	9000

1) К — комплемент.

ками, не обладала такой активностью [26]. Отсюда следует, что мишенями действия антител к Ia и комплемента при подавлении ими чувствительности к Кон А являются Ia-положительные ПКС, не относящиеся к классу Т.

Эти данные показывают также, что Ia-молекулы на вспомогательных клетках, взаимодействующих с Т-клетками, играют роль в активации Т-клеток в отсутствие какой-либо МНС-рестрикции, выявляющейся при реакции на антиген. Если единственной функцией вспомогательных клеток при ответе на митоген является образование растворимых факторов, как это вытекает из данных, приведенных в табл. 5.4, то для чего нужны Ia-положительные вспомо-

гательные клетки — ведь ИЛ-1 могут синтезировать не только клетки Ia⁺, но и клетки Ia⁻? Возможно, Ia-антигены играют не только роль элементов рестрикции при взаимодействии Т-клеток и вспомогательных клеток (см. гл. 15), но и служат индукторами образования растворимых факторов вспомогательными клетками, передают вспомогательным клеткам индуктивный сигнал ИЛ-1 или активируют Т-клетки к продуцированию ИЛ-1 [27, 28].

5.2.4. Взаимодействие вспомогательных клеток с Т-хелперами

Необходимость участия макрофагов в активации образования антител была впервые доказана Мозье в 1967 г. [29]. Он разделял клетки селезенки неиммунных мышей на прикрепляющиеся и неприкрепляющиеся популяции, сорбируя макрофаги на серии пластиковых чашек Петри. Ни одна из популяций в отдельности не давала бляшкообразующих клеток, синтезирующих IgM, в ответ на эритроциты барана, в то время как макрофаги и лимфоидные клетки, соединенные вместе, реагировали так же хорошо, как и исходная суспензия клеток селезенки. Эти эксперименты были подтверждены; сходные результаты были получены на других Т-зависимых антигенах, таких, как конъюгаты гаптен-белки, вирусы и синтетические полимеры аминокислот. Макрофаги мышей, лишенных Т-клеток, или мышей со специфической толерантностью к использованному антигену обеспечивают образование антител *in vitro* нормальными лимфоидными клетками так же эффективно, как и макрофаги нормальных мышей. В специальных экспериментах было показано, что макрофаги не являются ни продуцентами антител, ни предшественниками образующих их клеток.

Хотя относительно просто показать, что макрофаги необходимы для образования бляшкообразующих клеток, синтезирующих IgM, IgG и IgA, при первичном ответе на Т-зависимые антигены *in vitro*, пока неясно, нужны ли макрофаги для образования антител *in vitro* лимфоидными клетками из селезенки предварительно иммунизированных мышей. Ранние эксперименты показали, что после примирования антигеном лимфоидные клетки становятся менее зависимыми от макрофагов, — вторичный иммунный ответ может развиваться и в их отсутствие [30]. Пониженная зависимость от макрофагов появлялась лишь через 7—10 дней после иммунизации, но сохранялась при однократном введении антигена по меньшей мере в течение одного года. Эти данные были подтверждены рядом исследователей, показавших также, что на результаты оказывают существенное влияние плотность культуры и форма культуральных сосудов. Так, в культурах с высокой плотностью клеток макрофаги вообще не требовались. В других исследованиях, в которых применялись более жесткие методы удаления макрофагов, например обработка сывороткой против макрофагов и комплементом, была установлена необходимость макрофагов для развития вторичного иммунного ответа лимфоидными клетками примированных мышей. Полного согласия в этом вопросе так и не было достигнуто, и, по-видимому, правильным выводом будет то, что лимфоидные клетки иммунизированных животных в меньшей степени зависят от макрофагов для развития иммунного ответа *in vitro*, чем клетки нормальных неиммунизированных мышей. Объясняется это, возможно, тем, что активированные В-лимфоциты в отличие от девственных В-лимфоцитов могут сами стимулировать иммунные Т-хелперные клетки без участия макрофагов. Возможно, наиболее эффективный, хотя несомненно не единственный, путь активации Т-хелперов при вторичном иммунном ответе заключается в прямой презентации Т-хелперной клетке антигена, связанного с примированной антиген-специфической В-клеткой, и последующей

активации дифференцировки В-клетки в непосредственной близости от Т-хелпера.

Мы уже упоминали о способности макрофагов поддерживать жизнь других клеток и предполагали, что эта их «питающая» роль отличается от специфических функций макрофагов в презентации антигена Т-лимфоцитам. Хотя уже давно известно, что в отсутствие макрофагов в лимфоидных клетках не только не появляется бляшкообразующих клеток, но и снижается их жизнеспособность, первое прямое доказательство наличия у макрофагов функции поддержания жизнеспособности получили Чен и Хирш в 1972 г. [31]. По их данным, SH-реагент 2-меркаптоэтанол заменял макрофаги при ответе селезеночных лимфоидных клеток на бараньи эритроциты. Эти данные нашли подтверждение в опытах Пирса и др. [96], показавших, что добавление 2-меркаптоэтанолу для макрофагов к культуре неприкрепляющихся лимфоидных клеток приводит к одинаковой выживаемости. В отличие от Чена и Хирша они, однако, обнаружили, что появление бляшкообразующих клеток в культуре лимфоцитов с 2-меркаптоэтанолом хотя и было заметным, но не шло ни в какое сравнение с тем случаем, когда к культуре лимфоидных клеток добавляли макрофаги. Таким образом, хотя 2-меркаптоэтанол повышает жизнеспособность лимфоцитов в культуре не хуже, чем макрофаги, ясно, что всех функций макрофагов он заменить не может. Следует, кроме того, заметить, что даже наиболее скрупулезно очищенные от макрофагов лимфоидные популяции селезенки, не дающие реакции образования антител, на самом деле не свободны от макрофагов. Возможно, что число макрофагов, присутствующих в такой лимфоидной популяции, достаточно для презентации ими антигена, но недостаточно для поддержания жизнеспособности. В результате даже при оптимальной концентрации антигена в такой культуре не развивается иммунный ответ, так как Т-клетки погибают, не успев выполнить своих функций. Действие меркаптоэтанол может заключаться в том, что он повышает жизнеспособность, а макрофаги, присутствующие в достаточном для этого количестве, представляют антиген Т-лимфоцитам и индуцируют активность Т-хелперов.

5.2.5. Взаимодействие вспомогательных клеток с В-клетками

Общее заключение, которое можно вывести из приведенных выше данных, сводится к тому, что функция вспомогательных клеток — это презентация антигена Т-лимфоцитам и обеспечение тем самым образования антител на тимус-зависимые антигены. В литературе о роли вспомогательных клеток в индукции иммунного ответа *in vitro* тимуснезависимыми антигенами имелась тенденция уменьшить значение вспомогательных клеток или по крайней мере свести его к обеспечиваемому также 2-меркаптоэтанолом повышению жизнеспособности или к выработке факторов или других клеточных продуктов, стимулирующих В-клетки неспецифично. Оказалось, например, что после удаления прикрепляющихся клеток на колонке и обработки сывороткой против макрофагов В-клетки активировались тимуснезависимым антигеном, полимеризованным флагеллином, совершенно нормально, хотя эта же популяция клеток переставала реагировать на бараньи эритроциты. В других работах, где использовались различные тимуснезависимые антигены, такие, как липополисахарид, фосфорилхолиновая детерминанта пневмококков и динитрофенилфиколл, также было показано, что лишенные макрофагов лимфоидные клетки реагируют с образующим антител практически так же, как и нефракционированные клетки селезенки. Из этих экспериментов следовал вывод, что любой тимуснезависимый

антиген не зависит также и от макрофагов. В связи с этим вновь следует подчеркнуть, что технически крайне трудно получить В-лимфоциты, свободные от макрофагов, и ни одна из использованных популяций лимфоидных клеток не была полностью лишена макрофагов. Кроме того, в некоторых случаях удаление макрофагов, хотя и не подавляло полностью, но все же уменьшало реакцию на тимуснезависимые антигены. Крайне трудно поэтому исключить ту возможность, что для образования антител в ответ на тимуснезависимые антигены макрофаги необходимы, и их небольшого количества, остающегося в популяции В-лимфоцитов, для этого вполне достаточно, хотя их и не хватает для реакции на тимусзависимые антигены.

За последние несколько лет во многих работах был вновь поднят вопрос о возможной роли вспомогательных клеток в иммунном ответе на некоторые тимуснезависимые антигены [32]. В этих работах было показано, что функция вспомогательных клеток при ответе на Т-независимый антиген может заключаться в презентации антигена непосредственно В-клеткам. Так, например, пропускание клеток селезенки через колонку с сефадексом G10 подавляло их реакцию на тринитрофенильные (ТНФ) производные: ТНФ-леван, ТНФ-декстран и ТНФ-фиколл, хотя культивирование клеток проводилось в присутствии 2-меркаптоэтанола. Добавление к клеткам, пропущенным через сефадекс G10, прикрепляющихся вспомогательных клеток восстанавливало реакцию на все три антигена, а предобработка вспомогательных клеток сывороткой против Ia и комплементом подавляла их активность.

Взаимодействие В-клеток со вспомогательными клетками приводило к избирательной активации тех В-клеток, которые несут поверхностный антиген Lyb5 (см. гл. 3): удаление этой популяции клеток антисывороткой к Lyb5 и комплементом избирательно подавляло реакцию только на те тимуснезависимые антигены, для которых были необходимы вспомогательные клетки (ТНФ-фиколл, но не ТНФ-*Brucella abortus* или ТНФ-липополисахарид). Возможно, наблюдаемое взаимодействие между вспомогательными клетками и В-клетками Lyb5⁺ происходит не только при реакции на тимуснезависимые антигены, но также при активации В-клеток во время первичного иммунного ответа, зависящего от Т-хелперов, например при реакции на ТНФ-гемоцианин фиссулярии (ТНФ-KLN).

Представление о том, что вспомогательные клетки непосредственно взаимодействуют как с Т-хелперными клетками, так и с В-клетками и функционируют в качестве промежуточного звена между двумя классами лимфоцитов, может объяснить, каким образом слабые Т-клеточные сигналы переносятся В-клеткам. Неясно, почему экспрессия детерминанты Lyb5 характерна для субпопуляции В-клеток, реагирующей на активационные сигналы вспомогательных клеток, но, возможно, это связано с тем, что эта детерминанта экспрессируется В-клетками, появляющимися на поздних стадиях развития организма. Иными словами, способность В-клеток реагировать на активационные сигналы вспомогательных клеток может приобретаться по мере того, как В-клетки созревают и дифференцируются. При обсуждении взаимодействия вспомогательных клеток с В-клетками следует проявить некоторую осторожность. Не исключено, что в реакции на некоторые тимуснезависимые антигены, особенно антигены класса 2, участвуют также Т-клетки. Соответственно необходимость участия вспомогательных клеток типа Ia⁺ в реакции на эти антигены на самом деле может означать необходимость взаимодействия небольшого числа Т-клеток с антиген-презентирующими Ia⁺-клетками.

Интенсивно исследовалась также роль вспомогательных клеток в пролиферативной реакции В-лимфоцитов на различные митогены. Было установлено,

что активация В-лимфоцитов не зависит от макрофагов и что макрофаги даже подавляют пролиферацию, индуцированную липополисахаридом [97]. Было также показано, что такая пролиферация В-клеток регулируется в некоторых случаях Т-клетками. С другой стороны, сообщалось, что и макрофаги, и Т-клетки необходимы для реакции на липополисахарид: при концентрации клеток меньше 10^4 /мл реакция на липополисахарид отсутствовала, если в культуру не добавляли большое количество тимоцитов в качестве фидерных клеток (клеток-кормилиц). Роль вспомогательных клеток в пролиферативной реакции на митогены: липополисахарид и декстрансульфат — изучали, культивируя одиночные В-лимфоциты в плашках Терасаки [33]. Комбинация этих В-клеточных митогенов стимулировала пролиферацию изол: рованных клеток, и для реакции не требовались ни дополнительные (filler) клетки, ни кондиционированная среда. Из этих результатов был сделан вывод, что клональный рост В-клеток может быть активирован и в отсутствие каких-либо вспомогательных клеток.

Прролиферативная реакция В-лимфоцитов на анти-Ig-реагенты (антитела к Ig) также оказалась практически не зависящей от макрофагов [34]. Удаление прикрепляющихся клеток с помощью сефадекса G10 или обработки карбонильным железом с последующим приложением магнитного поля не уменьшало способности клеток реагировать на антитела к Ig. Напротив, при культивировании лишенных фагоцитов клеточных популяций с небольшой плотностью их реакция на антитела к Ig M была даже выше, чем у нефракционированной популяции клеток селезенки. Более того, когда В-лимфоциты избирательно выделяли на флуоресцентном сортере клеток, то, будучи свободными как от макрофагов, так и от Т-лимфоцитов, они тем не менее хорошо реагировали на стимуляцию антителами к IgM. Таким образом, общий вывод, который можно сделать на основании приведенных результатов, заключается в том, что митогенные реакции В-клеток на поликлональные В-клеточные активаторы не нуждаются во вспомогательных клетках. Однако, как уже не раз отмечалось в ходе этого обсуждения, крайне трудно исключить необходимость в очень небольшом числе таких клеток. Следует подчеркнуть, что если вспомогательные клетки и играют какую-то роль в активации размножения В-клеток, то она сводится прежде всего к поддержанию их жизнеспособности. В большинстве исследований, свидетельствующих о необходимости вспомогательных клеток, клетки культивировали в отсутствие 2-меркаптоэтанола. С другой стороны, не была с определенностью исключена возможная роль вспомогательных клеток в предоставлении В-клеткам необходимого второго активационного сигнала типа монокина ИЛ-1 подобно тому, что описано для Т-клеток. В действительности из проведенных недавно исследований вытекает, что ИЛ-1 играет, очевидно, важную роль в активации В-клеток антителами к IgM.

5.3. МНС-рестрикция при взаимодействии макрофагов с Т-лимфоцитами

МНС-рестрикция при взаимодействии между инкубированными с антигеном макрофагами и иммунизированными *in vivo* Т-лимфоцитами была впервые продемонстрирована на морских свинках [35, 36]. Позднее это нашло подтверждение в опытах на мышах, где благодаря изученности мышинного H-2 и наличию большого числа инбредных линий был проведен тщательный генетический анализ [37]. Роль функционирования гена *Ig* у антиген-презентирующих макрофагов была впервые продемонстрирована в опытах, показавших, что макрофаги

морской свинки, лишенной данного гена *Ig* (нереагирующая), не способны активировать пролиферацию Т-клеток гибрида (нереагирующая х реагирующая) F_1 [36]. Возможная роль макрофагов в осуществлении специфической функции гена *Ig* нашла подтверждение в опытах Розенталя и соавторов [38, 39], доказавших, что макрофаги способны проводить различие между двумя разными детерминантами, находящимися на одной молекуле антигена. Этот аспект проблемы подробно обсуждается в гл. 15 и 16.

Из исследований взаимодействия *in vitro* макрофагов с лимфоцитами вытекает, что генетические ограничения частично, если не полностью, возникают в процессе примирования антигеном. В опытах на морских свинках оказалось довольно легко примировать Т-лимфоциты *in vitro*, добавляя к ним инкубированные с антигеном сингенные макрофаги или же инкубированные с антигеном аллогенные макрофаги, предварительно удалив аллореактивные Т-клетки [40, 41]. Из этих результатов был сделан вывод, что Т-клетки сенсибилизируются антигеном, ассоциированным с аллогенными макрофагами, так же легко, как и антигеном, ассоциированным с сингенными макрофагами. Недавно с помощью этого подхода в опытах на мышах [42] и морских свинках [43] был исследован вопрос, вызвана ли неспособность отвечать на антиген неспособностью к его презентации. В целом исследования на этих двух видах показали, что макрофаги от животных с нереагирующими гаплотипами были вполне способны представлять антиген реагирующей популяции Т-клеток. Таким образом, эти наблюдения прямо противоречат тем моделям функционирования генов *Ig*, в которых неспособность реагировать объясняют неспособностью презентировать антиген (см. гл. 16, где это обсуждается более подробно).

5.4. Превращения антигена в макрофагах

Важнейший вопрос, на который должны ответить исследования процесса сдвига антигена в макрофагах, заключается о том, как соотносятся процессинг антигена и иммуногенные детерминанты, распознаваемые Т-лимфоцитами. Мы детально рассмотрим три различных подхода к этой проблеме: а) установление корреляции между метаболизмом меченого антигена в макрофагах и иммуногенностью как *in vivo*, так и *in vitro*; б) попытки модифицировать процесс презентации антигена обработкой поверхности макрофагов протеиназами, различными фармакологическими ингибиторами или же антителами к использованному антигену или Ia-антигенам; и в) исследование растворимых продуктов распада антигена, выделяемых макрофагами.

5.4.1. Исследования *in vivo*

В конце 60-х — начале 70-х гг. в большинстве работ, посвященных функционированию макрофагов, использовалась модель иммуногенности макрофагов *in vivo*. Макрофаги инкубировали с радиоактивно меченым антигеном (например, с ^{131}I -гемоцианином) и через разное время после инкубации вводили сингенным реципиентам, исследуя их способность индуцировать синтез антител [44, 45]. Часть макрофагов инкубировали *in vitro*, и через разное время определяли количество ^{131}I -меченого антигена, остающегося в клетках или выделяемого в среду. Антигены вначале связывались с клеточной поверхностью, а затем поглощались в составе мембранных пузырьков и быстро подвергались катаболизму. Около 80% антигена, первоначально связавшегося с клеткой, деградировало; большая часть катаболизированного антигена позднее обнаружи-

Таблица 5.6. Судьба ^{131}I -гемоцианина после поглощения макрофагами ¹⁾ [45]

Время	Гемоцианин, связанный с клетками		Гемоцианин в культуральной среде	
	общее содержание метки, %	содержание метки в ТХУ-нерастворимой фракции, %	общее содержание метки, %	содержание метки в ТХУ-нерастворимой фракции, %
0	100	60—70	0	—
2	20—30	50	70—80	14—20
4	9—14	60—75	86—91	10—14
21	9—14	60—75	86—91	10—14

¹⁾ Макрофаги подвергали воздействию ^{131}I -гемоцианин *in vivo* (100%), а затем культивировали разное время *in vitro*.

валась в культуральной среде в виде ^{131}I -аминокислот (табл. 5.6). В то же время оставшиеся 20% связанного клетками антигена избегали первоначальной деградации и оставались ассоциированными с клетками.

Связанный с клетками пул можно было разделить на три фракции (табл. 5.7) От 3 до 7% исходно связавшегося с клетками белка выделялись макрофагами

Таблица 5.7. Судьба антигена в макрофагах ¹⁾ [46]

Время (часы)	Содержание метки, %		
	в культуральной среде ²⁾	в клетках ³⁾	на мембране ⁴⁾
24	94/13	4,1	1,8
48	96/11	2,9	0,7
72	97/12	2,1	0,6

¹⁾ Макрофаги инкубировали с меченым ^{125}I сывороточным альбумином человека, а затем отмывали.

²⁾ Доля метки в культуральной среде от всей метки/процент метки в культуральной среде, осаждаемой 20% ТХУ.

³⁾ Доля метки, связанной с клетками и не удаляемой трипсином.

⁴⁾ Доля метки, связанной с клетками и удаляемой трипсином.

в среду. Появление этих продуктов не было связано с отщеплением гемоцианина, ассоциированного с клеточной поверхностью, поскольку их образование не подавлялось обработкой поверхности макрофагов трипсином. В то же время эти продукты были гетерогенны по размеру, что указывает на вызванные макрофагами изменения в строении молекулы. Большая часть выделяемого материала сохраняла способность реагировать с антителами. Секретия антигена происходила преимущественно в первые два часа после его поглощения. Из макрофагов также медленно выделялось небольшое количество антигена, столь же иммуногенного, как и нативная молекула. Возможно, эта часть секретируемого антигена возникала из внутриклеточного пула в результате экзоцитоза фагосом, возвращавшихся к клеточной поверхности. Второй пул антигена находился внутри клеток и медленно распадался. Между количеством распавшегося антигена и его иммуногенностью не было обнаружено корреляции. В случае с гемоцианином иммуногенность связанного с макрофагами антигена была относитель-

но стабильной в течение нескольких дней, в то время как большая часть антигена катаболизировалась. Третья часть связанного с клетками антигена располагалась на клеточной поверхности и представляла собой небольшое число молекул, оставшихся связанными с мембраной после поглощения большей части антигена. Примерно 1% исходно связанного с клетками белка сохранялся на поверхности клеток, но затем постепенно терялся. Хотя роль этих поверхностно-связанных компонентов не известна, показано, что инкубация макрофагов с антителами к антигену или с трипсином перед введением клеток животному заметно снижала их иммуногенность (табл. 5.8). Этот результат позволил

Таблица 5.8. Действие антител к антигену и трипсина на инкубированные с антигеном макрофаги¹⁾ [47]

Обработка	Образование антител в ответ на			
	САЧ ²⁾		КЛН	
	обработанные	необработанные	обработанные	необработанные
Трипсин	0,0	18,6	2,4	9,4
Антитела	не определялось		1,8	11,3

1) Макрофаги инкубировали с антигеном, обрабатывали трипсином, антителами или оставляли необработанными и вводили мышам. Образование антител определяли по связыванию радиоактивно меченного антигена.

2) САЧ — сывороточный альбумин человека, КЛН — гемоцианин фиссулярии.

Унэвью и Цероттини [47] постулируют, что иммуногенная детерминанта вовсе не является процессированным фрагментом и что мембрана макрофагов служит тем местом, где некоторые молекулы антигена избегают деградации и сохраняют свою исходную структуру.

5.4.2. Исследования *in vitro*

Разработка воспроизводимых и надежных методов оценки антиген-специфической активации Т-клеток позволила провести аналогичные исследования *in vitro*. Как и раньше, поглощение белковых антигенов макрофагами определяли с помощью радиоактивных изотопов, а иммуногенность оценивали по способности инкубированных с антигеном макрофагов активировать пролиферацию иммунных Т-клеток *in vitro*. Хотя результаты исследований *in vivo* и *in vitro* в целом были сходны, обнаружился также и ряд отличий, частично изменивших наши представления о процессинге антигена в макрофагах.

Макрофаги, инкубированные с растворимыми белковыми антигенами *in vitro*, накапливали иммунологически активный антиген по двухступенчатому механизму [48]. Первый этап включал связывание молекул антигена с поверхностью макрофагов; этот этап не зависел от температуры. Потенциальная иммуногенность молекул антигена, связавшихся с поверхностью макрофагов во время инкубации при 4°С, полностью подавлялась трипсинизацией макрофагов сразу после инкубации (рис. 5.2). Этот результат показывает, что после инкубации при 4°С молекулы антигена экспонированы на поверхности макрофагов. Второй этап захвата антигена макрофагами зависел от температуры и включал поглощение макрофагами молекул антигена, связанных с их поверхностью [49]. Подавление окислительного и гликолитического метаболизма с помощью азида

кул антигена хотя и свидетельствует в пользу того, что антиген поглощается клетками, но все же не доказывает этого строго. Конечно, поглощение молекул антигена путем пиноцитоза — наиболее вероятная гипотеза, но возможно, что связанные с мембраной молекулы антигена в ходе какого-то энергозависимого процесса скапливаются в складках клеточной поверхности и становятся нечувствительными к трипсинизации. Возможно также, что антиген на самом деле находится на клеточной поверхности и чувствителен к трипсину, однако его удаление с поверхности макрофагов при трипсинизации сопровождается постепенным выходом новых молекул антигена из цитоплазмы на поверхность, происходящим за то длительное время инкубации, которое необходимо для оценки активации Т-клеток. Хотя результаты многих работ показывали, что эта возможность маловероятна, в последнее время появились данные, подтверждающие ее.

Другой подход к биохимическому анализу процессинга антигена заключается в сравнении двух сходных клеточных популяций, одна из которых способна презентировать антиген, а другая лишена этой способности. Как указывалось ранее, клетки некоторых В-лимфом могут презентировать антиген, в то время как нормальные В-лимфоциты относительно неэффективны в качестве антиген-презентирующих клеток [52]. Однако когда нормальные В-клетки активировали поликлональным В-клеточным митогеном, липополисахаридом, то образующиеся через три дня после стимуляции В-лимфобласты презентировали антиген так же эффективно, как и В-лимфомы (табл. 5.11). Этот результат пока-

Таблица 5.11. Сравнение В-клеток и стимулированных ЛПС В-лимфоцитов по способности презентировать КЛН Т-клетками¹⁾ [15]

Источник Т-клеток	Число вспомогательных клеток к культуре ($\times 10^{-3}$)	Синтез ИЛ-2 Т-клетками (ед. ИЛ-2)	
		нормальные В-клетки	ЛПС-бласты
Т-клетки, примированные КЛН	100	0	80
	50	0	40
	10	0	40
	5	0	10
	1	0	0
Т-клеточная гибридома, специфичная к КЛН	50	80	320
	10	0	160
	5	0	80
	1	0	40
	0,5	0	20
	0,1	0	10

1) Нормальные В-клетки или В-лимфобласты на третий день после стимуляции липополисахаридом (ЛПС) сравнивали по способности презентировать КЛН примированным Т-клеткам или Т-клеточной гибридоме, специфичной к КЛН. Активацию Т-клеток оценивали по индукции синтеза ИЛ-2.

зывает, что способность В-клеток функционировать в качестве антиген-презентирующих клеток определяется стадией их дифференцировки и что трехдневные индуцированные ЛПС лимфобласты и В-клеточные лимфомы находятся как раз на соответствующей стадии созревания.

Сравнение нормальных В-лимфоцитов с В-лимфобластами и В-лимфомами показало, что, хотя В-клетки могут сорбировать антиген на своей поверхности

и осуществлять жидкофазный пиноцитоз, активность этих процессов у них гораздо ниже, чем у В-лимфоцитов и клеток В-лимфом [15]. Так, способность связывать КЛН у них была в 10 раз ниже, чем у В-лимфом. Одним из экспериментов, показавших, что неспособность В-лимфоцитов представлять антиген вызвана недостаточным его связыванием [15]. В этом эксперименте определяли, могут ли покоящиеся В-лимфоциты представлять кроличьи антигены к мышинным Ig Т-клеткам мыши, примированным нормальным кроличьим гамма-глобулином. Предполагалось, что кроличьи антигены к мышинным Ig, связываясь с поверхностными Ig, должны эффективно захватываться нормальными В-клетками. Действительно, нормальные В-лимфоциты эффективно презентировали антиген при обработке их кроличьим антимышиным Ig, но совершенно не презентировали нормальные гамма-глобулины кролика. Хотя этот результат хорошо согласуется с предположением о недостаточном эффективном поглощении антигена нормальными В-лимфоцитами, возможно и другое объяснение. Оно заключается в том, что кроличьи антигены к мышинным Ig активировали покоящиеся В-клетки, в результате чего они дифференцировались и достигали той стадии созревания, при которой начинается выделение лимфокина, например ИЛ-1, необходимого для активации Т-клеток, или же появляется возможность выполнять такие функции, которые не могут осуществляться покоящимися В-клетками. Так, В-лимфомы и В-лимфоциты могут осуществлять некие важные этапы процессинга антигена, на что покоящиеся В-клетки не способны. Другая возможность состоит в том, что на мембране активированных В-клеток имеются некие структуры, необходимые для эффективного взаимодействия В- и Т-клеток, которые отсутствуют у покоящихся В-клеток.

5.4.3. Влияние антител к антигену

По данным нескольких исследовательских групп, антитела к растворимым белковым антигенам не подавляют реакции Т-клеток на инкубированные с антигеном макрофаги. Ранее мы приводили такие же результаты для ДНФ-АМС. В сущности, это весьма загадочный результат, свидетельствующий о том, как мало мы знаем о механизмах процессинга растворимых белковых антигенов в макрофагах и презентации антигенов Т-клеткам. Тому, что антитела к антигену не подавляют ни пролиферации Т-клеток, ни их прикрепления к монослою инкубированных с антигеном макрофагов, было предложено множество объяснений. Весьма интересно рассмотреть эти предложения подробно, поскольку при этом станет ясно, что известно и что неизвестно о механизме процессинга антигена.

Наиболее простое объяснение аналогично тому, которое предлагалось для объяснения нечувствительности инкубированных с антигеном макрофагов к трипсину. Предполагается, что важные в иммунологическом отношении молекулы антигена находятся в участках клетки, недоступных для антител (например, внутри клеток или в глубине липидного бислоя). Процессированный антиген может локализоваться в макрофагах таким образом, что будет недоступен для антител, находящихся в водной фазе. Каким же образом антиген-специфическая Т-клетка «видит» или распознает антиген, если он не находится на поверхности макрофага? Эльнер и др. [51] предложили механизм, названный гипотезой «застежки-молнии» или «телеграфной гипотезой». Предполагается, что антиген «выставляется на обозрение» только при непосредственном физическом контакте макрофага и Т-клетки. Физическое взаимодействие макрофагов и лимфоцитов приводит к такому перераспределению (рекомпартаментации) антигена, в результате которого он оказывается на клеточной поверхности. При

этом может происходить двухэтапная активация лимфоцита. На первом этапе распознаются Ia-антигены макрофага, а на втором этапе — сам антиген. Хотя эта теория и согласуется с результатами некоторых экспериментальных работ (о чем будет сказано ниже), сейчас накапливается все больше данных в пользу того, что антиген или его фрагменты на самом деле присутствуют на поверхности макрофага в момент первоначального контакта Т-лимфоцита с макрофагом.

Тот факт, что антитела к антигену не способны угнетать функцию Т-рецептора, можно объяснить тем, что антитела к антигену распознают разные детерминанты. Рецептор Т-клеток может распознавать фрагменты антигена на поверхности макрофагов после процессинга, тогда как В-клетки (а следовательно, и антитела) распознают эпитоп, определяемый трехмерной структурой нативного антигена. Большинство антисывороток содержат гетерогенную популяцию антител, лишь небольшая часть которых обладает достаточной аффинностью (сродством) к собственным антигенным детерминантам, чтобы успешно подавлять их распознавание Т-клетками.

Имеется множество данных, из которых можно сделать вывод, что в ходе иммунного ответа на сложно устроенный антиген Т-клетки и В-клетки могут распознавать совершенно разные его детерминанты. В пользу этого предположения свидетельствуют некоторые особенности распознавания этими клетками гаптена и носителя. Т-клетки и В-клетки различаются также по тому, как они распознают нативные и денатурированные формы одного и того же антигена. На глобулярном антигене В-клетки распознают преимущественно конформационные детерминанты; когда антиген денатурирует, эти детерминанты разрушаются и появляются новые детерминанты, зависящие лишь от последовательности аминокислот, но не от конформации антигена. Т-клетки, напротив, перекрестно реагируют с нативной и денатурированной формами антигена. Логично предположить, что эта кажущаяся перекрестная реактивность обусловлена тем обстоятельством, что Т-клетки распознают лишь процессированный антиген. В то же время, хотя тот факт, что в отличие от В-клеток Т-клетки одинаково эффективно распознают нативный антиген и его денатурированную или химически модифицированную формы, был продемонстрирован во многих исследованиях на разнообразных растворимых белковых антигенах, из этих работ все же нельзя сделать однозначного вывода о том, реагируют ли с нативным и денатурированным антигеном одни и те же Т-клетки или же существуют две разные популяции Т-клеток, распознающих различные формы антигена. Недавно, однако, на популяционном уровне, используя технику самоубийства размножающихся клеток с помощью бромдезоксипридина и последующего облучения, а также на уровне одиночных Т-клеточных клонов удалось показать, что Т-клетки, распознающие и реагирующие на нативную и денатурированную формы антигена, составляют в значительной степени одну популяцию [53].

Из этой серии работ можно сделать вывод, что протеолитическая деградация антигена — важный этап его процессинга. Действительно, процессинг антигена легко объясняет перекрестную реактивность между нативной и денатурированной формами антигена: обе формы антигена в ходе процессинга превращаются в одни и те же небольшие пептиды, распознаваемые по их последовательности. Тот факт, что антитела к антигену не подавляют пролиферации Т-клеток, объясняется, очевидно, способностью антител распознавать преимущественно конформационные антигенные детерминанты.

В пользу этой гипотезы свидетельствовало бы успешное подавление пролиферации Т-клеток антителами к антигену, реагирующими с той самой детер-

минантой, которую распознают Т-клетки. Для этого можно получить антитела к денатурированным пептидам, а можно исследовать тот исключительный случай, когда Т-клетки распознают конформационные детерминанты на нативной молекуле антигена и не реагируют на изолированные пептиды, т. е. когда Т- и В-клетки реагируют с одной и той же антигенной детерминантой [54]. Этим критериям во многом удовлетворяет характер иммунного ответа на инсулин у морских свинок линии 2. Т-клетки морских свинок, иммунизированных бычьим инсулином, пролиферируют *in vitro* в ответ на бычий инсулин, но не на инсулин свиньи. Они также не реагируют на изолированную А-цепь бычьего инсулина. Все это указывает на то, что Т-клетки распознают конформационную детерминанту в петле А-цепи (аминокислоты А8—А10). Оказалось, что моноклональные антитела с тем же характером реактивности (реагирующие с бычьим инсулином, но не с инсулином свиньи) тем не менее не ингибируют пролиферативную реакцию Т-лимфоцитов, специфических к бычьему инсулину (табл. 5.12).

Таблица 5.12. Неспособность антител к антигену подавлять пролиферацию Т-клеток ¹⁾ [54]

Антитела	Макрофаги, инкубированные с бычьим инсулином	
	10 ⁵	5 · 10 ⁵
Среда	16 000	17 000
Антитела к петле А-цепи	17 500	23 000
Антитела к инсулину (не реагирующие с петлей А-цепи)	19 000	20 500

¹⁾ Иммунные к бычьему инсулину Т-клетки морских свинок линии 2 культивировали с сингенными макрофагами, инкубированными с бычьим инсулином, в присутствии или в отсутствие моноклональных антител к инсулину. Результаты выражены в виде прироста включения ³H-тимидина (имп/мин).

Размножение иммунизированных бычьим инсулином Т-клеток не подавлялось и в том случае, когда активизирующие их инкубированные с инсулином макрофаги обрабатывали последовательно моноклональными антителами к бычьему инсулину и F(ab')₂-фрагментами кроличьих антител к мышьяным Ig. Предпринимались также попытки повысить стабильность комплекса антиген—антитело одновременным добавлением антител и к А-петле, и к другим детерминантам молекулы бычьего инсулина. И в этом случае они потерпели неудачу.

К сожалению, при интерпретации этой серии исследований возникает осложнение теоретического характера. Остается неясным, действительно ли А-петля — это та самая детерминанта, которая узнается Т-клетками, или же А-петля взаимодействует с Ia-антигеном макрофага, а вовсе не с рецептором Т-клетки. В этом случае А-петля может оказаться недоступной для антител, и Т-клетки могут без затруднений распознавать некие расположенные рядом детерминанты. Итак, до сих пор ни антителами, ни антисывороткой к какому-либо сложному белку или простому пептиду не удалось подавить пролиферативную реакцию Т-клеток на этот белок или пептид. Можно, конечно, предположить, что просто еще никто не нашел «правильных» антител; однако это весьма сомнительно. Даже если не были найдены антитела к той самой детерминанте, которая распознается Т-клетками, то некоторые из реагентов по чисто стерическим причинам должны были бы подавлять распознавание Т-клетками «нужного» им эпитопа на сложной белковой молекуле.

5.4.4. Опыты с макрофагами, модифицированными гаптенем

Была сделана еще одна попытка объяснить, почему антитела к антигену не способны подавить пролиферацию Т-клеток. При этом исходили из предположения, что плотность антигена на поверхности макрофага обычно очень невелика. Рецептор Т-клеток и антитела к антигену конкурируют за доступные антигенные детерминанты. Можно думать, что начальное взаимодействие антител и Т-клеточного рецептора с антигеном — это равновесная реакция, однако если Т-клетка связалась с антигеном на поверхности макрофага, то между ней и макрофагом устанавливается прочный контакт, который уже не разрывается. Другая возможность состоит в том, что аффинность Т-клеточного рецептора к комплексу антиген—Ia значительно выше, чем у антитела; из-за редкого расположения антигенных детерминант на поверхности макрофагов связь антител с ними носит моновалентный характер. В любом случае антитела малоэффективно конкурируют с Т-клеточным рецептором за расположенный на поверхности макрофагов антиген.

Некоторое подтверждение последнему объяснению было получено в опытах по стимуляции Т-клеток макрофагами, модифицированными ТНФ-гаптенем. Естественно было думать, что ТНФ-детерминанта должна входить в состав антигенного комплекса, распознаваемого Т-клетками, сенсибилизированными *in vitro* модифицированными ТНФ макрофагами, и что антитела к ТНФ в этом случае должны подавлять реакцию. Высокоактивная антисыворотка к ТНФ существенно подавляла вторичную пролиферативную реакцию Т-клеток морской свинки, стимулированных *in vitro* ТНФ-макрофагами [55]. Однако стимулирующая способность макрофагов, модифицированных ТНФ, а затем инкубированных 24 ч при 37° С («состаренных») перед добавлением к иммунным Т-клеткам, оказалась нечувствительной к обработке антителами. Когда плотность гаптенных групп на поверхности таких состаренных макрофагов, модифицированных ТНФ, повысили повторной обработкой ДНФ-гаптенем, распознаваемым антителами к ТНФ, но не Т-клетками, иммунизированными ТНФ-макрофагами, то пролиферативный ответ, индуцированный такими же дважды модифицированными клетками, эффективно подавлялся антисывороткой к ТНФ (табл. 5.13). Эти результаты свидетельствуют о том, что связывание с клеточной поверхно-

Таблица 5.13. Подавление ТНФ-специфической пролиферации Т-клеток антителами к ТНФ¹⁾ [56]

Обработка макрофагов	Сыворотка	
	НСМС	анти-ТНФ
—	1125	2763
ТНФ-свежие	197 022	74 660
ДНФ-свежие	1629	1912
ТНФ-состаренные	75 266	65 776
ТНФ-состаренные/ДНФ-свежие ²⁾	66 273	16 607
ТНФ-состаренные+ДНФ-свежие ³⁾	111 164	99 576

1) Иммунизированные ТНФ Т-клетки культивировали с макрофагами, модифицированными различным образом (см. в тексте) в присутствии нормальной сыворотки морской свинки (НСМС) или антисыворотки к ТНФ.

2) Одни и те же макрофаги были обработаны двумя способами.

3) ТНФ-состаренные макрофаги были смешаны с ДНФ-свежими макрофагами.

стью достаточного количества антител к гаптену приводит к подавлению реакции на ТНФ и что антигенные детерминанты, распознаваемые Т-клетками, экспрессированы на поверхности макрофагов. Можно предположить, что связывание большого количества антител к антигену с поверхностью макрофагов приводит к активному удалению гаптенных детерминант путем кэппинга, эндоцитоза и слущивания (шеддинга).

Подход с использованием модифицированных гаптенем клеток был применен в опытах с макрофагами, «мечеными» растворимыми белковыми антигенами. Было установлено, что антитела к ТНФ специфически ингибировали пролиферативную реакцию Т-клеток на макрофаги, инкубированные с белковыми антигенами, если макрофаги модифицировали ТНФ после (но не до) инкубации с антигеном и если антиген содержал доступные ϵ -NH₂-лизинные остатки, способные реагировать с ТНФ-реагентом [57]. Был сделан вывод, что антитела к ТНФ подавляют пролиферацию Т-клеток, индуцируя кэппинг и слущивание ТНФ-модифицированных детерминант антигена вместе с белками поверхности макрофага, модифицированными ТНФ. В совокупности эти данные, полученные с макрофагами, модифицированными гаптенем, а также с макрофагами, «мечеными» растворимыми белковыми антигенами и при этом модифицированными гаптенем, показывают, что неудачи опытов по выявлению действия антител к антигену на активацию Т-клеток объясняются скорее всего низкой плотностью антигенных детерминант на поверхности макрофагов. Вследствие этого связывание обычных и тем более моноклональных антител происходит по одновалентному механизму и оказывается недостаточно прочным для того, чтобы ингибировать устойчивое связывание Т-клетки с расположенным на поверхности макрофага антигеном.

Эти функциональные исследования сопровождались серией биохимических экспериментов, в которых определяли локализацию в клетке антигенов, ассоциированных с макрофагами морской свинки [58]. Сначала макрофаги инкубировали с триполимером L-глутаминовой кислоты, L-лизина и L-тирозина (ГЛТ), меченым ¹²⁵I, а затем через разное время после инкубации модифицировали ТНФ с помощью тринитробензилсульфоната (ТНБС). Поскольку ТНБС не проникает в клетки, в детергентном экстракте обработанных макрофагов легко отличить ГЛТ, расположенный на поверхности клетки (меченый ¹²⁵I и модифицированный ТНФ), от внутриклеточного ГЛТ (содержащего только ¹²⁵I). Сразу после инкубации с ГЛТ макрофаги содержали ГЛТ как внутри, так и на своей поверхности. Если же макрофаги культивировали после инкубации в течение 3—24 ч, то ГЛТ обнаруживался только на клеточной поверхности. Наиболее важное значение этого исследования состояло в том, что оно помогло выяснить происхождение ГЛТ, ассоциированного с поверхностью таких клеток. Подробный кинетический анализ показал, что ГЛТ, находящийся на поверхности макрофагов через 24 ч после инкубации, происходит из того ГЛТ, который обнаруживался на клеточной поверхности сразу после инкубации. Не было получено никаких данных в пользу того, что поглощенный клетками ГЛТ в сколько-нибудь существенных количествах возвращается на клеточную поверхность. Не было также никаких оснований считать, что ГЛТ избирательно сохраняется на поверхности клеток: скорость оборота поверхностного ГЛТ не отличалась от скорости оборота макрофагальных белков в целом. Хотя внутриклеточное распределение (компартаментацию) ГЛТ и судьбу поглощенного ГЛТ в этой работе не определяли и, следовательно, нельзя исключить возможность внутриклеточного процессинга ГЛТ в процессе инкубации, полученные данные не подтверждают предположения о том, что при культивировании макрофагов в течение 3—24 ч антиген постоянно переносится из цитоплазмы на по-

верхность клетки. Эти результаты показывают, что важнейшие события в процессе переработки антигена макрофагами происходят на клеточной поверхности, хотя они могут быть и сложнее, чем просто пассивное связывание антигена с мембраной макрофага.

5.4.5. Иммунофармакологические подходы к процессингу антигена в макрофагах

В качестве экспериментальной модели в этих исследованиях использовали взаимодействие макрофагов с бактерией *Listeria monocytogenes* и последующую презентацию бактериальных белков или пептидов Т-клеткам, полученным от животных, иммунизированных *Listeria*. При этом определяли интенсивность прикрепления иммунных Т-клеток к монослою макрофагов, инкубированных с бактериями [59]. Связывание Т-клеток с такими макрофагами начиналось после лаг-периода продолжительностью 30—60 мин от начала инкубации макрофагов с бактериями. Связывание и поглощение бактерий макрофагами происходило гораздо быстрее. Из этого следует, что одного лишь связывания недостаточно для создания ассоциированного с макрофагами иммуногена, необходимого для прикрепления Т-клеток. Процессинг антигена и его связывание можно разделить на основе их различной зависимости от температуры и энергии. Хотя связывание антигена макрофагами может происходить при 4° С или же в присутствии ингибиторов окислительного и гликолитического метаболизма, в этих условиях у макрофагов не развивается способность связывать антиген-специфические Т-клетки. Переработка бактерий, видимо, осуществляется аналогично процессингу растворимых белковых антигенов. Накопление иммунологически активного антигена происходит путем связывания антигена с мембраной и последующего зависящего от метаболизма процесса его переработки. Заметим, что кинетика катаболизма антигена тесно коррелирует с кинетикой образования вещества, связывающего Т-клетки. Появление способности связывать Т-клетки и катаболизм антигена подавляются при низкой температуре, истощении метаболической энергии и фиксации клеток альдегидами. Модель, предложенная Зиглером и Унэню [60], включает 1) первоначальное взаимодействие бактерий *Listeria* с поверхностью макрофага, происходящее с участием трипсин-чувствительных рецепторов, 2) поглощение антигена в виде фагосом, 3) слияние фагосом с лизосомами и 4) протеолитическую деградацию антигена. Небольшие фрагменты антигена, образовавшиеся под действием лизосомных протеиназ, затем высвобождаются и переносятся на поверхность макрофага в ходе процесса, напоминающего экзоцитоз.

Убедительное подтверждение этой последовательности событий было получено в экспериментах с применением двух лизосомотропных агентов — ионов аммония и хлороквина [60]. Действие этих соединений сводится к нарушению нормального функционирования лизосом путем повышения лизосомного рН, а в результате и к подавлению активности кислых гидролаз. Хлороквин непосредственно ингибирует активность катепсина В.1, а ионы аммония тормозят слияние фагосом и лизосом; оба агента ингибируют также рециркуляцию рецепторов. Ни хлороквин, ни хлорид аммония не подавляют поглощения макрофагами убитых нагреванием клеток *Listeria*. В то же время катаболизм бактерий, меченных ^{125}I , ингибировался на 40—60%, о чем свидетельствовало уменьшение количества кислоторастворимой метки в культуральной среде. Вторая функция макрофагов, ослабляемая этими агентами, — презентация антигена. Если ионы аммония или хлороквин добавляли в среду за 30 мин до добавления бактерий, то антиген-специфическое связывание с макрофагами

иммунных Т-клеток значительно подавлялось (табл. 5-14). Если же макрофаги взаимодействовали с бактериями до добавления этих агентов в течение 30 мин при 37° С, то степень подавления была небольшой.

Таблица 5.14. Угнетение презентации антигена хлороквинном и NH₄Cl [60]

Метод оценки	Контроль	NH ₄ Cl (10 мМ)	Хлороквин (0,1 мМ)
Связывание антигена ¹⁾	15	13	15
Поглощение антигена ²⁾	66	63	67
Катаболизм антигена ³⁾	29	13	14
Связывание Т-клеток с макрофагами ⁴⁾ до обработки антигена	70	26	30
после обработки антигена	84	70	64

- 1) Доля меченных ¹²⁵I *Listeria*, связавшихся с макрофагами.
 2) Среднее уменьшение числа связанных с клеточной поверхностью бактерий (%).
 3) Среднее высвобождение ТХУ-растворимой метки за 1 ч культивирования (%).
 4) Доля иммунных Т-клеток, специфически связывающихся с макрофагами (%).

Из этих результатов был сделан вывод, что ингибирующие эффекты использованных агентов связаны с их действием на процесс переработки антигена макрофагами, имеющий более важное значение для возникновения, чем для поддержания антигенности макрофагов. Ослабление способности презентировать антиген строго коррелировало с избирательным подавлением его катаболизма. По-видимому, для презентации иммуногенов Т-клеткам необходим внутриклеточный процессинг молекул антигена. Возможно, что после расщепления антигена в лизосомах его фрагменты переносятся на доступные участки клеточной поверхности или выделяются во внеклеточную среду. Исходя из этих данных легко понять, почему антигенные детерминанты белков, распознаваемые Т-клетками, представлены денатурированными участками белков; подобные модификации белков, по всей видимости, происходят в результате их частичного расщепления в лизосомах.

Описанный выше подход был использован при изучении переработки растворимого глобулярного белкового антигена КЛН макрофагами и клетками В-лимфомы [61]. Чтобы выявить процесс презентации антигена, и клетки В-лимфомы, и макрофаги, связавшие КЛН при 4° С, необходимо было в течение 45—60 мин инкубировать при 37° С. По-видимому, это время требовалось для неких активных процессов, необходимых для экспонирования антигена. В данных исследованиях активацию Т-клеток оценивали по индукции секреции ИЛ-2 антиген-специфическими Т-клеточными гибридами. Условия, необходимые для активации этих антиген-специфических опухолевых линий, по всей видимости, отличались от условий активации нормальных иммунизированных Т-лимфоцитов: оказалось, что В-клетки и макрофаги можно зафиксировать перед добавлением к культуре Т-клеток.

Антиген, связавшийся с поверхностью презентующих клеток при 4° С, был чувствителен к расщеплению проназой. Однако после инкубации при 37° С антиген-презентирующая активность клеток не подавлялась под действием про-теиназы — очевидно, антиген поглощался клетками, попадая в участок, недоступный для протеиназы. Этот результат согласуется с описанными выше данными, полученными при исследовании макрофагов морской свинки, инкубиро-

ванных с ДНФ-АМС. Если клетки В-лимфомы или макрофаги инкубировали с КЛН в течение 2 ч при 37° С, обрабатывали проназой, а затем фиксировали параформальдегидом, то они теряли способность презентировать КЛН. В то же время нефиксированные обработанные проназой клетки презентировали КЛН так же эффективно, как и контрольные клетки, не подвергавшиеся воздействию протеназы. Был сделан вывод, что эти результаты убедительно свидетельствуют о реэкспрессии на клеточной поверхности поглощенного антигена: если после обработки проназой клетки фиксировали, то реэкспрессии не происходило и клетки не презентировали антигена.

Хлороквин подавлял презентацию КЛН и В-клетками, и макрофагами. Он действовал при этом только на процессинг антигена, а не на другие функции презентующих клеток, необходимые для активации Т-клеток: В-клетки не теряли способности презентировать антиген, поглощенный до инкубации с хлороквином (табл. 5.15). Эти результаты также согласуются с предположе-

Таблица 5.15. Угнетение презентации антигена хлороквином¹⁾ [61]

Первая инкубация с антигеном	Обработка хлороквином после первой инкубации	Вторая инкубация с антигеном	Синтез ИЛ-2 Т-клеточными гибридомами, Ед.	
			ОВА-специфическая	КЛН-специфическая
ОВА	—	—	640	0
ОВА	—	КЛН	640	320
ОВА	+	КЛН	640	0

¹⁾ Клетки В-лимфомы инкубировали с овальбумином (ОВА), отмывали и делили на три порции. Одну порцию инкубировали 2 ч при 37°С в культуральной среде, другую — с КЛН (2 ч при 37°С) и третью с КЛН в присутствии 40 мкМ хлороквирина. Затем клетки отмывали и фиксировали параформальдегидом, после чего помещали в культуру с ОВА-специфической или КЛН-специфической Т-клеточной гибридомой. Хлороквин подавлял презентацию только того антигена, вместе с которым его добавляли к клеткам (КЛН).

нием о том, что хлороквин действует на этап переработки антигена, предшествующий экспрессии процессированного антигена на клеточной поверхности. Во всех этих экспериментах В-лимфомы и макрофаги реагировали одинаково.

В другой работе [62] сравнивали судьбу радиоактивно-меченных белков после их связывания с поверхностью макрофагов и В-клеток. В макрофагах радиоактивно-меченные овальбумин (ОВА) и КЛН быстро распадались до кислоторастворимых пептидов; вероятно, их катаболизм происходил в лизосомах, так как процесс деградации в значительной степени ингибировался хлороквином. В отличие от этого деградация КЛН в клетках В-лимфомы была незначительной, причем имевший место небольшой катаболизм не подавлялся хлороквином. Поэтому нельзя исключить, что способность хлороквирина подавлять презентацию антигена не связана с ингибированием протеолитического действия лизосомных ферментов, а вызвана его действием на другие клеточные процессы, например на рециркуляцию рецепторов. Макрофаги связывали в 10—20 раз больше КЛН, чем В-клеточные опухоли, хотя эти два типа презентующих клеток не отличались по количеству антигена, требующегося им для активации Т-клеточной гибридомы в культуре. Эти данные показывают, что большие различия между клетками этих двух типов в их способности связывать антиген могут не иметь отношения к связыванию иммунологически активного антигена.

Возможно, высокий уровень протеолитической активности макрофагов, приводящий к распаду большей части связанного антигена на пептиды и аминокислоты, компенсирует повышенное поглощение антигена этими клетками и приводит к тому, что опухолевые В-клетки и макрофаги обладают примерно одинаковой способностью к презентации антигена.

5.4.6. Антиген-специфические продукты макрофагов

Более прямой подход к анализу переработки антигена в макрофагах заключается в исследовании растворимых антиген-специфических факторов, выделяемых макрофагами, инкубированными с антигеном. Прежде чем перейти к обсуждению полученных при этом результатов, следует указать, что такие факторы очень трудно выделить и почти все приводимые данные были получены всего лишь в нескольких лабораториях. Кроме того, трудно примирить существование этих факторов, свидетельствующих о том, что макрофагам и Т-клеткам не обязательно непосредственно взаимодействовать друг с другом, с большой группой данных, которые мы обсудим позднее, показывающих, что большинство функциональных субпопуляций Т-клеток взаимодействует с макрофагами при прямом физическом контакте.

Первыми растворимые продукты макрофагов, участвующие в активации Т-клеток, обнаружили Эрб и Фельдман [63—65] (табл. 5.16). Они заметили, что

Таблица 5.16. Свойства антиген-специфических факторов макрофагов¹⁾
(суммировано из работ [63—67])

Генетически обусловленный фактор (ГОФ)	Содержащий Ia антигенный комплекс (IАС)
<p>Индукцирует специфические Т-хелперные клетки в отсутствие макрофагов и антигена</p> <p>Активируются только Т-клетки мышей, совместимых по I-A</p> <p>Удаляется на аффинных колонках, содержащих антитела к Ia или антитела к антигену</p> <p>Т-клетки гибрида F₁ (реагирующий родитель × нереагирующий родитель) стимулируются ГОФ, полученным от клеток реагирующего, но не от нереагирующего родителя</p>	<p>Связывается с антиген-специфическими Т-клетками</p> <p>Связывается с клонированными сингенными хелперными Т-клеточными гибридами</p> <p>Иммуногенен <i>in vivo</i></p> <p>Будучи меченым, приводит к радиоактивному самоубийству хелперных Т-клеток <i>in vitro</i></p> <p>Стимулирует пролиферацию Т-клеток</p> <p>Все функциональные свойства проявляются только на Т-клетках, совместимых по I-A</p> <p>Специфически задерживается на аффинной колонке, содержащей антитела к Ia</p> <p>Т-клетки гибрида F₁ (реагирующий родитель × нереагирующий родитель) связывают преимущественно IАС реагирующего родителя</p>

при индукции хелперных Т-клеток необязателен прямой контакт между Т-клетками и макрофагами: образование хелперных Т-клеток происходило и в том случае, когда инкубированные с антигеном макрофаги и Т-клетки инкубировали в двух камерах, разделенных непроницаемой для клеток нуклеопоровой мембраной. Из этого наблюдения следовало, что под влиянием антигена макрофаги, очевидно, выделяют факторы, способные индуцировать дифференцировку Т-клеток в хелперные клетки. Было обнаружено два типа факторов, способных заменять макрофаги при индукции хелперных клеток [63]. Фактор первого

типа присутствовал в культуральной среде макрофагов, инкубированных без антигена, и был способен индуцировать Т-хелперы в отсутствие макрофагов, но лишь в том случае, если исследуемый антиген представлял собой частицы, а не растворимые белки. Этот фактор был назван «неспецифичным фактором макрофагов» (НФМ); его активность не была генетически рестриктирована: культуральная среда аллогенных макрофагов также оказывалась эффективной.

Фактор второго типа был получен из среды, в которой макрофаги в течение нескольких дней (обычно четырех) инкубировали в присутствии антигена. Он осуществлял индукцию хелперных Т-клеток в отсутствие макрофагов и дополнительных количеств растворимого антигена, но лишь при том условии, что макрофаги, от которых был получен фактор, и Т-клетки были идентичны по I-A-субрайону комплекса H-2. Из-за существования такой генетической рестрикции этот фактор был назван «генетически обусловленным фактором» (ГОФ) [64]. Биохимические исследования показали, что ГОФ представляет собой комплекс продуктов генов I-района и фрагмента антигена. Таким образом, ГОФ можно было удалить из среды с помощью иммуноадсорбента, содержащего либо антитела к Ia, либо антитела к антигену. Хелпер-индуцирующую активность ГОФ можно было элюировать с такой колонки, понижая рН до 2,4. Молекулярная масса ГОФ, полученного от макрофагов, инкубированных с KLN плц TGAL, находилась в интервале 50—60 кДа и не зависела от исходного размера антигена, использованного для получения ГОФ.

Существует определенное сходство в характере генетических ограничений, обнаруживаемых при взаимодействии инкубированных с антигеном макрофагов с иммунными Т-клетками и при взаимодействии ГОФ с неиммунной популяцией Т-хелперов. Если использовали Т-клетки от гибрида F₁, полученного в результате скрещивания (родитель, отвечающий на антиген, контролируемый Iг-генами × не отвечающий родитель), то активацию таких клеток мог вызвать лишь ГОФ, выделяемый макрофагами отвечающего родителя [65]. Таким образом, образование ГОФ полностью коррелирует со способностью макрофагов индуцировать хелперные Т-клетки. Дальнейший прогресс в функциональном и биохимическом исследовании ГОФ был, однако, очень невелик, что объясняется прежде всего сложностью системы, используемой для оценки его активности. Многие важные вопросы, касающиеся ГОФ, не удается решить в течение нескольких лет. Во-первых, обнаружение антигенной специфичности при связывании молекулами Ia антигена в составе ГОФ в принципе означает существование нового класса антиген-специфических молекул. Во-вторых, неясно, какие биохимические особенности повинны в том, что макрофаги, не отвечающие на данный антиген мыши, не способны образовывать ГОФ? Обусловлено ли это неспособностью иммуногенного фрагмента антигена связываться с нереагирующим Ia или же это связывание происходит неправильным образом — так, что с Т-клеточным рецептором взаимодействует иная, чем это необходимо, часть иммуногенного комплекса? Не может ли быть, что фрагменты антигена связываются с Ia, образуя ГОФ, совершенно неспецифическим образом?

Лован и сотр. [66, 67] недавно обнаружили в макрофагах, инкубированных с ¹²⁵I-меченым антигеном, продукт, имеющий ряд общих свойств с ГОФ. Вместо того чтобы использовать в качестве показателя индукцию Т-хелперных клеток, эта группа исследователей определяла ¹²⁵I-меченые факторы макрофагов по их способности связываться с антиген-специфическими Т-клетками, выявляемой методом радиоавтографии. По их данным, хелперные Т-клетки не способны связывать фактор макрофагов, если в культуре отсутствует растворимый фактор прикрепляющихся клеток, названный МФ. Эффект МФ не зависит от его генетического происхождения, в то время как связывание меченого ¹²⁵I фактора

макрофагов, являющегося, по всей видимости, комплексом собственных Ia и антигена и названного IAS, требует генетической гомологии между T-лимфоцитами и антиген-презентирующими макрофагами (табл. 5.16).

Очевидно, что по своим свойствам IAS и ГОФ во многом похожи. Оба фактора задерживаются на колонке с антителами к Ia и оба характеризуются H-2-рестрикцией своей функции. IAS образуется при кратковременном культивировании, т. е. образование иммуногенного комплекса представляет собой быстрый процесс. Обнаруженный Лонаи (Lona) МФ частично напоминает МФ Эрба и Фельдмана (Erb, Feldman). Было, однако, показано, что МФ действует, повышая вязкость мембран T-клеток, и необходим для связывания большого количества растворимых антигенов после их процессинга прикрепляющимися клетками, в то время как МФ был эффективен только по отношению к партикулированным антигенам.

Лонаи подробно охарактеризовал способность фактора IAS к связыванию. В экспериментах по радиоактивному самоубийству клеток, связавших антиген, IAS функционально элиминировал спигенные, но не аллогенные хелперные T-клетки. В экспериментах по конкурентному связыванию растворимые антигены не подавляли связывания IAS даже при очень большом (в 10^4 раз) избытке. Очевидно, антигенсвязывающие T-клетки могут связывать комплекс антигена с собственным Ia, но практически не имеют сродства к самому антигену. T-клетки F₁-гибрида между отвечающими и не отвечающими на данный антиген родителями преимущественно связывают IAS, полученный от инкубированных с антигеном макрофагов высокоотвечающего родителя. B-клетки, напротив, не связывают процессированный антиген лучше, чем исходный. Представляется возможным, что IAS выполняет функцию продукта гена *Ig*, приписываемую макрофагам.

Таким образом, изучение растворимых антиген-специфических факторов макрофагов находится пока еще на ранней стадии. Тем не менее отчетливо показано, что выделение иммуногенного продукта, несущего как антиген, так и Ia, является одним из путей презентации антигена. Эти результаты, несомненно, имеют очень важное значение и нуждаются в дальнейшем развитии. Их, кроме того, необходимо связать с описываемыми ниже данными о наличии прямого взаимодействия между T-клетками и макрофагами.

5.4.7. Выводы из опытов по изучению процессинга антигена

Хотя эта область в течение последних 15 лет интенсивно исследовалась, пока еще нет оснований считать, что механизм переработки антигена макрофагами выяснен полностью. По-видимому, можно считать установленным, что при презентации антигена T-клетке фрагмент антигена или сам нативный антиген присутствует на поверхности макрофага. Ясно также, что поглощение антигена макрофагами — это процесс температурозависимый, требующий затраты метаболической энергии, а не пассивное присоединение антигена к поверхности макрофага. Мы уже приводили множество данных о том, что перед повторной экспрессией на клеточной поверхности антиген поглощается и, возможно, подвергается протеолитической деградации. Надежных биохимических данных в пользу такого пути пока еще нет, и в настоящее время неясно, представляют ли поглощение антигена и его протеолитический распад необходимый этап переработки антигена или же несущественную деталь, зависящую от природы исследуемого антигена. Похоже, что лизосомный протеолиз сложных партикулированных антигенов — необходимый этап переработки антигена, как

это следует из опытов по презентации бактерий *Listeria*. Протеолиз, хотя и не обязательно, может также происходить при обработке сложных растворимых антигенов, таких, как гемоцианин, и оказывать существенное влияние как на природу иммуногенного вещества, представленного на клеточной поверхности, так и на специфичность Т-клеточного ответа. Пока рано делать вывод о том, что внутриклеточный этап переработки антигена необходим для всех антигенов. Небольшие пептидные антигены могут миновать некоторые этапы превращений, происходящих со сложными структурами, такими, как бактерии.

5.5. Физические взаимодействия между макрофагами и Т-лимфоцитами

В опытах на животных *in vivo* в лимфатических узлах, отвечающих на иммунизацию, было обнаружено скопление лимфоцитов и бластных клеток вокруг макрофагов. Тесная ассоциация лимфоцитов с макрофагами была обнаружена *in vivo* и в отсутствие специфической иммунизации, а также *in vitro* при культивировании без антигена. Было показано, что индукция *in vitro* первичного антигенного ответа так же, как и вызванная антигеном пролиферация иммунных лимфоцитов, включает в себя прямой физический контакт между лимфоцитами и несущими антиген макрофагами. В последние 10 лет физические взаимодействия, происходящие *in vitro* между макрофагами и лимфоцитами, были охарактеризованы и описаны с количественной стороны. Наблюдались два отдельных, но связанных между собой типа взаимодействий: одно — антиген-независимое и второе — зависящее от присутствия примированных Т-лимфоцитов и несущих примирующий антиген макрофагов.

5.5.1. Антигеннезависимые взаимодействия

Монослой макрофагов, полученных из различных лимфоидных органов или из перитонеального экссудата, связывает тимоциты в значительно большей степени, чем полиморфно-ядерные лейкоциты или фибробласты. Лимфоциты из лимфатических узлов или перитонеального экссудата прикрепляются к монослою макрофагов в значительно большем количестве, чем ксеногенные тимоциты или лимфоциты [68]. Таким образом, по-видимому, существует некоторая специфичность взаимодействия, возможно указывающая на существование неких клеточных механизмов распознавания. Не было обнаружено никакой избирательности по отношению к В- и Т-лимфоцитам: они связывались с макрофагами пропорционально их содержанию в популяции лимфоцитов. Изменение поверхностных Ig В-лимфоцитов не подавляло связывания; не было обнаружено также конкурентного угнетения связывания избытком Ig.

Для антигеннезависимого взаимодействия макрофагов с лимфоцитами требовались живые макрофаги, в то время как роль лимфоцитов была настолько пассивной, что тимоциты, убитые нагреванием, или тимоциты, обработанные необратимым метаболическим ингибитором иодоацетатом натрия, связывались так же, как и живые клетки. Обработка макрофагов трипсином заметно уменьшала их способность к связыванию тимоцитов; кроме того, реакция зависела от двухвалентных катионов ($\text{Ca}^{2+} \gg \text{Mg}^{2+}$) [69].

Важное свойство антигеннезависимого взаимодействия макрофагов с лимфоцитами — это его динамический характер. При добавлении тимоцитов к макрофагам максимальная степень связывания наблюдается через 30—60 мин. Это плато в связывании достигается в результате установления равновесия

между ассоциацией и диссоциацией. О лабильном характере связывания свидетельствуют результаты экспериментов с радиоактивно мечеными тимоцитами, показавшие, что в монослое происходит постоянный обмен значительного количества немеченых тимоцитов на меченые клетки, хотя заметных изменений в общем числе связанных с макрофагами тимоцитов при этом не происходит.

Роль антигеннезависимого взаимодействия макрофагов с лимфоцитами пока еще не выяснена. Однако можно допустить, что непосредственный контакт клеток облегчает осуществление некоторых функций питающих (фидерных) клеток. Как следует из некоторых приведенных ниже результатов, возможно также, что начальное антигеннезависимое взаимодействие Т-клеток с макрофагами облегчает дальнейшее антигензависимое связывание, приводящее в свою очередь к активации Т-клеток. Так, например, взаимодействие Т-клеток с макрофагами может индуцировать концентрирование соответствующих антигенных детерминант и (или) молекул Ia только в месте контакта.

5.5.2. Антигензависимые взаимодействия

Исследовали влияние антигена на взаимодействие макрофагов с иммунными лимфоцитами [70]. Для этого монослойные культуры прикрепленных к стеклу макрофагов инкубировали с растворимыми антигенами в течение 60 мин при 37° С, отмывали, а затем инкубировали с примированными Т-лимфоцитами. В этих опытах лимфоциты получали из лимфатических узлов морских свинок, иммунизированных растворимыми антигенами в полном адъюванте Фрейнда. Клетки пропускали через адгезивные колонки с нейлоновой ватой и стеклянными шариками для того, чтобы удалить макрофаги и В-клетки. Как это ни удивительно, эффективность взаимодействия макрофагов с лимфоцитами в первый час совместной инкубации не зависела от присутствия антигена (рис. 5.3). Однако если время инкубации увеличивали, то разница в связывании лимфоцитов с несущими антиген и контрольными макрофагами становилась заметной. Существенная разница в связывании Т-лимфоцитов с контрольными макрофагами и макрофагами, инкубированными с антигеном, наблюдалась через 6 ч, достигала максимума через 20 ч и сохранялась через 72 ч (рис. 5.3). Антиген-специфическое связывание наблюдалось только в том случае, если лимфоциты получали от животного, иммунизированного тем же антигеном, который несли культивируемые макрофаги. В то же время оно никак не зависело от иммунного статуса животного, от которого получали макрофаги.

Условия, необходимые для связывания макрофагов с иммунными Т-лимфоцитами, напоминают условия, необходимые для активации Т-лимфоцитов при индукции антиген-специфического пролиферативного ответа. Первой клеткой, взаимодействующей с антигеном, обязательно должны быть макрофаги: короткая инкубация лимфоцитов с антигеном не приводила к антигензависимому связыванию таких лимфоцитов с не мечеными антигеном контрольными макрофагами. Наконец, когда в качестве антигена использовали конъюгаты белка с гаптеном, то оказалось, что антигензависимое связывание специфично к носителю, а не к гаптену.

В культурах, содержащих 50% контрольных макрофагов и 50% макрофагов, инкубированных с антигеном, только этот последний тип клеток связывал Т-лимфоциты. То, что контрольные макрофаги в этих условиях не связывают повышенного количества лимфоцитов, свидетельствует о том, что опосредованное антигеном взаимодействие является первичным процессом, а не вторичным последствием активации лимфоцитов. Таким образом, стабилизируемое антигеном взаимодействие макрофага с лимфоцитами не является

следствием активации лимфоцита, а предшествует активации. Для того чтобы продемонстрировать функциональное значение антигензависимого связывания, радиоавтографическим методом определяли включение ^3H -тимидина через разные сроки культивирования в лимфоциты, связанные и не связанные с макрофагами. Иммуные лимфоциты, обработанные митомином С и вследствие этого не способные синтезировать ДНК в ответ на несущие антиген макрофаги, не отличаются от контрольных необработанных иммуных Т-лимфоцитов по способности связываться с монослоем пикубированных с антигеном клеток.

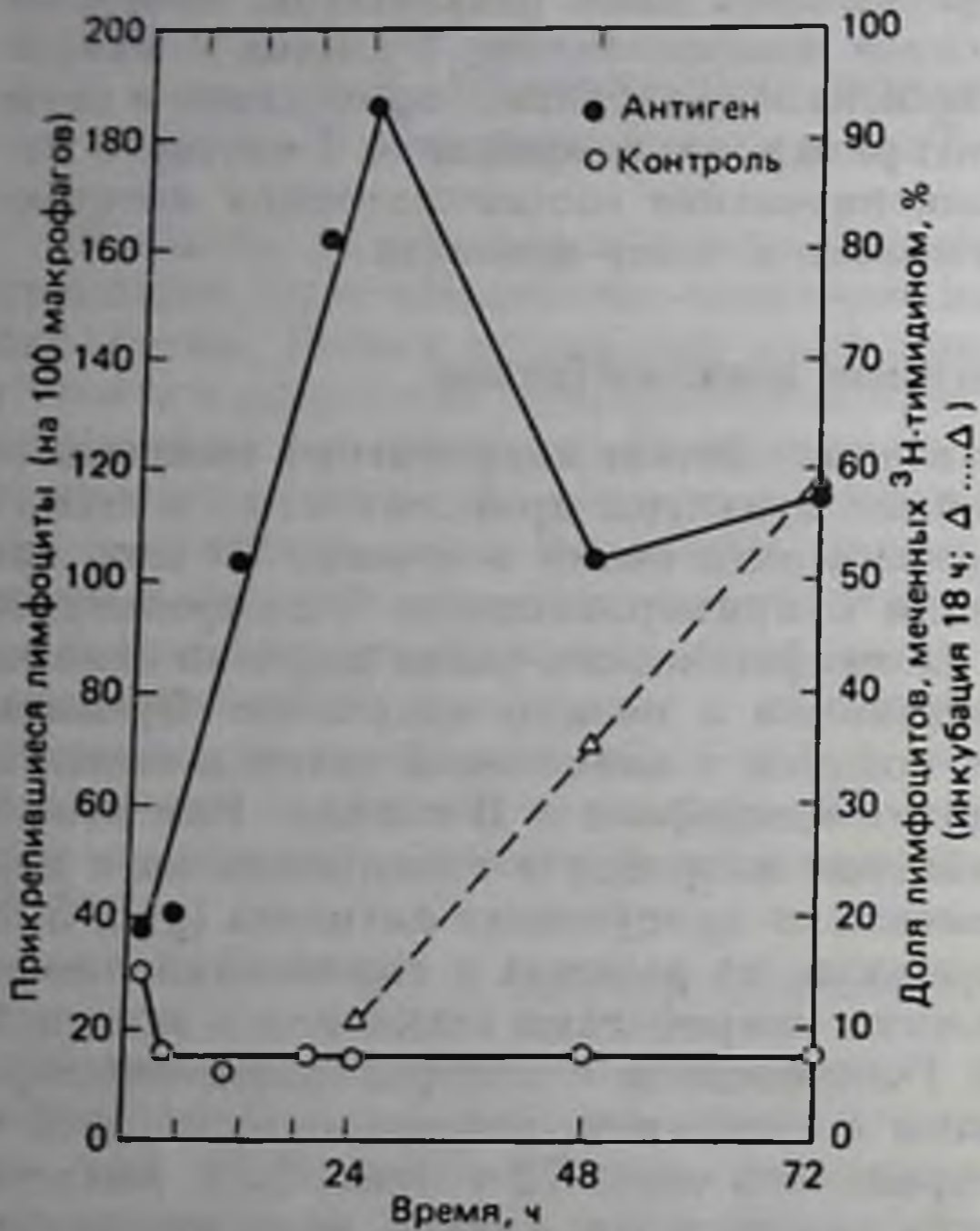


Рис. 5.3. Действие антигена на связывание иммуных лимфоцитов лимфатических узлов с антигенными макрофагами. Показана зависимость связывания с макрофагами от времени в отсутствие (светлые кружки) и в присутствии (темные кружки) антигена. Степень связывания выражена в виде числа лимфоцитов, прикрепившихся к 100 макрофагам. Синтез ДНК определяли как процент связанных с макрофагами лимфоцитов, включивших по данным радиоавтографии ^3H -тимидин в ходе 18-часовой инкубации ([71]; печатается с разрешения издательства).

Была исследована роль продуктов I-района в антигеннезависимом и антигензависимом взаимодействии макрофагов с лимфоцитами. В отсутствие антигена макрофаги одинаково эффективно связывали сингенные и аллогенные лимфоциты. Однако, как и следовало ожидать, антигензависимое взаимодействие макрофагов с лимфоцитами требовало, чтобы макрофаги и иммуные Т-лимфоциты были получены от совместимых по I-району животных.

5.5.3. Значение физического взаимодействия

Естественно было предположить, что антигеннезависимое обратимое связывание лимфоцитов с макрофагами переходит в стабилизированное антигеном специфичное взаимодействие, что приводит к активации и пролиферации Т-клеток. Однако строго доказать осуществление событий именно в такой последовательности оказалось достаточно трудно. Данные, подтверждающие эту точку зрения, были получены в опытах с цитохалазином В — ингибитором многих форм активности мембраны. Добавление цитохалазина В в начале культивирования подавляло антигензависимое связывание иммуных лимфоцитов с макрофагами, а также и активируемую антигеном пролиферацию лимфоцитов [72]. Чем позже добавляли цитохалазин В в культуру, тем слабее был его ингиби-

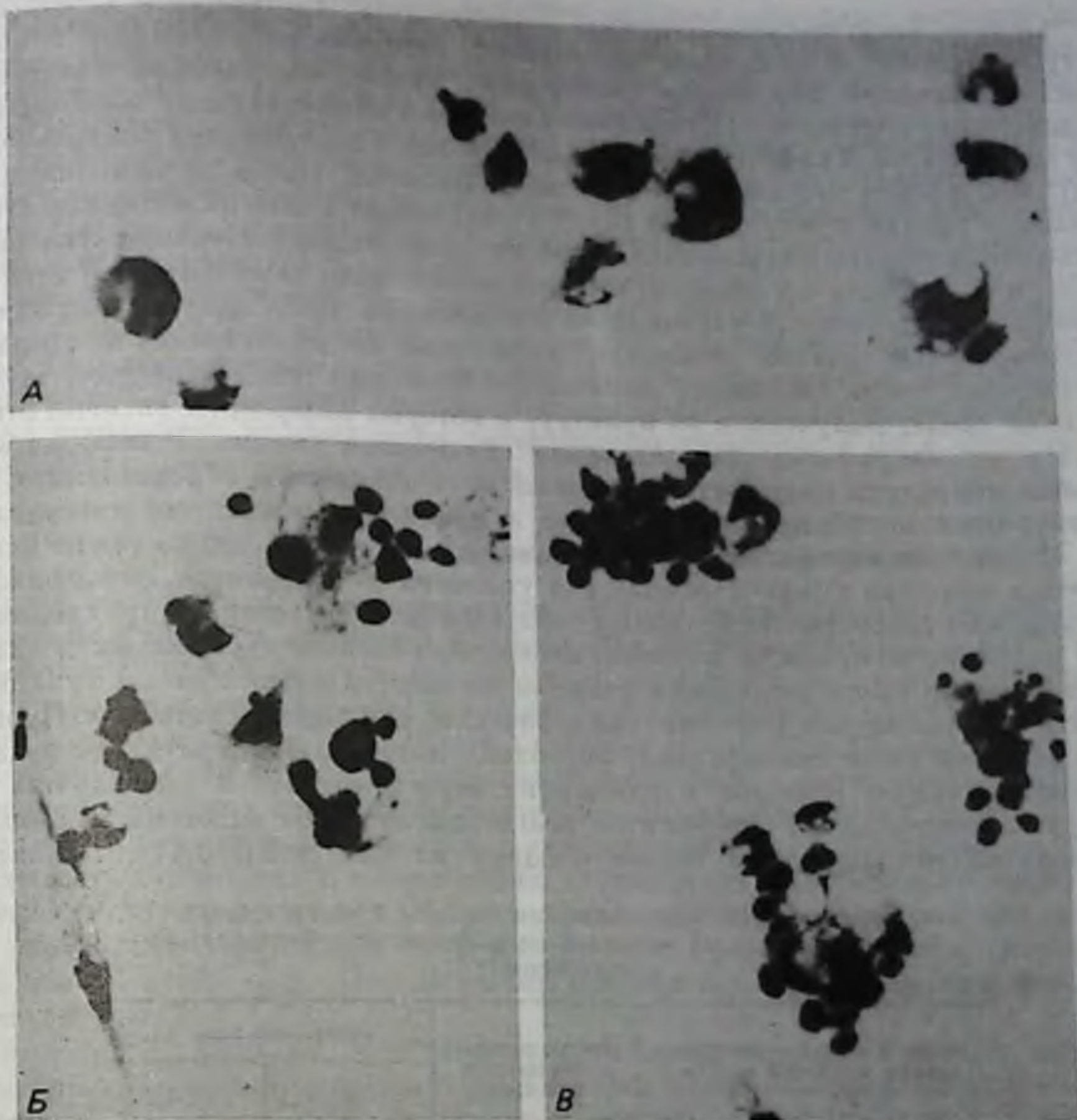


Рис. 5.4. Микрофотографии, иллюстрирующие физическое взаимодействие между Т-лимфоцитами морских свинок, иммунных к ОБПТ, и макрофагами через 20 ч инкубации. А. С контрольными макрофагами связывается мало Т-лимфоцитов. Б. Связыва-

ние, наблюдаемое при добавлении $5 \cdot 10^6$ Т-лимфоцитов к макрофагам, инкубированным с ОБПТ. В. Связывание, наблюдаемое при добавлении $10 \cdot 10^6$ Т-лимфоцитов к макрофагам, несущим ОБПТ ([70]; печатается с разрешения издательства).

рующий эффект. Кроме того, цитохалазин В подавлял антигеннезависимое связывание лимфоцитов с макрофагами. Таким образом, подавление этого этапа предотвращало последующее антигензависимое взаимодействие, выявляемое как физическими, так и функциональными тестами. Остается, однако, возможность того, что цитохалазин В может ингибировать антигензависимые физические и функциональные взаимодействия непосредственно, нарушая механизм экспонирования антигена на макрофагах или блокируя восприятие антигенного сигнала иммунным Т-лимфоцитом. В любом случае эти наблюдения указывают на тесную связь между физическим взаимодействием макрофагов с лимфоцитами и осуществляемой антигеном активацией иммунных Т-лимфоцитов.

Судьба антиген-специфических Т-лимфоцитов, связавшихся с монослоем инкубированных с антигеном макрофагов, детально исследовалась в опытах с использованием популяции лимфоцитов, сильно обогащенной антиген-специфическими клетками, полученными с помощью положительной селекции культур *in vitro* [73]. Такие лимфоциты связывались с макрофагами быстрее (за 1—8 ч), чем только что эксплантированные Т-клетки. После достижения максимального уровня прикрепления (4—8 ч инкубации) Т-клетки начинали открепляться от монослоя макрофагов. Скорость диссоциации постепенно становилась выше, чем скорость ассоциации, и в результате число лимфоцитов на один макрофаг в последующие 72 ч постепенно уменьшалось. Если процесс реассоциации предотвращали, удаляя свободные лимфоциты из культуральной среды, то уменьшение числа связанных лимфоцитов было еще более заметным. Культуральная среда, полученная от культур, в которых лимфоциты активно откреплялись от макрофагов, не подавляла связывание свежих Т-лимфоцитов со свежим монослоем макрофагов, что исключает возможную определяющую роль растворимых ингибирующих факторов в наблюдаемом процессе диссоциации.

Монослой макрофагов, инкубированных с антигеном, можно также использовать в качестве иммуносорбента для удаления Т-лимфоцитов, специфических в отношении растворимых белковых антигенов [74]. Т-клетки, не прикрепившиеся к монослою макрофагов в течение нескольких часов инкубации, были лишены способности к пролиферативной реакции на антиген и способности функционировать как хелперные Т-клетки, специфические для данного антигена. Процедура адсорбции была специфичной, поскольку позволяла избирательно подавить пролиферативную реакцию к одному из двух антигенов в том случае, если исходная популяция Т-лимфоцитов реагировала на оба антигена, а монослой макрофагов инкубировали только с одним из них (табл. 5.17). Подавление

Таблица 5.17. Специфическая сорбция приживаемых Т-лимфоцитов на монослой макрофагов, инкубированных с антигеном¹⁾ [74]

Агент, с которым инкубировали монослой макрофагов	Метод снятия лимфоцитов с монослоя	Ответ (имп/мин) на	
		ОВА	ОБПТ
ОВА	Смывание	8300	28 400
	Элюция	68 900	НО
ФРФБ	Смывание	19 400	26 800
	Элюция	НО	НО

¹⁾ Т-лимфоциты, иммунизированные ОВА и ОБПТ, сорбировали на монослой макрофагов, инкубированных с ОВА или в физиологическом растворе на фосфатном буфере (ФБФР). Через 4 ч инкубации неприкрепившиеся к макрофагам лимфоциты получали путем смывания, а прикрепившиеся лимфоциты элюировали смесью ЭДТА и трипсина. Смывые и элюированные лимфоциты затем инкубировали с ОВА и ОБПТ для определения их пролиферативной реакции.

реактивности неприкрепившихся к монослою лимфоцитов было вызвано связыванием реагирующих Т-лимфоцитов с макрофагами: у лимфоцитов, прикрепившихся к монослою, обнаруживалась повышенная реактивность на антиген.

В этом взаимодействии непосредственное участие принимают молекулы Ia, о чем свидетельствовала способность сыворотки против Ia подавлять процесс адсорбции [75]. В то же время антитела к антигену не оказывали влияния

на процесс связывания. Попытки подавить процесс адсорбции высокой концентрацией растворимого антигена в среде также потерпели неудачу: в большинстве работ избыток растворимого антигена даже усиливал связывание. Скорее всего, это было связано с тем, что добавление растворимого антигена в культуральную среду усиливал процесс его презентации макрофагами. Если бы Т-лимфоциты распознавали антиген и Ia с помощью двух совершенно независимых рецепторов, то следовало бы ожидать, что при повышении концентрации растворимого антигена в среде увеличивалось бы не только связывание с антигеном на поверхности макрофагов, но и связывание со свободным антигеном. Поскольку полученные данные показывают, что свободный антиген увеличивает связывание Т-лимфоцитов с макрофагами, они свидетельствуют в пользу совместного распознавания, так как оно должно приводить к повышенному связыванию Т-лимфоцитов с Ia-положительными несущими антиген макрофагами при повышении концентрации растворимого антигена, а не к повышению связывания с растворимым антигеном.

5.5.4. Лимфоцитарно-макрофагальные кластеры

Хотя до сих пор мы предполагали, что во взаимодействие лимфоцитов с инкубированными с антигеном макрофагами вовлечены только специфичные Т-лимфоциты, примированные исследуемым антигеном, детальные исследования Верделина и сотр. [76—78] показали, что это взаимодействие имеет значительно более сложный и динамичный характер. В большинстве работ Т-лимфоциты инкубировали с монослоем преинкубированных с антигеном макрофагов в течение нескольких часов, затем тщательно отмывали монослой средой и только потом Т-лимфоциты и макрофаги, оставшиеся на стекле, фиксировали глутаральдегидом и готовили к микроскопии. После этого подсчитывали число специфично связавшихся клеток. Подход, предложенный Верделином, подразумевает добавление фиксатора в культуру без предварительного отмывания с той целью, чтобы сохранить не только специфические, но и неспецифические взаимодействия.

Этот метод показал, что физическое взаимодействие Т-клеток морской свинки и макрофагов осуществляется в составе кластера (комплекса) (рис. 5.5), состоящего из одного прикрепленного к стеклу макрофага, присоединенного к нему значительным участком своей поверхности центрального лимфоцита и нескольких периферических лимфоцитов, соединенных с центральным лимфоцитом уropодами (рис. 5.6). Образование кластера начиналось с образования контакта между антиген-специфическим центральным лимфоцитом и несущим антиген макрофагом. Затем расположенные рядом лимфоциты, неспецифические в отношении антигена, с которыми инкубировали макрофаги, присоединялись к центральному лимфоциту. Центральный лимфоцит (но не периферические) затем начинал синтезировать ДНК. В исследованиях, описанных выше, в которых монослой тщательно отмывали перед фиксацией, обнаруживался только центральный лимфоцит.

Таким образом, в кластере имеют место два типа физического взаимодействия: антиген-специфическое взаимодействие между макрофагом и центральным лимфоцитом и антиген-неспецифическое взаимодействие между центральным и периферическими лимфоцитами. Вряд ли поверхность центрального лимфоцита обладает просто неспецифической адгезивностью, поскольку ни гомологичные, ни гетерологичные эритроциты не прикрепляются к центральному лимфоциту. Микрокинематографические исследования показали, что периферические лимфоциты сформировавшегося кластера взаимодействуют

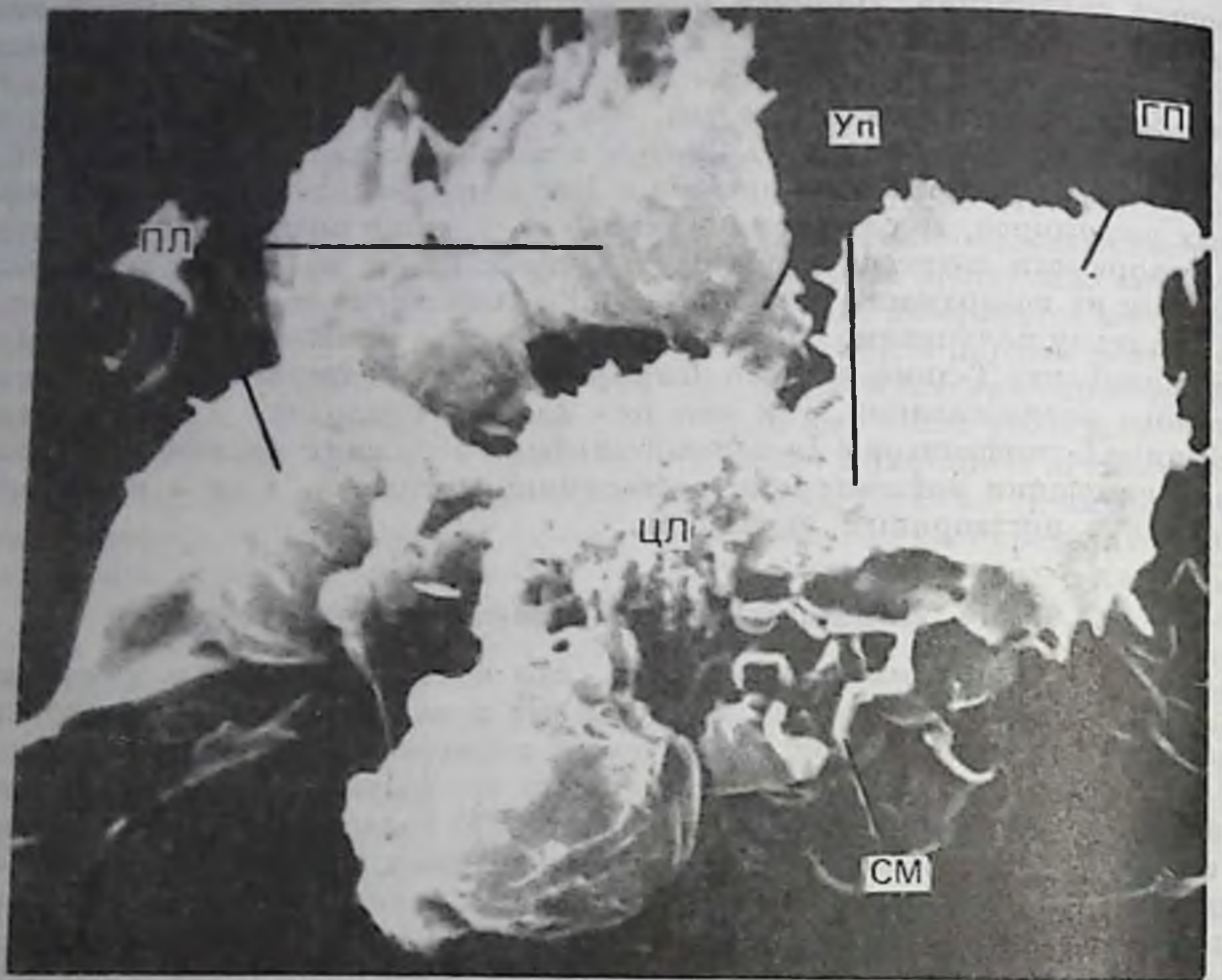


Рис. 5.5. Сканирующая электронная микрофотография кластеров лимфоцит—макрофаг. Периферические лимфоциты (ПЛ) прикреплены к центральному лимфоциту (ЦЛ) тонкими уropодами (Уп). Периферические лим-

фоциты имеют гладкую поверхность, а центральный лимфоцит — микроворсинчатую. ГП — гребенчатые псевдоподии, СМ — складки на поверхности макрофага [77].

с центральным лимфоцитом короткое время; затем они покидают кластер и заменяются новыми лимфоцитами, присутствующими в культуре. Условия взаимодействия центрального лимфоцита с периферическими можно было анализировать, встряхивая культуру с такой силой, чтобы взаимодействие центрального лимфоцита с периферическими нарушалось, а его связь с макрофагом оставалась неповрежденной [78]. Если затем в культуру добавляли достаточное число лимфоцитов, то восстановление кластеров происходило за 4—6 ч. Исследования такого рода показали, что периферические лимфоциты не должны быть иммунны к антигену, использованному для образования кластеров, и что во взаимодействии периферических лимфоцитов с центральным не существует ограничений по I-району. Более того, В-лимфоциты также могут входить в состав кластера как периферические лимфоциты, хотя в этом случае не наблюдается образования уropод.

Хотя физическое взаимодействие между центральным лимфоцитом и инкубированным с антигеном макрофагом, по-видимому, играет решающую роль в активации антиген-специфических Т-лимфоцитов, значение связывания периферических лимфоцитов с центральным остается неясным. Возможно, это взаимодействие представляет собой физическое проявление механизма активации и размножения лимфоцитов, осуществляемого с помощью прямых физических

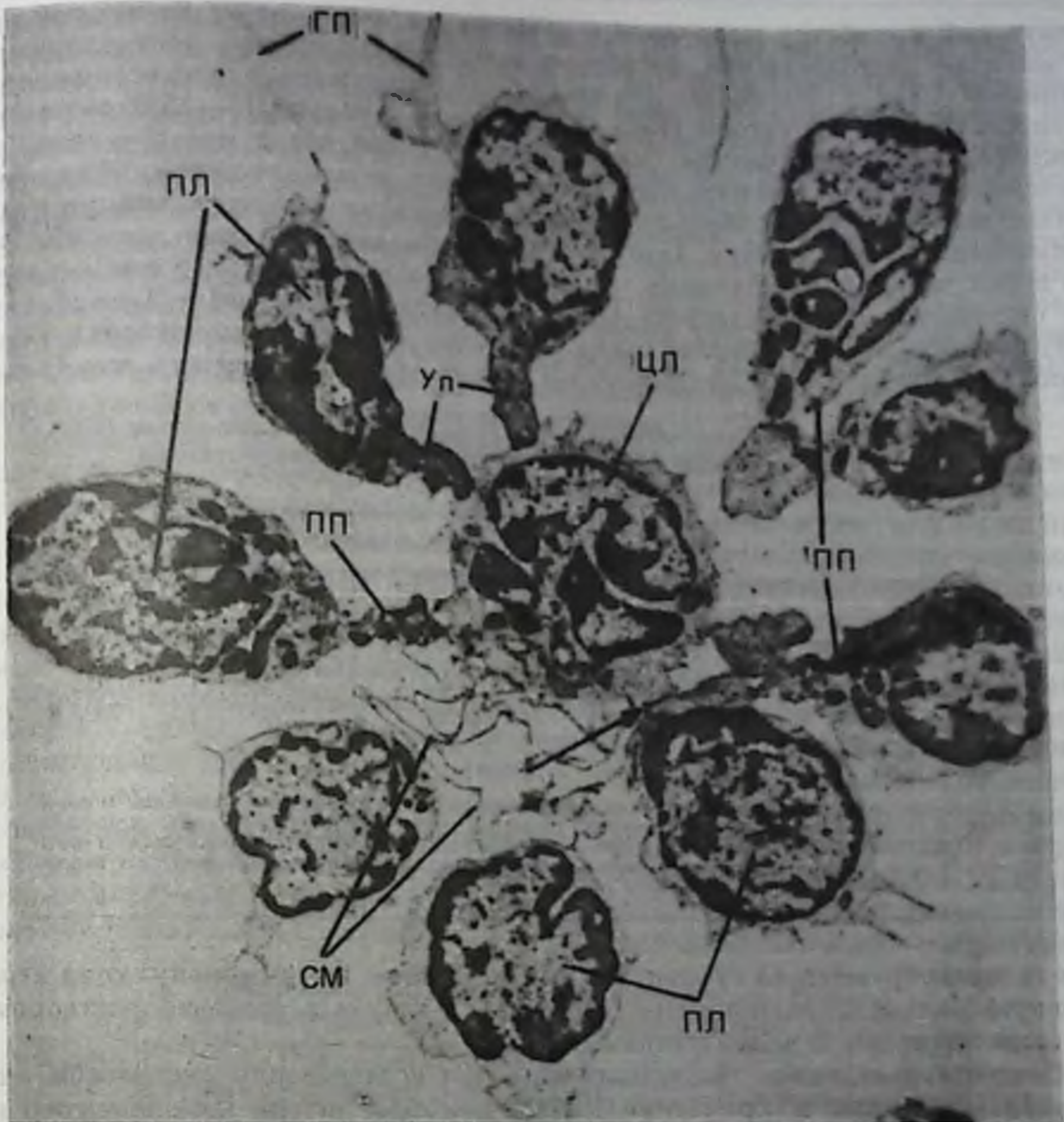


Рис. 5.6. Периферические лимфоциты (ПЛ) — некоторые с тонкими уropодами (Уп) и один без уropода (показан стрелкой) — прикреплены к поверхности центрального лимфоцита. Внутри клеток и в некоторых уropодах периферических лимфоцитов видны элек-

тронно-прозрачные пузырьки (ПП). СМ — складки на поверхности макрофага, ГП — срез гребенчатой псевдоподии периферического лимфоцита, ЦЛ — центральный лимфоцит. $\times 4600$ ([77]; печатается с разрешения издательства).

контактов, а не растворимых факторов. Это взаимодействие требует дальнейшего изучения и может играть важную роль *in vivo* в формировании зародышевых центров.

5.6. Модуляция экспрессии Ia-антигенов макрофагами

Как неоднократно подчеркивалось в этой главе, Ia-антигены макрофагов играют разностороннюю и важную роль в процессе активации Т-клеток: от функционирования в качестве молекулы, способной передавать сигнал, инду-

цирующий выработку моноклинов в ответ на митогены, до их возможной роли в качестве специфической антигенсвязывающей молекулы, контролирующей функцию генов *Ig*. Несколько лет назад было обнаружено, что не все макрофаги экспрессируют Ia-антигены [79]. Так, например, только 15—25% очищенных макрофагов морской свинки, индуцированных введенным маслом, могли быть лизированы при обработке анти-Ia-сывороткой и комплементом. Макрофаги, оставшиеся после такой обработки живыми, оказались неповрежденными и метаболически активными: они активно фагоцитировали латексные шарики. В то же время эти Ia-отрицательные макрофаги были в значительной степени лишены способности презентировать белковые антигены иммунным T-лимфоцитам и функционировать в качестве стимулирующих клеток при смешивании с аллогенными T-клетками в РСЛ (табл. 5.18). Таким образом, оказалось, что Ia-анти-

Таблица 5.18. Влияние обработки антителами к Ia и комплементом (К) на способность макрофагов презентировать белковые антигены и аллоантигены¹⁾ [79]

Обработка макрофагов	Ответ (имп/мин) на			
	среду	ДФ-ГЛ	ОБПТ	РСЛ
НСМС + К	352	88 666	59 549	105 844
Анти-Ia + К	256	6657	993	7096

¹⁾ Макрофаги нормальных морских свинок линии 2 инкубировали с антигеном и обрабатывали нормальной сывороткой морской свинки и комплементом (НСМС + К) или анти-Ia + К. Одинаковое число живых клеток смешивали с сингенными примированными T-лимфоцитами для определения антиген-специфической стимуляции или с аллогенными T-лимфоцитами для измерения способности реагировать в РСЛ.

гены экспрессируются на субпопуляции макрофагов, и эта субпопуляция играет основную роль в активации пролиферации T-клеток в ответ на растворимые белковые антигены и аллоантигены.

Сходные результаты были получены при исследовании экспрессии антигенов Ia мышинными макрофагами [80]. С помощью метода комплементзависимой цитотоксичности и протонного микрофлуориметрического анализа Ia-антигены удалось обнаружить в среднем у 8—15% клеток, имеющих морфологические и функциональные характеристики макрофагов и полученных из популяции перитонеального экссудата. Позднее Кауинг и др. [81] обнаружили, что доля Ia-положительных макрофагов заметно варьирует в зависимости от ткани, из которой были получены макрофаги (табл. 5.19). Среди прикрепляющихся

Таблица 5.19. Вариации в относительном количестве Ia-положительных макрофагов

Источник клеток	Доля Ia-положительных макрофагов, %	Источник клеток	Доля Ia-положительных макрофагов, %
Брюшная полость (резиденты)	10—20	Тимус	75
Селезенка	50	Легкие	10 (мышь)
Кожа	90	Кровь	80 (морская свинка)
Печень	25—30		75 (человек)

клеток селезенки, имеющих морфологию макрофагов, 60—70% несли антигены Ia, в то время как из макрофагов брюшной полости лишь 10—15% были Ia-положительными. Более того, оказалось, что экспрессию Ia-антигенов нельзя считать стабильной характеристикой прикрепляющихся клеток селезенки, поскольку при культивировании в течение 7 дней экспрессия Ia-антигенов спонтанно прекращалась. Аналогично результатам, полученным на морских свинках, данные цитотоксических опытов с использованием комплемента и лизител к Ia-антигенам показали, что функцию вспомогательных клеток выполняет субпопуляция макрофагов, несущих продукты субрайонов I-A и I-E. Способность к осуществлению функций вспомогательных клеток также коррелировала с долей клеток, экспрессирующих Ia-антигены; прикрепляющиеся клетки селезенки были гораздо более активными вспомогательными клетками, чем прикрепляющиеся клетки из брюшной полости.

Приведенные результаты убедительно показывают, что между наличием Ia-антигенов и способностью функционировать как вспомогательная клетка имеется непосредственная связь. Эти исследования поднимают также ряд интересных вопросов, касающихся иммунологии функционирования вспомогательных клеток. Относятся ли Ia-положительные вспомогательные клетки к той же клеточной линии, что и Ia-отрицательные вспомогательные клетки? Или — при несколько иной формулировке вопроса — не отражает ли наличие или отсутствие Ia-антигенов стадию дифференцировки одной линии клеток?

Чрезвычайно плодотворный подход для ответа на эти вопросы применили Беллер и сотр. [82, 83], детально исследовавшие, какую долю составляют Ia-положительные клетки среди макрофагов, полученных из различных источников. При этом исследовали также вопрос о том, как влияют на экспрессию макрофагами Ia-антигенов различные иммунологические воздействия и другие факторы среды. Были обнаружены изменения относительного числа Ia-положительных макрофагов в перитонеальных экссудатах при воздействии разных стимулов (табл. 5.20). Те стимулы, которые вызывали обогащение перитонеаль-

Таблица 5.20. Изменения в относительном количестве Ia-положительных макрофагов у иммунизированных мышей¹⁾ [82]

Иммуны к	Инъекция	Клетки перитонеального экссудата ($\times 10^{-6}$)	Доля Ia-положительных макрофагов, %
KLH	—	4,0	2,6
	KLH	4,0	53,2
<i>Listeria</i>	<i>Listeria</i>	4,2	10,2
	—	3,4	26,9
	KLH	4,7	33,3
	<i>Listeria</i>	5,2	59,1

¹⁾ Мышей иммунизировали KLH или живыми клетками *Listeria*. За 3 дня до получения экссудата мышам инъецировали в брюшную полость растворимый KLH или убитые нагреванием *Listeria*.

ного экссудата Ia-положительными клетками, были связаны по крайней мере частично с иммунологическими процессами. Вещества, вызывающие общее воспаление, такие, как минеральное масло или культуральный бульон, индуцировали образование экссудатов, в которых не наблюдалось заметного изменения в соотношении Ia-положительных и Ia-отрицательных макрофагов. Иммунизация сильными антигенами, такими, как KLH или организмы *Listeria*,

вызывали сдвиги в составе экссудата в сторону обогащения Ia-положительными клетками. Невозможность обнаружить значительное количество Ia-положительных макрофагов в экссудатах, индуцированных неиммунологическим путем, нельзя объяснить более медленным развитием ответа. Пептон, триглицериды и минеральное масло вызывали увеличение абсолютного числа Ia-положительных клеток, но никогда не повышали их относительного содержания.

Очень важен тот факт, что способность вызывать образование экссудатов, обогащенных Ia-положительными макрофагами, может переноситься иммунными T-клетками. Этот результат демонстрирует двойную роль T-клеток в осуществлении функционирования и регуляции вспомогательных клеток. Ia-положительные макрофаги необходимы для активации антиген-специфических T-клеток; после активации T-клетки могут регулировать прямо или косвенно Ia-фенотип макрофагов. Иммуногенные стимулы, таким образом, могут регулировать появление Ia-положительных макрофагов как локально, так и системно. Исходя из этого, весьма вероятно, что Ia-антигены определяют не стабильную субпопуляцию макрофагов, а специфическую стадию развития клеточной линии моноцитов-макрофагов.

Детальный анализ механизмов, с помощью которых T-клетки регулируют экспрессию Ia макрофагами, стал возможным после идентификации растворимого медиатора, освобождающегося при взаимодействии *in vitro* стимулированных антигеном T-клеток с макрофагами. Этот медиатор способен *in vivo* индуцировать экссудаты, богатые Ia-положительными макрофагами [84]. Для выработки этого медиатора, названного MIRF (от англ. macrophage Ia recruiting factor — фактор, рекрутирующий Ia макрофагов), требуется взаимодействие Ia-положительных макрофагов, иммунных T-клеток и присутствие специфического антигена. Для образования и поддержания экссудата, содержащего большое количество Ia-положительных клеток, требуются периодические инъекции этого фактора. Инъекция MIRF повышала долю Ia-положительных макрофагов от 10% (базальный уровень) до 50—90%. Этот ответ полностью исчезал, если до инъекции MIRF или иммунных T-клеток мыши получали летальную дозу облучения. Перенос костномозговых клеток облученным мышам в значительной степени восстанавливал их способность реагировать на иммунологические стимулы, даже если переносимые клетки костного мозга предварительно освобождали от Ia-положительных клеток. Таким образом, для поддержания высокого содержания Ia-положительных макрофагов, индуцируемого MIRF, требуется наличие обновляемых стволовых клеток [85]. После облучения MIRF не вызывал превращения даже недавно образовавшихся Ia-отрицательных клеток в Ia-положительные. Тот факт, что MIRF не способен индуцировать образование Ia-положительной популяции у облученных животных, стимулированных триглицеридом, показывает, что зрелые макрофаги, даже совсем недавно поступившие из кровотока, не могут служить мишенью действия медиаторов, выделяемых T-клетками. Видимо, превращение зрелых Ia-отрицательных макрофагов *in situ* в Ia-положительные не является основным механизмом образования *in vivo* Ia-положительного экссудата. Облучение, по-видимому, препятствует поступлению соответствующих клеток-мишеней.

Результаты, полученные при исследовании MIRF *in vivo*, в определенном отношении отличаются от результатов некоторых исследований, в которых было показано, что зрелые Ia-отрицательные перитонеальные макрофаги могут превращаться в Ia-положительные в культуре под действием растворимых медиаторов. Лимфокин из стимулированных антигеном клеток селезенки животных, иммунизированных *Trypanosoma cruzi*, увеличивал экспрессию и синтез Ia-антигенов макрофагов, причем этот ответ характеризовался зависи-

мостью от дозы и времени воздействия [86]. Пока неясно, все ли представители линии мононуклеарных фагоцитов усиливают экспрессию Ia-антигенов в ответ на медиатор, поскольку эти исследования проводились на клетках, индуцированных протениазным пептоном. Менее значительное увеличение экспрессии Ia-антигенов наблюдалось на обработанных медиатором резидентных макрофагах брюшной полости и селезенки.

Культуральная среда клеток селезенки, активированных конканавалином (Кон) А, также индуцировала экспрессию Ia-антигенов мышинными макрофагами *in vitro* [87]. Биохимическое исследование этого медиатора показало, что фактор, регулирующий Ia-антигены макрофагов, имеет такие же молекулярную массу, ИЭТ, а также гидрофобные и аффинные свойства, как и иммунный интерферон (ИФ- γ). Антисыворотка к мышинному ИФ- γ нейтрализовала как активность ИФ- γ культуральной среды, так и активность, регулирующую Ia-антиген макрофагов. Более того, частично очищенный ИФ- γ индуцировал экспрессию Ia-антигена макрофагами *in vitro*. Эти результаты показывают, что *in vivo* в тканях с высоким относительным содержанием Ia-положительных клеток экспрессия Ia-антигенов макрофагов может индуцироваться и поддерживаться при постоянном небольшом уровне образования ИФ- γ . Взаимосвязь между MIRF и ИФ- γ остается неясной и требует дальнейших биохимических исследований.

Предпринимались также попытки обнаружить медиаторы, понижающие экспрессию Ia-антигенов на макрофагах. В исследованиях на новорожденных животных, у которых количество Ia-положительных макрофагов очень невелико, было установлено, что продукт молодых реплицирующихся макрофагов подавляет экспрессию Ia-антигенов зрелыми макрофагами [88]. Недавно было обнаружено [89], что простагландины серии E (ПГЕ) сильно ингибируют экспрессию Ia-антигенов на макрофагах, индуцированных лимфокинами, и что тромбосан B2 препятствует данному эффекту ПГЕ (табл. 5.21). Регуляция

Таблица 5.21. Подавление простагландинами экспрессии Ia-антигенов¹⁾ [89]

Обработка		Доля (%) клеток, экспрессирующих	
лимфокин	ПГЕ ₂	Ia	H-2K
—	—	1	78
+	—	37	83
+	10 ⁻⁹ M	18	82
+	10 ⁻⁷ M	5	82
+	10 ⁻⁶ M	2	77

1) Макрофаги культивировали в течение 6 дней в среде, содержащей 2% лимфокинов. Простагландины добавляли в последние двое суток культивирования. Экспрессию Ia и H-2K определяли иммунофлуоресцентным методом.

экспрессии Ia-антигенов простагландинами может быть важным контролирующим механизмом в индуктивной фазе иммунного ответа. Потеря Ia-антигена макрофагами после инкубации с ПГЕ сопровождалась снижением способности презентировать антиген иммунным T-клеткам.

Изучение индукции экспрессии Ia-антигенов лимфокинами *in vitro* показало, что почти все Ia-отрицательные макрофаги могут быть превращены в Ia-положительные. Из этого, очевидно, можно сделать вывод, что Ia-положительные и Ia-отрицательные макрофаги возникают из одной и той же линии клеток. Тем не менее недавно была предпринята попытка определить, разделяется ли линия фагоцитов на определенной стадии созревания на два отдельных суб-класса, Ia-положительные и Ia-отрицательные клетки, т. е. существуют ли предшественники, дающие начало макрофагам, никогда не экспрессирующим Ia-антигены, и предшественники, из которых образуются макрофаги, способные экспрессировать Ia-антигены в зависимости от условий окружающей среды [90]. Макрофаги выращивали из костномозговых предшественников и определяли условия, в которых эти клетки начинают экспрессировать Ia-антигены.

Макрофаги, культивируемые в среде, кондиционированной L-клетками, оставались Ia-отрицательными, хотя и пролиферировали. Следовательно, у активно пролиферирующих клеток не наблюдается спонтанной экспрессии Ia-антигенов. После удаления ростовых стимулов небольшая доля макрофагов в течение непродолжительного времени спонтанно экспрессировала Ia-антигены. В присутствии же T-клеточных лимфокинов экспрессия Ia-антигенов была более стабильной и наблюдалась у большинства макрофагов. Все предшественники макрофагов давали начало клеткам, способным экспрессировать Ia-антигены: после стимуляции T-клеточными лимфокинами Ia-положительные макрофаги обнаруживались в 100% колоний. Эти результаты противоречат существованию отдельных линий Ia-положительных и Ia-отрицательных макрофагов. По-видимому, имеется лишь одна линия мононуклеарных фагоцитов, регулируемая различными индуктивными сигналами. До сих пор остается неясным, на каком этапе происходит изменение, в результате которого иммунные стимулы вызывают образование Ia-положительных эксудатов, а неиммунные стимулы — образование Ia-отрицательных эксудатов.

5.7. Макрофаг как эффекторная клетка

5.7.1. Активация макрофагов

В этой главе был детально проанализирован механизм регуляции взаимодействия вспомогательных клеток с T-лимфоцитами, приводящего к активации T-клеток, появлению у них хелперной функции и, как результат, защитной иммунной реакции. Другой аспект участия макрофагов в иммунном ответе на инфекционные агенты и опухолевые клетки включает в себя их активацию. Для развития активированного состояния макрофагов необходимо их взаимодействие со стимулированными T-лимфоцитами или их продуктами. Таким образом, имеет место замкнутый цикл

Антиген → Макрофаг → T-клетка → Макрофаг → Антиген.

В результате антиген эффективно элиминируется. Таким образом, фагоцит несет двойную функцию: с одной стороны, он традиционно играет роль «мусорщика», убирающего антиген, а с другой стороны, перерабатывая антиген, рекрутирует и стимулирует T-лимфоциты.

Защита от заражения многими внутриклеточными бактериями (*Mycobacteria*, *Salmonella*, *Brucella* и *Listeria*), вирусами, некоторыми паразитами и грибами включает активацию макрофагов, в результате которой они начинают активно уничтожать клетки. Термин «активированный макрофаг» первоначально

но означал повышенную бактерицидную активность макрофагов животных, приобретших иммунитет к инфицированию факультативными внутриклеточными бактериальными паразитами [91]. Одно из наиболее непонятных наблюдений заключалось в том, что активация макрофагов одним видом бактерий вызывала резистентность к другому, неродственному виду. Откуда же возникает в этих реакциях антигенная специфичность? Макэнесс [92] обнаружил, что клетками, обеспечивающими специфичность и взаимодействующими с макрофагами, являются лимфоциты. В опытах с переносом клеток нормальные мыши, которым вводили живые лимфоциты от мышей, иммунных к *Listeria monocytogenes*, оказывались защищенными от летальной дозы инфекции при заражении *Listeria*, но не туберкулезной бациллой. В то же время такие мыши легко сопротивлялись двойной инфекции, вызванной одновременным введением обоих микроорганизмов. Был сделан вывод, что Т-лимфоциты, иммунные к *Listeria*, индуцируют активацию макрофагов только специфически в ответ на введение клеток *Listeria*, но не туберкулезных бацилл, поскольку иммунных к последним лимфоцитов в трансплантируемых клетках не содержалось. Активированные же макрофаги могли защищать организм от любого постороннего патогена. Саймон и Шегрэн [93] провели сходные работы *in vitro* и показали, что нормальные макрофаги, инкубированные в присутствии специфического антигена и sensibilizированных им лимфоцитов, приобретают повышенную бактерицидную активность по отношению к неродственному патогену (табл. 5.22). Таким

Таблица 5.22. Индукция неспецифических бактерицидных свойств иммунными Т-клетками и антигеном¹⁾ [93]

№ эксперимента	Живые внутриклеточные <i>Listeria</i> ($\times 10^{-3}$)			
	Клетки, примированные САЧ ²⁾		Контрольные клетки	
1	$\frac{+САЧ}{75}$	$\frac{-САЧ}{3147}$	$\frac{+САЧ}{1641}$	$\frac{-САЧ}{2252}$
	Клетки, примированные БЦЖ		Контрольные клетки	
2	$\frac{+БЦЖ}{105}$	$\frac{-БЦЖ}{3722}$	$\frac{+БЦЖ}{4197}$	$\frac{-БЦЖ}{4916}$

1) Бактерицидные свойства клеток перитонеального экссудата иммунных и контрольных животных определяли, подсчитывая в культуре число живых клеток *Listeria* через 4 ч после заражения. Значительное увеличение бактерицидных свойств перитонеальных клеток иммунных животных наблюдалось в том случае, если за 24 ч до заражения к культурам добавляли антиген.

2) САЧ — сывороточный альбумин человека.

образом, адаптивные изменения макрофагов, лежащие в основе приобретенного иммунитета, индуцируются растворимыми факторами, которые секретируются специфично активированными Т-лимфоцитами.

Функциональное проявление макрофагов *in vivo* — это сложный процесс, происходящий в очаге воспаления. Проникнув туда, sensibilizированные лимфоциты и мононуклеарные фагоциты взаимодействуют друг с другом и со специфическим антигеном. В создании условий, облегчающих проникновение достаточного количества эффекторных макрофагов, могут участвовать механизмы положительной обратной связи, осуществляемой медиаторами, выделяе-

мыми макрофагами и лимфоцитами. Возможно, макрофагам для того, чтобы стать восприимчивыми к активации лимфокинами, необходимо каким-то образом модифицироваться под влиянием самого процесса воспаления.

Механизмы, регулирующие антимикробную активность макрофагов, и их связь с процессом активации макрофагов интенсивно исследовались в последние годы [94] (см. гл. 27). Было высказано предположение о наличии корреляции между активацией макрофагов и их способностью секретировать H_2O_2 . В основе этого вывода лежало следующее наблюдение: введение мышам различных микробных вакцин значительно повышает выделение H_2O_2 их макрофагами в ответ на такие стимуляторы секреции, как форболмиристатацетат (ФМА). Еще более убедительные данные в пользу такой корреляции были получены при прямом сравнении секреции H_2O_2 макрофагами и их способности убивать внутриклеточные паразиты *Trypanosoma cruzi*. Иммунизация мышей и повторное введение им этих микроорганизмов активировали как секрецию макрофагами H_2O_2 в ответ на ФМА или опсонизированный зимозан, так и способность убивать *T. cruzi* in vitro. Оба этих свойства терялись через несколько суток культивирования, причем со сходной кинетикой. Однократная инъекция убитых *T. cruzi* или пептона увеличивала секрецию H_2O_2 очень незначительно и не повышала способности макрофагов убивать трипаносом. Инкубация макрофагов в среде, богатой лимфокинами, активировала обе функции, причем для обеих функций наблюдалась одинаковая зависимость от дозы и времени инкубации. При удалении лимфокинов степень выраженности обеих функций возвращалась к исходному уровню с одинаковой кинетикой.

Таким образом, способность макрофагов секретировать реакционноспособные производные кислорода строго коррелирует со степенью их активации, определяемой по способности убивать определенные патогенные внутриклеточные микроорганизмы. Наличие такой корреляции, по-видимому, отражает прямое участие этих веществ в уничтожении микробов. Несомненно, однако, что макрофаги обладают и независимыми от кислорода важными механизмами антимикробной активности. Создается также впечатление, что некоторые одинаковые биохимические процессы используются макрофагами и для модификации их окружения и переработки фагоцитированных частиц. Так, например, окислительные механизмы участвуют не только в подавлении внутриклеточных паразитов, но также и в уничтожении опухолевых клеток, а возможно, и некоторых тканей в местах воспаления.

5.7.2. Макрофаг как секреторная клетка

Макрофаги секретируют множество различных продуктов (табл. 5.23) и в этом отношении могут соперничать даже с гепатоцитами [95]. К наиболее важным продуктам секреции макрофагов относятся протеиназы, активирующиеся при нейтральных значениях pH. Активатор плазминогена катализирует образование пламина из фиброгена, а коллагеназа и эластаза, две другие важные нейтральные протеиназы, разрушают компоненты стенок сосудов, окружающие сосуды тканей и поверхности суставов. Продукты расщепления комплемента и деградации коллагена вызывают хемотаксис макрофагов. Таким образом, активность нейтральных протеиназ может способствовать дальнейшему скоплению мононуклеарных фагоцитов. Макрофаги, однако, секретируют также α -2-макроглобулин, ингибитор пламина и активатор плазминогена, коллагеназу, эластазу и калликреин. Комплекс этих ферментов с ингибитором присоединяется к рецепторам на поверхности макрофагов, поглощается и разрушается. Секреция нейтральных протеиназ индуцируется рядом агентов,

Таблица 5.23. Секретируемые продукты макрофагов [95]

Ферменты Лизоцим Нейтральные протеиназы Активатор плазминогена Коллагеназа Эластаза Ангиотензин-конвертаза Кислые гидролазы Протеиназы Липазы Рибонуклеазы Фосфатазы Гликозидазы Сульфатазы Компоненты комплемента C1, C4, C2, C3, C5 Факторы В и D Пропердин Инактиватор C3b β ₂ H Ингибиторы ферментов α ₂ -макрोगлобулин Ингибиторы плазмина Связывающие белки Трансферрин Транскобаламин II Фибронектин Эндогенные пирогены	Реакционноспособные метаболиты кислорода Супероксид Пероксид водорода Гидроксильный радикал Биоактивные липиды Метаболиты арахидоновой кислоты Простагландин E ₂ 6-оксопростагландин F _{1α} Тромбоксан Лейкотриен Гидроксиэйкозотетраеновая кислота Факторы, активирующие тромбоциты Хемотаксические факторы нейтрофилов Факторы, регулирующие синтез белков в других клетках Факторы, стимулирующие репликацию: Лимфоцитов — ИЛ-1 Миелоидных предшественников — КСФ Фибробластов Факторы, угнетающие репликацию: Лимфоцитов Опухолевых клеток
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

таких, как эндотоксин, иммунные комплексы и другие поглощаемые частицы. Секреция же макрофагами других ферментов, например лизоцима, происходит конститутивно.

Макрофаги синтезируют и секретируют многие компоненты комплемента, связывают активированный комплемент с помощью нескольких различающихся между собой рецепторов и разрушают комплемент протеиназами. Взаимодействуя с рецепторами на поверхности макрофагов, комплемент влияет на их миграционное поведение, эндоцитоз и секрецию. Анафилотоксины (C3a и C5a) стимулируют миграцию макрофагов, а продукт альтернативного пути (C3b), напротив, подавляет миграцию и стимулирует их распластывание. При уменьшении pH в месте воспаления кислые гидролазы лизосом, которые раньше считали исключительно внутриклеточными ферментами, секретируются во внеклеточную среду, где они могут разрушать коллаген, базальные мембраны и другие компоненты соединительной ткани. Многие из перечисленных стимулов, вызывающих секрецию ферментов, могут также за считанные секунды активировать секрецию сильных окислителей, таких, как супероксиды, пероксид водорода и гидроксильные радикалы. Эти вещества могут окислять тиоловые группы ферментов и разрушать связи в молекулах белков, липидов и нуклеиновых кислот.

Краткое содержание

Мечников рассматривал макрофаг как клетку-мусорщик, предназначенную для охраны и защиты организма от чужеродных существ. Хотя мононуклеарные фагоциты выполняют и эту функцию, их роль в регуляции иммунного

ответа имеет гораздо большее значение. В этой главе я описал двунаправленные взаимодействия макрофагов с Т-лимфоцитами. Наибольшую важность имеет участие макрофагов на всех фазах индукции клеточного иммунитета. Некоторые свойства клетки-мусорщика, т. е. способность захватывать и разрушать чужеродные материалы, несомненно играют важную роль и в этой функции макрофагов. Однако взаимодействие макрофагов с Т-лимфоцитами требует также экспрессии поверхностных Ia-антигенов, причем регуляция экспрессии Ia-антигенов на макрофагах происходит при участии многих сложных межклеточных взаимодействий и растворимых медиаторов. Двунаправленные взаимодействия макрофагов с Т-клетками существенны и тогда, когда иммунитет уже установился и фагоциты начинают принимать в нем непосредственное участие. Активация Т-лимфоцитов приводит к секреции ими набора медиаторов, позволяющих макрофагам выполнять свою функцию «мусорщиков»: обуздании внутриклеточных микроорганизмов и защиту организма от опухолей.

ЛИТЕРАТУРА

Цитируемая

1. Van Furth R. Current view on the mononuclear phagocyte system, *Immunobiology*, 161, 178—185 (1982).
2. Van Furth R. Cells of the mononuclear phagocyte system. Nomenclature in terms of sites and conditions. In: *Mononuclear Phagocytes: Functional Aspects*, edited by R. Van Furth, pp. 1—30, Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, 1980.
3. Silberberg-Sinakin I., Gigli I., Baer R. L., Thorbecke G. J. Langerhans cells: Role in contact hypersensitivity and relationship to lymphoid dendritic cells and to macrophages, *Immunol. Rev.*, 53, 203—232 (1980).
4. Ho M. K., Springer T. A. MAC-1 antigen: Quantitative expression in macrophage populations and tissues, and immunofluorescent localization in spleen, *J. Immunol.*, 128, 2281—2286 (1982).
5. Ho M. K., Springer T. A. MAC-2: A novel 32 000 Mr macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies, *J. Immunol.*, 128, 1221—1225 (1982).
6. Rogoff T. M., Lipsky P. E. Characterization of isolated guinea pig Kupffer cells: Accessory cell function in mitogen-induced T lymphocyte activation, *J. Immunol.*, 123, 1920—1927 (1979).
7. Rogoff T. M., Lipsky P. E. Antigen presentation by isolated guinea pig Kupffer cells, *J. Immunol.*, 124, 1740—1744 (1980).
8. Lipscomb M. R., Toews G. R., Lyons C. R., Uhr J. W. Antigen presentation by guinea pig alveolar macrophages, *J. Immunol.*, 126, 286—291 (1981).
9. Lyons C. R., Lipscomb M. F. Alveolar macrophages in pulmonary immune responses. I. Role in initiation of primary immune responses and in selective recruitment of T lymphocytes to the lung, *J. Immunol.*, 130, 1113—1119 (1983).
10. Steinman R. M., Kaplan G., Witmer M. D., Cohn Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro, *J. exp. Med.*, 149, 1—16 (1979).
11. Nussenzweig M. C., Steinman R. M., Witmer M. D., Gutchinov B. A monoclonal antibody specific for mouse dendritic cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 161—165 (1982).
12. Steinman R. M., Witmer M. D. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 5132—5136 (1978).
13. Glimcher L. H., Kim J. K., Green I., Paul W. E. Ia antigen-bearing B cell tumor lines can present protein antigen and alloantigen in a major histocompatibility complex-restricted fashion to antigen-reactive T cells, *J. Exp. Med.*, 155, 445—459 (1982).
14. Issekutz T., Chu E., Geha R. S. Antigen presentation by human B cells: T cell proliferation induced by Epstein Barr virus B lymphoblastoid cells, *J. Immunol.*, 129, 1446—1450 (1982).
15. Chesnut R. W., Colon S. M., Grey H. M. Antigen presentation by normal B cells. B cell tumors, and macrophages: Functional and biochemical comparison, *J. Immunol.*, 128, 1764—1768 (1982).
16. Oppenheim J. J., Leventhal B. G., Hersh E. M. The transformation of column-purified lymphocytes with nonspecific and specific antigenic stimuli, *J. Immunol.*, 101, 262—270 (1968).

17. Waldron J. A., Horn R. G., Rosenthal A. S. Antigen-induced proliferation of guinea pig lymphocytes in vitro: Obligatory role of macrophages in the recognition of antigen by immune T-lymphocytes, *J. Immunol.*, 111, 58—64 (1973).
18. Cohen B. E., Rosenthal A. S., Paul W. E. Antigen-macrophage interaction. II. Relative roles of cytophilic antibody and other membrane sites, *J. Immunol.*, 111, 820—828 (1973).
19. Greineder D. K., Rosenthal A. S. Macrophage activation of allogeneic lymphocyte proliferation in the guinea pig mixed leukocyte reaction, *J. Immunol.*, 114, 1541—1547 (1975).
20. Ahmann G. B., Nadler P. I., Birnkrant A., Hodes R. J. T cell recognition in the mixed lymphocyte response. I. Non-T, radiation-resistant splenic adherent cells are the predominant stimulators in the murine mixed lymphocyte reaction, *J. Immunol.*, 123, 903—909 (1979).
21. Ahmann G. B., Nadler P. I., Birnkrant A., Hodes R. J. T cell recognition in the mixed lymphocyte response. II. Ia-positive splenic adherent cells are required for non-I region-induced stimulation, *J. Immunol.*, 127, 2308—2313 (1981).
22. Levis W. R., Robbins J. H. Effect of glass-adherent cells on the blastogenic response of purified lymphocytes to phytohemagglutinin, *Exp. Cell Res.*, 61, 153—158 (1970).
23. Rosenstreich D. L., Oppenheim J. J. The role of macrophages in the activation of T and B lymphocytes in vitro. In: *Immunobiology of the Macrophage*, edited by D. S. Nelson, pp. 162—201, Academic Press, New York, 1976.
24. Greineder D. K., Rosenthal A. S. The requirement for macrophage-lymphocyte interaction in T lymphocyte proliferation induced by generation of aldehydes on cell membranes, *J. Immunol.*, 115, 932—938 (1975).
25. Habu S., Raff M. C. Accessory cell dependence of lectin-induced proliferation of mouse T lymphocytes, *Eur. J. Immunol.*, 7, 451—457 (1977).
26. Ahmann G. B., Sachs D. H., Hodes R. J. Requirement for an Ia-bearing accessory cell in Con A-induced T cell proliferation, *J. Immunol.*, 121, 1981—1989 (1978).
27. Rock K. L. The role of Ia molecules in the activation of T lymphocytes. I. Activation of an IL-1 dependent IL-2 producing T cell hybridoma by Con A requires an interaction, which is not H-2 restricted, with an Ia-bearing accessory cell, *J. Immunol.*, 129, 1360—1366 (1982).
28. Durum S. K., Gershon R. K. Interleukin I can replace the requirement for I-A-positive cells in the proliferation of antigen-primed T cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 4747—4750 (1982).
29. Mosier D. E. A requirement for two cell types for antibody formation in vitro, *Science*, 158, 1573—1575 (1967).
30. Katz D. H., Unanue E. R. Critical role of determinant presentation in the induction of specific responses in immunocompetent lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 137, 967—990 (1973).
31. Chen C., Hirsch J. G. The effects of mercaptoethanol and peritoneal macrophages on the antibody-forming capacity of nonadherent mouse spleen cells in vitro, *J. Exp. Med.*, 136, 604—617 (1972).
32. Morrissey P. J., Boswell H. S., Scher I., Singer A. Role of accessory cells in B cell activation. IV. Ia⁺ accessory cells are required for the in vitro generation of thymic independent type 2 antibody responses to polysaccharide antigens, *J. Immunol.*, 127, 1345—1347 (1981).
33. Wetzel G. D., Kettman J. R. Activation of murine B lymphocytes. III. Stimulation of B lymphocyte clonal growth with lipopolysaccharide and dextran sulfate, *J. Immunol.*, 126, 723—728 (1981).
34. Sieckmann D. G., Scher I., Asofsky R., Mosier D. E., Paul W. E. Activation of mouse lymphocytes by antiimmunoglobulin. II. A thymus-independent response by a mature subset of B lymphocyte, *J. Exp. Med.*, 148, 1628—1643 (1978).
35. 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).
36. 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—1229 (1973).
37. 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—180 (1978).
38. Barcinski M. A., Rosenthal A. S. Immune response gene control of determinant selection. I. Intramolecular mapping of the immunogenic sites on insulin recognized by guinea pig T and B cells, *J. Exp. Med.*, 145, 726—742 (1977).
39. Rosenthal A. S., Barcinski M. A., Blake J. T. Determinant selection is a macrophage dependent immune response gene function, *Nature*, 267, 156—158 (1977).
40. Thomas D. W., Shevach E. M. Nature of the antigenic complex recognized by T lymphocytes. I. Analysis with an in vitro primary response to soluble protein antigens, *J. Exp. Med.*, 144, 1263—1273 (1976).
41. Thomas D. W., Shevach E. M. Nature of the antigenic complex recognized by T lympho-

- cytes: Specific sensitization by antigens associated with allogeneic macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 2104—2108 (1977).
42. *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—533 (1982).
 43. *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—1299 (1983).
 44. *Unanue E. R., Askonas B. A.* The immune response of mice to antigen in macrophages, *Immunology*, 15, 287—296 (1968).
 45. *Unanue E. R., Askonas B. A.* Persistence of immunogenicity of antigen after uptake by macrophages, *J. Exp. Med.*, 127, 915—925 (1968).
 46. *Schmidtke J. R., Unanue E. R.* Macrophage-antigen interaction: Uptake, metabolism, and immunogenicity of foreign albumin, *J. Immunol.*, 107, 331—338 (1971).
 47. *Unanue E. R., Cerottini J. C.* The immunogenicity of antigen bound to the plasma membrane of macrophages, *J. Exp. Med.*, 131, 711—725 (1970).
 48. *Ellner J. J., Rosenthal A. S.* Quantitative and immunologic aspects of the handling of 2,4-dinitrophenyl guinea pig albumin by macrophages, *J. Immunol.*, 114, 1563—1569 (1975).
 49. *Waldron J. A., Horn R. G., Rosenthal A. S.* Antigen-induced proliferation of guinea pig lymphocytes in vitro: Functional aspects of antigen handling by macrophages, *J. Immunol.*, 117, 746—755 (1974).
 50. *Rosenthal A. S., Blake J. T., Lipsky P. E.* Inhibition of macrophage-lymphocyte interaction by cytochalasin B during antigen recognition by T lymphocytes, *J. Immunol.*, 115, 1135—1139 (1975).
 51. *Ellner J. J., Lipsky P. E., Rosenthal A. S.* Antigen-handling by guinea pig macrophages: Further evidence for the sequestration of antigen relevant for activation of primed T lymphocytes, *J. Immunol.*, 118, 2053—2057 (1977).
 52. *Chesnut R. W., Grey H. M.* Studies on the capacity of B cells to serve as antigen-presenting cells, *J. Immunol.*, 126, 1075—1079 (1981).
 53. *Chesnut R. W., Endres R. O., Grey H. M.* Antigen recognition by T cells and B cells: Recognition of crossreactivity between native and denatured forms of globular antigens, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 15, 397—408 (1980).
 54. *Loblay R. H., Schroer J., Rosenthal A. S.* Attempts at determinant-specific antibody blockade of macrophage presentation. In: *Macrophage regulation of Immunity*, edited by E. R. Unanue and A. S. Rosenthal, pp. 87—94, Academic Press, New York, 1980.
 55. *Thomas D. W., Shevach E. M.* Nature of the antigenic complex recognized by T lymphocytes. VI. The effect of anti-TNP antibody on T cell responses to TNP-conjugated macrophages, *J. Immunol.*, 121, 1145—1151 (1978).
 56. *Shevach E. M., Chan C., Thomas D. W., Clement L.* What is the nature of the antigenic complex recognized by T lymphocytes? In: *T and B Lymphocytes: Recognition and Function*, edited by F. H. Bach, B. Bonavida, E. S. Vitetta, and C. F. Fox, pp. 405—421, Academic Press, New York, 1979.
 57. *Shevach E. M., Chan C., Clement L. T.* Nature of the antigenic complex recognized by T lymphocytes. VIII. Specific inhibition of the stimulatory capacity of antigen-pulsed hapten-modified peritoneal exudate cells by anti-hapten antibody, *Eur. J. Immunol.*, 12, 819—824 (1982).
 58. *Malek T. R., Shevach E. M.* Nature of the antigenic complex recognized by T lymphocytes. IX. Direct immunochemical demonstration of nominal antigen on the macrophage cell surface, *Eur. J. Immunol.*, 12, 825—831 (1982).
 59. *Ziegler K., Unanue E. R.* The specific binding on *Listeria monocytogenes* immune T lymphocytes to macrophages. I. Quantitation and role of H-2 gene products, *J. Exp. Med.*, 150, 1143—1160 (1979).
 60. *Ziegler H. K., Unanue E. R.* Decrease in macrophage associated antigen catabolism caused by ammonia and chloroquine is associated with inhibition of antigen presentation to T cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 175—178 (1982).
 61. *Chesnut R. W., Colon S. M., Grey H. M.* Requirements for the processing of antigens by antigen-presenting B cells. I. Functional comparison of B cell tumors and macrophages, *J. Immunol.*, 129, 2382—2388 (1982).
 62. *Grey H. M., Colon S. M., Chesnut R. W.* Requirements for the processing of antigen by antigen-presenting B cells. II. Biochemical comparison of the fate of antigen in B cell tumors and macrophages, *J. Immunol.*, 129, 2389—2395 (1982).
 63. *Erb P., Feldmann M.* The role of macrophages in the generation of T helper cells. III. Influence of macrophage-derived factors in helper cell induction, *Eur. J. Immunol.*, 5, 759—766 (1975).

64. Erb P., Feldmann M., Hogg N. The role of macrophages in the generation of t-helper cells. IV. Nature of genetically related factor derived from macrophages incubated with soluble antigens, *Eur. J. Immunol.*, 6, 365 (1976).
65. Erb P., Meier B., Feldman M. Is genetically related macrophage factor (GRF) a soluble immune response (Ir) gene product? *J. Immunol.*, 122, 1916—1919 (1979).
66. Puri J., Lonai P. Mechanism of antigen binding by T cells H-2 (I-A)-restricted binding of antigen plus Ia by helper cells, *Eur. J. Immunol.*, 10, 273—281 (1970).
67. Lonai P., Steinman L., Friedman V., Drizlikh G., Puri J. Specificity of antigen binding by T cells: Competition between soluble and Ia-associated antigen, *Eur. J. Immunol.*, 11, 382—387 (1981).
68. Lipsky P. E., Rosenthal A. S. Macrophage lymphocyte interaction. I. Characteristics of the antigen-independent-binding of guinea pig thymocytes and lymphocytes to syngeneic macrophages, *J. Exp. Med.*, 138, 900—924 (1973).
69. Lipsky P. E., Rosenthal A. S. Macrophage-lymphocyte interaction: Antigen-independent binding of guinea pig lymph node lymphocytes by macrophages, *J. Immunol.*, 115, 440—445 (1975).
70. Lipsky P. E., Rosenthal A. S. Macrophage lymphocyte interaction. II. Antigen-mediated physical interactions between immune guinea pig lymph node lymphocytes and syngeneic macrophages, *J. Exp. Med.*, 141, 138—154 (1975).
71. Rosenthal A. S., Lipsky P. E., Shevach E. M. Macrophage-lymphocyte interaction and antigen recognition, *Fed. Proc.*, 34, 1743—1745 (1975).
72. Lipscomb M. F., Ben-Sasson S. Z., Tucker T. F., Uhr J. W. Specific binding of T lymphocytes to macrophages. IV. Dependence on cations, temperature and cytochalasin B-sensitive mechanisms, *Eur. J. Immunol.*, 9, 119—125 (1979).
73. Ben-Sasson S. Z., Lipscomb M. F., Tucker T. F., Uhr J. W. Specific binding of T lymphocytes to macrophages. III. Spontaneous dissociation of T cells from antigen-pulsed macrophages, *J. Immunol.*, 120, 1902—1906 (1978).
74. Werdelin O., Braendstrup D., Shevach E. M. Specific absorption of T lymphocytes committed to soluble protein antigens by incubation on antigen-pulsed macrophage monolayers, *J. Immunol.*, 123, 1755—1762 (1979).
75. Werdelin O., Shevach E. M. Role of nominal antigen and Ia antigen in the binding of antigen-specific T lymphocytes to macrophages, *J. Immunol.*, 123, 2779—2784 (1979).
76. Werdelin O., Braendstrup O., Pedersen E. Macrophage-lymphocyte clusters in the immune response to soluble protein antigen in vitro, *J. Exp. Med.*, 140, 1245—1259 (1974).
77. Nielson M. H., Jensen H., Braendstrup O., Werdelin O. Macrophage-lymphocyte clusters in the immune response to soluble protein antigen in vitro. II. Ultrastructure of clusters formed during the early response, *J. Exp. Med.*, 140, 1260—1271 (1974).
78. Braendstrup O., Werdelin O., Shevach E. M., Rosenthal A. S. Macrophage lymphocyte clusters in the immune response to soluble protein antigen in vitro, VII. Genetically restricted and nonrestricted physical interactions, *J. Immunol.*, 122, 1608—1613 (1979).
79. Yamashita U., Shevach E. M. The expression of Ia antigens on immunocompetent cells in the guinea pig. II. Ia antigens on macrophages, *J. Immunol.*, 119, 1584—1588 (1977).
80. Cowing C., Pincus S. H., Sachs D. H., Dickler H. B. A subpopulation of adherent accessory cells bearing both I—A and I—E or C subregion antigens is required for antigen-specific murine T lymphocyte proliferation, *J. Immunol.*, 121, 1680—1686 (1978).
81. Cowing C., Schwartz E. D., Dickler H. B. Macrophage Ia antigens. I. Macrophage populations differ in their expression of Ia antigens, *J. Immunol.*, 120, 378—384 (1978).
82. Beller D. I., Kiely J. M., Unanue E. R. Regulation of macrophage populations. I. Preferential induction of Ia-rich peritoneal exudates by immunologic stimuli, *J. Immunol.*, 124, 1426—1432 (1980).
83. Beller D. I., Unanue E. R. Regulation of macrophage populations. II. Synthesis and expression of Ia antigens by peritoneal exudate macrophages is a transient event, *J. Immunol.*, 126, 263—269 (1981).
84. Scher M. G., Beller D. I., Unanue E. R. Demonstration of a soluble mediator that induces exudates rich in Ia-positive macrophages, *J. Exp. Med.*, 152, 1684—1698 (1980).
85. Scher M. G., Unanue E. R., Beller D. I. Regulation of macrophage populations. III. The immunologic induction of exudates rich in Ia-bearing macrophages is a radiosensitive process, *J. Immunol.*, 128, 447—450 (1982).
86. Steinman R. M., Nogueira N., Witmer M. D., Tydings J. D., Mellman I. S. Lymphokine enhances the expression and synthesis of Ia antigens on cultured mouse peritoneal macrophage, *J. Exp. Med.*, 152, 1248—1261 (1980).
87. Steeg P. G., Moore R. N., Johnson H. M., Oppenheim J. J. Regulation of murine macrophage Ia antigen expression by a lymphokine with immune interferon activity, *J. Exp. Med.*, 156, 1780—1793 (1982).

88. Snyder D. S., Lu C. Y., Unanue E. R. Control of macrophage Ia expression in neonatal mice: Role of splenic suppressor cell, *J. Immunol.*, 128, 1458—1465 (1982).
89. Snyder D. S., Beller D. I., Unanue E. R. Prostaglandins modulate macrophage Ia expression, *Nature*, 299, 163—165 (1982).
90. Calamai E. G., Beller D. I., Unanue E. R. Regulation of macrophage populations. IV. Modulation of Ia expression in bone marrow-derived macrophages, *J. Immunol.*, 128, 1692—1694 (1982).
91. Cohn Z. A. The activation of mononuclear phagocytes: Fact, fancy, future, *J. Immunol.*, 121, 813—816 (1978).
92. Mackaness G. B. The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo, *J. Exp. Med.*, 129, 973—992 (1969).
93. Simon H. B., Sheagren J. N. Cellular immunity in vitro. I. Immunologically mediated enhancement of macrophage bactericidal capacity, *J. Exp. Med.*, 133, 1377—1389 (1971).
94. Nathan C., Noguera N., Juangbhanichi C., Ellis J., Cohn Z. Activation of macrophages in vivo and in vitro. Correlation between hydrogen peroxide release and killing of *Trypanosoma cruzi*, *J. Exp. Med.*, 149, 1056—1068 (1979).
95. Nathan C. F., Murray H. W., Cohn Z. A. The macrophage as an effector cell, *N. Engl. J. Med.*, 303, 622—626 (1980).
96. Pierce C. W., Kapp J. A., Wood D. D., Benacerraf B. Immune responses in vitro. X. Functions of macrophages, *J. Immunol.*, 112, 1181—1189 (1974).
97. Yoshinaga M., Yoshinaga A., Waksman B. H. Regulation of lymphocyte responses in vitro. I. Regulatory effect of macrophages and T-dependent (T) cells on the response of T-independent B lymphocytes to endotoxin, *J. Exp. Med.*, 136, 956—971 (1972).

Рекомендуемая

- Forster O., Landy M. (eds.) (1981). *Heterogeneity of Mononuclear Phagocytes*, Academic Press, New York.
- Moller G. (ed.) (1978). *Role of macrophages in the immune response*, *Immunol. Rev.*, Vol. 40.
- Nelson D. S. (ed.) (1976). *Immunobiology of the Macrophage*, Academic Press, New York.
- Rosenthal A. S., Shevach E. M. (1975). The function of macrophages in T lymphocyte antigen recognition, *Contemp. Top. Immunobiol.*, 5, 47—90.
- Unanue E. R. (1972). The regulatory role of macrophages in antigenic stimulation, *Adv. Immunol.*, 15, 95—165.
- Unanue E. R. (1981). The regulatory role of macrophages in antigenic stimulation. II. Symbiotic relationship between lymphocytes and macrophages, *Adv. Immunol.*, 31, 1—136.
- Unanue E. R., Rosenthal A. S. (eds.) (1980). *Macrophage Regulation of Immunity*, Academic Press, New York.
- Van Furth R. (ed.) (1970). *Mononuclear Phagocytes*, FA Davis, Philadelphia.
- Van Furth R. (ed.) (1975). *Mononuclear Phagocytes in Immunity, Infection and Pathology*, Blackwell, Oxford.
- Van Furth R. (ed.) (1980). *Mononuclear Phagocytes: Functional Aspects*, Martinus Nijhoff, The Hague.

Лимфоидные органы и ткани

Эжен С. Батчер, Ирвинг Л. Вайссман

Eugene C. Butcher, Irving L. Weissman

Основные лимфоидные органы выполняют в организме целый ряд общих функций: создают оптимальное микроокружение для созревания лимфоцитов из их иммунонекомпетентных предшественников, собирают разбросанные по всему организму популяции антиген-специфических лимфоцитов в органические системы, дренирующие специфические области, в которые поступают антигены, регулируют взаимодействие разных классов лимфоцитов, обеспечивая максимальную эффективность клеточных взаимодействий, и, наконец, осуществляют своевременную поставку эффекторных элементов иммунной системы. Лимфоидная система представлена первичными лимфоидными органами — костным мозгом и тимусом у млекопитающих — и множеством вторичных лимфоидных органов, в которых происходят антигензависимое и антигеннезависимое взаимодействие зрелых циркулирующих лимфоцитов. В большинстве случаев зрелые лимфоциты впервые контактируют с антигеном в лимфоидных органах; сенсбилизация лимфоидных клеток вне лимфоидных органов происходит весьма редко. В этой главе мы рассмотрим лимфоидные и нелимфоидные компоненты первичных и вторичных лимфоидных органов с точки зрения их локализации и роли в управлении процессами созревания и иммунными ответами антиген-специфических лимфоцитов.

6.1. Состав и строение первичных лимфоидных органов

6.1.1. Раннее созревание лимфоцитов в костном мозге

Считается, что лимфоциты, как и все остальные элементы крови, образуются из популяции изначальных гематолимфоидных предшественников, которые впервые обнаруживаются на переднем конце эмбрионов позвоночных [1]. Затем гемопоэтические стволовые клетки появляются последовательно в кровяных островках желточного мешка, в эмбриональной печени (после того, как разовьются сосуды, связывающие желточный мешок с печенью), очень ненадолго в эмбриональной селезенке и, наконец, в костном мозге [2]. Частично дифференцированные стволовые клетки, запрограммированные (коммитированные) к лимфоидной дифференцировке, сначала обнаруживаются в желточном мешке, но со временем вместе со своими плюрипотентными гематолимфоидными предшественниками «заселяют» костный мозг [3, 4].

У млекопитающих костный мозг представляет собой место созревания клеток В-линии, превращающихся из стволовых клеток в малые лимфоциты, несущие поверхностные иммуноглобулины [5]. У птиц созревание В-лимфоцитов происходит в основном в фабрициевой сумке [6, 7], хотя термин «сумка»

(*burgsa*), употребляемый для обозначения места, где протекают эти процессы, не совсем точен. Бурэктомия у плода не препятствует созреванию В-клеток, способных после стимуляции превращаться в IgM-плазматические клетки. По некоторым другим данным фабрициевую сумку (*burgsa*) можно рассматривать как вторичный лимфоидный орган, способный процессировать антиген, а также участвовать в антительном ответе и сходный по структуре с пейеровыми бляшками, локализованными в кишечнике млекопитающих (все эти вопросы рассмотрены в специальном обзоре [8]).

Тонкая структура той среды в костном мозге млекопитающих, в которой происходит созревание В-лимфоцитов, изучена еще недостаточно. Костный мозг содержит гетерогенную популяцию нелимфоидных прикрепленных клеток [9], необходимых для созревания всех основных нелимфоидных родоначальных клеток [10], включая те, которые в отсутствие лимфоцитолизических глюкокортикоидов поддерживают непрерывное производство В-клеток как *in vivo*, так и *in vitro* [11]. Пре-В-клетки костного мозга экспрессируют поверхностные маркеры, присущие развивающимся В-клеткам ([12], гл. 3). У мышей на них приходится не менее 30% костномозговых клеток, имеющих ядро, и большинство костномозговых лимфоцитов. В больших пре-В-клетках впервые происходит перестройка генов, кодирующих тяжелые цепи иммуноглобулинов (в результате образуются функциональные транскрипционные единицы для μ -цепей и начинается синтез цитоплазматических μ -цепей). Затем эти клетки делятся, давая начало малым пре-В-клеткам. В малых пре-В-клетках перестраиваются гены легких каппа (κ)-цепей (обычно этот процесс затрагивает только один из двух аллельных каппа-локусов), что влечет за собой появление этих цепей в цитоплазме и экспрессию поверхностных IgM κ [12, 13]. У мышей очень небольшая часть В-клеток претерпевает дальнейшие перестройки генов легких λ -цепей с последующей экспрессией этих цепей, тогда как у людей подобные события являются скорее правилом, чем исключением, и приводят к частичной или полной делеции ранее сформированных каппа-генов. Созревание В-клеток считается завершенным, когда на их поверхности экспрессируются иммуноглобулиновые рецепторы для антигена, структуры, кодируемые генами главного комплекса гистосовместимости (МНС), необходимые для осуществления межклеточных взаимодействий при развитии иммунного ответа, и рецепторы, наличие которых позволяет В-клеткам поступать во вторичные лимфоидные органы (см. ниже). В костном мозге содержится также некоторое количество пре-Т-лимфоцитов, представляющих собой отдельную популяцию, отличную от популяции только что описанных пре-В-лимфоцитов (хотя, по-видимому, и те и другие клетки происходят от общего предшественника) [14]. У животных, лишенных тимуса, запасы костномозговых пре-Т-клеток, вероятно, увеличиваются, что приводит к появлению небольшого числа функциональных популяций Т-клеток [15]. Независимо от принадлежности к разным или общим линиям процессы созревания В-лимфоцитов в костном мозге и Т-лимфоцитов в тимусе имеют важную общую особенность: в первичных лимфоидных органах производится гораздо больше клеток, чем их обнаруживается в общем пуле периферических иммунокомпетентных лимфоцитов [5, 16].

6.1.2. Созревание тимусных лимфоцитов в тимическом микроокружении

Тимус представляет собой орган, принимающий пре-Т-клетки, обеспечивающий созревание и(или) отбор антиген-специфических Т-клеток и осуществляющий избирательное высвобождение этих клеток на периферию. Процесс созре-

ванья сопровождается «включением» специфических генов, причем некоторые из них экспрессируются только во время той фазы дифференцировки, которая происходит в тимусе, тогда как другие остаются в активном состоянии на протяжении всей жизни Т-клетки. На определенных стадиях созревания тимоцитов (Т-клеток) происходят следующие события: экспрессия антиген-специфических рецепторов; появление или отбор клеток, распознающих продукты специфических для тимуса МНС-генов, необходимые для взаимодействия клеток иммунной системы; приобретение Т-клетками способности осуществлять помощь, «убийство» и супрессию; появление на клетках достаточного количества рецепторов, отвечающих за доставку лимфоцитов из кровяного русла в организованные лимфоидные ткани. Наше понимание того, каким образом в тимусе осуществляются эти основные процессы становления Т-клеток, пока еще крайне примитивно. Мы не знаем, происходят ли все созревающие в тимусе клетки из предшественников одного класса, локализованных в тимусе или в костном мозге, или имеет место параллельное развитие нескольких независимых линий. И даже в тех случаях, когда удается идентифицировать один ряд, мы не располагаем полным описанием всех стадий созревания. Мы не знаем также, ни на каком этапе своего развития Т-клетки впервые экспрессируют антиген-специфические рецепторы, ни на каком — приобретают способность к распознаванию чужеродного антигена в комплексе со своими (или не своими) маркерами, опосредующими межклеточное взаимодействие, такими, как детерминанты МНС. До тех пор пока мы не будем иметь полного набора маркеров, однозначно характеризующих каждую из вышперечисленных стадий (появление рецепторов для антигена, рецепторов, необходимых для осуществления межклеточных взаимодействий и доставки, приобретение специализированных функций), мы не сможем ответить на самые существенные вопросы, касающиеся тимуса и созревания Т-клеток. Является ли тимус тем местом, где из совершенно незрелых предшественников образуются полностью компетентные Т-клетки? Или же он создает селективную среду, в которой поступающие извне Т-клетки, несущие антиген-специфические рецепторы, подвергаются отбору таким образом, что только некоторые «подходящие» клоны их потомков «получают разрешение» покинуть тимус и заселить периферию? А может быть, на различных стадиях созревания Т-клеток в тимусе происходят и те и другие события? В этом разделе мы расскажем о том, что известно на сегодняшний день об основных классах лимфоидных и прикрепленных клеток в тимусе, их происхождении и образовании ими определенного потомства, а также об их взаимодействии друг с другом. Мы попытаемся связать эти данные со сведениями о локализации каждого типа клеток в тех или иных областях тимуса.

6.1.2.1. Общие сведения о строении тимуса

Зрелый тимус представляет собой эпителиально-лимфоидный орган, состоящий из трех отдельных слоев, каждый из которых содержит лимфоидные клетки преимущественно одного определенного класса и нелимфоидные клетки, обеспечивающие необходимое микроокружение для созревания лимфоцитов (рис. 6.1). В наружном субкапсулярном (лежащем прямо под капсулой, покрывающей тимус) корковом слое обнаруживаются примитивные делящиеся клетки (лимфобласты). По крайней мере некоторые из них, очевидно, взаимодействуют со специализированными эпителиальными клетками-кормилицами («nurse»), ускоряющими процессы самообновления лимфобластов и превращения их во все другие тимусные клетки и Т-клетки различных подклассов. Во внутреннем корковом слое находятся главным образом потомки лимфобластов — в боль-

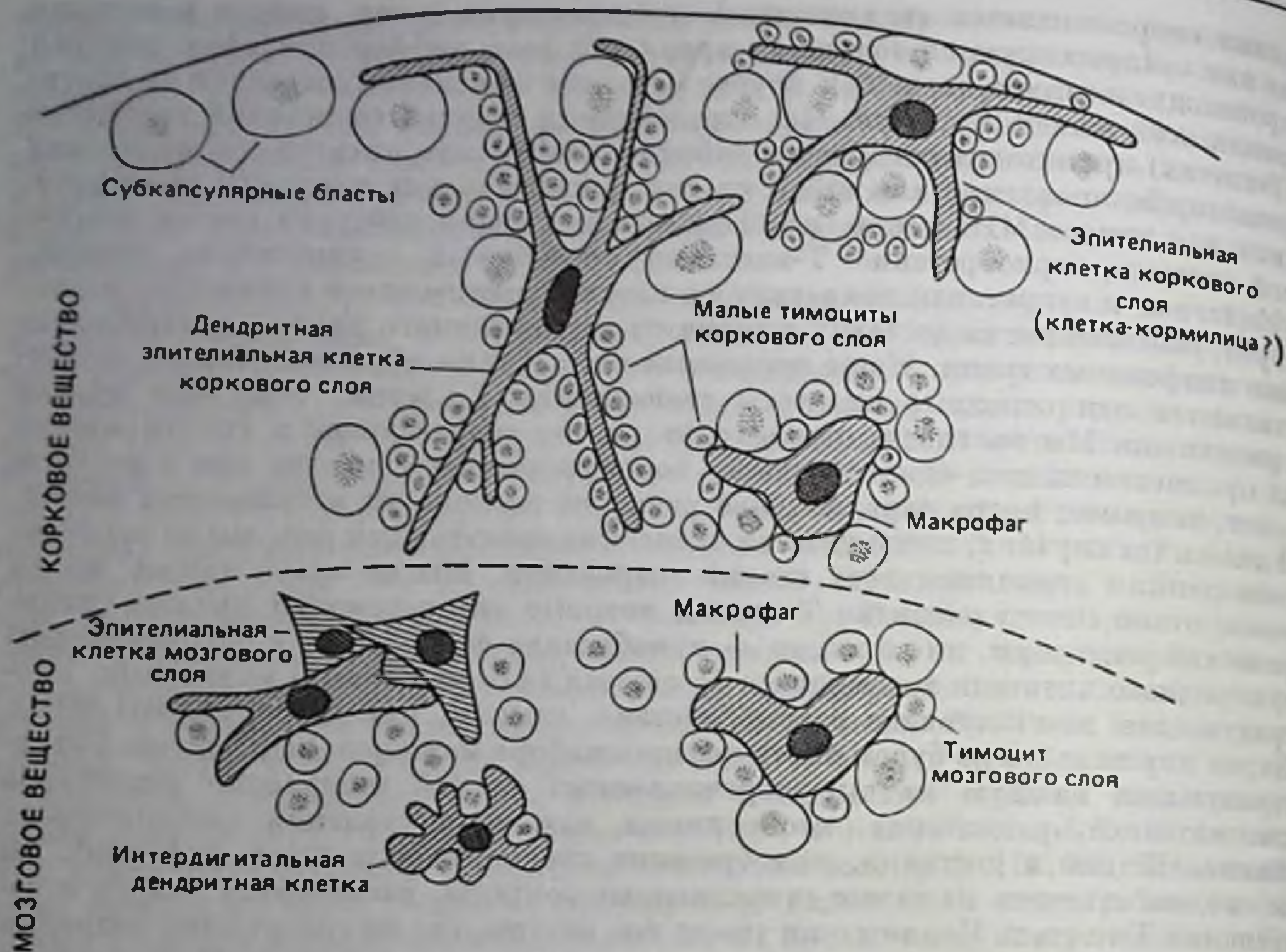


Рис. 6.1. Схематическое изображение различных типов клеток, обнаруженных в тимусе мыши (см. текст).

шинстве своем неделившиеся малые тимусные лимфоциты, располагающиеся вблизи дендритных корковых эпителиальных клеток. Мозговой слой тимуса содержит в основном лимфоциты среднего размера, также происходящие (по крайней мере частично) из лимфобластов; с мозговыми лимфоцитами взаимодействуют разнообразные нелимфоидные клетки, например лопатковидные мозговые эпителиальные клетки и интердигитальные дендритные клетки.

6.1.2.2. Эмбриогенез тимуса

Развитие тимуса начинается с того момента, когда тяжки, состоящие из эпителиальных клеток третьего жаберного кармана у мышей и третьего и четвертого жаберных карманов у людей, прорастают через развивающееся грудное входное отверстие в переднюю верхнюю часть грудной мезенхимы. Хотя и считается, что глоточные эпителиальные клетки в конечном итоге дают начало по крайней мере некоторым классам эпителиальных клеток тимуса, однако экспериментов по идентификации потомков глоточных клеток по прямой линии с помощью специфических маркеров еще не проводилось. Формирующийся тимус, по-видимому, посылает во внешнюю среду некие периодические сигналы, привлекающие гемопоэтические клетки, которые должны заселить тимус таким образом, что эти клетки собираются вместе и через строго определенные промежутки времени поступают в тимус, становясь родоначальниками само-

обновляющихся и дифференцирующихся линий тимусных лимфоцитов. Клетки костного мозга, заселяющие тимус, изначально не обладают Т-специфическими антигенами на поверхности незрелых тимоцитов) и Lyt-1, 2, 3 (гл. 4), но через несколько часов после поступления в тимус начинают последовательно экспрессировать эти маркеры [14, 17—19]. На основании обнаруженной корреляции между выполняемыми функциями и экспрессией поверхностного антигена Lyt-2 периферические Т-лимфоциты можно разделить на два основных подкласса: клетки Lyt-1⁺2⁻ — это, как правило, хелперы и (или) эффекторы, тогда как клетки Lyt-2⁺ (они могут экспрессировать, а могут и не экспрессировать большое количество Lyt-1) обычно представляют собой киллеры или супрессоры [20], хотя было описано несколько исключений из этого правила [21]. В эмбриональном тимусе клетки Lyt-1⁺2⁻ и Lyt-1⁺2⁺ появляются как независимые популяции [18, 19]; следовательно, соответствующие исходные клетки костного мозга также могут быть разделены на два основных фенотипических подкласса [14], хотя, являются ли они независимыми предшественниками, еще предстоит установить.

6.1.2.3. Раннее созревание тимуса в облученных химерах

Последующие стадии созревания тимусных лимфоцитов изучены хуже. Они исследовались только в системе, где возможно получение артефактов: в облученных химерах. Облучение летальными дозами вызывает гибель более 99,9% незрелых тимусных лимфоцитов, костномозговых клеток всех категорий, а также периферических Т- и В-лимфоцитов. Введение таким особям (лишенным Т-клеток) гемопоэтических клеток из костного мозга, эмбриональной печени и даже из желточного мешка приводит в конечном итоге к восстановлению гемопоэтической системы, в том числе и В- и Т-лимфоидных рядов. Даже при инъекции большого количества гемопоэтических клеток, среди которых имеются заселяющие тимус пре-Т-клетки, всегда проходит 12—20 дней перед тем, как тимоциты донора начинают интенсивно делиться. Использование поверхностных маркеров при комбинациях донор-хозяин, конгенных по Thy-1, позволило показать, что развивающиеся тимоциты первоначально взаимодействуют в тимусе с двумя классами клеток костномозгового происхождения: I-A-антиген-отрицательными макрофагами и I-A-антиген-положительными интердигитальными дендритными клетками. (В тимусе взрослых необлученных особей I-A-антиген-положительные и I-A-антиген-отрицательные макрофаги располагаются на границе между корковым и мозговым веществом, а интердигитальные дендритные клетки сосредоточены в основном со стороны мозгового вещества.) Гемопоэтические предшественники Т-клеток поступают в тимус, по-видимому, из сосудов, расположенных на границе между корковым и мозговым веществом (И. Вайссман, неопубликованные наблюдения). Поступающие лимфоциты вначале обнаруживаются в ассоциации с I-A-антиген-отрицательными макрофагами, а спустя 2—3 дня — с интердигитальными дендритными клетками, а также с популяцией тимусных эпителиальных клеток-кормилиц в субкапсулярном корковом слое [22—26]. Интересно, что сами неэпителиальные макрофаги и интердигитальные дендритные клетки (но не эпителиальные клетки-кормилицы или корковые дендритные клетки) происходят из костного мозга. Все три упомянутых класса комплексов лимфоцитов с нелимфоидными клетками можно выделить, обрабатывая intactный тимус коллагеназой и протеиназой с последующим избирательным осаждением этих многоклеточных комплексов (ком-

плексов лимфоцитов с тимусными клетками-кормилицами и розеток, содержащих либо лимфоциты и макрофаги, либо лимфоциты и интродигитальные дендритные клетки) из полученной клеточной суспензии [22—25].

6.1.2.4. *Тимусный субкапсулярный корковый слой: зона пролиферации тимусных лимфобластов и их взаимодействие с тимусными клетками-кормилицами*

Впервые тимусные клетки-кормилицы были описаны как лимфоэпителиальные комплексы, выделяемые после обработки тимуса коллагеназой и протеиназой, в которых тимусные лимфоциты, заключенные в образованные плазматической мембраной пузырьки или складки, казались расположенными в цитоплазме клеток-кормилиц [22]. С помощью метода флуоресцентного окрашивания [27, 28] было установлено место локализации этих клеток — субкапсулярный корковый слой [23, 24]. До сих пор окончательно не установлено, находятся ли лимфоциты внутри клеток-кормилиц или просто прочно связались с ними еще *in vivo*; результаты, полученные в последнее время, свидетельствуют в пользу последнего предположения [23]. Как следует из данных, приведенных в табл. 6.1, тимусные лимфоциты наружного слоя и лимфоциты, ассоциированные с тимусными клетками-кормилицами, представляют собой одну популяцию. Это в основном крупные самообновляющиеся тимусные лимфобласты, на долю которых приходится 5—15% общего количества тимусных лимфоцитов. Тимусные лимфобласты наружного коркового слоя уже подразделяются на подклассы в зависимости от Lyt-2-маркеров и содержат, вероятно, предшественники цитолитических Т-клеток (табл. 6.1) [16, 27—29]. Эти делящиеся тимусные лимфобласты дают начало трем другим популяциям: малым тимоцитам внутреннего коркового слоя, по крайней мере некоторым тимоцитам среднего размера, расположенным в мозговом слое, и, наконец, тимусным клеткам-эмигрантам [30, 31]. Таким образом, лимфобласты наружного коркового слоя — это гетерогенная популяция тимусных лимфоцитов (по крайней мере их часть взаимодействует с тимусными эпителиальными клетками-кормилицами); в результате их пролиферации происходит как их самообновление, так и появление клеток, принадлежащих ко всем другим классам тимусных лимфоцитов. Сами лимфобласты образуются, по-видимому, из заселяющих тимус предшественников после длительного лаг-периода, в течение которого эти предшественники дифференцируются и мигрируют в наружный корковый слой тимуса. Измерение скоростей синтеза специфических гликопротеинов и белков тимусных лимфоцитов показывает, что в лимфобластах наружного коркового слоя происходит активный синтез молекул TL, Lyt-1, 2, 3, Thy-1 и терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы¹ [32, 33]. На ранних стадиях эмбриогенеза лимфобласты наружного коркового слоя экспрессируют поверхностные рецепторы для агглютинина из соевых бобов (SBA — от англ. soy bean agglutinin), но не образуют рецепторов для агглютинина из земляных орехов (PNA — от англ. peanut agglutinin); этот факт говорит о том, что гликопротеины или гликолипиды, локализованные на поверхности этих клеток, содержат в качестве концевых сахаров галактозамины, но не содержат остатков галактозы; однако в сформировавшемся тимусе лимфобласты наружного коркового слоя несут рецепторы как для SBA, так и для PNA [34]. Следовательно, регуляция процессов созревания тимусных лимфоцитов и (или) их размещения в тимусе частично связана с избирательной экспрессией специфических гликозилтрансфераз или гликозидаз.

¹ Рекомендуемое название терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы — Нуклеотидрибозилтрансфераза: ДНК-нуклеотидилакзотрансфераза (КФ 2.7.7.31). — *Прим. перев.*

Таблица 6.1. Свойства преобладающих подклассов лимфоцитов и прикрепленных клеток локализованных в основных зонах созревания тимуса

Зона	Преобладающий размер лимфоцитов	Подклассы, характеризующиеся наличием поверхностных маркеров, %				Иммунологические функции ²⁾	Ассоциированные прикрепленные клетки
		Lyt	MHC ¹⁾	TL	Лектин-связывающие участки		
Субкапсулярный наружный корковый слой	Большие	Lyt-1+2+ [85] Lyt-1+2- } [15] Lyt-1-2 }	H2K ^{ср/вD^в} H ^{ср/вD^в}	TL ^в [70] TL ^н [30]	SBA ⁺ PNA ⁺	PT ⁻ ПЦТЛ ⁺ ПТС?	Тимусные эпителиальные клетки-кормилицы (K ^{вD^вI-A^в})
Внутренний корковый слой	Малые	Lyt-1+2+ [90] Lyt-1+2- [10]	H2K ^{ср D^{ср}} [70] H2K ^{н D^{ср/н}} [30]	TL ^в [70] TL ^н [30]	SBA ⁻ PNA ⁺	PT ⁻ ПЦТЛ ⁻ ПТС ⁺	Дендритные эпителиальные клетки коркового слоя (K ^{вD^нI-A^в})
Мозговой слой (по результатам анализа лимфоцитов мозгового слоя, устойчивых к кортизолу)	Средние	Lyt-1+2+ [40] Lyt-1+2- [60]	H2K ^{вD^в}	TL ^н	SBA ⁻ PNA ⁻	PT ⁺ ПЦТЛ ⁺	Макрофаги (I-A ⁻ и I-A ⁺) Интердигитальные дендритные клетки (I-A ⁺) Лопатковидные эпителиальные клетки (I-A ⁺)
Эмигранты	Малые и средние	Lyt-1+2+ [30] Lyt-1+2- [70]	H2K ^{вD^в}	TL ^в или TL ⁻	SBA ⁻ PNA ⁻	PT ⁺ ПЦТЛ ⁺ ПТС ⁺	

1) в — высокая концентрация; ср — средняя; н — от низкой до неопределяемой.

2) PT⁺ — предшественники Т-хелперов, ПЦТЛ — предшественники цитотоксических Т-лимфоцитов; ПТС — предшественники Т-супрессоров.

6.1.2.5. Внутренний корковый слой тимуса содержит основную часть тимусных лимфоцитов, большинство из которых погибает, и особый класс дендритных эпителиальных клеток

Во внутреннем корковом слое имеются клетки двух основных классов: малые тимоциты и дендритные корковые эпителиальные клетки. Малые тимоциты, на долю которых приходится около 85% общего числа всех тимусных лимфо-

цитов, содержат небольшое количество цитоплазмы и, подобно другим корковым лимфоцитам, обладают *in vivo* ярко выраженной чувствительностью к кортизолу. Большинство тимусных лимфоцитов внутреннего коркового слоя экспрессирует меньше H2K-детерминант (по сравнению с лимфоцитами наружного коркового слоя) и в основном продолжает экспрессировать (но не синтезировать) TL-антигены [28, 32, 33]. Они являются SBA-отрицательными и PNA-положительными [35]. Гликолипиды и гликопротеины этих тимоцитов характеризуются отсутствием концевых остатков спаловой кислоты в углеводных боковых цепях [34]. Как и лимфоциты наружного коркового слоя, малые тимоциты можно разделить на две популяции, различающиеся по Lyt-2 (табл. 6.1). Существует множество данных в пользу того, что среди малых тимоцитов коркового слоя имеются субпопуляции, которые служат источником небольшого числа клеток, эмигрирующих из тимуса, однако эти «эмигранты» экспрессируют много поверхностных H2K и мало (или в неопределяемых количествах) TL. Поэтому маловероятно, что основная популяция тимоцитов коркового слоя, характеризующаяся низким содержанием поверхностных H2K и высоким содержанием TL, служит непосредственным предшественником эмигрантов; популяцию предшественников еще предстоит идентифицировать.

Интересно, что в популяции малых тимоцитов внутреннего коркового слоя синтезируется большое количество внутриклеточной терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы, причем в клетках данной популяции постоянно поддерживается высокая концентрация фермента [33]. Возможно, гибель значительной части этих клеток в тимусе обусловлена в той или иной мере либо процессами, связанными с сохранением определенного поверхностного фенотипа (PNA^{hi} , SBA^{lo} , TL^{hi} , $H2K^{lo}$), либо продолжительным действием терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы; с другой стороны, гибель этих клеток может быть обусловлена их высокой чувствительностью к глюкокортикоидам эндогенного происхождения [36]. Не исключено, что немногие зрелые и(или) подвергнувшиеся соответствующему отбору клетки приобретают способность покидать тимус только после завершения гликозилирования их поверхностных гликопротеинов и(или) гликолипидов. Как показано ниже, существует обратная связь между наличием поверхностных рецепторов, которые позволяют лимфоцитам заселять определенные лимфоидные органы, и присутствием поверхностных PNA-связывающих участков; присоединение концевых остатков спаловой кислоты могло бы вызвать высвобождение PNA^{+} -положительных тимоцитов (или других клеток, проявляющих PNA^{+} -положительные свойства в специфическом лимфоидном микроокружении) из комплексов с гипотетическими PNA-подобными лектинами, обеспечивая, таким образом, эти клетки «выездными визами», необходимыми для выхода из тимуса.

Многие малые тимоциты, расположенные во внутреннем корковом слое, по-видимому, взаимодействуют там со специализированными дендритными эпителиальными клетками коркового слоя. Эти клетки имеют длинные ветвящиеся дендритные отростки, связывающие одну клетку с другой, — непосредственно в местах соединения находятся десмосомы [37]. Продольные оси дендритных отростков, перпендикулярные поверхности, отделяющей корковый слой от мозгового, и капсуле, образуют вместе с рассеянными между ними лимфоцитами вертикально исчерченную узорчатую сетку. Дендритные эпителиальные клетки коркового слоя необычны в том отношении, что они экспрессируют чрезвычайно большие количества аллотипических и мономорфных детерминант класса II MHC (кодируемых генами I-A) [38, 39] (рис. 6.2). Как показал иммуноэлектронно-микроскопический анализ, многие лимфоциты, находящиеся в контакте с дендритными эпителиальными клетками коркового слоя, содержат или связы-

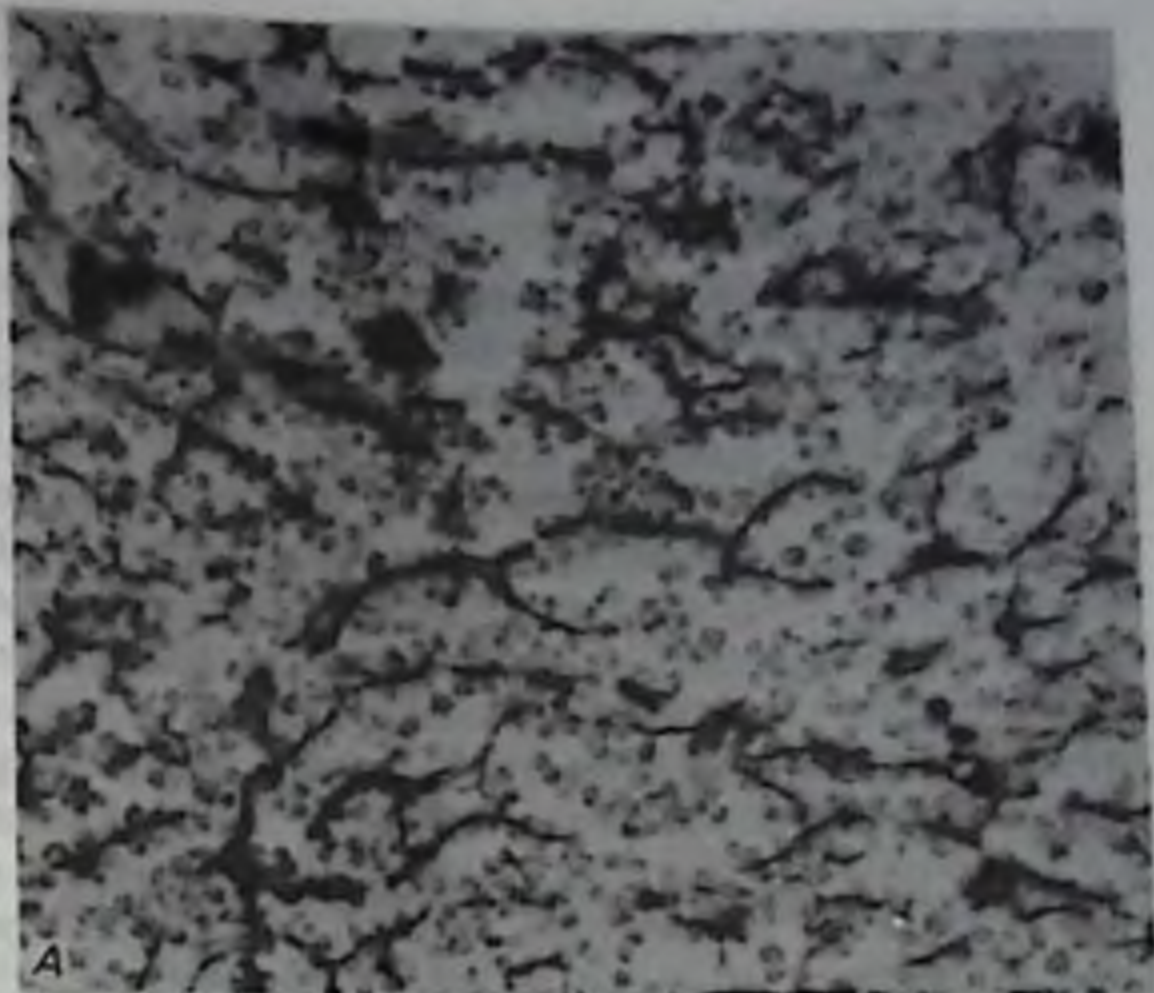


Рис. 6.2. Замороженные срезы тимуса мыши, окрашенные с помощью меченых пероксидазой моноклональных антител, специфических к антигенам МНС.

А. На микрофотографии коркового слоя, пропикцированного с анти-I-Ak, видны интенсивно окрашенные отростки эпителиальных клеток и ассоциированные с ними неокрашенные тимocyты (большое увеличение).

Б. Микрофотография тимуса, окрашенного с помощью анти-I-Ak, — однородный мозговой слой и сетка, образованная дендритными отростками эпителиальных клеток в корковом слое (малое увеличение).

В. Эксперимент, аналогичный предыдущему, но с использованием анти-H-2Kk, — однородное окрашивание мозгового слоя и отсутствие сколько-нибудь заметного окрашивания коркового слоя (малое увеличение). (Wessman et al., 26; печатается с любезного разрешения д-ра R. Rouse.)

вают I-A-антигены этих клеток *in situ* и в суспензии — возможно, в результате связывания таких молекул с комплементарными рецепторами тимусных лимфоцитов [39]. Удивительно, что эти дендритные эпителиальные клетки коркового слоя не экспрессируют определяемых количеств H2K или H2D аллотипических детерминант класса I МНС (рис. 6.2). На поверхности человеческих корковых дендритных клеток можно обнаружить молекулы HLA класса I МНС; однако в соответствии с тем, что наблюдается при изучении мышиных клеток, не удается выявить экспрессии по крайней мере некоторых аллотипических детерминант [40]. Таким образом, внутренний корковый слой тимуса заселен в основном популяцией лимфоцитов, которая а) содержит значительное число клеток, со временем погибающих, б) дает начало какой-то (основной) части пула тимусных эмигрантов и в) находясь в тимусе, взаимодействует с определенной популяцией тимусных эпителиальных клеток, избирательно экспрессирующих антигены класса II МНС. Мы полагаем, что приобретение выживающими Т-лимфоцитами способности узнавать «свои» маркеры, участвующие в процессах межклеточного взаимодействия и представления антигена, связано с взаимодействием этих лимфоцитов с дендритными кортикальными эпителиальными клетками. В результате такого взаимодействия могут, вероятно, возникать а) положительные сигналы, обеспечивающие выживание тех относительно редких тимусных лимфоцитов коркового слоя, которые узнают «свои» детерминанты МНС (и, кроме того, не являются аутореактивными); б) отрицательные сигналы, способствующие гибели клеток с неподходящей реактивностью.

Сформировавшиеся тимусные лимфоциты движутся по направлению к мозговому слою — на их пути, пролегающем между отростками дендритных кортикальных эпителиальных клеток, расположены корковые макрофаги, выполняющие функцию своеобразных стражей. По крайней мере некоторые из этих макрофагов участвуют, по-видимому, в разрушении и фагоцитозе уже погибших или обреченных на гибель тимусных лимфоцитов. Макрофаги, локализованные со стороны мозгового вещества от границы между корковым и мозговым слоями, взаимодействуют с эпителиальными клетками мозгового слоя, образуя особую структуру, состоящую из так называемых телец Гассала [37]. Это одно из кладбищ тимусных лимфоцитов и, возможно, то единственное место, где происходит их окончательное разрушение.

6.1.2.6. *Мозговой слой содержит иммунокомпетентные клетки, а также несколько типов нелимфоидных клеток костномозгового и тимусного происхождения*

Мозговой слой содержит лимфоциты среднего размера, на долю которых приходится ~3—5% общего числа всех тимусных лимфоцитов. По крайней мере некоторые из этих лимфоцитов происходят из чувствительных к кортизону предшественников, расположенных в наружном корковом слое, хотя сами, по-видимому, *in vivo* устойчивы к кортизону. Введенные искусственным путем в кровяное русло подходящего хозяина, устойчивые к кортизону тимусные лимфоциты выполняют почти все иммунные реакции, приписываемые Т-лимфоцитам. В свое время считали, что эти клетки находятся на заключительной стадии созревания, предшествующей их выходу из тимуса, однако экспериментальная проверка этой гипотезы не подтвердила ее правомочности. Таким образом, можно допустить, что эти клетки никогда и не покидают тимус. Не исключено, что, оставаясь в тимусе, они участвуют в каких-то регуляторных и(или) связанных с развитием процессах, или же представляют собой потенциально опасную популяцию Т-лимфоцитов (например, аутореактивных). Т-лимфоциты мозгово-

го слоя окружены лопатковидными эпителиальными клетками, экспрессирующими все известные детерминанты МНС, а также интердигитальными неэпителиальными дендритными клетками костномозгового происхождения; это I-A-положительные клетки, способные в условиях *in vitro* эффективно презентировать антиген (Б. Киевски, личное сообщение). Роль различных нелимфоидных клеток мозгового слоя в процессах, связанных с жизнедеятельностью самого тимуса и с созреванием Т-клеток, все еще совершенно неизвестна, так же как неизвестны судьба и функции окруженных ими лимфоцитов мозгового вещества.

Суммируя все вышесказанное, можно заключить, что клетки коркового слоя и(или) субпопуляция клеток мозгового слоя дают начало тем тимусным клеткам-эмигрантам, которые могут узнавать антиген, имеют рецепторы, необходимые для осуществления межклеточных взаимодействий и доставки этих клеток в определенные органы, а также выполняют основные иммунные функции, известные как функции Т-лимфоцитов.

6.2. Состав и строение периферических лимфоидных органов

6.2.1. Лимфоидный состав вторичных лимфоидных органов: рециркуляция лимфоцитов

Лимфоциты — самый многочисленный тип клеток лимфатических узлов, пейеровых бляшек кишечника и белой пульпы селезенки; поэтому они по праву считаются основным компонентом этих органов. Каждый лимфоидный орган имеет лимфоидный компартмент строго определенного размера и состава, что отражает в какой-то мере потребность данного органа в тех или иных клетках. Так, например, в селезенке и пейеровых бляшках кишечника преобладают лимфоциты, ответственные главным образом за развитие гуморального иммунитета (В-клетки), а Т-клетки, в основном регуляторные и цитотоксические, составляют большую часть лимфоцитов периферических лимфатических узлов и кожи [41]. Еще сильнее выражены различия в том, как локализуются популяции определенных эффекторных клеток — например, IgA-секретирующие плазматические клетки располагаются в основном в слизистых; клетки же, секретирующие IgG и IgM, — в тканях, не содержащих слизистых поверхностей. Хотя не вызывает сомнений, что в распределении различных наборов лимфоцитов между лимфоидными компартментами определенных органов и тканей принимают участие многие элементы, в настоящее время известны лишь два принципиальных механизма. Первый из них, который мы рассмотрим вкратце ниже, заключается в образовании *in situ* индивидуальных наборов пролиферирующих лимфоцитов из стимулированных антигеном предшественников. Второй, хорошо изученный, механизм контролирует поступление специфических наборов лимфоцитов в определенные органы и ткани из кровотока.

Большинство зрелых лимфоцитов непрерывно циркулирует между различными лимфоидными органами и другими тканями организма, попадая туда из лимфы и кровяного русла. Такие лимфоциты называют рециркулирующими, поскольку они поступают из кровяного русла в лимфоидные органы, затем в собирающие выводящие лимфатические сосуды, откуда в конечном итоге возвращаются в кровяное русло, где цикл возобновляется [42]. Скорость рециркуляции зависит от того, на какой стадии дифференцировки находятся клетки данной популяции лимфоцитов. Этот вопрос был тщательно изучен на примере ряда грызунов. Оказалось, что в среднем В-клеткам, по-видимому, требуется больше

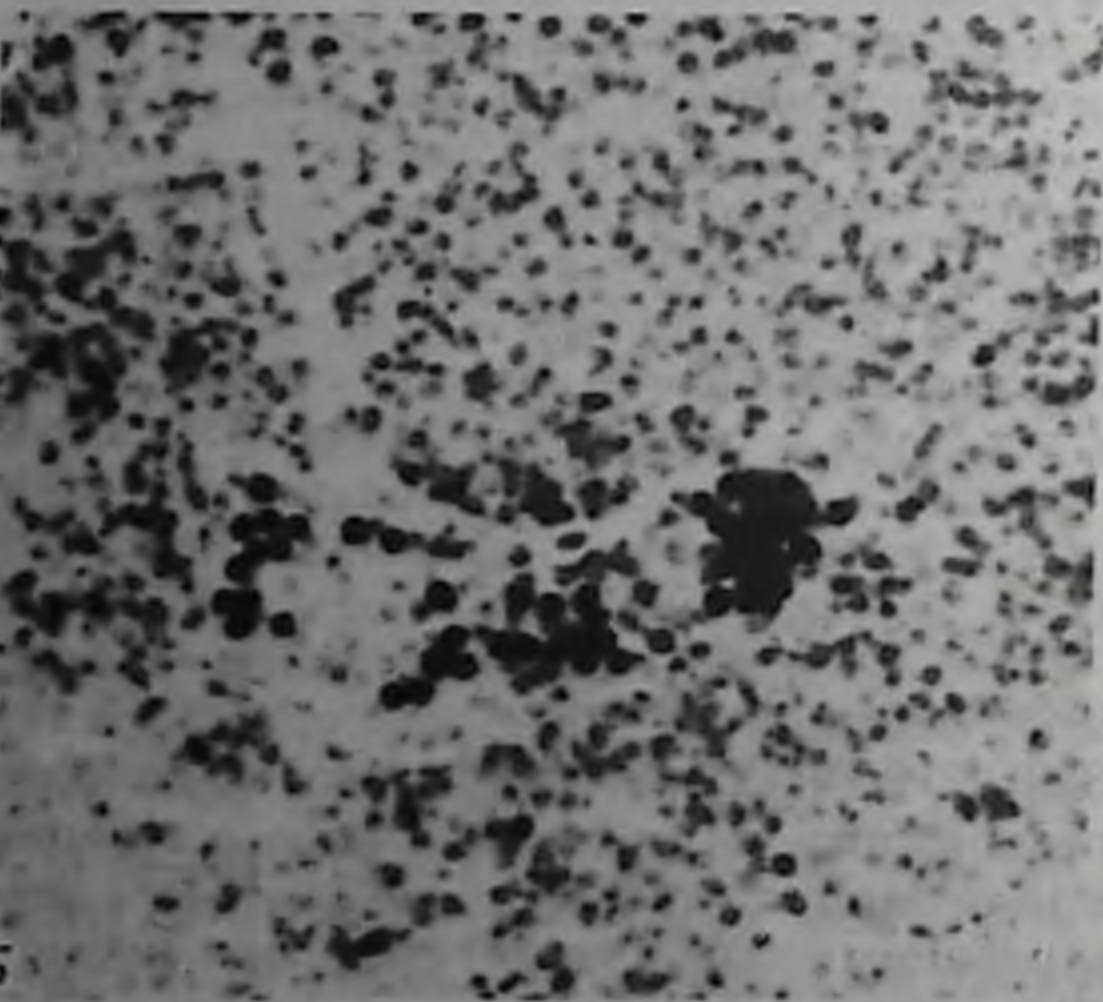
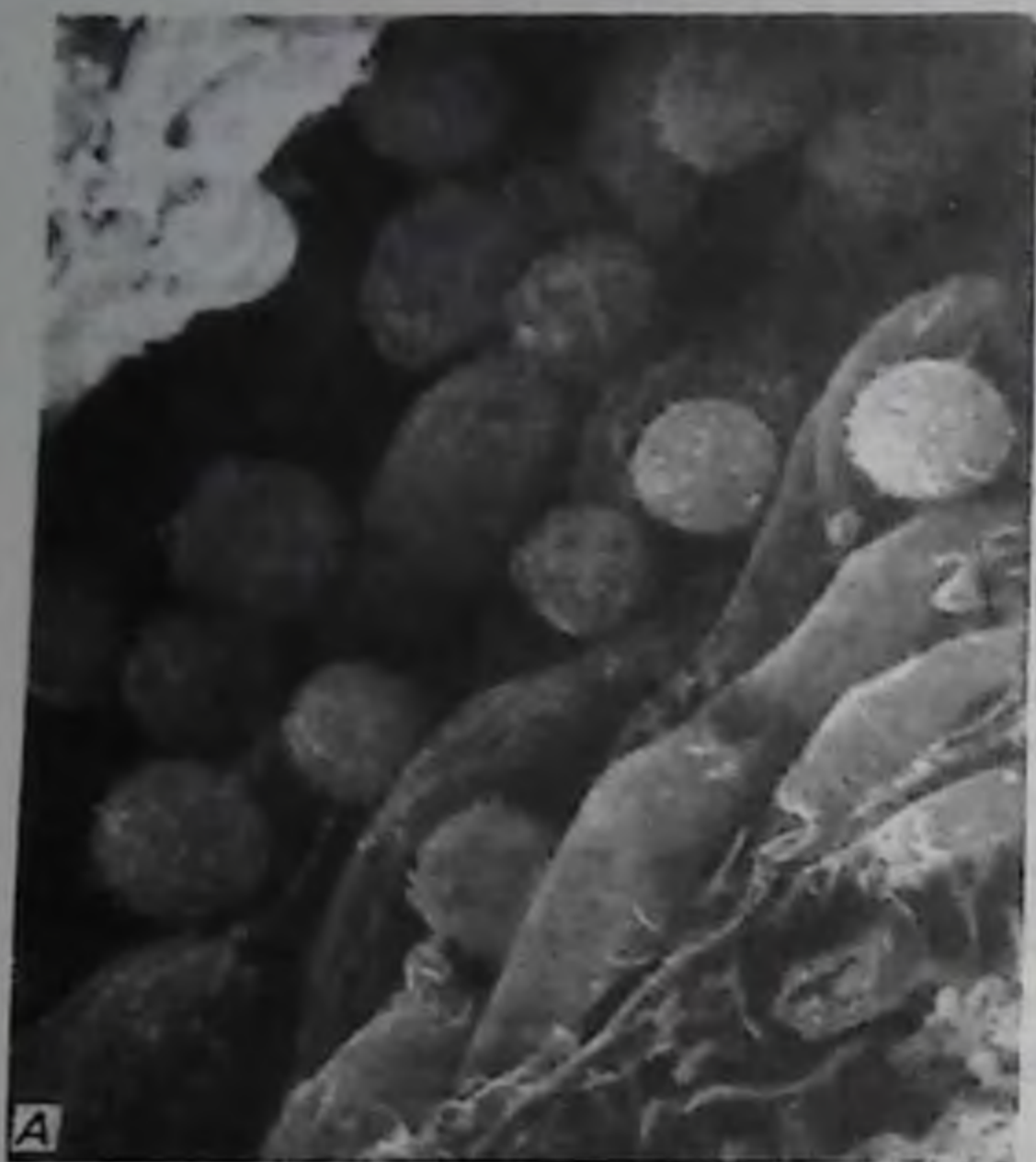


Рис. 6.3. Взаимодействие лимфоцитов с эндотелльными клетками, выступающими высокоэндотелиальные вены (ВЭВ) *in vivo* и *in vitro*.

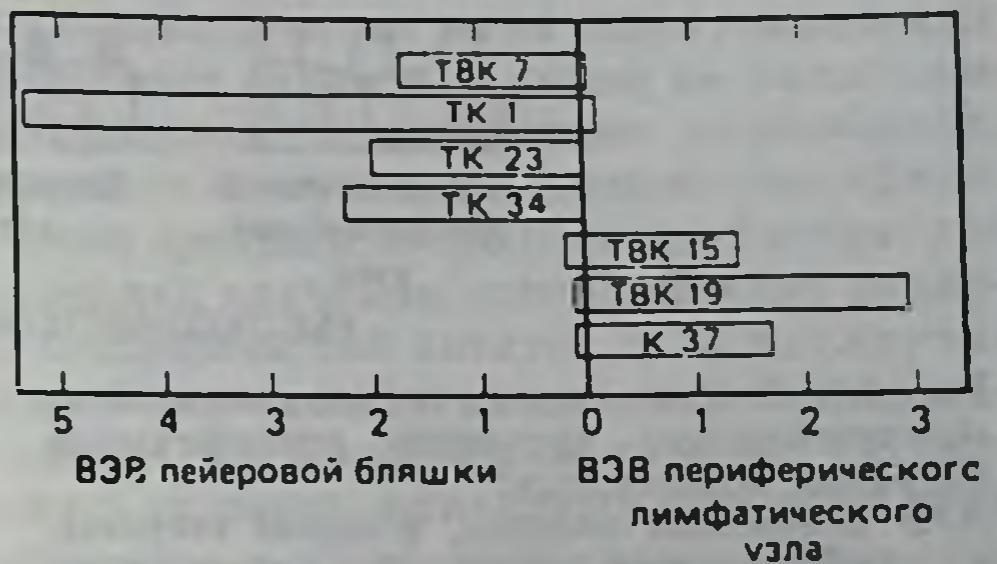
А. Электронная микрофотография (сканирующий микроскоп) внутренней поверхности одной из высокоэндотелиальных венул лимфатического узла мыши. Многочисленные лимфоциты прочно связаны с выпуклыми эндотелиальными клетками. Перед фиксацией методом перфузии с помощью глутарового альдегида в PBS неприкрепившиеся элементы крови отмывали, быстро пропуская через сосудистую систему культуральную среду ([91]; печатается с разрешения).

Б. Избирательное связывание лимфоцитов с ВЭВ на замороженном срезе лимфатического узла мыши. Лимфоциты инкубировали при 7 °C в течение 30 мин на свежемороженых срезах лимфатического узла мыши, после чего клетки, связавшиеся с ВЭВ, фиксировали на срезе с помощью глутарового альдегида в PBS. Прикрепленные клетки можно легко отличить от всех остальных, поскольку они окрашиваются тионином более интенсивно, чем лежащие под ними фрагментированные клетки тканевого среза ([92], печатается с разрешения).

времени, чем Т-клеткам, чтобы мигрировать из крови в грудной лимфатический проток [43, 44], и рециркуляция, по крайней мере некоторых популяций клеток памяти, осуществляется значительно интенсивнее, чем рециркуляция их «девственных» аналогов [45]. Тем не менее почти все малые лимфоциты в той или иной степени мигрируют [46], так что лимфоидные компартменты лимфоидных органов постоянно обмениваются. Клеточные миграции открывают лимфоцитам всех типов доступ к любым частям тела и, что, по-видимому, также важно, способствуют установлению межклеточных взаимодействий, необходимых для развития и регуляции иммунного ответа.

Рециркулирующие лимфоциты попадают из крови в лимфатические узлы и пейеровы бляшки, специфически связываясь со стенками расположенных эндотелиальных венул (ВЭВ) (рис. 6.3, А) и мигрируя затем через стенку сосуда в окружающую его лимфоидную паренхиму [42]. Такое избирательное взаимодействие лимфоцитов с ВЭВ и с сосудами, содержащими другие типы эндотелия, играет ключевую роль в регуляции транспорта лимфоцитов. Взаимодействие этих клеток с ВЭВ интенсивно исследовалось на моделях *in vitro* с помощью метода, разработанного Стэмпером и Вудруффом [47]; суть этого метода сводится к приготовлению замороженных срезов лимфоидных органов, несущих ВЭВ, и исследованию связывания зрелых лимфоцитов с ВЭВ при 7 °С (рис. 6.3, Б). Способность узнавать ВЭВ и взаимодействовать с ними приобретает лимфоцитами в процессе их созревания — зрелые В- и Т-клетки

рис. 6.4. Определение *in vitro* ВЭВ-связывающих свойств клеток ряда лимфом, выделенных от мышей линий АКР (обозначены ТК или К) или С57BL/Ка (обозначены ТВК) с помощью замороженных срезов периферических лимфатических узлов или пейеровых бляшек. Связывание нормальных лимфоцитов брыжеечных узлов с ВЭВ любого органа принимается за единицу. Представленные данные демонстрируют наличие механизмов, обеспечивающих почти абсолютную органныю специфичность распознавания ВЭВ лимфоцитами ([49]; печатается с разрешения).



периферической крови связываются с ВЭВ гораздо лучше, чем их незрелые предшественники, локализующиеся в костном мозге и в тимусе [48]. По-видимому, уход созревших лимфоцитов из первичных лимфоидных органов на периферию связан с экспрессией функциональных количеств рецепторов для ВЭВ и, вероятно, даже частично зависит от нее. Тимусные клетки-эмигранты всегда можно обнаружить в лимфоидных органах, содержащих ВЭВ, в течение 15 мин после мечения этих клеток *in situ* в тимусе [16].

При специфическом взаимодействии лимфоцитов с ВЭВ не только контролируется скорость притока лимфоцитов в тот или иной лимфоидный орган, но также и определяется специфическое направление, в котором движутся различные популяции лимфоцитов через слизистую оболочку к «неслизистым», лимфоидным тканям (см. обзоры [49, 50]). На рис. 6.4 приведен один из наиболее ярких примеров, демонстрирующих способность определенных популяций лимфоцитов избирательно распознавать эндотелиальные клетки отдельных органов — клетки В- и Т-лимфом связываются почти исключительно с ВЭВ лимфоидных органов, ассоциированных со слизистой — пейеровыми бляшками, в то время как клетки других лимфом обладают чуть ли не абсолютной специфичностью в отношении ВЭВ «неслизистых» периферических лимфатических узлов [51, 52]. Эти данные говорят о существовании механизмов (вероятно, с участием комплементарных лимфоцитарных и эндотелиальных узнающих молекул, или «рецепторов»), обеспечивающих почти абсолютную специфичность попадания лимфоцитов в «слизистые» или «неслизистые» лимфоидные органы.

Процессы избирательного узнавания ВЭВ, по-видимому, имеют место в той или иной степени на всех стадиях дифференцировки лимфоцитов, регулируя их распределение и, следовательно, заселенность определенных органов теми или иными субпопуляциями лимфоцитов [41, 50, 53]. Например, хотя подавляю-

щее большинство малых иммунокомпетентных, но непростимулированных лимфоцитов способно распознавать эндотелий обоих типов, тем не менее в зависимости от вида субпопуляции эти клетки отдают явное предпочтение ВЭВ либо периферических узлов, либо пейеровых бляшек, что и определяет степень заселенности «слизистых» и «неслизистых» лимфоидных органов функционально различающимися субпопуляциями лимфоцитов. Так, преобладание В-лимфоцитов в пейеровых бляшках (около 70% В-клеток, 10—20% Т-клеток) и Т-клеток



Рис. 6.5. Гипотетическая модель механизмов, обеспечивающих органную специфичность миграции лимфоцитов.

ВЭВ пейеровых бляшек, с одной стороны, и лимфатических узлов (за исключением брыжеечных) — с другой, имеют отличающиеся друг от друга поверхностные рецепторы для лимфоцитов. ВЭВ брыжеечных узлов, взаимодействующие с лимфоцитами, специфичны как к пейеровым бляшкам, так и к лимфатическим узлам, экспрессируют, по-видимому, ВЭВ-детерминанты обоих типов. Основные субпопуляции малых лимфоцитов (В-клетки, а также Т-клетки $Lyt-2^+$ и $Lyt-2^-$) способны связываться с ВЭВ обоих типов, однако обладают заметно выраженной предпочтительностью. Эта предпочтительность объясняется, вероятно, тем, что клетки упомянутых субпопуляций экспрессируют разные количества рецепторов для ВЭВ периферических узлов и пейеровых бляшек

(как показано на рисунке) либо несут рецепторы других типов, способные лишь к частичной дискриминации. Предпочтительность узнавания тех или иных ВЭВ определяется, очевидно, классовой, а не органной принадлежностью лимфоцитов. С другой стороны, некоторые лимфоциты (например, определенные иммунобласты), видимо, экспрессируют поверхностные рецепторы исключительно для ВЭВ-детерминант либо периферических лимфатических узлов, либо пейеровых бляшек, что обеспечивает их специфическое передвижение либо через лимфатические узлы, либо через слизистые лимфоидные ткани. Такая способность активированных лимфоцитов экспрессировать рецепторы только названных типов, вероятно, не зависит от их классовой принадлежности. По-видимому, она обусловлена воздействием той среды, в которой происходит blastogenesis ([91]; печатается с разрешения).

в периферических лимфатических узлах (70% Т-клеток, 25% В-клеток), по-видимому, в значительной мере определяется предпочтением мигрирующих В-клеток к ВЭВ пейеровых бляшек, а Т-клеток — к ВЭВ периферических узлов [41]. Менее выраженные, но все же существенные различия наблюдаются в распределении Т-клеток $Lyt-2^+$ и $Lyt-2^-$, причем очевидно, что эти различия также связаны с неодинаковой способностью этих клеток узнавать ВЭВ [53]. На рис. 6.5 схематически изображена одна из гипотетических моделей распознавания ВЭВ лимфоцитами.

6.2.2. Роль антигена

Хотя описанные механизмы, обеспечивающие избирательность локализации лимфоцитов, действуют независимо от антигена, введение антигена может оказывать существенное влияние на перемещение этих клеток. Одно из наиболее

ранних проявлений воздействия антигена, наблюдаемое в первые часы после стимуляции, сводится к увеличению кровотока через стимулированную ткань [54, 55]. Ток крови в месте локального воспаления в коже или в стимулированном лимфатическом узле может возрасти в 10—25 раз по сравнению с нормальными движущимися через воспаленную область. Некоторые антигены еще больше увеличивают накопление лимфоцитов, вызывая временную задержку их выхода из стимулированных лимфатических узлов (см. обзор [55]). В течение 5—7 дней после антигенной стимуляции размер лимфатического узла может увеличиться в 15 раз, что, вероятно, в значительной степени обусловлено измененным движением лимфоцитов. Не исключено, что такое неспецифическое воздействие на скорость поступления и выхода лимфоцитов из стимулированных участков может приводить к усилению иммунного ответа просто в результате увеличения числа лимфоцитов, способных реагировать с антигеном.

Помимо описанных изменений, касающихся всего пула циркулирующих лимфоцитов, антигенная стимуляция оказывает сильное влияние на локальное содержание *антиген-специфических* лимфоцитов. Это влияние выражается, по-видимому, не в обеспечении избирательного поступления антиген-специфических лимфоцитов из крови, хотя такая точка зрения и обсуждается в литературе [56], а 1) в удержании уже в лимфоидных тканях случайно попавших туда рециркулирующих лимфоцитов, встретивших специфический антиген, и 2) в стимуляции локальной пролиферации и клональной экспансии этих антиген-специфических популяций лимфоцитов. Было показано, что в некоторых случаях активация лимфоцитов с помощью специфического антигена приводит к переходу этих клеток в «неподвижную» фазу пролиферации и дифференцировки, находясь в которой активированные лимфоциты в большинстве своем не способны локализоваться в лимфоидных органах, будучи внутривенно введены в организм, и не могут взаимодействовать с ВЭВ. Подавление функционирования рецепторов для ВЭВ само по себе могло бы обеспечить задержание антиген-специфических лимфоцитов, или, что, возможно, более вероятно, наблюдаемая супрессия просто происходит одновременно с появлением других фенотипических и поверхностных свойств, индуцируемых антигеном и отвечающих за предотвращение перемещения лимфоцитов из того места, где находится антиген.

Примером клеток, проходящих в процессе своей дифференцировки «неподвижную» стадию, служат клетки В-ряда, локализованные в зародышевых центрах [57]. Что касается Т-лимфоцитов, то вскоре после внутривенного введения антигена в селезенке реципиента наблюдается накопление антиген-специфических Т-хелперов, которые возвращаются в рециркулирующий пул уже в качестве делящихся эффекторных клеток только через 2—3 дня [58—60]. Другой пример — это Т-клеточные клоны, чувствительные к антигенам и факторам роста; хотя и выращенные *in vitro*, эти клетки сохраняют многие признаки нормальных Т-бластов, и тот факт, что все изученные клоны имеют «неподвижный» фенотип [61], убедительно свидетельствует в пользу предположения о наличии определенных Т-бластов с таким же фенотипом и *in vivo*. Неспособность к нормальной миграции, вероятно, ограничивает возможности использования Т-клеточных клонов для исследований *in vivo*.

Потеря лимфоцитами способности к перемещению наблюдается также при их активации *in vitro*. В смешанной культуре большинство лимфоцитов, отвечающих на митоген или аллогенные лимфоциты, теряет способность узнавать ВЭВ и связываться с ними в течение 3 дней — почти в те же сроки, в которые удается идентифицировать отвечающие клетки как отдельную популяцию крупных лимфоцитов [62]. Неотвечающие малые лимфоциты той же самой куль-

туры продолжают узнавать ВЭВ, подтверждая то, что потеря способности к миграции специфична для активированной популяции.

При локализации процессов пролиферации и дифференцировки активированных лимфоцитов *in vivo* вновь образующиеся клетки могут подвергаться либо репрограммированию, либо отбору, приводящему к изменению возможных путей их перемещения. Многие активированные клетки, покидающие то место, где они были стимулированы антигеном, по-видимому, вновь приобретают способность к миграции, однако теперь они проявляют специфичность, зависимость от места и независимость от типа популяции; иными словами, и В-, и Т-бласты специфически возвращаются в области (либо слизистые, либо неслизистые), сходные с теми, в которых они впервые встретились с антигеном (см. обзор [50]). Аналогично этому различные популяции образовавшихся в лимфатических узлах малых Т-лимфоцитов, развивающиеся у молодых овец с возрастом (и в результате антигенной стимуляции?), специфически рециркулируют либо через кишечник, либо через периферические лимфатические узлы [63—65]. В миграции этих популяций отмечается определенная степень органной специфичности, близкая к той, какой обладают клетки лимфом, связывающиеся с ВЭВ *in vitro*. Таким образом, индуцированная экспрессия поверхностных рецепторов для органоспецифических эндотелиальных детерминант играет, вероятно, существенную роль в распределении по тканям популяций постмитотических эффекторных лимфоцитов и клеток памяти и, несомненно, имеет большое значение для разделения субпопуляций лимфоцитов, отвечающих за различия в иммунных свойствах слизистых и неслизистых органов. Например, предшественники IgA-секретирующих плазматических клеток, пролиферирующие в микроокружении пейеровых бляшек, могут быть индуцированы или отобраны таким образом, что в дальнейшем они будут экспрессировать рецепторы, специфические в отношении детерминант эндотелиальных клеток, выстилающих капилляры в lamina propria слизистых, что приводит в конечном итоге к избирательному распределению IgA-секретирующих плазматических клеток в слизистых поверхностях. Остается непонятным, являются ли молекулы лимфоцитов и эндотелиальных клеток, обеспечивающие такую избирательную локализацию в lamina propria или в других нелимфоидных областях, идентичными, связанными или они совершенно независимы от рецепторных систем лимфоцит—ВЭВ.

Хотя, согласно имеющимся данным, локальному микроокружению принадлежит важная роль в установлении миграционной специфичности постмитотических лимфоцитов, мало что известно о механизмах, отвечающих за избирательную экспрессию соответствующих детерминант на поверхности эндотелиальных клеток. В связи с этим представляет интерес следующий факт: брыжеечный узел, дренирующий кишечник, содержит ВЭВ, связывающие как клетки периферического лимфоузла, так и клетки лимфомы, специфичные к ВЭВ пейеровых бляшек [52], — т. е. в данном случае, очевидно, одновременно экспрессируются как слизистые, так и неслизистые эндотелиальные детерминанты. Из этого можно сделать вывод, что экспрессия эндотелиальных детерминант, характерных для ВЭВ пейеровых бляшек, может быть вызвана некими растворимыми или клеточными факторами слизистого происхождения, попадающими в лимфатические сосуды слизистых органов. Значение компонентов лимфы для поддержания нормального дифференцированного состояния ВЭВ исследовали Хендрик и др. [66], обнаружившие, что повреждение приносящих (афферентных) лимфатических сосудов периферических узлов у крыс приводит к тому, что ВЭВ утрачивают свои типичные морфологические свойства и способность передавать лимфоциты, поступающие с кровью.

Недавно был идентифицирован поверхностный белок лимфоцитов, по-видимому принимающий участие в распознавании ВЭВ периферических узлов [67]. Этот белок выявляется с помощью крысиных моноклональных антител MEL-14, которые распознают антигенную детерминанту на всех исследованных клетках лимфомы, связывающихся с ВЭВ периферических узлов, и на нормальных лимфоцитах, но не реагируют ни со специфичными к пейеровым бляшкам, ни с ВЭВ-несвязывающимися клетками В- и Т-лимфом. Предварительная инкубация клеток лимфом, специфических в отношении ВЭВ периферических узлов, с насыщающим количеством MEL-14 приводит к потере этими клетками способности связываться с ВЭВ, тогда как антитела к другим широко представленным поверхностным антигенам не оказывают подобного действия. MEL-14 не ингибирует связывания специфичных к пейеровым бляшкам опухолевых клеток. Обработка нормальных лимфоцитов антителами полностью угнетает их способность связываться с ВЭВ периферических узлов, хотя при этом их сродство к ВЭВ пейеровых бляшек практически не изменяется (даже несмотря на то, что антитела связываются с огромным большинством нормальных малых лимфоцитов, в том числе и с клетками, заселяющими пейеровы бляшки). Хотя окончательный вывод нуждается в строгом доказательстве, такая специфичность ингибирования, наблюдаемая в экспериментах с клетками, способными узнавать ВЭВ как периферических узлов, так и пейеровых бляшек, уже может служить достаточным основанием для того, чтобы считать распознаваемый антиген частью рецептора для ВЭВ периферических узлов, а не какой-то связанной с ним, но не относящейся к делу молекулой. Белок, предположительно узнающий ВЭВ, представляет собой гликопротеин, который при электрофорезе в ПААГ с ДСН мигрирует так же, как полипептид с мол. массой около 80 000 Да.

Результаты экспериментов по количественному определению экспрессии антигенной детерминанты нормальных лимфоцитов, распознаваемой MEL-14, суммированы в табл. 6.2. Установленная с помощью иммуногистологических методов локализация клеток, несущих предполагаемый рецептор, в стимулиро-

Таблица 6.2. Экспрессия предполагаемого рецептора для ВЭВ периферических узлов в процессе дифференцировки лимфоцитов¹⁾

Клетки	Окрашивание с помощью MEL-14		
	приблизительное количество позитивных клеток, %	относительная флуоресценция ²⁾	ВЭВ-связывающая способность (ОС в расчете на ПУ ВЭВ) ³⁾
Пре-В-клетки костного мозга	≥ 80	60	НО ⁴⁾
Тимоциты	≥ 90	80	0,05
Лимфоциты периферических лимфоузлов	≥ 80	800	единица
Клетки зародышевых центров	< 5	0	0,0

1) Суспензии клеток мышей линии BALB/c окрашивали MEL-14. В качестве вторых антител использовали высокоспецифические кроличьи антитела к крысиным Ig, меченные флуоресцентным красителем. Окрашенные клетки анализировали методом проточной цитофлуориметрии. Крысиные моноклональные антитела с неизвестной специфичностью служили отрицательным контролем, определяя фон.

2) В условных единицах, за вычетом фона.

3) Относительное связывание (ОС) пропорционально числу лимфоцитов в образце, связывающихся с ВЭВ периферических узлов (ПУ) в стандартных условиях. Значения нормированы таким образом, что связывающая способность клеток лимфатических узлов определяется в единицах ОС.

4) Не определяли.

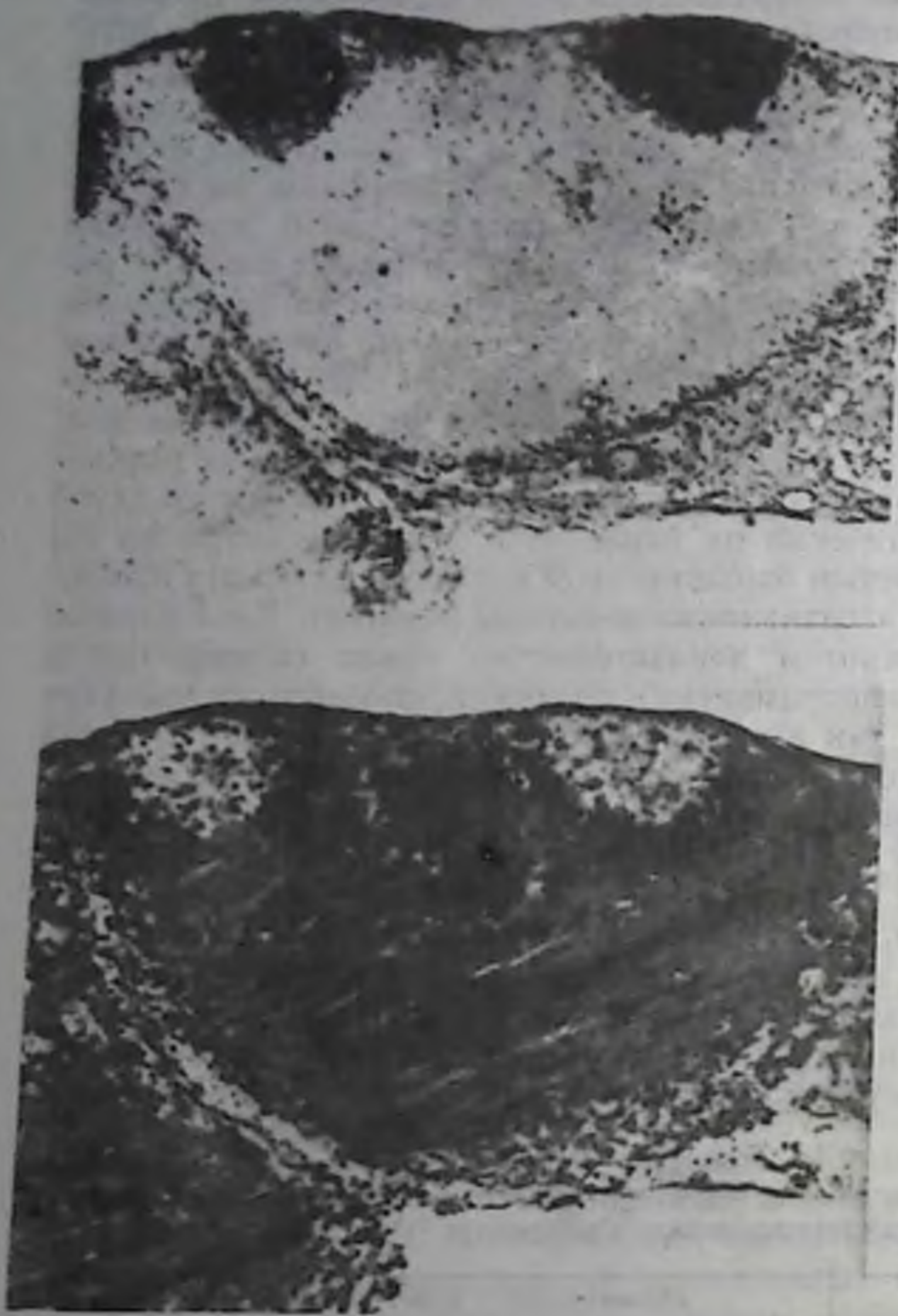


Рис. 6.6. Иммунопероксидазное окрашивание замороженных срезов нестимулированного лимфатического узла мыши, демонстрирующее сегрегацию В- и Т-лимфоцитов в дискретные домены. *Вверху:* использование анти-IgD позволяет выявить локализацию В-клеток в отделенных друг от друга фолликулах, расположенных в наружной части коркового вещества. Кроме того, отдельные В-клетки обнаруживаются в местах их проникновения в лимфатический узел, которые находятся главным образом внутри Т-клеточного домена или в областях, примыкающих к нему. *Внизу:* окрашивание с помощью анти-Thy-1 определяет границы Т-клеточного домена (преимущественно во внутренней части коркового вещества), а также демонстрирует присутствие отдельных Т-клеток внутри В-клеточных фолликулов. (Фотографии любезно предоставлены R. Reichert.)

важном антигеном лимфатическом узле показана выше (см. рис. 6.6). Согласно модели, изображенной на рис. 6.5, предполагаемый рецептор имеется на поверхности огромного большинства малых периферических В- и Т-лимфоцитов, но не у клеток, выстилающих ВЭВ. Антиген, ассоциированный с рецептором, не обнаруживается на клетках зародышевых центров (рис. 6.6) и на культивируемых *in vitro* Т-клеточных клонах. Удивительно, что тимоциты и значительная часть пре-В-клеток костного мозга несут этот антиген, хотя и в существенно меньшем количестве, чем периферические лимфоциты. Таким образом, экспрессия антигена, реагирующего с MEL-14, строго коррелирует со способностью лимфоцитов узнавать ВЭВ периферических узлов и взаимодействовать с ними. Следовательно, антитела MEL-14 могут служить зондом для выявления одного из специфических дифференцировочных антигенов, непосредственно входящего в состав рецепторов, необходимого для осуществления межклеточного взаимодействия, которое имеет место при функционировании лимфоидной ткани. Следует отметить, однако, что экспрессия этой антигенной детерминанты не ограничивается лимфоидными клетками, — MEL-14 окрашивают также основ-

ную популяцию крупных, преимущественно нелимфоидных клеток костного мозга. Пока еще не установлено, принадлежит ли эта антигенная детерминанта поверхностной молекуле, идентичной или лишь перекрестно-реагирующей с предполагаемым рецептором лимфоцита к ВЭВ периферических узлов. Однако обнаружение этой детерминанты на поверхности нелимфоидных клеток позволяет предположить, что миграция клеток нескольких гемопоэтических рядов (таких, как моноциты, тучные клетки и нейтрофилы) осуществляется с помощью того же самого (или похожего) механизма узнавания эндотелиальных клеток, который действует при миграции лимфоцитов.

Итак, взаимодействие лимфоцитов с ВЭВ занимает одно из центральных мест в цепи процессов, управляющих распределением лимфоцитов по лимфоидным органам, и является необходимым для нормального функционирования иммунной системы. Структуры, непосредственно участвующие в этом взаимодействии, экспрессированы на поверхности как лимфоцитов, так и клеток, выстилающих ВЭВ. Различающиеся эндотелиальные детерминанты периферических узлов, с одной стороны, и пейеровых бляшек — с другой, вместе с комплементарными рецепторами лимфоцитов определяют органныю специфичность миграции лимфоцитов либо в слизистые, либо в неслизистые лимфоидные ткани. Вероятно, те же самые или похожие по своему действию механизмы контролируют движение лимфоцитов по нелимфоидным органам. Эти рецепторные системы играют основную роль в регуляции тканевого распределения функционально различающихся популяций лимфоцитов и, следовательно, в значительной степени определяют особенности локальных иммунных ответов.

6.2.3. В- и Т-клеточные домены в лимфоидных органах

После того как лимфоциты проникают через слой высокого эндотелия в лимфатических узлах и пейеровых бляшках или попадают из маргинальной зоны в белую пульпу селезенки, они быстро собираются в неких дискретных областях лимфоидной паренхимы, причем каждый класс лимфоцитов — в своих. В-клетки обнаруживаются в первичных фолликулах, локализованных в наружной субкапсулярной части коркового вещества лимфатических узлов, тогда как Т-клетки преимущественно остаются в диффузной, или внутренней, части коркового вещества лимфатических узлов (см. схематическое изображение строения лимфатического узла, рис. 6.6 и рис. 6.7) и в периартериальных лимфатических муфтах селезенки. Хотя механизмы обособления лимфоцитов различных классов внутри организованных лимфоидных тканей до сих пор неизвестны, можно рассмотреть несколько возможностей. Например, В- и Т-клетки могли бы избирательно поступать в определенные области лимфоидных органов, откуда они непосредственно направлялись бы в определенные домены. Однако это представляется маловероятным, поскольку, во-первых, В- и Т-лимфоциты входят в лимфатические узлы по одним и тем же ВЭВ [68]; во-вторых, большинство ВЭВ расположено в диффузном корковом веществе (Т-клеточные области), и, в-третьих, те ВЭВ, которые находятся вблизи В-клеточных доменов в лимфатических узлах (или обращены в их сторону), не обнаруживают какой-либо предпочтительности в связывании или переносе В-клеток [48, 68]. Куртис и де Суса [69] предложили другой возможный механизм разделения В- и Т-клеток. Они показали, что Т-клетки выделяют растворимый фактор, ингибирующий спонтанную агрегацию В-клеток, а В-клетки в свою очередь секретируют фактор, оказывающий аналогичное действие на Т-клетки. Если бы эти факторы обладали такими же свойствами *in vivo*, они могли бы препятствовать накоплению В-клеток в Т-клеточных областях и наоборот.

Не исключено, однако (и скорее всего, так и происходит на самом деле), что рассматриваемый механизм должен включать избирательное взаимодействие В- и Т-клеток с клетками стромы или ретикулярными элементами, поскольку нелимфоидные клетки, локализованные в В- и Т-областях, весьма сильно отличаются друг от друга. Т-клеточные области лимфатических узлов, селезенки и мозгового вещества тимуса содержат уникальные по своим морфологиче-

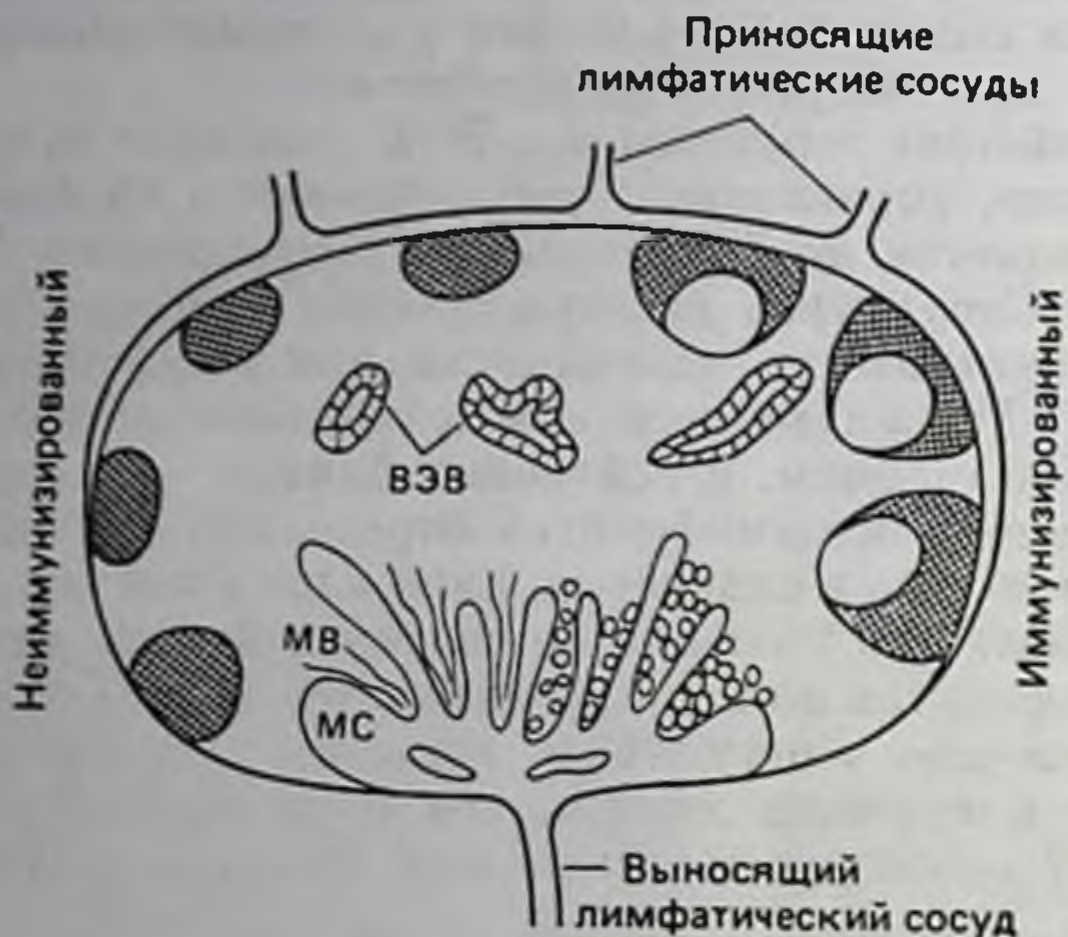


Рис. 6.7. Схематическое изображение строения лимфатического узла мыши. Приносящая (афферентная) лимфа, содержащая лимфоциты, макрофаги и по временам антиген, поступает по приносящим лимфатическим сосудам в субкапсулярное пространство, проникает сквозь внутреннюю часть коркового вещества (показано светлым) и мякотные тяжки мозгового вещества (МВ) в синусы мозгового слоя (МС), после чего выходит из узла по выносящим лимфатическим сосудам. В- и Т-лимфоциты поступают в узел преимущественно из крови, проникая через стенку посткапиллярных высокоэндотелиальных венул (ВЭВ), а затем собираются в дискретных областях — В-клеточных фолликулах (показано черным) и Т-клеточном районе, занимающем внутреннюю часть кор-

кового вещества (показано светлым). Со временем они покидают лимфатический узел с выходящей из него лимфой. Антигенная стимуляция вызывает активацию и дифференцировку лимфоцитов. Две хорошо выявляемые гистологическими методами особенности иммунизированных лимфатических узлов изображены на рисунке справа: а) зародышевые центры (серые кружки), представляющие собой кластеры делящихся и дифференцирующихся В-клеточных blastов, отвечающих на локализованный там же антиген и обеспечивающих проникновение малых В-лимфоцитов в окружающие серповидные области первичных фолликулов, и б) расширение мякотных тяжей мозгового вещества (МВ) за счет плазматических клеток.

ским особенностям стромальные элементы, называемые интердигитальными клетками (ИДК). Эти клетки характеризуются наличием многочисленных сплетающихся пальцевидных отростков, которые находятся в тесном контакте с Т-лимфоцитами [70, 71]. Интердигитальные клетки имеют несколько общих свойств с эпидермальными клетками Лангерганса, а также с презентующими антиген «дендритными» клетками, описанными Нуссеншвайгом и др. [72]. К таким свойствам относятся некоторые морфологические признаки, экспрессия поверхностных Ia-антигенов и отсутствие фагоцитирующей активности (см. обзоры [73, 74]). Таким образом, ИДК, вероятно, принимают участие в процессе презентации антигена или в регуляции взаимодействия Т- и В-клеток.

В-клеточные области периферических лимфоидных органов содержат свои собственные, характерные для данных областей ретикулярные клетки, дендритные ретикулярные клетки или фолликулярные дендритные клетки (ФДК) [70, 71, 74]. ФДК заполняют все пространство внутри первичных фолликулов и хорошо видны также в светлой зоне активных зародышевых центров, где наиболее отчетливо проявляется наличие у этих клеток протяженных дендритных отростков, контактирующих с активно пролиферирующими В-клетками, расположенными в зародышевом центре. Фолликулярные дендритные клетки почти наверняка участвуют в презентации антигена В-клеткам, поскольку антигены можно прямо обнаружить на поверхности отростков ФДК. Электронно-микроскопические исследования выявили множество различий в ультраструктуре ИДК и ФДК, а предварительные эксперименты, проведенные с суспензией изолированных предполагаемых ФДК, позволили заключить, что в отличие от ИДК ФДК, по-видимому, не экспрессируют поверхностные Ia-антигены (Дж. Хамфри, личное сообщение).

Таким образом, В- и Т-клеточные области периферических лимфоидных органов заселены различающимися популяциями стромальных клеток, которые, возможно, и определяют характерные особенности данных областей. Наличие тесных контактов между лимфоцитами и стромальными клетками ясно свидетельствуют в пользу того, что специфические взаимодействия Т-ИДК и В-ФДК отвечают, вероятно, за обособление В- и Т-лимфоцитов в отдельные домены, а также за возникновение и(или) регуляцию иммунных ответов. В настоящее время предпринимаются попытки выделить индивидуальные популяции лимфоидных стромальных клеток. Усиленная разработка методов очистки откроет возможность для прямого изучения функциональных свойств этих важных клеток лимфоидных тканей.

Возникает вопрос: в чем смысл существования В- и Т-клеточных доменов? Известно, что для образования антител к большинству антигенов необходимо взаимодействие Т- и В-клеток. Какое же преимущество с этой точки зрения дает разобщение двух классов лимфоцитов? Если бы взаимодействие Т- и В-клеток осуществлялось путем их прямого контакта, то для более высокой эффективности процесса популяции должны были бы перемешиваться. Разумеется, такое перемешивание и происходит в течение коротких промежутков времени в определенных ограниченных областях лимфоидных органов (например, в местах проникновения лимфоцитов и вокруг ВЭВ или в маргинальных синусах селезенки), однако маловероятно, чтобы столь кратковременный контакт имел существенное значение для функционального клеточного кооперирования. По всей видимости, функция Т-клеток при развитии иммунного ответа *in situ* осуществляется не путем прямого контакта с В-клетками, а опосредуется вспомогательными клетками (возможно, макрофагами, ИДК и ФДК). Тогда заключение В- и Т-клеток в дискретные области могло бы оптимизировать их способность получать и передавать соответствующие сигналы от элементов стромы. Существует и другая гипотеза, признающая важную роль прямого контакта В- и Т-клеток для В-клеточной активации. В этом случае предполагается, что контакт возникает не в результате перемешивания всех В- и Т-клеток, а благодаря избирательному заселению В-клеточных доменов соответствующими Т-хелперами. Эта гипотеза согласуется со следующими наблюдениями: во-первых, как в первичных, так и во вторичных (содержащих зародышевые центры) В-клеточных фолликулах обнаруживается небольшое количество Т-лимфоцитов [75]; во-вторых, эти Т-клетки (особенно в зародышевых центрах) в основном имеют фенотип, характерный для Т-хелперов (Lyt-1⁺, Lyt-2⁻) [76], и, в-третьих, у нормальных мышей многие делящиеся В-клетки физически ассоциированы

с разбросанными по фолликулам Т-клетками [77]. Эта модель предполагает, что разобщение В- и Т-клеток необходимо для предотвращения нежелательных межклеточных взаимодействий, приводящих к таким, например, последствиям, как нерегулируемый иммунный ответ В- и Т-клеток друг против друга.

6.2.4. Строение лимфоидных органов и иммунные реакции

Функциональное значение микроокружения, существующего в лимфоидных органах, для развития иммунных ответов *in vivo* было наглядно продемонстрировано в экспериментах по изучению процессинга антигена с помощью элементов стромы и временных взаимоотношений между этим процессингом и активацией лимфоцитов. Как правило, антигены поступают в лимфатические узлы по приносящим лимфатическим протокам, впадающим в субкапсулярные синусы, а в селезенку по кровеносным сосудам, омывающим маргинальный синус. В лимфоидных органах обоих типов эти места обогащены макрофагами, быстро фагоцитирующими введенный материал. Большая часть такого захваченного антигена, по-видимому, разрушается, не внося сколько-нибудь существенного вклада в развитие иммунного ответа. Однако часть антигена, вероятно, остается в ассоциированном с поверхностью клеток виде и через 18—24 ч после иммунизации появляется в весьма специфическом виде внутри первичных фолликулов (см. обзор [74]). Хотя какая-то доля этого фолликулярного антигена может быть связана с лимфоцитами, большая его часть, несомненно, локализуется на поверхности отростков фолликулярных дендритных клеток. До сих пор непонятно, каким образом эти клетки удерживают антиген; предполагается, что это происходит при прямом или непрямом участии предсуществующих специфических антител [74, 78]. Класс антител и их способность фиксировать комплекс имеют, по-видимому, важное значение для фолликулярной локализации комплексов антиген — антитело [78]. Согласно одной из гипотез, фолликулярные дендритные клетки экспрессируют поверхностные рецепторы для Fc-областей иммуноглобулинов или для компонентов системы комплемента и благодаря этим рецепторам избирательно взаимодействуют с антителами, связанными с антигеном. Однако возникает вопрос об изначальном источнике антиген-специфических антител, поскольку многие антигены обнаруживаются в фолликулах еще до того, как появляется заметное количество сывороточных антител или специфических антителообразующих клеток. Фолликулярную локализацию можно наблюдать даже после облучения животных такими дозами, которые вызывают гибель практически всех В-лимфоцитов. Не исключено, что антителами, опосредующими связывание антигенов с фолликулярными дендритными клетками, служат какие-то перекрестно реагирующие или «естественные» антитела, уже присутствующие в сыворотке крови в низкой концентрации. Возможно, однако, что этот эффект достигается в результате взаимодействия ФДК с антиген-специфическими факторами, секретруемыми Т-клетками.

Первое, что происходит в лимфоидном компартменте лимфатического узла в ответ на введение какого-либо сложного антигена, например бараньих эритроцитов (БЭ), — это волна процессов активации и деления лимфоцитов, возникающая через 1—2 дня после иммунизации [79]. Частота Т-клеточных митозов становится максимальной приблизительно на 3-й день, а затем довольно быстро снижается, достигая обычного уровня на 7-й или 8-й день. Частота В-клеточных митозов доходит до максимума примерно на один день позже и остается сравнительно высокой в течение более продолжительного времени. Антителообразующие клетки, секретирующие антитела против бараньих эритроцитов, преимущественно IgM-класса, появляются на 3-й или 4-й день и скоро оказываются

основным компонентом мягкотных тяжей. Начиная с 4-го или 5-го дня большинство делящихся В-клеток собирается в обособленные группы, называемые зародышевыми центрами, которые связываясь со специфическим антигеном, располагаются на поверхности фолликулярных дендритных клеток. Маловероятно, чтобы зародышевые центры участвовали в генерировании первичного иммунного ответа, поскольку их удается достоверно идентифицировать только после первого появления сывороточных антител. Аналогичное поведение В- и Т-клеток наблюдается в селезенке после внутривенного введения бараньих эритроцитов [80].

Время протекания всех этих реакций, выявленных гистологическими методами, равно как и их относительный вклад в иммунный ответ, сильно варьируют и зависят в значительной степени от природы иммунизирующего антигена. Так, например, более ярко выраженная и более длительная реакция, происходящая в паракортикальном веществе, является, вероятно, основным проявлением ответов на антигены, вызывающие Т-клеточный иммунитет (к таким антигенам относятся оксазолон и другие контактные сенсибилизаторы или аллотрансплантаты) [81]. При стимуляции некоторыми полимерными антигенами, индуцирующими Т-независимый гуморальный ответ (преимущественно антитела IgM- и IgG3-классов) образование плазматических клеток происходит на фоне относительно слабой паракортикальной Т-клеточной реакции, не сопровождаясь появлением отчетливо выраженных зародышевых центров [82, 83]. С другой стороны, развитие Т-зависимого гуморального ответа сопровождается активным формированием зародышевых центров, что, по всей видимости, служит необходимым условием эффективного образования антител IgG- и IgA-классов. Весьма важное значение имеет также и форма поступающего антигенного материала. Корпускулярные и агрегированные антигены, а также комплексы антиген-антитело, образованные при избытке антигена, вызывают оптимальный ответ, тогда как те же самые антигены в растворимой форме часто являются слабыми иммуногенами, что проявляется в возникновении замедленной и слабой ответной реакции [78].

Лимфобласты, образующие зародышевые центры, обладают уникальным фенотипом: помимо своих больших размеров (в среднем), что является следствием их активированного состояния, эти клетки (у мышей и у людей) характеризуются высоким содержанием поверхностных участков связывания для РНА, растительного лектина, специфически взаимодействующего с концевыми остатками галактозы [84—86] (рис. 6.8). Это свойство позволяет отличать клетки зародышевых центров от других В-клеток, а также от плазматических клеток и от большинства плазмобластов. Ранее мы уже высказывали предположение о том, что РНА-связывающие участки могут либо быть ассоциированы с молекулами, помогающими удерживать дифференцирующиеся лимфоидные популяции в определенных местах, либо сами выступать в роли таких молекул, поскольку основные популяции лимфоцитов с фенотипом РНА^{hi}-клетки зародышевых центров [87, 88], тимоциты и, по-видимому, пре-В-клетки костного мозга — все представляют собой немигрирующие популяции, на дифференцировку которых оказывает влияние локальное микроокружение. Проведенные недавно эксперименты с использованием РНА в качестве маркера для идентификации В-клеток зародышевых центров в суспензиях стимулированных лимфатических узлов или пейеровых бляшек показали, что эти клетки находятся на одной из ключевых стадий В-клеточной дифференцировки. Возможно, самая существенная фенотипическая особенность клеток зародышевых центров — это экспрессия поверхностных Ig-рецепторов, специфичных по отношению к индуцирующему антигену. Действительно, после первичной стимуляции

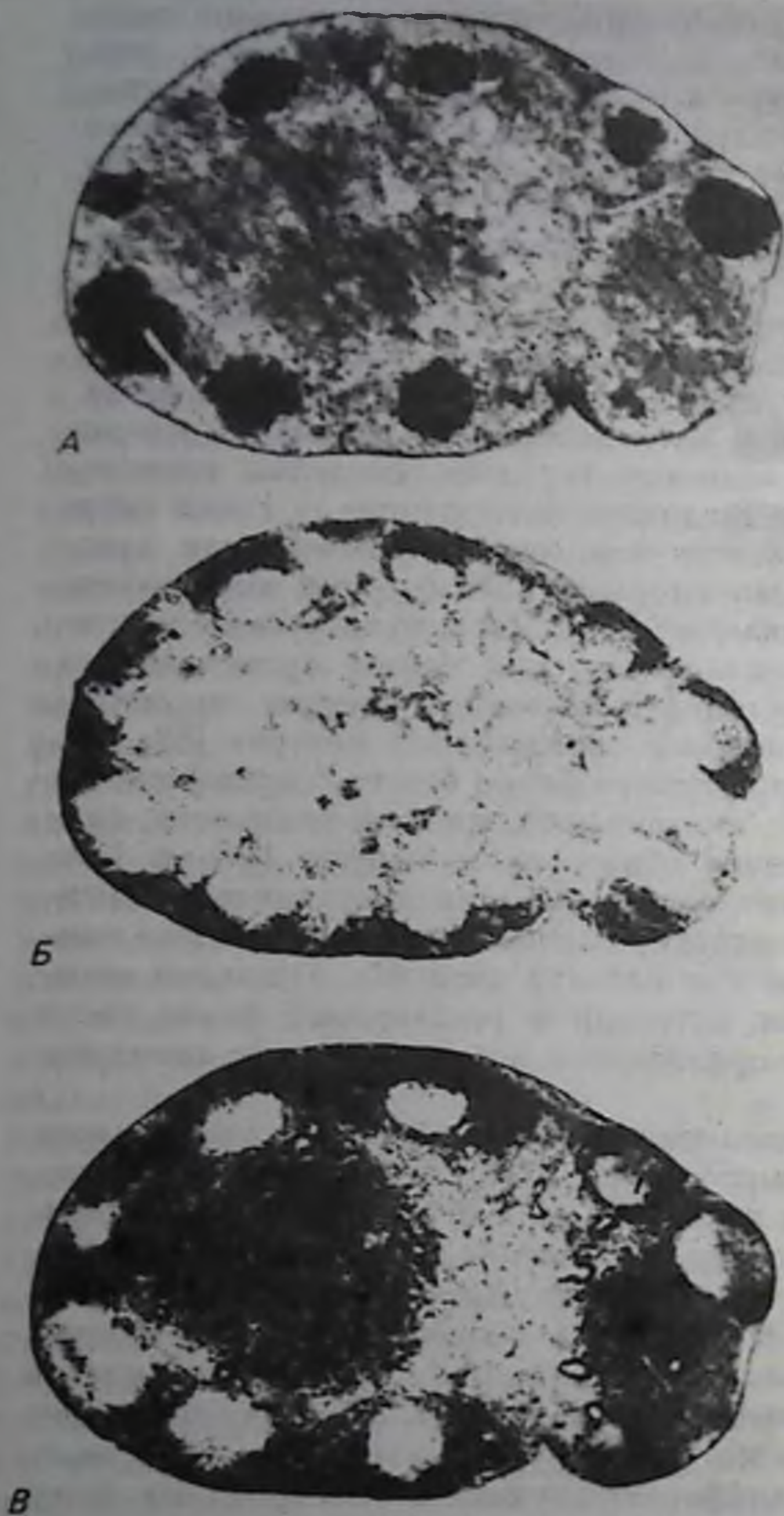


Рис. 6.8. Изучение стимулированного антигеном лимфатического узла с помощью иммунопероксидазного окрашивания. Через 7 дней после иммунизации бараньи эритроцитами удален плечевой лимфатический узел. Серийные замороженные срезы были окрашены. А: один из растительных лектинов, агглютинирующий из земляных орехов (PNA), обладающий специфичностью по отношению к концевым остаткам галактозы, избирательно связывается с клетками, находящимися в зародышевых центрах, которые появляются на внутренней стороне В-клеточных фолликулов.

Б: окрашивание с помощью анти-IgD демонстрирует, что клетки зародышевых центров являются IgD⁻, а также позволяет локализовать IgD⁺ В-клеточные домены и неокрашивающиеся Т-клеточные области. Обратите внимание на скопление В-клеток IgD⁺ в серповидных муфтах, окружающих зародышевые центры. Многочисленные В-клетки IgD⁺ располагаются и вокруг мест их пролиферации в лимфатический узел, т. е. вблизи ВЭВ во внутренней части коркового вещества. В: MEL-14, моноклональные антитела против предполагаемого рецептора лимфоцитов для ВЭВ периферических узлов, окрашивают большинство Т-клеток и В-клетки IgD⁺. При этом зародышевые центры остаются в значительной степени неокрашенными. Отсутствие экспрессии предполагаемой детерминанты, узнающей ВЭВ, коррелирует с неспособностью клеток зародышевых центров мигрировать. Мозговое вещество, содержащее плазматические клетки, макрофаги и другие элементы стромы, тоже практически не окрашивается ([57], печатается с разрешения авторов).

большинство антигенсвязывающих В-клеток обнаруживается в составе зародышевых центров лимфоидного органа [89]. Эти клетки собираются в зародышевых центрах, по-видимому, благодаря своей способности взаимодействовать с антигеном, локализованным на поверхности ФДК, а затем под воздействием комплексов ФДК — антиген и Т-хелперов (и их продуктов) происходит образование клонов. Клетки зародышевых центров экспрессируют также уникальный набор дифференцировочных антигенов [86]. В отличие от практически всех остальных фолликулярных лимфоцитов эти клетки лишены поверхностных IgD и в значительной степени дифференцировочного антигена TnB. Клетки зародышевых центров не мигрируют и не узнают высокоэндотелиальные вены (ВЭВ), и соответственно этому у них отсутствуют предполагаемые рецепторы

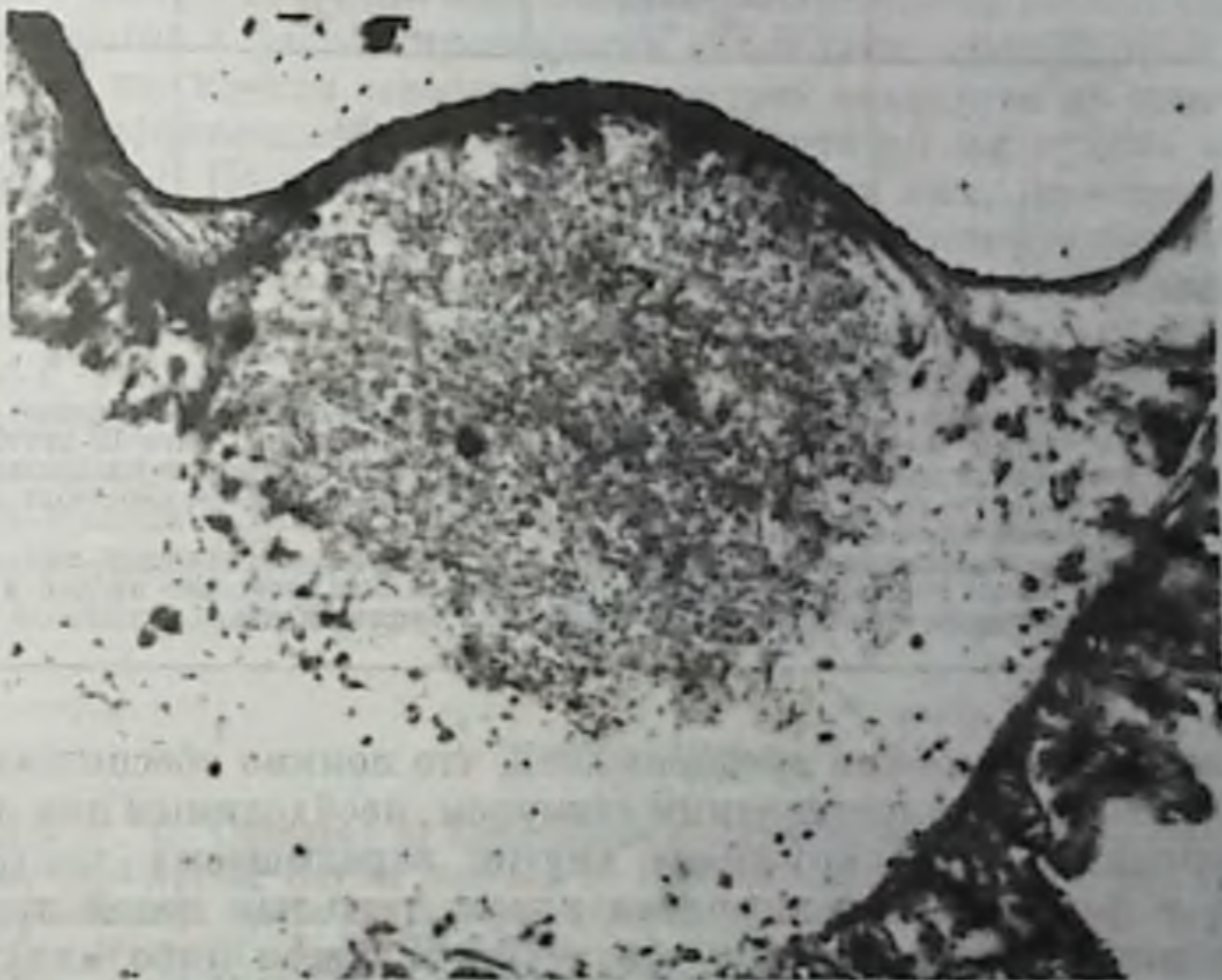
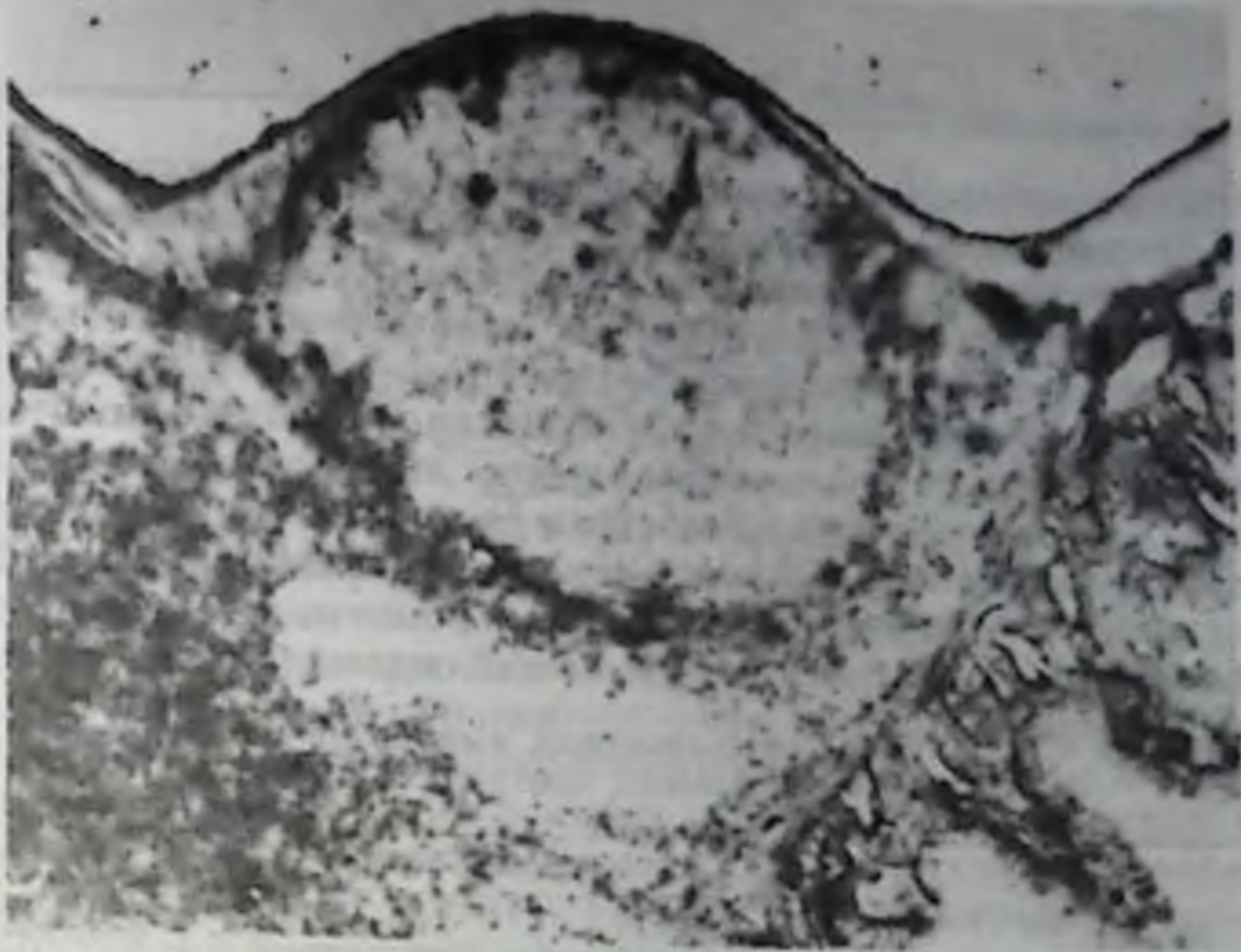


Рис. 6.9. Иммуногистологическое окрашивание пейеровой бляшки мыши.
Вверху: окрашивание пейеровой бляшки конъюгатом кроличьих антител против Ig мыши с пероксидазой хрена. В-клеточные области, расположенные на данной микрофотографии вокруг зародышевого центра и в нижнем левом углу, окрашены интенсивно. Зародышевый центр окрашен слабо, но четко. Наблюдаемый низкий уровень иммуногистологического окрашивания хорошо коррелирует с данными, полученными методом проточной цитофлуорометрии, которые указывают на то, что клетки зародышевых центров несут в 5—10 раз меньше поверхностных Ig, чем большинство других зрелых В-клеток. Небольшая овальная Т-клеточная зона, локализованная под зародышевым цен-

тром, не окрашена. На микрофотографии видно также, что в пейеровых бляшках преобладают В-клетки (по сравнению с Т-клетками).

Внизу: окрашивание с помощью моноклональных анти-IgA демонстрирует, что в пейеровых бляшках большинство клеток, несущих IgA, находится в зародышевом центре — это наблюдение подтверждается экспериментами, проведенными с использованием клеточных суспензий. В окружающей зародышевый центр В-клеточной муфте обнаруживаются только случайные плазматические клетки и немного окрашенных лимфоцитов. Многочисленные IgA-содержащие плазматические клетки присутствуют в lamina propria слизистой оболочки (нижний правый угол) ([86], печатается с разрешения).

для ВЭВ, т. е. не наблюдается взаимодействия с моноклональными антителами MEL-14 [57] (рис. 6.8). По сравнению с IgD-B-клетками клетки зародышевых центров несут больше поверхностных антигенов, кодируемых I-A-областью, и меньше H2K-детерминант [86]; для них характерен также низкий уровень экспрессии поверхностных иммуноглобулинов (в 5—10 раз меньше, чем у окружающих малых В-лимфоцитов) (рис. 6.9). После первичной антигенной стимуляции основную часть этих поверхностных иммуноглобулинов составляют молекулы IgM, а вторичная или длительная стимуляция с помощью специфического антигена приводит к повышению содержания поверхностных IgG (в лимфатических узлах) или поверхностных IgA (в кишечных пейеровых бляшках; рис. 6.9) (см. табл. 6.3; [86, 89]). Исходя из наблюдаемых изменений экспрессии

Таблица 6.3. Изотипы поверхностных иммуноглобулинов клеток зародышевых центров ¹⁾

Изотип	Лимфатические узлы		Пейеровы бляшки (%. +)
	первичная стимуляция ²⁾ (%. +)	вторичная стимуляция ³⁾ (%. +)	
IgM	66	30	15
IgG	10	72	15
IgA	4	4	70
IgD	1	1	0
Суммарные Ig	89	96	90

¹⁾ Клетки зародышевых центров, идентифицированные методом окрашивания с помощью FITC-PNA, были затем еще раз окрашены мечеными FITC анти-Ig-антителами, как указано. Результаты позволяют предположить, что среда внутри зародышевых центров играет центральную роль в регуляции экспрессии изотипов поверхностных иммуноглобулинов при развитии В-клеточного ответа.

²⁾ Семь дней после иммунизации бараньими эритроцитами в подушечки лап.

³⁾ Через 2 нед после первичной иммунизации антиген был повторно введен в лимфатические узлы, которые спустя 1 нед были удалены и исследованы.

класса тяжелых цепей, можно предположить, что помимо обеспечения антиген-специфических В-клеток определенным стимулом, необходимым для их клональной пролиферации, микроокружение внутри зародышевых центров играет важную роль в феномене переключения класса тяжелых цепей при развитии В-клеточного ответа. По-видимому, это осуществляется либо индукцией экспрессии, либо отбором соответствующих изотипов.

Напрашивается вывод, что микроокружение в центрах размножения может оказывать влияние также и на другие стороны дифференцировки В-клеток. Например, зародышевые центры, расположенные в пейеровых бляшках, вероятно, программируют активированные В-клетки к экспрессии поверхностных рецепторов, специфичных по отношению к слизистому эндотелию, тогда как зародышевые центры лимфатических узлов, возможно, индуцируют экспрессию рецепторов для неслизистых детерминант (или регулируют отбор соответствующих клеток); в результате клетки впоследствии локализуются в тканях, сходных с теми, где произошла первоначальная антигенная стимуляция. Не исключено также, что зародышевые центры непосредственно участвуют в процессах, связанных с изменением аффинности антител, продуцируемых на разных стадиях В-клеточного ответа. При длительной стимуляции с помощью какого-либо антигена средний аффинитет антител к этому антигену постепенно увеличивается. Чтобы объяснить это явление, было высказано предположение, что это

увеличение аффинности обусловлено конкурентным взаимодействием пролиферирующих клеток зародышевых центров с антигеном, находящимся на отростках фолликулярных дендритных клеток. Клетки, обладающие наиболее высоким аффинитетом или авидностью, избирательно стимулируются к пролиферации, в то время как клетки, экспрессирующие низкоаффинные антитела, не получают соответствующего сигнала и скорее всего погибают прямо в зародышевом центре. Согласно этой модели, микроокружение внутри зародышевых центров могло бы даже индуцировать или по крайней мере способствовать отбору В-клеток с соматическими мутациями, вызывающими образование антител с «улучшенной» специфичностью по отношению к иммунизирующему антигену. Ряд имеющихся данных указывает на то, что некоторые из перечисленных процессов отбора или отбраковки действительно происходят в зародышевых центрах. Во-первых (как и в случае дифференцировки пре-В-клеток и тимоцитов), скорость клеточной пролиферации намного превышает число идентифицируемых клеток, покидающих зародышевые центры. Во-вторых, результаты разнообразных гистологических экспериментов говорят о множественной гибели клеток — зародышевые центры содержат многочисленное множество аномальных («tingible body») макрофагов с фагоцитированными обломками ядер.

Очевидно, что клетки зародышевых центров находятся на ключевой стадии В-клеточной дифференцировки. Однако пока что об их судьбе нам известно на редкость мало. По крайней мере некоторые из них, по-видимому, превращаются в дальнейшем в плазматические клетки, секретирующие иммуноглобулины. Другие, вероятно, дают начало В-клеткам памяти. Последняя возможность подтверждается широким спектром экспериментальных данных, демонстрирующих наличие корреляции между появлением зародышевых центров с одной стороны, и В-клеточной памяти — с другой [90]. Дальнейшие исследования прямых предшественников клеток зародышевых центров, а также изучение судьбы клеток зародышевых центров в опытах с адоптивным переносом их реципиентам точнее определяют роль микроокружения внутри зародышевых центров в возникновении и регуляции гуморального иммунитета.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Le Douarin N. M.* Ontogeny of hematopoietic organs studied in avian embryo interspecific chimeras, Cold Spring Harbor meeting on Differentiation of Normal and Neoplastic Hematopoietic Cells, ed. by B. Clarkson, P. A. Marks, and J. E. Till, pp. 5—32 (1978).
2. *Metcalf D., Moore M. A. S.* Haemopoietic cells. In: *Frontiers of Biology*, Vol. 24, ed. by A. Neuberger and E. L. Tatum, North-Holland Publishing Company, 1971.
3. *Weissman I., Papaioannou V., Gardner R.* Fetal hematopoietic origins of the adult hemato-lymphoid system, Cold Spring Harbor Meeting on Differentiation of Normal and Neoplastic Hematopoietic Cells, ed. by B. Clarkson, P. A. Marks, and J. E. Till, pp. 33—47 (1978).
4. *Ford C. E., Micklem H. S., Evans E. P., Gray J. H., Ogden D. A.* The inflow of bone marrow cells to the thymus. Studies with part body-irradiated mice injected with chromosome-marked bone marrow and subjected to antigenic stimulation, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 129, 283—296 (1968).
5. *Osmond D. G., Nossal G. J. V.* Differentiation of lymphocytes in mouse bone marrow. II. Kinetics of maturation and renewal of antiglobulin-binding cells studied by double labeling, *Cell. Immunol.*, 13, 132 (1974).
6. *Szenberg A., Warner N. L.* Dissociation of immunological responsiveness in fowls with a hormonally arrested development of lymphoid tissues, *Nature*, 194, 146 (1962).
7. *Cooper M. D., Peterson R. D. A., South M. A., Good R. A.* The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken, *J. Exp. Med.*, 123, 75 (1966).
8. *Weissman I. L.* Development and distribution of immunoglobulin-bearing cells in mice, *Transplant. Rev.*, 24, 159 (1975).
9. *Wells L.* The haemopoietic microenvironment of bone marrow: An ultrastructural study of the interactions of blood cells, stroma and blood vessels, *Ciba Found. Symp.*, 71, 13 (1980).

10. Dexter T. M., Allen T. D., Lajtaj L. G., Krizsa F., Testa N. G., Moore M. A. S. In vitro analysis of selfrenewal and commitment of hematopoietic stem cells, Cold Spring Harbor Meeting on Differentiation of Normal and Neoplastic Hematopoietic Cells, ed. by B. Clarkson, P. A. Marks, and J. E. Till, pp. 63—80 (1978).
11. Whitlock C. A., Witte O. N. Long-term culture of B lymphocytes and their precursors from murine bone marrow, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 3608 (1982).
12. Coffman R. L. Surface antigen expression and immunoglobulin gene rearrangement during mouse pre-B cell development, Immunol. Rev. (1982) (in press).
13. Coffman R. L., Weissman I. L. (in preparation).
14. Lepault F., Coffman R. L., Weissman I. L. Characteristics of thymus-homing bone marrow cells, J. J. Immunol. (1983) (in press).
15. Wagner H., Hardt C., Heeg K., Rollinghoff M., Pfizenmaler K. T-cell-derived helper factor allows in vivo induction of cytotoxic T cells in nu/nu mice, Nature, 284, 2781 (1980).
16. Scollay R., Butcher E., Weissman I. L. Thymus cell migration, quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice, Eur. J. Immunol., 10, 210 (1980).
17. Lepault F., Weissman I. L. An in vivo assay for thymus-homing bone marrow cells, Nature, 293, 151 (1981).
18. Scollay R. G., Mandel T., Pyke K. The ontogeny of Lyt-1 and Lyt-1,2,3 subsets in the thymus, Adv. exp. Med. Biol., 149, 365 (1982).
19. Mathieson B. J., Sharrow S. O., Rosenberg Y., Hammerling U. Lyt-1⁺ 23⁺ cells, appear in the thymus before Lyt-123⁺ cells, Nature, 289, 179 (1981).
20. Huber B., Cantor H., Shen F. W., Boyse E. A. Independent differentiative pathways of Ly-1 and Ly-23 subclasses of T cells. Experimental production of mice derived of selected T-cell subclasses, J. Exp. Med., 144, 1128 (1976).
21. Swain S. L. Significance of Lyt phenotypes: Lyt2 antibodies block activities of T cells that recognize class 1 major histocompatibility complex antigens regardless of their function, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7101 (1981).
22. Wekerle H., Ketelsen U.-P., Ernst M. Thymic nurse cells. Lymphoepithelial complexes in murine thymuses: morphological and serological characterization, J. Exp. Med., 151, 925 (1980).
23. Kyewski B. A., Kaplan H. S. Lymphoepithelial interactions in the mouse thymus: Phenotypic and kinetic studies on thymic nurse cells, J. Immunol. (1982) (in press).
24. Boniver J., Houben-Defresne M. P., Varlet A., Goffinet G., Betz E. M. «Thymic nurse cells» contain the first virus-producing cells after radiation leukemia virus inoculation in C57B1/Ka mice, Adv. Exp. Med. Biol., 149, 263 (1982).
25. Kyewski B. A., Rouse R. V., Kaplan H. S. Thymocyte rosettes: Multicellular complexes of lymphocytes and bone marrow-derived stromal cells in the mouse thymus, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 5646 (1982).
26. Weissman I. L., Rouse R. V., Kyewski B. A., Lepault F., Butcher E. C., Kaplan H. S., Scollay R. G. Thymic lymphocyte maturation in the thymic microenvironment In: Behring Institute Mittlungen, «The Influence of the Thymus on the Generation of the T Cell Repertoire». Presented at the International Workshop, Rudesheim, September 16—19. 1981 (F. R. Seiler and H. G. Schwick, eds.), p. 242 (1982).
27. Scollay R., Weissman I. L. Thymocyte and thymus migrant subpopulations defined with monoclonal antibodies to the antigens Lyt-1, Lyt-2 and ThB, J. Immunol., 124, 2841 (1980).
28. Scollay R., Jacobs S., Jerabek L., Butcher E., Weissman I. T cell maturation: Thymocyte and thymus migrant subpopulations defined with monoclonal antibodies to MHC region antigens, J. Immunol., 124, 2845 (1980).
29. Fink P., Kyewski B., Kaplan H. S., Weissman I. L. (in preparation).
30. Weissman I. Thymus cell maturation: Studies on the origin of cortisone-resistant thymic lymphocytes, J. Exp. Med., 137, 504 (1973).
31. Fathman C. G., Small M., Herzenberg L. A., Weissman I. L. Thymus cell maturation. II. Differentiation of three «mature» subclasses in vivo, Cell. Immunol., 15, 109 (1975).
32. Rothenberg E. Expression of differentiation antigens in subpopulations of mouse thymocytes: Regulation of the level of de novo synthesis, Cell, 20, 1 (1980).
33. Rothenberg E. A specific biosynthetic marker for immature thymic lymphoblasts, J. Exp. Med., 155, 140 (1982).
34. Raedler A., Raedler E., Becker W. M., Arndt R., Thiele H. G. Subcapsular thymic lymphoblasts expose receptors for soy bean lectin, Immunology, 46, 321 (1982).
35. Despont J.-P., Abel C. A., Grey H. M. Sialic acids and sialyl transferases in murine lymphoid cells: Indicators of T cell maturation, Cell. Immunol., 17, 487 (1975).
36. Weissman I. L., Levy R. In vitro cortisone sensitivity of in vivo cortisone resistant thymocytes, Israel J. Med. Sci., 11, 884 (1975).
37. Rouse R. V., Weissman I. L. Microanatomy of the thymus: Its relationship to T cell differentiation, Ciba Found. Symp., 84, 161 (1981).

38. 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).
39. Ewijk W., van, Rouse R. V., Weissman I. L. Distribution of H-2 microenvironments in the mouse thymus, *J. Histochem. Cytochem.*, 28, 1089 (1980).
40. Rouse R. V., Parham P., Grumet F. C., Weissman I. L. Expression of HLA antigens by human thymic epithelial cells, *Hum. Immunol.*, 5, 21 (1982).
41. Stevens S. K., Weissman I. L., Butcher E. C. Differences in the migration of B and T lymphocytes: Organselective localization in vivo and the role of lymphocyte-endothelial cell recognition, *J. Immunol.*, 128, 844—851 (1982).
42. Gowans J. L., Knight E. J. The route of recirculation of lymphocytes in the rat, *Proc. R. Soc. Lond. [Biol.]*, 159, 257 (1964).
43. Ford W. L., Simmonds S. J. The tempo of lymphocyte recirculation from blood to lymph in the rat, *Cell. Tissue Kinet.*, 5, 175 (1972).
44. Howard J. C. The life-span and recirculation of marrow-derived small lymphocytes from rat thoracic duct, *J. Exp. Med.*, 135, 185 (1972).
45. Strober S., Dilley J. Maturation of B lymphocytes in the rat. I. Migration pattern, tissue distribution and turnover rate of unprimed and primed B lymphocytes involved in the anti-dinitrophenyl response, *J. Exp. Med.*, 138, 1331 (1973).
46. Sprent J. Circulating T and B lymphocytes of the mouse. I. Migratory properties, *Cell. Immunol.*, 7, 10 (1973).
47. Stamper H. B., Jr., Woodruff J. J. Lymphocyte homing into lymph nodes: In vitro demonstration of the selective affinity of recirculating lymphocytes for high endothelial venules, *J. Exp. Med.*, 144, 828—833 (1976).
48. Butcher E. C., Scollay R. G., Weissman I. L. Lymphocyte adherence to high endothelial venules: Characterization of a modified in vitro assay, and examination of the binding of syngeneic and allogeneic lymphocyte populations, *J. Immunol.*, 123, 1996 (1979).
49. Butcher E. C., Stevens S. K., Reichert R. A., Scollay R. G., Weissman I. L. Lymphocyte-endothelial cell recognition in lymphocyte migration and the segregation of mucosal and non-mucosal immunity. In: *Recent Advances in Mucosal Immunity*, ed. by W. Strober, L. A. Hanson, and K. W. Sell, pp. 3—24, Raven Press, New York, 1982.
50. Butcher E. C. The control of lymphocyte migration and tissue distribution. In: *Experimental and Clinical Photoimmunology*, ed. by R. A. Daynes, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1982.
51. Butcher E. C., Weissman I. L. Cellular, genetic and evolutionary aspects of lymphocyte interactions with high endothelial venules, *Ciba Found. Symp.*, 71, 265—286 (1979).
52. Butcher E. C., Scollay R. G., Weissman I. L. Organ specificity of lymphocyte migration: Mediation by highly selective lymphocyte interaction with organ-specific determinants on high endothelial venules, *Eur. J. Immunol.*, 10, 556 (1980).
53. Kraal G., Weissman I. L., Butcher E. C. Differences in in vivo distribution and homing of T cell subsets to mucosal or non-mucosal lymphoid organs, *J. Immunol.*, 130, 1097—1102 (1983).
54. Hay J. B., Johnston M. G., Vadas P., Chin W., Issekutz T., Movat H. Z. Relationship between changes in blood flow and lymphocyte migration induced by antigen, *Mongr. Allergy*, 16, 112—125 (1980).
55. Trnka Z., Cahill R. N. P. Aspects of the immune response in single lymph nodes, *Mongr. Allergy*, 16, 245—259 (1980).
56. McCullagh P. Unresponsiveness of recirculating lymphocytes after antigenic challenge, *Mongr. Allergy*, 16, 143—156 (1980).
57. Reichert R. A., Gallatin W. M., Weissman I. L., Butcher E. C. Germinal center B cells lack homing receptors necessary for normal lymphocyte migration, *J. Exp. Med.* (1982) (in press).
58. Rowley D. A., Gowans J. L., Atkins R. C., Ford R. C., Smith W. L. The specific selection of recirculating lymphocytes by antigen in normal and preimmunized rats, *J. Exp. Med.*, 136, 499 (1972).
59. Ford W. L., Atkins R. C. Specific unresponsiveness of recirculating lymphocytes after exposure to histocompatibility antigens in F₁ hybrid rats, *J. Exp. Med.*, 141, 681 (1975).
60. Sprent J. Antigen-induced selective sequestration of T lymphocytes: Role of the major histocompatibility complex, *Mongr. Allergy*, 16, 233—244 (1980).
61. Dailey M. O., Fathman C. G., Butcher E. C., Pillemer F., Weissman I. L. Abnormal migration of T lymphocyte clones, *J. Immunol.*, 128, 2134 (1982).
62. Dailey M. O., Gallatin W. M., Butcher E. C., Weissman I. L. (in preparation).
63. Scollay R., Hopkins J., Hall J. Possible role of surface Ig in non-random recirculation of small lymphocytes, *Nature*, 260, 528—529 (1976).
64. Cahill R. N. P., Poskitt D. C., Frost H., Trnka Z. Two distinct pools of recirculating T lymphocytes: Migration characteristics of nodal and intestinal T lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 145, 420—428 (1977).

85. *Chiu W., Hay J. B.* A comparison of lymphocyte migration through intestinal lymph nodes subcutaneous lymph nodes, and chronic inflammatory sites of seep, *Gastroenterology*, 79, 1231—1242 (1980).
86. *Hendriks H. R., Eastermans I. L., Hoefsmit E. C.* Depletion of macrophages and disappearance of high endothelial venules in lymph nodes deprived of afferent lymphatic vessels, *Cell Tissue Res.*, 211, 375—389 (1980).
87. *Gallatin W. M., Weissman I. L., Butcher E. C.* A cell surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes, *Nature* (1983) (in press).
88. *Gutman G., Weissman I.* Homing properties of thymus-independent follicular lymphocytes, *Transplantation*, 16, 621 (1973).
89. *Curtis A. S. G., de Sousa M.* Lymphocyte interactions and positioning. I. Adhesive interactions, *Cell. Immunol.*, 19, 282 (1975).
90. *Veldman J. E.* Histophysiology and electron microscopy of the immune response, Ph. D. Thesis, Groningen, 1970.
91. *Veerman A. J. P., van Ewijk W.* White pulp compartments in the spleen of rats and mice, *Cell Tiss. Res.*, 156, 417—441 (1975).
92. *Nussensweig M. C., Steinman R. M., Unkeless J. C., Witmer M. D., Gutchinov B., Cohn Z. A.* Studies of the cell surface of mouse dendritic cells and other leukocytes, *J. Exp. Med.*, 154, 168—187 (1981).
93. *Hoefsmit E. C. M.* Macrophages, Langerhans cells, interdigitating and dendritic accessory cells: A summary, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 149, 463 (1982).
94. *Silberberg-Sinakin I., Gigli I., Baer R. L., Thorbecke G. J.* Langerhans cells: Role in contact hypersensitivity and relationship to lymphoid dendritic cells and to macrophages, *Immunol. Rev.*, 53, 203—232 (1980).
- Nossal G. J. V., Ada G. L.* Antigen, Lymphoid Cells, and the Immune Response, Academic Press, New York, 1971.
95. *Gutman G., Weissman I.* Lymphoid tissue architecture: Experimental analysis of the origin and distribution of T and B cells, *Immunology*, 23, 465 (1972).
96. *Rouse R. V., Ledbetter J. A., Weissman I. L.* Mouse lymph node germinal centers contain a selected subset of T cells: The helper phenotype, *J. Immunol.*, 128, 2243 (1982).
97. *Berman M. A., Rafieri S., Gutman G. A.* Association of T cells with proliferating cells in lymphoid follicles, *Transplantation*, 32, 426—430 (1981).
98. *Klaus G. G. B., Kunkl A.* The role of germinal centers in the generation of immunological memory, *Ciba Found. Symp.*, 84, 265—280 (1981).
99. *Davies A. J. S., Carter R. L., Leuchars E., Wallis V., Koller P. C.* The morphology of immune reactions in normal, thymectomized and reconstituted mice I. The response to sheep erythrocytes, *Immunology*, 16, 57 (1969).
100. *Ewijk W., van, Rozing J., Brons N. H. C., Klepper D.* Cellular events during the primary immune response in the spleen, *Cell Tissue Rev.*, 183, 471 (1977).
101. *Davies A. J. S., Carter R. L., Leuchars E., Wallis V. J.* The morphology of immune reactions in normal, thymectomized and reconstituted mice. II. The response to oxazolone, *Immunology*, 17, 111 (1969).
102. *Davies A. J. S., Carter R. L., Leuchars E., Wallis V., Dietrich F. M.* The morphology of immune reactions in normal, thymectomized and reconstituted mice. III. Response to bacterial antigens: Salmonellar flagellar antigen and pneumococcal polysaccharide, *Immunology*, 19, 945 (1970).
103. *Weissman I. L., Gutman G. A., Friedberg S. H., Jerabek L.* Lymphoid tissue architecture. III. Germinal centers, T cells and thymus dependent vs. thymus independent antigens, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 66, 229 (1976).
104. *Rose M. L., Birbeck M. S. C., Wallis V. J., Forrester J. A., Davies A. J. S.* Peanut lectin binding properties of germinal centers in mouse lymphoid tissue, *Nature*, 284, 364—366 (1980).
105. *Raedler A., Raedler E., Arndt R., Thiele H.-C.* Centroblasts and centrocytes display receptors for peanut lectin, *Immunol. Lett.*, 2, 335—338 (1981).
106. *Butcher E. C., Rouse R. V., Coffman R. L., Nottenburg C., Hardy R. R., Weissman I. L.* Surface phenotype of Peyer's patch germinal center cells: Implications for the role of germinal centers in B cell differentiation, *J. Immunol.*, 129, 2698—2707 (1982).
107. *Osmond D. G., Saveriano N., Drinnan M., Santer V., Rahal M. D., Owen J. J. T., Rijbeek A.-M.* Lectin binding by bone marrow lymphocytes: Pre-B cells have a surface receptor for peanut agglutinin. In: *B lymphocytes in the Immune Response: Functional, Developmental, and Interactive Properties*, ed. by N. Klinman, D. E. Mosier, I. Scher, and E. S. Vitetta, pp. 103—110, Elsevier/North-Holland, New York, 1981.
108. *Newman R. A., Boss M. A.* Expression of binding sites for peanut agglutinin during murine B lymphocyte differentiation, *Immunology*, 40, 193—200 (1980).
109. *Kraal G., Weissman I. L., Butcher E. C.* Germinal center B cells: Antigen specificity and changes in heavy chain class expression, *Nature*, 298, 377 (1982).

90. Thorbecke G. J., Romano T. J., Lerman S. P. In: Progress in Immunology II, Vol. 3, ed. by L. Brent and J. Holborow, pp. 25—34, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1974.
91. Butcher E. C., Kraal G., Stevens S. K., Weissman I. L. A recognition function of endothelial cells: Directing lymphocyte traffic. In: Pathobiology of the Endothelial Cell, ed. by H. L. Nessel and H. J. Vogel, pp. 409—424, Academic Press, New York, 1982.
92. Butcher E., Scollay R., Weissman I. L. Evidence of continuous evolutionary change in structures mediating the adherence of lymphocytes to specialized venules, *Nature*, 280, 496 (1979).

Часть III

Антитела и рецепторы

Глава 7

Иммуноглобулины: строение и функции

Дебра Дж. Джеске, Дж. Доналд Кепра

(*Debra J. Jeske, J. Donald Capra*)

Основная функция молекул иммуноглобулинов сводится к специфическому связыванию с чужеродными молекулами (антигенами), обуславливающими инактивацию и (или) удаление токсина, микроорганизма, паразита или каких-либо веществ из организма. Обеспечивается это способностью микроорганизма индуцировать образование множества сходных по структуре, но индивидуально отличных молекул иммуноглобулинов. Одним из самых выдающихся достижений молекулярной биологии за последние 25 лет было выяснение строения иммуноглобулинов. Это в свою очередь обеспечило значительные успехи в изучении зависимости между структурой и функцией белков и организации генов иммуноглобулинов. В этой главе обобщены современные представления о строении иммуноглобулинов. В качестве примера в большинстве случаев используются данные о молекулах иммуноглобулинов человека, поскольку именно соединения этого класса изучены наиболее полно. Однако обсуждаются также данные об иммуноглобулинах мыши и других видов животных.

Мономерные антитела представляют собой макромолекулы, построенные из четырех цепей: двух идентичных тяжелых и двух идентичных легких (на одну молекулу). Схема строения такой молекулы показана на рис. 7.1 [1]. Эти четыре цепи ковалентно соединены дисульфидными связями. Каждая из цепей состоит из переменной (V) и константной (C) областей [2]. Ферменты, например папаин, способны расщеплять молекулу на три фрагмента. Два из них, обозначаемые как Fab, имеют в своем составе переменные области и сохраняют способность реагировать с антигеном. Третий фрагмент, обозначаемый Fc, состоит из части константной области тяжелых цепей и способен к таким эффекторным функциям, как связывание комплемента и реакция с рецепторами лейкоцитов [3].

На рис. 7.2 показана трехмерная структура интактного иммуноглобулина. Эта молекула состоит из компактных глобул [4]. Дж. М. Эделман (Edelman) высказал предположение о существовании таких глобул еще до того, как они были обнаружены методом рентгеноструктурного анализа. Он подметил, что аминокислотную последовательность тяжелых цепей иммуноглобулинов можно разделить на гомологичные участки длиной в 110 аминокислот, и предположил, что каждый из этих участков, или доменов, появился в эволюции для выполне-

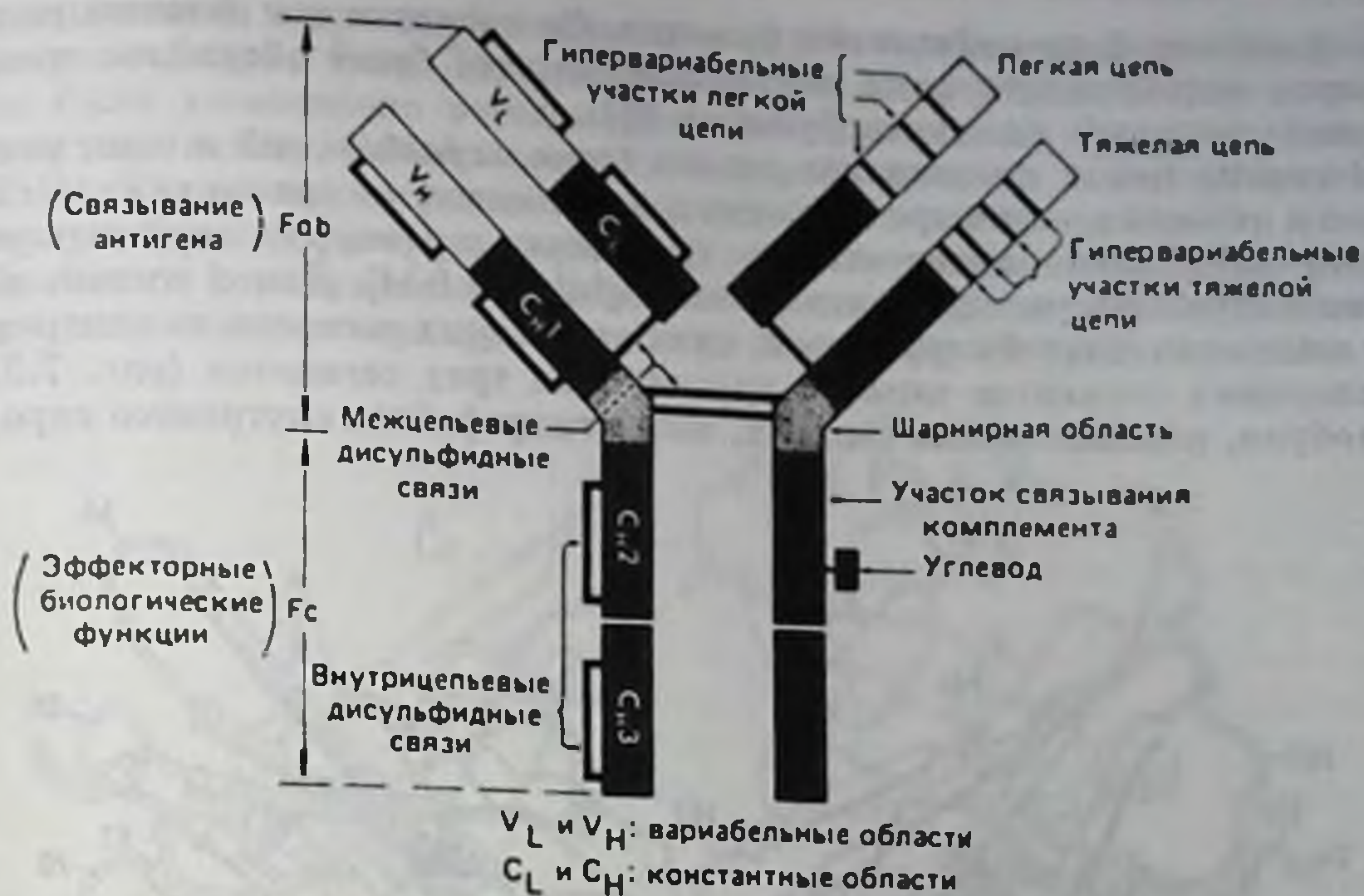


Рис. 7.1. Строение молекулы IgG. Показана локализация участков, ответственных

ных за различные функции ([4]; печатается с разрешения).

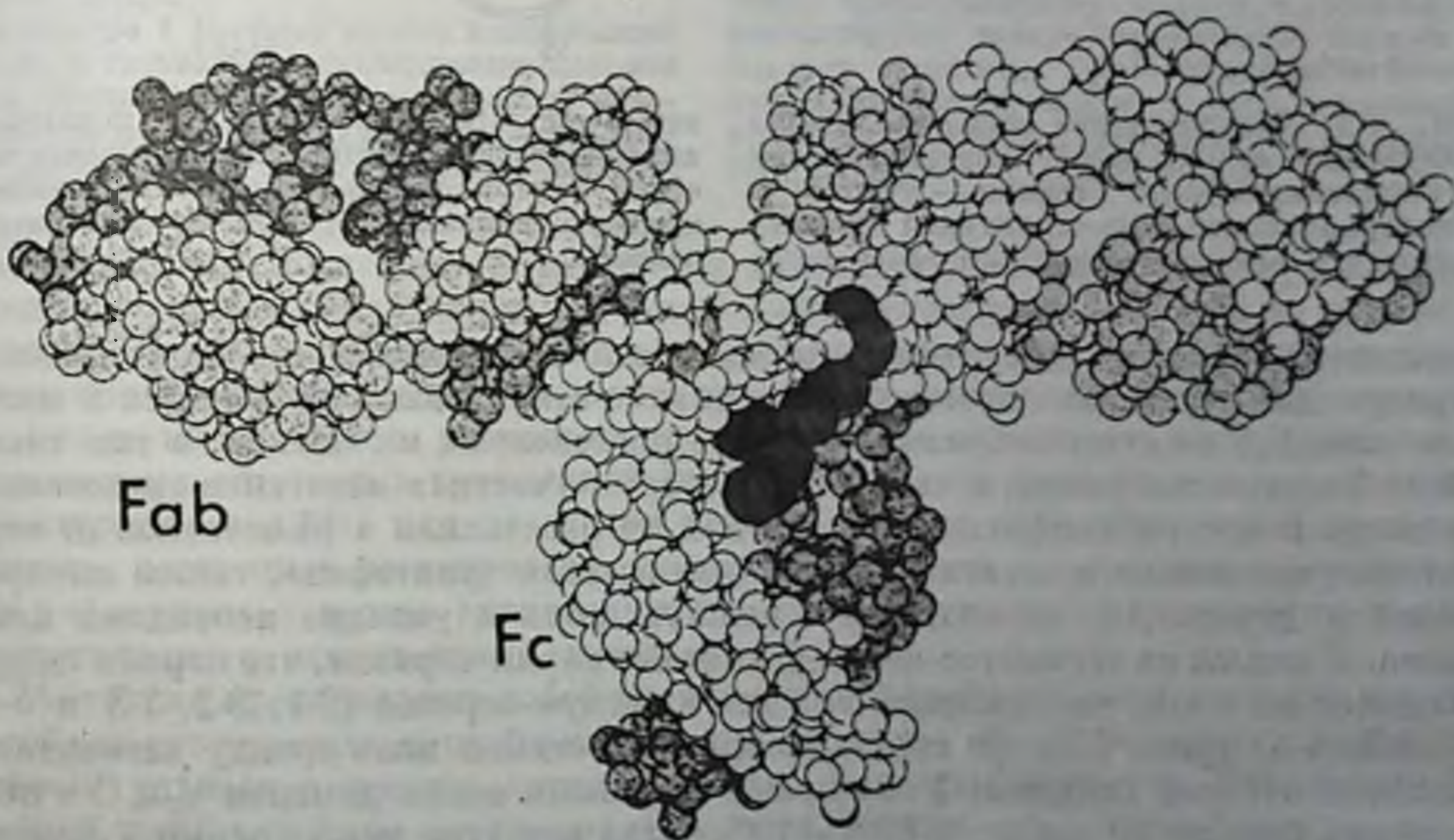


Рис. 7.2. Трехмерная структура IgG D₀B человека.

Этот белок в шарнирной области имеет на 15 аминокислотных остатков меньше, чем нормальные IgG. Две тяжелые цепи пред-

ставлены незакрашенными и темно-серыми, легкие цепи — светло-серыми. Углеводы изображены черными кружками ([4]; печатается с разрешения).

ния определенной специфической функции. Со временем эта гипотеза получила серьезные экспериментальные подтверждения, что будет обсуждено ниже при описании функций иммуноглобулинов [5].

В легких цепях имеются два домена (один вариабельный и один константный), а в тяжелых — четыре или пять в зависимости от класса тяжелых цепей. Каждый из доменов имеет особую третичную структуру, характерную для иммуноглобулинов укладку цепи (immunoglobulin fold). Домен состоит из двух слоев с бета-складчатой структурой, один из которых построен из четырех антипараллельных сегментов цепи, а другой — из трех сегментов (рис. 7.3). Вся эта глобула, напоминающая сэндвич, имеет гидрофобное внутреннее ядро. Слои

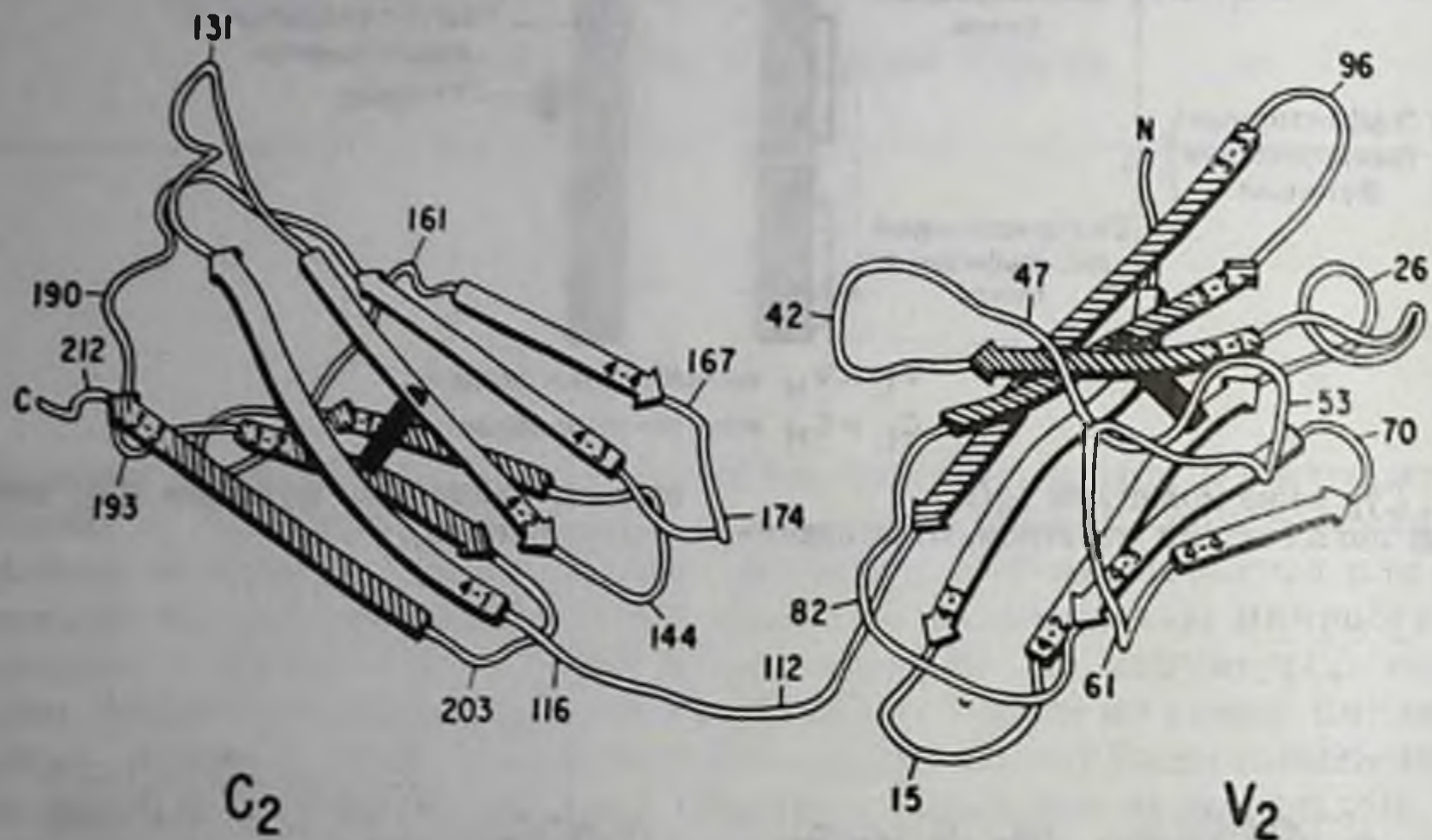


Рис. 7.3. Схематическое изображение V- и C-доменов легких цепей. Заштрихованные и незаштрихованные стрелки — участки с антипараллельной бета-структурой трехсегментного и четырехсегментного слоев соот-

ветственно. Цифрами обозначены некоторые аминокислотные остатки. Дисульфидные мостики внутри домена обозначены черными прямоугольниками ([6]; печатается с разрешения).

ковалентно связаны дисульфидным мостиком примерно в середине домена. Образующие эту связь цистеины эволюционно стабильны; они имеются в молекуле каждого иммуноглобулина, а также родственных им белков, в том числе и бета-2-микроглобулина, а также в некоторых участках антигенов гистосовместимости. В иммуноглобулиновых доменах на расстоянии в 14 остатков от первого полуцистинового остатка расположен остаток триптофана, также инвариантный и играющий, по-видимому, важную роль в укладке пептидной цепи домена. Каждый из сегментов цепи обозначают таким образом, что первая цифра указывает на слой, содержащий три либо четыре отрезка (3-1, 3-2, 3-3 и 4-1, 4-2, 4-3, 4-4) (рис. 7.3). В шпилькообразных сгибах цепи между сегментами находятся остатки глицина. Угол между главными осями доменов V и C в легких цепях больше 90° (обычно $100-110^\circ$), тогда как угол между осями V-домена и первого C-домена тяжелой цепи меньше 90° (обычно $80-85^\circ$). У V-доменов имеется одна добавочная петля, отсутствующая у C-доменов (петля, соединяющая 4-2 и 3-1, рис. 7.3). Альфа-спиралей в молекулах иммуноглобулинов очень мало или вообще нет [6].

Биологические функции белка находятся в зависимости от четвертичной структуры; в связи с этим следует отметить, что такие рассмотренные домены

с цилиндрической структурой также взаимодействуют между собой. В Fab-фрагментах и белках Бенс-Джонса (димеры L-L), пространственное строение контактируют между собой слоями, построенными из четырех сегментов (рис. 7.4). Таким путем достигается гидрофобное взаимодействие доменов, образующих границу раздела, свободную от растворителя. Наружную поверхность С-области формирует слой из трех сегментов. Образование пар V-доменов идет по противоположному принципу — за счет слоев из трех сегментов. При

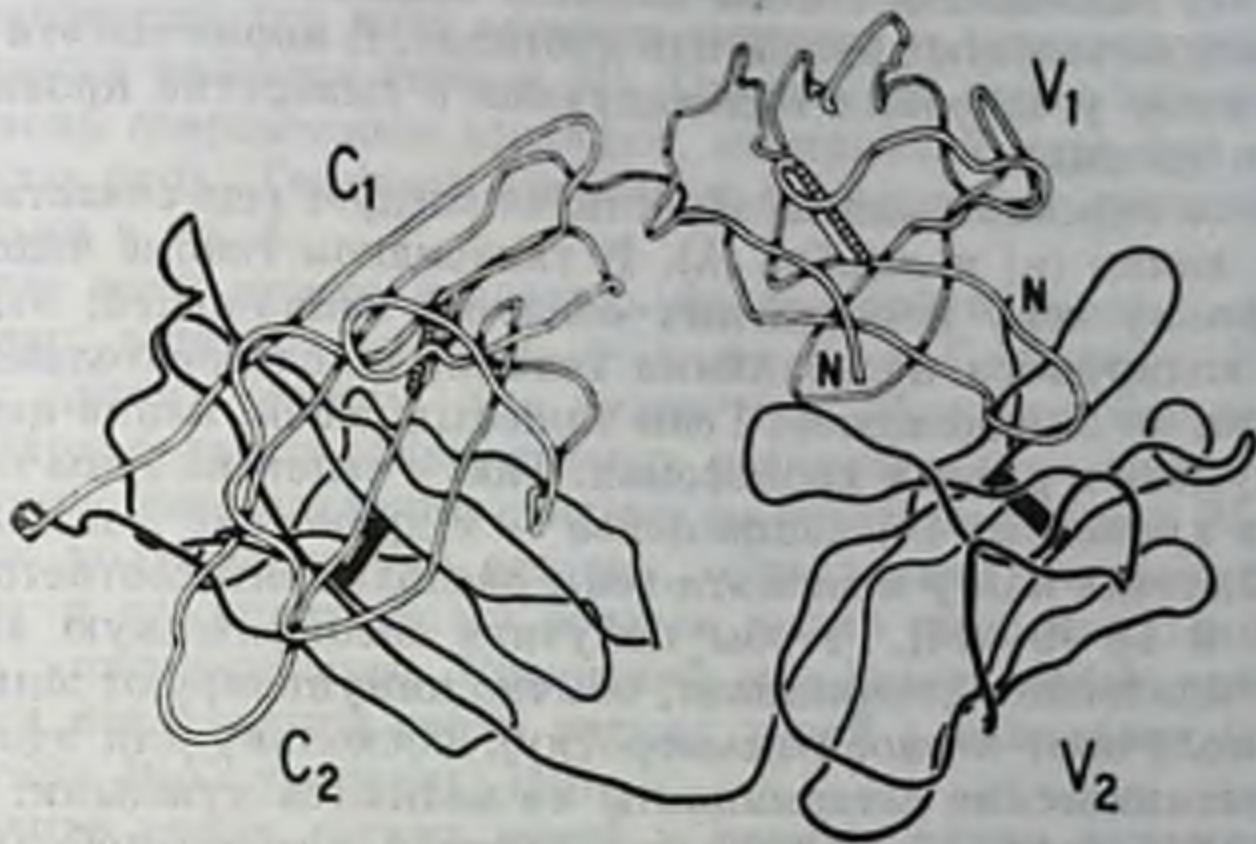


Рис. 7.4. Ход полипептидной цепи димера легких цепей.

У мономера 1 (светлая линия) конформация сходна с таковой Fab-субъединицы тяжелой цепи. Мономер 2 (зачерненная линия) напоминает по строению легкую цепь. Межцепевая дисульфидная связь расположена слева.

V-домены образуют пару за счет контакта между трехсегментными слоями, а С-домены контактируют четырехсегментными слоями. Следует отметить, что пространственные взаимоотношения между V- и С-доменами мономера 1 отличны от таковых мономера 2 ([6]; печатается с разрешения).

взаимодействии последних формируется гидрофильный канал, который, собственно говоря, и образует реагирующий с антигеном участок. Слой из четырех сегментов в этом случае находится на наружной поверхности [6]. Чтобы знать, какие именно остатки образуют контакты между взаимодействующими цепями и какие из них доступны растворителю, необходимо определить положение аминокислотных остатков в трехмерной структуре молекулы с помощью рентгеноструктурного анализа или на основе сходства с уже изученными молекулами. Остатки, доступные растворителю, могут участвовать в контакте с антигеном или же входить в состав антигенных детерминант, которые используются для серологического исследования антител.

Антитела представляют собой сложные гликопротеиновые молекулы и сами по себе могут служить антигенами. Можно получить антисыворотки, с помощью которых удастся выявлять серологические варианты антител. Различают по крайней мере три типа детерминант, используемых при классификации антител — изотипические, аллотипические и идиотипические детерминанты. Структура некоторых из них была установлена на основе данных о первичной структуре цепей антител, а также современных представлений о строении генов иммуноглобулинов (см. обзоры [7, 8]).

Изотипы характеризуются антигенными детерминантами константных областей цепей; с помощью этих детерминант можно отличать друг от друга продук-

ты каждого из генов константных областей тяжелых и легких цепей. Всего идентифицировано пять классов тяжелых цепей; их обозначают греческими буквами: альфа (α), гамма (γ), мю (μ), эпсилон (ϵ) и дельта (δ). Два из них подразделяются на подклассы. Так, у человека имеются четыре подкласса гамма-цепей (γ_1 , γ_2 , γ_3 и γ_4), так же как и у мыши (γ_1 , γ_{2a} , γ_{2b} , γ_3). У человека найдено также два подкласса альфа-цепей (α_1 и α_2). Соответственно тяжелой цепи обозначается и сам класс молекул иммуноглобулинов. Например, если в составе молекул данного иммуноглобулина есть мю-цепи, то он относится к классу IgM. В гаплоидном геноме имеются отдельные гены для константных областей каждой из тяжелых цепей, или изотипов. В норме все эти гены экспрессируются, поэтому у здоровых индивидуумов в сыворотке крови имеются все перечисленные изотипы.

Для полного описания молекулы антител следует еще сказать о двух типах легких цепей: каппа (κ) и лямбда (λ). В гаплоидном геноме человека и мыши имеется по одному гену константных областей каппа-цепей; эти же области лямбда-цепей кодируются несколькими генами, и, следовательно, существует несколько изотипов лямбда-цепей. Гены тяжелых цепей, каппа-цепей и лямбда-цепей локализируются в разных хромосомах. Так, у человека гены тяжелых цепей расположены в хромосоме 14, каппа-цепей — в хромосоме 2 и лямбда-цепей — в хромосоме 22, тогда как у мыши эти гены расположены соответственно в хромосомах 12, 6 и 16 [9—14]. Чтобы получить специфическую антисыворотку к одной из изотипических детерминант, обычно иммунизируют животных другого вида (т. е. получают ксеноантисыворотку), поскольку для здоровых особей одного вида изотипические детерминанты не являются чуждыми.

Детерминанты, кодируемые аллелями данного иммуноглобулинового гена, называются *аллотипическими*. В отличие от изотипов, имеющих у всех особей данного вида, аллотипы присутствуют лишь у некоторых из них. Очевидно, что не все особи имеют полный набор аллотипических вариантов, и поэтому антисыворотки к ним получают, вводя белок определенного аллотипического варианта другой особи того же вида, у которой, однако, белки обладают иной аллотипической характеристикой. Удастся также получить гетеро- и ксеноантисыворотки со специфичностью к определенному аллотипу. Более подробно проблема аллотипов обсуждается ниже, а также в гл. 9.

В переменных областях молекул антител локализируются идиотипические детерминанты. Они характеризуют собой индивидуальные свойства данной молекулы. Для получения антиидиотипической антисыворотки иммунизацию проводят гомогенной популяцией молекул иммуноглобулинов, например каким-либо миеломным белком. Получаемые антитела затем тщательно адсорбируют нормальным иммуноглобулином, пока антисыворотка не станет специфической только для белка, использованного при иммунизации. Такая антисыворотка будет распознавать то, что мы называем «индивидуальной антигенной специфичностью» или идиотипом [7]. С помощью техники гибридом (гл. 28) можно получить моноклональные антиидиотипические антитела. В некоторых случаях при иммунизации двух разных особей одним и тем же антигеном получают антитела с одинаковыми идиотипическими детерминантами. Такие идиотипы называют *перекрестно-реагирующими* или *общими* (public). Как правило, эти идиотипы ассоциированы со способностью антитела реагировать с определенным антигеном, что указывает на связь между идиотипическими детерминантами и антигенсвязывающей областью. В генетической основе идиотипии еще много неясного, однако экспрессия идиотипов некоторыми исследователями связывается с локусами тяжелых и легких цепей или с генами главного комплекса гистосовместимости (см., например, [8, 15]).

7.1. Легкие цепи

Различают два типа легких цепей, каппа (κ) и лямбда (λ). Оба они имеют молекулярную массу, равную примерно 23 000 Да. Протяженность каждой легкой цепи равна около 214 остатков аминокислот. Когда впервые была исследована первичная структура нескольких каппа-цепей, то оказалось, что первые 110 аминокислотных остатков очень изменчивы, тогда как остальные 110 остатков у данного вида всегда одинаковы. При интерпретации этих результатов возникла еретическая для того времени гипотеза о возможности кодирования одной цепи двумя разными генами [2]. Однако это число оказалось заниженным, и, согласно современным взглядам, по крайней мере три гена кодируют каждую легкую цепь. Генетика антител и проблема их разнообразия обсуждаются детально в гл. 8.

Все легкие цепи можно разделить на две почти равные области, по 110 аминокислотных остатков каждая, т. е. на V- и C-области. Каждая из них соответствует одному домену, и в целом они образуют псевдосимметричную структуру. Вариабельные области могут различаться по длине на 1—6 остатков. Как правило, эти различия связаны со вставками около 27-го положения. Инвариантные полуцистиновые остатки, образующие внутрицепьевую дисульфидную связь и полуцистиновый остаток около карбоксильного конца цепи, эволюционно консервативны. Последний полуцистиновый остаток участвует в образовании ковалентной связи легких цепей с тяжелыми (за исключением одного аллотипа IgA2 человека) [16].

Соотношение типов легких цепей у разных видов варьирует. Например, у человека соотношение каппа: лямбда равно 70:30, тогда как у мыши оно составляет 95:5 [8]. Причина этих различий не совсем ясна. У мышей много генов V-областей каппа-цепей, но мало таких же генов лямбда-цепей. У человека число V-генов для каппа- и лямбда-цепей примерно одинаково. Каппа- и лямбда-цепи обладают одинаковой способностью комбинироваться с любой тяжелой цепью; таким образом, из этого, очевидно, можно заключить, что не существует особых структурных ограничений для предпочтения одного типа легких цепей другому. Соотношение каппа:лямбда, как правило, хорошо коррелирует лишь с числом соответствующих генов (V-сегмент) в геноме.

У человека константные области каппа-цепей не варьируют, за исключением аллотипического маркера Km в положении 153 и 191 (табл. 7.1). По ана-

Таблица 7.1. Km-аллотипы и структура каппа-цепей

	Остатки	
	153	191
Km (1)	Val	Leu
Km (1, 2)	Ala	Leu
Km (3)	Ala	Val

логии с рентгеноструктурными данными о строении лямбда-цепей человека остатки 153 и 191 находятся на поверхности глобулы и могут участвовать в построении антигенной детерминанты [17]. На рис. 7.5 показаны константные области легких цепей типа каппа человека и трех видов животных (сокращенные

	110	120	130	140
Крыса	R A N A A P T V S I F P P S T E Q L A T G G A S V V C L M N K F Y P R D I S V K			
Мышь	R A D A A P T V S I F P P S S E Q L T S G G A S V V C F L N N F Y P K D I N V K			
Человек	R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q			
Кролик	G D P V A P T V L I F P P A A D Q V A T G T V T I V C V A N K Y F P R D V T V T			
	150	160	170	180
Крыса	W K I D G T E R R N G V L N S V T B Q D S K D S T Y S M S S T L S L T K A D Y Q			
Мышь	W K I D G S E R Q N G V L N S D T Z W D S K D S T Y S M S S T L T L T K D E Y E			
Человек	W K V D N A L Q S G N S Q E S V T Z Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E			
Кролик	W E V D G T T Q T T G I E N S K T P Q D S A D C T Y N L S S T L T L T S T Q Y N			
	190	200	210	
Крыса	S H N L Y T C Q V V H K T S S S P V V K N F N R N E C			
Мышь	R H N S Y T C E A T H K T S T S P I V K S F N R N E C			
Человек	K H K L Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C			
Кролик	S H K E Y T C K V T H Q G T T S P V V Q S F N R G D C			

Рис. 7.5. Сравнение аминокислотной последовательности константных областей капсидов крысы, мыши, человека и кролика.

Аминокислоты обозначены стандартным однобуквенным кодом. Обведены остатки, общие для всех цепей.

обозначения аминокислот приведены в табл. 7.2). Гомология между цепями достигает 37%.

Таблица 7.2. Однобуквенные и трехбуквенные обозначения аминокислот

A-ala-аланин	M-met-метионин
B-asx-аспарагиновая кислота или аспарагин	N-asn-аспарагин
C-cys-цистеин	P-Pro-пролин
D-asx-аспарагиновая кислота	Q-gln-глутамин
E-glu-глутаминовая кислота	R-arg-аргинин
F-phe-фенилаланин	S-ser-серин
G-gly-глицин	T-thr-треонин
H-his-гистидин	V-val-валин
I-ile-изолейцин	W-trp-триптофан
K-lys-лизин	Y-tyr-тирозин
L-leu-лейцин	Z-glx-глутаминовая кислота, глутамин или пирролидонкарбоксил

У человека имеется по крайней мере четыре изотипа лямбда-цепей, у мыши — три. Остатки, которые строят изотипические маркеры, определяемые серологически, находятся на поверхности домена и входят в состав антигенных детерминант.

На рис. 7.6 (обозначения аминокислот приведены в табл. 7.2) приведены константные области лямбда-цепи человека и двух видов животных. При сопо-

ставлении последовательности константных областей лямбда-цепей мыши и свиньи с таковой человека, для которой известна трехмерная структура, удается предположительно установить, к какому отрезку цепи относятся петли и сегменты с бета-складчатой структурой. Иржи Новотный и Франтишек Франек [18] показали, что слой из четырех сегментов с бета-структурой является эволюционно наименее изменчивым (межвидовая гомология равна 67%). Константные области тяжелых и легких цепей взаимодействуют с этими слоями из четырех сегментов, и возможно, что высокая степень гомологии отражает существование определенных структурных ограничений, необходимых для такой ассоциации. Наибольшая степень вариабельности была найдена у двух поверхностно расположенных петель (гомология равна лишь 6%). В целом у лямбда-цепей человека и двух изученных видов животных около 50% остатков константных областей являются идентичными.

7.2. IgG

Около 75% общего количества всех иммуноглобулинов в сыворотке высших позвоночных животных приходится на IgG. Каждая их молекула состоит из двух легких цепей (обе цепи либо каппа, либо лямбда) и двух тяжелых гамма-цепей, связанных ковалентно друг с другом дисульфидными связями. Молекулярная масса молекулы IgG составляет примерно 150 000. У человека и мыши имеется по четыре подкласса IgG; впервые они были обнаружены серологическими методами [7]. У человека нумерация иммуноглобулинов отражает их содержание в сыворотке. Так, из всех иммуноглобулинов количество IgG1 больше всего, а количество IgG4 наименьшее. Соответствующие тяжелые цепи γ_1 , γ_2 , γ_3 и γ_4 могут различаться как по аминокислотной последовательности, так и по антигенным свойствам. Они являются продуктами разных генов тяжелых цепей. На рис. 7.7 приведена в качестве примера последовательность аминокислот одной из γ_1 -цепей [5].

Структура других подклассов гамма-цепей (на рисунке не показана) очень схожа со структурой γ_1 -цепей; степень гомологии колеблется от 90 до 95% в соответствующих доменах [19, 20]. Шесть полуцистиновых остатков одинаковы в различных вариантах цепей. Они необходимы для формирования трех доменов константных областей гамма-цепей; в каждом из них имеется по одной дисульфидной петле. Во втором домене константной области всех гамма-цепей имеется один углеводный компонент, прикрепленный к остатку 297. Эта углеводная группа влияет на четвертичную структуру антитела в области второго константного домена, препятствуя взаимодействию между бета-складчатыми слоями (рис. 7.8) [21]. Возможно, от такой конформации зависят функциональные свойства C_γ2-домена, однако доказать эту гипотезу экспериментально пока не удается.

Различия в изотипических свойствах и биологических функциях определяются такими участками молекул, которые уникальны для каждого подкласса. В каждом домене имеется лишь по несколько аминокислотных замен, однако самые большие различия между гамма-подклассами обнаружены в области межцепевых связей и в шарнирной области. Хотя IgG1 стал как бы прототипом структуры иммуноглобулинов, он в действительности является уникальным по характеру своей связи между тяжелыми и легкими цепями. Только у этого иммуноглобулина человека полуцистиновый остаток легкой цепи связан с полуцистиновым остатком в положении 220 сегмента между C_H1 и C_H2, а не в положении 131 между V_H и C_H1 (в молекуле IgA2 аллотипа A2m (1) вообще нет

1
 PCA - VAL - GLN - LEU - VAL - GLN - SER - GLY - ALA - GLU - VAL - LYS - LYS - PRO - GLY - SER - SER - VAL - LYS - VAL - 20
 SER - [CYS] - LYS - ALA - SER - GLY - GLY - THR - PHE - SER - ARG - SER - ALA - ILE - ILE - TRP - VAL - ARG - GLN - ALA - 30
 PRO - GLY - GLN - GLY - LEU - GLU - TRP - MET - GLY - GLY - ILE - VAL - PRO - MET - PHE - GLY - PRO - PRO - ASN - TYR - 40
 ALA - GLN - LYS - PHE - GLN - GLY - ARG - VAL - THR - ILE - THR - ALA - ASP - GLU - SER - THR - ASN - THR - ALA - TYR - 50
 MET - GLU - LEU - SER - SER - LEU - ARG - SER - GLU - ASP - THR - ALA - PHE - TYR - PHE - [CYS] - ALA - GLY - GLY - TYR - 60
 GLY - ILE - TYR - SER - PRO - GLU - GLU - TYR - ASN - GLY - GLY - LEU - VAL - THR - VAL - SER - SER - ALA - SER - THR - 70
 LYS - GLY - PRO - SER - VAL - PHE - PRO - LEU - ALA - PRO - SER - SER - LYS - SER - THR - SER - GLY - GLY - THR - ALA - 80
 ALA - LEU - GLY - [CYS] - LEU - VAL - LYS - ASP - TYR - PHE - PRO - GLU - PRO - VAL - THR - VAL - SER - TRP - ASN - SER - 90
 GLY - ALA - LEU - THR - SER - GLY - VAL - HIS - THR - PHE - PRO - ALA - VAL - LEU - GLN - SER - SER - GLY - LEU - TYR - 100
 SER - LEU - SER - SER - VAL - VAL - THR - VAL - PRO - SER - SER - SER - LEU - GLY - THR - GLN - THR - TYR - ILE - [CYS] - 110
 ASN - VAL - ASN - HIS - LYS - PRO - SER - ASN - THR - LYS - VAL - ASP - LYS - ARG - VAL - GLU - PRO - LYS - SER - [CYS] - 120
 ASP - LYS - THR - HIS - THR - [CYS] - PRO - PRO - [CYS] - PRO - ALA - PRO - GLU - LEU - LEU - GLY - GLY - PRO - SER - VAL - 130
 PHE - LEU - PHE - PRO - PRO - LYS - PRO - LYS - ASP - THR - LEU - MET - ILE - SER - ARG - THR - PRO - GLU - VAL - THR - 140
 [CYS] - VAL - VAL - VAL - ASP - VAL - SER - HIS - GLU - ASP - PRO - GLN - VAL - LYS - PHE - ASN - TRP - TYR - VAL - ASP - 150
 GLY - VAL - GLN - VAL - HIS - ASN - ALA - LYS - THR - LYS - PRO - ARG - GLU - GLN - GLN - TYR - ASX - SER - THR - TYR - 160
 ARG - VAL - VAL - SER - VAL - LEU - THR - VAL - LEU - HIS - GLN - ASN - TRP - LEU - ASP - GLY - LYS - GLU - TYR - LYS - 170
 [CYS] - LYS - VAL - SER - ASN - LYS - ALA - LEU - PRO - ALA - PRO - ILE - GLU - LYS - THR - ILE - SER - LYS - ALA - LYS - 180
 GLY - GLN - PRO - ARG - GLU - PRO - GLN - VAL - TYR - THR - LEU - PRO - PRO - SER - ARG - GLU - GLU - MET - THR - LYS - 190
 ASN - GLN - VAL - SER - LEU - THR - [CYS] - LEU - VAL - LYS - GLY - PHE - TYR - PRO - SER - ASP - ILE - ALA - VAL - GLU - 200
 TRP - GLU - SER - ASN - ASP - GLY - GLU - PRO - GLU - ASN - TYR - LYS - THR - THR - PRO - PRO - VAL - LEU - ASP - SER - 210
 ASP - GLY - SER - PHE - PHE - LEU - TYR - SER - LYS - LEU - THR - VAL - ASP - LYS - SER - ARG - TRP - GLN - GLU - GLY - 220
 ASN - VAL - PHE - SER - [CYS] - SER - VAL - MET - HIS - GLU - ALA - LEU - HIS - ASN - HIS - TYR - THR - GLN - LYS - SER - 230
 LEU - SER - LEU - SER - PRO - GLY 240

Рис. 7.7. Полная аминокислотная последовательность тяжелой цепи IgG1 (Eu) человека. Единичный углеводный компонент прикреп-

ляется к остатку 297. Полуцистиновые остатки обведены прямоугольником ([5]; печатается с разрешения).

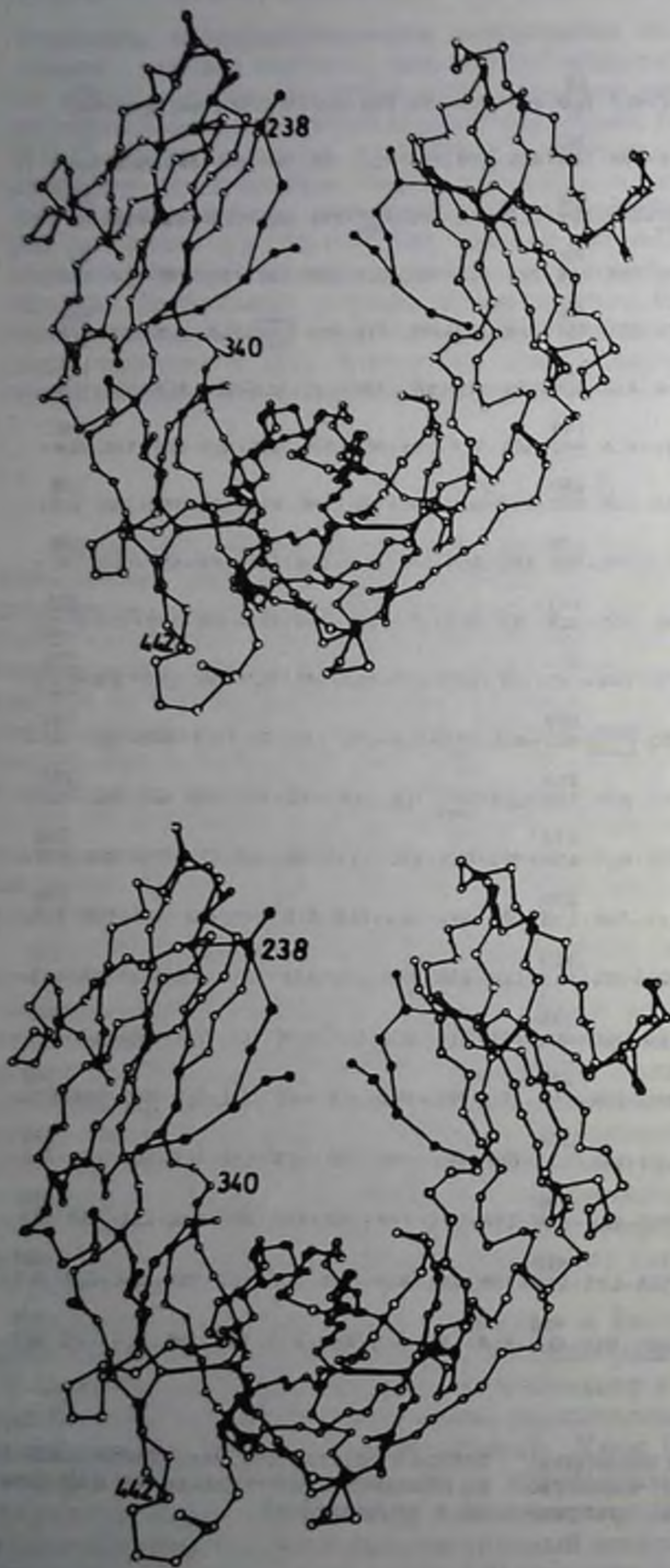
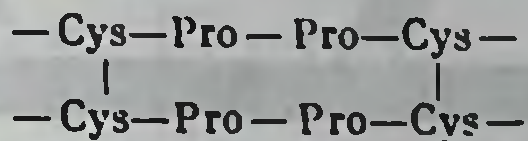


Рис. 7.8. Стереосхема хода полипептидной цепи Fc-фрагмента из неспецифического IgG человека. Углевод обозначен **тежными кружками** ([21]; печатается с разрешения).

связи между тяжелыми и легкими цепями). Согласно данным рентгеноструктурного анализа, оба остатка в положениях 131 и 220 находятся на расстоянии 6.4 от соответствующего остатка цистеина легких цепей, и поэтому они равновероятно могут участвовать в образовании связи между тяжелыми и легкими цепями [17]. Шарнирные области между $C_{\gamma 1}$ - и $C_{\gamma 2}$ -доменами являются наиболее изменчивыми по своей аминокислотной последовательности; они играют, вероятно, главную роль в определении различий в биологических функциях подклассов. От шарнирной области, богатой остатками пролина и цистеина, видимо, зависят гибкость молекулы, способность связывать комплемент и чувствительность к протеолитическому перевариванию. В этой части молекулы находятся дисульфидные связи между тяжелыми цепями. Число дисульфидных связей варьирует от двух в $\gamma 1$ - и $\gamma 4$ -цепях человека, четырех — в $\gamma 2$ -цепях человека до одиннадцати в $\gamma 3$ -цепях человека [22, 23]. $\gamma 1$ -цепи, спариваясь, образуют очень жесткую циклическую октапептидную структуру:



Эта структура служит своего рода осью вращения для всей гибкой шарнирной области. Как правило, протеолитические ферменты расщепляют молекулу либо непосредственно перед этим октапептидом (трипсин, папаин), либо сразу же после него (пепсин), что приводит к образованию Fab- или $F(ab')_2$ -фрагментов соответственно. Последние состоят из двух Fab-частей молекулы, соединенных дисульфидной связью в области шарнира.

На рис. 7.9 показана структура двух из четырех шарнирных областей [23]. В $\gamma 1$ -цепи она начинается с остатка 216 и заканчивается остатком 231. В шарнирной области $\gamma 3$ -цепи имеется 47 остатков, которых нет в шарнирной области $\gamma 1$ -цепи. При внимательном анализе можно увидеть, что этот отрезок представляет собой повтор фрагмента из 15 остатков (216—231), который является общим для шарнирных областей $\gamma 1$ - и $\gamma 3$ -цепей. Таким образом, шарнирная область $\gamma 3$, вероятно, возникла в результате четырехкратной дубликации фрагмента из 15 остатков шарнирной области $\gamma 1$. Столь длинная шарнирная область может быть ответственна за многие биологические эффекторные функции, которых нет у других гамма-подклассов, а также за очень высокую чувствительность молекул IgG3 к протеолизу и быстрый катаболизм. Из-за вставки длиной в 47 остатков в шарнире $\gamma 3$ -цепи имеют несколько большую молекулярную массу, чем другие гамма-цепи. Известны аллотипические варианты IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, свойства которых подробно обсуждаются в гл. 9.

Гомология между гамма-цепями иммуноглобулинов мыши носит иной характер. Так же, как и у человека, у мышей имеются четыре подкласса гамма-цепей: $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$ и $\gamma 3$, но, за исключением двух $\gamma 2$ -цепей, гомология между цепями составляет лишь от 60 до 70%, т. е. она примерно такая же, как между гамма-цепями мыши, с одной стороны, и человека или морской свинки — с другой. В то же время $\gamma 2a$ - и $\gamma 2b$ -цепи гомологичны на 80%. По определению подклассы должны быть более сходными друг с другом, чем с другими классами тяжелых цепей. Как правило, последовательности цепей разных подклассов различаются только на 10—40%, тогда как цепи разных классов различаются между собой примерно на 70%.

Аллотипические варианты известны также и для гамма-цепей мыши. При сравнении двух $\gamma 2a$ -цепей, принадлежащих к разным аллотипам (Ig-1a и Ig-1b), неожиданно было обнаружено восемь замен в $C_{\gamma 2}$ и 28 в $C_{\gamma 3}$ [24]. Это можно было объяснить либо очень высоким уровнем мутаций, способствующим быстрой

γ3 Шарнир

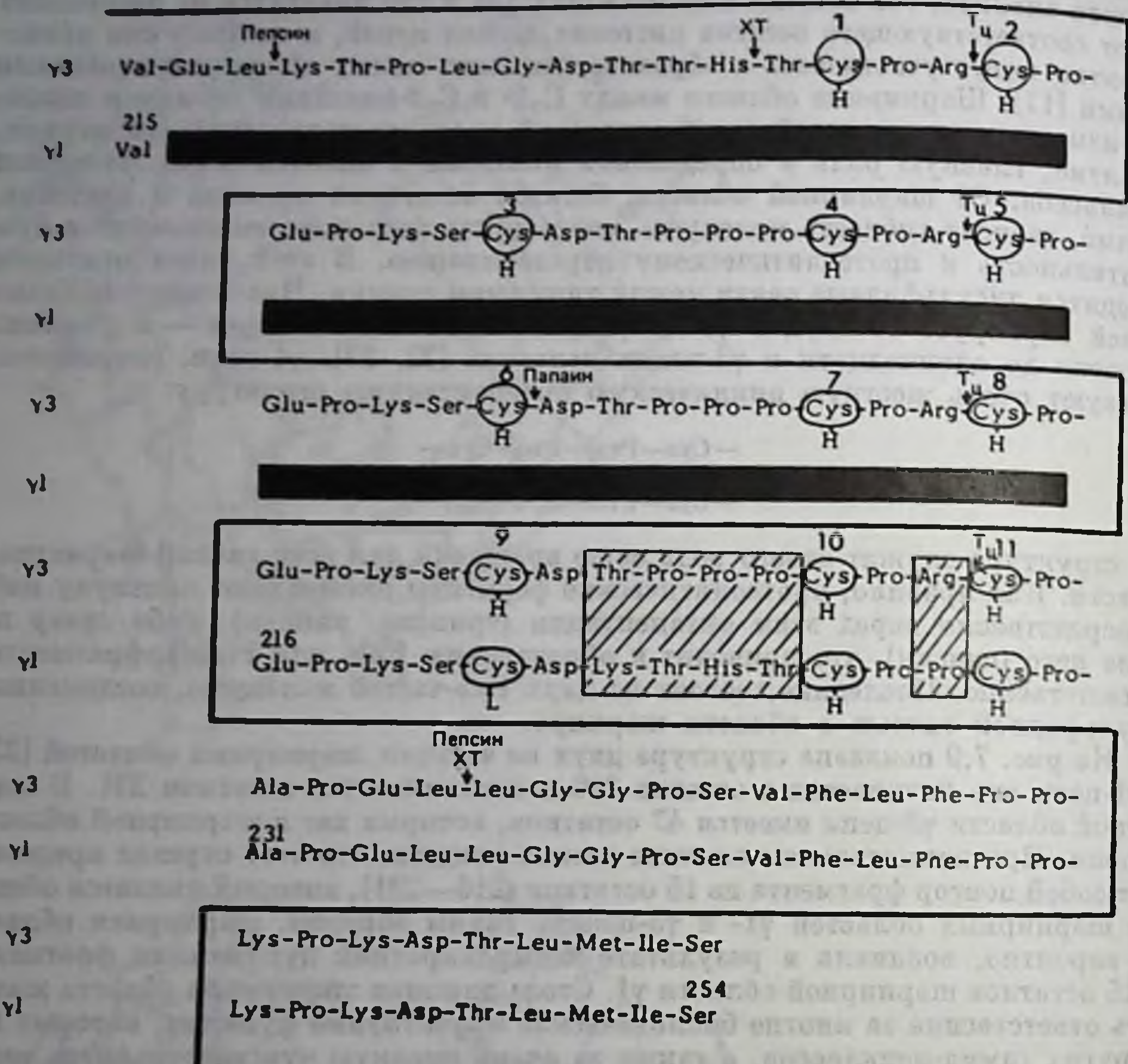


Рис. 7.9. Сравнение аминокислотных последовательностей шарнирных областей γ3- и γ1-цепей человека.

Зачервленный прямоугольник — вставка у γ3-цепи в 47 остатков, отсутствующая у γ1-цепей. Заштрихованы участки, которые раз-

личаются у γ1- и γ3-цепей. Последовательности сопоставлены так, чтобы можно было четко увидеть четырехкратное повторение участка шарнирной области γ3-цепей (верхние четыре пары последовательностей) ([23]; печатается с разрешения).

дивергенции аллелей, либо конверсией генов константных областей лишь одного аллеля, но не другого. Однако две аллельные γ2b-цепи различаются только по четырем положениям (два в C_{γ2} и два в C_{γ3}). По крайней мере некоторые из замен, найденные в этих и других гамма-цепях, должны находиться на поверхности молекулы, что позволяет различать аллотипические варианты по их антигенным свойствам.

7.3. IgA

Иммуноглобулины А составляют лишь 10—15% всех иммуноглобулинов сыворотки. Однако они преобладают в экстравазкулярных секретах. Большая часть IgA в слюне, слезах, пищеварительных соках, секретах слизистой носа

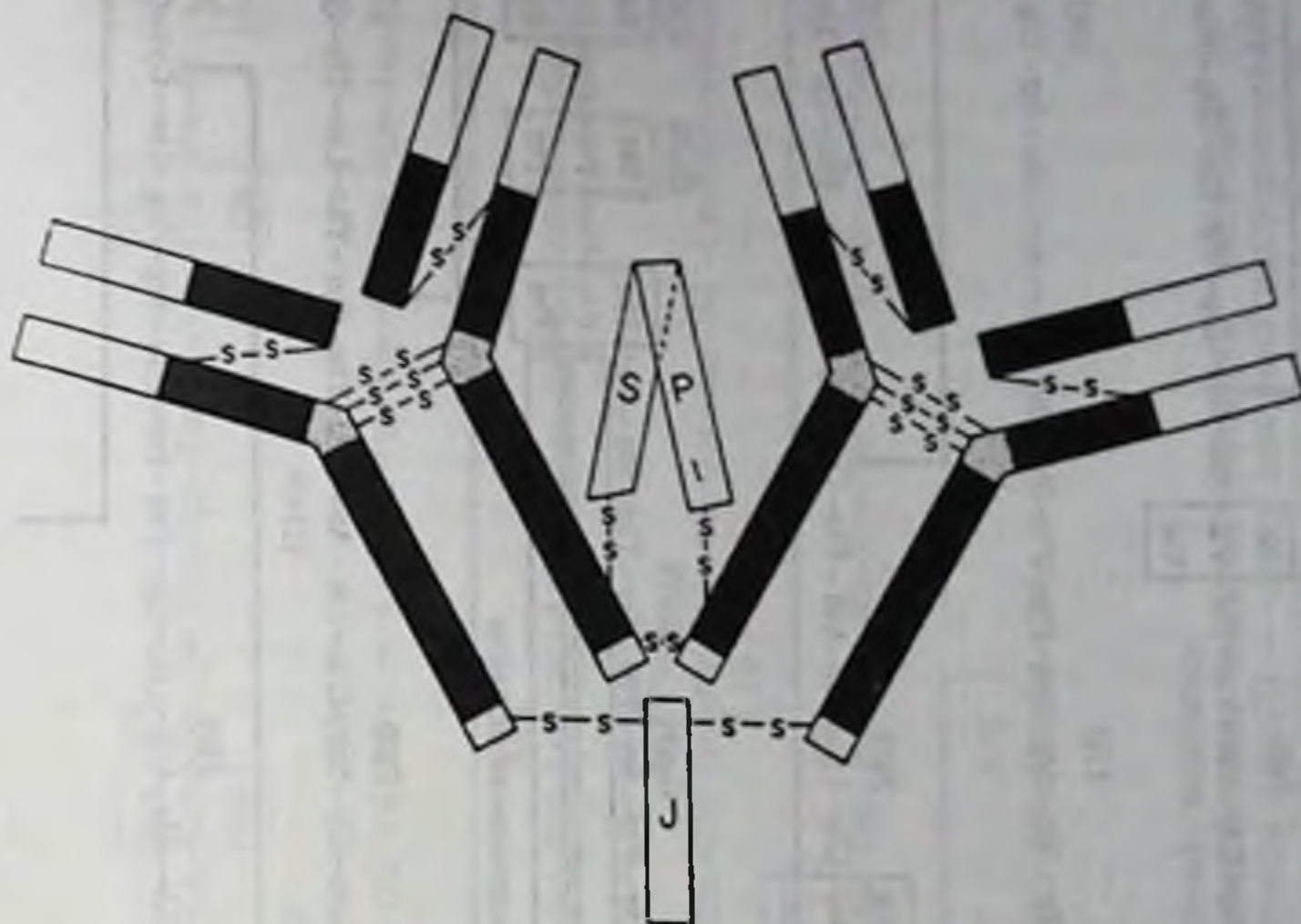


Рис. 7.10. Схема строения секреторного IgA человека. Относительные размеры цепей соответствуют истинным. J — J-цепь, СК — секр-

торный компонент ([1]; печатается с разрешения).

и выделениях грудной железы находится в виде секреторного IgA (SIgA), т. е. полимерной формы, состоящей из двух IgA-мономеров, соединяющей молекулы (обозначаемой как J-цепь) и гликопротеина, называемого секреторным компонентом (СК) (рис. 7.10). Свойства J-цепи и СК детально обсуждаются в конце этого раздела. Небольшое количество IgA находится в виде тримера и высших полимеров. У многих млекопитающих молозиво служит богатым источником SIgA, обеспечивая передачу иммунитета от матери новорожденным (см. обзор [25]).

У всех здоровых людей имеются два изотипа: IgA — IgA1 и IgA2 [26]. В сыворотке основным подклассом является IgA1, а в экстраваскулярных секретах IgA2 содержится в несколько большем количестве, чем IgA1. У IgA1 человека аллотипов не найдено, а для IgA2 известны аллотипические варианты A2m (1) и A2m (2). Все тяжелые цепи класса «альфа» построены из домена V-области, трех доменов C-области и шарнирной области. Первичная структура константных областей IgA1 и обоих вариантов IgA2 человека изучена полностью [27—29]. За исключением шарнира, постоянные области альфа-цепей гомологичны на 95% (рис. 7.11). В каждом домене имеется по одной дисульфидной связи. Кроме того, альфа-цепи содержат по крайней мере две добавочные внутридоменные дисульфидные связи, которых нет у других классов иммуноглобулинов (одна в $C_{\alpha}2$, а другая в $C_{\alpha}3$).

Для локализации аллотипических и изотипических детерминант необходимо знать положение аминокислотных замен в константных областях цепей. За исключением шарнирной области (200—242), сейчас известны различия в 14 положениях между тремя константными доменами $\alpha 1$ и $\alpha 2$ A2m(1). Цепи $\alpha 2$ A2m(2) в этих 14 положениях имеют одинаковые остатки с $\alpha 2$ A2m(1)-цепями, но в то же время отличаются как от $\alpha 1$, так и от $\alpha 2$ A2m(1) по другим шести положениям — 212, 221, 411, 428, 458, 467 (рис. 7.11). Анализируя эти 20 замен, можно понять, каким образом небольшие изменения в первичной структуре этих молекул влияют на их антигенность и конформацию. В то же

время этот пример показывает, как сравнение сходных последовательностей помогает локализовать вероятное положение изотипических и аллотипических детерминант на молекуле иммуноглобулина.

В первом домене константной области (C_{H1} или $C_{\alpha 1}$) $\alpha 2$ -цепи имеют семь замен в одинаковых положениях, по которым они отличаются от $\alpha 1$ -цепей. Со структурной точки зрения наиболее важную роль играют замены в положениях 133 и 166. У $\alpha 2$ -цепей в положении 133 находится аспарагиновая кислота вместо цистеина. Легкие цепи присоединены дисульфидной связью к $\alpha 1$ -цепям именно в этом положении. У $\alpha 2$ -цепей связь тяжелых и легких цепей должна уже локализоваться в другом месте. В положении 166 у $\alpha 2$ -цепей имеется аспарагин, а у $\alpha 1$ -цепей — глицин. Эта замена приводит к появлению трипептида Asp-X-Ser (Thr), к которому, как известно, прикрепляется глюкозаминный олигосахарид. Совместный эффект от изменения места прикрепления легкой цепи и появления добавочного олигосахаридного компонента, возможно, обуславливает часть антигенных различий между $\alpha 1$ и $\alpha 2$ -цепями, т. е. изотипические варианты.

Аллотипические различия между $\alpha 2$ -цепями, по-видимому, определяются остатками области $C_{\alpha 1}$, расположенными непосредственно перед шарнирной областью (положения 212 и 221). У A2m(2)-аллотипа вместо пролина, имеющегося в A2m(1) $\alpha 2$ -цепях, находится серин; в результате такой замены появляется еще один акцепторный участок, по которому может происходить прикрепление олигосахаридов (последовательность Asp-Pro-Ser не может, как правило, служить акцепторным участком, поскольку его конформация делает остаток аспарагина труднодоступным для соответствующей эндогликозидазы). В $\alpha 2$ -цепях нет также пролина-221, вместо него находится аргинин. Кроме потери двух пролинов и добавочного олигосахаридов у $\alpha 2$ A2m (2)-цепей есть еще одна особенность — возможно, что легкая цепь прикрепляется к остатку Cys-220. Молекулы IgA2 аллотипа A2m (1) отличаются от молекул всех других иммуноглобулинов тем, что их легкие и тяжелые цепи не связаны дисульфидными мостиками друг с другом, а вместо этого существуют дисульфидные связи между двумя легкими цепями и двумя тяжелыми цепями [320]. Очевидно, что различия в конформации этой части молекулы у двух аллотипических вариантов константных областей $\alpha 2$ -цепей объясняют локализацию аллотипических детерминант.

Шарнирные области $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -цепей значительно отличаются друг от друга, поскольку у $\alpha 2$ -цепей в этом месте имеется делеция в 13 аминокислотных остатков [31]. Строение шарнира $\alpha 1$ -цепей необычное, так как здесь локализируются пять галактозаминных олигосахаридов, присоединенных O-гликозидной связью к остаткам серина. За исключением $\alpha 1$ -цепей, углеводы были обнаружены еще лишь в шарнирной области δ -цепей. Отрезок цепи 224—239 возник в результате внутренней дубликации последовательности Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Pro-Ser-Pro-. Дубликации отрезков такой длины встречаются редко и могут происходить в результате неравного кроссинговера в мейозе. В слюне и содержимом толстых кишок человека содержатся протеолитические ферменты, способные расщеплять IgA1 именно в этом месте. В то же время IgA2 резистентен к такому протеолизу, поскольку у него нет упомянутой последовательности аминокислот. Протеолитические ферменты секретируются также некоторыми штаммами таких бактерий, как *Streptococcus sanguis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*. Фермент, образуемый *S. sanguis*, расщепляет первый повтор дублированного сегмента после остатка Pro-227, а ферменты *Neisseria* специфически разрывают пептидную цепь в аналогичном месте второго повтора, после остатка Pro-235 (рис. 7.12). Возможно, что IgA2 возник в эволюции именно

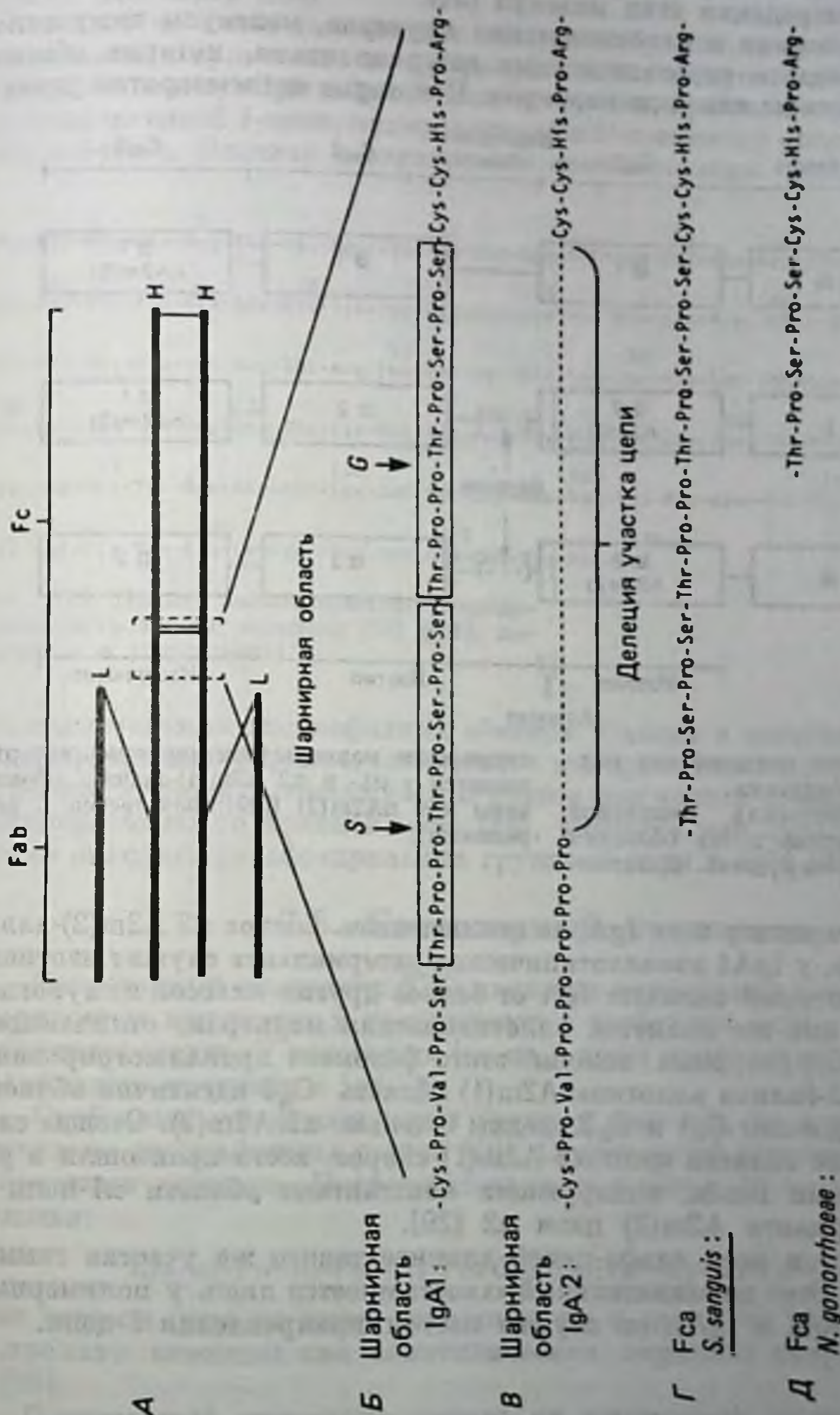


Рис. 7.12. Шарнирная область IgA1 и IgA2 человека и продукты расщепления двумя высклочными бактериальными ферментами. А — схема мономера IgA человека. В — аминокислотная последовательность шарнирной области IgA1. Дублированный участок обведен прямоугольником. Стрелками показаны связи Pro-Thr, которые расщепляются ферментами *Streptococcus sanguis* (S) и *Neisseria gonorrhoeae* (G) соответственно. В — аминокислотная последовательность шарнирной области IgA2. Показана делеция (по сравнению с IgA1), которая включает оба участка, чувствительные к протеолиту. Это объясняет резистентность IgA2 к бактериальным ферментам. Г и Д — N₂-концевая последовательность Fc-фрагмента IgA1, полученного расщеплением ферментами из *S. sanguis* и *N. gonorrhoeae*. Обе последовательности расположены так, что можно локализовать места действия указанных ферментов. Видно, что последние расщепляют только одну из связей Pro-Thr ([32]; печатается с разрешения).

потому, что он способен как бы ускользать от действия бактериальных протеиназ. С другой стороны, поскольку IgA1 более устойчив к кишечным протеиназам, чем IgA2, бактерии могли адаптироваться к расщеплению IgA1, приводящему к более быстрой деградации этих молекул [32].

Кроме изотипических и аллотипических маркеров, молекулы иммуноглобулинов могут обладать серологическими детерминантами, которые обозначаются как изоаллотипы или «нов-маркеры». Некоторые антисыворотки узнают

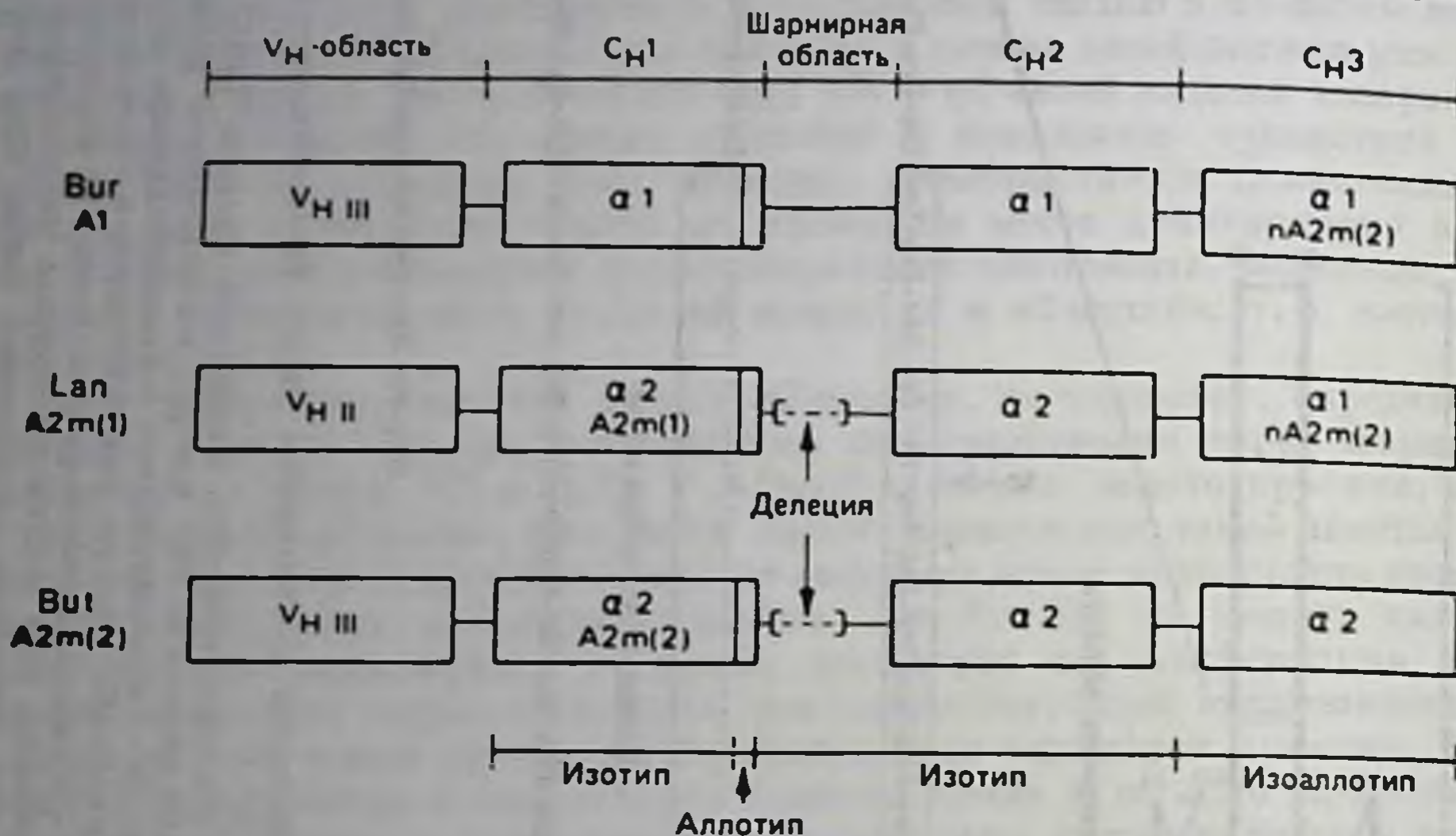


Рис. 7.13. Расположение генетических маркеров на альфа-цепях человека. Обозначения аллотипических маркеров A2m(1) и A2m(2) приведены в тех областях цепи, где их удается обнаружить. Изоалло-

типические маркеры (нов-маркеры), которые имеются у α1- и α2 A2m(1)-цепей, обозначены как α1 nA2m(2) ([29]; печатается с разрешения).

детерминанты, имеющиеся у всех IgA, за исключением белков α2 A2m(2)-аллоти- типа. Так, например, у IgA1 изоаллотипическая детерминанта служит изотипи- ческим маркером, который отличает IgA от белков других классов иммуногло- булинов, а у IgA2 она же является аллотипическим маркером, отличающим A2m(2) от A2m(1). Структурные основы этого феномена проиллюстрированы на рис. 7.13. У IgA2-белков аллоти- типа A2m(1) область C_α3 идентична области C_α3 α1-цепи, но их домены C_α1 и C_α2 сходны с цепью α2 A2m(2). Отсюда сле- дует, что константные области цепи α2 A2m(1) скорее всего произошли в ре- зультате рекомбинации генов, кодирующих константные области α1-цепи и аллотипического варианта A2m(2) цепи α2 [29].

C-концевой участок всех альфа-цепей длиннее такого же участка гамма- цепей на 18 остатков. Этот дополнительный «хвост» имеется лишь у полимерных иммуноглобулинов (IgM и IgA); он служит местом прикрепления J-цепи.

7.4. J-цепь

J-цепь — это особый полипептид, необходимый, по-видимому, для иници- рования полимеризации как IgA, так и IgM. Его молекулярная масса равна примерно 15 000, и он построен из остатков 129 аминокислот и одного сложного

углеводного компонента. Первичная структура J-цепи показана на рис. 7.14. В молекуле имеется много отрицательно заряженных аминокислот и восемь полуцистиновых остатков, участвующих во внутрицепевых и межцепевых связях (см. обзор [35]).

J-цепь не имеет гомологии с иммуноглобулинами, и кодирующий ее ген расположен в хромосоме, не содержащей генов иммуноглобулинов [36]. У полимерных молекул IgM и IgA J-цепь одинакова, причем в каждой из них имеется лишь по одной J-цепи, прикрепленной к C-концевому остатку цистина альфа- или мю-цепи. Вначале полагали, что полимеризация осуществляется серией

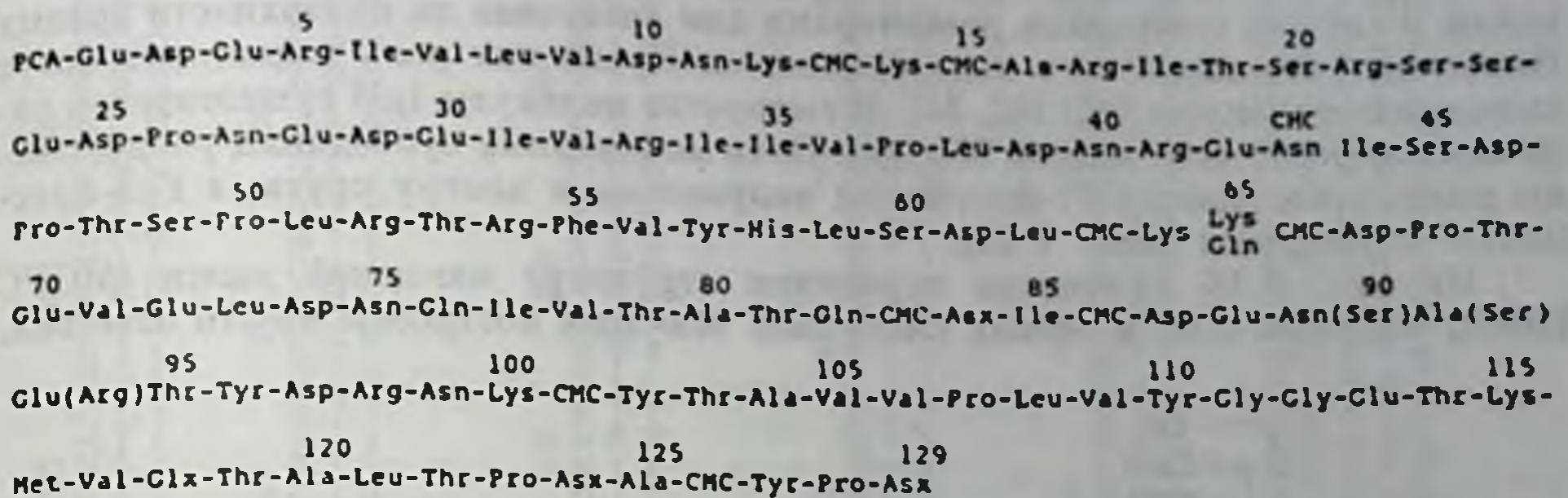


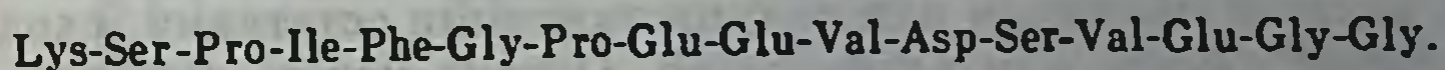
Рис. 7.14. Полная аминокислотная последовательность J-цепи человека [33] ([34]; печатается с разрешения).

последовательных дисульфидных обменов. Однако в настоящее время известен полимеризующий фермент, связанный с мембранами активированных В-клеток, но отсутствующий у покоящихся В-клеток или клеток печени. Он катализирует полимеризацию по крайней мере IgM, действуя как сульфгидрилоксидаза, и прямо окисляет сульфгидрильные группы J-цепи и IgM [37].

7.5. Секреторный компонент

Секреторный компонент (СК) является нормальной составной частью SIgA в слизистых жидкостях и присутствует в свободном виде в секретах молочных и слюнных желез. У некоторых (но не у всех) видов он может быть связан дисульфидным мостиком с IgA.

Свободных сульфгидрильных групп у него нет, но в то же время имеется несколько дисульфидных связей [16]. Секреторный компонент содержит много углеводных остатков. Последовательность первых 16 остатков его цепи следующая:



Этот отрезок цепи не имеет гомологии ни с одним из изученных белков [38]. У кролика известны два аллотипических варианта секреторного компонента [39].

Секреторный компонент состоит из нескольких полипептидов, имеющих антигенное родство. Они образуются эпителиальными клетками как рецепторные мембранные белки, специфические в отношении комплекса (IgA)₂-J. Комплексы СК-иммуноглобулинов, образующиеся на базолатеральной поверхности клетки, захватываются внутрь клетки с помощью эндоцитоза, передвигаются

в цитоплазме и освобождаются на апикальной поверхности клетки в результате протеолитического расщепления трансмембранного СК. Фрагмент предшественника СК остается на мембране. Играет ли он какую-либо роль в дальнейшем, неизвестно [40, 41].

7.6. IgM

В ходе иммунного ответа вначале появляются антитела IgM-класса. У новорожденного первые антитела также относятся к этому классу иммуноглобулинов. IgM играют важную роль в патогенезе некоторых аутоиммунных заболеваний и служат основными рецепторами для антигенов на поверхности зрелых В-клеток, где находятся в виде мономеров. Кроме них роль рецепторов могут выполнять молекулы IgD [42, 43]. В сыворотке молекулы IgM существуют в виде пентамеров с мол. массой 950 000. Пять мономерных субъединиц расположены радиально, причем Fc-фрагменты направлены к центру круга, а Fab-фрагменты — наружу (рис. 7.15).

На рис. 7.16 приведена первичная структура мю-цепей мыши (MORC 104E), человека (Ou) и собаки (Mo) [45]. Мю-цепи построены из 576 остатков,

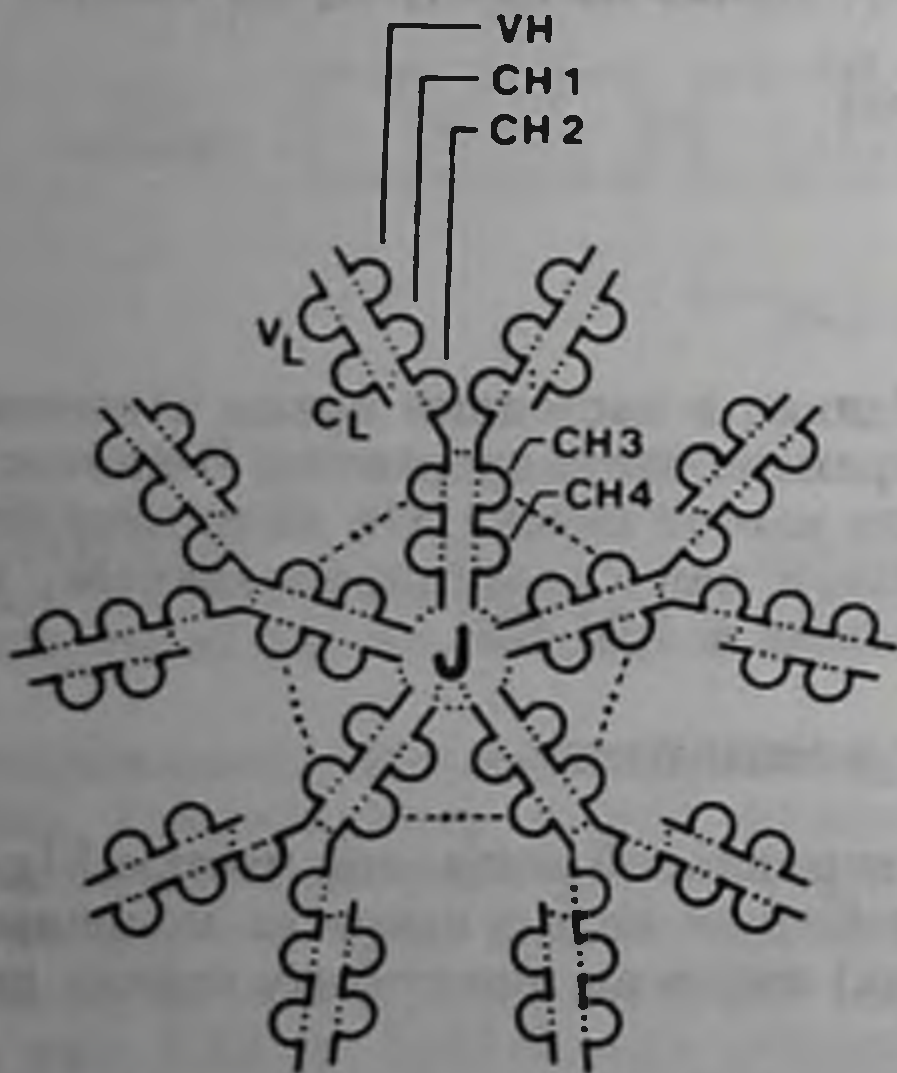


Рис. 7.15. Схема пентамерной молекулы IgM. — · · · — дисульфидные связи ([44]; печатается с разрешения).

из которых 452 относятся к константной области. У последней насчитываются четыре домена, на один больше, чем у гамма- или альфа-цепей. Мю-цепи не имеют области, богатой пролином или полуцистиновыми остатками, сходной с шарнирной областью гамма- или альфа-цепей. Однако можно выявить некоторую конформационную лабильность в середине молекулы IgM, если ее обработать мягкими денатурирующими агентами при 60 °С или длительно инкубировать с сильными денатурирующими агентами, например 4 М мочевиной при 25 °С [46]. Одну из дисульфидных связей между тяжелыми цепями образуют остатки Cys-337 в C_μ2; в то же время между C_μ1 и C_μ2 имеются остатки пролина. Таким образом, C_μ2-домен представляет собой аналог шарнирных областей гамма- и альфа-цепей и может рассматриваться как предшественник этих областей. К каждой мю-цепи прикрепляется по пяти олигосахаридов (один в C_μ1, три

130 140 150 160 170 180
 ESQAFPNVFPPLVSCESPLSDKNLVAMGCLARDFLPSTISFTWYQNTVEIQGIRT
 G-ASA-TL---NSP-BSTI)-V---Z---DS-T-S-K-K-BSEI)-SST-G
 G-ASA-SI---NSNPTSTI)-GS-T-S-K-EELSAL)-NST-G

MOPC 104E
 Ou
 Moo

190 200 210 220 230 240 250 260 270
 FPTLRTGGKYLATSQVLLSPKNILBGSDEYLVKIHYGKTRDLQVPIPAVAIMPNVNVFVPRDGFSGPAPRKSKLICEA TNFTPKPIC)
 --SVLR---A(-Z)-PS-DVMQ-T-HVCKWVQHPNGBKQKB-L-VI-ELP-K-S---B-P-BI)-Q-G-S-RQVW
 --SVLR---Y---F-PSVD-IQ-T-HI---VRHSBGBKQKB-L-VMLTLP-E-SG-I---A-F-BI)-Q-Q-SG-S-RQVW

MOPC 104E
 Ou
 Moo

280 290 300 310 320 330 340 350 360
 TVSMKDKLVESGFTTDPVTIENKGSTPQYKVISLTISEIDWLNINVTCTRVDIRGLTFLKNVSSCAASPSTDI LNFITPPSFADIFLS
 SLREG-QVGI J-V-BZ-ZAZA-Z-G-T---T---KZS---GESMF---QQ-A-M-VPDQD-A-RV-A---S---T
 SLRDG-QIEI J-V-NE-ZAZA-Z-G-T---T-M-Q-DA-SQS-F-K-E---QQ-A-M-TSDQPVG-SI---S---NT

MOPC 104E
 Ou
 Moo

370 380 390 400 410 420 430 440 450
 KSNALTCLVSNLATYETLTI SWASQSGEPLTKIKIMESHNGTFSAGVASCYVEDWNNRKEFVCTVTRDLPSFQKXFI SKPNEVNDI
 --TK---TD-T-BSV---TRENGAVK-ITN-S---A---V-E-I-EDBDWSEI-T---T---L-QT-R-KG-AL-
 --K-S---TD---DSV---TRENGA-K-ITN-S---M-E-T---E-FSGEQ-T---T---VL-QT-R-KG-AV-

MOPC 104E
 Ou
 Moo

460 470 480 490 500 510 520 530 540
 PPAVYLLPPAREQLNRESATVCLVKGFSPADISVQWKQKQQLPQEKYVTSAPRPEGAGFYFTHSILTVTEEMNSGETYTCVGH
 R-B---ZZ---I---T---VF-E-M---EP-SPQ---Q---R-A---S---T-Q---A-
 M-S---V---S---D---LS---T-Y-P-VF---V-K-PV-PDS---Q---L-A---S---A---A-

MOPC 104E
 Ou
 Moo

550 560 570
 FALPELVTEKTVKSTGKPTLYNWSLIMSITGTCY
 ---NR---V---A---
 -S-NR---S---VL---A-Z--

MOPC 104E
 Ou
 Moo

Рис. 7.16. Сравнение аминокислотных последовательностей мю-цепей из IgM мыши (MOPC 104E), человека (Ou) и собаки (Moo).
 Прямая линия означает идентичность последовательностей цепей человека и собаки с цепью мыши. Квадратные скобки указывают на пропуски, введенные для получения максимальной гомологии ([45]; с изменениями).

в $C_{\mu}3$ и один в хвостовом отрезке из 18 остатков аминокислот). Предпоследний остаток цистеина в С-концевом отрезке, видимо, очень существен для полимеризации пентамера J-цепью. У связанного с мембраной IgM имеется другая С-концевая последовательность из 41 остатка. Из них 25 принадлежат трансмембранному отрезку из гидрофобных аминокислот. Вслед за ним идет участок из нескольких полярных аминокислот, которым молекула прикрепляется к плазматической мембране [47].

На основе филогенетических, эволюционных и иммунохимических данных IgM можно рассматривать как наименее изменчивый класс иммуноглобулинов. Мю-цепи различных видов имеют большую антигенную общность, чем гамма-, альфа-, каппа- или лямбда-цепи, что подтверждается сравнением соответствующих аминокислотных последовательностей. Например, гомология мю-цепей собаки и человека достигает 81%, тогда как для последовательностей гамма-, каппа- или лямбда-цепей эта величина составляет лишь примерно 60% [48, 49].

7.7. IgE

Имуноглобулины E содержатся в сыворотке лишь в очень небольших количествах, однако они являются главным классом иммуноглобулинов, подготавливающим тучные клетки и базофилы к участию в аллергических реакциях. К этим клеткам молекулы IgE прикрепляются своими Fc-областями. Когда несколько молекул IgE связывают антиген, тучные клетки или базофилы получают сигнал к секреции вазоактивных аминов и других фармакологически активных веществ. Зачем собственно эта система нужна организму, не совсем ясно. Возможно, что стимуляция комплекса IgE-тучные клетки помогает предохранять организм от паразитов, поскольку освобождаемые при этом медиаторы способны привлекать эозинофилы [50].

Молекулярная масса IgE равна примерно 190 000. Эти молекулы содержат около 12% углеводов. Эпсилон-цепи по своим размерам сходны с мю-цепями, и обе они имеют по четыре постоянных домена и один вариабельный (в целом около 550 аминокислотных остатков). У тяжелых цепей эпсилон-класса нет карбоксиконцевого нондекапептидного «хвоста», который имеется у мю- и альфа-цепей.

Полная последовательность С-области эпсилон-цепи человека показана на рис. 7.17 [51]. Эти цепи имеют 13 полуцистиновых остатков, шесть из которых образуют внутрицепьевые дисульфидные связи в четырех константных доменах. Три из других полуцистиновых остатков участвуют в межцепьевых связях (L-N у Cys-128 или Cys-129; H—H у Cys-231 и Cys-318). Дополнительная внутрицепьевая связь, локализованная в $C_{\epsilon}1$, образуется между Cys-129 (или 128) и Cys-215. Подобная связь имеется еще только в альфа-цепях человека.

Локализация связей между тяжелыми цепями в двух различных участках (между $C_{\epsilon}1$ и $C_{\epsilon}2$ и между $C_{\epsilon}2$ и $C_{\epsilon}3$) характерна лишь для ϵ -цепей. Углеводные компоненты расположены в различных местах молекулы. Все шесть олигосахаридных цепей прикрепляются к остаткам аспарагина, одна — к месту соединения V- и С-областей, одна в $C_{\epsilon}1$, одна в области между $C_{\epsilon}1$ и $C_{\epsilon}2$, еще одна в $C_{\epsilon}2$ и две в $C_{\epsilon}3$.

Способность IgE связываться с клетками обратимо снимается восстановлением дисульфидных связей в молекуле. Прогревание IgE при 56 °C также инактивирует цитотропную активность, что совпадает с одновременной потерей антигенных детерминант в $C_{\epsilon}3$ и $C_{\epsilon}4$. Очевидно, что именно этим доменам принадлежит наиболее важная роль в осуществлении указанных функций молекул IgE [52].

Вариабельная область — Константная область

область — T — C₁

Легкая цепь — S

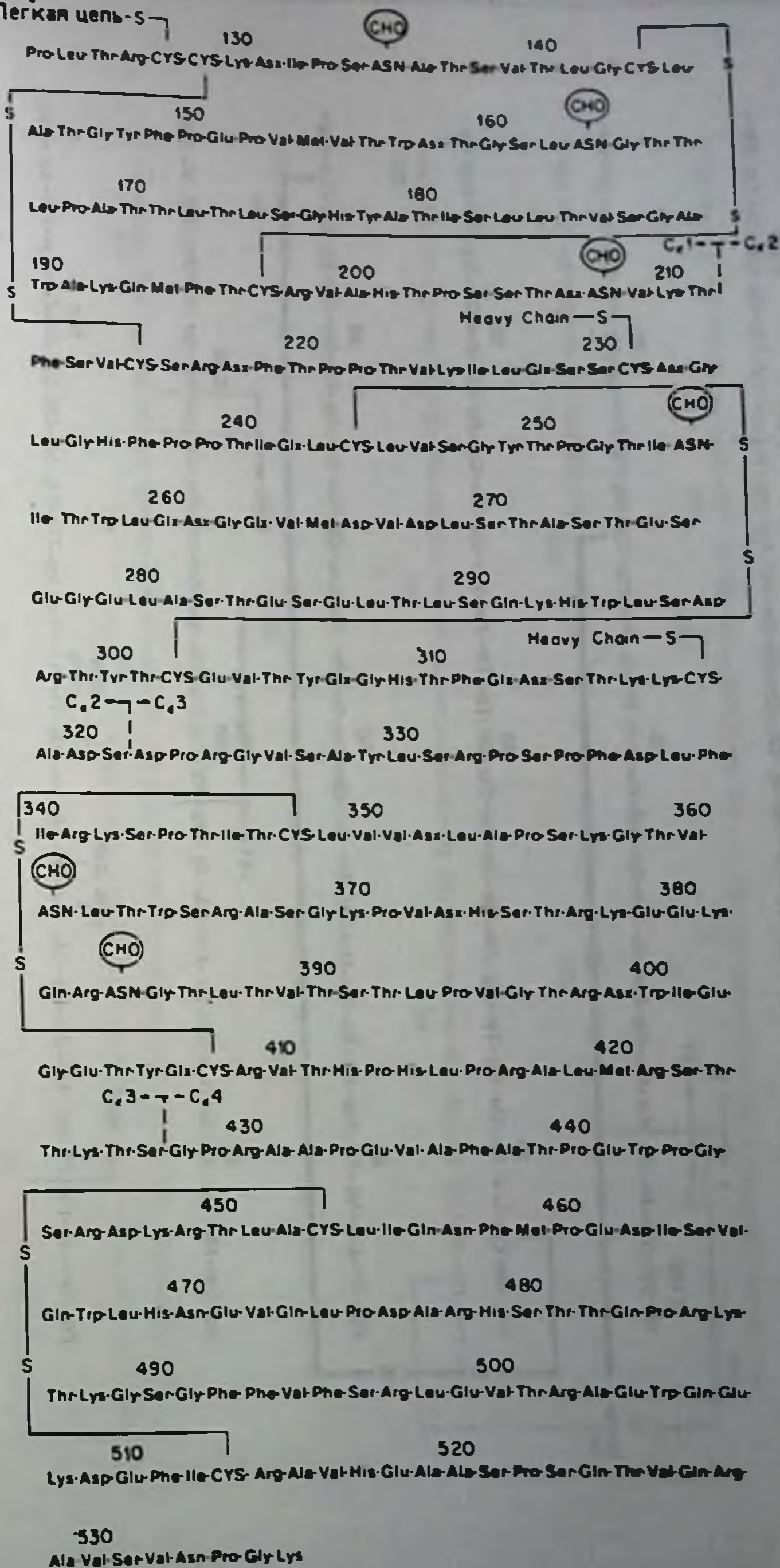


Рис. 7.17. Аминокислотная последовательность константной области тяжелой эпислон-цепи человека [51].

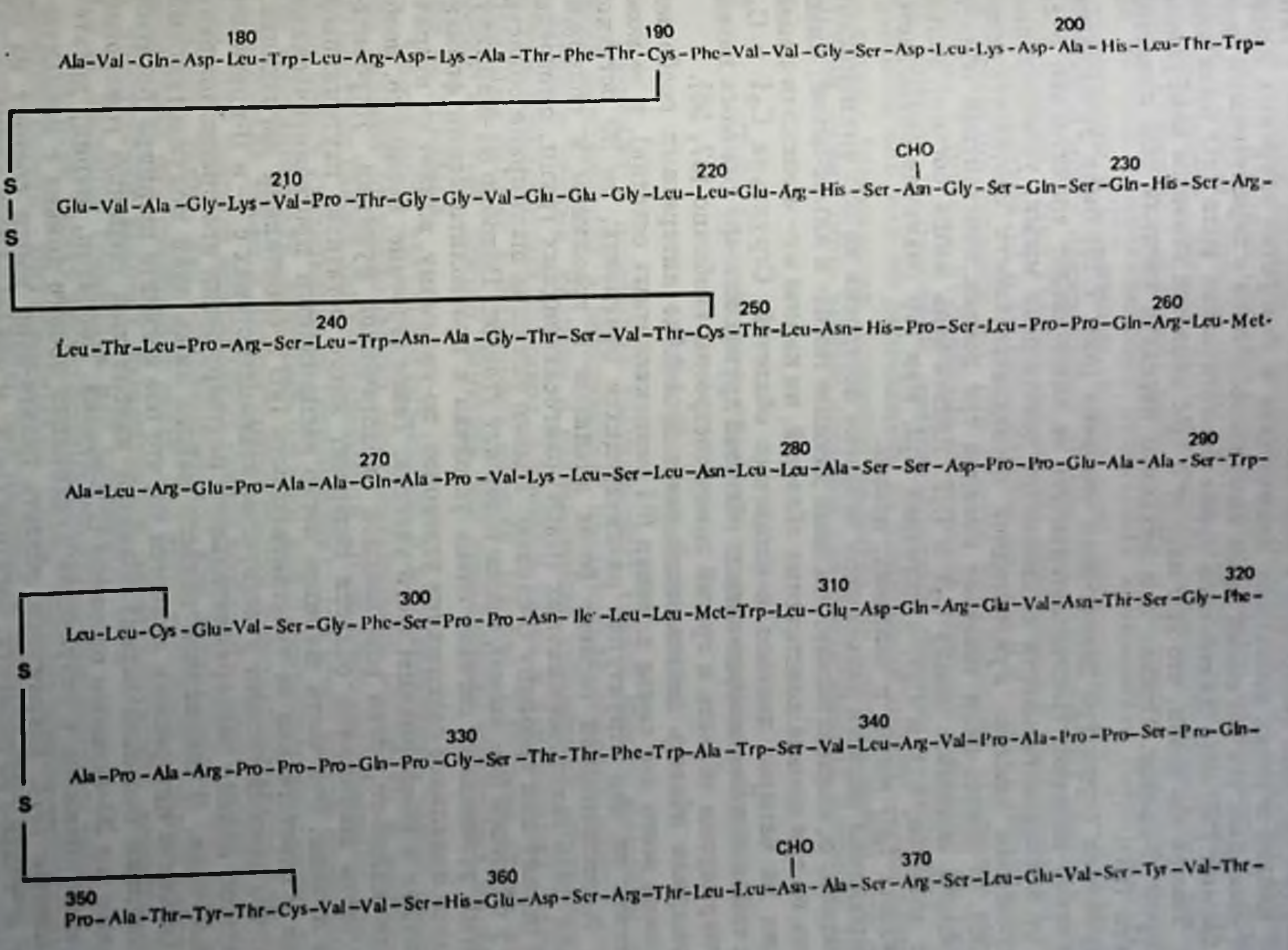
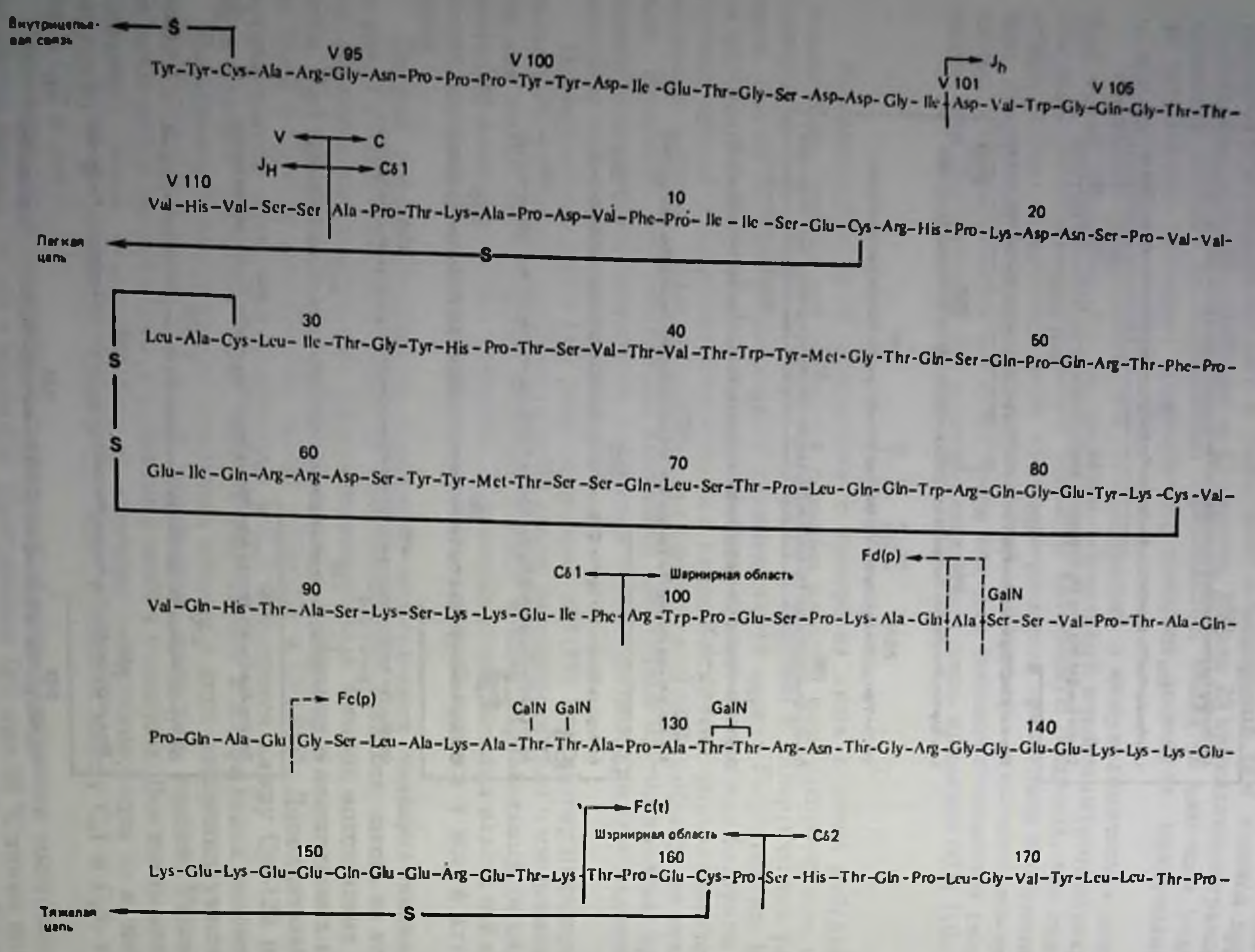


Рис. 7.18. Аминокислотная последовательность константной области дельта-цепи человека [57, 58].

7.8. IgD

Впервые IgD был обнаружен в виде необычного меломного белка, а затем он был найден в очень небольших количествах в сыворотке здоровых людей, и стало очевидно, что это новый класс иммуноглобулинов с характерными тяжелыми цепями [53, 54]. Длительное время биологическая роль IgD была неизвестна. Теперь мы знаем, что IgD наряду с IgM является главным мембранным рецептором В-клеток. Однако сам механизм передачи сигнала еще предстоит выяснить [55].

Первичная структура дельта-цепи человека (рис. 7.18) была установлена относительно недавно. Последовательность ее аминокислот значительно отличается от последовательности аминокислот дельта-цепи мыши, установленной по результатам анализа нуклеотидной последовательности соответствующей ДНК [56]. В дельта-цепи человека имеются три домена константной области с шарнирной областью между $C_{\delta}1$ и $C_{\delta}2$. Дельта-цепь мыши состоит только из двух доменов, $C_{\delta}1$ и $C_{\delta}3$, с делецией $C_{\delta}2$. Как это различие сказывается на функциях IgD мыши и человека, неясно.

Константная область дельта-цепи человека построена из 383 аминокислотных остатков, и, следовательно, эти цепи длиннее гамма- и альфа-цепей, имеющих лишь по три домена константных областей, но короче мю- и эпсилон-цепей, состоящих из четырех доменов константных областей. Структура $C_{\delta}1$ и $C_{\delta}2$ сходна с таковой доменов константных областей других классов тяжелых цепей, однако шарнирная область и третий домен построены необычно [57, 58].

Шарнирная область дельта-цепей имеет несколько интересных особенностей. Прежде всего она самая длинная (64 аминокислотных остатка), и ее можно разделить на два структурно различающихся фрагмента, по 30 остатков каждый. Аминоконцевой сегмент богат аланином и треонином и содержит четыре или пять галактозаминных (GalN) олигосахаридных групп, присоединенных к серину или треонину O-связью. Только еще одна шарнирная область, а именно у $\alpha 1$ -цепей (см. выше), также содержит углевод. Подобно $\alpha 1$ -шарниру, этот богатый углеводами сегмент очень устойчив к протеолитическим ферментам. Высокое локальное содержание углеводов, по-видимому, влияет на вторичную структуру и конформацию этого участка. Такое строение, возможно, необходимо для какой-то, пока еще неясной биологической функции. Карбокси-концевая часть шарнирной области содержит много остатков глутаминовой кислоты и лизина. Эта часть шарнира легко расщепляется протеолитическими ферментами и ответственна за чувствительность IgD к спонтанной деградации. Возможно, что данный сегмент участвует во взаимодействиях с Т- и В-клетками и макрофагами, однако экспериментального подтверждения это предположение пока не получило. В шарнирной области найден лишь один полуцистиновый остаток. Наиболее интересным является то, что оба сегмента шарнира (богатый GalN и имеющий большой заряд) обладают наибольшей степенью гомологии (33%) с таким же 30-членным отрезком $C_{\mu}2$ -домена. Вероятно, шарнир дельта-цепей человека появился в результате дубликации общего домена с последующими мутациями [57]. Шарнирная область дельта-цепи мыши состоит из 35 остатков, т. е. только из сегмента, богатого GalN, и, следовательно, шарнирные области IgD человека и мыши могли приобрести различные биологические функции в ходе эволюции.

Для $C_{\delta}3$ -домена дельта-цепей также характерны необычная последовательность и высокое содержание углеводов. На основе гомологии с иммуноглобулинами, пространственная структура которых уже известна, можно предполагать,

какие участки $C_{\delta 3}$ участвуют в формировании бета-складчатых слоев. Участки цепей между бета-сегментами образуют петли на «передних» и «задних» концах домена; они содержат много пролина, т. е. аминокислоты, имеющей тенденцию изменять направление полипептидной цепи. В тяжелых цепях других классов остатки пролина в аналогичных положениях не найдены. Возможно, что остатки пролина создают особую конформацию поверхности $C_{\delta 3}$ -домена, отличную от той, которую имеют другие карбоксиконцевые домены. Эта гипотеза, разумеется, должна быть проверена рентгеноструктурными исследованиями. Углеводы $C_{\delta 3}$ -домена расположены в не совсем обычном положении. Два из трех глюкозаминных углеводных компонентов (GlcN) дельта-цепей локализованы в $C_{\delta 3}$ -домене, и еще один расположен в $C_{\delta 2}$ — в положении, идентичном месту прикрепления углеводов в гомологичных доменах гамма- и эpsilon-цепей. Один углевод $C_{\delta 3}$ -домена прикреплен к протяженному отрезку между сегментами 3-1 и 4-4 бета-складчатого слоя и к остатку аспарагина в карбоксиконцевом сегменте 3-3. Эти участки прикрепления углеводов не имеют аналогии с другими Fc-доменами (положение отрезков показано на рис. 7.3). Как именно расположены олигосахаридные цепочки — выдаются ли они в растворитель или же расположены на поверхности домена, — еще неизвестно. Поскольку локализация углеводов необычна, то предполагается, что их присутствие может иметь важное значение для биологических функций IgD [58].

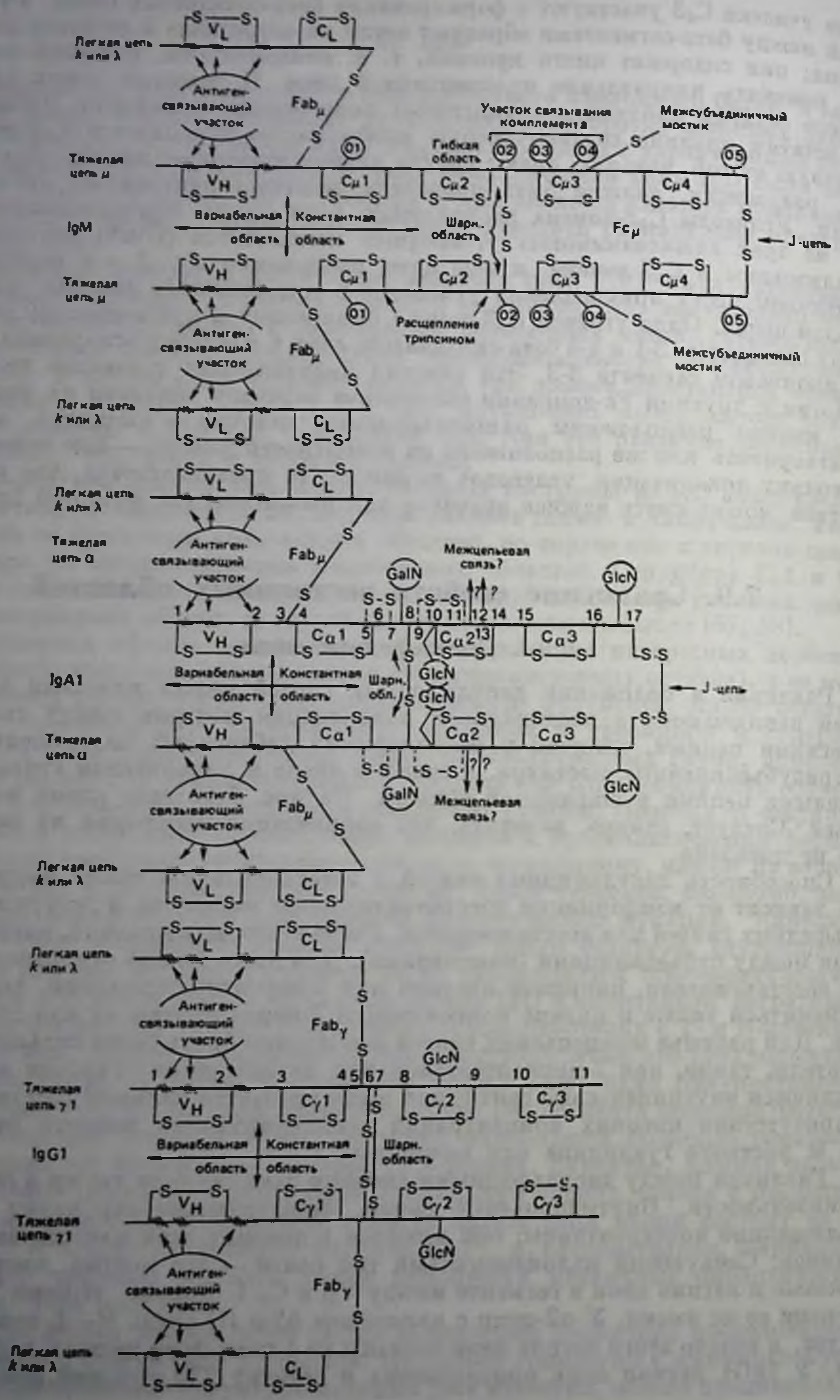
7.9. Сравнение свойств постоянных областей

7.9.1. Дисульфидные связи

Различия в положении дисульфидных связей между классами тяжелых цепей заключаются в неодинаковой локализации мостика между тяжелыми и легкими цепями, наличии и расположении добавочных внутрицепевых и внутрисубъединичных мостиков, а также в числе и локализации связей между тяжелыми цепями в шарнирной области. На рис. 7.19 дана схема всех этих связей. Следует, однако, заметить, что локализация некоторых из них точно еще не доказана.

Способность дисульфидных связей к восстановлению также неодинакова. Она зависит от конформации восстанавливаемой молекулы и доступности дисульфидных связей для восстановления. Легче всего, как правило, разрываются связи между субъединицами (мономерами). Для этого можно использовать слабые восстановители, например цистеин или 2-меркаптоэтанол, хотя могут применяться также и низкие концентрации 2-меркаптоэтанола или дитиотрептола. Для разрыва межцепевых связей необходимо брать более сильные восстановители, такие, как 2-меркаптоэтанол или дитиотрептол. Труднее всего расщепляются внутрицепевые связи; для этого требуется сильный восстановитель в присутствии высоких концентраций денатурирующих веществ (например, в 5 М растворе гуанидина или мочевины).

Различия между дисульфидными связями заключаются также в степени их вариабельности. Внутрицепевые связи, формирующие структуру доменов, эволюционно консервативны; они имеются в доменах всех классов иммуноглобулинов. Следующий малозменчивый тип связи — это мостик, соединяющий тяжелые и легкие цепи в сегменте между V_H и $C_H 1$. Только $\gamma 1$ -цепи и $\alpha 2A 2m$ (1)-цепи ее не имеют. У $\alpha 2$ -цепи с аллотипом A2m (1) связь H—L совсем отсутствует, а вместо этого легкие цепи связаны не с тяжелыми цепями, а друг с другом. У IgG1 легкая цепь присоединена к остатку 220 $\gamma 1$ -цепей между $C_H 1$ и



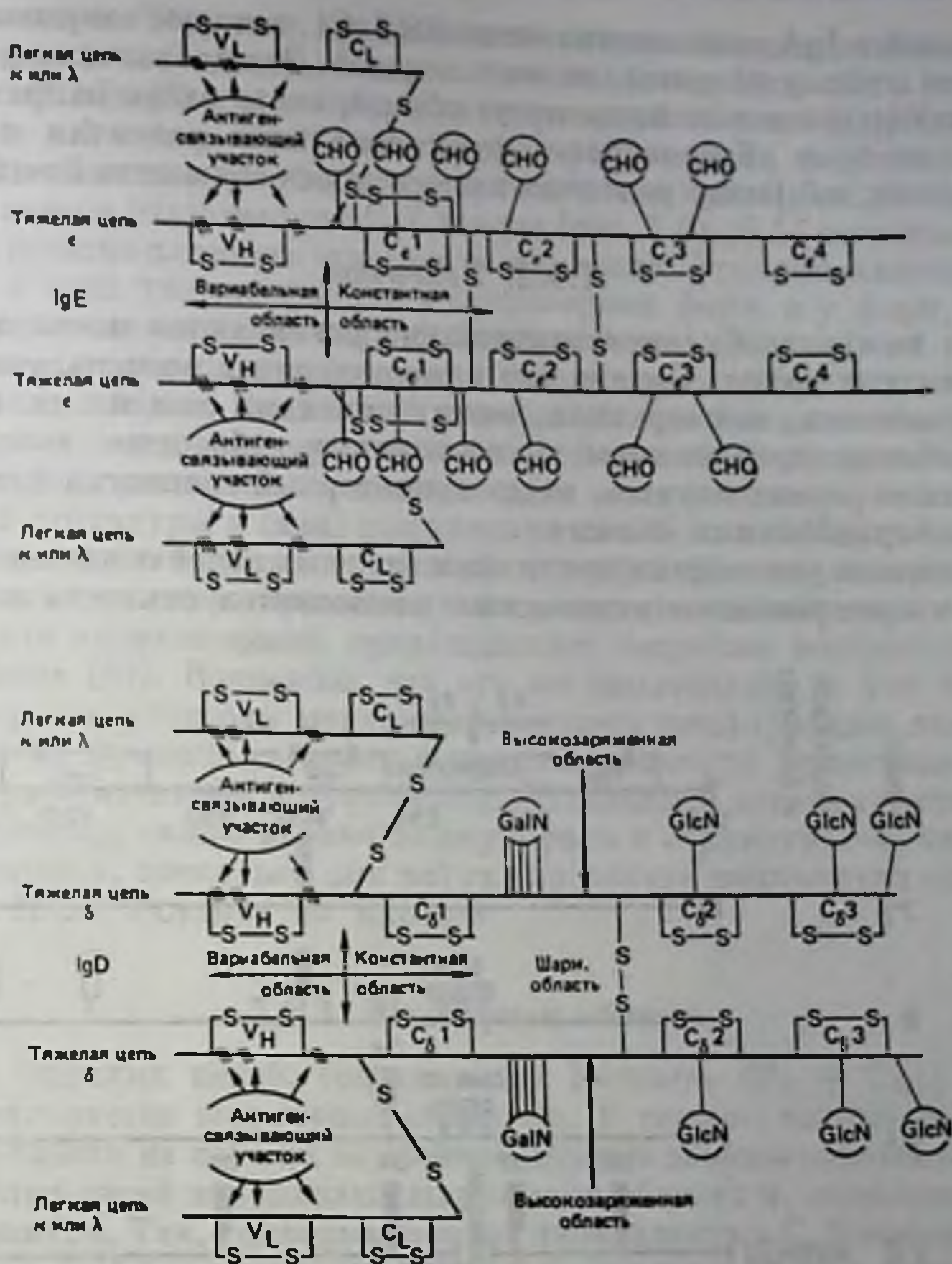


Рис. 7.19. Схематическое изображение пяти классов иммуноглобулинов человека. Показаны расположение дисульфидных свя-

зей и локализация углеводов для каждой молекулы. Схемы IgM, IgG и IgA взяты из работы Патнема [16].

СН2. Как уже говорилось, согласно трехмерным моделям IgC1, остаток 220 находится в достаточной близости к остатку, участвующему в белках других классов и подклассов в образовании дисульфидной связи, что позволяет ему также образовывать дисульфидный мостик с легкой цепью, не нарушая укладку полипептидной цепи.

Связи между тяжелыми цепями варьируют в большей степени. Всего может быть от одной до пятнадцати дисульфидных связей между двумя тяжелыми цепями у одной молекулы иммуноглобулина. Молекулы IgE несколько необычны в этом отношении, поскольку у них две дисульфидные связи разделены C₂-доменом.

Дисульфидные связи между субъединицами и J-цепью имеются лишь у полимерных иммуноглобулинов (IgA и IgM). Очень важную роль для процесса сборки мономеров в полимерные молекулы играет остаток Cys-575.

Наконец, следует упомянуть о некоторых необычных дисульфидных связях: одной в IgE и двух в IgA. Положение добавочных внутривцепевых дисульфидных связей:

фидных связей в IgA гомологично остаткам IgC1, которые закрыты углеводным компонентом лишь у $\gamma 1$ -цепей, но не у α -цепей. Эти добавочные дисульфидные связи на поверхности молекулы могут образовывать очень напряженную конформацию, которая обуславливает функциональные различия между гамма- и альфа-цепями, например различия в способности связывать комплемент.

7.9.2. Углеводы

Классы иммуноглобулинов значительно различаются по числу и локализации углеводных групп. Однако ряд олигосахаридов располагается в гомологичных положениях, как правило, между доменами или на их поверхности. Углеводы обычно прикреплены к постоянным областям тяжелых цепей, за исключением редких случаев, когда акцепторный трипептид Asn-X-Ser (Thr) имеется и в вариабельных областях.

Расположение углеводных групп семи тяжелых цепей показано на рис. 7.20. Гомология в прикреплении углеводных компонентов отмечена зачерненными

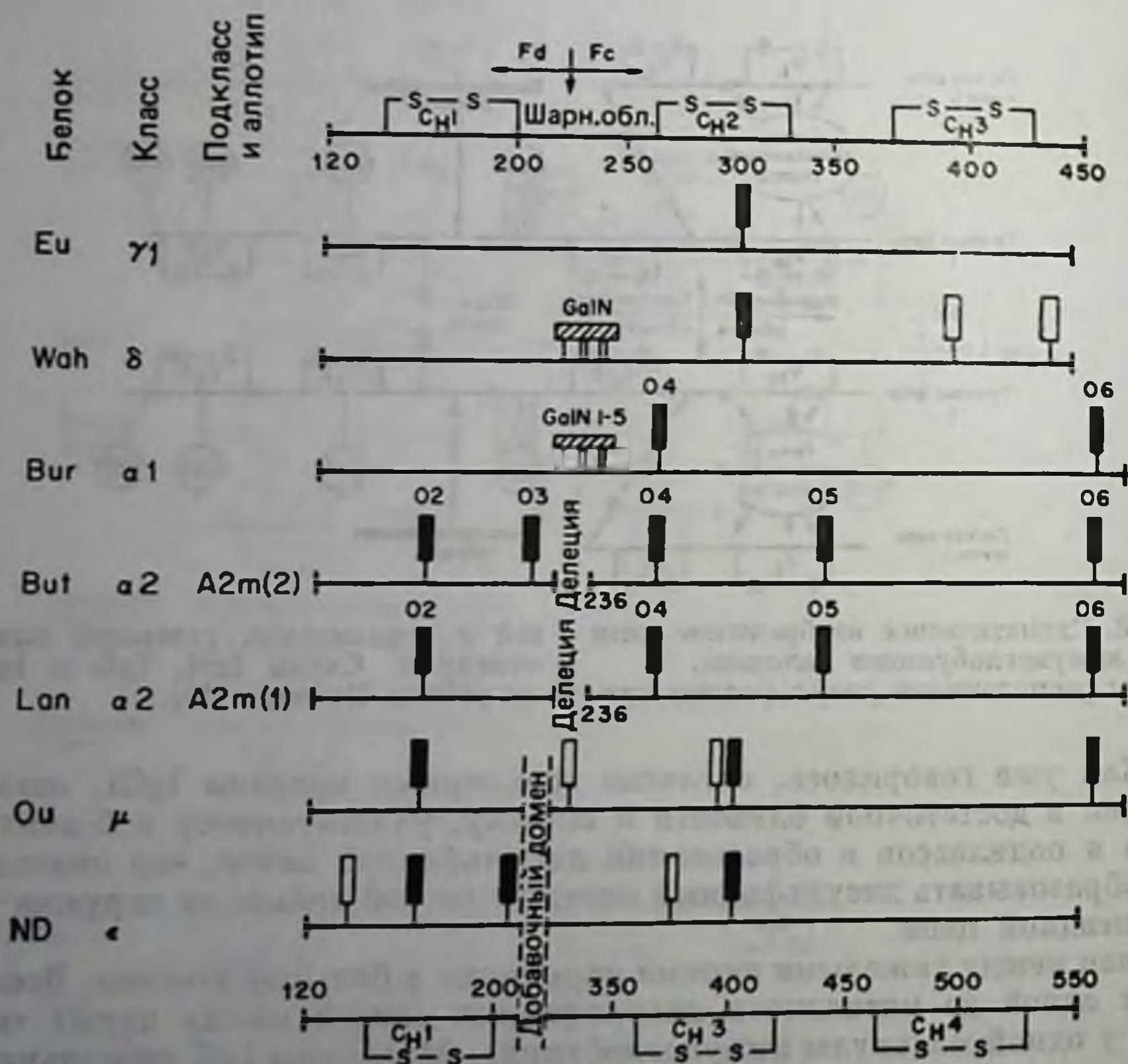


Рис. 7.20. Локализация углевода в тяжелых цепях иммуноглобулинов человека. Глюкозаминные олигосахариды обозначены вертикальными прямоугольниками; положения олигосахаридов, гомологичные у двух или более цепей, зачернены; положения углевода, характерные лишь для одной из цепей,

не закрашены. Горизонтальными заштригованными прямоугольниками показана локализация галактозаминных олигосахаридов. Верхний масштаб приведен для остатков верхних пяти цепей, а нижний — для мю- и эpsilon-цепей ([59], с некоторыми изменениями).

прямоугольниками. Торано и др. [59] описали пять гомологичных положений иммуноглобулинов человека: а) в первом константном домене $\alpha 2$, μ и ϵ ; б) породо найдены в $\alpha 1$ - и δ -цепях, GlcN-компоненты — в μ -цепях); г) 40 остатков в первом домене Fc-области в $\gamma 1$ -, δ -, μ - и ϵ -цепях, т. е. в $C_{\gamma 2}$, $C_{\delta 2}$, $C_{\mu 3}$, $C_{\epsilon 3}$; в гамма-цепях этот углевод разделяет два $C_{\gamma 2}$ -домена (рис. 7.9); д) 14 остатков от карбоксиконцевого остатка длинного «хвоста» α - и μ -цепей. Этот дополнительный отрезок имеется в этих тяжелых цепях у секреторных форм, а у форм, связанных с мембранами, он замещен на гидрофобный сегмент.

Часто места прикрепления углеводов гомологичны у сходных классов тяжелых цепей разных видов. Единичный углевод $\gamma 1$ -цепи человека находится в том же положении, как и у некоторых гамма-цепей мыши, кролика и морской свинки, что, очевидно, указывает на важную роль этого компонента в поддержании определенной структуры и (или) выполнении какой-то иной функции. По-видимому, углеводы играют роль в транспорте и секреции гликозилированных белков. Подавление гликозилирования полипептидных цепей, таких, например, как альфа- или эpsilon-цепей, предотвращает секрецию соответствующих иммуноглобулинов [60]. Возможно, что это же справедливо и для гамма-цепей. С другой стороны, углеводы могут поддерживать конформацию доменов, необходимую для их функции, а также защищать молекулу от деградации, закрывая места, чувствительные к протеолизу. Углеводы в негомологичных положениях, по-видимому, также играют важную роль в структурно-функциональных взаимоотношениях, поскольку они могут определять индивидуальные функциональные свойства каждого из классов.

7.9.3. Шарнирная область

Сегмент тяжелых цепей, соединяющий Fd-часть ($V_H + C_H 1$) с Fc-частью молекулы, называется шарнирной областью. У гамма-, альфа- и дельта-цепей шарнирные области не похожи на домены. Вторые домены константных областей у μ - и ϵ -цепей напоминают шарнирные области и, возможно, служат их предшественником. Так, конформационная лабильность в $C_{\mu 2}$ -домене выявляется при инкубации IgM с протеолитическими ферментами как при денатурирующих

Таблица 7.3. Структурные характеристики тяжелых цепей иммуноглобулинов человека

Вся цепь		Константная область					
цепь	домены	междоменные мостики	положение H-L-мостика	олигосахариды		число остатков (приблизительно)	
				GlcN	GalN	в шарнирной области	в константной области
$\gamma 1$	4	3	220	1	0	15	330
$\gamma 2$	4	5	131	1	0	12	325
$\gamma 3$	4	12	131	1	0	62	375
$\gamma 4$	4	3	131	1	0	14	325
$\alpha 1$	4	5	133	2	5	26	350
$\alpha 2 A 2 m (1)$	4	4	Утерян	4	0	13	340
$\alpha 2 A 2 m (2)$	4	5	133	5	0	13	340
μ	5	4	140	5	0	0	450
ϵ	5	3	127	6	0	0	420
δ	4	2	128	3	4 или 5	64	380

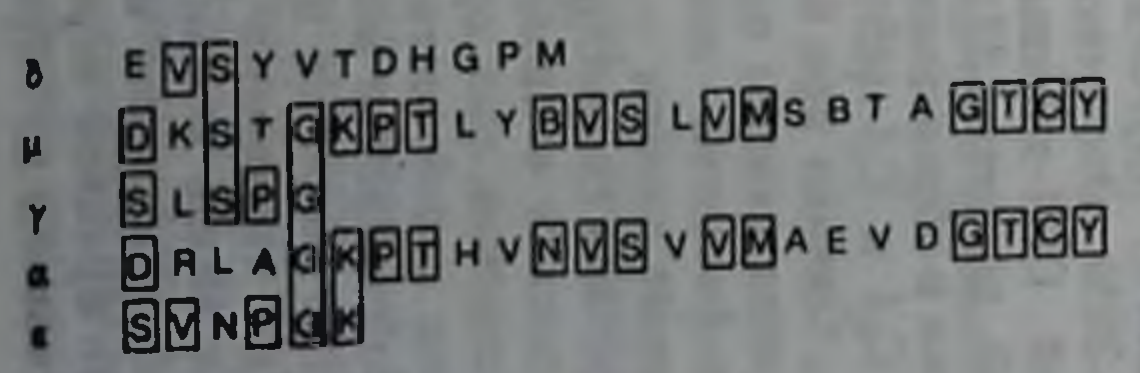
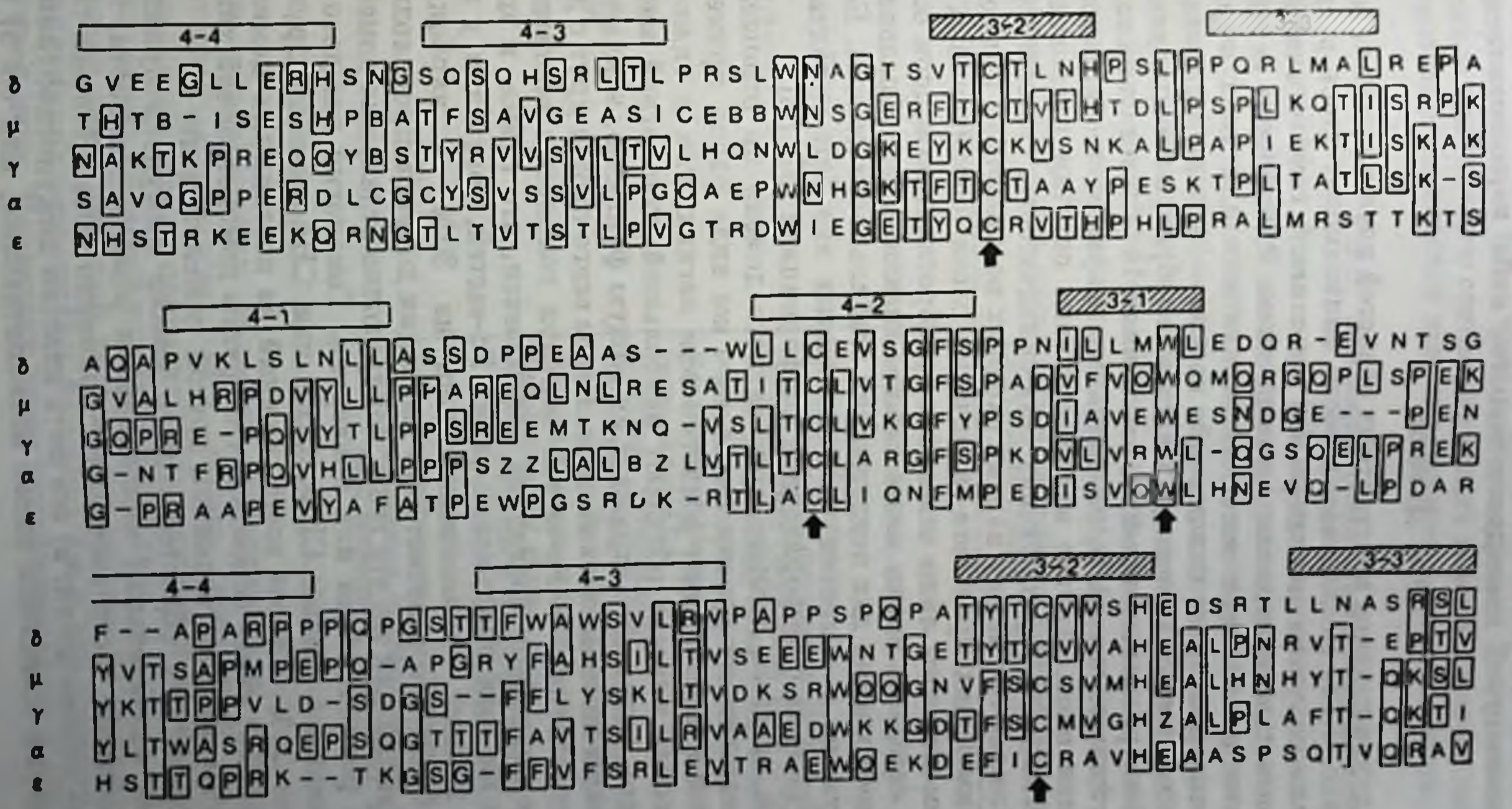
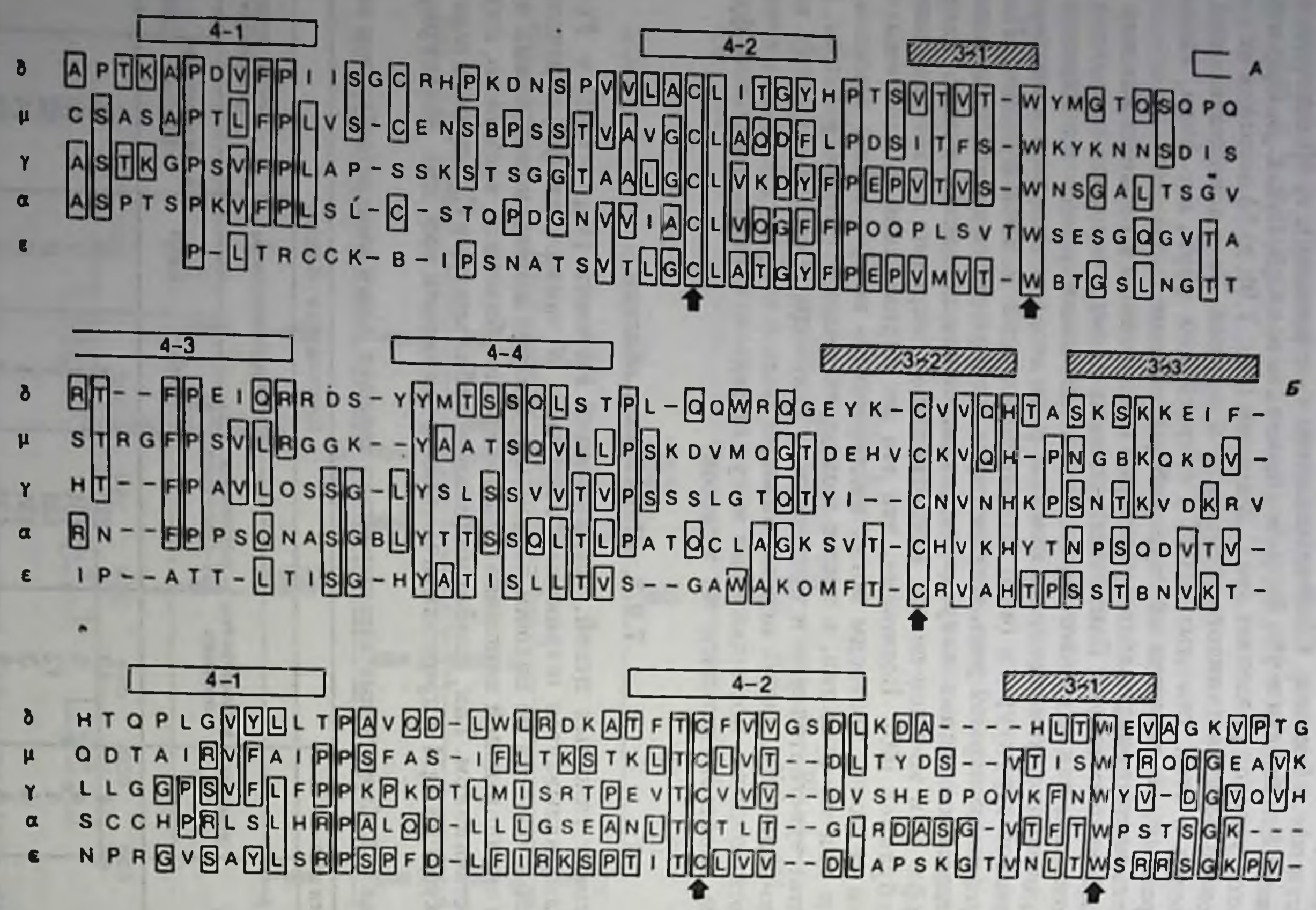


Рис. 7.21. Сравнение аминокислотных последовательностей C11-домена (А) и Fe-области (Б) пяти классов иммуноглобулинов человека. Пропуски введены для получения максимальной гомологии. Инвариантные остатки цистеина (C) и триптофана (W) в каждом домене отмечены стрелками. Обведены остатки, идентичные в двух или более цепях. Участки с бета-складчатостью в четырехсегментных слоях обозначены незаштрированными и в трехсегментных слоях заштрихованными прямоугольниками. Использована нумерация участков с бета-складчатостью согласно Эдмундону ([57, 58]; печатается с разрешения).

так и неденатурирующих условиях. При этом можно получить Fab- и Fc-фрагменты, однако середина тяжелой цепи при протеолизе разрушается.

У каждого класса тяжелых цепей шарнирная область имеет своеобразное строение и заметно отличается даже у представителей разных подклассов (табл. 7.3). Структурные особенности каждой из шарнирных областей уже обсуждалась. Здесь же следует лишь упомянуть, что они представляют собой самую переменную часть тяжелых цепей и, следовательно, обуславливают функциональные различия между классами иммуноглобулинов, либо наличием определенной аминокислотной последовательности, либо варьированием сегментной гибкости.

7.9.4. Домены

Первичная структура доменов константных областей пяти классов тяжелых цепей показана на рис. 7.21. Последовательности аминокислот здесь расположены так, чтобы была получена максимальная гомология; гомологичные сегменты с бета-складчатостью обозначены согласно схеме Эдмундсона и др. [6]. Наибольшее внимание привлекают остатки, одинаковые для всех классов. В CH1 имеется 10 инвариантных положений, восемь — в первом домене Fc и девять — в карбоксиконцевом домене. Два цистеина, образующие дисульфидную связь, и триптофан, расположенный на расстоянии 14—16 остатков от первого цистеина, присутствуют всегда и, по-видимому, формируют ядро домена в процессе свертывания цепи. Другие малоизменяемые остатки расположены главным образом в сегментах, формирующих бета-складчатость. Замены в этих сегментах обычно наблюдаются между парами сходных по свойствам аминокислот. У сегментов, занимающих края бета-складчатых слоев (обозначенных как 4-4 и 3-3, рис. 7.3), гомологичны лишь отдельные, разбросанные по цепи остатки. По-видимому, эти сегменты имеют менее важное значение для образования водородных связей, необходимых для поддержания стабильности домена. Большинство замен обнаружено в областях, расположенных вне бета-складчатых слоев, в частности в участках с беспорядочной конформацией [57, 58].

Степень гомологии каждого данного константного домена по отношению к любому другому константному домену белка того же вида равна примерно 25—30%. Это относится к постоянным областям как легких, так и тяжелых цепей. CH1-домены разных классов обладают наибольшей гомологией между собой, достигая 33%, что, возможно, отражает их общую функцию, заключающуюся в образовании пары доменов легкой цепи. Более всего схожи друг с другом C_γ1 и C_ε1 (45% гомологии). У Fc-частей молекул гомология составляет 30%. Однако при более подробном сравнении оказывается, что гамма- и эpsilon-цепи сходны почти на всем протяжении своих Fc-частей, тогда как у мю- и альфа-цепей одни домены гомологичны лишь на 20%, а карбоксиконцевые домены — на 50%. Это означает, что эволюция доменов происходила при разной скорости мутаций или же что гены, кодирующие отдельные домены, участвовали в процессе рекомбинации или конверсии. Гомология каждого из CH1-доменов при сравнении с любым CH2-, CH3- или CH4-доменом других четырех цепей составляет 25%. Скорее всего, каждый из постоянных доменов эволюционировал независимо; менее вероятно, что группа доменов одной тяжелой цепи является прямым предшественником другой тяжелой цепи.

При сравнении константных областей одного класса иммуноглобулинов разных видов выявляется значительная эволюционная консервативность, поскольку гомология по большей части составляет примерно 60%. Отсюда следуют по крайней мере две возможности: а) все пять классов иммуноглобулинов существовали до образования известных видов млекопитающих, или же б) ге-

вы-предшественники эволюционировали у каждого вида в сторону выполнения сходных функций и в результате функциональных ограничений должны были привести к закреплению определенной структуры. Как уже указывалось, IgM менее всего изменчивы и обнаруживают 80%-ную гомологию при сравнении последовательностей тяжелых цепей человека, собаки и мыши. Очевидно, что ограничения, накладываемые функцией IgM, выражены более всего по сравнению с другими классами иммуноглобулинов.

Гомология цепей подклассов одного класса иммуноглобулинов, как правило, составляет от 60 до 90% или даже более. Это указывает на сравнительно недавнюю дубликацию соответствующих генов у каждого вида. Очевидно также, что развитие подклассов шло независимо у разных видов.

7.9.5. Эволюция генов иммуноглобулинов

Еще в 1966 г. Хилл и др. [61] предположили, что в ходе эволюции белков семейства иммуноглобулинов происходила дубликация генов. Анализируя первую полученную последовательность аминокислот одного иммуноглобулина, Эдельман и Голл [62] в 1969 г. выдвинули предположение, что иммуноглобулины построены из дискретных гомологичных субъединиц (доменов), каждая из которых возникла от общего предшественника и затем эволюционировала в направлении выполнения определенной биологической функции (табл. 7.4).

Таблица 7.4. Сводка имеющихся к настоящему времени данных о функции доменов иммуноглобулинов С человека

Домены	Функция
$V_H + V_L$	Связывание антигена
$C_{H1} + C_1$	Нековалентное соединение H- и L-цепей Нековалентное соединение H- и L-цепей «Вставка» между областями, ответственными за связывание антигена и эффекторные функции
C_{H2}	Ковалентное соединение H- и L-цепей Связывание C1q
C_{H3}	Контроль катаболизма
$C_{H1} + C_{H3}$	Взаимодействие с Fc-рецепторами макрофагов и моноцитов Нековалентное связывание H-цепей Взаимодействие с белком А <i>Staphylococcus aureus</i> Взаимодействие с Fc-рецепторами на а) синцитиотрофобластах плаценты, б) нейтрофилах, в) цитотоксических К-клетках, г) кишечных эпителиальных клетках (у новорожденных животных некоторых видов)

Гены переменных областей дивергировали относительно рано от генов константных областей. На основе различной интерпретации данных о гомологии можно построить различающиеся варианты схемы эволюции генов константных областей тяжелых цепей (рис. 7.22) [58, 63]. Предковый ген, кодирующий белок, равный по размеру домену, на первом этапе дублировался, и дубликация повторялась на этапах 2 и 3, что привело к появлению первичной тяжелой цепи. Последняя затем дублировалась с образованием предшествен-

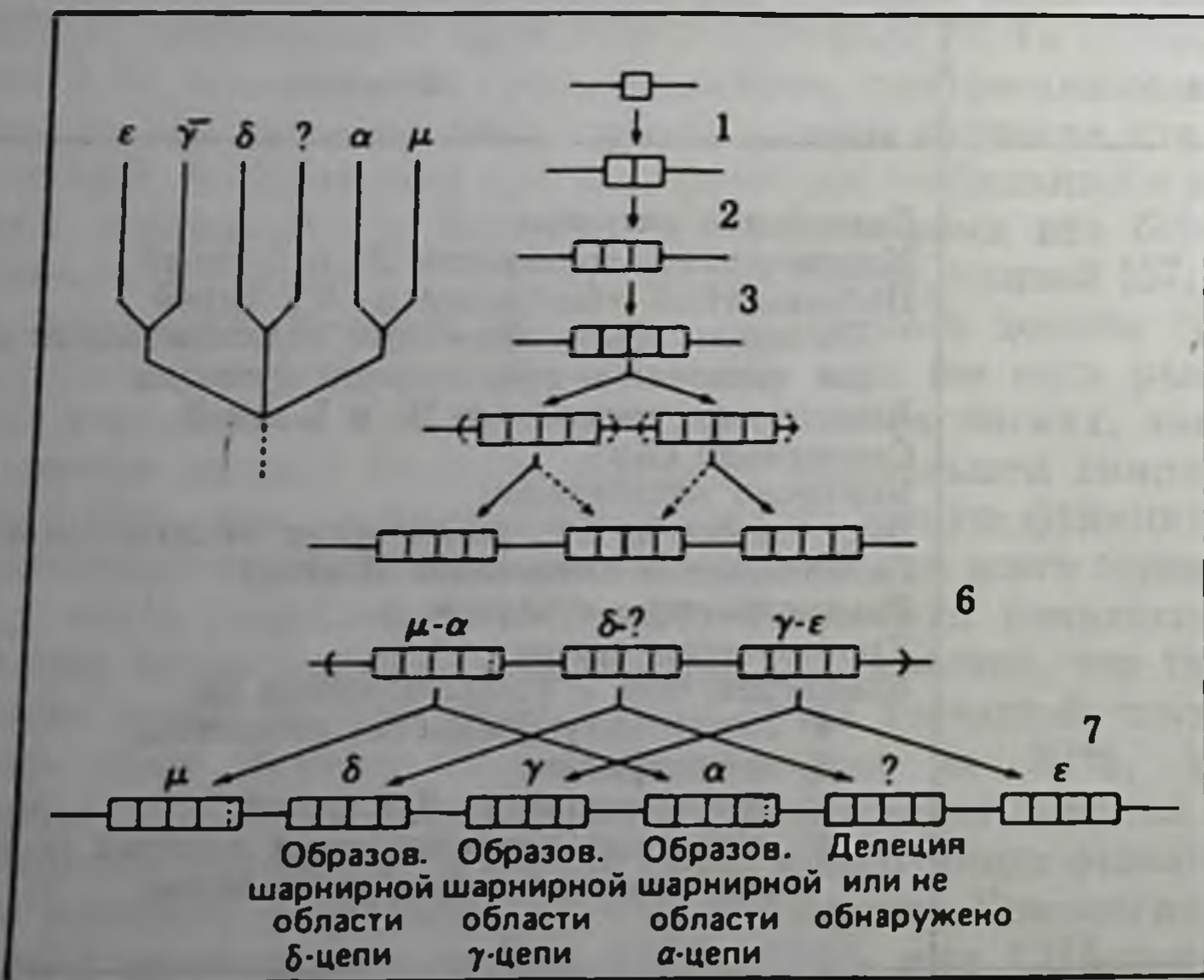
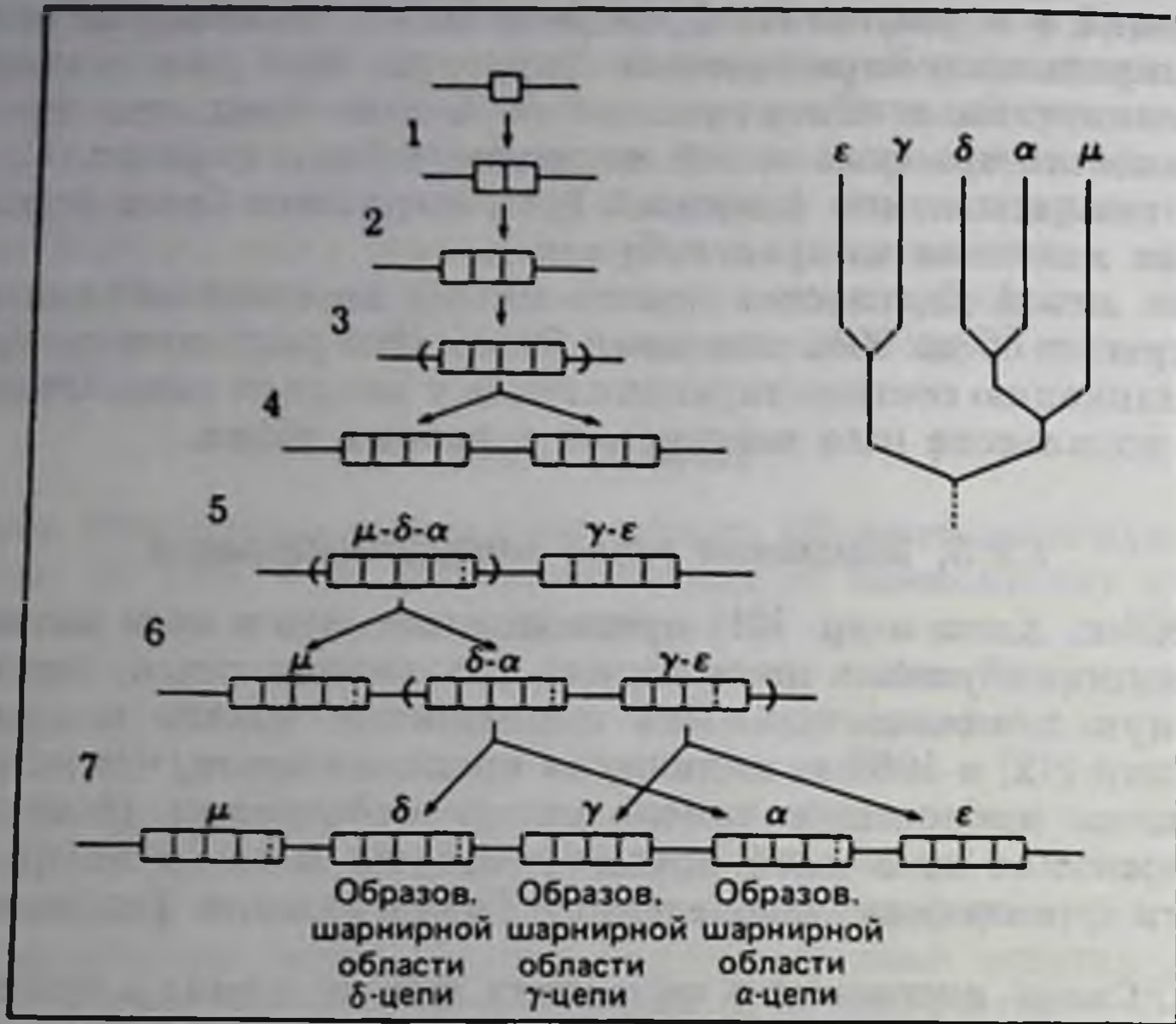


Рис. 7.22. Две гипотетические схемы возможного генетического развития, приведшего к образованию группы генов константных областей тяжелых цепей. Каждый прямоугольник обозначает домен константной области. Внутренняя дупликация доменов, приводящая к появлению удли-

ненных С-генов, показана неразветвленной стрелкой. Дупликация части генома с образованием новых С-генов обозначены скобками и разветвленными стрелками. Сбоку показано эволюционное дерево для каждой из схем ([58]; печатается с разрешения).

ника цепей мю, дельта и альфа и предшественника цепей гамма и эпсилон, и, как показано на схеме, каждый из них вновь дублировался и затем дивергировал с образованием генов, кодирующих соответствующие цепи. Все эти события происходили на одной хромосоме для генов тяжелых цепей. На ранних этапах эволюции предковый генный комплекс V-C мог быть перенесен на две другие хромосомы, которые стали нести информацию для двух классов легких цепей — каппа и лямбда. Гены константных областей лямбда-цепей затем могли дублироваться с образованием разных изотипов.

7.10 Структурные особенности вариабельных областей

7.10.1. Подгруппы вариабельных областей

Основные принципы построения пептидных цепей иммуноглобулинов были выяснены впервые в нескольких лабораториях при изучении первичной структуры легких цепей. Как выше уже упоминалось, каппа- и лямбда-цепи можно разделить на аминоконцевые вариабельные области (положения 1—108) и на карбоксиконцевую, или константную, область (положения 109—214). Первая

	5	10	15	20	25
V _{KI}	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala				
V _{KII}	_____ Val Leu _____ Leu Ser _____ Pro Val Thr Pro _____ Glu Pro Ala Ser _____ Ser _____ Ser				
V _{KIII}	Glu _____ Val Leu _____ Gly _____ Leu _____ Pro _____ Glu _____ Ala _____ Leu Ser _____				

Рис. 7.23. Последовательность 25 аминоконцевых аминокислотных остатков трех каппа-цепей человека, принадлежащих к трем

основным V_K-подгруппам. Линия указывает на идентичность с последовательностью самой верхней цепи.

сильно различается у разных белков, тогда как вторая почти одинакова у белков одного изотипа. Легкие цепи можно разделить на подгруппы согласно первичной структуре их вариабельных областей.

У каппа-цепей иммуноглобулинов человека различают подгруппы с разными аминокислотными последовательностями аминоконцевых 108 остатков V-области. Для иллюстрации на рис. 7.23 приведены лишь первые 25 остатков. Эти последовательности были установлены в результате изучения первичной структуры более чем 100 вариабельных областей каппа-цепей человека. Следует отметить, что в некоторых положениях (2, 5, 6, 7, 8, 11, 16, 23, 24) каппа-цепи всех трех подгрупп имеют одни и те же аминокислоты. Это так называемые инвариантные остатки; в показанных последовательностях они составляют около трети всех остатков. Столь же выраженное сходство между каппа-цепями всех трех подгрупп указывает на их общее эволюционное происхождение. Заслуживает внимания еще одна структурная особенность: в нескольких положениях (1, 3, 4, 10, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 22, 25) у двух подгрупп имеется одна и та же аминокислота, тогда как в третьей подгруппе — другая. Подобная закономерность отмечается в 13 из первых 25 положений, т. е. примерно в половине этого отрезка. Кроме указанных, подобных замен больше не встречается, и никакие две из трех подгрупп больше общих аминокислотных остатков не имеют. Из сказанного следует, что три подгруппы возникли относительно рано

в процессе эволюции млекопитающих. Среди аминоконцевых 25 остатков только в двух положениях (9 и 13) все три подгруппы имеют разные аминокислоты. Описанные свойства подгрупп V-областей указывают на то, что белки каждой из них кодируются по крайней мере одним гаметным V-геном, поскольку ни одна подгруппа не могла возникнуть только рекомбинацией генов, кодирующих две другие подгруппы.

Еще одна закономерность, выявляющаяся при анализе данных рис. 7.23, — это так называемые «сопряженные» замены. Она по существу лежит в основе определения термина «подгруппа». Например, большинство белков с Gln-Met в положениях 3 и 4 имеют также серин в положении 9, аланин в положении 13,

	5	10	15	20	25
Ag	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala				
Roy	_____				
Au	_____				
Bel	_____ Leu _____				
Gal	_____ Ile _____ Arg _____				
Kuc	_____ Thr Gln Pro _____ Arg _____				
Hau	_____ Arg _____				
Ou	_____ Arg _____				
Dau	_____ Thr Val _____ Asp _____				
Eu	_____ Thr _____ Arg _____				

Рис. 7.24. Аминокислотная последовательность $10V_{\times 1}$ -цепей человека. Остатки, идентичные белку Ag, показаны прямой линией. Приведены лишь остатки, отличающиеся от последовательности белка Ag.

валин в положении 19 и аланин в положении 25. Поэтому можно предсказать последовательность всей V-области, если известно, какие аминокислоты расположены лишь в нескольких положениях.

Аминокислотные различия между членами разных подгрупп V-областей точно установить нельзя, поскольку само определение термина «подгруппа» не является строгим. Однако в системе каппа-цепей человека, где насчитываются три или четыре V-подгруппы, белки одной подгруппы имеют 75% идентичных остатков, тогда как белки разных подгрупп идентичны лишь в 50% положений. У мышей различия между белками подгрупп (в частности, у каппа-цепей) выражены менее четко и вариации как внутри подгрупп, так и между ними не столь определены.

Чтобы показать характер вариаций между V-областями белков одной подгруппы, на рис. 7.24 приведены 25 аминокислотных остатков N-концевых отрезков десяти разных $V_{\times 1}$ -белков. Как можно заметить, вариации по большей части являются случайными за некоторыми лишь исключениями, которые рассматриваются ниже. Сами замены ограничены как с точки зрения генетического кода, гидрофильности и гидрофобности аминокислот, так и размеров и объема боковых цепей аминокислот. Большинство этих ограниченных замен, видимо, относительно мало влияет на общую третичную структуру молекул антител.

Аналогичные исследования последовательности аминокислот у лямбда-цепей человека выявили наличие пяти подгрупп переменных областей; три

или четыре подгруппы описаны также для вариабельных областей тяжелых цепей человека. Характер замен в этих случаях в принципе такой же, и здесь они обсуждаться не будут.

Различия между подгруппами носят изотипический, а не аллотипический характер, поскольку все подгруппы обнаруживаются в сыворотке каждого здорового индивидуума. Поэтому они являются аналогами классов константных областей иммуноглобулинов. Очевидно, что для каппа- и лямбда-цепей человека должно быть минимум от трех (у каппа-цепей) до пяти (у лямбда-цепей) структурных генов вариабельных областей, каждый из которых кодирует последовательность одной из основных подгрупп этих областей.

Кроме различий, характерных для трех главных подгрупп каппа-цепей человека, имеется еще много положений, в которых равновероятно встречаются два аминокислотных остатка. Например, в положении 24 подгруппы $\kappa 1$ примерно у половины белков имеется глутамин, а у другой половины — аргинин (рис. 7.24). Такая замена не является аллельной, так как обе аминокислоты в этом положении обнаружены у всех индивидуумов. Подобного рода данные указывают на существование вариантов внутри подгрупп.

Подгруппы вариабельных областей каппа- и лямбда-цепей отличаются друг от друга, и вариабельные подгруппы каппа-цепи не образуют полную легкую цепь с С-областью лямбда-типа, а вариабельные подгруппы лямбда-цепей не встречаются вместе с С-областью каппа-типа. Как уже указывалось выше, вариабельные области тяжелых цепей также можно разделить на подгруппы, отличающиеся от каппа- или лямбда-подгрупп. Таким образом, все семейство константных областей (каппа-, лямбда- и тяжелые цепи) способно объединяться лишь с определенным набором продуктов генов V-областей [64].

7.10.2. Каркасные и гипервариабельные участки

Вариабельность аминокислотных остатков не распространяется равномерно по всей V-области, а относится лишь к строго определенным ее участкам. Во всех V-областях иммуноглобулинов имеются гипервариабельные участки, которые особенно сильно различаются у разных белков. На рис. 7.25 приведена первичная структура нескольких тяжелых цепей человека, принадлежащих к одной V-подгруппе ($V_H III$). Четыре участка можно отнести к гипервариабельным: положения 31—37, 51—68, 84—91 и 101—110. Из них первый, второй и четвертый можно обозначить как участки, определяющие комплементарность к антигену, так как рентгеноструктурные исследования иммуноглобулинов и данные опытов мечения по сродству (см. ниже) показали, что именно они образуют полость участка антители, соединяющегося с антигеном [65]. Однако, хотя вариабельность остатков в положениях 31—37, 51—68 и 101—110 может иметь отношение к связыванию антигена, функция и роль гипервариабельного участка тяжелых цепей в районе остатков 84—91 до сих пор не установлена [66]. Вероятно, этот участок отражает наличие какого-то важного генетического полиморфизма V-области.

Само существование и положение гипервариабельных участков можно сразу же обнаружить, если построить график зависимости параметра вариабельности от положения аминокислотных остатков. Сам этот параметр, введенный впервые Ву и Кабатом [67], определяется следующим образом: вариабельность равна числу различных аминокислотных остатков в данном положении, деленному на отношение частоты, с которой обнаруживается наиболее часто встречающаяся в этом же положении аминокислота, к числу изученных белков. Приведем пример из оригинального исследования Ву и Кабата. В по-

		10		20	
Tie	GLU VAL GLN LEU VAL GLU SER GLY GLY GLY LEU VAL GLN PRO GLY GLY SER LEU ARG LEU SER CYS ALA ALA SER				
Was	_____ LEU _____				
Jon	ASP _____ LYS _____				
Zap	_____ ALA _____ GLY _____				
Tur	_____ LEU _____				
		30		40	50
Tie	GLY PHE THR PHE SER THR SER ALA VAL TYR [] TRP VAL ARG GLN ALA PRO GLY IYS GLY LEU GLU TRP VAL				
Was	_____ SER _____ ASP _____ MET _____ [] _____				
Jon	_____ ALA TRP MET LYS [] _____				
Zap	_____ THR SER ARG PHE [] _____				
Tur	_____ ARG VAL LEU SER SER [] _____				
		60		70	
Tie	GLY TRP ARG TYR GLU GLY SER SER LEU THR HIS TYR ALA VAL SER VAL GLN GLY ARG PHE THR ILE SER ARG ASN				
Was	ALA _____ LYS _____ GLN GLU ALA _____ ASN SER _____ PHE _____ ASP THR _____ ASN _____				
Jon	VAL _____ VAL _____ GLN VAL VAL GLU LYS ALA PHE _____ ASN _____ ASN _____				
Zap	GLU PHE _____ VAL GLN _____ ALA ILE SER _____ ASP _____ ALA _____				
Tur	SER GLY _____ LEU ASN ALA _____ ASN LEU _____ PHE _____ ALA _____				
		80		90	100
Tie	ASP SER LYS ASN THR LEU TYR LEU GLN MET LEU SER LEU GLU PRO GLX ASX THR ALA VAL TYR TYR CYS ALA ARG				
Was	_____ ASN ARG _____ ALA _____				
Jon	_____ ILE _____ VAL THR _____				
Zap	_____ ASN THR GLY _____ ALA _____				
Tur	_____ GLN ALA _____ LEU _____				
		110		120	
Tie	VAL THR PRO ALA ALA ALA SER LEU THR PHE SER ALA VAL TRP GLY GLN GLY THR LEU VAL THR				
Was	PHE ARG GLN PRO PHE VAL GLN [] _____ PHE ASP _____ PHE _____				
Jon	_____ VAL VAL SER THR [] SER MET ASP _____ PRO _____				
Zap	THR ARG _____ GLY GLY TYR [] _____ ASP _____ SER _____				
Tur	LEU SER VAL THR _____ VAL [] ALA PHE ASP _____ LYS _____ SER _____				

Рис. 7.25. Полные аминокислотные последовательности пяти варпабельных областей V_HIII тяжелых цепей человека. Приведены лишь остатки, отличные от последовательности белка Tie. Скобками ука-

заны пропуски, сделанные для получения максимальной гомологии. Для обозначения аминокислот использованы трехбуквенные символы [65].

ложено 7 легких цепей из 63 изученных белков в 41 случае имеется серия. Кроме него в этом же положении обнаруживаются еще пролин, треонин и аспарагиновая кислота. Таким образом, частота, с которой встречается чаще всего обнаруживаемая аминокислота, равна $41 : 63 = 0,65$, и, следовательно, варпабельность будет составлять $4 : 0,65 = 6,15$. Варпабельность любого инвари-

автоного остатка, согласно сказанному, будет равна единице, тогда как теоретически верхний предел для 20 аминокислот, случайно встречающихся в любом из положений, равен $20 : 1/20 = 400$. На рис. 7.26 показана графически вариabельность для V-области тяжелых цепей человека; для построения этой зависимости было использовано в четыре раза больше данных, чем приведено на рис. 7.25. Можно заметить, что «вариabельная» область является относительно «постоянной» (константной), за исключением «гипервариabельных» участков.

Расположение гипервариabельных участков, определяющих комплементарность к антигену, в легких и тяжелых цепях одно и то же у всех позвоночных

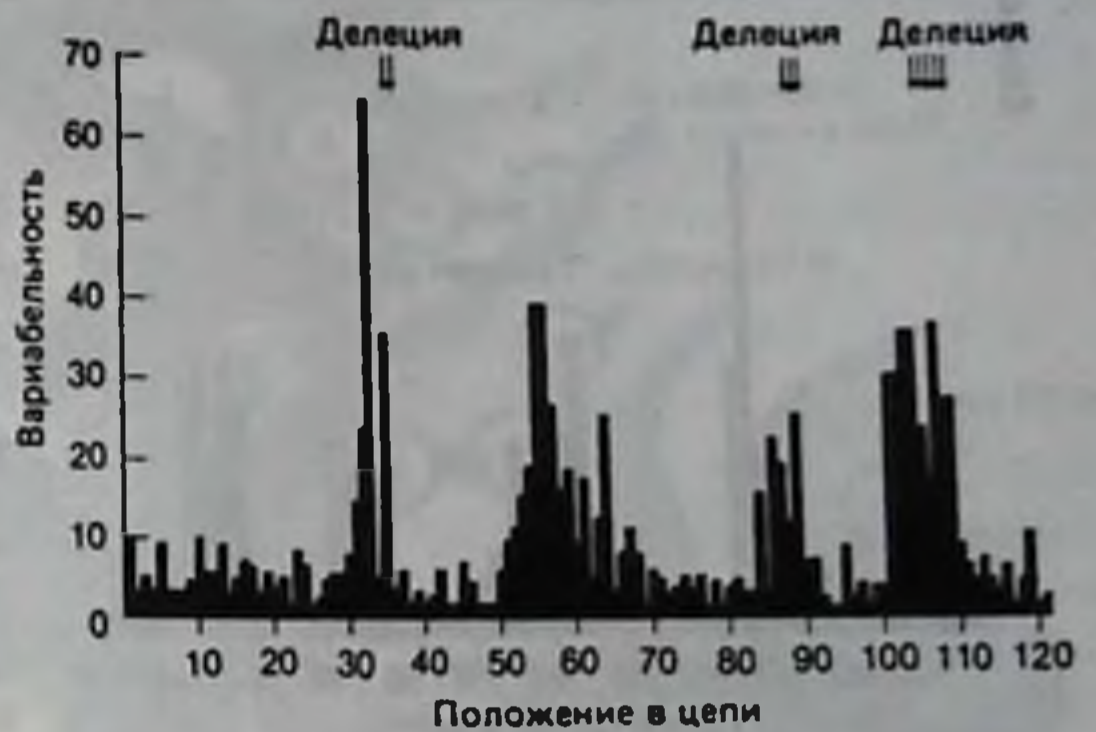


Рис. 7.26. Вариabельность V-областей тяжелых цепей человека. График получен по методу Ву и Кэбата [67]. Указано, где из-за делеций было необходимо сделать пропуски, чтобы получить гомологию последовательностей [65].

животных. Столь сходная локализация гипервариabельных участков в иммуноглобулинах различных видов животных свидетельствует в пользу существования селективных преимуществ у такого механизма возникновения разнообразия антител.

Относительно инвариантные сегменты V-области, не включаемые в гипервариabельные участки и составляющие около 80—85% всей V-области, обозначаются как каркасные участки. Согласно рентгеноструктурным данным, эти сегменты обеспечивают пространственную структуру, необходимую для расположения в определенном порядке остатков, от которых зависит комплементарность к антигену. У каждой данной V-группы изменчивость каркасных участков очень невелика (порядка 5%). Сейчас нет сомнений в том, что каркасные участки V-областей ответственны за поддержание у всех антител в целом одинаковой трехмерной структуры той области, которая непосредственно контактирует с антигеном. Каркасные участки имеют очень сходные размеры у иммуноглобулинов различных видов высших животных, изученных до настоящего времени. Это лишний раз подчеркивает единство животного мира.

7.10.3. Область, контактирующая с антигеном

С помощью аффинной метки (мечения по сродству) было показано, что гипервариabельные участки очищенных антител представляют собой те части молекулы, аминокислотные остатки которых действительно контактируют с антигеном и определяют таким образом антигенную специфичность антитела. Метка по сродству обычно обнаруживается как в легких, так и в тяжелых цепях, что указывает на участие обеих цепей в связывании антигена. Судя по первичной структуре пептидов, меченных по сродству, они находятся около гипервариabельных участков или входят в их состав, хотя в каждом конкретном случае обычно метились лишь немногие гипервариabельные участки (рис. 7.27).

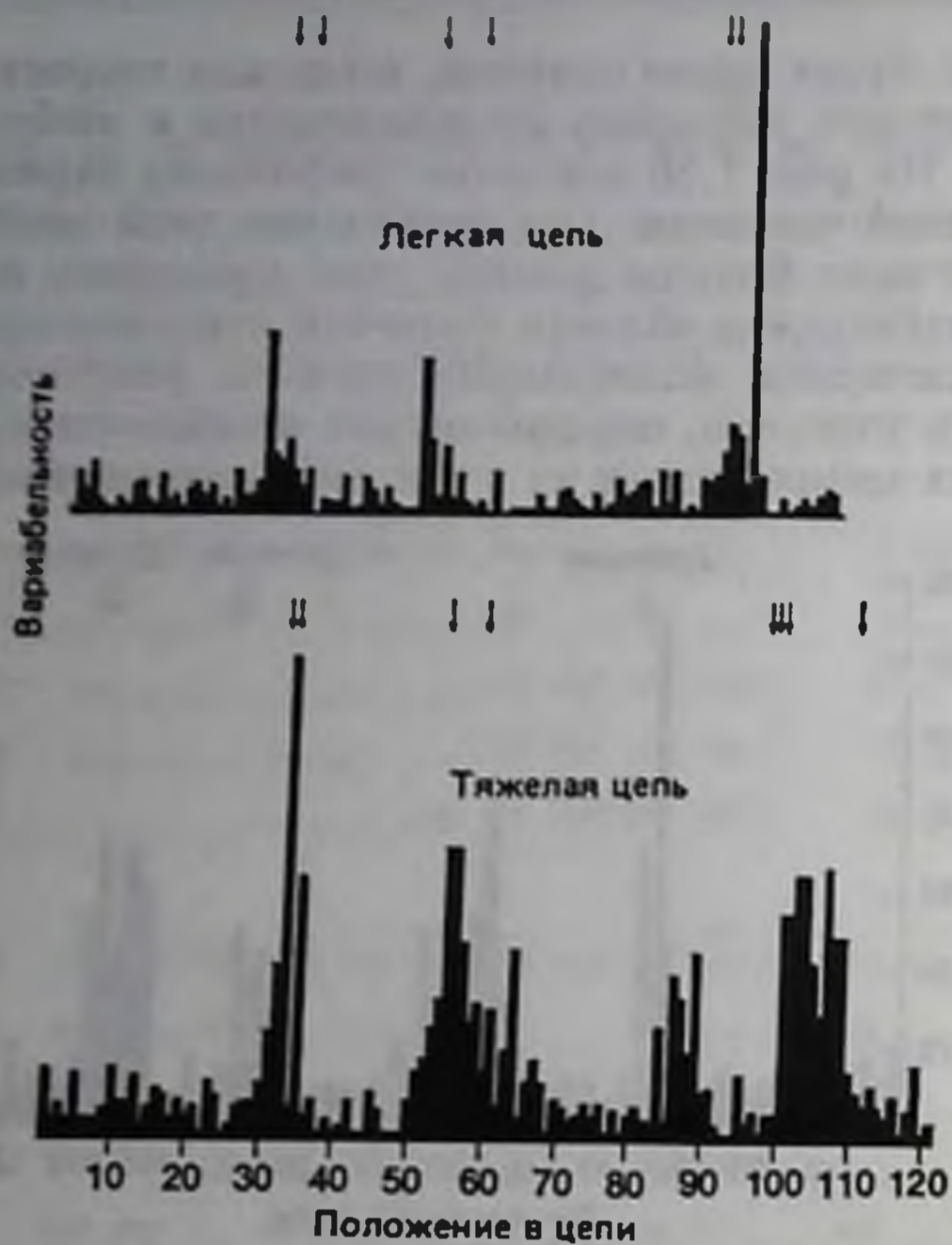


Рис. 7.27. Вариабельность в различных положениях последовательностей легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов всех видов. Стрелками показаны места прикрепления аффинных меток, установленные в различных исследованиях [1].

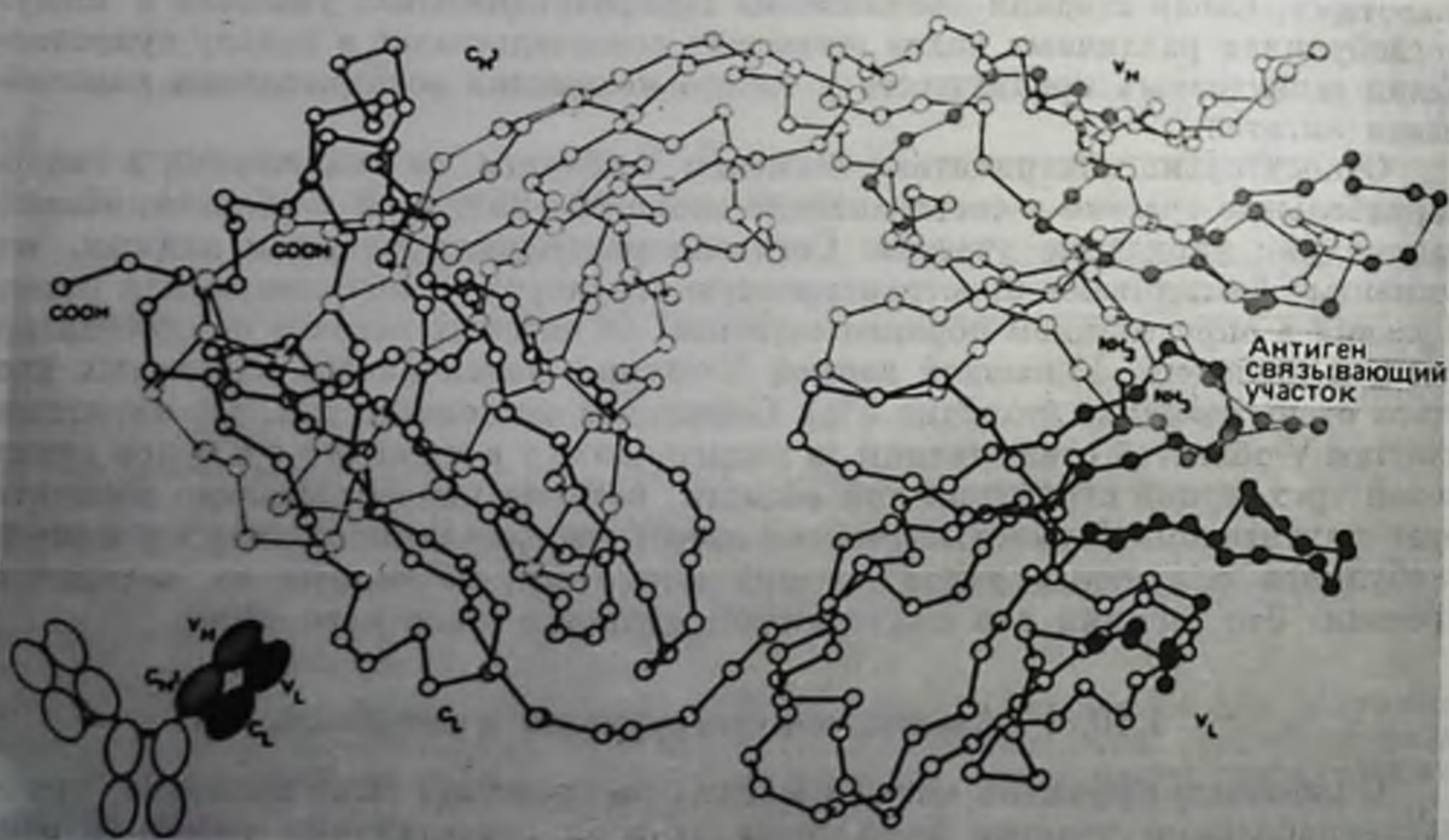


Рис. 7.28. Ход пептидной цепи Fab-фрагмента из мнеломного белка McPC603 мыши показывает, как весь фрагмент делится на плотноупакованные постоянные и вариабельные области, состоящие из пар доменов тяжелых и легких цепей и соединенных протяженными сегментами, которые обозначаются как «участки переключения».

Участок соединения с антигеном, расположенный на правом конце фрагмента, построен полностью из прилегающих петель гипервариабельных аминокислот (темные кружки), которые принадлежат обоим полипептидным цепям. (Схема построена на основании исходных данных Дэвиса и Падлана [68]; печатается с разрешения).

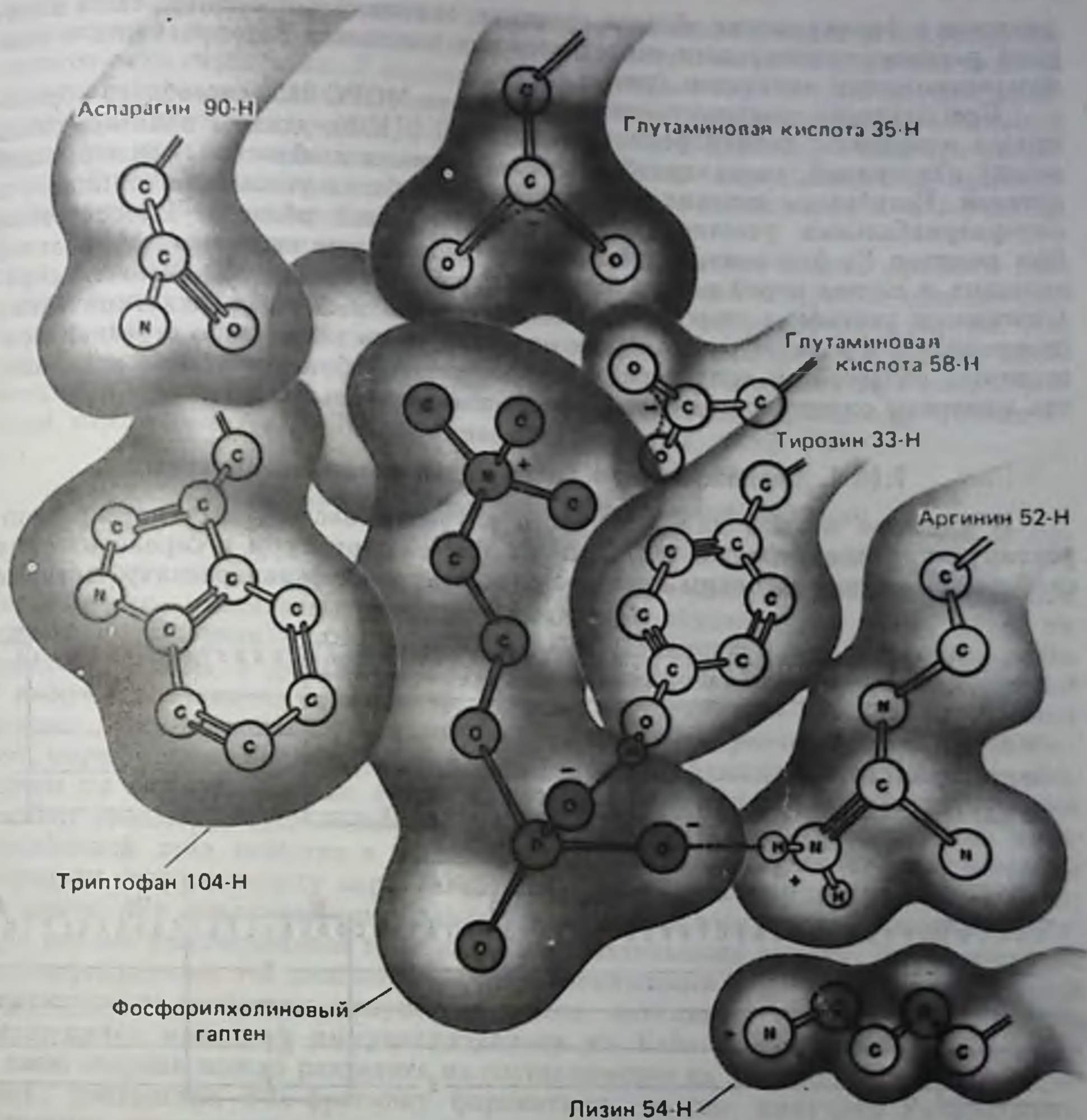


Рис. 7.29. Модель участка связывания антитела McPC 603 с присоединенным к нему фосфорилхолином.

Хорошо видно, насколько форма этого участка комплементарна таковой гаптена. Боковые цепи аминокислот, ограничивающие полость, реагируют с гаптемом слабыми нековалентными взаимодействиями. Отмеченная на рисунке принадлежность аминокислот той или иной цепи указывает на то, что в формировании участка связывания участвуют все

три гипервариабельные области тяжелой цепи, определяющие комплементарность, но только одна такая область легкой цепи. У различных антител, как показывают данные по их трехмерной структуре, вклад в образование участка связывания каждой из шести гипервариабельных областей, определяющих комплементарность, неодинаков. (Модель построена на основании исходных данных Дэвиса и Пэдлана [68]; печатается с разрешения.)

Полное представление о строении контактирующей области можно получить при анализе трехмерной структуры Fab-фрагмента (рис. 7.28). Гипервариабельные участки группируются на одном конце молекулы, что делает их полностью доступными растворителю. Окончательно роль гипервариабельных

участков в формировании области антитела, связывающей антиген, была выяснена рентгеноструктурными исследованиями комплекса Fab-фрагмента с низкомолекулярным антигеном (рис. 7.29).

При изучении мышинного меломного белка МОРС 315, способного образовывать комплекс с динитрофенильной группой (ДНФ), удалось показать связь между idiotипней, гипервариабельными участками и областью, связывающей антиген. Результаты мечения по сродству этого белка указывали на близость гипервариабельных участков к антигенсвязывающей области. Впоследствии был получен Fv-фрагмент, состоящий из нековалентно связанных V-областей тяжелых и легких цепей и способный реагировать с антигеном. Согласно серологическим данным, в этом фрагменте имеется полный набор idiotипических детерминант, и в то же время в нем не обнаружено каких-либо отрезков константных областей. В этих исследованиях впервые было отчетливо показано, что idiotипы определяются строением лишь вариабельных областей [65].

7.10.4. Вариабельные области индуцированных антител

В качестве модели для детального изучения наследуемых перекрестно-реагирующих idiotипов, в частности их тонкой структуры и серологических свойств, были использованы антитела к гаптену *n*-азофениларсонату, которые

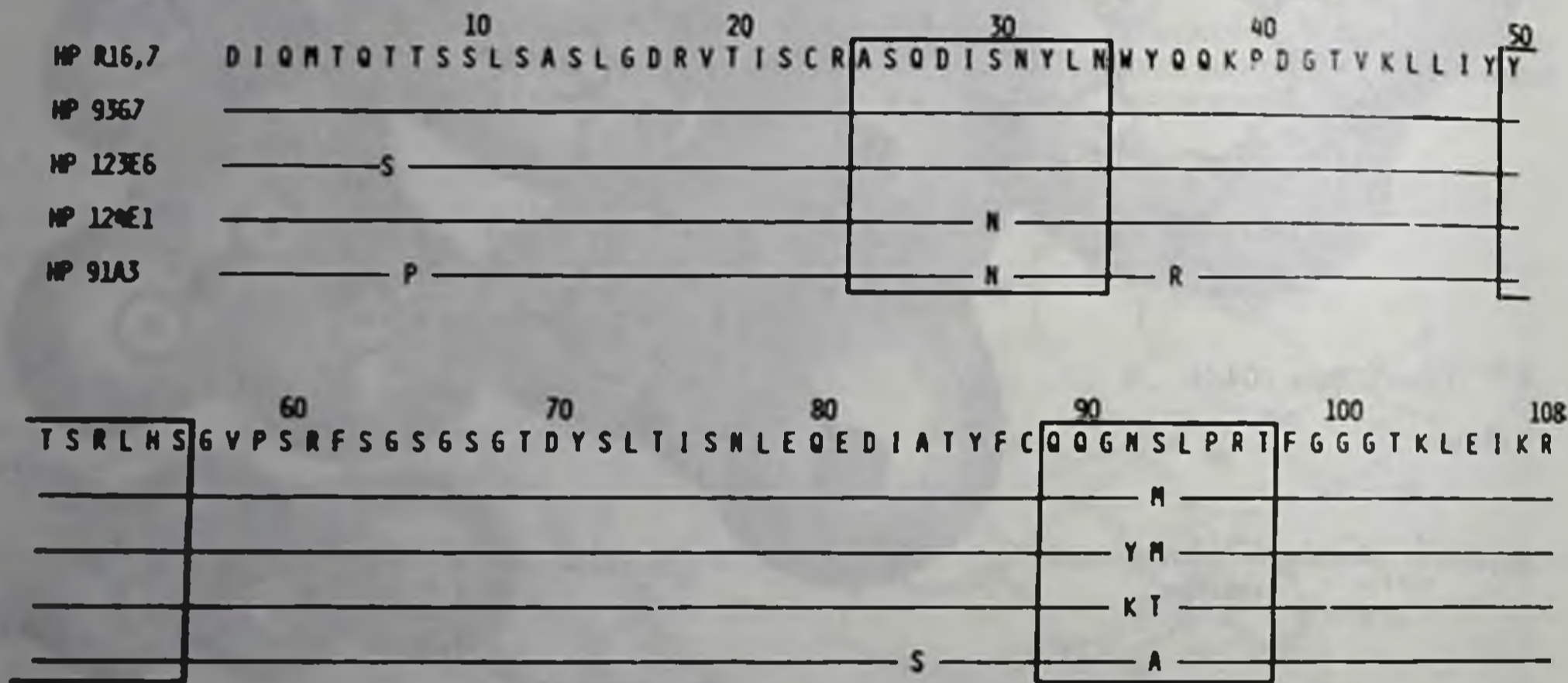


Рис. 7.30. Легкие цепи антител против арсоната, образованные гибридомой.

Приведены последовательности легких цепей антител с перекрестно-реагирующим idiotипом (четыре верхние последовательности)

и без него (нижняя последовательность). Прямая линия показывает остатки, идентичные цепи R16.7; гипервариабельные остатки обведены четырехугольниками.

были синтезированы мышами линии A/J. На рис. 7.30 приведена аминокислотная последовательность пяти моноклональных антител, из которых четыре имели перекрестно-реагирующий idiotип, а у одного он не выявлялся вообще.

Согласно этим данным, антитела, связывающие один и тот же гаптен и, кроме того, обладающие перекрестно-реагирующим idiotипом, имеют очень сходную аминокислотную последовательность. В других опытах было выявлено значительное сходство между первичной структурой тяжелых цепей этих же антител. Оказалось, что одинаковыми являются не только остатки каркасных участков, но и гипервариабельные участки (в частности, первый и второй)

практически идентичны. Подобное сходство, очевидно, отражает те структурные ограничения, которые накладываются связыванием гаптена и идиотипическими антигенными свойствами. У исследованной серии молекул особый интерес представляет отрезок с высокой вариабельностью в третьем гипервариабельном участке. В двух положениях (92 и 93) почти у всех изученных молекул располагаются разные аминокислотные остатки. Такая вариабельность, причины которой пока еще неясны, не связана с сегментом, соединяющим V- и J-участки (этот вопрос более подробно обсуждается в гл. 8).

Согласно приведенным данным, легкие цепи антител против простого гаптена, выделенные из антител одной инбредной линии и притом обладающие одним и тем же идиотипом, имеют очень сходную первичную структуру. Это в свою очередь подтверждает гипотезу о том, что легкие цепи изученных антител к арсонату кодируются единичным V-геном первичных половых клеток (гаметным). Скорее всего, обнаруженная гетерогенность обусловлена соматическим механизмом, а не отбором разных гаметных генов [69].

7.10.5. Биологические или эффекторные функции иммуноглобулинов

Как уже указывалось в начале этой главы, молекулы иммуноглобулинов специфически связывают чужеродные молекулы, обуславливая таким путем их инактивацию и (или) удаление из организма. Доменная гипотеза явилась очень важным этапом в разгадке структурно-функциональных взаимоотношений у иммуноглобулинов. Согласно ей, каждый из возникших независимо доменов должен быть ответствен за ту или иную биологическую активность, и наоборот, определенные биологические или эффекторные функции выполняются лишь одним из доменов. Только немногие свойства молекул антител, если таковые вообще имеются, обусловлены взаимодействием доменов. Сам факт таких взаимодействий стал известен в последние годы, как и очевидное существование передачи сигнала между вариабельными и константными областями. Однако, за немногими исключениями, большинство свойств иммуноглобулиновых молекул все же приписывается тому или иному отдельному домену. Эксперименты, подтверждающие это положение, стали возможными благодаря определенным структурным свойствам иммуноглобулинов, описанным выше. Ряд ферментов расщепляет молекулу иммуноглобулинов на Fab- и Fc-фрагменты, которые в свою очередь можно разделить на составляющие их домены. Как уже говорилось, расщепляя Fab-фрагмент ферментами, можно получить Fv-фрагмент. Изучение последнего позволило сделать вывод, что идиотипия и антигенсвязывающая способность иммуноглобулинов полностью определяются строением вариабельных доменов.

Все эти свойства зависят в основном от четвертичной структуры молекулы, и даже очень незначительные изменения, вызываемые нагреванием, могут нарушать основные биологические функции. Роль углеводов в молекулах иммуноглобулинов полностью еще не выяснена. Это относится, в частности, и к их возможному участию в метаболической деградации иммуноглобулинов. В настоящее время появилась хорошая возможность вновь изучить этот давно назревший вопрос, поскольку известны вещества, с помощью которых можно подавить образование углеводов (например, туникамицин) или же удалить углеводный компонент (например, трифторметансульфокислоту).

Как правило, в ответ на определенный антигенный стимул иммунная система образует антитела всех классов и подклассов. Крайне трудно понять точный биологический смысл столь огромного разнообразия антител. При изучении

Таблица 7.5. Физические, химические и биологические свойства классов иммуноглобулинов человека

Свойство (данные о биосинтезе, скорости обмена и количестве в кровотоке взяты из работы Уоллмена и др. [70]; печатается с разрешения)	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Обычная форма	Мономер	Мономер, димер и т. д.	Пентамер	Мономер	Мономер
Молекулярная формула	$\kappa_2\gamma_2$ или $\lambda_2\gamma_2$	$(\kappa_2\alpha_2)_n$ или $(\lambda_2\alpha_2)_n$	$(\kappa_2\mu_2)_5$ или $(\lambda_2\mu_2)_5$	$\kappa_2\delta_2$ или $\lambda_2\delta_2$	$\kappa_2\varepsilon_2$ или $\lambda_2\varepsilon_2$
Другие цепи	—	J-цепь, СК	J-цепь	—	—
Подклассы	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4	IgA1, IgA2	Не найдены	Нет	Нет
Подкласс тяжелых цепей	$\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4$	α_1, α_2	—	—	—
Аллотипы тяжелых цепей	Gm (около 20)	Am (2)	Mm (2)	—	—
Молекулярная масса	150 000	160 000	950 000	175 000	190 000
Коэффициент седиментации ($S_{20, w}$)	6,6S	7S, 9S, 11S, 14S	19S	7S	8S
Содержание углеводов (%)	3	7	10	9	13
Количество в сыворотке (в среднем у взрослых, мг/100 мл)	1250 ± 300	210 ± 50	125 ± 50	4	0,03
Процент от общего количества иммуноглобулинов в сыворотке	75—85	7—15	5—10	0,3	0,003
Всего в кровотоке (мг/кг веса)	494,0	95,0	37,0	1,1	0,019
Период полураспада (дни)	23,0	5,8	5,1	2,8	2,5
Скорость синтеза (мг/кг за 1 день)	33,0	24	6,7	0,4	0,016
Парапротеинемия	Миелома	Миелома	Макроглобулинемия	Миелома	Миелома
Валентность антител	2	2	5 или 10	?	?
Фиксация комплемента (по классическому пути)	+ (IgG1, 2, 3)	—	+	—	—
Активация комплемента (альтернативный путь)	+ (IgG4)	+ (IgA1, 2)	—	+	—
Связывание с клетками	Макрофаги, нейтрофилы	—	—	?	Тучные клетки
Другие биологические свойства	Вторичный иммунный ответ, перенос через плаценту	Характерные антитела в секретах	Первичный иммунный ответ; ревматоидный фактор	Основная молекула поверхности лимфоцитов	Гомоцитотропные антитела, анафилаксия; аллергия

этого вопроса антитела обычно фракционируют вначале по их способности реагировать с антигеном, а затем полученные фракции разделяют на различные классы и подклассы. Разумеется, подобное фракционирование очень искусственно, так как гетерогенность переменных областей делает невозможным точное сравнение, для которого необходимо иметь молекулы с одной переменной, но разными константными областями. Однако недавно были сделаны два суще-

ственных достижения, позволившие экспериментально подойти к решению этого вопроса. Во-первых, появилась возможность осуществить переключение синтеза одного класса гибридных антител на другой. При этом вначале индуцируют моноклональное антитело к определенному антигену, а затем в культуре клеток отбирают варианты гибридом, переключившихся с синтеза одного класса на другой. Таким путем в принципе можно получить моноклональные антитела, переменные области которых идентичны, а константные выполняют самые разные эффекторные функции. Подробное физико-химическое и биологическое изучение таких молекул должно дать важные данные о роли константных областей. Еще более многообещающим должно быть использование технологии рекомбинантных ДНК, с помощью которой можно сконструировать молекулы иммуноглобулинов, отдельные домены которых будут взяты от молекул разных классов. Например, из молекул IgG2a и IgG2b, возможно, удастся получить молекулу с замененным C_H3-доменом и затем исследовать физико-химические и биологические свойства такой «рекомбинантной» молекулы. Этот метод может оказаться особенно полезным для выяснения роли шарнирной области, которая, как говорилось, является исключительно переменной не только у классов и подклассов иммуноглобулинов одного вида, но и у классов иммуноглобулинов разных видов. Влияние шарнирной области на биологические свойства двух С-концевых доменов иммуноглобулинов хорошо видно на примере IgG4 человека. Белки этого подкласса иммуноглобулинов, как показано многочисленными экспериментами, не связывают C1q и поэтому не могут инициировать активацию комплемента по классическому пути. Однако полученные результаты были получены как с очищенными миеломными IgG4 человека в нативном виде, так и с препаратами, агрегированными различными способами. Однако изолированные Fc-фрагменты из этих же молекул оказались способными активировать комплемент по классическому пути. Очевидно, что не существует каких-либо структурных дефектов в C_H2- или C_H3-доменах молекул IgG4 (известно, что C1q связывается с C_H2-доменом). Скорее всего, у этих белков Fab-субъединицы расположены из-за особого строения шарнирной области таким образом, что прикрывают участки C_H2-доменов, ответственные за комплексирование с C1q. Сейчас уже получено много экспериментальных данных в пользу изложенной гипотезы. Поэтому недостаточно лишь изучить биологические свойства молекул миеломных белков или неспецифических иммуноглобулинов. Значительно важнее это же проделать на антителах после их реакции с антигеном. Ведь вполне возможно, что IgG4-антитела после связывания антигена

Таблица 7.6. Биологические свойства подклассов иммуноглобулинов человека

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Фиксация комплемента (классический путь)	++++	++	++++	+ ¹⁾
Пассивная кожная анафилаксия ²⁾	+	—	+	+
Связывание с Fc-рецепторами полиморфноядерных лейкоцитов	+	+	+	+
Связывание с Fc-рецепторами моноцитов	+	—	+	—
Перенос через плаценту	+	+	+	+

1) См. текст.

2) У морских свинок.

приобретают способность к фиксации компонента точно так же, как и антитела подклассов IgG1, 2 и 3.

В табл. 7.5 и 7.6 приведены биологические свойства иммуноглобулинов человека. Как правило, свойства, которыми обладает данный класс одного вида, имеются у того же класса и других видов. В отношении подклассов такой закономерности не наблюдается, хотя определенный параллелизм существует в этом случае. Но поскольку номенклатура подклассов у различных видов была установлена без учета их биологических свойств, то прямого соответствия не наблюдается. Например, у человека антитела к углеводным антигенам часто относятся к IgG2, тогда как у мышей такие же антитела принадлежат к IgG3.

Благодарности

При работе над этой главой неоценимую помощь оказали замечания и критические советы д-ра Е. Milner, С. Hurley, А. Clark. Необходимо отметить также квалифицированную техническую помощь мисс Kathy Able. Работа была субсидирована национальными институтами здравоохранения (субсидия А1 12127) и фондом Welch (субсидия I-874.)

ЛИТЕРАТУРА

1. Wasserman R. L., Capra J. D. Immunoglobulins. In: The Glycoconjugates, edited by M. I. Horowitz and W. Pigman, pp. 323—348, Academic Press, New York (1977).
2. Hilschmann N., Craig, L. C. Amino acid sequence studies with Bence Jones proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53, 1403—1409 (1965).
3. Porter R. R. The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain, Biochem. J., 73, 119—126 (1959).
4. Silvertown E. W., Navia M. A., Davies, D. R. Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5140—5144 (1977).
5. Edelman G. M., Cunningham B. A., Gall W. E., Gottlieb P. D., Rutishauser U., Wazdal M. J. The covalent structure of an entire γ G immunoglobulin molecule, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63, 78—85 (1969).
6. Edmundson A. B., Ely K. R., Abola E. E., Schiffer M., Panagiotopoulos N. Rotational allomerism and divergent evolution of domains in immunoglobulin light chains, Biochemistry, 14, 3953—3961 (1975).
7. Natvig J. B., Kunkel H. G. Human immunoglobulins: Classes, subclasses, genetic variants, and idiotypes, Adv. Immunol., 16, 1—59 (1973).
8. Nisonoff A., Hopper J. E., Spring S. B. The Antibody Molecule, Academic Press, New York (1975).
9. Croce C. M., Shander M., Martinis J., Cicurel L., D'Ancona G. G., Dolby T. W., Koprowski H. Chromosomal location of the genes for human immunoglobulin heavy chains, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 3416—3419 (1979).
10. Malcolm S., Barton P., Bentley D. L., Ferguson-Smith M. A., Murphy C. S., Rabbits T. H. Assignment of a V_{κ} locus for immunoglobulin light chains to the short arm of chromosome 2 (2 cen \rightarrow p13) by in situ hybridization using a cRNA probe of HK 101 λ Ch 4A. Human Gene Mapping 6, Oslo Conference 1981. Cytogenetics and Cell Genetics, 32, 296 (1982).
11. Erickson J., Martinis J., Croce C. Assignment of the genes c for human λ immunoglobulin chains to chromosome 22, Nature, 294, 173—175 (1981).
12. D'Eustachio P., Pravtcheva D., Marcu K., Ruddle F. H. Chromosomal location of the structural gene cluster encoding murine immunoglobulin heavy chains, J. Exp. Med., 151, 1545—1550 (1980).
13. Swan O., D'Eustachio P., Leinwand L., Seldman J., Keithley D., Ruddle F. H. Chromosomal assignment of the mouse κ light chain genes, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 76, 2735—2739 (1979).
14. D'Eustachio P., Bothwell A. L. M., Takaro T. K., Baltimore D., Ruddle F. H. Chromosomal location of the structural genes encoding murine immunoglobulin λ light chains, J. Exp. Med., 153, 793—800 (1981).

15. Babu U. M., Maurer P. H. The expression of anti-poly (L-Glu⁴⁰, L-Phe⁴⁰) idiotype determinants dictated by the gene products in the major histocompatibility complex, *J. Exp. Med.*, 154, 649—658 (1981).
16. Putnam F. W. *The Plasma Proteins: Structure, Function and Genetic Control*, Vol. 3, 2d ed., Academic Press, New York (1977).
17. Poljak R. J., X-ray diffraction studies of immunoglobulins, *Adv. Immunol.*, 21, 1—33 (1975).
18. Novotny J., Franek F. Different degrees of interspecies homology in immunoglobulin λ chain constant domain correlated with three-dimensional structure, *Nature*, 258, 641—643 (1975).
19. Wang A.-C., Tung E., Fudenberg H. H. The primary structure of a human IgG2 heavy chain. Genetic, evolutionary and functional implications, *J. Immunol.*, 125, 1048—1054 (1980).
20. Ellison J. Hood L. Linkage and sequence homology of two immunoglobulin γ heavy chain constant region genes, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 79, 1984—1988 (1982).
21. Huber R., Deisenhofer J., Colman P. M., Matsushima M., Palm W. (1976). Crystallographic structure studies of an IgG molecule and an F₁ fragment, *Nature*, 264, 415—420 (1976).
22. Frangione B., Milstein C., Pink J. R. L. Structural studies of immunoglobulin G, *Nature*, 221, 145—148 (1969).
23. Michaelson T. E., Frangione B., Franklin E. C. Primary structure of the «hinge» region of human IgG3. *J. Biol. Chem.*, 252, 883—889 (1977).
24. Dognin M. J., Lauwereys M., Strosberg A. D. Multiple amino acid substitutions between murine γ 2a heavy chain Fc regions of Ig-1a and Ig-1b allotypic forms, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 78, 4031—4035 (1981).
25. Heremans J. F. Immunoglobulin A. In: *The Antigens*. Vol. 2, edited by M. Sela, pp. 365—522, Academic Press, New York (1974).
26. Kunkel H. C., Smith W. K., Joslin F. G., Natvig J. B., Litwin S. D. Genetic marker of the gamma -A2 subgroup of gamma-A immunoglobulins, *Nature*, 223, 1247—1248 (1969).
27. Torano A., Putnam F. W. Complete amino acid sequence of the α 2 heavy chain of a human IgA2 immunoglobulin of the A2m (2) allotype, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 75, 966—969 (1978).
28. Putnam F. W., Liu Y. V., Low T. L. K. Primary structure of a human IgA1 immunoglobulin. IV. Streptococcal IgA1 protease digestion, Fab and Fc fragments, and the complete amino acid sequence of the α 1 heavy chain, *J. Biol. Chem.*, 254, 2865—2974 (1979).
29. Tsuzukida Y., Wang C.-C., Putnam F. W. Structure of the A2m (1) allotype of human IgA — A recombinant molecule, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 76, 1104—1108 (1979).
30. Grey H. M., Abel C. A., Youngt W. J., Kunkel H. G. A subclass of human γ A-globulins (γ A2) which lacks the disulfide bonds linking heavy and light chains, *J. Exp. Med.*, 128, 1223—1236 (1968).
31. Frangione B., Wolfenstein-Todel C. Partial duplication in the «hinge» region of IgA1 myeloma proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 69, 3673—3676 (1972).
32. Plaut A. G., Gilbert J. V., Artenstein M. S., Capra J. D. *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*: Extracellular enzyme cleaves human immunoglobulin A, *Science*, 190, 1103—1105 (1975).
33. Mole J. E., Bhowan A. S., Bennett J. C. Primary structure of human J chain: Alignment of peptides from chemical and enzymatic hydrolyses, *Biochemistry*, 16, 3507—3513 (1977).
34. Kehoe J. M., Seide-Kehoe R. Antigenic features of immunoglobulins. In: *Immunochemistry of Proteins*, edited by M. Z. Atassi, pp. 87—121. Plenum, New York (1979).
35. Koshland M. E. Structure and function of the J. chain, *Adv. Immunol.*, 20, 41—67 (1975).
36. Yagi M., D'Eustachio P., Ruddle F. H., Koshland M. E. J chain is encoded by a single gene unlinked to other immunoglobulin structural genes, *J. Exp. Med.*, 155, 647—654 (1982).
37. Roth R. A., Koshland M. E. Identification of a lymphocyte enzyme that catalyzes pentamer immunoglobulin M assembly, *J. Biol. Chem.*, 256, 4633—4639 (1981).
38. Cunningham-Rundles C., Lamm M. E., Franklin E. C. Human secretory component NH₂-terminal amino acid sequences and peptide maps of the form occurring in exocrine immunoglobulin A and the free form, *J. Biol. Chem.*, 249, 5654—5657 (1974).
39. Knight K. L., Rosenzweig M., Richter E. A., Hanly W. C. Rabbit secretory IgA: Identification and genetic control of two allotypes of secretory component, *J. Immunol.*, 112, 877—882 (1974).
40. Mostov K. E., Kraehenbuhl J., Blobel G. Receptor-mediated transcellular transport of immunoglobulin: Synthesis of secretory component as multiple and large transmembrane forms, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 77, 7257—7261 (1980).
41. Kuhn L. C., Kraehenbuhl J. The membrane receptor for polymeric immunoglobulin is structurally related to secretory component, *J. Biol. Chem.*, 256, 12490—12495 (1981).
42. Pernis B., Brouet J. C., Seligmann M. IgD and IgM on the membrane of lymphoid cells in macroglobulinemia. Evidence for identity of membrane IgD and IgM antibody activity in a case with anti-IgG receptors, *Eur. J. Immunol.*, 4, 776—778 (1974).

43. *Fu S. M., Winchester R. J., Kunkel H. G.* Similar idiotypic specificity for the membrane IgD and IgM of human B lymphocytes, *J. Immunol.*, 114, 250—252 (1975).
44. *Eisen H. N.* Immunology: Harper and Row, Hagerstown, Md (1980).
45. *Kehry M., Sibley C., Fuhrman J., Schilling J., Hood L. E.* Amino acid sequence of a mouse immunoglobulin μ chain, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 76, 2932—2936 (1979).
46. *Shimizu A., Watanabe S., Yamamura Y., Putnam F. W.* Tryptic digestion of immunoglobulin M in urea: Conformational lability of the middle part of the IgM molecule, *Immunochemistry*, 11, 719—727 (1974).
47. *Rogers J., Early P., Carter C., Calame K., Bond M., Hood L., Wall R.* Two mRNAs with different 3' ends encode membrane bound and secreted forms of immunoglobulin μ chain, *Cell*, 20, 303—312 (1980).
48. *McCumber L. J., Wasserman R., Capra J. D.* Primary structural conservation in the evolution of IgM. In: *Biological Basis of Immunodeficiency*, edited by E. W. Gelfand and H.-M. Dosch, pp. 169—175, Raven Press, New York (1980).
49. *Wasserman R. L., Capra J. D.* Amino acid sequence of the Fc region of a canine immunoglobulin M: interspecies homology for the IgM class, *Science*, 200, 1159—1161 (1978).
50. *Ishizaka K.* Chemistry and biology of immunoglobulin E. In: *The Antigens*, Vol. 1, edited by M. Sela, pp. 479—528, Academic Press, New York (1973).
51. *Bennich H., von Bahr-Lindström H.* Structure of immunoglobulin E (IgE). In: *Progress in Immunology II*, Vol. 1, edited by L. Brent and J. Holborow, pp. 49—58. North-Holland Publishing Company, Amsterdam (1974).
52. *Dorrington K. J., Bennich H.* Thermally induced structural changes in immunoglobulin E., *J. Biol. Chem.*, 248, 8378—8384 (1973).
53. *Rowe D. S., Fahey J. L.* A new class of human immunoglobulins. I. A unique myeloma protein, *J. Exp. Med.*, 121, 171—184 (1965).
54. *Rowe D. S., Fahey J. L.* A new class of human immunoglobulins. II. Normal serum IgD, *J. Exp. Med.*, 121, 185—199 (1965).
55. *Vitetta E. S., Uhr J. W.* Immunoglobulin-receptors revisited, *Science*, 189, 964—969 (1975).
56. *Tucker P. W., Liu C.-P., Mushinski J. F., Blattner F. R.* Mouse immunoglobulin D: Messenger RNA and genomic DNA sequences, *Science*, 209, 1353—1360 (1980).
57. *Putnam F. W., Takahashi N., Tetaert D., Debuire B., Lin L.-C.* Amino acid sequence of the first constant region domain and the hinge region of the δ heavy chain of human IgD, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 6168—6172 (1981).
58. *Lin L.-C., Putman F. W.* Primary structure of the Fc region of human immunoglobulin D: Implications for evolutionary origin and biological function, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 78, 504—508 (1981).
59. *Torano A., Tsuzukida Y., Liu Y. V., Putnam F. W.* Location and structural significance of the oligosaccharides in human IgA1 and IgA2 immunoglobulins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 2301—2305 (1977).
60. *Hickman S., Kulczycki A., Jr., Lynch R. G., Kornfield S.* Studies of the mechanism of tunicamycin inhibition of IgA and IgE secretion by plasma cells, *J. Biol. Chem.*, 252, 4402—4408 (1977).
61. *Hill P. L., Delaney R., Fellows R. E., Jr., Lebovitz H. E.* The evolutionary origins of the immunoglobulins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 56, 1762—1769 (1966).
62. *Edelman G. M., Gall W. E.* The antibody problem, *Ann. Rev. Biochem.*, 38, 415—466 (1969).
63. *Barker W. C., Ketchan L. K., Dayhoff M. O.* Origins of immunoglobulin heavy chain domains, *J. Mol. Evol.*, 15, 113—127 (1980).
64. *Franěk F.* The character of variable sequences in immunoglobulin and its evolutionary origin. In: *Symposium on Developmental Aspects of Antibody Formation and Structure*, 1969, edited by J. Šterzl and I. Riha, p. 311, Prague, Academia, New York, Academic Press (1970).
65. *Capra J. D., Kehoe J. M.* Hypervariable regions, idiotypy and the antibody combining site, *Adv. Immunol.*, 20, 1—40 (1975).
66. *Capra J. D.* A hypervariable region in human immunoglobulin heavy chains, *Nature*, 230, 61—63 (1971).
67. *Wu T. T., Kabat E. A.* 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).
68. *Capra J. D., Edmundson A.* The antibody combining site, *Sci. Am.*, 236, 50—59 (1977).
69. *Stegelman M., Capra J. D.* Complete amino acid sequence of light chain variable regions derived from five monoclonal anti-p-azophenylarsonate antibodies differing with respect to a cross-reactive idiotype, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 78, 7679—7683 (1981).
70. *Waldman T. A., Strober W., Blaese R. M.* In: *Immunoglobulins*, edited by E. Merler, pp. 33—48, National Academy of Science, Washington, D. C. (1970).

Иммуноглобулины: молекулярная генетика

Эдвард Э. Макс

(Edward E. Max)

Молекулярно-биологические исследования генов иммуноглобулинов (Ig) стали одним из первых триумфов метода рекомбинантных ДНК. До появления методов клонирования гены иммуноглобулинов можно было изучать лишь косвенно, на основании данных об аминокислотных последовательностях. Когда же стало возможным работать непосредственно с генами, многие из запутанных вопросов получили свое разрешение. В этой главе кратко рассматриваются некоторые из достигнутых успехов.

Разнообразие кодируемых генами антител,— это уникальная в своем роде загадка. Разнообразие это проявляется на нескольких уровнях. Наибольшее удивление вызывает разнообразие антигенсвязывающих центров антител. Согласно классическим работам Ландштейнера (Landsteiner), число различающихся по специфичности центров практически бесконечно. Как указывалось в предыдущей главе, разнообразие специфичностей связывающих центров обусловлено разнообразием аминокислотных последовательностей N-концевых доменов (вариабельных (V) участков) как легких (L), так и тяжелых (H) цепей. В то же время было обнаружено, что C-концевой домен L-цепи и три или четыре (в зависимости от изотипа) C-концевых домена H-цепей инвариантны в пределах одного класса L- или H-цепей. Было предложено несколько моделей, объясняющих беспрецедентное разнообразие Ig, а также тот факт, что это разнообразие сосредоточено в N-концевом домене. В одной из экстремальных моделей — модели соматических мутаций — постулировалось, что в гаметном геноме (гаплоидном геноме первичных половых клеток) имеется всего лишь несколько генов V-области. Увеличение разнообразия Ig на протяжении жизни организма эта модель объясняет наличием специального механизма, вызывающего соматические мутации. В основе другой экстремальной модели лежало предположение о том, что все огромное число разнообразных V-областей, возникшее, вероятно, в результате дупликаций и мутаций генов в процессе эволюции, непосредственно закодировано в гаметном геноме. Вне зависимости от того, возникает ли разнообразие последовательностей в филогенезе (гаметное разнообразие) или онтогенезе (соматические мутации), остается еще один вопрос: каким образом таких изменений избегает константная (C) область генов Ig? В 1965 г. Дрейер и Беннетт [1] высказали революционную для того времени идею о том, что для данного класса Ig в гаметном геноме существует единственный ген C-области (ген C), расположенный отдельно от множества генов, кодирующих V-области (V-гены); в процессе развития клетки, продуцирующей антитела, один из генов V объединяется с геном C, образуя полный ген (V + C), который и экспрессируется клеткой. Таким образом, механизмы, обеспечивающие разнообразие генов V-области, могут не затрагивать расположенный в отдаленном локусе единственный ген C-области. Очевидно, что для подтверждения или опровержения

гипотезы Дрейера и Беннетта и оценки сравнительного значения соматической и гаметной моделей разнообразия V-областей был необходим прямой анализ интересующих нас генов.

Кроме разнообразия V-областей легких и тяжелых цепей существует и другой, характерный для H-цепей тип разнообразия, также нуждающийся в молекулярнобиологическом объяснении. По многим данным, развивающаяся B-клетка сначала всегда синтезирует IgM и лишь при дальнейшем созревании может изменить изотип своей H-цепи с μ на δ , γ , ϵ или α . При переключении C-области клетка продолжает экспрессировать ту же самую V-область. Таким образом, недостаточно только объяснить, как одна и та же C-область может соединяться с множеством V-областей (рекомбинация V — C). Необходимо также рассмотреть молекулярный механизм, с помощью которого одна и та же V-область в процессе развития лимфоцита может последовательно присоединиться к нескольким C-областям (переключение H-цепей).

Последний уровень разнообразия H-цепей Ig — это различие между секретруемыми Ig и Ig, встроенными в мембрану B-клеток. Мембранные иммуноглобулины обладают дополнительным C-концевым участком, содержащим липофильные аминокислоты, ассоциированные с мембранными липидами; секретруемые же Ig, в остальном идентичные мембранным, лишены этой C-концевой области. Анализ генов Ig помог установить, каким образом эти две формы закодированы в геноме.

В настоящей главе мы познакомимся с тем, как применение техники клонирования ДНК помогло объяснить происхождение некоторых типов разнообразия, описанного выше. Кроме того, будут рассмотрены и другие вопросы, решению которых способствовал анализ структуры генов, например аллельное исключение (тот факт, что каждый из лимфоцитов синтезирует только один аллотип антител) и локализация генов Ig в хромосомах. Включенные в эту главу работы отобраны из литературы таким образом, чтобы помочь составить отчетливое представление об основных направлениях исследований, и отнюдь не претендуют на полную сводку данных о генах Ig. Для этого нет необходимости знакомить читателя с технологией рекомбинантных ДНК.

8.1. Гены легких цепей kappa у мыши

Из всех животных наиболее детально изучены гены иммуноглобулинов у мышей линии BALB/c. Выбор этот обусловлен наличием большого числа хорошо охарактеризованных миелом, индуцированных у мышей данной линии Майклом Поттером (Michael Potter) и его сотрудниками из Национальных институтов здоровья (NIH). Эти миеломы служат источником гомогенных Ig, представляющих собой хороший объект для определения аминокислотных последовательностей. Еще важнее то, что получение миелом от инбредных мышей облегчает их поддержание *in vivo* и позволяет тем самым сравнивать структуру генов, выделенных из различных миелом и гаметной ДНК. У мышей BALB/c хорошо изучены гены H-цепей, а также гены κ - и λ L-цепей. В данной главе в первую очередь рассматриваются κ L-цепи, поскольку на этой системе удобно продемонстрировать основные принципы организации генов Ig.

8.1.1. Определение количества генов до «эры клонирования»

Одним из первых вопросов, заинтересовавших молекулярных биологов, был вопрос о количестве генов *Ig* в геноме. Возможности методов, применявшихся до появления техники клонирования, были с современной точки зрения ограниченными; тем не менее они позволили отказаться от одной из обсуждавшихся тогда моделей. Эта модель в отличие от гипотезы Дрейера и Беннетта (Dreyer, Bennett) постулировала, что в гаметном геноме присутствует огромное число полных (т. е. $V + C$) генов *Ig*, кодирующих весь антительный репертуар организма. В 1974—1977 гг. эта модель была опровергнута в нескольких лабораториях в результате «подсчета генов» с помощью ДНК-зонда, комплементарного очищенной мРНК каппа L-цепей [2—7]. Для получения таких κ -специфических мРНК клетки κ -секретирующих миелом лизировали и из лизата осаждали полисомы. (Некоторые исследователи пытались получить обогащенные κ -синтезирующие полисомы с помощью иммунопреципитации вновь образованных κ -цепей анти- κ -антителами). Затем из полисом экстрагировали РНК, а из нее путем гибридизации с oligo-dT — мРНК (почти все типы матричной РНК содержат poly A-«хвост», который может гибридизоваться с комплементарным oligo-dT). Дальнейшая очистка κ -специфической мРНК достигалась путем фракционирования РНК по размеру при центрифугировании в градиенте концентрации сахарозы. Затем, инкубируя κ -мРНК с радиоактивно мечеными предшественниками ДНК и вирусным ферментом — обратной транскриптазой, получали комплементарную меченую ДНК (κ -ДНК). Такие радиоактивные зонды κ -кДНК были использованы для оценки числа κ -подобных генов в геномной ДНК путем изучения кинетики гибридизации, происходящей при отжиге радиоактивной κ -ДНК с комплементарными ей последовательностями геномной ДНК. В основе этого хорошо известного метода лежит следующая закономерность: гибридизация происходит быстро, если изучаемая ДНК содержит много копий последовательностей, комплементарных зонду. Если же таких последовательностей мало, то и отжиг протекает медленно, так как для нахождения зондом комплементарного участка понадобится больше времени. Эти эксперименты показали, что число генов С-области в гаплоидном геноме значительно меньше, чем постулируется моделью «гаметного разнообразия», согласно которой в гаметном геноме содержится множество полных κ -генов. Однако присущая методу погрешность не позволила определить точное число копий гена κ С-области. Доказать, что в геноме присутствует только одна его копия, оказалось возможным только с появлением методов рекомбинатных ДНК. Чтобы понять суть проведенных экспериментов, а также последующие достижения, необходимо сделать краткое отступление, посвященное этим мощным методам.

8.1.2. Клонирование κ -кДНК

Основным инструментом при использовании метода рекомбинатных ДНК служит внушительный набор ферментов (из различных биологических источников), действующих на нуклеиновые кислоты специфическим путем. Это ферменты, удаляющие и присоединяющие концевые фосфатные группы, специфически расщепляющие одно- или двухцепочечные ДНК и РНК, ковалентно сшивающие фрагменты ДНК, а также ферменты, синтезирующие цепи, комплементарные одноцепочечным ДНК или РНК. Наиболее важное значение при этом имеют ферменты, называемые «рестриктирующими эндонуклеазами» или «рестриктазами». Эти ферменты расщепляют ДНК в специфически распозна-

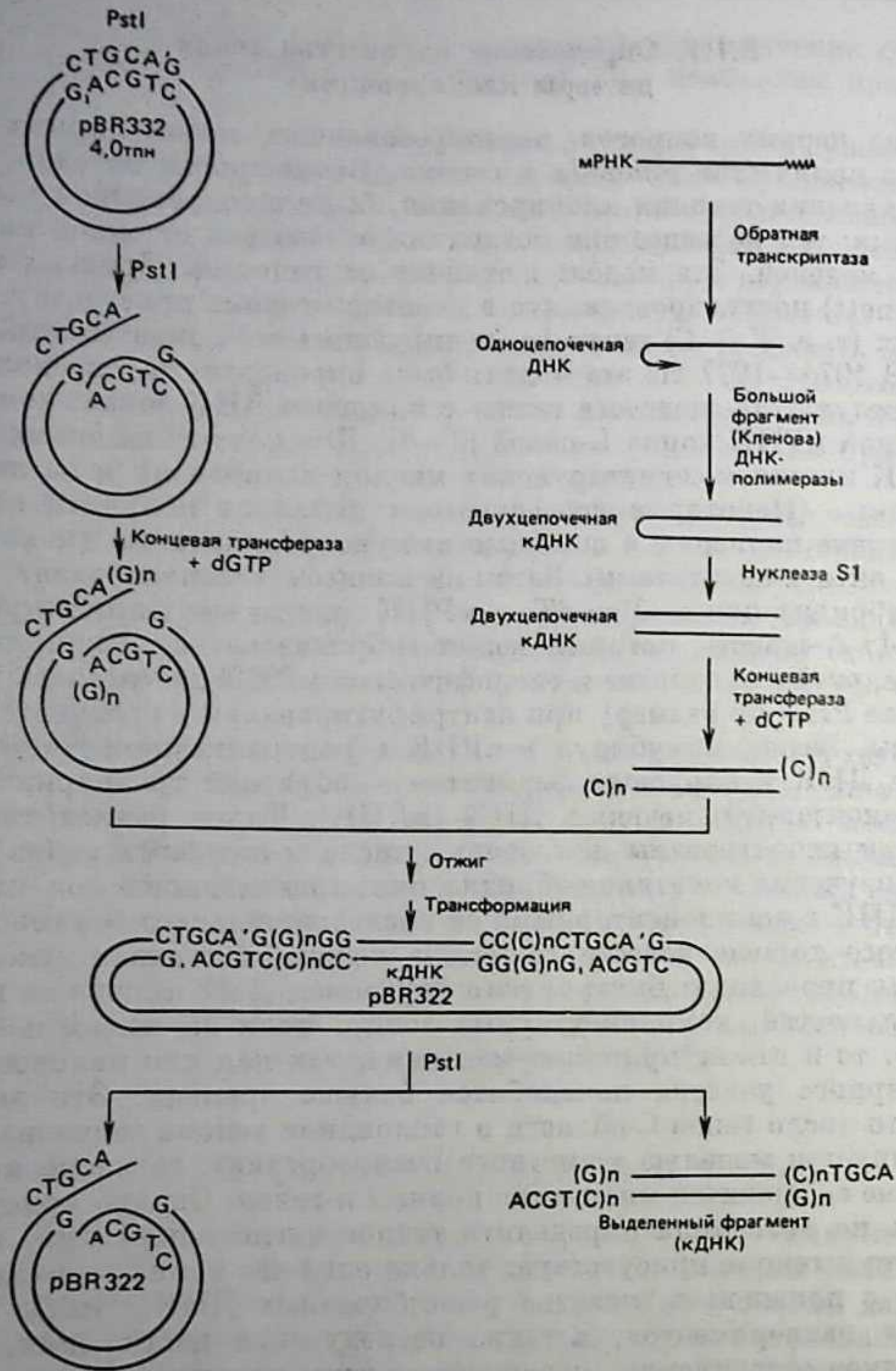


Рис. 8.1. Методы генетической инженерии и клонирование кДНК.

Наверху слева показана независимо реплицирующаяся плазмида pBR322, часто используемая в качестве вектора для введения ДНК в бактериальные клетки. Плазмида содержит единственный сайт расщепления ферментом PstI, последовательность нуклеотидов которого приведена на рисунке. Верхняя последовательность, как это принято, записана в направлении 5' → 3' (слева направо); внизу дана комплементарная последовательность в противоположной ориентации. Одна и та же последовательность читается

слева направо в верхней цепи и справа налево в нижней, что типично для сайтов узнавания рестриктазами. Места расщепления PstI внутри узнаваемой ферментом последовательности обозначены вертикальными черточками. После расщепления остаются четырехнуклеотидные одноцепочечные элементарные выступы («лишние концы») на обоих появляющихся концах, как показано внизу. Для клонирования кДНК эти концы наращивают, достраивая гомополимер из остатков dG. ДНК-вставку получают на мРНК с использованием приведенных справа ферментативных стадий. У вставки наращи-

ваемых участках, обычно состоящих из 4—6 нуклеотидов и имеющих «палиндромную» последовательность, т. е. узнаваемая последовательность располагается на обеих цепях ДНК в одном и том же положении (см. рис. 8.1). Ферменты, узнающие различные последовательности, выделяют из бактерий разных видов и штаммов, где они служат для расщепления проникшей в клетку чужеродной (например, вирусной) ДНК. (Собственная ДНК бактерии защищена от фермента метилированием.) Многие из этих ферментов расщепляют комплементарные цепи в точках, смещенных относительно друг друга, с образованием «липких концов», которые при отжиге быстро комплексируются и легко могут быть ковалентно сшиты ДНК-лигазой. Липкие концы могут быть созданы искусственно, при помощи фермента концевой трансферазы, если, как показано на рис. 8.1, построить poly-dG-концы у одного фрагмента ДНК и комплементарные poly-dC-концы у другого фрагмента. С помощью именно этих реакций кДНК, скопированная с очищенной мРНК κ -Ig, была встроена в плазмидный вектор, называемый pBR322 (рис. 8.1). Полученная рекомбинантная плаزمид была введена в бактерию *Escherichia coli* путем ее трансформации. В экспериментах такого рода лишь небольшая часть бактерий получает молекулу плазмиды, однако эти немногие бактерии могут быть выращены селективно на среде, содержащей тетрациклин. Плазмиды содержат ген устойчивости к тетрациклину, защищающий от его действия бактерию-хозяина, тогда как нетрансформированные клетки в присутствии тетрациклина не размножаются. Хотя в исходном препарате кДНК может содержаться смесь нескольких последовательностей (в зависимости от чистоты исходно использованной мРНК), каждая колония трансформированных бактерий, растущая на чашке с содержащим тетрациклин агаром, содержит многие тысячи бактерий, являющихся потомками одной клетки, захватившей одну-единственную плазмидную молекулу. Таким образом, каждая клетка колонии содержит плазмиды с идентичной встроенной последовательностью, которая таким образом «клонировается». Плазмидную ДНК можно выделить из жидких бактериальных культур, происходящих из одной колонии, и получить таким способом чистую ДНК-вставку в количествах, достаточных для анализа нуклеотидной последовательности.

Описанный метод использовали для клонирования кДНК для κ -Ig мыши в 1978 г. Сейдман и др. [8], Ленхард-Шуллер и др. [9] и Хэмлин и др. [10]. (Вторая из этих групп годом раньше сообщила о клонировании кДНК для λ -Ig мыши.) Идентичность этих клонов была проверена несколькими методами, в том числе прямым определением нуклеотидной последовательности. «Выведенная» на основе нуклеотидного анализа последовательность аминокислот оказалась полностью идентичной химически определенной последовательности миеломных κ -цепей BALB/c.

8.1.3. Блоттинг по Саузерну

Одним из первых результатов, полученных с использованием клонов кДНК, явилось подтверждение следующих предсказаний гипотезы Дрейера — Беннетта: а) существует один-единственный ген κ С-области, но б) множество генов V-

вают концы из oligo-dC, комплементарные соответствующим концам вектора. Вектор и вставку соединяют и вводят в бактерию при таких разведениях, чтобы ни одна из клеток не получила более одной плазмиды. После отбора бактериальной колонии, содержащей нужный ген, эти клетки могут быть

выращены в больших количествах. Плазмиды, полученная из таких клеток, может быть расщеплена PstI, и свободная ДНК-вставка может быть отделена от вектора (внизу). (Перепечатано с некоторыми изменениями из работы [169].)

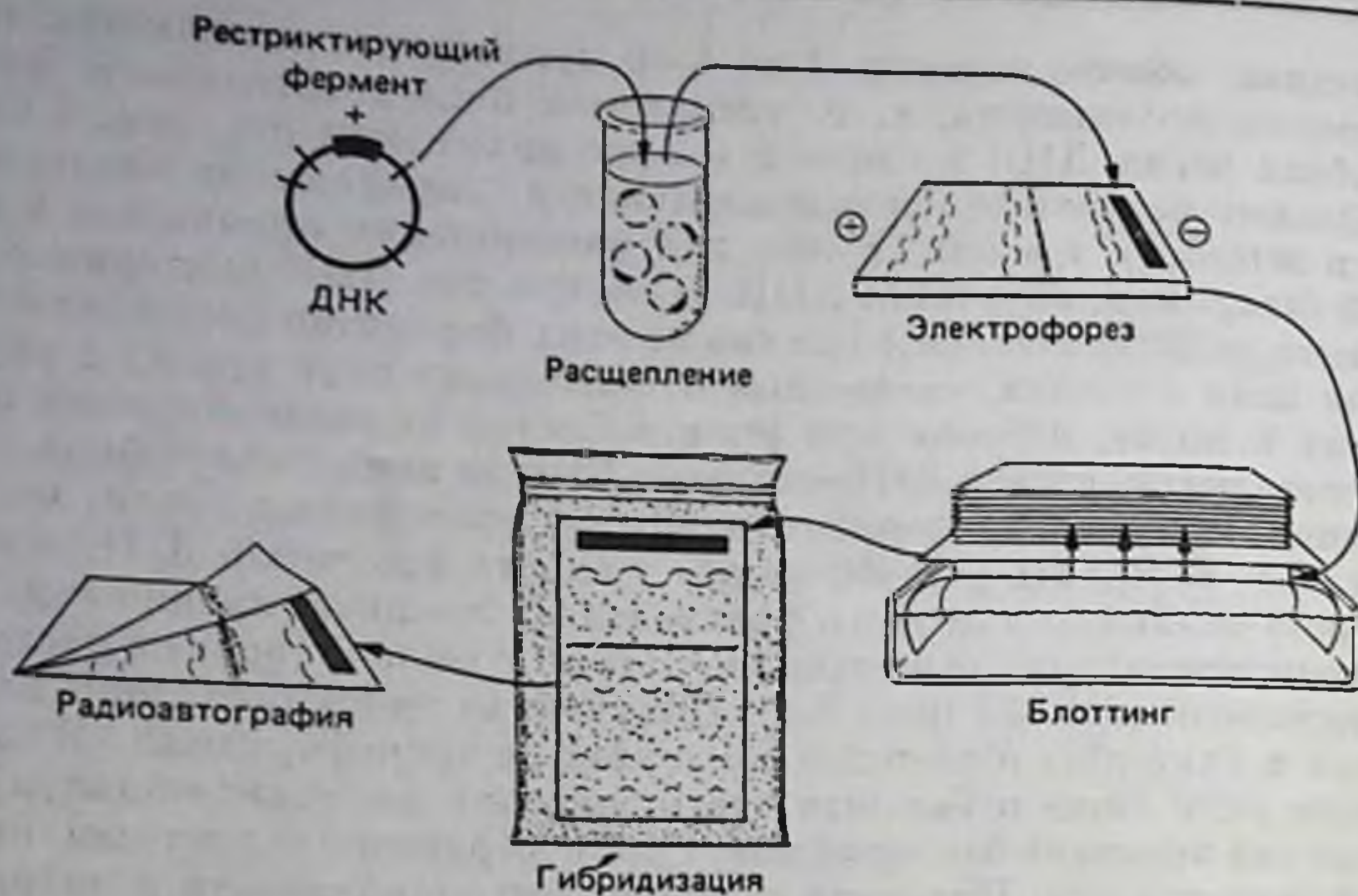


Рис. 8.2. Блоттинг по Саузерну. Этот мощный метод [11] позволяет определить длину фрагмента ДНК, содержащего нужный ген (обозначен толстым черным прямоугольником). Расщепленную рестриктазой ДНК наносят в стартовую лунку (черная полоса) агарозного геля и проводят электрофорез; меньшие фрагменты движутся в геле с большей скоростью и разделяются по размеру на полосы, находящиеся на различных расстояниях от старта. ДНК этих полос переносят на лист нитроцеллюлозы (внизу справа). Стопка сухих бумажных

полотенец над фильтром просасывает буфер через гель за счет капиллярных сил. Фрагменты ДНК при этом переносятся на фильтр и задерживаются на нем, воспроизводя исходную картину разделенных полос. После фиксации ДНК на фильтре запеканием нитроцеллюлозу запаивают в пластиковый мешок с радиоактивным зондом (точки), комплементарным гену. Фильтр отмывают от несвязавшегося зонда и выдерживают его в контакте с рентгеновской пленкой, чтобы обнаружить радиоактивность, связанную с искомым геном.

области, в) в гаметной ДНК гены *V* и *C* расположены далеко друг от друга, и г) они существенно сближаются при активной экспрессии генетической информации в клетках κ -секретирующей миеломы. Метод, с помощью которого эти данные были получены, получил название «блоттинга по Саузерну» и начиная с 1975 г., когда он был описан Саузерном (11), является одним из наиболее мощных инструментов молекулярного биолога.

Для того чтобы проиллюстрировать сказанное, представим клонированный в плазмиде гипотетический ген «X». Если плазмидную ДНК разрезать одной из рестриктаз, например *AvaII*, то с помощью блоттинга по Саузерну можно получить ответ на вопрос: каков размер фрагмента ДНК, содержащего ген X? ДНК, гидролизованную *AvaII*, наносят на агарозный гель и проводят электрофорез (рис. 8.2). При электрофорезе фрагменты ДНК в соответствии с их размером образуют четкие зоны — меньшие фрагменты движутся в геле быстрее. Кольцевая рекомбинантная плазида, содержащая, например, пять участков узнавания *AvaII*, будет разрезана на шесть фрагментов; после электрофореза фрагменты можно выявить с помощью ДНК, меченой флуоресцентным красителем — бромистым этидием, и сравнить их положение с положением полос, образованных в том же геле маркерными молекулами ДНК с известными размерами. Чтобы определить, какая из пяти полос содержит ген X, фрагменты ДНК переносят на нитроцеллюлозный фильтр, при этом на нитроцеллюлозной копии сохраняется исходное относительное расположение полос. Затем ДНК фикси-

руют на фильтре и фильтр инкубируют с радиоактивным ДНК-зондом, содержащим либо фрагмент гена *X*, либо высокомолекулярную ему последовательность. Радиоактивный зонд связывается (или «гибридизуется») с фиксированной на фильтре ДНК, содержащей ген *X*, но не с другими фрагментами плазмидной ДНК. После тщательной промывки для удаления несвязавшегося зонда фильтр накладывают на чувствительную к рентгеновским лучам фотопленку и положение радиоактивной гибридизующейся полосы выявляют в виде пятна на радиоавтограмме. Наиболее впечатляющее достоинство этого метода состоит в том, что с его помощью в геномной ДНК, расщепленной *Ava*II, можно обнаружить интересующий нас ген *x*, составляющий менее одной миллионной от всей нанесенной на гель ДНК, в то время как окраска бромистым этидием дает одно сплошное пятно (диффузный отпечаток).

8.1.4. Наличие лишь одного гена *Cx* у мышей

Результаты блоттинга по Саузерну [12, 13] позволяют утверждать, что, в согласии с гипотезой Дрейера — Беннетта, в геноме мыши существует только один ген *x*. В типичных экспериментах ДНК из сперматозоида мыши (или из любой нелимфоидной ткани) гидролизуют рестриктазой *Eco*RI, фракционируют с помощью электрофореза и переносят на нитроцеллюлозу. В качестве зонда использовали фрагмент клона *x*-кДНК, содержащий *C*-последовательность. Радиоактивно меченный зонд гибридизовали с перенесенной на фильтр геномной ДНК. Выявление на радиоавтограмме лишь одной полосы (размером около 16 тпн) свидетельствовало о наличии только одного гена. Вероятность того, что два гена *C* находятся в двух разных, случайно совпадающих по величине *Eco*RI-фрагментах, весьма невелика, поскольку при использовании нескольких других рестриктаз в опытах с блоттингом по Саузерну также была выявлена лишь одна *Cx*-полоса. Вывод об уникальности гена *Cx* нашел подтверждение при определении нуклеотидной последовательности нескольких *x*-мРНК, а также кДНК и геномных клонов; во всех случаях нуклеотидная последовательность оказалась одинаковой.

8.1.5. Множественность генов *V*

Совершенно иные результаты получаются при использовании для гибридизации (после блоттинга) зонда, содержащего *V*-область кДНК: всегда выявляется несколько полос (см., например, [12—15]). Для определения количества различных генов, гибридизующихся с такими зондами, Сейдман и др. [12, 14] применили двумерный блоттинг. *Eco*RI-фрагменты гаметной ДНК фракционировали колоночной хроматографией с обращенной фазой (RPC-5). Полученные фракции разделяли электрофорезом, переносили на фильтры и гибридизовали с генами *V* из кДНК клонов, полученных из двух различных миелом мыши. С помощью двумерной системы удалось разделить некоторые фрагменты, мигрирующие при обычном одномерном разделении, однако число определяемых этим методом различных генов все же дает лишь минимальную оценку. На каждой из радиоавтограмм выявлялось от шести до десяти полос с различной интенсивностью; для двух разных *V*-ДНК-зондов был получен разный набор полос. Авторы пришли к выводу, что каждый из зондов выявляет семейство родственных генов *V*, обладающих различной степенью гомологии с зондом. Как будет видно из дальнейшего изложения, этот вывод нашел подтверждение в последующих экспериментах по клонированию, что позволило приблизительно оценить величину репертуара гаметных генов *V*.

8.1.6. Гены *V* и *C* соединяются в В-лимфоцитах

Как правило, гаметные гены *V*, выявляемые в гаметной ДНК методом блоттинга по Саузерну, мигрируют отдельно от генов *C*, что согласуется с выводом о раздельном расположении генов *V* и *C* в гаметном геноме. Модель Дрейера — Беннета предсказывала, что экспрессии гена *V* в антителообразующей клетке должно предшествовать перемещение этого гена в гаметном геноме и соединение с геном *C*. Появление метода блоттинга по Саузерну позволило проверить эту гипотезу. Схема постановки эксперимента приведена на рис. 8.3. Если ген *V* сближается с геном *C*, то при блоттинге миеломной ДНК, рестриктированной эндонуклеазой, гибризирующая с *C*-зондом полоса должна переместиться из положения, характерного для гаметной ДНК. Полоса, соответствующая новой, «перестроенной» ДНК, может стать больше, меньше или же случайно совпасть по размеру с гаметной полосой в зависимости от локализации сайта (*V* — *C*)-рекомбинации и расположения сайтов расщепления рестриктазой в участках, окружающих гены *V* и *C*. Если на ДНК воздействовать рестриктазой, сайт узнавания которой находится ближе к *C*-области, чем участок рекомбинации *V* — *C* (см. незаштрихованные треугольники на рисунке), то рекомбинация не повлияет на размер *C*-области. Аналогично этому в миеломе может перестроиться одна из полос *V*-области. При использовании рестриктазы, сайты узнавания которой расположены более благоприятно для рестрикции (показаны стрелками на рисунке), гибридизация как с *C*-, так и с *V*-зондом выявит один и тот же фрагмент ДНК. Результаты блоттинга по Саузерну миеломной ДНК подтвердили наличие «перестроенных» генов капса-цепей в миеломах

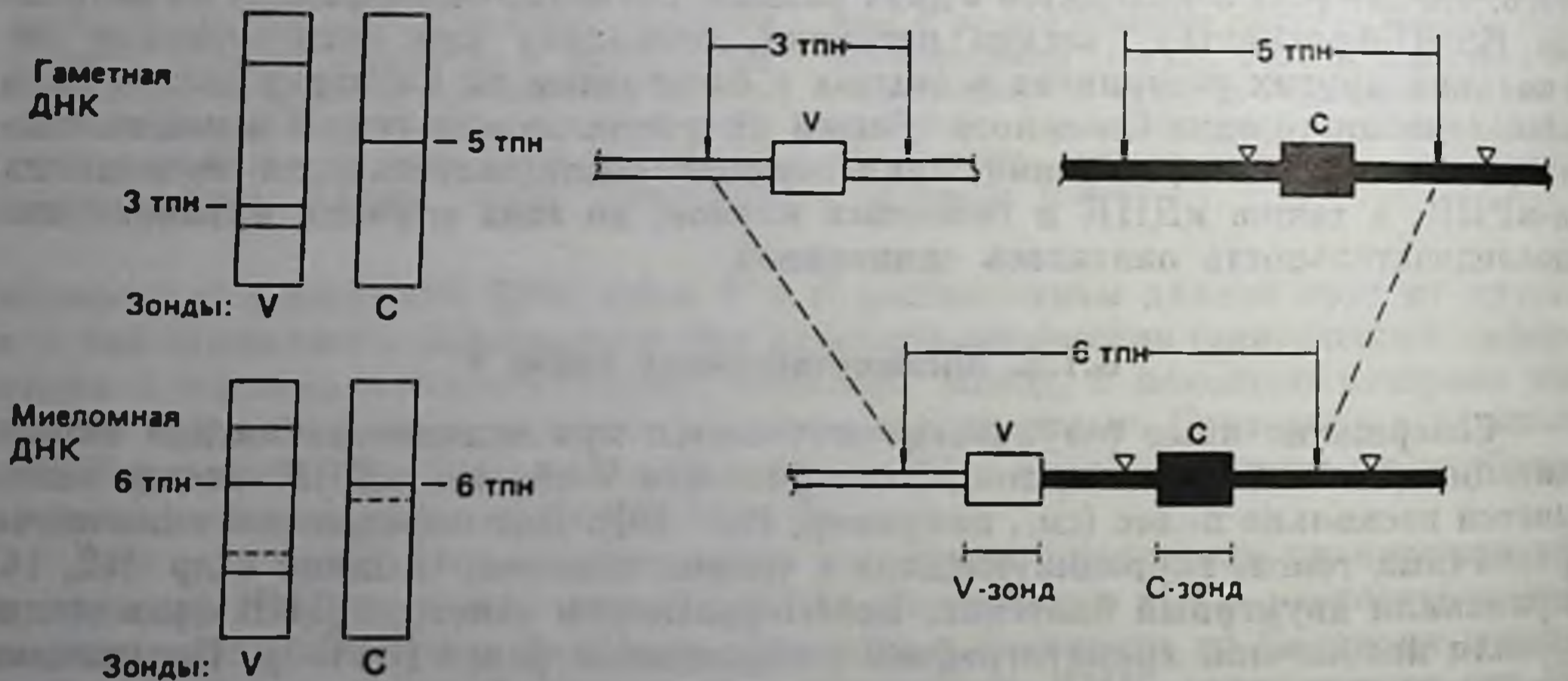


Рис. 8.3. Выявление с помощью блоттинга по Саузерну перестроек в генах *V*- и *C*-областей иммуноглобулинов.

На условно изображенном гене сайты расщепления *EcoRI* обозначены стрелками. В гаметной ДНК (верхний рисунок) *V*- и *C*-гены находятся на неизвестном расстоянии друг от друга и при блоттинге по Саузерну обнаруживаются в *EcoRI*-фрагментах длиной соответственно 3 и 5 тпн. Зонд из *V*-области гибридизуется также с некоторым числом родственных генов (полосы выше и ниже полосы в 3 тпн). В миеломной ДНК

(нижний рисунок) гены *V* и *C* сблизились так, что (в данном примере) участки *EcoRI*-расщепления между ними отсутствуют и они входят в состав одного и того же *EcoRI*-фрагмента длиной 6 тпн, который гибридизуется с обоими зондами. Фрагменты исходного размера (прерывистые линии) могут сохраняться или не сохраняться в миеломах в зависимости от того, присутствуют ли в них обе гомологичные хромосомы. (В некоторых миеломах присутствуют обе хромосомы, причем обе в перестроенном виде.)

в отличие от нелимфоидной ДНК¹. Гены, служившие контролем (такие, как ген глобина), в миеломах изменены не были. Эти результаты подтвердили правоту гипотезы Дрейера — Беннетта и привели к пересмотру концепции, утверждающей, что во всех клетках организма набор генов идентичен [16, 17].

Нормальный лимфоцит представляет собой диплоидную клетку, содержащую две копии аутомсомных генов. Если ($V - C$)-рекомбинация приводит к возникновению активного гена κ в одной из хромосом, то что происходит с копией гена C в гомологичной хромосоме? Если бы эта копия оставалась в неизмененной гаметной конфигурации, было бы легко объяснить аллельное исключение: неперестроенный аллель не мог бы экспрессироваться без «активации» путем рекомбинации $V - C$. Изучая этот вопрос методом блоттинга по Саузерну, Перри и др. [18], анализировали ДНК из 30 различных мышинных миелом и обнаружили, что в 15 из них наряду с перестроенной ДНК имеется и «гаметная» полоса, а в 15 других — по 2 перестроенных полосы. Эти результаты противоречат приведенной выше простой модели аллельного исключения и ставят вопрос о природе перестройки во «втором» геноме этих клеток, что мы рассмотрим несколько позже.

8.1.7. Геномные клоны

Получение клонов к ДНК κ -цепей — источника гибридизационных зондов — позволяет клонировать гены V и C из нелимфоидной геномной ДНК и перестроенные гены $V - C$ из ДНК миелом. Эти геномные гены были немедленно использованы для детального изучения перестроек $V - C$. Дополнительным стимулом для получения геномных κ -генов послужило следующее обстоятельство: сравнение геномных клонов и клонов к ДНК для других генов, в частности для генов λ L-цепей мыши, выявило совершенно неожиданную особенность геномных клонов, присущую также и κ -генам, а именно наличие в них «интронов» [19].

Интронами, или вставочными последовательностями, называют участки ДНК, не представленные в зрелых мРНК (и соответственно не кодирующие аминокислот) и располагающиеся между кодирующими последовательностями геномных генов. В некоторых генах имеется множество интронов, общая длина которых превышает длину кодирующих последовательностей. Функция всех этих некодирующих участков ДНК неизвестна. При образовании РНК-копии гена интроны транскрибируются вместе с кодирующими последовательностями, но затем вырезаются при созревании («процессинге») РНК. В результате первичный РНК-транскрипт превращается в зрелую мРНК. Какие именно особенности первичного транскрипта служат сигналами для того, чтобы вырезание интронных последовательностей в процессе созревания происходило с большой точностью, пока не вполне ясно, однако определение нуклеотидных последовательностей большого числа генов позволило установить, что на концах всех интронов располагаются близкие по последовательности участки. В частности,

¹ Значительные успехи в изучении генов перестроек в лимфоидных клетках были достигнуты при сравнении результатов блоттинга по Саузерну ДНК из этих клеток и ДНК из нелимфоидных клеток. При этом считалось, что любая нелимфоидная ДНК эквивалентна гаметной ДНК, хотя истинная гаметная ДНК может быть получена только из сперматозоидов. Однако сравнение картин блоттинга ДНК спермы и ДНК других нелимфоидных клеток при использовании обычных рестриктаз не выявило никаких различий. Хотя рестриктазы, чувствительные к метилированию ДНК, могут давать различные результаты в зависимости от ткани, все данные, обсуждаемые в этой главе, получены с помощью ферментов, лишенных этого свойства. Таким образом, упоминаемые в этой главе нелимфоидные ДНК обычно (хотя и не вполне строго) называются гаметными вне зависимости от того, получены ли они из сперматозоидов, целых эмбрионов, печени или других нелимфоидных тканей.

все интроны начинаются с GT... и оканчиваются на ...AG [20]. Представляло интерес выяснить, имеются ли интроны в геномных генах Ig.

По методическим причинам геномные гены обычно клонируют не в плазмидах, а в бактериофагах. Для этих целей на основе фага λ *E. coli* сконструирован ряд векторов с повышенной эффективностью клонирования. Процесс клонирования начинают с того, что линейную молекулу ДНК (хромосому) такого «сконструированного фага» расщепляют рестриктазой для удаления центральной области хромосомы, которая содержит ряд генов бактериофага, необходимых для поддержания лизогенного состояния, но не требующихся для размножения фага. Вместо этой центральной области между оставшимися «плечами» ДНК фага λ вставляют фрагмент чужеродной ДНК — обычно рестрикционный фрагмент геномной ДНК. Полученные рекомбинантные молекулы ДНК «упаковывают» *in vitro* в головки фага и таким рекомбинантным фагом заражают газон *E. coli*, выращиваемый на чашке с агаром. Каждая из появляющихся прозрачных бляшек содержит потомство одного рекомбинантного фага, несущего один тип вставки, которая таким образом клонируется. Обычно на 10^6 клонов приходится один клон с нужной вставкой. Для выявления столь редко встречающихся клонов разработаны высокоэффективные методы отбора. Они включают перепечатывание на нитроцеллюлозный фильтр бляшек, появившихся на чашках. Нужную бляшку находят по гибридизации ее ДНК с радиоактивным кДНК-зондом. Из идентифицированной таким образом бляшки можно получить чистую культуру бактериофага, а из нее — большое количество фаговой ДНК со вставкой.

Разработаны две стратегии клонирования, несколько различающиеся по способу приготовления фрагментов геномной ДНК, предназначенных для включения в фаг. При одном из способов геномная ДНК полностью расщепляется рестриктазой, которая, согласно предварительным опытам с блоттингом по Саузерну, дает фрагмент подходящего размера, содержащий нужный ген. Преимущество этого метода состоит в том, что перед упаковкой искомого фрагмента его можно частично очистить с помощью препаративного электрофореза. Поэтому после упаковки требуется проанализировать значительно меньше бляшек для выявления искомого фага. Другой метод включает использование рестриктазы, участки узнавания которой часто повторяются в ДНК. Расщепление, однако, останавливают после образования лишь очень небольшого числа разрывов. При этом искомым ген будет входить в состав ряда разных фрагментов, длина которых зависит от того, в каком из участков узнавания произойдут разрывы в разных копиях гена. После введения этой смеси фрагментов в фаг получают «библиотеку» клонов, обладающую рядом преимуществ. Одно из них состоит в том, что при последовательном просмотре одной и той же библиотеки можно получить много разных генов, так как этап очистки ДНК, при котором удаляется большое число генов, в этом случае выпускается. Кроме того, при поиске нужного гена в библиотеке обычно получают набор перекрывающихся клонов, суммарный размер ДНК которых больше, чем может вместиться в один клон. Более того, вырезав новый зонд с одного из концов комбинированного сегмента и повторив с помощью этого зонда скрининг библиотеки, можно получить новый набор перекрывающихся клонов и таким образом расширить область клонированной ДНК, прилегающую к искомому гену. Последовательное применение этого метода (называемого также «прогулкой по геному») позволяет получить длинные участки клонированной ДНК, которые могут включать несколько генов.

8.1.8. Перестроенный геномный клон

Тем или иным из описанных выше методов был клонирован ряд перестроенных мышечных генов κ . Как показал анализ нуклеотидных последовательностей, все они очень похожи по общему строению, примером которого служит структура первого полностью проанализированного гена κ из миеломы МОРС 41 [21]. Ко времени клонирования этого гена уже была расшифрована химическими методами первичная структура κ -цепи, секретлируемой МОРС 41, и показано, что она содержит «лидер», или сигнальную последовательность, длиной в 22 аминокислоты. (Сигнальные пептиды обнаружены на *N*-концах всех предназначенных для секреции белков; после того как возможность секреции белка обеспечена, эти последовательности отщепляются специфическими пептидазами.) Путем сравнения аминокислотной и нуклеотидной последовательностей была установлена кодирующая область гена. Последовательность начиналась с иницирующего кодона АТG (Met) в положении -22 (остатки сигнального пептида отсчитываются в обратную сторону от точки его отщепления) и совпадала с аминокислотной последовательностью до остатка -4 (Gly). Кодон -4 между первым и вторым нуклеотидами содержал интрон в 129 нуклеотидов. После этого интрона последовательность гена химически соответствовала определенной последовательности аминокислот сигнального пептида и всей *V*-области. На *C*-конце гена *V* кодон $+108$ между первым и вторым нуклеотидами содержал интрон длиной 3,7 тпн, после которого шла кодирующая последовательность *C*-области, не прерываемая никакими интронами. Такая общая структура — короткий интрон (около 100 пн) в кодоне -4 и длинный (>1 тпн) интрон между генами *V* и *C* — была обнаружена для всех функционально перестроенных генов κ , а также для генов λ и *H* (хотя *C*-области *H*-цепей устроены более сложно).

8.1.9. Геномные гены *V* и *C*

После получения перестроенного гена представлялось интересным сравнить его с «родительским» гаметным геном V_{κ} , подвергшимся перестройке в МОРС 41. При клонировании гаметного гена V_{κ} , однако, возникло затруднение — зонд, специфический к области V_{κ} из МОРС41, мог гибридизоваться не только с истинным гаметным геном V_{κ} , но и с другими гомологичными генами V_{κ} , как это показано на двумерной картине блоттинга по Саузерну (рис. 8.4). Для того чтобы найти истинный «родительский» ген V_{κ} , Сейдман и др. [21] проверили методом Саузерна несколько различных фракций генома, содержащих гены *V*, гомологичные гену κ МОРС41, используя характерный признак активно перестроенного гена МОРС41 — наличие рестрикционного фрагмента длиной 1 тпн между участками расщепления EcoRI и KpnI, расположенными со стороны 5'-конца гена *V*, т. е. вне его последовательности (рис. 8.4). Этот фрагмент был обнаружен лишь в одной из геномных фракций. Из этой фракции и был клонирован гаметный ген *V* МОРС41 [21].

В области, гомологичной для двух клонов, последовательность гаметного гена V_{κ} МОРС41 точно совпала с последовательностью перестроенного гена. Эти данные противоречили гипотезе, объясняющей разнообразие Ig соматическими мутациями (в крайней ее форме), так как они показали, что по крайней мере некоторые из гаметных генов не подвержены таким мутациям и могут экспрессироваться в неизменном виде. Кроме того, эти данные наряду с другими противоречили модели «мини-генов», объясняющей разнообразие *V*-областей Ig тем, что гипервариабельные и каркасные участки *V*-области закодированы в гаметном геноме в виде отдельных отрезков.

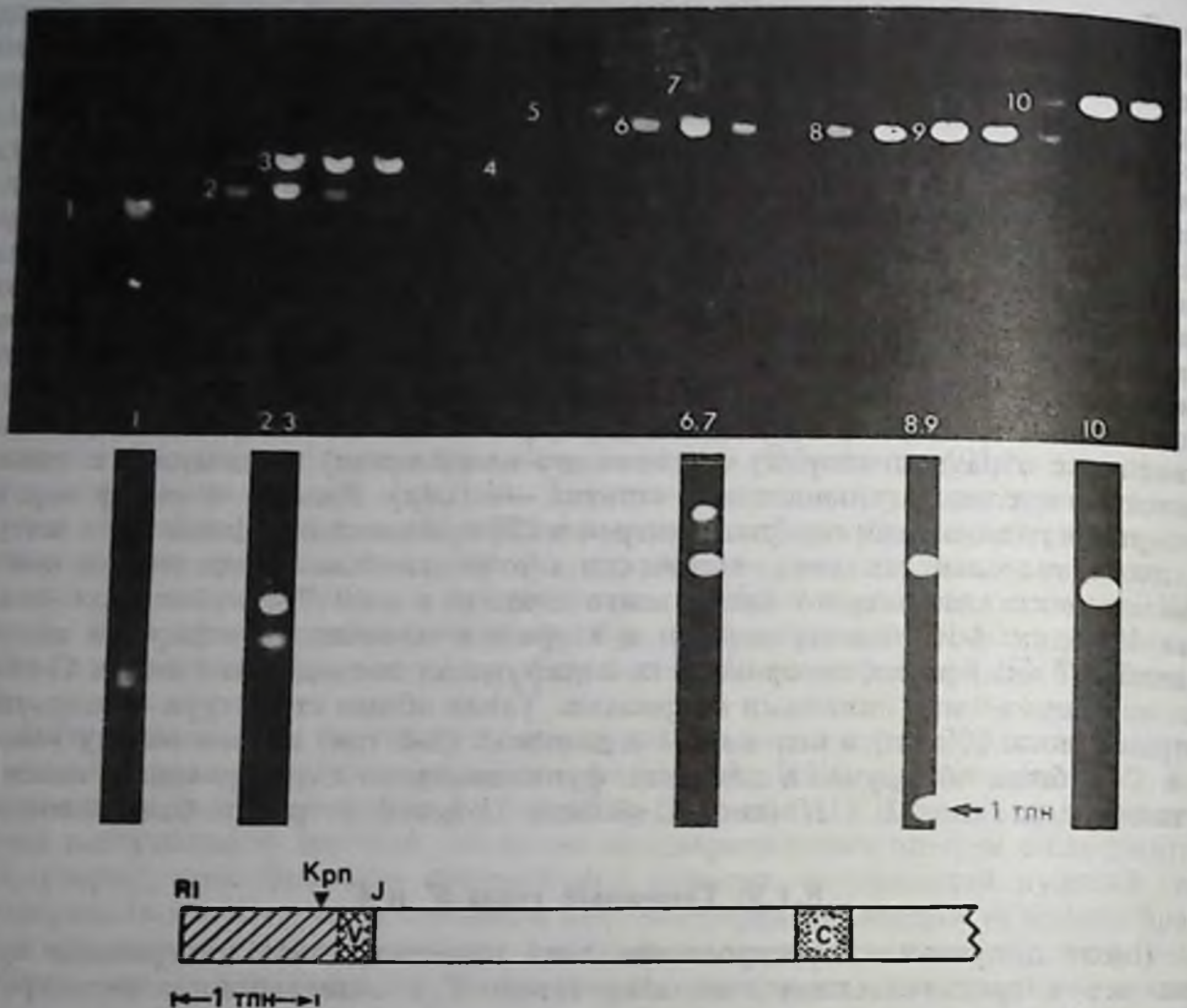


Рис. 8.4. Идентификация гаметного предшественника для гена *V* MORC41.

Вверху: картина двумерного переноса расщепленной *EcoRI* ДНК эмбрионов мыши (равноценная гаметной ДНК). Фрагменты фракционировали на колонке RPC-5 и индивидуальные фракции наносили на отдельные дорожки агарозного геля. После электрофореза, переноса и гибридизации с зондом, вырезанным из *V*-области клонированной кДНК MORC41, было обнаружено около 10 различных полос, любая из которых могла содержать гаметный предшественник гена *V*. Для того чтобы выявить полученную с RPC-5 фракцию, содержащую истинный ген-предшественник, гибридизующиеся фракции расщепляли дополнительно *KpnI*, разделяли электрофорезом и переносили на другой нитроцеллюлозный фильтр. В выделенном

из ДНК MORC41 перестроенном геномном клоне *V + C* имеется сайт расщепления *KpnI*, расположенный на расстоянии 1 тпн от 5'-концевого сайта расщепления *EcoRI* (см. схему внизу). Предполагая, что ген-предшественник должен содержать те же участки расщепления *EcoRI* и *KpnI*, Сейдман и др. [21] ввели радиоактивную метку в *EcoRI*-*KpnI*-фрагмент и гибридизовали его с описанным выше вторым фильтром (в центре) в поисках фракции, содержащей фрагмент *EcoRI*-*KpnI*, идентичный обнаруженному в перестроенном гене мшеломы. Такой фрагмент был найден только во фракциях 8 и 9, и клонирование гаметного предшественника для гена *V* было проведено именно из этих фракций [21] (воспроизводится с разрешения).

Хотя последовательности нуклеотидов гаметного и перестроенного генов точно совпали, гомология между этими двумя генами резко обрывалась на кодоне 95. Участок, включающий в себя остатки 96—108, всегда рассматриваемый как часть *V*-области и кодируемый неразрывно с основной ее частью в пере-

строенном гене, в гаметном V-клоне отсутствовал. Этот факт не был абсолютно неожиданным, так как ранее в лаборатории Тонегавы (Tonegawa) при изучении системы λ-генов мышей было показано, что аналогичный участок, названный J-областью (от англ. join — соединять), в гаметном гене кодируется вблизи 5'-конца C-области, а не вблизи гена V. Поскольку в перестроенном гене MOPC41 остатки J-области были закодированы на расстоянии 3,7 тпн от 5'-конца гена C, можно было ожидать, что эта область будет присутствовать на том же расстоянии от гена C и в гаметном клоне. Более того, так как обнаруженные в других перестроенных клонх x большие интроны между областями V и C составляли по длине менее 3,7 тпн, можно было ожидать наличия и других фрагментов, кодирующих J-области, расположенных несколько ближе к гену C.

Когда были получены клоны гаметных генов C-областей и определена их нуклеотидная последовательность, оказалось, что существует пять J-сегментов; они разделены примерно 0,3 тпн и занимают участок, расположенный на расстоянии от 3,7 до 2,5 тпн от 5'-конца гена C [22, 23]. Сегменты J1, J2, J4 и J5 (нумерация начинается с гена J, наиболее удаленного от гена C) кодировали аминокислотные последовательности, найденные в одной или нескольких миедомных x-цепях мыши, первичные структуры которых были определены, и соответственно остатки с 97 по 108 всех x-цепей BALB/c совпадали с одним из этих четырех гаметных генов J. С другой стороны, сегмент J3 кодировал последовательность, никогда не наблюдавшуюся в каппа-цепях. Более того, в отличие от четырех других генов J в гене J3 отсутствовал общий для всех генов сигнал сплайсинга, позволяющий удалять большой интрон при созревании РНК (обязательная, по-видимому, последовательность GT... была заменена на СТ...). По двум этим причинам считается, что сегмент J3 представляет собой нефункциональный J-сегмент.

8.1.10. Сайт-специфическая рекомбинация

При сравнении нуклеотидных последовательностей клонов гаметных генов V и C можно точно указать сайт, в котором произошло соединение гаметных

91	92	93	94	95		
Tyr	Ala	Ser	Ser	Pro	-----	
TATGCTAGTTCCTCCACAGTGATA						Эмбриональный VK41
TATGCTAGTTCCTCCGTTGGACGTTCCGT						Перестроенный MOPC41
GTACTACCACGTGGTGGACGTTCCGT						Эмбриональный J-C
					-----	TrpThrPheGly
						96 97 98 99

Рис. 8.5. Участок рекомбинации V — J гена x MOPC41.

Последовательность перестроенного и экспрессирующегося гена MOPC41 приведена вместе с последовательностью гаметного предшественника V-области (эмбриональный VK41) и гаметного предшественника J-области (эмбриональный J — C). Вертикальные линии между двумя последовательностями отмечают идентичные нуклеотиды и указывают на гаметный источник рекомбинированной последовательности. 5'-область пере-

строенного гена (слева) идентична гаметному предшественнику до второго нуклеотида кодона 95. Начиная с этой точки, перестроенный ген совпадает с предшественником J-области. Такое сравнение позволяет точно локализовать участок перехода (точку перекреста). Горизонтальными черточками отмечены палиндромный гептамер CACAGTG в гене V и комплементарный ему CACTGTG в гене J. Эти элементы, как считают, принимают участие в рекомбинации.

генов V и J1 в лимфоидных клетках, давших начало MOPC41. Как видно из рис. 8.5, перестроенный клон совпадает с гаметным клоном V до второго нуклео-

тида кодона 95; очевидно также, что перестроенная последовательность после этой точки происходит уже из *J1*. Всегда ли рекомбинация происходит точно между вторым и третьим нуклеотидами кодона 95?

Анализ аминокислотных последовательностей κ -цепей позволяет предположить, что, напротив, система рекомбинации обладает некоторой гибкостью. Выше уже было отмечено, что аминокислотные последовательности всех κ -цепей с известной первичной структурой соответствуют тому или иному гаметному

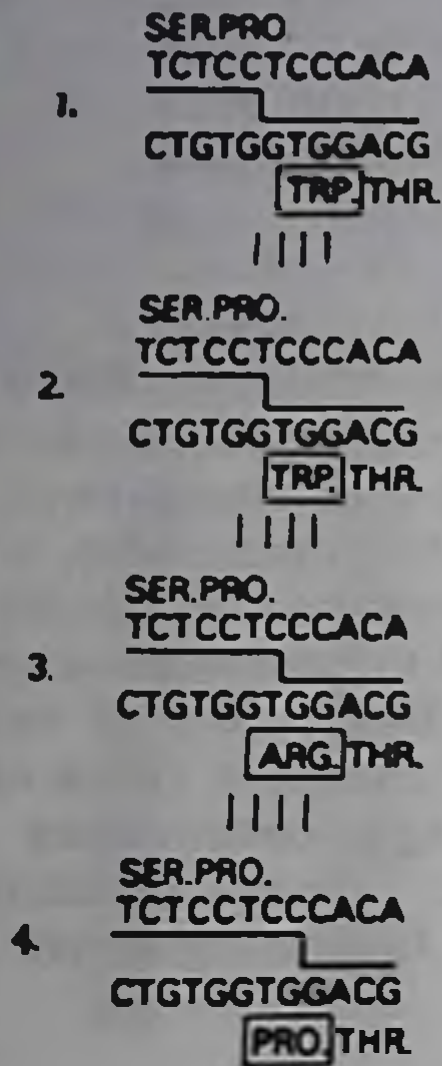


Рис. 8.6. Гибкость рекомбинационной рамки может объяснить вариабельность в кодоне 96.

Те же, что и на рис. 8.5, гаметные последовательности повторены здесь 4 раза для того, чтобы продемонстрировать результат соединения двух последовательностей в четырех различных точках. Первый пример иллюстрирует участок рекомбинации в MOPC41 — между вторым и третьим нуклеотидами кодона 95. Второй случай — соединение между кодонами 95 и 96 — приводит только к молчащей замене третьего основания кодона 95 (без замены аминокислоты). В третьем случае, при рекомбинации внутри кодона 96, TGG (Trp) изменяется на CGG (Arg). В четвертом случае кодон 96 превращается в CCG (Pro).

J-сегменту в области 97—108. Существуют, однако, κ -цепи, у которых аминокислота-96 не соответствует ни одному из гаметных *J*-фрагментов. Эти цепи могли бы кодироваться теми перестроенными генами, у которых соединение между *V*- и *J*-фрагментами произошло между разными нуклеотидами внутри кодона 96 (рис. 8.6). Это наблюдение может объяснить необычайно высокую вариабельность аминокислот в положении 96. Сравнение перестроенной и гаметной форм других генов также позволяет предположить, что точки рекомбинации в них обладают некоторой подвижностью.

8.1.11. Аберрантные перестройки

Представление о гибкости рекомбинационной системы сопряжено с одной неясностью — нелегко представить себе, каким образом при соединении *V* и *J* ферментативный аппарат рекомбинации может сочетать эту гибкость со способностью сохранять правильную триплетную рамку считывания. Изучение структуры большого числа перестроенных генов показало, что правильная рамка считывания действительно сохраняется не всегда. Было обнаружено, что ряд миелом, секретирующих κ -цепи, содержит кроме функционального экспрессируемого гена κ и «абберрантные» гены в «исключенной» хромосоме; в некоторых из этих генов рекомбинация *V* — *C* произошла с нарушением рамки считывания, что привело к возникновению последовательностей, не способных кодировать функциональные κ -цепи. Случаи эти могут быть не такими уж редкими и в некоторых клетках, возможно, происходят в обеих копиях гена κ . Очевидная расточительность такой рекомбинации может компенсироваться увеличением

разнообразие последовательностей в месте соединения $V — J$ — выигрыш, который мог сохранить в процессе эволюции рекомбинационную гибкость.

Другие типы нефункционально перестроенных генов были обнаружены при скрининге библиотек миеломной ДНК с помощью зондов C_{κ} -области; аналогичные эксперименты продемонстрировали наличие и нефункциональных генов λ и H-цепей. Многие из этих генов представляют собой ошибки без всякой, по всей видимости, полезной компенсации. Гены такого рода иллюстрируют генетический закон Мерфи (Murphy): все, что может испортиться, портится. В миеломе MPC11, например, гаметный ген V из подгруппы $V_{\kappa} 21$ присоединен к участку, находящемуся на расстоянии 1,4 тпн от 5'-конца гена C_{κ} , не соединенному ни с каким геном J [26—28]. В миеломе S107 гаметный ген V соединен с J -областью, но два кодона в месте соединения $V — J$ утеряны [25, 29]. В MPC149 фрагмент ДНК, последовательность которого, по всей видимости, не имеет отношения к гену V_{κ} , присоединен вблизи 3'-, а не 5'-конца J -области [30]. В MPC315 ген λ , перестроенный с нарушением рамки считывания, иллюстрирует еще один способ, которым ген может «испортиться»: соматическая мутация разрушила функциональный участок сплайсинга РНК на 5'-конце гена J , и транскрибированная РНК в результате не может подвергнуться правильному сплайсингу [31]. Различные типы нефункциональных генов могут вызывать появление «вторых» перестроенных полос, наблюдаемых при блоттинге по Саузерну во многих миеломных ДНК. Это может объяснить, почему клетка с двумя перестроенными генами κ способна все же синтезировать лишь один κ -Ig.

В связи с обнаружением в миеломах нефункциональных генов возникает следующий вопрос: не связано ли это с наличием в миеломной клетке нефизиологического окружения? Действительно, кроме раковой природы миелом следует учитывать и то обстоятельство, что многие из этих клеток культивируются в лабораториях в течение сроков, многократно превышающих срок жизни мышей. Для того чтобы определить частоту «вторых» перестроек в нормальных В-лимфоцитах, Коулклоф и др. [32] выделили, используя метод проточной цитофлуориметрии (FACS), κ -синтезирующие В-клетки из нормальной селезенки мыши. ДНК, выделенную из этих клеток и из мышинных эмбрионов, анализировали по Саузерну; при этом интенсивности гибридизующихся полос измеряли денситометрически. Выбор рестриктазы HindIII и гибридизационного зонда позволил авторам идентифицировать в одном образце полосу гена C (интенсивность которой не должна изменяться при рекомбинации $V — J$) и полосу гаметного J -сегмента (интенсивность которой должна уменьшаться пропорционально доле генов, подвергшихся перестройке). Отбор клеток проводили таким образом, что каждая отобранная клетка имела одну хромосому с функциональной перестройкой $V — J$. Следовательно, если бы в каждой клетке локус κ другой хромосомы не был перестроен, интенсивность гаметной J -полосы должна была бы уменьшиться на 50%. На деле интенсивность гаметной J -полосы оказалась на 1/3 ниже, чем ожидалось. Это значит, что примерно в 1/3 клеток произошла добавочная и, по всей видимости, нефункциональная перестройка гена κ .

8.1.12. Механизм рекомбинации

В поисках подхода к выяснению механизмов рекомбинации был проведен сравнительный анализ последовательностей гаметных генов V -области и гаметных генов J (рис. 8.7). Были обнаружены два консервативных блока последовательностей, которые, возможно, играют роль в рекомбинации. Первый из них — это гептамер CACTGTG, расположенный на 5'-концах генов J , и комплементарный ему (инвертированный) гептамер CACAGTG на 3'-концах генов V .

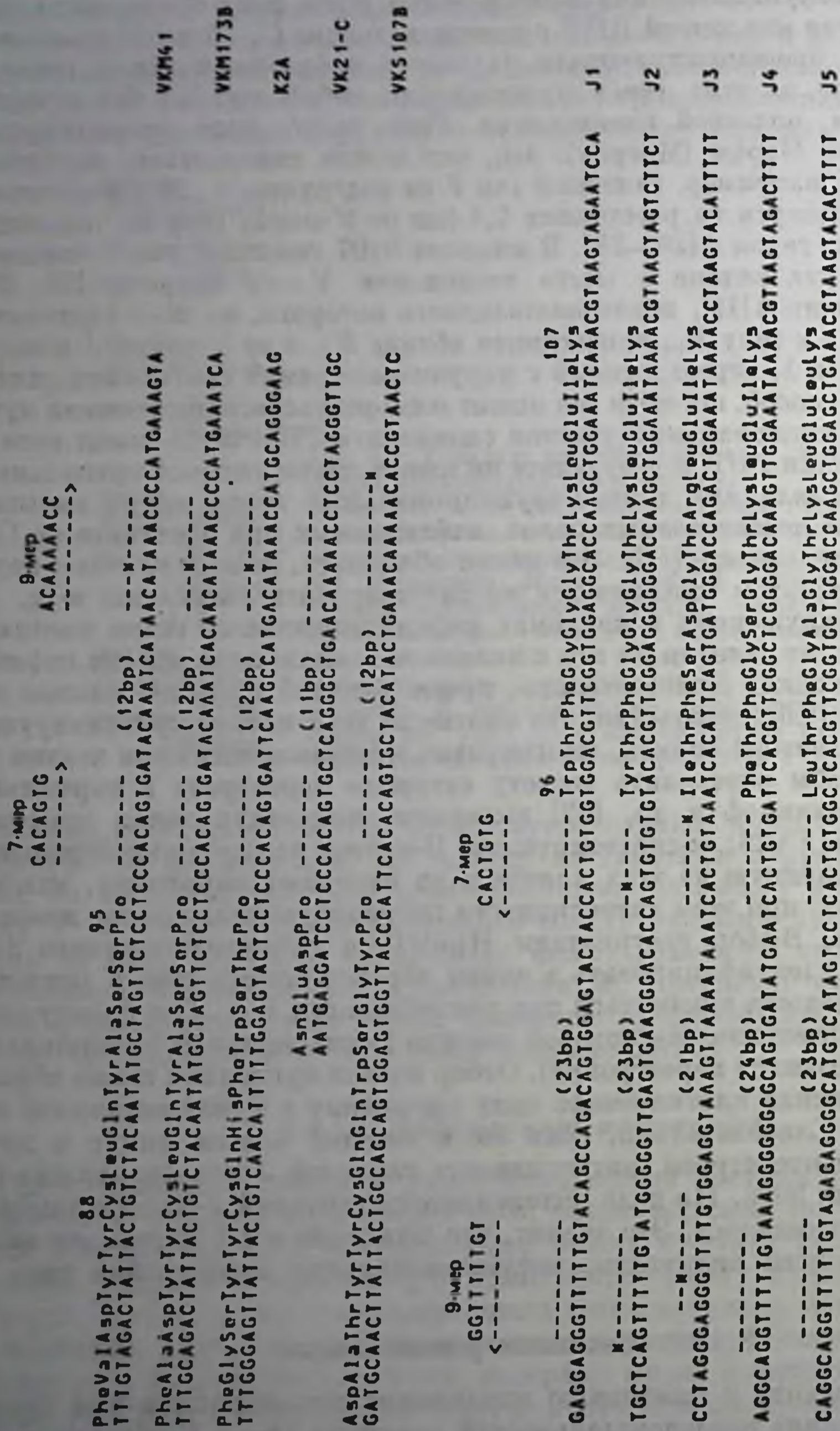


Рис. 8.7. Гомологичные элементы, прилегающие (фланкирующие) к гаметным V - и J -генам. Несколько последовательностей гаметных генов V_{\times} мыши и 5 последовательностей генов J_{\times} расставлены в соответствии с го-мологией их структур. Единственно сопоставимые последовательности в генах V и J — это обозначенные прерывистыми линиями гептамеры и нонамеры (звездочками указаны встречающиеся отличия от «идеальных» последовательностей гепта-мера и нонамера). Два этих элемента разделены промежутком (спейсером) в 11—12 пар оснований в последовательности гента-соседствующей с V -областью, и спейсером в 23—24 пары в последовательности, соседствующей с J -областью. (Единственное исключение — J3, где этот промежуток составляет 24 пн, — последовательность нефункциональна.)

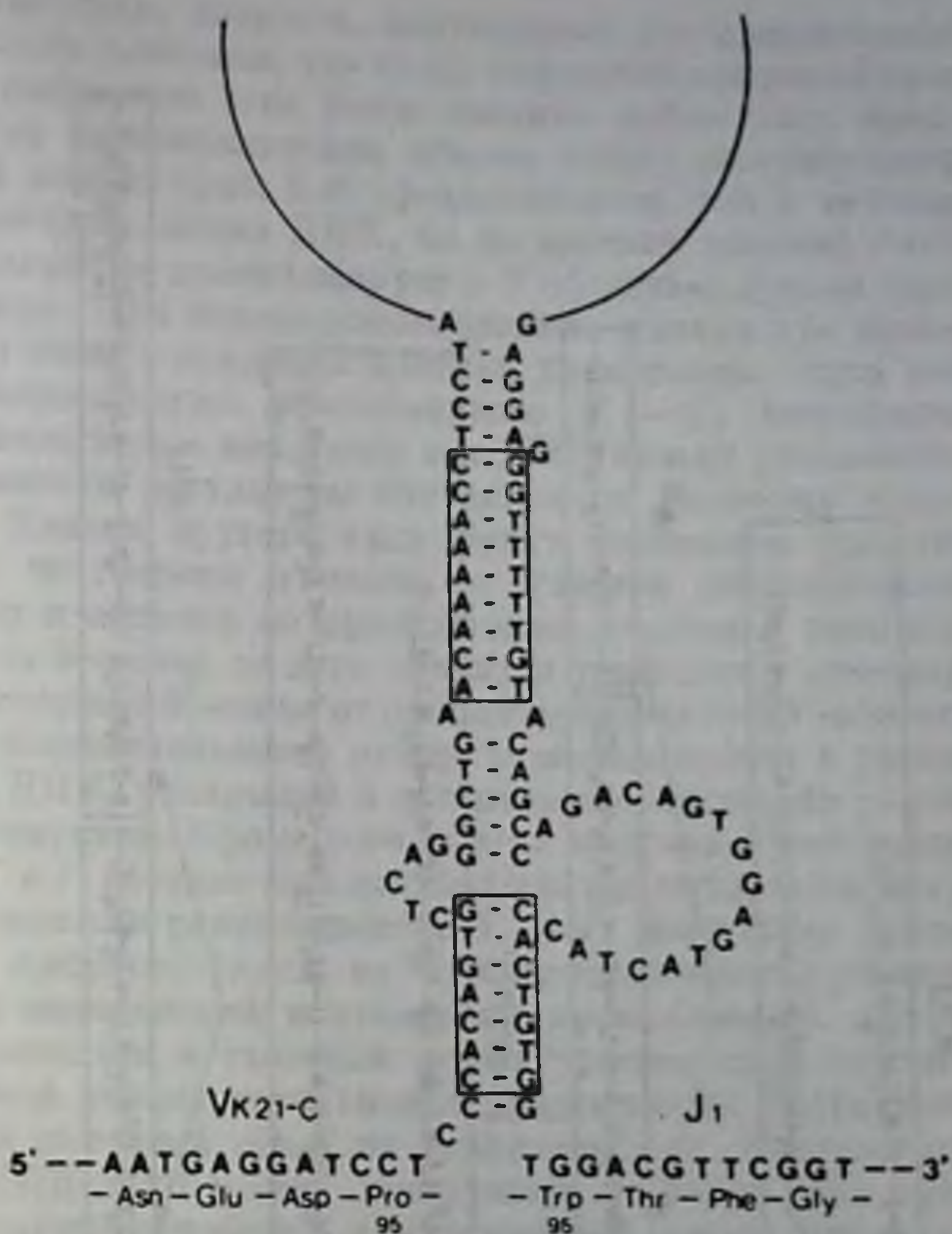


Рис. 8.8. Гипотетическая структура «стебель с петлей». Этот предполагаемый промежуточный продукт рекомбинации $V - J$ может возникать в результате комплементарности гептамерных и нонамерных элементов (обведены рамкой); при образовании пар оснований между соответствующими элементами последовательностей V и J ([170]; печатается с разрешения).

Второй — нонамер GGTTTTGT, расположенный на расстоянии 22 нуклеотидов от 5'-конца гептамера J и комплементарный ему АСАААААСС на расстоянии 11 нуклеотидов от 3'-конца гептамера V [22, 23]. Важное значение этих элементов для рекомбинации подтверждается их наличием в сходных позициях генов λ - и H -цепей, а также отсутствием по обе стороны от этих генов других консервативных последовательностей.

Комплементарность гептамеров и нонамеров, принадлежащих генам V и J , позволила предположить [22, 23], что эти элементы могут участвовать в образовании структуры «стебля и петли», являющейся промежуточной стадией рекомбинации (рис. 8.8). Такая структура, по всей видимости, в свободном виде термодинамически невыгодна, однако она могла бы стабилизироваться специфическими белками. При образовании «стебля и петли» кодирующие последовательности генов V и J сближаются; при этом они либо соединяются под действием топоизомеразы I, либо транскрибируются, образуя непрерывную цепь ДНК, по механизму «выбора копии», когда при образовании новой цепи, комплементарной последовательностям V и J , пропускается участок ДНК, входящий в «стебель с петлей». С другой стороны, последовательности гептамера и нонамера могут узнаваться участвующими в рекомбинации белками; в этом случае необходимость в образовании комплементарных пар и структуры типа «стебель с петлей» отпадает [33].

Одно из предсказаний модели «стебля и петли» состоит в том, что ДНК, образующая эту структуру, должна при рекомбинации вырезаться. Данные,

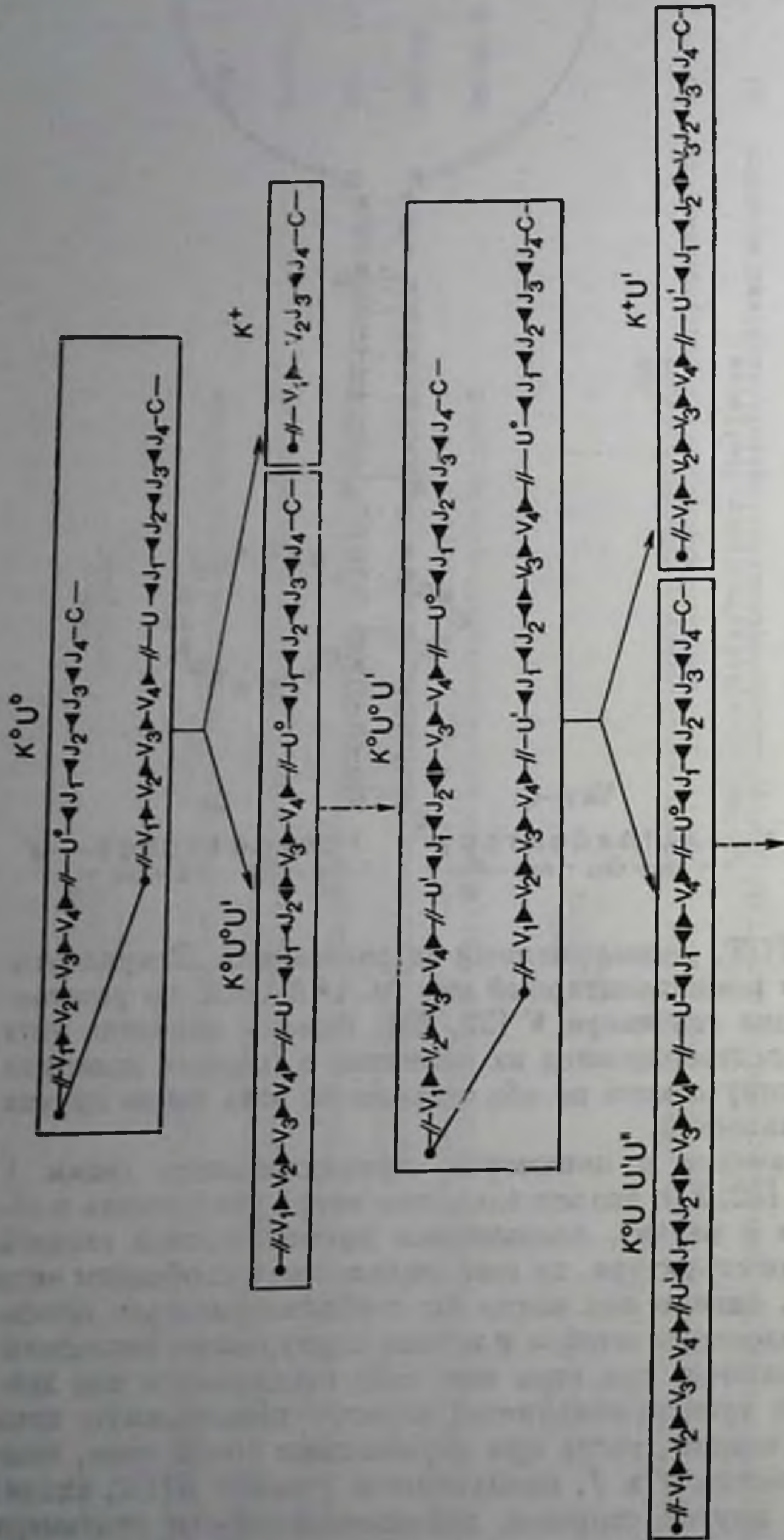


Рис. 8.9. Модель неравного обмена (кроссинговера) между сестринскими хроматидами (НОСХ). В каждом из прямоугольников изображен локус κ одной хромосомы (отцовской или материнской). Прослежены события в течение двух клеточных делений. κ^0 и κ^+ обозначают состояние гена C_κ в геноме; ген κ^0 — это гаметная конфигурация гена, а κ^+ — ген, подвергшийся функциональной перестройке V-J. «U» обозначает фрагмент ДНК, расположенный левее перестройкам (т. е. U', U''). Вследствие рекомбинации в локусе J. Черные треугольники — это гептамерный и нонамерный сигнальные элементы, примыкающие (фланкирующие) к V- и J-областям. В верхнем прямоугольнике располагаются две идентичные хроматиды в гаметной конфигурации (K⁰, U⁰), готовые для НОСХ между V₂ и J₃. Прямоугольники под ним иллюстрируют строение двух продуктов НОСХ, расходящихся по двум дочерним клеткам. В правом прямоугольнике — продукт функциональной перестройки (κ^+) между V₂ и J₃ с кажущейся делением фрагмента ДНК, расположенного между ними в гаметной конфигурации. В левом прямоугольнике — этот же фрагмент, дублированный во втором продукте обмена. Этот продукт сохраняет гаметные последовательности K⁰ и U⁰ и приобретает (вместе с дублированным фрагментом) вторую, перестроенную 5'-последовательность (U'). Содержащий продукты НОСХ локус κ дочерней клетки может подвергнуться НОСХ вторично (прямоугольники внизу); при этом могут образоваться K⁺-клетки, сохраняющие перестроенную 5'-последовательность (K⁺U', прямоугольник справа). Черные треугольники, расположенные навстречу друг другу, представляют продукты рекомбинации по фланкирующим маркерам ([35], печатается с разрешения).

полученные на нескольких миеломах, казалось, подтвердили это предположение, но более поздние результаты показали, что такое вырезание сопровождается рекомбинацией не всегда. В результате этих более поздних работ была предложена модель, основанная на неэквивалентном обмене между сестринскими хроматидами [35, 36]. В этой модели (рис. 8.9) предполагается, что в течение части клеточного цикла (после репликации ДНК, но до деления клетки) *J*-область одной из хроматид реципрокно рекомбинирует с *V*-областью другой хроматиды путем взаимного обмена. При последующем делении клетки две новые хроматиды расходятся, давая начало дочерным клеткам двух типов. Один тип клеток будет содержать «нормальную» рекомбинацию *V — J*, описанную выше. Эти клетки будут выглядеть так, как будто вся ДНК между рекомбинировавшими *V* и *J* делегирована и результаты блоттинга по Саузерну будут подобны описанным ранее. Клетки другого типа будут содержать продукт реципрокной рекомбинации: со стороны 5'-конца от участка рекомбинации будут располагаться гептамер и нонамер из принимавшей участие в рекомбинации *J*-области, а со стороны 5'-конца от него появятся гептамер и нонамер, располагавшиеся до этого со стороны 3'-конца от рекомбинировавшей *V*-области (рис. 8.9). В этих клетках последовательность между участвовавшими в рекомбинации *V* и *J*, т. е. участок ДНК, удаляемый в процессе «нормальной» рекомбинации *V — J*, будет дублирован. Кроме того, в этих клетках будет содержаться полный набор генов *V* и *J*, которые при дальнейшей рекомбинации могут дать начало совершенно правильным рекомбинантам *V — J*. Поскольку рекомбинация эта происходит в пределах одной из дублированных хромосом (а не между гомологичными материнской и отцовской хромосомами), другая хромосома может при этом остаться в гаметной конфигурации либо принять участие в другой, независимой последовательности аналогичных перестроек. Во всех случаях ни на одной из стадий ген *C* не дублируется. Поэтому при блоттинге по Саузерну геномной ДНК можно обнаружить не более двух гомологичных копий (принадлежащих отцовской и материнской хромосомам) вне зависимости от числа произошедших в данной клеточной линии обменов между сестринскими хроматидами.

Эта модель позволяет сделать важное предсказание, не укладывающееся в простую модель «делеция петли»: часть клеток должна содержать продукты реципрокной рекомбинации с прилежащими друг к другу гептамерами *V* и *J* и фланкирующими (расположенными по обе стороны) нонамерами. Это предсказание подтвердили Хехтль и др. [36], сообщившие о клонировании и секвенировании таких фрагментов (названных авторами продуктами «фланкирующей» рекомбинации) из трех различных миелом (рис. 8.10). Ни в одном из этих трех случаев продукт рекомбинации, включающий фланкирующие последовательности, не был обнаружен в клетке, содержащей нормальный *V — J*-продукт. Именно такой результат и был предсказан моделью, так как продукты взаимной рекомбинации всегда должны расходиться по разным дочерным клеткам. Во всех трех случаях фрагмент, происходящий от *J*-области, принадлежал гену *J1*. Фрагменты, происходящие от *V*-области, не соответствовали ни одной из опубликованных к тому времени последовательностей гаметных *V*-областей, но, используя в качестве зонда происходящий от гена *V* фрагмент из 3'-области одного из фланкирующих продуктов, Хехтль и др. [36] смогли проклонировать соответствующий ему гаметный ген *V*. Оказалось, что все три продукта, содержащие фланкирующие последовательности, обладают интересным свойством: оба гептамера прилегают друг к другу так плотно, что между ними нет ни одного промежуточного нуклеотида. Для получения правильных реципрокных продуктов при перестройках *V-J* в MOPC41, MOPC173B и S107B, согласно пред-

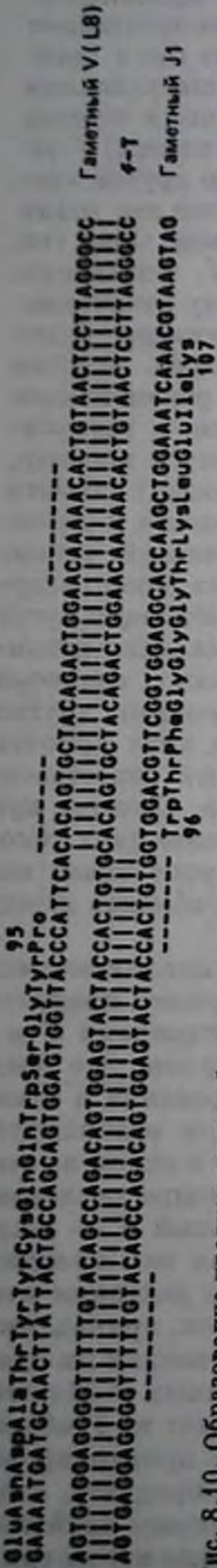


Рис. 8.10. Образование продукта рекомбинации, содержащего фланкирующие последовательности из гаметных предшественников. Последовательность образующегося при такой рекомбинации продукта «I — T» [36] приведена вместе с последовательностями гаметного гена VL8 [36] и J1 мыши. Вертикальные линии соединяют комплементарные нуклеотиды и указывают на продукт и функционально перестроенный продукт VJ — результаты взаимного обмена. Продукт, с абсолютной точностью обратный I — T, однако, должен был содержать пять дополнительных нуклеотидов между генами V и J (последовательность TTCAG). Такой продукт был бы нефункционален, так как последовательность J кодировалась бы с нарушением рамки считывания. Из этого следует, что либо несколько нуклеотидов в процессе рекомбинации теряются, либо продукт, содержащий фланкирующие последовательности, возникает в результате взаимного обмена с нефункциональным рекомбинантом V-J.

сказанию, должны были бы существовать несколько промежуточных нуклеотидов. Это, видимо, необходимо для всех перестроек с сохранением рамки считывания, так как гептамерная последовательность отделена от кодона 95 гаметного гена V и от кодона 96 гена J несколькими нуклеотидами. В процессе перестройки, возможно, происходит делеция этих нуклеотидов.

Модель неравного обмена между сестринскими хроматидами подтверждена и другим исследованием, показавшим, что клетки, несущие продукты рекомбинации, содержащие фланкирующие последовательности, встречаются достаточно часто. Ван Несс и др. [35] изучили 28 миелом с перестроенными генами κ и выяснили, что в 15 из них при гибридизации по Саузерну с фрагментом ДНК, расположенным со стороны 5'-конца от генов J-области, обнаруживаются полосы, соответствующие, вероятно, фланкирующим фрагментам. Не обусловлено ли образование продуктов рекомбинации, содержащих фланкирующие последовательности, аномальными перестройками, связанными с нефизиологическими условиями в миеломной ткани? Для ответа на этот вопрос Ван Несс и др. использовали метод количественного определения интенсивностей полос, получаемых при блоттинге по Саузерну ДНК из отобранных при помощи проточной цитофлуориметрии κ -синтезирующих В-лимфоцитов (как описано в предыдущем разделе). Выбор участков расщепления рестриктазами и гибридизационного зонда (рис. 8.11) позволил независимо определить интенсивность полосы гена C (ни интенсивность, ни размер которой не должны изменяться при перестройках V — J), гаметной полосы J (интенсивность которой должна падать при перестройке) и полосы, представляющей последовательность, располагающуюся со стороны 5'-конца от J-области (интенсивность которой может уменьшаться только при делециях этой последовательности из генома). Результаты показали, что примерно две трети локусов

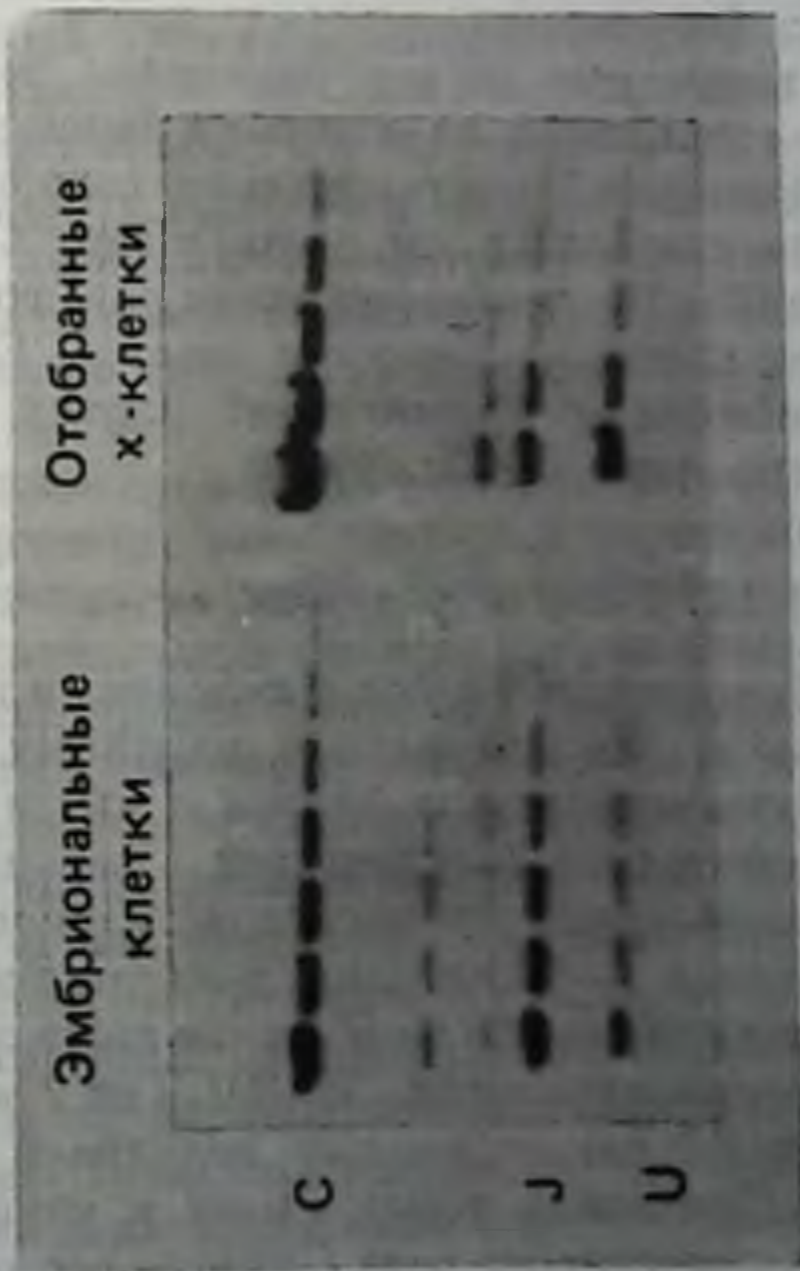
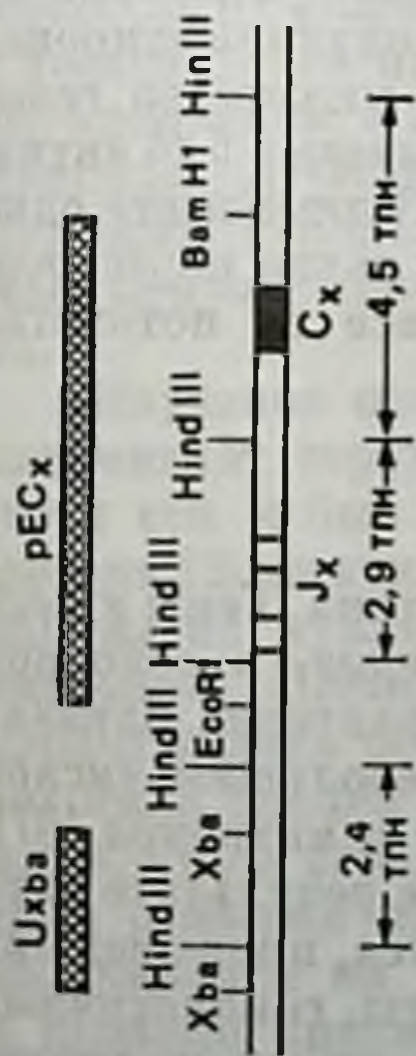
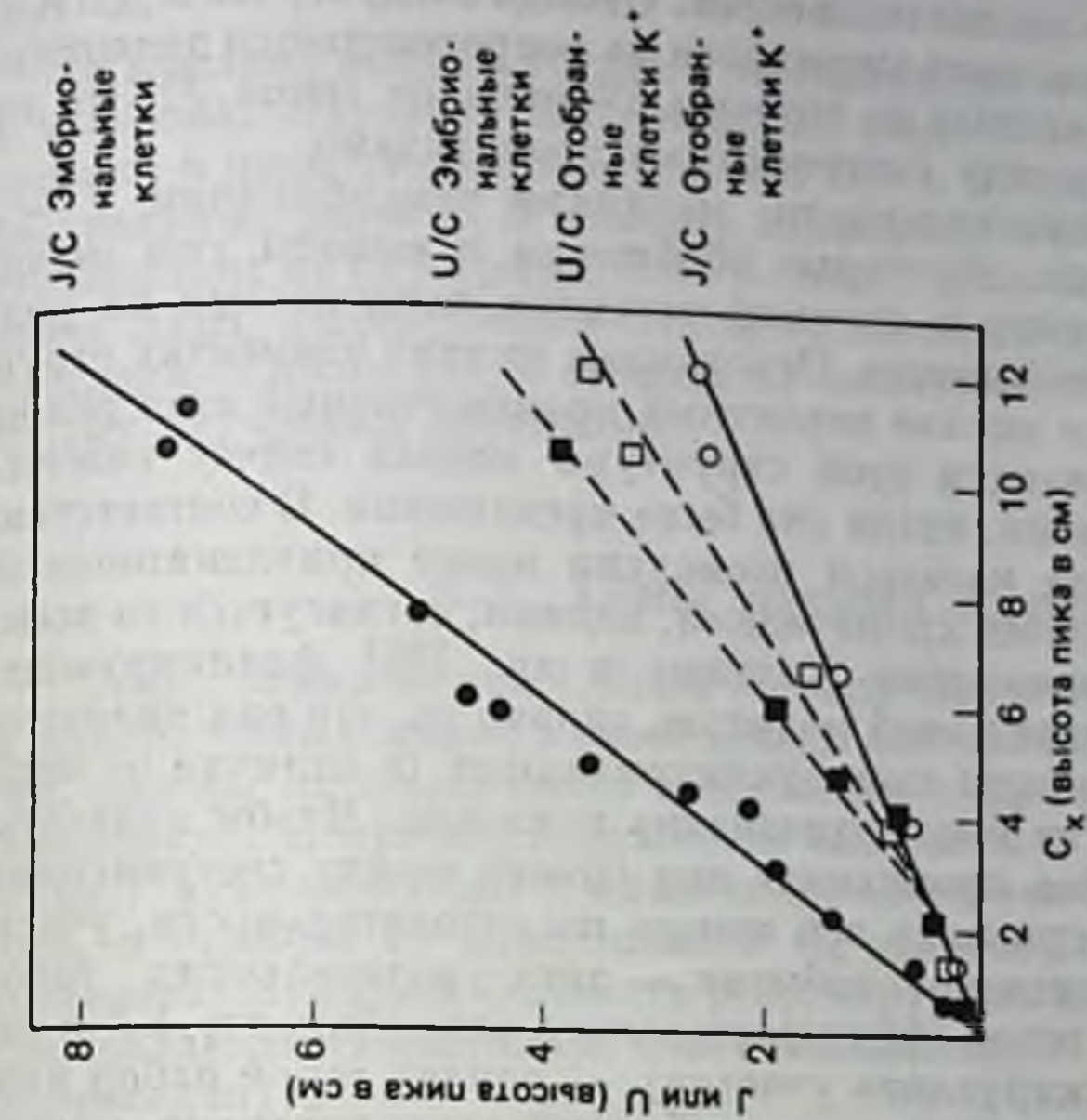


Рис. 8.11. Результаты блоттинга по Саузерну, согласующиеся с моделью рекомбинации за счет НОСХ в нормальных лимфоцитах. На картинах блоттинга по Саузерну расщепленной Hind III ДНК из мышиных эмбрионов (гаметной ДНК) и из x^+ -лимфоцитов (отобранных с помощью проточного цитофлуориметра) зонды (слева сверху) выявляют главные полосы длиной 2,4; 2,9 и 4,5 тпн, представляющие соответственно «левые» 5'-концевые последовательности, J-фрагменты и область C_x . Интенсивность полосы C_x (4,5 тпн), не зависящая от генных перестроек, использовалась для нормализации интенсивностей других полос. Для нахождения линейной области ДНК наносилась на гель в нескольких концентрациях. Определенное отношение нормализованных интенсивностей графиков J/C (для отобранных x^+ -клеток) к J/C (для эмбрионов), Ван Несс и др. [35] рассчитали, что x^+ -клетки сохраняют около 30% последовательностей локуса J, содержащихся в гаметной ДНК. Отношение U/C (x^+ -клетки) к U/C (эмбрионы) указывало, что около 75% «левых» 5'-концевых последовательностей также сохранялось. Эти результаты согласуются с моделью НОСХ и противоречат модели с делецией петли ([35]; печатается с разрешения).

х содержат перестроенные гены J (как описано в предыдущем разделе), но удалена лишь четверть всех 5'-последовательностей. Отсюда следует, что в ДНК из популяции лимфоцитов большая часть перестроек не сопровождается делециями последовательностей, расположенных со стороны 5'-конца от генов J . Это согласуется с моделью обмена между сестринскими хроматидами.

Хотя, как следует из вышесказанного, механизм рекомбинации $V-J$ остается во многом непонятным, некоторые обобщения и выводы уже можно сделать. Консервативные гептамер и нонамер остаются кандидатами на роль участков, узнаваемых при рекомбинации. Основанная на этих элементах структура «стебель и петля» — также вполне вероятный промежуточный этап рекомбинации, но основанная на делеции этой структуры модель сейчас кажется менее убедительной, чем в то время, когда она была предложена. В соответствии с этим и сама структура стала казаться несколько менее привлекательной. Модель обмена между сестринскими хроматидами, видимо, согласуется со всеми имеющимися данными. Клонированные Хехтлем и др. [36] фланкирующие фрагменты прекрасно согласуются с этой моделью, однако то, что они являются продуктами взаимной рекомбинации при функциональных (в отличие от ошибочных) перестройках $V-J$, не было однозначно показано. Чтобы доказать, что функциональная перестройка происходит при обмене между сестринскими хроматидами, нужно было бы сравнить все четыре последовательности, участвующие в одном рекомбинационном событии, — двух родительских генов (V и C) и двух перестроенных генов (функционального рекомбинанта VJ и рекомбинанта, содержащего фланкирующие участки), — однако такой набор клонов будет, по всей видимости, нелегко создать. Точный ответ вероятно, можно получить в опытах на системах рекомбинации *in vitro*; такие системы разрабатываются в нескольких лабораториях.

Несмотря на то что некоторые детали механизма рекомбинации пока не выяснены, общая модель, основанная на изучении генов κ , получила широкое признание. Согласно этой модели, гаметный геном содержит множество генов V_{κ} -области (возможно, несколько сотен, см. ниже) и одну C -область с 5 (4 активными) J -генами на ее 5'-конце. На некотором этапе развития В-лимфоцита один из генов V рекомбинирует с одним из активных генов J . Если такая перестройка функциональна, рекомбинация коммитирует клетку и все ее потомство к экспрессии этой перестроенной V -области.

8.1.13. Гены κ у других видов

Кроме мыши гены κ обнаружены у крысы, человека и кролика. Гены крысы и человека, клонированные с использованием мышьяных зондов, в основном сходны с генами мыши. В частности, для крысы и мыши характерна близкая гомология как кодирующих последовательностей с весьма небольшим числом «молчащих» замен, так и фланкирующих последовательностей и интронов [37]. Крыса, однако, имеет семь генов J , возникших, по-видимому, в результате двух отдельных и недавних актов дупликации на 5'-конце этого локуса, происшедших на сравнительно поздних этапах эволюции [38, 39]. Ген J крысы, гомологичный неактивному мышьяному гену $J3$, также, видимо, неактивен и несет тот же дефект участка сплайсинга РНК. Сравнение генов мыши и человека выявило более ограниченную гомологию: в окрестности гена C гомология отчетливо выявляется в кодирующей и 3'-нетранслируемой областях, но заметно падает в прилежащих к ним областях [40]. В области локуса J слабая гомология наблюдается повсюду. Наиболее консервативны последовательности гептамера и нонамера, которые, как считают, служат сигналами рекомбинации. Сравнение генов J этих орга-

измов (пяти генов человека и мыши и семи генов крысы) привело к интересным предположениям о дупликациях и мутациях этих генов в процессе эволюции [41].

У кролика локус κ устроен, по всей видимости, сложнее, чем у мыши, крысы и человека. Изучение наследования вариантов κ -цепей (аллотипов) кролика привело к представлению о том, что геном кролика может содержать несколько неаллельных генов κ . К моменту написания этой книги было известно лишь то, что блоттинг по Саузерну ДНК кролика с использованием в качестве зонда фрагмента ДНК, кодирующего С-область аллотипа b_4 , приводит к появлению множественных полос [42] в отличие от единственной полосы, обнаруженной у всех других изученных организмов.

8.2. Гены легких цепей лямбда

Гены, кодирующие L-цепи λ , подробно исследованы у человека и мыши. У лабораторных линий мышей λ -цепи составляют лишь около 5% от всех L-цепей, причем их повышенное содержание сопряжено с заметно сниженным разнообразием. В противоположность системе κ с ее многочисленным семейством генов V в системе генов λ мыши содержатся только два гаметных гена V . Кроме того, в отличие от единственной C_{κ} -области, при изучении аминокислотных последовательностей С-области секретируемых цепей λ у мыши было обнаружено три неаллельных изотипа λ . Они известны как λ_1 , λ_2 и λ_3 (в порядке уменьшения содержания)¹.

Первым проклонированным геном λ был полученный в лаборатории Тонегавы (Tonegawa) в 1977 г. гаметный ген V [43]. (В действительности это был первый проклонированный ген Ig .) Общую эмбриональную ДНК расщепляли $EcoRI$ и нужный фрагмент очищали препаративным электрофорезом в агарозе с последующей препаративной гибридизацией его с очищенной мРНК и центрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия. Очищенный в 350 раз фрагмент ДНК при помощи лигазы присоединяли к «плечам» бактериофага. Эту ДНК использовали для трансфекции *E. coli*. Из полученных в результате 4000 бляшек при помощи гибридизации с λ -мРНК миеломы был выделен клон V_{λ} .

Изучение последовательности V_{λ} [44] показало, что структура этого гена напоминает структуру гаметного гена V_{κ} , описанного в предыдущем разделе (хотя ген κ был выделен позднее). Последовательность, кодирующая состоящий из 19 остатков сигнальный пептид, прерывалась внутри кодона —4 интроном из 93 нуклеотидов (фактически это был один из первых обнаруженных интронов). После остальных кодонов сигнального пептида последовательность продолжалась без перерывов. Соответствующая последовательность аминокислот была близка к последовательности гена V_{λ_2} . (Пять отличий последовательности этого гена от последовательности аминокислот V_{λ_2} -цепей из MOPC315 была отнесена на счет соматических мутаций в этой миеломе.) Ген внезапно оканчивался на расстоянии 13 кодонов от ожидаемого конца V -области, что и привело впервые к предположению о существовании отдельной J -области. Впоследствии группа Тонегавы получила из миеломы перестроенный клон $V-C$ для λ_1 , а также гаметные клоны V и C для λ_1 из эмбриональной ДНК [45]. Используя эти клоны, авторы с помощью блоттинга по Саузерну и анализа

¹ В настоящее время выявлен и изотип λ , который, однако, нефункционален (см. ниже). — *Прим. ред.*

нуклеотидных последовательностей продемонстрировали перемещение гена V мнеломы в участок, расположенный на расстоянии примерно в 1,3 тпн от 5'-конца гена C , т. е. в область гена J .

Дальнейшие исследования [46—50] значительно расширили наши знания о локусе λ у мыши. В нем существует четыре гена C^1 , каждый со своим геном J , расположенным на расстоянии примерно 1,3 тпн в 5'-сторону от гена C . На 5'-концах всех генов J имеются последовательности, гомологичные гептамеру и нонамеру, обнаруженным в системе κ . В системе λ , однако, эти элементы разделены приблизительно лишь 12 нуклеотидами в отличие от 22 в генах κ . Гены $J_{C_{\lambda 3}}$ и $J_{C_{\lambda 1}}$ сгруппированы в кластер и отделены друг от друга примерно 3 тпн. Другой кластер содержит $J_{C_{\lambda 2}}$ и неэкспрессируемый ген $J_{\lambda 4}$. Гомология между четырьмя генами C позволяет предполагать, что эти два кластера появились в результате дупликации предшествующего блока $J_{C_{\lambda x}} - J_{C_{\lambda y}}$, который в свою очередь возник в результате более раннего акта дупликации. Последовательности эти были проанализированы также и с целью обнаружения особенностей, объясняющих относительное количество продуктов их экспрессии — $\lambda 1 > \lambda 2 \approx \lambda 3 \gg \lambda 4$. Последовательность $C_{\lambda 4}$ детерминирует несколько амфино-кислотных замен, но не содержит терминирующих кодонов, способных превратить этот ген в нефункционирующий. На 3'-конце гена $J_{\lambda 4}$, однако, мутация разрушила участок «GT...», присутствующий во всех «донорных» участках сплайсинга, так что РНК, транскрибированная с этого гена, не способна правильно созреть (наподобие гена $\kappa J 3$ мыши). Уменьшенное количество $\lambda 2$ и $\lambda 3$ в сравнении с $\lambda 1$ может объясняться несоответствием их нонамерных гомологичных элементов последовательности «идеального» нонамера.

В лаборатории Тонегавы были получены клоны и определены последовательности двух гаметных генов λV -области. $V_{\lambda 2}$, как упоминалось выше, связан с $C_{\lambda 2}$; $V_{\lambda 1}$ связан с $C_{\lambda 1}$ и $C_{\lambda 3}$. Блоттинг по Саузерну гаметной ДНК с использованием зондов $V_{\lambda 1}$ и $V_{\lambda 2}$ не выявил дополнительных гомологичных полос и, таким образом, позволил сделать вывод, что две клонированные V -области — это все содержащиеся в гаметном геноме мышей BALB/c гены λV -областей. Точное взаимное расположение двух генов V и двух дуплицированных элементов $JC - JC$ неизвестно, так же как неизвестна локализация этих четырех сегментов в хромосоме.

Распространенная гипотеза, согласующаяся со всеми имеющимися сейчас данными, указывает порядок расположения [5'- $V_{\lambda 1}JC_{\lambda 3}-JC_{\lambda 1}-3'$] и [5'- $V_{\lambda 2} - JC_{\lambda 2} - JC_{\lambda 4}-3'$]. Относительное расположение заключенных в скобки сегментов неизвестно [46].

Оба гаметных гена V_{λ} мыши содержат консервативные элементы (гептамер и нонамер), найденные и в генах V_{κ} , хотя в генах λ расстояние между ними (спейсер) составляет 23 нуклеотида в отличие от 12 нуклеотидов в генах V_{κ} . Промежутки между этими элементами в гаметных генах V_{λ} (23 нуклеотида) и J (13 нуклеотидов), таким образом, противоположны промежуткам в системе κ . Эти наблюдения привели к гипотезе, согласно которой для осуществления рекомбинации $V - J$ необходимо сочетание спейсеров двух типов. Это предположение подтвердилось при изучении рекомбинации в H-цепях, но с одним интересным дополнением, о чем будет сказано в следующем разделе.

У человека L-цепи λ встречаются значительно чаще, чем у мыши (около 40% против 5% у мыши). Кроме того, у человека обнаружены четыре неаллельные формы L-цепей λ , обозначенные обычно их первоначальными серологическими

¹ В настоящее время выявлен пятый ген C_{λ} , экспрессирующийся только в пре-B-клетках. — Прим. ред.

символами: $Kern^{-}Oz^{-}$, $Kern^{-}Oz^{+}$, $Kern^{+}Oz^{-}$ и Mcg . Были обнаружены и некоторые другие варианты, однако тот факт, что они представляют собой добавочные неаллельные формы, а не результат аллельного полиморфизма, не был точно установлен. Исходя из различий между системами λ человека и мыши, можно было ожидать, что гены λ человека устроены сложнее. Действительно, Хвтер и др. [51] описали фрагмент ДНК человека длиной 50 тпн, содержащий шесть последовательностей λ С-области и, кроме того, еще три сегмента со слабой гомологией. Для выделения человеческих клонов был использован межвидовой гибридизационный зонд — клон мышинной кДНК $\lambda 1$. Была определена последовательность трех из шести сцепленных генов, которые были идентифицированы как гены $Kern^{-}Oz^{-}$, $Kern^{-}Oz^{+}$ и Mcg . Ген $Kern^{+}Oz^{-}$, по всей видимости, находится среди оставшихся трех генов кластера; другие два гомологичные гена представляют собой либо добавочные варианты, либо неэкспрессируемые псевдогены. Один из слабогибридизующихся клонов, не входящий в кластер, был четко идентифицирован как псевдоген, принадлежащий к интересному классу «процессированных» генов [52]. Псевдогены этого типа, по всей видимости, произошли путем обратной транскрипции с процессированной РНК и включения образованной ДНК в участки генома, не связанные с локусами исходных генов.

8.3. Гены Н-цепей

Для аминокислотных последовательностей Н-цепей характерны те же V- и С-области, что и для L-цепей. Было, однако, показано, что изотип Н-цепей, кроме того, меняется при созревании секретирующих их В-клеток (переключение Н-цепей). На этом основании можно было предположить, что перестройки в генах Н-цепей отличаются большей сложностью, чем в генах L-цепей, и это предположение подтвердилось.

Впервые это было подтверждено в трех сходных работах по анализу геномных клонов α , $\gamma 2b$ и $\gamma 1$ мыши, опубликованных в 1980 г. Дэвисом и др. [53], Маки и др. [54] и Катаока и др. [55]. Сравнив, например, функционально перестроенный ген α (выделенный из миеломы S107) с гаметными клонами V и $C_{H\alpha}$, Дэвис и др. показали, что в перестроенном гене участки ДНК, соответствующие гаметным генам V и $C_{H\alpha}$, разделены сегментом ДНК длиной 5 тпн, не относящимся ни к одному из этих генов. Источником этой «экстра»-ДНК оказалась область, расположенная с 5'-стороны от гаметного гена C_{μ} . Поскольку известно, что перед переключением на другие изотипы В-клетки экспрессируют изотип μ , авторы обоснованно предположили, что относящийся к гену μ участок — это результат первоначально осуществленной перестройки генов V и μ ; С-область μ в дальнейшем была заменена на α в ходе повторной перестройки, а участок ДНК, примыкавший к гену μ с 5'-стороны, является «напоминанием» о первоначальной перестройке. Дальнейшие исследования подтвердили эту общую модель и дали подробную картину обоих типов перестроек.

8.3.1. Рекомбинация VDJ в Н-цепях мыши

Рекомбинация, приводящая к перемещению гаметного гена V Н-цепи в участок, сближенный с μ С-областью, очень схожа с рекомбинацией V — J в случае L-цепей, но с одним важным отличием: в полученном в результате перестройки гене Н-цепи между V и J включен третий элемент — D (от английского diversity — разнообразие). Как следует из работы Шиллинга и др. [56], о существовании такого элемента можно судить на основании определенных химически последовательностей аминокислот. Авторы составили таблицу опубликованных

аминокислотных последовательностей Н-цепей, расположив их так, чтобы достигнуть максимальной гомологии. При этом выявился необычно вариабельный по последовательности и длине сегмент, соответствующий третьей гипервариабельной области. Участки, примыкающие к этому вариабельному сегменту из 0—8 аминокислот (максимально известное число — 14), были более консервативны и несли следы независимого подбора, т. е. рекомбинации независимых *V*- и *J*-областей (данная *V*-последовательность могла быть связана с различными *J*-последовательностями, и наоборот). Существование отдельного элемента *D* нашло подтверждение при сравнении нескольких перестроенных генов Н-цепей с их гаметными *V*- и *J*-предшественниками.

Гаметные клоны μ мыши изучались несколькими группами [33, 57—59]. При анализе нуклеотидных последовательностей было установлено, что они содержат четыре гена *J*-области на расстоянии около 5 тпн с 5'-стороны от кодирующей последовательности μ . Все четыре гена *J*, видимо, функциональны, так как все кодируемые ими аминокислотные последовательности были обнаружены в секретируемых Н-цепях (обратной закономерности не наблюдается: структура некоторых секретируемых Н-цепей свидетельствует о наличии точковых мутаций в их *J*-областях). Вблизи от 5'-концов всех четырех генов *J* были найдены гептамерный и нонамерный гомологичные элементы, ранее обнаруженные в *J*-генах L-цепей; расстояние между этими элементами составляло около 22 нуклеотидов.

Для детального изучения сайта рекомбинации было исследовано несколько перестроенных генов Н-цепей и гаметных предшественников генов *V*. В этих работах гаметный предшественник гена *V* получали путем скринирования фаговых клонов гаметной ДНК с помощью *V*-зондов, полученных из рекомбинированных генов. При блоттинге по Саузерну гаметной ДНК и гибридизации с этими зондами было получено несколько полос, что указывало на существование семейства родственных генов *V*, подобного семейству генов *V_x*. Выявление среди генов этого семейства гаметных предшественников конкретных рекомбинировавших *V*-областей основывалось на гомологии их 5'-фланкирующих участков и сравнении последовательности [33, 59]. Общее строение клонированных гаметных генов *V* оказалось сходным со структурой *V*-генов L-цепей; последовательность, кодирующая сигнальный пептид из 19 остатков, прерывалась в кодоне —4 коротким интроном, остальная часть генов *V*-области была непрерывна. Вблизи 3'-конца кодирующей последовательности были обнаружены гептамерный и нонамерный сигнальные элементы, разделенные примерно 22 нуклеотидами.

При сравнении нуклеотидных последовательностей рекомбинированного гена и его предшественников *V* и *J* оказалось, что ни один из предшественников не кодирует фрагмента, расположенного в перестроенном гене между *V* и *J*. Таким образом, представление о закодированном независимо элементе *D* оказалось верным.

Для однозначного вывода о существовании гаметных *D*-областей недоставало только клонирования этих участков из гаметной ДНК, однако одно интересное предсказание об их структуре было высказано еще до получения этих клонов. Предсказание это касалось промежутка между гептамерами и нонамерами в *D*-области. В генах *V* и *J* L-цепей расстояние между этими элементами составляло либо 11—12, либо 22—23 пн. Эти расстояния соответствуют приблизительно одному или двум виткам двойной спирали ДНК. Как было отмечено ранее, рекомбинация *V* — *J* как в κ -, так и в λ -системах происходит между парой зародышевых предшественников, содержащих комбинацию из двух возможных спейсеров (правило 1 + 2 витков). Поскольку в системе генов Н-цепей про-

межутки между консервативными элементами составляли «2 витка» как у V_H , так и у J_H -генов, было предсказано, что зародышевая D -область должна содержать на обоих концах сигнальные элементы с промежутком в 1 виток. При этом рекомбинация как между V и D , так и между D и J должна подчиняться правилу $1 + 2$ витков.

Обнаружить гаметный ген D с помощью зонда, вырезанного из клонированных перестроенных генов, было технически сложно, так как фрагмент ДНК, кодирующий несколько аминокислот D -области, слишком мал для того, чтобы служить сигналом гибридизации. Более эффективный зонд мог быть получен из нефункционального промежуточного продукта рекомбинации DJ , не успевшего прорекомбинировать с геном V . Такая структура, по предположению Сакано и др. [60], должна была бы существовать в некоторых миеломах и могла оказаться удобным гибридизационным зондом, так как сохраняла бы 5'-фланкирующую последовательность гаметного гена D . О существовании нефункциональных перестроек генов H -цепи свидетельствовал ряд данных, полученных при исследовании ряда миелом с помощью блоттинга по Саузерну и гибридизации со специфичным к J_H зондом, согласно которым в большинстве случаев в миеломах нет перестроенных гаметных полос, но есть одна, две и даже три перестроенные полосы. После клонирования одной из таких полос миеломы QUPC52 оказалось, что она содержит искомым аберрантный рекомбинант DJ . Гаметный предшественник этой области был обнаружен на расстоянии 0,7 тпн от 5'-конца J_H1 . Его структура оказалась весьма сходной с ожидаемой: к кодирующей последовательности из 10 нуклеотидов с обеих сторон прилегали гептамерный и нонамерный сигнальные элементы с промежутком между ними в «1 виток». Сходный клон, полученный из перестроенного J_H в линии T -клеток (SP2), был также использован в качестве второго зонда для клонирования D -участка гаметной ДНК [61, 62]. При помощи зонда SP2 было выявлено семейство из девяти родственных D -областей, сгруппированных на участке длиной 60 тпн. Расстояние этого участка от гена D из QUPC52 неизвестно. Все гены семейства SP2 содержат кодирующую область из 17 нуклеотидов, а расстояние между сигнальными элементами в них соответствует «одному витку». Третий зонд D , названный FL16, был получен сходным образом и позволил выявить D -семейство, расположенное с 5'-стороны от семейства SP2. Семейство FL16 состоит, видимо, лишь из двух гаметных генов D , однако оно широко представлено в перестроенных генах H -цепей, для которых известна последовательность.

В D -областях большинства рекомбинировавших генов DJ при сравнении с гаметными D -областями обнаруживаются мутации, а во многих — от одного до четырех дополнительных нуклеотидов, не входящих в состав ни одного из гаметных предшественников. Эти дополнительные нуклеотиды либо добавляются в процессе перестройки генов, либо отражают существование пока не обнаруженных гаметных D -областей, сходных с тремя уже известными семействами. Некоторые из перестроенных генов H -цепей содержат D -последовательности, настолько отличающиеся от известных гаметных последовательностей, что существование по крайней мере еще одного гаметного D -семейства весьма вероятно.

В кодирующей последовательности нескольких D -областей содержатся группы нуклеотидов, гомологичные гептамерному сигнальному элементу; этот внутренний гомолог гептамера расположен на расстоянии около «двух витков» от нонамеров, примыкающих с обеих сторон к гену D . Было высказано предположение [62], что благодаря таким промежуткам может происходить рекомбинация $D - D$, еще больше расширяющая разнообразие D -областей.

8.3.2. *VDJ*-рекомбинация H-цепей человека

Картина рекомбинации *V-D-J*, полученная при изучении клонированных генов H-цепей человека, сходна с уже описанной для мыши. Было показано, что клонированный ген μ человека содержит с 5'-стороны от кодирующей последовательности кластер генов *J* [63]. В этот кластер входит шесть, по всей видимости, функционирующих *J*-областей, которые, с поправкой на точечные мутации, соответствуют участкам *J* всех H-цепей человека с известной аминокислотной последовательностью, кроме двух. Эти две последовательности могут быть либо результатом аллельного полиморфизма, либо кодироваться до сих пор не найденными неаллельными генами *J*. Активные гены *J* человека перемежаются тремя псевдогенами, кодирующими аминокислотные последовательности, не обнаруживаемые в H-цепях, и при этом лишены сигнала сплайсинга РНК, находящегося на 3'-конце всех активных генов *J*. Все гены и псевдогены *J* содержат сигнальные элементы рекомбинации с промежутком в «два витка», как у мыши.

Гаметные гены *D*-области также были обнаружены в геноме человека [63, 64]. Один из гаметных генов *D* находится в положении, приблизительно гомологичном положению гена *DQ52* мыши, т. е. с 5'-стороны от первого активного гена *J* человека. Этот ген *D*, названный у человека *DHQ52*, обладает замечательной гомологией со своим мышинным аналогом. Для обнаружения других генов *D* человека Раветч и др. [63] и Зибенлист и др. [64] применили подходы, аналогичные описанным выше при анализе генов *D* мыши. Из μ -экспрессирующих клеток больного хроническим лимфоцитарным лейкозом был клонирован рекомбинированный ген *DJ*, названный *LR36*; зонд, включающий его *D*- и 5'-фланкирующую области, был использован для поиска гена в фаговой библиотеке ДНК плаценты. При дальнейшем анализе и отборе полученных клонов было охарактеризовано семейство из четырех гомологичных генов *D*-области, занимающее участок в 33 тпн с интервалом между генами в 9 тпн. Длина кодирующих частей этих генов составила от 28 до 31 нуклеотида, что значительно больше, чем 11 нуклеотидная кодирующая часть гена *DHQ52*. Анализ гомологии последовательностей генов *D* из гаметных клонов, *LR36* и из активного рекомбинанта *V-D-J*, названного *LR35*, свидетельствует о возможности рекомбинации *D — D*.

8.3.3. Разнообразие и механизм рекомбинации *VDJ*

Хотя о рекомбинации *V-D-J* в генах тяжелых цепей известно еще далеко не все, очевидно, что наличие элемента *D* приводит к значительному расширению многообразия рекомбинаций *V-J* по сравнению с таковым в L-цепях. Кроме повышения числа сочетаний за счет выбора *D* из неизвестного числа гаметных генов и возможности рекомбинации между несколькими гаметными генами *D* к увеличению разнообразия приводит и некоторая вариабельность длин аминокислотных последовательностей *D*-генов, которая может появляться вследствие «гибкости» рекомбинации *V-D* и *D-J*. Возможно даже, что проходящая с нарушением рамки считывания рекомбинация *V-D* может приводить к функциональным генам, если эта рамка восстанавливается при рекомбинации *D-J*. Если это так, то каждый ген *D* в принципе способен кодировать аминокислотную последовательность в любой из трех рамок считывания. Дополнительные нуклеотиды, обнаруживаемые в рекомбинантах *DJ* и *VDJ* между участками, происходящими из генов *D* и *J*, могут встраиваться в ходе самого акта рекомбинации, возможно, даже без участия геномной матрицы. Эти последовательности, прозванные

N-(нуклеотидными) областями, служат еще одним элементом, расширяющим функциональное разнообразие.

Большая сложность рекомбинации *V-(D)-J* в генах *H*-цепей по сравнению с *L*-цепями, по-видимому, сопровождается большей частотой нефункциональных перестроек. Коулклаф и др. [32] изучили с помощью блоттинга по Саузерну перестройки J_H в 20 миеломах, продуцирующих IgM, и обнаружили в 15 из них более одной перестроенной полосы. В отобранных с помощью цитофлуориметрии нормальных клетках селезенки, продуцирующих IgM, количественная оценка интенсивности полос, аналогичная описанным выше в опытах с перестройками генов κ , показала, что около 90% клеток несут перестройки в копиях генов J_H обеих хромосом. В сходных опытах Ноттенбург и Вайсман [66] изучали перестройки J_H в неэкспрессируемой аллели. Используя мышей (BALB/c \times C57BL/J) F_1 , они с помощью проточной цитофлуориметрии разделили клетки, продуцирующие два аллотипа Igh. Анализ методом блоттинга по Саузерну, позволивший определять перестройки в разных аллелях независимо, также показал, что более 90% неэкспрессируемых аллелей J_H перестроено. Эта цифра значительно больше, чем примерно 30%-ная доля перестроек в неэкспрессируемых аллелях генов κ , полученная сходными методами (см. выше). Неэкспрессируемые перестройки *H*-цепей, без сомнения, включают в себя подобные описанным выше рекомбинанты *DJ*, так же как рекомбинанты *V-D-J* с нарушенной рамкой считывания и другие, более сложные структуры, появляющиеся благодаря способности генов *D* рекомбинировать как с *V*, так и с *J* в нормальной и инвертированной ориентации. (Последнее — следствие того, что ген *D* обладает двумя симметричными парами сигнальных элементов с промежутком в один виток [60]).

Принято считать, что механизм рекомбинации *V-D-J* сходен с механизмом рекомбинации *V-J* *L*-цепей. Наличие рекомбинантов *D-J* позволяет предположить, что акты рекомбинации *V-D* и *D-J* могут проходить независимо. С другой стороны, очевидно, что перестройка *D-J* нефункциональна и не может служить аргументом против того, что функциональные рекомбинанты *V-D-J* образуются в результате согласованной перестройки. В пользу модели рекомбинации с вырезанием петли приводились данные о делеции последовательностей между V_H и J_H , но, как уже указывалось при рассмотрении рекомбинации *V-J* в генах κ , такая делеция полностью согласуется и с механизмом обмена между сестринскими хроматидами. К моменту написания этой главы для генов *H*-цепей был известен единственный пример продукта рекомбинации, содержащего фланкирующие последовательности [65]. Он был обнаружен в гене с большим числом рекомбинационных дефектов и в трансформированной линии клеток.

8.3.4. Локус гена C_H

Сейчас принято считать, что в процессе развития В-клетки первым из Ig продуцируется IgM. Впоследствии клетка и все ее потомство, продолжая синтезировать антитела с теми же *V*-областями *L*- и *H*-цепей, может изменить изотип *H*-цепи. Об этом свидетельствуют, кроме других, и следующие данные: а) переключение изотипа в ходе иммунного ответа [67]; б) способность клонов В-клеток — миелом [68, 69] и селезеночных узелков [70] — экспрессировать наряду с IgM и другой изотип с идентичной *V*-областью и в) данные опытов *in vivo*, указывающие на то, что IgM-продуцирующие клетки служат предшественниками IgG-продуцентов [71]. Молекулярный механизм, с помощью которого клетка может специфически изменить одну часть молекулы синтези-

руемого ею белка, оставив другую часть без изменений, представляет большой интерес.

Как уже упоминалось выше, рядом авторов было показано, что активно перестроенные гены α , $\gamma 2b$ и $\gamma 1$ содержат между V - и C -областями последовательность ДНК, происходящую из 5'-фланкирующей области гена μ (включая области J_H). На основании этих данных была предложена модель, согласно которой V_H -ген первоначально перестраивается в область, расположенную с 5'-стороны от гена μ (при этом продуцируется IgM), а впоследствии C_H -область гена μ заменяется на другой ген (соответственно изменяется и изотип синтезируемого Ig). Хотя эта модель получила всеобщее признание, она не дает полного описания механизма переключения, так как не отвечает на ряд интересующих нас вопросов: какие последовательности участвуют в переключении или служат для него сигналом? Каким образом C_H -области располагаются в хромосоме? Существуют ли последовательности J_H вблизи других генов C_H , кроме гена μ ? Обязательна ли для переключения делеция генов C_H -области из клетки, или же возможны и другие механизмы переключения (например, обмен между сестринскими хроматидами)? Каким образом можно объяснить существование клеток, синтезирующих одновременно с IgM другой изотип (двойные продуценты)?

В 1978 г., еще до получения геномных клонов C_H , Хонжо и Катаока [72] провели эксперименты, позволившие дать частичный ответ на некоторые из этих вопросов. Из кДНК, синтезированной на мРНК, выделенной из четырех различных миелом и очищенной при помощи иммунопреципитации полисом, были получены радиоактивно меченные зонды. Эти зонды для генов $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$ и $\gamma 3$ использовались для определения числа копий генов каждого изотипа в нескольких миеломах путем анализа кинетики гибридизации. Было обнаружено, что в IgM- или IgG3-продуцирующих миеломах содержатся все четыре гена γ , каждый в количестве одной копии на гаплоидный геном (как в нелимфоидных тканях), тогда как в IgA-продуцентах все четыре гена γ представлены лишь 0,5 копиями каждый. Из этих данных следует, что в IgA-продуцирующей миеломе произошла делеция генов μ и α . Аналогичный анализ миелом, продуцирующих IgG1, IgG2a и IgG2b, позволил установить относительное расположение генов C_H в хромосоме, исходя из предположения, что образование данного изотипа сопровождается делецией всех генов C_H , расположенных с 5'-стороны от гена C_H этого изотипа. Предложенный порядок расположения генов: μ - $\gamma 3$ - $\gamma 1$ - $\gamma 2b$ - $\gamma 2a$ - α — был подтвержден в последующих экспериментах. Например, несколькими группами авторов для определения содержания различных генов C_H в миеломах был использован метод блоттинга по Саузерну. При таком подходе количественные результаты получить труднее, чем при гибридизации в растворе, а присутствие генов C_H в неэкспрессируемой хромосоме создает потенциальные трудности для выявления делеций тех же генов из экспрессируемой хромосомы. Получить однозначные результаты, однако, оказалось возможным при использовании миелом, в неэкспрессируемой хромосоме которых был утрачен весь локус C_H или его часть, так что делеции в экспрессируемой хромосоме можно было наблюдать без мешающего влияния последовательностей этого локуса [73—75]. Яонта и Хонжо [76] решили эту проблему иначе. При изучении миелом, индуцированных у мышей (BALB/c \times C57BL) F_1 , они смогли проанализировать различные гены C_H независимо на экспрессируемой и неэкспрессируемой хромосомах, так как два родительских гена при блоттинге по Саузерну давали различные наборы полос. Результаты всех этих работ подтвердили приведенное выше расположение генов и делеционную модель.

8.3.5. Геномные клоны C_H

Структура локуса H-цепей была изучена более подробно после того, как во многих лабораториях удалось выделить геномные клоны генов C_H . Как правило, клоны эти были получены при скрининге библиотек геномной ДНК с помощью зондов кДНК, синтезированных на мРНК миелом. Из множества интересных результатов в связи с ограниченностью места мы рассмотрим лишь некоторые.

Одно из удивительных свойств, присущих всем генам C_H (см., например, [77—81]), состоит в том, что их функциональные домены, идентифицированные по внутренней гомологии аминокислотных последовательностей и по данным анализа трехмерной структуры (рентгеноструктурный анализ), кодируются в виде непрерывных экзонов, отделенных от других доменов интронами длиной примерно 0,1—0,3 тпн. Так, например, белок $\gamma 2b$ мыши содержит три основных домена (C_{H1} , C_{H2} и C_{H3}) и небольшой шарнирный домен между C_{H1} и C_{H2} . Структуру его гена [77] можно суммировать в виде

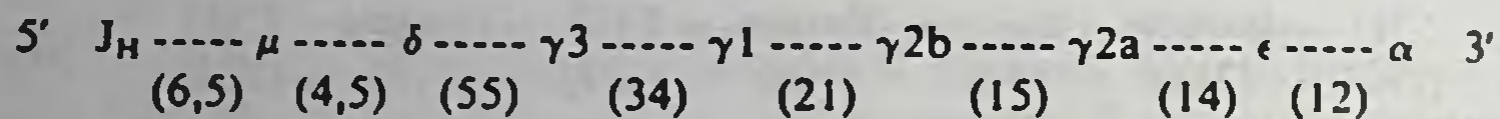
C_{H1} --- Интрон --- Шарнир --- Интрон --- C_{H2} --- Интрон --- C_{H3}
(292) (314) (64) (106) (328) (119) (322)

где цифры в скобках означают число нуклеотидов в каждом сегменте. Интересно, что шарнирный участок гена α кодируется слитно с доменом C_{H2} без вставочной последовательности (интрона) [78]. Анализ геномных генов C_H привел к предположению, что в процессе эволюции этих генов могли происходить мутации, уничтожающие и создающие сайты сплайсинга РНК. В результате некоторые из интронных последовательностей могли превращаться в экзоны, и наоборот. Например, последовательность интрона, расположенного с 5'-стороны от шарнирного домена $\gamma 2b$, в высокой степени гомологична последовательности C_{H1} . Исходя из этого, Такер и др. [77] высказали предположение о том, что экзон шарнирного домена мог возникнуть из полного домена Ig, изменившегося либо в результате исчезновения сайта сплайсинга на 5'-конце домена, либо при возникновении нового сайта сплайсинга в пределах домена.

Результаты анализа структуры гена C_H позволили объяснить и возникновение мембранной и секреторируемой форм H-цепей. Как было отмечено ранее, мембрано-связанные формы H-цепей Ig несколько больше секреторируемых форм из-за дополнительного C-концевого гидрофобного сегмента, который, видимо, служит для «заякоривания» белка в мембранном липидном слое [82]. В случае μ -цепей эти две формы кодируются двумя различными мРНК длиной 2,7 и 2,4 тпн, которые можно разделить с помощью электрофореза в геле. При сравнении последовательностей ДНК геномного клона μ и двух кДНК-клонов, соответствующих этим двум мРНК, в нескольких лабораториях [83—87] было показано, что оба вида мРНК транскрибируются с одного и того же гена, но сплайсинг их 3'- или C-концевой области проходит по-разному. Нуклеотидная последовательность, кодирующая 20 C-концевых остатков секреторируемой формы, содержится в сегменте ДНК, непосредственно следующем за C_{H4} -доменом гена μ , тогда как в мембранной мРНК следующие за C_{H4} -доменом нуклеотиды кодируются двумя экзонами, расположенными примерно на 2 тпн дальше в сторону 3'-конца. Эти мембранные экзоны кодируют 41 остаток, включая 26 незавершенных остатков, которые, встраиваясь в мембрану, закрепляют Ig на поверхности клетки. Согласно современным представлениям, первичный РНК-транскрипт содержит полный локус, включая и 3'-концевые мембранные экзо-

ны; соответствующие последовательности экзонов и интронов удаляются затем в процессе созревания РНК, причем механизм удаления каким-то образом связан с изменяющимися на разных стадиях развития потребностями В-клетки в мембранной или секретрируемой формах IgM. Той же общей структурой обладает и ряд других генов C_H [88—92]. Это позволяет предполагать, что механизм альтернативного сплайсинга ответствен за образование двух форм Ig и всех остальных изотипов.

После выделения геномных клонов для всех восьми изотипов H-цепей мыши были предприняты попытки «связать» их, т. е. проклонировать непрерывно как область ДНК, включающую гены C_H , так и всю ДНК, лежащую между ними. Стратегия этих исследований состояла в следующем: используя клоны кДНК для выделения генов C_H , с помощью описанного выше метода «прогулки по хромосоме» просеквенировать и всю некодирующую ДНК, лежащую между генами. В ряде лабораторий удалось «связать» несколько генов C_H , а в 1982 г. Шимизу и др. [93] получили клоны, охватывающие область ДНК генома мыши длиной около 200 тпн и содержащие все восемь генов C_H . На основании изучения этих клонов была определена следующая структура этой области:



где цифры в скобках указывают расстояния между генами в тпн. Все гены C_H ориентированы в одном и том же направлении 5'—3'.

Чтобы выяснить, содержатся ли J-подобные последовательности в каких-либо районах этой области, кроме известного участка вблизи гена μ , зонд, содержащий все известные J_H -гены, гибридизовали по Саузерну с клонами, охватывающими полностью все C_H -гены. Дополнительных J-последовательностей обнаружено не было. Для того чтобы выявить последовательности, гомологичные генам C_H , которые могли бы представлять собой псевдогены, аналогичные опыты были проведены и с зондами из генов C_H . Были обнаружены две полосы со слабой перекрестной гибридизацией (отдаленно родственный псевдоген γ может существовать с 5'-стороны от гена $\gamma 3$ и в противоположной ориентации [94]), однако общий вывод сводился к тому, что в изученной области длиной 200 тпн близких по последовательности псевдогенов нет. В этом отношении локусы C_H мыши и человека различаются. Большинство генов C_H человека было клонировано; оказалось, что они в основном подобны соответствующим генам мыши [63, 95—102]. В геноме человека, однако, на 3'-конце локуса генов H-цепей существует большая дублицированная область, включающая в себя гены α и ϵ и, возможно, некоторые из генов γ , расположенных далее в направлении 5'-конца [101]. Одна из дублицированных последовательностей — это псевдоген, у которого произошла делеция доменов $C_H 1$ и $C_H 2$. Кроме того, в геноме человека есть еще одна близкородственная гену ϵ последовательность — процессированный псевдоген, обнаруженный вне локуса C_H и даже в другой хромосоме [103].

8.3.6. Переключение тяжелой цепи

Сразу после выделения первых геномных клонов C_H была предпринята попытка выяснить механизм переключения H-цепей. Был проведен сравнительный анализ активных «переключенных» генов из нескольких миелом с соответствующими гаметными генами C_H и с гаметным геном μ . Особое внимание уделялось последовательностям, расположенным по обе стороны от участка, в котором осуществляется рекомбинация при переключении. Во всех случаях ока-

залось, что рекомбинационные события происходят в пределах участков, содержащих последовательности ДНК с внутренними повторами и расположенных с 5'-стороны от последовательностей, кодирующих C_H ; эти участки были названы областями переключения (S -области — от англ. switch) [104—108].

S -область гена μ , S_μ , расположена на расстоянии около 1—2 тпн со стороны 5'-конца от кодирующей последовательности и состоит из множественных тандемных повторов типа (GAGCT) (G_nGGT), где n обычно равно 2—5, но может достигать и 17 [105]. Наличие таких повторов, по-видимому, способствует делециям в области S_μ при гомологичных рекомбинациях, которые могут происходить в процессе экспериментального конструирования и выделения клонов, содержащих S_μ -область. Благодаря таким делециям, большинство клонированных гаметных μ -генов обнаруживается в EcoRI-фрагментах, длина которых была меньше 12,5 тпн, т. е. длины фрагментов, выявляемых при блоттинге по Саузерну геномной ДНК мышей линии BALB/c. При сравнении локусов μ у мышей различных линий было показано, что подобные делеции могут происходить и *in vivo* [109].

Сходные S -последовательности с внутренними повторами, охватывающие области в несколько тысяч пар оснований, обнаружены с 5'-стороны и других генов C_H . В опытах с использованием блоттинга по Саузерну [93] было показано, что зонд S_μ гибридизуется сильнее всего с S_α , несколько слабее с S_γ , слабо с S_{γ_3} и совсем не гибридизуется с другими областями S_γ . Анализ первичной структуры показал, что область S_α состоит из тандемно повторяющихся гомологичных элементов длиной 80 пн, тогда как S_{γ_1} , S_{γ_2} и S_{γ_3} содержат сходные между собой повторяющиеся гомологичные элементы длиной 49 пн. Во всех S -областях с известной последовательностью очень часто встречаются пентамеры GAGCT и G_nGGT , которые являются основным повторяющимся элементом гена S_μ ; в других S -областях эти пентамеры не образуют тандемных повторов, а входят в состав более крупных повторяющихся единиц. На основе высокой частоты делеций в S -области, обусловленной, по-видимому, гомологичными рекомбинациями между внутренними повторами, было высказано предположение, что гомология между повторяющимися элементами различных S -областей может способствовать рекомбинации между этими областями, лежащей в основе переключения изотипа.

Путем сравнения последовательностей гаметной области S_μ с гаметной S_α и S_γ в рекомбинированных миеломных генах удалось точно локализовать место рекомбинации S_μ и S_α в нескольких α -продуцирующих миеломах; аналогичный анализ был проведен и для γ -продуцирующих миелом. Результаты этих опытов показали, что как в S_μ , так и во всех других S -областях нет такой специфической точки, в которой рекомбинация проходит во всех случаях. Таким образом, в отличие от ферментного аппарата рекомбинации V - J система переключения тяжелых цепей, по-видимому, может осуществлять рекомбинацию в различных участках, содержащих гомологичные повторы гаметных S -предшественников и затем соединять эти последовательности в разных точках в пределах данной области. Было замечено, что последовательность YAGGTTA (где Y = C или T) часто располагается вблизи от места рекомбинации при переключении и, видимо, может играть какую-то роль при выборе места рекомбинации [110]. Тот факт, что структуры S -областей у разных изотипов неидентичны, позволил высказать предположение [101, 104], что индивидуальные S -области могут узнаваться различными ферментными системами. Это позволило бы регулировать появление определенного изотипа, влияя на активность изотип-специфических ферментов, участвующих в переключении, возможно, с помощью

T-хелперных факторов. Тот же механизм мог бы отвечать и за специфические к изотипу ответы на разные антигены и способы иммунизации.

Было показано, что S-области генов H-цепей человека очень похожи на гомологичные гены мышей [111, 112]. Действительно, гомология между участками клонов человека и мыши, прилегающими к генам C_H на 5'-концах, распространяется и на S-области, что также подтверждает биологическое значение этих районов.

Структура как гаметных предшественников, так и «переключенных» генов H-цепей изучена довольно подробно, однако сам процесс переключения остается малопонятным. Несмотря на наличие данных в пользу делеции C_H -областей, располагающихся с 5'-стороны от экспрессируемого гена C_H в работающей хромосоме, до сих пор неясно, происходит ли рекомбинация с помощью простого механизма делеции с вырезанием петли или же путем обмена между сестринскими хроматидами. Против простой модели с вырезанием петли свидетельствуют два наблюдения. Во-первых, это описанная в работе Обата и др. [113] структура «переключенного» гена $\gamma 1$. В этом гене между S_μ и $S_{\gamma 1}$ встроен сегмент S_α длиной 0,5 тпв. Такой сегмент можно было бы считать остатком прошедшей ранее рекомбинации между S_μ и S_α , но, согласно делеционной модели, такое переключение должно было бы привести к делеции генов C_H , расположенных с 5'-стороны от α и сделать невозможным второе переключение с участием $\gamma 1$. Во-вторых, при переключении изотипа линии В-клеток иногда наблюдается «обратное» переключение («реверсия»), т. е. переключение на изотип, который, согласно делеционной модели, должен бы быть deletирован из экспрессируемой хромосомы [114]. Оба этих наблюдения можно объяснить с помощью модели обмена между сестринскими хроматидами следующим образом [113]: при первом акте переключения образуется продукт реципрокной рекомбинации, содержащий фланкирующие последовательности, в котором гены C_H , располагавшиеся в гаметной ДНК с 5'-стороны от, например, гена α , окажутся дублированными с 3'-стороны от него. Такой сегмент ДНК, перешедший в дочернюю клетку после первого акта переключения, может подвергнуться вторичному переключению между S_μ и S_α , а затем и третьему (кажущемуся «обратным») переключению с участием одного из генов γ , дублированного с 3'-стороны от гена α . «Обратное» переключение можно объяснить также на основе рекомбинации между рекомбинировавшим сегментом $S_\mu - S_\alpha$ одной хромосомы и сегментом S_γ гомологичной хромосомы. Впрочем, на основании генетических данных по скрещиванию родительских линий, гомозиготных по специфическим аллотипическим маркерам V и C, и определению в поколении F_1 образования антител, несущих маркеры обеих родительских хромосом [115], считается, что межхромосомная рекомбинация встречается редко. С другой стороны, возможно, что «обратное» переключение при нормальном развитии В-клеток как физиологическое событие случается также очень редко либо вообще не происходит. Действительно, на основании результатов блоттинга по Саузерну ДНК клеток с «обратными» перестройками было высказано предположение, что механизм перестроек *in vitro* отличается от механизма переключения изотипа в физиологических условиях [116]. Из сказанного ясно, что изучение деталей механизма переключения изотипа представляет широкий простор для дальнейших исследований.

8.3.7. Клетки, несущие иммуноглобулины двух изотипов

Существование клеток, несущих на поверхности Ig более чем одного изотипа (double bearing cells), было обнаружено во многих лабораториях. В некоторых случаях исследователи смогли продемонстрировать, что эти Ig синтези-

рованы самой клеткой, а не адсорбированы поверхностью клетки из плазмы крови. Существование клеток, экспрессирующих μ и δ , трудно объяснить, если считать, что для экспрессии δ всегда необходим акт рекомбинации, при котором происходит делеция гена μ . На самом деле, как было показано в ряде лабораторий [117—119], клетки, несущие гены μ и δ , могут содержать экспрессирующиеся цепи μ и δ без всяких следов переключения. Маки и др. [117] изучали гибридому GCL2.8, содержащую лишь одну копию хромосомы 12, в которой располагаются мышинные гены C_H . Гибридома эта продуцирует как IgM, так и IgD, а соответствующие μ - и δ -мРНК, как было показано, содержат одну и ту же последовательность V_H . Данные блоттинга по Саузерну указывали на то, что, хотя область J_H подверглась перестройке (рекомбинация $V-D-J$ необходима для любой экспрессии H-цепи), гены μ и δ остались в гаметной конфигурации без каких-либо следов переключения. Простейшее объяснение этих результатов состоит в следующем: μ -мРНК и δ -мРНК образуются при транскрипции одной и той же области генома, путем альтернативного сплайсинга. Эта схема напоминает модель альтернативного синтеза мембранных и секретрируемых форм H-цепей. В другой гибридоме, секретрирующей только цепь δ , была обнаружена делеция гена μ , как это и ожидалось на основании описанных ранее исследований по экспрессии C_H в миеломах. Эти и другие аналогичные опыты привели к предположению о том, что клетки, несущие два изотипа, могут представлять собой промежуточный этап между клетками, синтезирующими только μ , и клетками следующей стадии, синтезирующими только новый изотип; сначала новый изотип синтезируется в результате альтернативного сплайсинга мРНК, несущей несколько C_H ; лишь после этого происходит переключение генов.

Для объяснения экспрессии с переключением изотипа и в других системах были предложены сходные модели с использованием РНК-транскриптов, содержащих множественные гены C_H . Так, в линии В-клеток (полученной при трансформации вирусом лейкоза мышей Абельсона) при культивировании *in vitro* наблюдалось переключение изотипа с μ на $\gamma 2b$, однако при этом оба гена μ оставались в «непереключенной» форме [120]. В другой работе отобранные методом проточной цитофлуорометрии (FASC) спленоциты, несущие на поверхности IgE (большая их часть несла два изотипа IgE и IgM), содержали гены μ , ϵ и γ , которые при блоттинге по Саузерну давали полосы, неотличимые от гаметных как по размеру, так и по интенсивности [121]¹. В обеих работах смена изотипа без «переключающей» перестройки объяснялась наличием длинных РНК-транскриптов. Подтверждение такой модели осложняется техническими трудностями исследования этих гипотетических длинных молекул РНК. РНК-транскрипт, кодирующий гены μ и δ , должен иметь длину не менее 12 тпн (расстояние между сегментом J_H и геном δ), а соответствующие транскрипты, необходимые для кодирования $\gamma 2b$ или ϵ , как в приведенном выше примере, должны быть длиной соответственно 130 и 180 тпн! Транскрипты такого размера должны встречаться крайне редко, если это вообще возможно. Модель постулирует также наличие механизма сплайсинга РНК, способного избирательно соединять предназначенный для экспрессии ген C_H с перестроенным сегментом J_H (VDJ), вырезая при этом все промежуточные гены C_H . Одна из модификаций модели допускает одновременное осуществление транскрипции и сплайсинга таким образом, что промежуточные этапы сплайсинга могут происходить по мере прохождения РНК-полимеразой локуса C_H еще до того, как будут

¹ Позднее появилась работа, объясняющая эти данные сорбцией IgE из сыворотки, а не синтезом поверхностных IgE.— Приж. ред.

транскрибированы гены, наиболее удаленные в сторону 3'-конца. При таком механизме нет необходимости постулировать образование сверхдлинных молекул РНК. Еще одна, но чисто спекулятивная гипотеза состоит в том, что транскрипция может начинаться непосредственно с 5'-конца гена ϵ независимо от транскрипции VDJ . Полученные последовательности гена ϵ и VDJ могут затем соединяться на уровне РНК. Насколько правомерны эти гипотезы, покажут дальнейшие исследования.

8.4. Разнообразие

Одна из наиболее интересных проблем, касающихся Ig, — это источники необъятного разнообразия антительных специфичностей и в особенности относительная роль в этом соматических мутаций и разнообразия гаметных генов. Исследования с использованием клонированных генов позволили выявить ряд источников «рекомбинационного» многообразия и получить некоторую информацию о геномных генах V как в их гаметной (и эмбриональной) форме, так и в активно работающих В-клетках.

Один из классических (появившихся до эры клонирования) подходов к выявлению источников разнообразия состоял в том, чтобы оценить полное число генов V в геноме и полное число антител, которое может образовывать организм, и, сопоставив две эти величины, установить, в каком количестве необходимы — и необходимы ли вообще — соматические мутации. Поскольку обе оценки страдали множеством неточностей, этот подход не позволил получить убедительных данных о важности соматических мутаций. Даже информация, полученная с помощью клонирования генов, не позволяет полностью преодолеть эти трудности. В качестве примера такого расчета рассмотрим число антител, которые могут быть образованы 100 гаметными генами V_x и 50 генами V_H (оба этих числа близки к нижнему пределу оценок числа гаметных генов). Для последовательностей x мы можем умножить 100 (число генов V) на 4 (число активных J -областей) и на 2 (постоянный множитель, отражающий варибельность в области остатка 96, появляющаяся вследствие «гибкости» системы рекомбинации); в результате получим 800. Для H -цепей имеем 50 (число генов V_H) \times 4 (число генов J_H) \times 12 (число известных гаметных D -областей; возможно, что их число еще больше) \times 4 (подвижная рекомбинация с обеих сторон от D); результат составит 9600. Если принять, что ассоциация L - и H -цепей при образовании полной молекулы антитела L_2H_2 происходит случайно, то число различных комбинаций составит $800 \cdot 9600 = 8 \cdot 10^6$. Хотя при этой оценке мы пренебрегли разнообразием, возникающим при участии возможных некодируемых « N »-областей, прилежащих к D -областям в рекомбинировавших генах VDJ , а также возможностью изменения рамки считывания в D -областях, она может служить примером того, как природа, позволяя различным элементам рекомбинировать друг с другом, достигает огромного разнообразия, исходя из ограниченного числа одних и тех же нуклеотидов.

По порядку величины эта оценка полного числа различных последовательностей L_2H_2 совпадает с некоторыми оценками общего числа антител [122] и с первого взгляда устраняет необходимость постулирования соматических мутаций в V -областях. Вывод этот, однако, преждевременен. Одна из трудностей такого подхода состоит в том, что при использованном способе расчета для получения каждой из оценок приходится умножать друг на друга несколько факторов, обладающих достаточно большой погрешностью. При этом погрешность оценки пропорциональна произведению погрешностей, характерных для отдельных факторов. (В самом деле, выбрав другие значения для ряда пара-

метров, в некоторых опубликованных работах пришли к прямо противоположным выводам.) Более того, некоторые из основных допущений, сделанных при расчете, могут оказаться неверными. Маловероятно, например, что каждое из возможных сочетаний L- и H-цепей дает функциональную молекулу антитела, так как в опытах по реассоциации L- + H-цепей *in vitro* гибридные молекулы (образованные L- и H-цепями, выделенными из разных антител) часто бывают относительно нестабильны. Кроме того, ассоциация V и J (или V, D и J), по-видимому, не полностью случайна. Наконец, оценка общего числа антител обычно основывается на экстраполяции данных, полученных при изучении некоторой доли полного репертуара. Трудно установить, насколько представительна такая выборка (белки миелом, например, во многих отношениях нетипичны [123]). Трудно также представить, как соотносятся между собой и с различиями в аминокислотной последовательности параметры, используемые для различения антител с до сих пор не установленной первичной структурой (картины изоэлектрической фокусировки, тонкая антительная специфичность, анализ идиотипа). Например, две L-цепи, различающиеся по трем аминокислотам, могут образовывать антитела, изоэлектрические точки которых и способность к связыванию антигена могут быть одинаковыми или различными в зависимости от природы и локализации аминокислотных замен. Таким образом, недостатки методов подсчета различных структур могут сильно затруднить корректное количественное сравнение.

В отличие от подобных глобальных оценок разнообразия изучение отдельных классов Ig, для которых степень разнообразия можно оценить надежнее, позволило получить более убедительные данные о сравнительной роли гаметного разнообразия и соматических мутаций. Результаты анализа аминокислотных последовательностей λ -цепей мыши убедительно свидетельствуют в пользу роли соматических мутаций в создании разнообразия. Так, Коэн и др. [124], а также Вайгерт и Риблет [125] проанализировали последовательности цепей $\lambda 1$, продуцируемых 21 независимо полученной миеломой, и обнаружили, что 12 из них идентичны. Все остальные варианты оказались уникальными и отличались от последовательности, общей для первых 12 миелом, в основном заменами единичных аминокислот, которые можно, по-видимому, объяснить заменами одного основания (хотя в одном из вариантов были обнаружены две замены, а в другом — три). Важен тот факт, что каждая из замен, кроме одной, была уникальна лишь для одного из вариантов. Авторы пришли к выводу, что общая для 12 миелом последовательность соответствует последовательности единственного гаметного гена, а варианты возникли в результате соматических мутаций. Вывод о том, что общая последовательность соответствует последовательности гаметного гена, был сделан на основании того факта, что появление в результате соматических мутаций одной и той же последовательности 12 раз в 12 независимых миеломах невероятно. Возникновение вариантных последовательностей вследствие соматических мутаций гаметного гена $\lambda 1$ согласуется с тем фактом, что каждый из вариантов наблюдался только однажды, тогда как при появлении таких последовательностей в результате экспрессии других генов V_{λ} можно было ожидать их неоднократного появления. Сейчас, когда эксперименты по клонированию подтвердили, что ген $V_{\lambda 1}$ представлен лишь одной копией, идентификацию вариантов как продуктов соматических мутаций можно считать доказанной. (В действительности уже первый перестроенный ген λ , который удалось клонировать, содержал несколько отличий от гаметного гена.) Следует принять во внимание, однако, одно формальное возражение: мутации, появляющиеся в миеломных антителах, могли возникнуть в результате нефизиологических процессов, связанных со злокачественной трансформацией клеток или их

культивированием в лабораториях, что особенно вероятно в случае миелом, поддерживаемых в культуре по многу лет. В литературе описано возникновение таких мутаций в процессе культивирования клеток миелом [126, 127].

8.4.1. Анализ гаметного разнообразия V -областей L -цепей с помощью рекомбинантных ДНК

При скрининге геномных библиотек гаметной ДНК с помощью зондов, полученных из кДНК V -областей, в нескольких лабораториях были выделены клоны, содержащие группы родственных генов V для κ - или H -цепей [128—131]. Достаточно часто встречались клоны, содержащие по 2 гомологичных гена V , расположенных на расстоянии 5—15 тпн друг от друга. Это позволило предположить, что гены V в геноме могут располагаться группами, состоящими из родственных последовательностей. Корреляция между результатами блоттинга по Саузерну геномной ДНК и рестрикционными картами клонированных генов указывала, что в ряде случаев клоны эти содержат значительную часть V -семейства; это позволило надежно оценить размер нескольких V -семейств. Такого рода исследования показали, что геномный репертуар генов V заметно шире, чем минимальные оценки, предсказанные теми, кто считал соматические мутации основным источником разнообразия [132]; тем не менее было твердо установлено, что соматические мутации играют в создании многообразия существенную роль.

Изучая локус V_{κ} мыши, Кори и др. [133] проанализировали картины блоттинга по Саузерну геномной ДНК мыши с использованием V -зондов, полученных из 10 различных клонов κ -кДНК. Каждый из зондов при гибридизации давал характерную картину из 15—17 полос, но, поскольку некоторые зонды приводили к почти идентичным полосам, были выделены лишь четыре независимые типа гибридизации. Путем сложения длин интенсивно гибридизующихся фрагментов в каждом из этих случаев минимальная длина ДНК, соответствующая каждому из четырех семейств родственных генов V , была оценена примерно в 400 тпн. Для оценки общего геномного репертуара V_{κ} была использована выборочная статистика с тремя различными системами экстраполяции, основанными на количестве полос, выявляемых при блоттинге по Саузерну; наиболее правильные оценки лежали в диапазоне от 90 до 320 генов.

Сходные эксперименты для гаметных генов V_{κ} человека были проведены Бентли и Рэббитсом [134]. Эти исследователи выявили меньший набор гаметных генов, согласующийся с меньшим числом групп родственных аминокислотных последовательностей, обнаруженных в миеломных κ -цепях человека, — только 4 в отличие от более чем 30 у мыши. В этой работе для отбора генов из библиотеки ДНК печени человеческого эмбриона был использован V_{κ} -зонд мыши. Удалось выделить три клон V_{κ} человека, два из которых содержали гены, кодирующие V -области группы I. (Интересно, что третий клон содержал родственную им последовательность, деградировавшую до псевдогена вследствие замен, вставок и делеций, препятствующих функциональной экспрессии). Функциональные гены V_{κ} были затем использованы в качестве зондов для блоттинга по Саузерну геномной ДНК человека. В результате удалось выявить семейство из 15—20 гибридизующихся полос. Поскольку использование V_{κ} -зонда мыши, дивергировавшего на 28% от зондов человека, приводило к той же картине гибридизации, а анализ аминокислотных последовательностей κ -цепей группы I позволил предсказать, что максимальная дивергенция нуклеотидных последовательностей (между членами этой группы) составляет около 25%, был сделан вывод, что среди гибридизационных полос представлены все члены семейства генов

V_H группы I. Однако, поскольку зонд мыши в равной степени гомологичен κ -последовательностям групп I, III и IV человека, вполне вероятно, что наблюдающиеся 15—20 полос включают и гаметные гены V для этих групп. Предположение это было подтверждено результатами блоттинга по Саузерну с использованием зонда, соответствующего гену V группы III; если не считать различий в относительной интенсивности полос, наблюдавшаяся картина была почти неотличима от полученной с зондом группы I. Различия выявлялись лишь по трем полосам. Таким образом, наблюдавшиеся в этих экспериментах полосы могут соответствовать большей части генов V_H групп I, III и IV, которые вместе составляют 83% последовательностей секвенированных κ -цепей человека. Меньшая величина гаметного репертуара у человека по сравнению с мышинным свидетельствует о более важной роли соматических мутаций в генах κ человека, что может быть связано с большей продолжительностью его жизни.

8.4.2. Соматические мутации в легких цепях

Выявление различий в последовательностях нуклеотидов, в перестроенных κ -генах миелом и предполагаемых гаметных предшественниках этих генов отчетливо свидетельствует о том, что гены V_H подвержены соматическим мутациям. Такого рода анализ, как и аналогичные исследования, проведенные на генах V_H , оказались сопряжены со значительными затруднениями, отсутствовавшими в случае описанной выше системы λ . Наличие единственного гаметного гена $V_{\lambda 1}$ означает, что любое отличие последовательности миеломного гена $\lambda 1$ от этого гена должно быть следствием соматической мутации. Для систем же V_H и V_H , напротив, идентификация миеломного гена как продукта соматической мутации надежна лишь постольку, поскольку показано, что этот ген отличается от всех гомологичных генов V гаметного генома, образующих семейство, иногда довольно большое.

Печ и др. [135] использовали V -зонды из двух перестроенных генов κ мышинной миеломы (обозначаемой «Т») для выделения предполагаемых гаметных предшественников гена V из библиотеки геномной ДНК. Для того чтобы идентифицировать специфические предшественники каждого из миеломных генов V , они проклонировали гаметные гены V_H , соответствующие всем полосам Саузерн-блоттинга, интенсивно гибридизующимся с данным V -зондом. Затем было показано, что в каждом случае лишь для одного из клонов участки расщепления рестриктазами соответствуют таковым перестроенного гена миеломы. Сравнение последовательностей перестроенного гена V и гаметного предшественника выявило в каждом случае по шесть нуклеотидных замен. Хотя некоторые из альтернативных объяснений полностью исключить нельзя, эти изменения последовательности почти наверняка являются результатом соматических мутаций.

Другой пример соматических мутаций в генах V_H описали Гершенфельд и др. [136] (и независимо Селсинг и Шторб [137]), которые получили клоны предполагаемых гаметных предшественников для гомологичных генов V_H , экспрессируемых миеломами МОРС167 и МОРС511. В этом случае блоттинг по Саузерну выявил наличие в гаметной ДНК единственного близкородственного гена V . Когда этот ген проклонировали и определили его последовательность, в нем выявились отличия от последовательности МОРС167 по четырем нуклеотидам. Оказалось, что для того, чтобы кодировать последовательность МОРС511, он должен содержать не менее пяти замен. Вследствие различий в сайтах расщепления рестриктазами, predeterminedенных последовательностями МОРС511 и МОРС167, оказалось возможным с помощью блоттинга по Саузерну показать,

что в гаметном геноме не существует гена, идентичного миеломным последовательностям. Следовательно, эти отличия в нуклеотидных последовательностях возникли в результате соматических мутаций.

Эти работы подтвердили роль соматических мутаций в системе генов V_H , предсказанную исходя из большего числа аминокислотных последовательностей x в сравнении с числом гаметных генов V_H , оцененным методами гибридизационной кинетики и блоттинга по Саузерну. Эти исследования, однако, не устранили упомянутой выше формальной возможности того, что изменения последовательности, наблюдаемые в культивируемых в лабораторных условиях миелом, могут отражать нефизиологическое окружение генов в этих клетках.

8.4.3. Разнообразие гаметных V -областей генов тяжелых цепей

Ряд исследователей приступил к изучению локуса генов V_H в гаметном состоянии. Гивол и др. [130] при помощи V_H -зонда, полученного из клона кДНК МРС11, провели скрининг библиотеки ДНК эмбрионов мыши и обнаружили несколько сильно гибридизующихся клонов. Было показано, что два из них содержат по две последовательности V_H с промежутком между ними около 7 и 12 тпн. Последовательность трех из этих генов была определена так же, как последовательность четвертого гена из другого клона. Оказалось, что исследованные гены соответствуют одной из пяти подгрупп, на которые разделены аминокислотные последовательности V_H мыши (подгруппа V_{HII}), и на 80—90% гомологичны зонду МРС11. Эти данные подтверждают, что родственные V_H -гены расположены в хромосоме вблизи друг от друга. Интересно, что три из четырех проанализированных генов, по-видимому, неспособны к экспрессии; один из них несет мутацию, разрушающую иницирующий кодон AUG, а два других — терминирующие кодоны в одной фазе с рамкой считывания. Возможно, эти гены играют некоторую роль в создании разнообразия, участвуя в межгенной рекомбинации или генной конверсии. Однако более вероятно, что они представляют собой неизбежные «отходы», возникающие при необходимости поддерживать составленную многими копиями родственных генов «библиотеку», часть которой может экспрессироваться с достаточно низкой интенсивностью, и давление отбора в сторону сохранения «правильности» таких генов окажется низким. В любом случае, присутствие таких псевдогенов в заметных количествах означает, что при «подсчете генов», основанном на числе наблюдаемых при переносе по Саузерну полос, число функциональных генов можно переоценить.

Сравнивая с помощью блоттинга по Саузерну ДНК миеломы МОРС104Е и гаметную ДНК (из печени), Рехави и др. [131] смогли установить, что подгруппа генов V_{HII} расположена с 5'-стороны от подгруппы V_{HIII} . Миелома МОРС104Е гаплоидна по генам H-цепи и продуцирует миеломный белок V_{HII} -IgM. При сравнении результатов блоттинга ДНК миеломы МОРС104Е и печени с использованием зондов V_{HII} и V_{HIII} (полученных из клона кДНК тяжелой цепи S107) оказалось, что в клетках МОРС104Е отсутствует весь набор генов V_{HIII} , но сохраняются все полосы V_{HII} , имеющиеся в гаметной ДНК. Если считать, что делеция возникает вследствие V - D - J -рекомбинации, то полученный результат означает, что гены семейства V_{HIII} лежат между рекомбинировавшими V_{HII} - и J -генами, располагающимися вблизи C_H , тогда как остальные гены V_{HII} могут избежать делеции в том случае, если они располагаются с 5'-стороны от рекомбинировавшего гена. Такой подход должен оказаться полезным для дальнейшей работы по картированию генов. Другим потен-

циально полезным подходом для картирования локуса V_H может служить сопоставление данных блоттинга по Саузерну с классическими маркерами идиотипов и аллотипов. Бен-Нерия и др. [138] использовали зонды V_{HII} для блоттинга ДНК из 16 линий мышей. Полученные ими результаты в целом хорошо коррелируют с Igh -аллотипом, а выявившиеся различия могут даже оказаться полезными (например, содержать информацию о гаметной рекомбинации между генами V_H и C_H).

8.4.4. Многообразие тяжелых цепей: соматические мутации

В дополнение к описанным выше опытам по анализу вклада гаметных генов в разнообразие V_H с использованием методов клонирования был изучен и вклад соматических мутаций. Лучше других в этом отношении исследованы системы NP^b и антифосфорилхолиновая.

Система NP^b ответственна за необычный ответ мышей C57BL/6 на иммунизацию белками, несущими в качестве гаптена NP (4-гидрокси-3-нитрофенилацетил): основная масса вырабатываемых антител укладывается в ограниченное число изоэлектрических форм и реагирует с полиспецифической антиидиотипической антисывороткой, которая определяет перекрестно-реагирующий идиотип, называемый NP^b и специфический для гаплотипа IgH^b . Для изучения генов V_H , ответственных за этот идиотип, Ботуэлл и др. [139] проклонировали кДНК генов H-цепей из двух гибридом, продуцирующих антитела NP^b . Клон IgM -кДНК был получен из гибридомы, сконструированной после первичного ответа, а клон IgG_{2a} — из гибридомы, полученной после гипериммунного ответа. Последовательность нуклеотидов этих двух кДНК различалась по 10 положениям. Для поиска гаметного прототипа этих генов Ботуэлл и др. обследовали библиотеку ДНК C57BL/6 при помощи зонда, полученного из клона IgG_{2a} -кДНК. Были выделены бактериофаги, содержавшие по крайней мере 14 гомологичных V -областей. В их состав входили все (кроме трех) фрагменты EcoRI, гибридизующиеся с этим зондом при блоттинге по Саузерну геномной ДНК C57BL/6. Исключение слабогибридизующихся клонов позволило уменьшить число «кандидатов» в возможные предшественники до пяти. В независимых опытах для уменьшения числа «кандидатов» клоны расщепляли рестриктазами и скринировали для отбора характерных фрагментов ДНК, предсказанных из последовательностей двух кДНК. Семь клонов (в это число вошли все интенсивно гибридизующиеся) дали картину, предсказанную для IgM -кДНК, но ни в одном случае распределение не совпадало с тем, которое ожидалось для IgG_{2a} -кДНК. После определения последовательности семи предполагаемых предшественников оказалось, что один из них $V186-2$ точно соответствует клону IgM -кДНК. Он и был принят в качестве гаметного предшественника этого клона. Ни одна из определенных последовательностей не совпала с областью $V_H IgG_{2a}$ -клона и не содержала ни одной из 10 нуклеотидных замен, отличающих последовательность $V_H IgG_{2a}$ -клона от последовательности IgM -клона. Авторы заключили, что V -область IgG_{2a} -клона произошла также из $V186-2$, но подверглась соматическим мутациям. Возможность того, что последовательность $V_H IgG_{2a}$ происходит от одного из немногих не попавших в клоны гомологичных гаметных генов V_H , не была исключена полностью, но была признана невероятной, так как семь гаметных генов V_H обладали одним общим свойством — большинство точек, в которых их последовательность отличалась одним нуклеотидом от $V186-2$, совпадало по последовательности по крайней мере еще с одним из других генов этого семейства. Все же 10 отличий, обнаруженных в IgG_{2a} -кДНК, напротив, оказались уникальными, что предполагает их нега-

метное происхождение. Тот факт, что одни и те же отличия последовательности от V_{186} встречаются у нескольких гаметных генов, интересен и сам по себе, так как позволяет сделать важные заключения о генерации разнообразия гаметных генов. Эти общие отличия связывают каждый из гаметных генов со всеми остальными таким образом, который противоречит модели их образования по пути «дупликация — точковая мутация — дупликация и т. д.». Хотя до сих пор не вполне ясно, каков альтернативный механизм образования этих генов, рассматривались варианты с участием гомологичной рекомбинации между генами V_x и конверсии генов. Этот вопрос нуждается в дальнейшем изучении.

Иммунный ответ мышей на фосфорилхоллин (ФХ) представляет собой удобную модель для изучения иммунной системы. В сочетании с гибридной техникой и использованием рекомбинантных ДНК эта модель помогла получить интересные результаты о природе соматических мутаций. Гирхарт и др. [140] исследовали аминокислотные последовательности ФХ-связывающих антител из 20 гибридом и 9 миелом. Для всех этих белков была определена последовательность 36 N-концевых остатков V-области H-цепи, а последовательность 18 V_H -областей была определена полностью. Обобщение полученных данных показало, что, за исключением J-областей (оказавшихся идентичными для всех изученных последовательностей) и D-областей (которые различались у всех изученных изотипов), все V_H области ФХ-связывающих белков класса IgM обладали одной и той же аминокислотной последовательностью. В отличие от этого V_H -области IgA включали в себя V_H -районы, идентичные прототипической последовательности, а в некоторых случаях содержали до семи рассеянных аминокислотных замен. Большая часть V_H -областей IgG содержала по сравнению с прототипом замены. При сравнении 30 L-цепей этих антител (в области остатков 1—36) были выявлены три прототипические последовательности. Все L-цепи IgM были идентичны одному из этих прототипов; отличия были найдены только в L-цепях IgG и IgA. Все варианты последовательностей как V_H , так и V_L оказались уникальными и, за одним исключением, каждая аминокислотная замена была уникальной и свойственной только данному варианту. По аналогии с описанными выше примерами эти сравнения позволяют предположить, что прототипические последовательности соответствуют гаметным генам, а их варианты — это продукты соматических мутаций.

В случае последовательностей генов V_H этот вывод был подтвержден. Для определения числа генов, которые могли бы кодировать наблюдаемые последовательности V_H -цепей, зонд, соответствующий последовательности-прототипу (полученный из S107) гибридизовали с перенесенной на фильтры гаметной ДНК; были обнаружены только четыре интенсивно гибридизующиеся полосы. Крюз и др. [141] выделили из библиотеки геномной ДНК клоны, соответствующие каждой из этих четырех полос. Один из четырех генов — VI — содержал нуклеотидную последовательность, точно кодирующую обнаруженный в описанных выше опытах прототип V_H . Был сделан вывод, что этот ген представляет собой гаметный предшественник V_H -области прототипа. В последовательности второго родственного гена произошел сдвиг рамки, превративший его в псевдоген. Два оставшихся гена кодировали, по всей видимости, вполне «жизнеспособные» области V_H , однако их последовательности содержали так много аминокислотных замен, не наблюдавшихся ни в прототипе, ни в одной из вариантов последовательностей, что эти гены не могли быть кандидатами в гаметные предшественники вариантов последовательностей. Считая, что эти четыре гена представляют собой полный репертуар гаметных генов, кодирующих ФХ-связывающие V_H -области, Крюз и др. сделали вывод, что первый из них, VI, должен быть предшественником как вариантов

последовательностей, так и прототипа и что замены аминокислот должны быть вызваны соматическими мутациями. Тот факт, что варианты последовательности обнаружены только в IgA и IgG, но не в IgM, привел к предположению, что соматические мутации не вносят вклада в разнообразие антител класса IgM, а способствуют лишь разнообразию «переключенных» изотипов. Это положение представляет значительный интерес. Для того чтобы точнее оценить взаимосвязь между переключением изотипа и соматическими мутациями, необходимы дальнейшие эксперименты.

Для изучения природы соматических мутаций Ким и др. [142] определили последовательности экспрессирующихся генов V_H и фланкирующих (примыкаю-

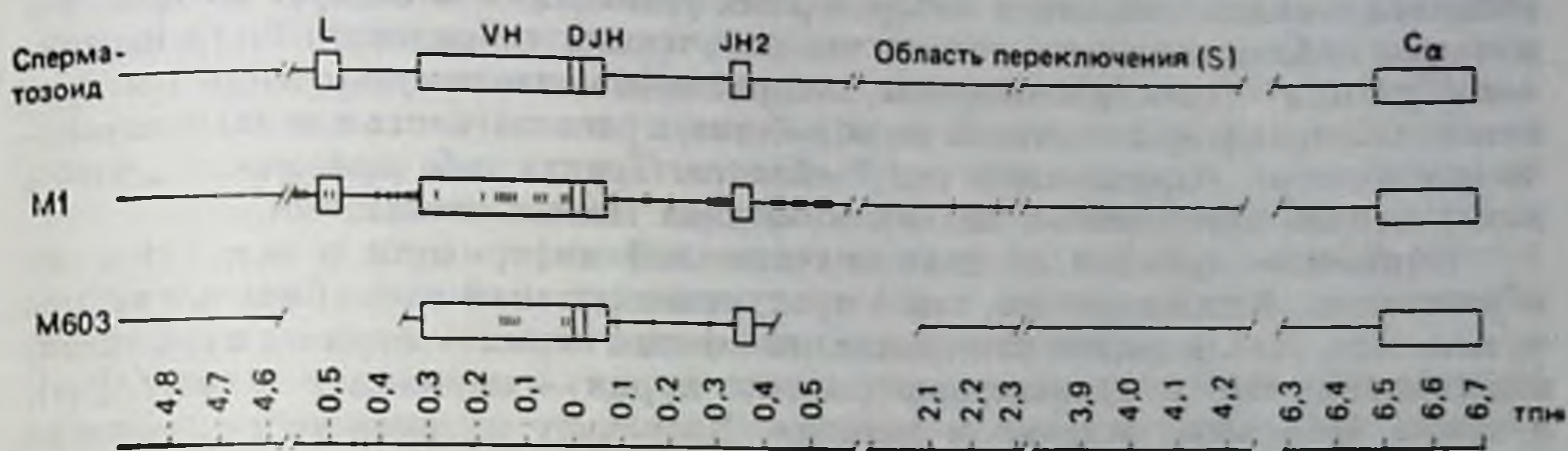


Рис. 8.12. Распределение соматических мутаций в двух миеломных генах V_H . Гены V_H двух ФХ-связывающих антител из миелом M167 (на рисунке обозначено как M1) и M603 были клонированы, и соответствующие области их последовательностей сравнивались с гаметными предшественниками — геном V_H , последовательностью μ и областью $C_{H\alpha}$, клонированными из ДНК сперматозоида [142]. Нуклеотидные замены в каждом экспрессирующемся миеломном гене V_H обозначены вертикальными

черточками. Шкала внизу указывает расстояние сравниваемых участков от D-области. Из сравнения последовательностей следует, что соматические мутации наблюдаются только в ограниченном районе, окружающем рекомбинированный блок V_{DJ} ; за пределами расстояния в 4,6 кпн с 5'-стороны и 3,8 кпн с 3'-стороны от VD активные гены идентичны гаметному предшественнику. Такое расположение свидетельствует в пользу специфического «гипермутационного» механизма. ([142]; печатается с разрешения).

щих) участков ДНК, которые были клонированы из двух миелом, продуцирующих ФХ-связывающие антитела с вариантными последовательностями V_H : M167 (с восемью аминокислотными заменами по сравнению с прототипической последовательностью) и M603 (с тремя заменами). Ряд особенностей 5'-фланкирующей ДНК оказались идентичными у этих перестроенных генов и гаметного гена V_H . Этот факт подтвердил, что ген V_H служит предшественником V_H -областей как M167, так и M603. При сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей предшественника и двух миеломных генов была обнаружена весьма примечательная локализация мутаций (рис. 8.12). В гене M603 мутации были локализованы в кодирующей последовательности гена V_H и в интроне между J_{H1} и J_{H2} . В гене M167, расшифровка структуры которого продвинулась дальше, мутации наблюдались, начиная от области, расположенной с 5'-конца последовательности, кодирующей сигнальный пептид, в обоих кодирующих участках и во всех интронах исследуемой ДНК, захватывая участок, расположенный на расстоянии 2,3 кпн с 3'-стороны от комплекса V_{DJ} . Однако последовательности, располагающиеся в обоих направлениях еще дальше от V_H -области (около 5 кпн в 5'-сторону V_{DJ} и внутрь находящейся с 3'-стороны S-области и $C_{H\alpha}$ -последовательности), оказались незатронутыми мутациями. «Сфокусированное» расположение мутаций позволяет предполо-

жить наличие специфического Ig-«гипермутационного» механизма, способного распознавать какие-то свойства ДНК, соседствующей с *VDJ*-последовательностью.

Эти исследования ФХ-системы неопровержимо доказали наличие соматических мутаций в генах L- и H-цепей и тем самым подтвердили правильность выводов, сделанных в результате других исследований, в которых не было однозначно показано, что гаметные гены, идентичные наблюдающимся «варьянтам», не утрачены в ходе клонирования. Кроме того, полученные данные позволили избавиться от беспокойства по поводу того, что мутации, наблюдающиеся в миеломных последовательностях, — результат искусственной индукции или культивирования миеломы в лабораторных условиях. Это следует из того, что мутации наблюдавшиеся в только что полученных гибридах, были ограничены IgA и IgG (хотя IgM-миеломы, экспрессировавшие немутуирующие последовательности, подверглись такой же обработке) и располагались в очень специфическом участке, окружающем ген V-области. Трудно себе представить, чтобы какой-нибудь артефактный механизм обладал такими свойствами.

Выявление мутаций не дало значительной информации о механизме их образования. Как мишенями, так и продуктами мутаций могут быть все четыре нуклеотида. Наблюдались как транзиции (замены пурин — пурин и пиримидин — пиримидин), так и трансверсии (замены пурин — пиримидин и наоборот), а также небольшие вставки и делеции. Поскольку мутации наблюдаются не только в гипервариабельных или определяющих комплементарность (CDR, complementarity determining regions) областях, обнаруживаясь иногда даже в пептидах, возможно, что гипермутационный механизм не действует предпочтительно на эти участки. Поэтому высокая вариабельность последовательностей CDR может быть следствием отбора клеток, экспрессирующих мутантные CDR. Такой отбор может возникать либо из-за того, что изменения каркаса приводят к изменению общей укладки белка, либо в результате того, что мутации CDR могут повышать сродство к антигену и вследствие этого вести к усилению клональной экспансии.

8.4.5. Биологическое значение соматических мутаций

Тот факт, что V-области IgM соответствуют неизменным гаметным последовательностям, а дальнейшая соматическая дивергенция происходит только при «переключении» изотипов, привел к интересным заключениям относительно биологии иммунного ответа. На начальных стадиях первичного ответа доминируют антитела класса IgM. Для антисыворотки, полученной на более поздних стадиях, характерны два существенных изменения: переход к доминированию IgG и повышение сродства к антигену. В ряде работ (см. обзор [143]) было показано, что у IgM, остающегося в антисыворотке на поздних стадиях ответа, наблюдается минимальное увеличение сродства или гетерогенности, тогда как у антител IgG-класса оба этих параметра резко повышаются. Вспомним также, что одна из задач сывороточных Ig — быстро вывести антиген из кровотока.

Сопоставив эти факты с данными о соматических мутациях, можно представить себе гипотетическую картину, пересматривающую ранние представления о «созревании» аффинитета (сродства) к антигену. При первом «столкновении» с чужеродным антигеном животное обладает набором B-клеток, экспрессирующих поверхностные IgM с последовательностью, соответствующей гаметной. Вследствие разнообразия имеющихся V_L , J_L , V_H , D- и J_H -последовательностей, а также из-за описанных выше внутрительных комбинаторных

возможностей некоторые В-клетки будут продуцировать молекулы Ig с умеренным аффинитетом; эти клетки будут активироваться к пролиферации и секреции антител. Кроме того, будет индуцировано переключение изотипа и включен гипермутационный механизм, вызывающий случайные мутации генов V_L и V_H в индивидуальных клетках-потомках исходно активированной популяции. Многие из произошедших соматических мутаций будут уменьшать аффинитет синтезируемых Ig к антигену; клетки, экспрессирующие на поверхности такие антитела, не будут связывать антиген и перестанут стимулироваться к пролиферации и секреции. Клетки же, мутировавшие в сторону повышения аффинитета связывающего центра к антигену, будут продолжать пролиферировать; после выведения циркулирующего в крови антигена клетки с высоким аффинитетом будут эффективнее стимулироваться низкими концентрациями антигена, чем исходная низкоаффинная популяция, экспрессирующая исключительно гаметную последовательность. Этот избирательный механизм будет постепенно сдвигать популяцию антител в сыворотке в сторону более высокого аффинитета. Продолжающаяся пролиферация этих высокоаффинных клеток приведет к тому, что эти клетки станут доминирующей популяцией клеток памяти после окончания действия антигена — отсюда быстрое появление высокоаффинного ответа при повторном введении антигена.

Очевидно, многие детали этой схемы еще только предстоит подтвердить, однако стоит отметить, что часть из них уже хорошо обоснована в литературе. Например, на важное значение уменьшения концентрации антигена для отбора антител с высоким аффинитетом указывает то, что введение большой дозы антигена может угнетать повышение аффинитета, наблюдаемое при иммунизации меньшими дозами [144]. Без сомнения, дальнейшее изучение роли соматических мутаций в повышении разнообразия в ходе иммунного ответа позволит еще неоднократно проверить эту схему.

8.5. Регуляция перестроек иммуноглобулиновых генов

Процессы рекомбинации генов иммуноглобулинов — одни из самых важных в развитии клеток В-ряда. Рекомбинация сопровождается необратимыми делециями участков генома. При этом определяется, какой изотип L-цепи и какая из пар V_L-V_H будут экспрессироваться во всех последующих поколениях. Можно думать, что такие важные процессы должны четко регулироваться. Действительно, то, что каждая линия В-клеток экспрессирует только один изотип L-цепи (изотипическое исключение) и использует только один из двух гомологичных хромосомных локусов для генов H- и L-цепей (аллельное исключение), означает, что эти процессы тем или иным способом регулируются. Хотя к настоящему времени механизмы такой регуляции изучены еще недостаточно, имеется некоторый прогресс по крайней мере в описании последовательности событий, происходящих с этими генами. Общий подход в работах такого рода состоял в изучении перестроек и экспрессии генов Ig в различных клеточных линиях (лейкозы, лимфомы, гибридомы, миеломы), представляющих собой лимфоциты, остановленные на различных стадиях развития путем слияния или злокачественной трансформации.

Наиболее примитивный тип клеток В-ряда — это пре-В-клетки, содержащие по определению μ -цепи в цитоплазме, но не несущие IgM на поверхности. В ряде экспериментов такие клетки из эмбриональной печени мыши иммортализовали либо слиянием — с получением гибридом [145], либо трансформа-

цией вирусом лейкоза мышей Абельсона (A-MuLV) [146]. Был исследован ряд линий обоих типов. Как правило, методом блоттинга по Саузерну в ДНК этих клеток не выявлялось перестроек генов L-цепей, но наблюдались одна-две перестройки J_H -генов. Некоторые линии, трансформированные A-MuLV, по-видимому, претерпевали перестройку генов- J_H в культуре. Несмотря на отсутствие перестроек в генах κ , некоторая транскрипционная активность этих генов, по всей видимости, наблюдалась, так как удалось зарегистрировать РНК-транскрипт длиной 8,4 тн, содержащий κ последовательности С-области. Такие транскрипты, предположительно иницирующиеся на промоторе, расположенном с 5'-стороны от гаметного гена κ , были ранее обнаружены в некоторых млекопитающих.

Последующие события в ходе созревания В-клетки, по-видимому, заключаются в перестройке гена L-цепи, синтезе L-цепи и появлении Ig на поверхности клетки, что отвечает переходу от пре-В к В-клетке. Взаимосвязь между синтезом легких цепей и появлением поверхностных Ig (sIg) исследовали на нетрансформированных клетках, выделенных из печени поздних эмбрионов и новорожденных мышей [147]. Когда популяцию таких клеток фракционировали адсорбцией на чашках, покрытых анти-Ig, L-цепи выявлялись в sIg⁺-клетках, но не обнаруживались в sIg-клетках. Это позволяет предположить, что появление sIg происходит немедленно вслед за синтезом L-цепи. Последующая активация В-клеток антигеном к пролиферации и созреванию в плазматические клетки, способные секретировать антитела, выходит за рамки этой главы, а взаимосвязь этих процессов с переключением изотипа и соматическими мутациями мало изучена.

Явления аллельного и изотипического исключения изучались в нескольких лабораториях. Были предложены две основные модели. Согласно стохастической модели, обнаруживаемое в клетках большое число дефектно перестроенных генов указывает на то, что функциональные перестройки происходят редко; аллельное исключение вытекает при этом из низкой вероятности совпадения двух маловероятных событий в одной и той же клетке [32]. Так, например, если функционально перестроенные гены κ составляют лишь 10% от всех перестроек этих генов, то только 1% клеток будет обладать двумя функционально перестроенными генами. Это отклонение от правила аллельного исключения, вероятно, максимальное из согласующихся с экспериментом. При таких соотношениях 81% клеток будет содержать два нефункциональных гена ($0,9 \cdot 0,9 = 0,81$) и окажется в «отходах». Подобный расчет с учетом L- и H-цепей приводит к предсказанию, что в «отходах» окажется более 96% клеток (нефункциональные перестройки либо в L-, либо в H-цепях), что кажется неоправданно расточительным. В этой модели низкая частота λ -продуцирующих клеток — статистическое следствие меньшего репертуара способных к перестройке генов V_λ .

Модель, альтернативная стохастической, может быть названа «регуляторной». Согласно этой, более распространенной в настоящее время, точке зрения, функциональная перестройка гена L- (или H)-цепи ингибирует дальнейшие перестройки генов L- (или H)-цепей в той же клетке посредством некоего регуляторного механизма [148]. В случае быстрого ингибирования такой механизм может не допустить одновременной экспрессии обоих аллельных генов и привести к аллельному исключению вне зависимости от частоты нефункциональных перестроек. Специфическим сигналом, с помощью которого клетка «чувствует» функциональную перестройку H-цепи, может служить синтезированный μ -белок. Альтернативный гипотетический механизм, узнающий нуклеотидную последовательность «правильно» перестроенного VDJ-района ДНК или РНК, сталкивается с трудностями при определении перестроек с нарушением рамки считывания вследствие вариабельности длины D-фрагмента. Кроме того,

трудно представить себе, чтобы какая-нибудь система, узнающая нуклеотидную последовательность, могла бы опознавать находящиеся в рамке считывания терминарующие кодоны, которые могут присутствовать в псевдогене V_H , завершающую μ -цепь, по-видимому, присутствует некий регуляторный сигнал, поскольку в более примитивных клетках, не продуцирующих μ -цепей, не наблюдаются перестройки гена L -цепи. Но если белок μ может служить сигналом, разрешающим перестройку L -цепи, то он с тем же успехом может быть и сигналом, запрещающим последующую перестройку H -цепи.

В пользу подобного регуляторного механизма, блокирующего ненужную перестройку L -цепи, убедительно свидетельствуют работы по рекомбинации генов κ и λ в происходящих от лимфоцитов линиях клеток больных лейкозом и лимфомой. В этих работах Хитер и др. [149] и Корсмейер и др. [150] методом блоттинга по Саузерну изучали структуру генов L -цепей как в κ - и λ -секретирующих клетках, так и в несекретирующих (клетках типа ni -Т/ ni -В при остром лимфоцитарном лейкозе). Как и предполагалось, в κ -секретирующих клетках были перестроены гены κ , а в λ -секретирующих — гены λ . Неожиданным оказалось то, что при использовании гетерологичных зондов гены λ в κ -секретирующих клетках были совершенно незатронуты, тогда как гены κ клеток, секретирующих λ , были обычно делетированы или по крайней мере перестроены. Такая асимметрия результатов заставила предположить, что κ -перестройки должны предшествовать λ -перестройкам и, кроме того, что присутствие функционального белка κ (сигналом, возможно, служит появление на мембране L_2H_2) блокирует перестройку λ . Результаты этих экспериментов позволили сформулировать следующие гипотетические правила регуляции, объясняющие как изотипическое, так и аллельное исключение: а) присутствие нормальных μ -цепей останавливает дальнейшие перестройки H -цепей, но запускает перестройку генов κ ; б) появление L_2H_2 на мембране блокирует дальнейшие перестройки L -цепи; в) перестройки или делеции гена κ в обоих аллелях запускают перестройку λ .

Согласно этим правилам, пре-В-клетки могут «пробовать» получить функциональные L -цепи с четырех хромосомных локусов; сначала с двух аллелей κ , а затем, если обе перестройки κ окажутся безуспешными, с двух аллельных локусов λ (возможно, что в хромосоме, несущей гены λ , последовательным перестройкам могут подвергаться различные неаллельные гены λ). Клетка, непродуктивно перестроившая все локусы генов L -цепей, превращается в 0 -клетку, в конечное дифференцированное состояние. Типы клеток, запрещаемые этими правилами, т. е. клетки с перестроенными генами κ и только гаметными генами μ , клетки с перестроенными генами λ и только гаметными генами κ , а также клетки, синтезирующие одновременно κ и λ -цепи, в этих линиях человеческих клеток не наблюдались, тогда как почти все разрешенные типы клеток были обнаружены. Следует отметить, что делеции генов κ , имеющие место в λ -секретирующих клетках, очевидно, совершенно отличаются от нефункциональных перестроек генов $V-J$, наблюдающихся как «вторичные» перестройки в клетках, секретирующих κ . Механизм этих делеций неизвестен, как неизвестна и природа сигнала, при помощи которого эти делеции, видимо, «разрешают» перестройку генов λ .

8.6. Гены иммуноглобулинов: хромосомы и рак

Известен класс перестроек в гене *Ig*, отличный от уже рассмотренных, и, видимо, связанный со злокачественной трансформацией тех клеток, в которых эти гены активны, т. е. В-лимфоцитов. Некоторые данные, указывающие на связь между генами *Ig* и раком В-клеток, были получены при хромосомном картировании этих генов.

До наступления эры рекомбинантных ДНК классические методы генетики позволили локализовать некоторые гены *Ig* в определенных хромосомах, продемонстрировав генетическое сцепление аллотипов с известными хромосомными маркерами. Новые методы, использующие клонированные гены, подтвердили и расширили эти представления. Один из многообещающих методов состоит в получении гибридных клеток путем слияния, например, человеческих клеток с культивируемыми клетками мыши. Поскольку такие гибридомы утрачивают преимущественно человеческие хромосомы, при субклонировании можно получить набор различных гибридных линий, каждая из которых сохраняет те или иные человеческие хромосомы. Затем, используя гибридизацию ДНК с клонированными генами человека, можно установить, какая из гибридных линий содержит клонированный ген. (Перекрестная гибридизация с гомологичными генами мыши обычно не создает трудностей, так как мышиные и человеческие гены можно различить методом блоттинга по Саузерну по различиям в сайтах рестрикции во фланкирующих последовательностях). Сопоставляя наличие человеческого гена (или продукта его экспрессии) с тем, какая из хромосом человека сохранилась в различных гибридных субклонах, можно идентифицировать хромосому, несущую этот ген. С помощью этого метода иммуноглобулиновые гены были локализованы в хромосомах человека 2 (κ), 22 (λ) и 14 (*IgH*) [151, 152]. В аналогичных опытах с использованием гибридов между клетками мыши и клетками других грызунов *Ig*-гены мыши были локализованы в хромосомах 6 (κ), 16 (λ) и 12 (*IgH*) [153—155].

Три хромосомы, содержащие гены *Ig* человека, обладают еще одним общим свойством, позволяющим предположить связь между этими генами и раком В-клеток. Со времени открытия хромосомной аномалии при хроническом миелогенном лейкозе (хромосома «Филадельфия») поиск подобных аномалий был предпринят и в случае других злокачественных заболеваний. Было обнаружено, что при лейкозах В-клеток и лимфомах Беркита наблюдаются взаимные транслокации между хромосомой 8 и либо хромосомами 2 и 22, либо, чаще всего, хромосомой 14. Цитологические методы с использованием флуоресцентного красителя акрихина и дифференциального окрашивания хромосом трипсином-Гимзой позволили установить, что участок транслокации хромосомы 14 находится в одном из дисков, обозначаемых как 14q32 [156, 157]. Метод картирования генов Н-цепей в хромосоме позволил локализовать их точно в том же участке хромосомы 14. Этот метод основан на гибридизации *in situ* меченого тритием ДНК-зонда с хромосомой, распластанной на предметном стекле. Стекло покрывают фотографической эмульсией и выдерживают для радиоавтографии. Расположение появляющихся зерен серебра позволяет определить положение данного гена не только в конкретной хромосоме, но и в определенном диске хромосомы. Тот факт, что Кирш и др. [158] выявили гены Н-цепей в диске 14q32 — том же участке хромосомы, который участвует в связанных с раком транслокациях в В-клетках, — позволяет предположить, что транслокации могут происходить внутри локуса генов Н-цепей, и что активная экспрессия этого локуса в В-клетках может быть каким-то образом связана с транслокацией и злокачественным перерождением.

Сходные данные позволили связать локус генов человека с хромосомным диском, в котором происходит транслокация 8;2 в некоторых линиях лимфомы Беркита [159].

Пытаясь точнее картировать участок транслокации 8;14 в линии клеток лимфомы Беркита (Дауди) по отношению к генам H-цепей, Эрикссон и др. [160] получили гибриды клеток Дауди и линии клеток мышинной миеломы. С помощью блоттинга по Саузерну им удалось определить содержание генов V_H и C_H в различных гибридных субклонах. Было установлено, что субклон, содержащий аномальную хромосому 8, несущую транслоцированный конец плеча хромосомы 14, несет и некоторое число человеческих генов V_H , но не содержит $C_{H\mu}$ или $C_{H\gamma}$. В то же время субклон, несущий аномальную хромосому 14 с транслоцированным участком хромосомы 8, содержал гены $C_{H\mu}$ и $C_{H\gamma}$ человека. Эти данные свидетельствуют о том, что транслокация в линии Дауди происходит внутри локуса генов H-цепей. Злокачественные клетки мышей, вероятно, должны обладать сходными характеристиками, так как уже известно, что мышинные миеломы содержат частые транслокации дистальной части хромосомы 15 либо на хромосому 6 (несущую гены κ), либо на хромосому 12 (несущую гены H-цепей) [161].

Транслокации происходят в результате межхромосомной рекомбинации. Поскольку рекомбинация — это естественное и необходимое свойство генов Ig , можно задаться вопросом: не способствуют ли транслокациям в локус генов Ig те же их участки, которые необходимы для физиологической рекомбинации, т. е. последовательности ДНК, принимающие участие в рекомбинации $V(D)J$ или в переключении изотипа? Если это так, то можно ожидать, что гомологичные последовательности присутствуют в хромосоме 8 человека (или мышинной хромосоме 15), так как и рекомбинация $V(D)H$, и переключение изотипа, по всей видимости, происходят с участием родственных последовательностей обоих рекомбинирующих партнеров. Какие физиологические функции могут выполнять подобные последовательности, находясь вне генов Ig ? Для того чтобы углубиться далее в область предположений, необходимо учесть, что иммуноглобулины — это лишь один из многих видов белков, в которых компонент «А» может быть связан с различными компонентами «В» или «С». При этом в зависимости от того, с каким из компонентов («В» или «С») соединится компонент «А», полный белок будет выполнять несколько разных функций, необходимых при различных физиологических условиях, например в разных типах клеток или на разных стадиях развития. Приведем лишь два примера: гемоглобин плода и гемоглобин взрослого содержат одинаковые α -субъединицы, но различаются другой субъединицей — гемоглобин плода содержит γ -субъединицу, гемоглобин взрослого — β -субъединицу; гонадотропины и тиреотропин содержат одну и ту же α -субъединицу, но различаются β -субъединицами [162]. В рассмотренных случаях ассоциируют субъединицы, кодирующиеся разными генами в отличие от перестроек внутри одного полипептида (как в случае Ig). Однако широкая распространенность такого феномена позволяет предполагать, что кроме Ig и другие системы могут использовать рекомбинацию генов для «переключения» компонентов внутри одного полипептида. В связи с этим интересно отметить, что Кирш и др. [163] при изучении мышинной миеломы S107 обнаружили, что последовательности, гомологичные S_{μ} , существуют вне локуса C_H . Миелома S107 продуцирует IgA , и следовало бы ожидать, что в экспрессирующейся хромосоме делетированы все гены C_H и сопутствующие им S-области, располагающиеся между генами S_{μ} и S_{α} . В неэкспрессирующейся хромосоме миеломы S107 произошла ошибочная рекомбинация непосредственно с 5'-стороны от другой копии гена α , чему, очевидно, сопутствовала делеция остав-

шихся генов C_H , так как блоттинг по Саузерну с использованием μ , γ - и ϵ -зондов показывает, что эти гены в миеломе S107 полностью отсутствуют. При гибридизации гаметной ДНК в блоттинге с сегментом S-последовательности, полученным из гена S_μ , кроме сильной полосы, соответствующей гену $S_\mu-C_{H\mu}$, наблюдалось 15 менее выраженных полос. Важно то, что почти все эти полосы остаются и в S107 несмотря на то, что эта линия утратила весь локус C_H с 5'-стороны от $C_{H\alpha}$. Объяснить это можно, по-видимому, тем, что слабо выраженные полосы соответствуют последовательностям, родственным S-области, расположенным вне локуса генов H-цепей и, возможно, принимающим участие в переключении генов каких-либо других систем. Сакояма и др. [164] с помощью подобного же S_μ -зонда проверили ДНК у множества различных видов животных, включая беспозвоночных, не продуцирующих Ig. Тот факт, что перекрестно-гибридизующиеся последовательности были обнаружены у морского ежа, дрозофилы и дрожжей, свидетельствует, очевидно, о том, что у этих организмов может существовать некий механизм переключения генов, не имеющий отношения к генам Ig, и что переключение генов может оказаться эволюционно древним механизмом, перешедшим затем к Ig.

Связь всего вышесказанного с транслокационными событиями часто носит гипотетический характер, так как неизвестно, участвуют ли в этих событиях S-последовательности или сигналы рекомбинации VDJ. В то же время некоторые твердо установленные данные приводят к многообещающим заключениям, касающимся двух других вопросов, связанных с участием транслокаций в злокачественном росте В-клеток: какие последовательности транслоцируются в хромосому 8 и как связана транслокация со злокачественной трансформацией? В мышьяной миеломе S107, как упоминалось выше, в неэкспрессирующейся хромосоме произошла ошибочная рекомбинация, при которой новый, не имеющий отношения к генам Ig сегмент ДНК был вставлен с 5'-стороны от гена α . Когда этот «ошибочный» сегмент ДНК (или полученный сходным образом сегмент из миеломы J558 [165]) применили в качестве зонда при блоттинге по Саузерну, его удалось отождествить с BamHI-фрагментом длиной 5,6 тпн или EcoRI-фрагментом длиной ≥ 22 тпн гаметной ДНК. Харрис и др. [165] и Кирш и др. [163] обнаружили, что большая часть миелом содержит как перестроенную полосу, так и полосу, совпадающую по размеру с гаметной, тогда как в гибридах перестройки этой последовательности не наблюдалось. То, что эта последовательность перестроена в миеломах, но не в гибридах, предполагает, что эта перестройка может быть связана со злокачественной трансформацией миелом, а не с экспрессией генов Ig.

Участие специфических генов в злокачественной трансформации было подробно изучено методами рекомбинантных ДНК, и результаты этих исследований явились еще одним триумфом современной генетики. Было обнаружено, что более десятка онкогенных вирусов содержат «онкогены», способные индуцировать злокачественную трансформацию в чувствительных к ним клетках [166]. Вызывает удивление, что каждому вирусному онкогену «v-*onc*» соответствует близкородственный клеточный ген «с-*onc*», по-видимому участвующий в нормальных процессах в организме. Считается, что оба гена, как правило, кодируют сходные или идентичные белковые продукты. Таким образом, во многих случаях злокачественная трансформация связана не с аномальными свойствами вирусного белка, а с повышенным количеством этого белка, индуцированного геном v-*onc*, который не подчиняется механизмам, регулирующим экспрессию гена с-*onc*. Фактически ген с-*onc* может индуцировать трансформацию примерно с той же эффективностью, что и вирусный онкоген, если с помощью методов генетической инженерии с 5'-стороны от его кодирующей последователь-

ности вставить вирусный промотор. Вторым механизмом вирусного онкогенеза может служить включение такого промотора *in vivo* при интеграции вируса с клеточным геномом вблизи от гена *c-onc*, что может стимулировать избыточную экспрессию этого клеточного гена. Индукция вирусом злокачественного роста при таком механизме должна протекать с относительно длительным латентным периодом, так как трансформация зависит от редкого события, при котором интеграция происходит случайно вблизи подходящего клеточного гена. Хорошим примером может служить индукция В-клеточных лимфом вирусом лейкоза птиц. Этот вирус трансформирует клетку, интегрируя вблизи клеточного гомолога гена *v-onc* вируса миелодисплазии (*v-myc*) и значительно стимулируя образование вирусоспецифической РНК [167]. Учитывая специфичность этого вируса для трансформации В-клеток, Тауб и др. [168] изучили возможность того, что описанный выше «ошибочный» сегмент ДНК (который, по-видимому, специфически перестраивается в миеломах) может иметь отношение к гену *myc*. Оказалось, что этот сегмент ДНК хорошо гибридизуется с клонированным геном *c-myc* курицы. Это позволяет утверждать, что новая последовательность, появляющаяся с 5'-стороны от неэкспрессирующегося гена α в миеломе S107, и есть *c-myc*. Когда в качестве зонда при блоттинге по Саузерну ДНК из 10 линий клеток Беркита был использован ген *c-myc* человека, во всех линиях был обнаружен фрагмент EcoRI длиной 12,5 тпв, содержащий неперестроенный ген *c-myc* человека, а в 5 линиях наблюдалась дополнительная полоса перестроенного гена *c-myc*. В двух из этих линий полоса перестроенного гена *c-myc* комигрировала с полосой, идентифицированной при помощи человеческого μ -зонда с использованием двух рестриктаз; это позволяет предположить, что в этих клетках ген *c-myc* перестроен в область, близкую к человеческому гену μ . Наконец, с помощью гибридизации *in situ* было показано, что ген *c-myc* человека располагается в диске q24 хромосомы 8, т. е. в том же участке ДНК, который принимает участие в транслокациях в хромосомы 14, 22 и 2, содержащие гены *Ig*. Из этих данных вытекает интересное предположение: злокачественный рост В-клеток может быть следствием активации гена *c-myc*, возникающей не с помощью вирусного промотора, а в результате транслокации этого гена в участок, близкий к активно экспрессирующимся генам *Ig*. Те же локальные особенности хромосомы, которые активировали гены *Ig* В-клеток, могут активировать и сближенный с ними в результате транслокации ген *c-myc*, что и приводит к злокачественной трансформации. Эта гипотеза имеет большое значение, так как предполагает причинную связь между наблюдающимися при раке хромосомными транслокациями и генами *c-onc*, которые могут быть ответственны за злокачественное перерождение. То, что перестроенный ген *c-myc* был обнаружен не во всех миеломах или лимфомах Беркита, может означать, что это — не единственное объяснение трансформации В-клеток. Этот факт, однако, может объясняться и просто тем, что рекомбинация в этом случае произошла за пределами участков, вырезаемых использованными для блоттинга по Саузерну рестриктазами, и не была обнаружена. Кроме важнейшего значения этих результатов для онкологии они позволяют объяснить также один из видов перестроек в генах *Ig*, наблюдающихся при блоттинге по Саузерну миеломной ДНК.

Заключение

Технология рекомбинантных ДНК позволила выявить предшественников и продукты для нескольких видов генных перестроек, участвующих в экспрессии генов *Ig*. Ко времени написания этой главы молекулярные механизмы этих рекомбинационных событий, а также принципы, на которых основана их регу-

лядия, в деталях еще не выяснены. Если темп развития этой области не уменьшится в сравнении с первыми годами исследований с помощью методов рекомбинантных ДНК, следующее издание данной книги будет содержать решения некоторых из этих загадок, а также, без сомнения, и новые вопросы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dreyer W. J., Bennett J. C. The molecular basis of antibody formation: A paradox, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 54, 864 (1965).
2. Faust C. H., Diggelmann H., Mach B. Estimation of the number of genes coding for the constant part of the mouse immunoglobulin kappa light chain. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 71, 2491 (1974).
3. Stavnezer J., Huang R. C. C., Stavnezer E., Bishop J. M. Isolation of messenger RNA for an immunoglobulin kappa chain and enumeration of the genes for the constant region of kappa chain in the mouse, J. Mol. Biol., 88, 43 (1974).
4. Leder P., Honjo T., Packman S., Swan D., Nau M., Norman B. The organization and diversity of immunoglobulin genes, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 71, 5109 (1974).
5. Ono M., Kondo T., Kawakami M., Honjo T. Purification of immunoglobulin heavy chain messenger RNA by immunoprecipitation from the mouse myeloma tumor, MOPC-31C, J. Biochem., 81, 949 (1977).
6. Legler M. K., Cohen E. P. Hybridization properties of immunoglobulin mRNA: Failure to detect covalently associated IgG mRNA transcripts of reiterated and unique mouse DNA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 3528 (1977).
7. Rabbitts T. H. Hybridization characteristics of enzymatically synthesised DNA complementary to mouse immunoglobulin messenger RNA, FEBS Lett., 42, 323 (1974).
8. Seidman J. G., Edgell M. H., Leder P. Immunoglobulin light-chain structural gene sequences cloned in a bacterial plasmid, Nature, 271, 582 (1978).
9. Lenhard-Schuller R., Hohn B., Brack C., Hiram M., Tonegawa S. DNA clones containing mouse immunoglobulin κ chain genes isolated by in vitro packaging into phage λ coats, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 4709 (1978).
10. Hamlyn P. H., Brownlee G. G., Cheng C-C., Gait M. J., Milstein C. Complete sequence of constant and 3' noncoding regions of an immunoglobulin mRNA using the dideoxynucleotide method of RNA sequencing, Cell, 15, 1067 (1978).
11. Southern E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, J. Mol. Biol., 98, 503 (1975).
12. Seidman J. G., Leder A., Nau M., Norman B., Leder P. Antibody diversity. The structure of cloned immunoglobulin genes suggests a mechanism for generating new sequences, Science, 202, 11 (1978).
13. Wilson R., Miller J., Storb U. Rearrangement of immunoglobulin genes, Biochemistry, 18, 5013 (1979).
14. Seidman J. G., Leder A., Edgell M. H., Polsky F., Tilghman S. M., Tiemeier D. C., Leder P. Multiple related immunoglobulin variable-region genes identified by cloning and sequence analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 3881 (1978).
15. Steinmetz M., Höchtel J., Schnell H., Gebhard W., Zachau H. G. Cloning of V region fragments from mouse liver DNA and localization of repetitive DNA sequences in the vicinity of immunoglobulin gene segments, Nucleic Acids Res., 8, 1721 (1980).
16. Seidman J. G., Leder P. The arrangement and rearrangement of antibody genes, Nature, 276, 790 (1978).
17. Rabbitts T. H., Forster A. Evidence for noncontiguous variable and constant region genes in both germ line and myeloma DNA, Cell, 13, 319 (1978).
18. Perry R. P., Kelley D. E., Coleclough C., Seidman J. G., Leder P., Tonegawa S., Matthysens G., Weigert M. Transcription of mouse κ chain genes: Implications for allelic exclusion, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1937 (1980).
19. Brack C., Tonegawa S. Variable and constant parts of the immunoglobulin light chain gene of a mouse myeloma cell are 1250 nontranslated bases apart, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5652 (1977).
20. Seif I., Khoury G., Dhar R. BKV splice sequences based on analysis of preferred donor and acceptor sites, Nucleic Acids Res., 6, 3387 (1979).
21. Seidman J. G., Max E. E., Leder P. A κ immunoglobulin gene is formed by site-specific recombination without further somatic mutation, Nature, 280, 370 (1979).
22. Max E. E., Seidman J. G., Leder P. Sequences of five potential recombination sites encoded close to an immunoglobulin κ constant region gene, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 3450 (1979).

23. Sakano H., Hüppi K., Heinrich G., Tonegawa S. Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes, *Nature*, 280, 288 (1979).
24. Altenburger W., Steinmetz M., Zachau H. G. Functional and non-functional joining in immunoglobulin light chain genes of a mouse myeloma, *Nature*, 287, 603 (1980).
25. Bernard O., Gough N. M., Adams J. M. Plasmacytomas with more than one immunoglobulin κ mRNA: implications for allelic exclusion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 5812 (1981).
26. Schnell H., Steinmetz M., Zachau H. G. An unusual translocation of immunoglobulin gene segments in variants of the mouse myeloma MPC11, *Nature*, 286, 170 (1980).
27. Seidman J. G., Leder P. A mutant immunoglobulin light chain is formed by aberrant DNA- and RNA-splicing events, *Nature*, 286, 779 (1980).
28. Choi E., Kuehl M., Wall R. RNA splicing generates a variant light chain from an aberrantly rearranged κ gene, *Nature*, 286, 776 (1980).
29. Kwan S.-P., Max E. E., Seidman J. G., Leder P., Scharff M. D. Two kappa immunoglobulin genes are expressed in the myeloma S107, *Cell*, 26, 57 (1981).
30. Leder P., Max E. E., Seidman J. G. The organization of immunoglobulin genes and the origin of their diversity. In: *Immunology 80*, ed. by M. Fougereau and J. Dausset, p. 34, Academic Press, New York, (1980).
31. Hozumi N., Wu G. E., Murialdo H., Roberts L., Vetter D., Fife W. L., Whiteley M., Sadowski P. RNA splicing mutation in an aberrantly rearranged immunoglobulin λ I gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 7019 (1981).
32. Coleclough C., Perry R. P., Karjalainen K., Weigert M. Aberrant rearrangements contribute significantly to the allelic exclusion of immunoglobulin gene expression, *Nature*, 290, 372 (1981).
33. Early P., Huang H., Davis M., Calame K., Hood L. An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: V_H , D and J_H , *Cell*, 19, 981 (1980).
34. Seidman J. G., Nau M. M., Norman B., Kwan S.-P., Scharff M., Leder P. Immunoglobulin V/J recombination is accompanied by deletion of joining site and variable region segments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 6022 (1980).
35. Ness B. G., van, Coleclough C., Perry R. P., Weigert M. DNA between variable and joining gene segments of immunoglobulin κ light chain is frequently retained in cells that rearrange the κ locus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 262 (1982).
36. Hocht J., Müller C. R., Zachau H. G. Recombined flanks of the variable and joining segments of immunoglobulin genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 1383 (1982).
37. Sheppard H. W., Gutman G. A. Allelic forms of rat κ chain genes: Evidence for strong selection at the level of nucleotide sequence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 7064 (1981).
38. Sheppard H. W., Gutman G. A. Rat kappa-chain J-segment genes: Two recent gene duplications separate rat and mouse, *Cell*, 29, 121 (1982).
39. Breiner A. V., Brandt C. R., Milcarek C., Sweet R. W., Ziv E., Burstein Y., Schechter I. Somatic DNA rearrangement generates functional rat immunoglobulin κ chain genes: The J_κ gene cluster is longer in rat than in mouse, *Gene*, 18, 165 (1982).
40. Hieter P. A., Max E. E., Seidman J. G., Maizel J. V., Jr., Leder P. Cloned human and mouse kappa immunoglobulin constant and J. region genes conserve homology in functional segments, *Cell*, 22, 197 (1980).
41. Hieter P. A., Maizel J. V., Jr., Leder P. Evolution of human immunoglobulin κ J region genes, *J. Biol. Chem.*, 257, 1516 (1982).
42. Heidmann O., Rougeon F. Multiple sequences related to a constant region kappa light chain gene in the rabbit genome, *Cell*, 28, 507 (1982).
43. Tonegawa S., Brack C., Hozumi N., Schuller R. Cloning of an immunoglobulin variable region gene from mouse embryo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 3518 (1977).
44. Tonegawa S., Mazam A. M., Tizard R., Bernard O., Gilbert W. Sequence of a mouse germ-line gene for a variable region of an immunoglobulin light chain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 1485 (1978).
45. Bernard O., Hozumi N., Tonegawa S. Sequences of a mouse immunoglobulin light chain genes before and after somatic changes, *Cell*, 15, 1133 (1978).
46. Blomberg B., Traunecker A., Eisen H., Tonegawa S. Organization of four mouse λ light chain immunoglobulin genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 3765 (1981).
47. Blomberg B., Tonegawa S. DNA sequences of the joining regions of mouse λ light chain immunoglobulin genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 530 (1982).
48. Miller J., Bothwell A., Storb U. Physical linkage of the constant region genes for immunoglobulins λ_I and λ_{III} , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 3829 (1981).
49. Miller J., Selsing E., Storb U. Structural alterations in J regions of mouse immunoglobulin λ genes are associated with differential gene expression, *Nature*, 295, 428 (1982).

50. *Selsing E., Miller J., Wilson R., Storb U.* Evolution of mouse immunoglobulin λ genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 4681 (1982).
51. *Hieter P. A., Hollis G. F., Korsmeyer S. J., Waldmann T. A., Leder P.* Clustered arrangement of immunoglobulin λ constant region genes in man, *Nature*, 294, 536 (1981).
52. *Hollis G. F., Hieter P. A., McBride O. W., Swan D., Leder P.* Processed genes: A dispersed human immunoglobulin gene bearing evidence of RNA-type processing, *Nature*, 296, 321 (1982).
53. *Davis M. M., Calame K., Early P. W., Livant D. L., Joho R., Weissman I. L., Hood L.* An immunoglobulin heavy-chain gene is formed by at least two recombinational events, *Nature*, 283, 733 (1980).
54. *Maki R., Traunecker A., Sakano H., Roeder W., Tonegawa S.* Exon shuffling generates an immunoglobulin heavy chain gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 2138 (1980).
55. *Kataoka T., Kawakami T., Takahashi N., Honjo T.* Rearrangement of immunoglobulin $\gamma 1$ -chain gene and mechanism for heavy-chain class switch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 919 (1980).
56. *Schilling J., Clevinger B., Davie J. M., Hood L.* Amino acid sequence of homogeneous antibodies to dextran and DNA rearrangements in heavy chain V-region gene segments, *Nature*, 283, 35 (1980).
57. *Bernard O., Gough N. M.* Nucleotide sequence of immunoglobulin heavy chain joining segments between translocated V_H and μ constant region genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 3630 (1980).
58. *Gough N. M., Bernard O.* Sequences of the joining region genes for immunoglobulin heavy chains and their role in generation of antibody diversity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 509 (1981).
59. *Sakano H., Maki R., Kurosawa Y., Roeder W., Tonegawa S.* Two types of somatic recombination are necessary for the generation of complete immunoglobulin heavy-chain genes, *Nature*, 286, 676 (1980).
60. *Sakano H., Kurosawa Y., Weigert M., Tonegawa S.* Identification and nucleotide sequence of a diversity DNA segment (D) of immunoglobulin heavy-chain genes, *Nature*, 290, 562 (1981).
61. *Kurosawa Y., von Boehmer H., Haas W., Sakano H., Traunecker A., Tonegawa S.* Identification of D segments of immunoglobulin heavy-chain genes and their rearrangement in T lymphocytes, *Nature*, 290, 565 (1981).
62. *Kurosawa Y., Tonegawa S.* Organization, structure, and assembly of immunoglobulin heavy chain diversity DNA segments, *J. Exp. Med.*, 155, 201 (1982).
63. *Raverch J. V., Siebenlist U., Korsmeyer S., Waldmann I., Leder P.* Structure of the human immunoglobulin μ locus: Characterization of embryonic and rearranged J and D genes, *Cell*, 27, 583 (1981).
64. *Siebenlist U., Raverch J. V., Korsmeyer S., Waldmann T., Leder P.* Human immunoglobulin D segments encoded in tandem multigenic families, *Nature*, 294, 631 (1981).
65. *Alt F. W., Baltimore D.* Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: Implications from a chromosome with evidence of three D — J_H fusions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 4118 (1982).
66. *Nottenburg C., Weissman I. L.* C_μ gene rearrangement of mouse immunoglobulin genes in normal B cells occurs on both the expressed and nonexpressed chromosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 484 (1981).
67. *Nossal G. J. V., Szenberg A., Ada G. L., Austin C. M.* Single cell studies on 19S antibody production, *J. Exp. Med.*, 119, 485 (1964).
68. *Wang A.-C., Wang I. Y. F., McCormick J. N., Fudenberg H. H.* The identity of light chains of monoclonal IgG and monoclonal IgM in one patient, *Immunochemistry*, 6, 451 (1969).
69. *Nisonoff A., Fudenberg H. H., Wilson S. K., Hopper J. E., Wang A. C.* Individual antigenic specificity in immunoglobulins: relationship to biosynthesis, *Fed. Proc.*, 31, 206 (1972).
70. *Gearhart P. J., Sigal N. H., Kltzman N. R.* Production of antibodies of identical idiotype but diverse immunoglobulin classes by cells derived from a single stimulated B cell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 1707 (1975).
71. *Kincade P. W., Lawton A. R., Bockman D. E., Cooper M. D.* Suppression of immunoglobulin G synthesis as a result of antibody-mediated suppression of immunoglobulin M synthesis in chickens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 67, 1918 (1970).
72. *Honjo T., Kataoka T.* Organization of immunoglobulin heavy chain genes and allelic deletion model, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 2140 (1978).
73. *Cory S., Adams J. M.* Deletions are associated with somatic rearrangement of immunoglobulin heavy chain genes, *Cell*, 19, 37 (1980).
74. *Cory S., Jackson J., Adams J. M.* Deletions in the constant region locus can account for switches in immunoglobulin heavy chain expression, *Nature*, 285, 450 (1980).

75. *Rabbitts T. H., Forster A., Dunnick W., Bentley D. L.* The role of gene deletion in the immunoglobulin heavy chains switch, *Nature*, 283, 351 (1980).
76. *Yaoita Y., Honjo T.* Deletion of immunoglobulin heavy chain genes from expressed allelic chromosome. *Nature*, 286, 850 (1980).
77. *Tucker P. W., Marcus K. B., Newell N., Richards J., Blattner F. R.* Sequence of the cloned gene for the constant region of murine $\gamma 2b$ immunoglobulin heavy chain, *Science*, 206, 1303 (1979).
78. *Tucker P. W., Slightom J. L., Blattner F. R.* Mouse IgA heavy chain gene sequence: Implications for evolution of immunoglobulin hinge exons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 7684 (1981).
79. *Sakano H., Rogers H. J., Hüppi K., Brack C., Traunecker A., Maki R., Tonegawa S.* Domains and the hinge region of an immunoglobulin heavy chain are encoded in separate DNA segments. *Nature*, 277, 627 (1979).
80. *Gough N. M., Kemp D. J., Tyler B. M., Adams J. M., Cory S.* Intervening sequences divide the gene for the constant region of mouse immunoglobulin μ chains into segments, each encoding a domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 554 (1980).
81. *Calame K., Rogers J., Early P., Davis M., Livant D., Wall R., Hood L.* Mouse C_{μ} heavy chain immunoglobulin gene segment contains three intervening sequences separating domains, *Nature*, 284, 452 (1980).
82. *Vassalli P., Tedghi R., Lisowski-Bernstein B., Tartakoff A., Jaton J.-C.* Evidence for hydrophobic region within heavy chains of mouse B lymphocyte membrane-bound IgM, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 5515 (1979).
83. *Kemp D. J., Harris A. W., Adams J. M.* Transcripts of the immunoglobulin C_{μ} gene vary in structure and splicing during lymphoid development, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 7400 (1980).
84. *Singer P. A., Singer H. H., Williamson A. R.* Different species of messenger RNA encode receptor and secretory IgM μ chains differing at their carboxy termini, *Nature*, 285, 294 (1980).
85. *Early P., Rogers J., Davis M., Calame K., Bond M., Wall R., Hood L.* Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin μ gene by alternative RNA processing pathways, *Cell*, 20, 313 (1980).
86. *Alt F. W., Bothwell A. L. M., Knapp M., Siden E., Mather E., Koshland M., Baltimore D.* Synthesis of secreted and membrane-bound immunoglobulin μ heavy chains is directed by mRNAs that differ at their 3' ends, *Cell*, 20, 293 (1980).
87. *Rogers J., Early P., Carter C., Calame K., Bond M., Hood L., Wall R.* Two mRNAs with different 3' ends encode membrane-bound and secreted forms of immunoglobulin μ chain, *Cell*, 20, 303 (1980).
88. *Rogers J., Choi E., Souza L., Carter C., Word C., Kuehl M., Eisenberg D., Wall R.* Gene segments encoding transmembrane carboxyl termini of immunoglobulin γ chains, *Cell*, 26, 19 (1981).
89. *Cheng H-L., Blattner F. R., Fitzmaurice L., Mushinski J. F., Tucker P. W.* Structure of genes for membrane and secreted murine IgD heavy chains, *Nature*, 296, 410 (1982).
90. *Yamawaki-Kataoka Y., Nakai S., Miyata T., Honjo T.* Nucleotide sequences of gene segments encoding membrane domains of immunoglobulin γ chains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 2623 (1982).
91. *Cushley W., Coupar B. E. H., Mickelson C. A., Williamson A. R.* A common mechanism for the synthesis of membrane and secreted immunoglobulin α , γ and μ chains, *Nature*, 298, 77 (1982).
92. *Tyler B. M., Cowman A. F., Gerondakis S. D., Adams J. M., Bernard O.* mRNA for surface immunoglobulin γ chains encodes a highly conserved transmembrane sequence and a 28-residue intracellular domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 2008 (1982).
93. *Shimizu A., Takahashi N., Yaoita Y., Honjo T.* Organization of the constant-region gene family of the mouse immunoglobulin heavy chain, *Cell*, 28, 499 (1982).
94. *Tyler B. M., Adams J. M.* Organization of sequences flanking immunoglobulin heavy chain genes and their role in class switching, *Nucleic Acids Res.*, 8, 5579 (1980).
95. *Dolby T. W., Devuono J., Croce C. M.* Cloning and partial nucleotide sequence of human immunoglobulin μ chain cDNA from B cells and mouse-human hybridomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 6027 (1980).
96. *Ellison J. W., Berson B. J., Hood L. E.* The nucleotide sequence of a human immunoglobulin C_{γ} gene, *Nucleic Acids Res.*, 10, 4071 (1982).
97. *Takahashi N., Ueda S., Obata M., Nikaido T., Nakai S., Honjo T.* Structure of human immunoglobulin gamma genes: Implications for evolution of a gene family, *Cell*, 29, 671 (1982).

98. *Ellison J., Burbaum J., Hood L.* Nucleotide sequence of a human immunoglobulin C_γ gene. *DNA*, 1, 11 (1981).
99. *Ellison J., Hood L.* Linkage and sequence homology of two human immunoglobulin γ heavy chain constant region genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 1984 (1982).
100. *Nishida Y., Mili T., Hisajima H., Honjo T.* Cloning of human immunoglobulin ε chain genes: Evidence for multiple C_ε genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 3833 (1982).
101. *Max E. E., Battey J., Ney R., Kirsch I. R., Leder P.* Duplication and deletion in the human immunoglobulin ε genes, *Cell*, 29, 691 (1982).
102. *Flanagan J. G., Rabbitts T. H.* The sequence of a human immunoglobulin epsilon heavy chain constant region gene, and evidence for three non-allelic genes, *EMBO J.*, 1, 655.
103. *Battey J., Max E. E., McBride W. O., Swan D., Leder P.* A processed human immunoglobulin ε gene has moved to chromosome 9, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 5956 (1982).
104. *Dunnick W., Rabbitts T. H., Milstein C.* An immunoglobulin deletion mutant with implications for the heavy-chain switch and RNA splicing, *Nature*, 286, 669 (1980).
105. *Nikaido T., Nakai S., Honjo T.* Switch region of immunoglobulin C_μ gene is composed of simple tandem repetitive sequences, *Nature*, 292, 845 (1981).
106. *Kataoka T., Miyata T., Honjo T.* Repetitive sequences in class-switch recombination regions of immunoglobulin heavy chain genes, *Cell*, 23, 357 (1981).
107. *Takahashi N., Kataoka T., Honjo T.* Nucleotide sequences of class-switch recombination region of the mouse immunoglobulin γ2b-chain gene, *Gene*, 11, 117 (1980).
108. *Davis M. M., Kim S. K., Hood L. E.* DNA sequences mediating class switching in α-immunoglobulins, *Sciences*, 209, 1360 (1980).
109. *Marcu K. B., Banerji J., Penncavage N. A., Lang R., Arnheim N.* 5' flanking region of immunoglobulin heavy chain constant region genes displays length heterogeneity in germ-lines of inbred mouse strains, *Cell*, 22, 187 (1980).
110. *Marcu K. B., Lang R. B., Stanton L. W., Harris L. J.* A model for the molecular requirements of immunoglobulin heavy chain class switching, *Nature*, 298, 87 (1982).
111. *Rabbitts T. H., Forster A., Milstein C. P.* Human immunoglobulin heavy chain genes: Evolutionary comparisons of C_μ, C_δ and C_γ genes and associated switch sequences, *Nucleic Acids Res.*, 9, 4509 (1981).
112. *Ravetch J. V., Kirsch I. R., Leder P.* Evolutionary approach to the question of immunoglobulin heavy chain switching: Evidence from cloned human and mouse genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 6734 (1980).
113. *Obata M., Kataoka I., Nakai S., Yamagishi H., Takahashi N., Yamawaki-Kataoka Y., Nikaido T., Shimizu A., Honjo T.* Structure of a rearranged γ1 chain gene and its implication to immunoglobulin class-switch mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 2437 (1982).
114. *Radbruch A., Liesegang B., Rajewsky L.* Isolation of variants of mouse myeloma X63 that express changed immunoglobulin class, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 2909 (1980).
115. *Kindt T. J., Mandy W. J., Todd C. W.* Association of allotypic specificities of group a with allotypic specificities A11 and A12 in rabbit immunoglobulin, *Biochemistry*, 9, 2028 (1970).
116. *Sabitzky F., Radbruch A., Rajewsky K.* Spontaneous immunoglobulin class switching in myeloma and hybridoma cell lines differs from physiological class switching, *Immunol. Rev.*, 67, 59 (1982).
117. *Maki R., Roeder W., Irauneker A., Sidman C., Walb M., Raschke W., Tonegawa S.* The role of DNA rearrangement and alternative RNA processing in the expression of immunoglobulin delta genes, *Cell*, 24, 353 (1981).
118. *Knapp M. R., Ltu C-P., Newell N., Ward R. B., Tucker P. W., Strober S., Blattner F.* Simultaneous expression of immunoglobulin μ and δ heavy chains by a cloned B-cell lymphoma: A single copy of the V_H gene is shared by two adjacent C_H genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 2996 (1982).
119. *Moore K. W., Rogers J., Hunkapiller T., Early P., Nottenburg C., Weissman I., Bazin H., Wall R., Hood L.* Expression of IgD may use both DNA rearrangement and RNA splicing mechanisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 1800 (1981).
120. *Alt F. W., Rosenberg N., Casanova R. J., Thomas E., Baltimore D.* Immunoglobulin heavy-chain expression and class switching in a murine leukaemia cell line, *Nature*, 296, 325 (1982).
121. *Yaotta Y., Kumagai Y., Okumura K., Honjo T.* Expression of lymphocyte surface IgE does not require switch recombination, *Nature*, 297, 697 (1982).
122. *Williamson A. R.* The biological origin of antibody diversity, *Annu. Rev. Biochem.*, 45, 467 (1976).

123. Loh E., Black B., Riblet R., Weigert M., Hood J. M., Hood L. Myeloma proteins from NZB and BALB/c mice: Structural and functional differences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 1395 (1979).
124. Cohn M., Blomberg B., Geckeler W., Raschke W., Riblet R., Weigert M. First order considerations in analyzing the generator of diversity. In: *The Immune System Genes, Receptors, Signals*, ed. by E. E. Sercarz, A. R. Williamson, and C. F. Fox., p. 89, Academic Press, New York, 1974.
125. Weigert M., Riblet R. Genetic control of antibody variable regions, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 41, 837 (1977).
126. Cook W. D., Scharff M. D. Antigen-binding mutants of mouse myeloma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5687 (1977).
127. Rudikoff S., Giusti A. M., Cook W. D., Scharff M. D. Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 1979 (1982).
128. Bentley D. L., Rabbitts T. H. Human immunoglobulin variable region genes — DNA sequences of two V_x genes and a pseudogene, *Nature*, 288, 730 (1980).
129. Matthysens G., Rabbitts T. H. Structure and multiplicity of genes for the human immunoglobulin heavy chain variable region, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 6561 (1980).
130. Givol D., Zakut R., Effron K., Rechavi G., Ram D., Cohen J. B. Diversity of germ-line immunoglobulin V_H genes, *Nature*, 292, 426 (1981).
131. Rechavi G., Bienz B., Ram D., Ben-Neriah Y., Cohen J. B., Zakut R., Givol D. Organization and evolution of immunoglobulin V_H gene subgroups, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 4405 (1982).
132. Cohn M. Selection under a somatic model (Editorial), *Cell. Immunol.*, 1, 461 (1970).
133. Cory S., Tyler B. M., Adams J. M. Sets of immunoglobulin V_x genes homologous to ten cloned V_x sequences: Implications for the number of germline V_x genes, *J. Molec. Appl. Genet.*, 1, 103 (1981).
134. Bentley D. L., Rabbitts T. H. Human V_x immunoglobulin gene number: Implications for the origin of antibody diversity, *Cell*, 24, 613 (1981).
135. Pech M., Höchtel J., Schnell H., Zachau H. G. Differences between germ-line and rearranged immunoglobulin V_x coding sequences suggest a localized mutation mechanism, *Nature*, 291, 668 (1981).
136. Gershenfeld H. K., Tsukamoto A., Weissman I. L., Joho R. Somatic diversification is required to generate the V_x genes of MOPC 511 and MOPC 167 myeloma proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 7674 (1981).
137. Selsing E., Storb U. Somatic mutation of immunoglobulin light-chain variable-region genes, *Cell*, 25, 47 (1981).
138. Ben-Neriah Y., Cohen J. B., Rechavi G., Zakut R., Givol D. Polymorphism of germ-line immunoglobulin V_H genes correlates with allotype and idiotype markers, *Eur. J. Immunol.*, 11, 1017 (1981).
139. Bothwell A. L., M., Paskind M., Reth M., Imanishi-Kari T., Rajewsky K., Baltimore D. Heavy chain variable region contribution to the NP^d family of antibodies: Somatic mutation evident in a $\gamma 2a$ variable region, *Cell*, 24, 625 (1981).
140. Gearhart P. J., Johnson N. D., Douglas R., Hood L. IgG antibodies to phosphorylcholine exhibit more diversity than their IgM counterparts, *Nature*, 291, 29 (1981).
141. Crews S., Griffin J., Huang H., Calame K., Hood L. A single V_H gene segment encodes the immune response to phosphorylcholine: Somatic mutation is correlated with the class of the antibody, *Cell*, 25, 59 (1981).
142. Kim S., Davis M., Sinn E., Patten P., Hood L. Antibody diversity: Somatic hypermutation of rearranged V_H genes, *Cell*, 27, 573 (1981).
143. Karush F. The affinity of antibody: Range, variability, and the role of multivalence. In: *Comprehensive Immunology*, ed. by G. W. Litman and R. A. Good, p. 85, Plenum, New York, 1978.
144. Eisen H. N., Siskind G. W. Variations in affinities of antibodies during the immune response, *Biochemistry*, 3, 996 (1964).
145. Perry R. P., Kelley D. E., Coleclough C., Kearney J. F. Organization and expression of immunoglobulin genes in fetal liver hybridomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 247 (1981).
146. Alt F., Rosenberg N., Lewis S., Thomas E., Baltimore D. Organization and reorganization of immunoglobulin genes in A-MuLV-transformed cells: Rearrangement of heavy but not light chain genes, *Cell*, 27, 381 (1981).
147. Siden E., Alt F. W., Shinefeld L., Sato V., Baltimore D. Synthesis of immunoglobulin μ chain gene products precedes synthesis of light chains during B-lymphocyte development, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 1823 (1981).
148. Alt F. W., Enea V., Bothwell A. L. M., Baltimore D. Activity of multiple light chain genes in murine myeloma cells producing a single, functional light chain, *Cell*, 21, 1 (1980).

149. *Hieter P. A., Korsmeyer S. J., Waldmann T. A., Leder P.* Human immunoglobulin κ light-chain genes are deleted or rearranged in λ -producing B cells, *Nature*, 290, 368 (1981).
150. *Korsmeyer S. J., Hieter P. A., Ravetch J. V., Poplack D. G., Waldmann T. A., Leder P.* Developmental hierarchy of immunoglobulin gene rearrangements in human leukemic pre-B-cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 7096 (1981).
151. *McBride O. W., Hieter P. A., Hollis G. F., Swan D., Otey M. C., Leder P.* Chromosomal location of human kappa and lambda immunoglobulin light chain constant region genes, *J. Exp. Med.*, 155, 1480 (1982).
152. *Croce C. M., Shander M., Martinis J., Cicurel L., D'Ancona G. G., Dolby T. W., Koprowski H.* Chromosomal location of the genes for human immunoglobulin heavy chains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 3416 (1979).
153. *Swan D., D'Eustachio P., Leinwand L., Seidman J., Keithley D., Ruddle F. H.* Chromosomal assignment of the mouse κ light chain genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 2735 (1979).
154. *D'Eustachio P., Bothwell A. L. M., Takaro T. K., Baltimore D., Ruddle F. H.* Chromosomal location of structural genes encoding murine immunoglobulin λ light chains. Genetics of murine λ light chains, *J. Exp. Med.*, 153, 793 (1981).
155. *D'Eustachio P., Pravatcheva D., Marcu K., Ruddle F. H.* Chromosomal location of the structural gene cluster encoding murine immunoglobulin heavy chains, *J. Exp. Med.*, 151, 1545 (1980).
156. *Klein G.* The role of gene dosage and genetic transpositions in carcinogenesis, *Nature*, 294, 313 (1981).
157. *Rowley J. D.* Identification of the constant chromosome regions involved in human hematologic malignant disease, *Science*, 216, 749 (1982).
158. *Kirsch I. R., Morton C. C., Nakahara K., Leder P.* Human immunoglobulin heavy chain genes map to a region of translocations in malignant B lymphocytes, *Science*, 216, 301 (1982).
159. *Malcolm S., Barton P., Murphy C., Ferguson-Smith M. A., Bentley D. L., Rabbitts T. H.* Localization of human immunoglobulin κ light chain variable region genes to the short arm of chromosome 2 by *in situ* hybridization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 4957 (1982).
160. *Erikson J., Finan J., Nowell P. C., Croce C. M.* Translocation of immunoglobulin V_H genes in Burkitt lymphoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 5611 (1982).
161. *Ohno S., Babonits M., Wiener F., Spira J., Klein G.* Nonrandom chromosome changes involving the Ig gene-carrying chromosomes 12 and 6 in pristane-induced mouse plasmacytomas, *Cell*, 18, 1001 (1979).
162. *Fiddes J. C., Goodman H. M.* The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones, *J. Molec. Appl. Genet.*, 1, 3 (1981).
163. *Kirsch I. R., Ravetch J. V., Kwan S.-P., Max E. E., Ney R. L., Leder P.* Multiple immunoglobulin switch region homologies outside the heavy chain constant region locus, *Nature*, 293, 585 (1981).
164. *Sakoyama Y., Yaoita Y., Honjo T.* Immunoglobulin switch region-like sequences in *Drosophila melanogaster*, *Nucleic Acids Res.*, 10, 4203 (1982).
165. *Harris L. J., Lang R. B., Marcu K. B.* Non-immunoglobulin-associated DNA rearrangements in mouse plasmacytomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 4175 (1982).
166. *Bishop J. M.* Oncogenes, *Sci. Am.*, 246, 80 (1982).
167. *Hayward W. S., Neel B. G., Astrin S. M.* Activation of a cellular *onc* gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukemia, *Nature*, 290, 475 (1981).
168. *Taub R., Kirsch I., Morton C., Lenoir G., Swan D., Tronick S., Aaronson S., Leder P.* Translocation of the *c-myc* gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt's lymphoma and murine plasmacytoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7837 (1982).
169. *Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.* *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
170. *Tonegawa S.* Somatic recombination and mosaic structure of immunoglobulin genes, *Harvey Lectures*, 75, 61 (1981).

Иммуноглобулины: аллотипы и идиотипы

Джулиан Б. Флайшман, Джозеф М. Дейви

(Julian B. Fleischman Joseph M. Davie)

9.1. Аллотипы

Аллотипы — это аллельные варианты полипептидных цепей иммуноглобулинов, сегрегирующие, согласно законам Менделя, среди представителей какого-либо вида¹. Открытие в конце 50-х начале 60-х годов Удином и Груббом (Oudin, Grubb) аллотипов иммуноглобулинов сыграло важную роль в развитии иммунологии. В то время широкое признание получило мнение, что запутанный вопрос о возникновении разнообразия антител должен решаться на генетическом уровне, а аллотипические детерминанты послужили первыми генетическими маркерами, по которым удалось проследить за наследованием иммуноглобулинов у животных и людей. Многие аллотипы оказались очень похожими на аллельные формы других белков, например на полипептидные цепи гемоглобинов. Некоторые аллотипы наследуются и экспрессируются значительно более сложным образом, что воздвигло немало препятствий на пути к изучению механизма экспрессии генов иммуноглобулинов. Некоторые из таких препятствий рассматриваются в данной главе.

Практически во всех известных случаях аллотипические различия легких и тяжелых цепей обуславливаются заменами аминокислот, происшедшими в результате мутаций соответствующих структурных генов. Эти замены сосредоточены главным образом в константных областях². В отличие от ситуации, имеющей место в случае многих вариантов цепей гемоглобина, аллотипические замены в большинстве случаев не сказываются на специфичности антител (которая определяется вариабельными областями). Невелико влияние этих замен и на эффекторные функции различных классов и подклассов иммуноглобулинов. Аллотипические детерминанты распознаются антителами и Т-клетками и могут играть важную роль в регуляции иммунного ответа (хотя пока еще трудно сказать, каким образом осуществляется эта регуляция). Группа аллотипов, представляющая собой аллельные варианты одного гена, характеризует аллотипический «локус». Таким образом, локус соответствует либо одному структурному гену, либо группе тесно сцепленных генов. У гетерозигот аллели одного локуса кодоминантны, т. е. в сыворотке можно обнаружить оба аллотипа, кодируемых данным локусом. В то же время у гетерозигот любая иммуноглобулиновая молекула всегда симметрична: обе тяжелые цепи и обе легкие цепи имеют один и тот же аллотип. Поэтому в сыворотке крови гетерозиготных особей находится смесь молекул иммуноглобулинов, часть которых содержит две тяжелые (или легкие) цепи одного аллотипа, а другая часть — две тяжелые (или легкие) цепи второго аллотипа. Следовательно, у особей, гетерозиготных по

¹ В конце главы приведено несколько ссылок на прекрасные обзорные статьи [1—8].

² Любопытным исключением являются аллотипы локуса α иммуноглобулинов кролика; они служат маркерами генов V_H -области. До настоящего времени не ясно, влияют ли эти замены на функцию антител; дальнейшее изучение этой группы аллотипов, по-видимому, прольет свет на то, как построены и экспрессируются гены V_H .

локусам как легких, так и тяжелых цепей, будут присутствовать четыре типа молекул, различающихся по аллотипу. Причина этого явления заключается в том, что отдельная плазматическая клетка, секретирующая гомогенную популяцию антител, экспрессирует лишь одну из двух родительских аллелей, кодирующих тяжелые или легкие цепи. Поэтому все молекулы определенного класса, продуцируемые одной клеткой, имеют две идентичные тяжелые и две идентичные легкие цепи.

Еще в самом начале генетических исследований иммуноглобулинов было выяснено, что аллотипические маркеры тяжелых цепей, легких цепей κ -типа и легких цепей λ -типа не сцеплены друг с другом. На этой основе было высказано предположение о том, что структурные гены тяжелых цепей, а также κ - и λ -цепей образуют три отдельных, несцепленных семейства генов, находящихся в разных хромосомах. Недавно эта гипотеза нашла подтверждение при изучении генетики соматических клеток мыши и человека [9]. Если изучать наследование не только аллотипов константной области, но также и наследование генетических маркеров вариабельной области (например, кроличьих аллотипов локуса a или наследуемых идиотипов мыши), то оказывается, что в пределах одного семейства генов гены вариабельной и константной областей сцеплены, т. е. V_H -гены находятся в той же хромосоме, что и C_H -гены.

9.1.1. Простые и комплексные аллотипы.

Латентная экспрессия

Многие аллотипы различаются заменой лишь одной или нескольких аминокислот, что можно легко объяснить мутациями, приводящими к образованию аллельных вариантов данного структурного гена. Такие аллотипы называют «простыми». Небольшим количеством замен они напоминают аллельные формы многих белков, например глобиновых цепей. Причина появления «комплексных» аллотипов более сложная. Значительные отличия — более чем на 30% аминокислотных остатков — наблюдаются у аллельных вариантов цепей (т. е. аллотипов) иммуноглобулинов кролика по локусам a и b (аллотипы V_H и C_H). Этим они напоминают изотипы иммуноглобулинов. Трудно объяснить столь значительные различия простой дивергенцией аллелей единственного структурного гена в процессе эволюции отдельного вида животных. Появление некоторых комплексных аллотипов легче понять, исходя из предположения о тандемной дупликации набора псевдоаллельных структурных генов; возможно, гены, кодирующие некоторые или даже все известные аллотипы, имеются у каждой особи, а аллелизм обуславливается регуляторным или контрольным геном. Такая модель псевдоаллелей позволяет объяснить наличие значительной вариабельности в последовательности аминокислот, характерной для комплексных аллотипов, результатом длительной эволюции набора дублированных генов. Основная трудность модели заключается в том, чтобы понять кажущийся аллелизм регуляторных элементов, контролирующих экспрессию этих структурных генов. Согласно другой гипотезе, объясняющей возникновение некоторых комплексных аллотипов, их гены представляют собой единичные аллельные гены, претерпевшие значительные изменения либо в результате негомологичного кроссинговера, либо путем конверсии генов [10].

Ключом к решению этой проблемы могут послужить исследования «латентных» аллотипов. Последние представляют собой аллотипы, которые обнаруживаются у неиммунных кроликов в очень малых количествах и появление которых нельзя предсказать, исходя из истории данного семейства. Иногда у иммунизированных кроликов латентные аллотипы присутствуют в больших количествах.

вах. Ниже будет приведено несколько примеров. Наличие латентных аллотипов служит веским доводом в пользу того, что у всех индивидов имеются структурные гены, кодирующие несколько аллотипов одного локуса. И в этом случае логичнее всего объяснить факт существования экспрессии латентных аллотипов псевдоаллельной организацией нескольких структурных генов. Появление наряду с «обычными» аллотипами, ожидаемыми на основе известного генотипа животного, небольших количеств «неожиданных» аллотипов может быть обусловлено ошибками аллельного регуляторного механизма.

9.1.2. Обнаружение аллотипов

Аллотипы идентифицируют серологическими методами. Как правило, специфическую антисыворотку к аллотипическим детерминантам получают, вводя донорский иммуноглобулин, несущий определенный аллотип, реципиенту того же вида, у которого, однако, данный аллотип отсутствует. Удин (Udin) впервые охарактеризовал кроличьи аллотипы локусов *a* и *b*, приготовив указанным способом антисыворотку, специфичную к аллотипическим детерминантам. Именно таким путем получают большую часть аллотипических антисывороток. В некоторых случаях такие антисыворотки удается получить иммунизацией животных другого вида. Однако подобные гетерологичные антисыворотки содержат главным образом антитела против иммунодоминантных изотипических детерминант иммуногена, поскольку аллотипические детерминанты зачастую образуются в результате лишь незначительных изменений в антигенной структуре молекулы. По этой причине такие антисыворотки следует тщательно истощать иммуноглобулинами другого аллотипа. Антисыворотки к аллотипам иммуноглобулинов человека, разумеется, лишь в редких случаях получают иммунизацией людей. Как правило, в качестве антисывороток к аллотипам человека используют сыворотки здоровых людей или больных, страдающих некоторыми аутоиммунными заболеваниями (например, ревматоидным артритом).

Поскольку некоторые аллотипические различия бывают обусловлены лишь незначительными структурными вариациями иммуноглобулиновых молекул, то с помощью аллотипической антисыворотки часто удается обнаружить лишь одну-две уникальные антигенные детерминанты. Нередко антиаллотипические антитела не преципитируют иммуноглобулин, имеющий соответствующий аллотип, поскольку при этом не происходит образования протяженной трехмерной решетки, необходимой для преципитации. Поэтому для серологического обнаружения аллотипов следует использовать другие методы, например описанное ниже для аллотипов человека торможение гемагглютинации, а также радиоиммунный анализ с адсорбцией на твердой фазе или преципитацией вторыми антителами. Однако антисыворотки к кроличьим аллотипам *a* и *b* и некоторым S_H -аллотипам мыши хорошо преципитируют соответствующие иммуноглобулины. Все эти аллотипы представляют собой комплексные аллотипы (см. ниже), которые отличаются друг от друга несколькими аминокислотами. При подобных заменах скорее всего имеется по несколько различных антигенных детерминант на молекулу, что приводит к поливалентному взаимодействию с антиаллотипическими антителами и образованию пространственной решетки с последующей преципитацией.

Ниже будет рассмотрено несколько хорошо изученных систем аллотипов. Некоторые из этих систем имеют как комплексные, так и латентные аллотипы; именно на этих примерах будут обсуждаться те вопросы, которые возникают при изучении экспрессии подобных аллотипов.

Таблица 9.1. Некоторые аллотипы иммуноглобулинов

Локус аллотипа	Локализация в цепи	Аллотипы	Аминокислотные остатки 2)
у кролика			Множественные замены
a	V _H	a1, a2, a3	То же
x	V _H	x32, x ¹)	» »
y	V _H	y33, y ¹)	» »
b	C _x	b4, b4 ^{var} , b5, b6, b9, b ^{bas}	Н. О.
c	λ	c7, c21	То же
Ms	Cμ	Ms16, Ms17	Met 225
d	Cγ	d11	Thr 225
		d12	Thr 309
e	Cγ	e14	Ala 309
		e15	Н. О.
f	Ca1	f69—f73	То же
g	Caγ	g74—g77	» »
t	Секреторный компонент IgA	t61, t62	
У человека			
G1m	Cγ1 (CH1)	G1m(4)	Arg 214
		G1m(17)	Lys 214
	Cγ1 (CH3)	G1m(1)	Asp 365, Leu 358
		G1m(-1)	Glu 356, Met 358
G2m	Cγ2 (CH2)	G2m(23), G2m(23-)	Н. О.
G3m	Cγ3 (CH2)	G3m(5)	То же
		G3m(-5)	» »
		G3m(15)	Tyr 296
		G3m(16)	Phe 296
		G3m(21)	
		G3m(-21)	
	Cγ3 (CH3)	G3m(6)	Phe 436
		G3m(11)	Tyr 436
		G3m(-11)	
		G3m(13)	
		G3m(14)	
G4m	Cγ4 (CH2)	G4m(4a)	Leu 309
		G4m(4b)	Делеция в положении 309
A2m	Ca2 (CH3)	A2m(1)	Phe 411, Asp 428, Val 458, Val 467
		A2m(2)	Thr 411, Glu 428, Ile 458, Ala 467
Km	C _x	Km(1)	Val 153, Leu 191
		Km(1, 2)	Ala 153, Leu 191
		Km(3)	Ala 153, Val 191
у мыши			Множественные замены
Igh-1	Cγ2a (CH2, CH3)	1 ^a —1 ^h ; 1 ^l —1 ^m (12 аллелей)	Н. О.
Igh-2	Ca	2 ^a —2 ^d ; 2 ^l (5 аллелей)	То же
Igh-3	Cγ2b	3 ^a , 3 ^b , 3 ^d —3 ^g (6 аллелей)	» »
Igh-4	Cγ1	4 ^a , 4 ^b , 4 ^d	» »
Igh-5	Cδ	5 ^a , 5 ^b	» »
Igh-6	Cμ	6 ^a , 6 ^b , 6 ^e	» »
У крысы			Множественные замены
RI-1	C _x	1 ^a , 1 ^b	

1) Эти аллельные формы серологическими методами не обнаружены.
 2) Н. О. Не определяли.

9.1.3. Аллотипы иммуноглобулинов кролика

В табл. 9.1 приведены аллотипы тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов кролика. Аллотипы локусов a , x и y обнаруживаются на тяжелых цепях всех классов. Аллотипические детерминанты локусов d и e находятся в константной области тяжелых (γ) цепей IgG (для которых пока известен лишь один изотип), детерминанты локусов f и g — в константной области тяжелых (α) цепей IgA, а детерминанты локуса Ms (так же, как и n) — на μ -цепях IgM. Аллотипы локуса b , представляющие собой варианты легких цепей κ -типа, локализованы в константной области κ -цепи, в то время как аллотипы локуса c — на λ -цепях.

9.1.3.1. Локус a

Вскоре после того как Удин идентифицировал в IgG три основных аллотипа локуса a ($a1$, $a2$ и $a3$), а Тодд вслед за этим показал, что эти аллотипы встречаются и у иммуноглобулинов других классов, стало ясно, что аллотипические детерминанты, кодируемые локусом a , находятся в V_H -областях, которые могут присоединяться к C_H -области любого изотипа. Поскольку в гаметной ДНК,

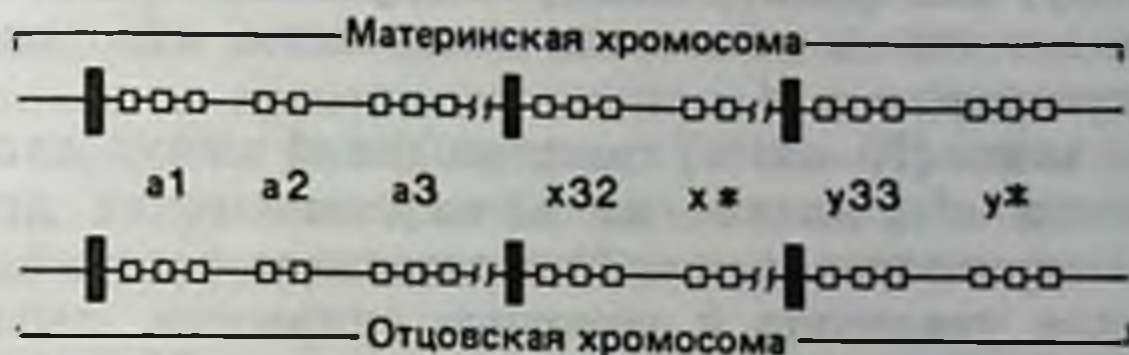


Рис. 9.1. Гипотетическая псевдоаллельная организация генов кролика. Группы генов V_H (светлые квадраты), соответствующие определенным V_H -аллотипам ($a1$, $a2$, $a3$ и т. д.), расположены тандемно с идентичными гомологами в обеих хромосомах клетки. Черными прямоугольниками обо-

значены постулированные регуляторные элементы, от которых зависит экспрессия каждой группы генов V_H , что создает видимость аллелизма. x^* и y^* — неидентифицированные псевдоаллельные формы генов аллотипов $x32$ и $y33$.

по-видимому, имеется множество генов V_H , аллотипические замены аминокислот, характерные для каждого аллеля ($a1$, $a2$ или $a3$), очевидно, должны повторяться во многих гаметных V_H -генах одной хромосомы. Возникает парадокс, каким образом такой обширный набор генов V_H может наследоваться в качестве «аллелей» и при этом не затрагиваться рекомбинациями. Одно из возможных объяснений состоит в том, что гены V_H всех трех аллелей локуса a ($a1$, $a2$ и $a3$) находятся в одной хромосоме, а аллелизм обуславливается расположенным по соседству регуляторным геном (рис. 9.1). Альтернативное объяснение предполагает возможность коррекции ограниченного числа рекомбинаций среди многочисленных аллельных генов V_H путем конверсии генов [10].

Молекулы аллотипов $a1$, $a2$ и $a3$ различаются между собой заменой по меньшей мере шести аминокислот N-концевых каркасов участков V_H -области, а возможно, и дополнительными заменами в других участках V_H . Это позволяет отнести их к комплексным аллотипам, т. е. имеющим не одну-две аминокислотные замены, как следует ожидать для простых аллельных вариантов, а многочисленные замены. Результатом этого является наличие в молекуле нескольких аллотипических детерминант, которые обуславливают возмож-

ность преципитации иммуноглобулинов а-аллотипа антиаллотипической антисывороткой.

Встречаются и латентные аллотипы локуса *a*. В некоторых случаях они неожиданно экспрессируются у кроликов, для которых предсказать подобную экспрессию, исходя из их генетической характеристики, было невозможно. В классической работе Стросберга и др. [11] было обнаружено, что гетерозиготный кролик *a1a3* отвечал на иммунизацию бактериальными клетками образованием иммуноглобулинов с а2-аллотипом наряду с а1- и а3-иммуноглобулинами. Этот факт находится в явном противоречии с законом Менделя, согласно которому у одной особи может присутствовать не более двух аллелей одного гена. Аналогичное явление наблюдалось и для локуса *b* легких κ -цепей: у того же самого гетерозиготного кролика *b4b5* обнаруживались и κ -цепи *b6*. Подобные неожиданные латентные аллотипы локусов *a*, *b* и других были найдены (хотя и в очень малых количествах) также у некоторых неиммунных кроликов [12].

Такое парадоксальное поведение аллотипов локуса *a* более или менее хорошо объясняется тем, что они представляют собой три сцепленные группы гомологичных гаметных структурных генов V_H , имеющих отношение к каркасным участкам и присутствующих у всех кроликов. Таким образом, каждая V_H -группа (*a1*, *a2* или *a3*) — это псевдоаллель, а настоящий аллелизм присущ регуляторному гену, контролирующему экспрессию генов V_H . Данное предположение позволяет также объяснить экспрессию аллотипов локуса *b* (C_κ) и, возможно, локусов *x*, *y* и *d*.

Значительная часть (10—30%) тяжелых цепей иммуноглобулинов каждого кролика не имеет ни а1-, ни а2-, ни а3-аллотипических детерминант; такие цепи называют «а-отрицательными». Относительное содержание а-отрицательных молекул можно увеличить с помощью супрессии, подавляя, например, биосинтез а2-детерминанты у гомозиготного кролика *a2/a2* [13]. Получающаяся в результате популяция иммуноглобулинов оказывается полностью а-отрицательной. При иммунизации такими иммуноглобулинами гомозиготного кролика *a1/a1* были выявлены еще два неаллельных аллотипа, *x32* и *y33*. Таким образом, *x* и *y* представляют собой два дополнительных локуса, причем они тесно сцеплены с локусом *a*. Локус *x* представлен двумя аллелями: *x* и еще одним аллелем, детерминанта которого не выявлена. Аналогичным образом локус *y* соответствует детерминанте *y33* и ее неиммуногенному аллельному варианту. Аллотипические детерминанты *x* и *y* (так же как и детерминанта *a*) находятся в V_H -области. Следовательно, *a*, *x* и *y* — это по меньшей мере три тандемно сцепленные группы V_H -генов; экспрессия каждой группы может контролироваться аллельными регуляторными генами (рис. 9.1).

9.1.3.2. Локус *b*

Локус *b* кодирует по меньшей мере 9 аллотипов κ -цепей иммуноглобулинов кролика. Четыре из них, *b4*, *b5*, *b6* и *b9*, встречающиеся, как правило, у лабораторных кроликов, хорошо изучены. Аллельные варианты определяются в константной (C_κ) области κ -цепи. Аллотипы, кодируемые локусом *b*, являются комплексными: при сравнении C_κ -областей любых двух из перечисленных выше аллотипов обнаруживается от 20 до 35% различий в аминокислотных остатках [14]. Маловероятно, чтобы подобные значительные отличия возникли в результате простой аллельной дивергенции единственного структурного гена в процессе эволюции «кролика» (*Oryctolagus cuniculus*)¹.

¹ Исключением является аллель *b4^{var}*, у которой последовательность C_κ отличается от *b4* лишь двумя аминокислотными остатками. Таким образом, *b4^{var}* может быть настоящей аллелью гена *b4C_κ* [15].

В некоторых случаях аллотипы локуса *b* экспрессируются неожиданно, как латентные аллотипы у номинально гетерозиготных или гомозиготных кроликов. Как и в случае *a*-аллотипов, появление латентных аллотипов лучше всего объясняется наличием в геноме кодирующих их генов наряду с генами номинальных аллотипов. Одна из возможностей состоит в том, что в обеих хромосомах S_x -гены, соответствующие аллотипам *b*₄, *b*₅, *b*₆ и *b*₉, организованы как псевдоаллели. Частая фенотипическая экспрессия только одного гена на хромосому, т. е. номинальный аллотип, может определяться аллельными формами независимого регуляторного гена. Реальную организацию S_x -генов кролика можно будет определить картированием ДНК. Недавно получены данные о наличии в геномной ДНК кроликов, гомозиготных по *b*₄-, *b*₅-, *b*₆- или *b*₉-аллотипу, многочисленных участков, гибридизующихся с *b*₄ S_x -зондом [16].

9.1.3.3. Локус *c*

Локус *c* кодирует два аллотипа λ -цепей кролика *c*₇ и *c*₂₁. В некоторых опытах было показано, что гены *c*₇ и *c*₂₁ сегрегируют как аллели, однако описан случай, когда они наследовались вместе, как сцепленные гены, и экспрессировались у всего потомства [17]. У кроликов, гомозиготных по гену *c*₇ или *c*₂₁, были обнаружены «с-отрицательные» λ -цепи. У подобных цепей отсутствуют детерминанты *c*₇ или *c*₂₁ и соответствующие серологически обнаруживаемые аллотипы. До настоящего времени не удалось с уверенностью локализовать детерминанты *c*₇ и *c*₂₁ в $V\lambda$ - или $S\lambda$ -цепях. Таким образом, хотя организация локуса *c* еще не ясна, скорее всего, есть основания думать, что имеется несколько структурных генов, кодирующих λ -цепи у кролика.

9.1.3.4. Прочие аллотипы кролика

*d*₁₁, *d*₁₂, *e*₁₄ и *e*₁₅ — это аллотипы, экспрессируемые в S_γ -области. В отличие от аллотипов локусов *a* и *b* для аллотипов локусов *d* и *e* характерна замена одной-единственной аминокислоты. Так, у *d*₁₁-аллотипа в положении 225 шарнирного участка γ -цепи находится метионин, а у аллотипа *d*₁₂ — треонин. У аллотипа *e*₁₄ в положении 309 находится треонин, а у *e*₁₅ — аланин. Эти аллотипические варианты представляют собой простые аллотипы и поэтому напоминают аллельные варианты других белков, например цепей глобина. Наличие в положении 225 метионина у аллотипа *d*₁₁ и треонина у *d*₁₂ позволяет различить эти аллотипы как химическими, так и серологическими методами [18]. Бромидная расщепляет молекулу *d*₁₁ по Met-225; в результате образуются одновалентные Fab-фрагменты. Молекула *d*₁₂, у которой в положении 225 находится треонин, расщепляется не в этом месте, а по Met-252, с образованием двухвалентного $F(ab)_2$ -фрагмента, между тяжелыми цепями которого имеется дисульфидная связь. Два названных фрагмента легко различить по их молекулярным массам. У кролика с номинальным аллотипом *d*₁₁ или *d*₁₂ альтернативный аллотип может экспрессироваться как латентный [19]; следовательно, и аллотипы локуса *d* могут быть на деле псевдоаллельными. Окончательный ответ должны дать проводящиеся в настоящее время исследования, цель которых состоит в выяснении числа и организации S_γ -генов кролика. Аллотипы локуса *M_s* (или *n*) кодируются, по-видимому, геном S_μ . Этот локус кодирует по меньшей мере восемь аллотипов [20]. Интересно, что для полной экспрессии некоторых аллотипов локуса *M_s* на той же самой молекуле должны присутствовать определенные аллотипы V_H -области. Например, ряд детерминант локуса *M_s1* экспрессируются только в том случае, если примыкающая V_H -область имеет

аллотип а3. Два набора аллотипических детерминант, а именно: пять в локусе *f* и четыре в локусе *g* — обнаружены в молекулах IgA. Локусы *f* и *g* принадлежат двум отдельным субклассам α -цепей, $C_{\alpha f}$ и $C_{\alpha g}$ [21]. Два аллельных варианта, *t61* и *t62*, имеет секреторный компонент — белок неиммуноглобулиновой природы, входящий в состав секреторного IgA [22]. Секреторный компонент кодируется отдельным локусом *t*, не сцепленным с локусами тяжелых или легких цепей (*a*, *b* или *c*) иммуноглобулинов кролика.

9.1.4. Аллотипы иммуноглобулинов человека

Хорошо изучены и аллотипы всех четырех субклассов γ -цепей IgG человека («Gm»-аллотипы), тяжелых (α) цепей IgA («Am») и легких κ -цепей («Km»). В современной номенклатуре [23] на первом месте ставится обозначение класса и субкласса (т. е. G1m, G2m, G3m или G4m), далее в скобках следует номер аллели. Например, два аллотипа $\gamma 3$ -цепи обозначают как G3m(5) и G3m(21). Аналогичным образом аллотипы $\alpha 2$ -цепи обозначаются A2m(1) и A2m(2). Тремя аллотипами κ -цепей человека являются Km(1), Km(1, 2) и Km(3). Все описанные к настоящему времени аллотипы иммуноглобулинов человека — это простые аллотипы; их аллельные варианты имеют от одной до четырех замен аминокислот на одну цепь. Аллотипические варианты $\alpha 1$ -, δ -, ϵ - и λ -цепей пока не обнаружены.

Начало изучению аллотипов человека было положено в 1956 г. Груббом (Grubb), обнаружившим, что некоторые ревматоидные факторы¹ агглютинируют Rh-положительные эритроциты, покрытые анти-Rh-антителами класса G не всех, а лишь отдельных индивидуумов (т. е. дают положительную «антиглобулиновую» реакцию, или тест Кумса). Следовательно, в тех случаях, когда наблюдалась агглютинация, IgG имел аллотипические детерминанты, присутствующие у IgG одних, но не у IgG других людей. Таким путем было идентифицировано несколько вариантов IgG человека, представляющих собой разные аллотипы. Оригинальная работа Грубба лежит в основе применяемого сейчас метода идентификации аллотипов в образцах сыворотки крови, который заключается в торможении агглютинации. Rh-положительные эритроциты покрывают аллотипически однородными анти-Rh-антителами (или пассивно нагружают гомогенным по аллотипу иммуноглобулином, например миеломным). Агглютинацию модифицированных эритроцитов вызывают антителами, специфическими к данному аллотипу (часто используют ревматоидный фактор). Количество аллотипа в неизвестном образце определяют, добавляя его в избытке к эритроцитам, несущим иммуноглобулин соответствующего аллотипа, и оценивая степень торможения агглютинации. Торможение обуславливается конкуренцией за активные центры антиаллотипических антител между аллотипическими детерминантами иммуноглобулина образца и детерминантами иммуноглобулина на эритроцитах. Наличие торможения означает, что исследуемый иммуноглобулин имеет данный аллотип. Схематическое изображение этого метода приведено на рис. 9.2.

Некоторые аллотипы иммуноглобулинов человека являются «конформационно-зависимыми» в том смысле, что для их активности необходимы обе полипептидные цепи. Примерами могут служить аллотипы тяжелых цепей G1m(4) и G1m(17), которые обнаруживаются лишь при ассоциации тяжелой цепи с легкой. Аналогичным образом Km-аллотипы легкой κ -цепи активны только при наличии тяжелой цепи.

¹ Ревматоидные факторы — аутоантитела класса IgM сыворотки крови больных ревматоидным артритом.

Некоторые аллотипические детерминанты Gm, характерные для определенного подкласса тяжелой цепи, обнаруживаются и у других подклассов, однако при этом они не могут служить маркерами аллельных вариантов. Подобные аллотипы, экспрессируемые на других подклассах, называют «нон-маркерами» или «изоаллотипическими». Например, G⁴m(4a) и G⁴m(4b) представляют собой аллельные варианты γ^4 -цепи. Детерминанта G⁴m(4b) встречается, кроме того, у γ^2 -цепей, вероятно, в том же самом положении пептидной цепи. Однако детерминанта G⁴m(4b) всегда экспрессируется обоими родительскими генами, кодирующими γ^2 , и поэтому не может служить генетическим

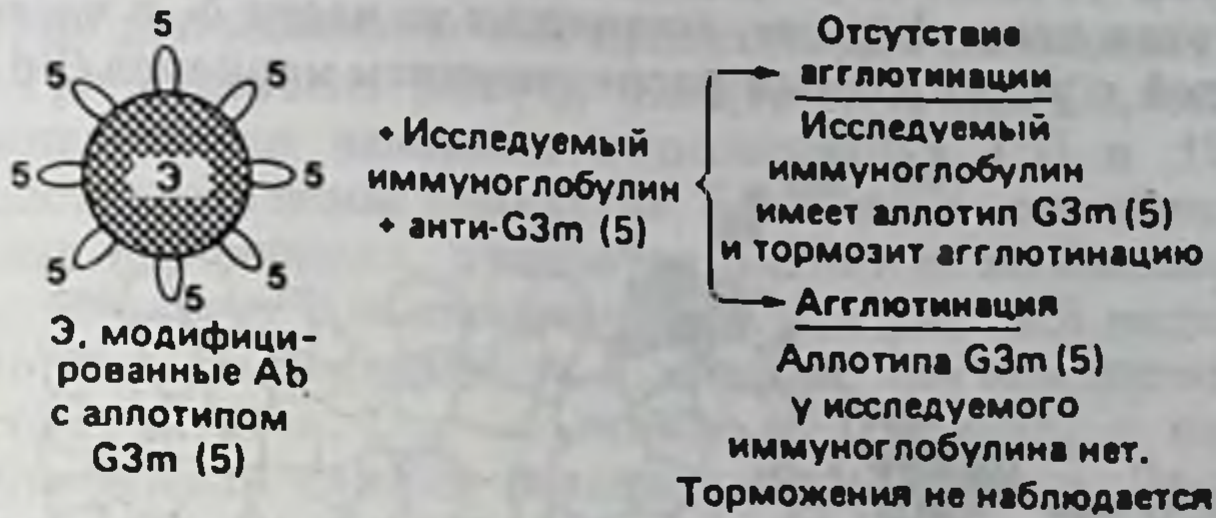


Рис. 9.2. Определение аллотипа G3m(5) в препарате иммуноглобулина методом ингибирования гемагглютинации. На эритроцитах (Э) был сорбирован однородный иммуноглобулин с аллотипом G3m(5). Такие эритроциты смешивали с антителами, специфическими G3m(5)-аллотипу

(например, ревматоидным фактором). Если исследуемый иммуноглобулин имеет аллотип G3m(5), он будет конкурировать с эритроцитами за антитела и тормозить агглютинацию. При отсутствии же у него G3m(5)-детерминанты конкуренция отсутствует и наблюдается агглютинация эритроцитов.

маркером γ^2 . Это явление становится вполне понятным, если принять во внимание общую структурную гомологию подклассов γ -цепей иммуноглобулинов человека (наличие лишь 10% различий в аминокислотной последовательности). Совсем не обязательно мутация, приводящая к возникновению аллотипа G⁴m(4a) у одного аллеля γ^4 -цепи, происходит в том же самом положении гена γ^2 -цепи, и поэтому оба аллеля γ^2 -гена экспрессируют неизмененную нон-маркерную детерминанту¹.

Аллотипические маркеры изотипов тяжелых цепей, как правило, наследуются вместе в виде тесно сцепленного кластера, «аллогруппы» или «гаплотипа». Рекомбинации внутри этого кластера чрезвычайно редки. Тем не менее в процессе эволюции человека должны были произойти некоторые рекомбинации, поскольку доминирующие аллогруппы у представителей различных рас, по-видимому, произошли одна от другой вследствие рекомбинаций. Например, одна аллогруппа (т. е. гаплотипный кластер связанных генов) у представителей европеидной расы — G¹m(1,17), G²m(23—), G³m(21), G⁴m(4a); другая, совершенно отличная, — G¹m(—1,4), G²m(23), G³m(5) и G⁴m(4b). Третья аллогруппа, G¹m(—1,4), G²m(23—), G³m(5) и G⁴m(4a), очевидно, появилась в результате по меньшей мере двух рекомбинаций, в результате которых маркеры G²m(23—) и G³m(4a) оказались совмещенными с G¹m(—1,4) и G³m(5), а не с G¹m(1,17) и G³m(21), как у первой аллогруппы. Подобные рекомбинации исключительно редки среди членов одной семьи, что свидетель-

¹ Нон-маркерные детерминанты иногда обозначают знаком минус перед номером аллотипа. Знак минус, следующий за номером аллотипа, означает отсутствие данной аллотипической детерминанты.

ствуется об очень тесном сцеплении генов C_H в кластерах, кодирующих тяжелые цепи. Поэтому порядок расположения генов C_H не удается определить по частоте рекомбинаций. Для выяснения этого вопроса следует провести картирование ДНК данного участка генома человека; такие исследования и проводятся в настоящее время. Предположение о том, в каком порядке расположены гены C_H человека, впервые было высказано после того, как в 60-е годы у двух больных были обнаружены необычные «рекомбинантные» молекулы иммуноглобулинов. У первого больного была обнаружена гибридная тяжелая цепь, вмещающая в Fd (C_{H1})-фрагменте аллотипический маркер γ_3 -цепи, а в Fc-фрагменте — аллотип γ_1 -цепи [24]. (Аналогом данной гибридной молекулы является гемоглобиновая цепь «Lероге», состоящая из части δ - и части β -цепи.) Рекомбинантных цепей с реципрокным расположением маркеров (Fd $_{\gamma_1}$ с Fc $_{\gamma_3}$) не было

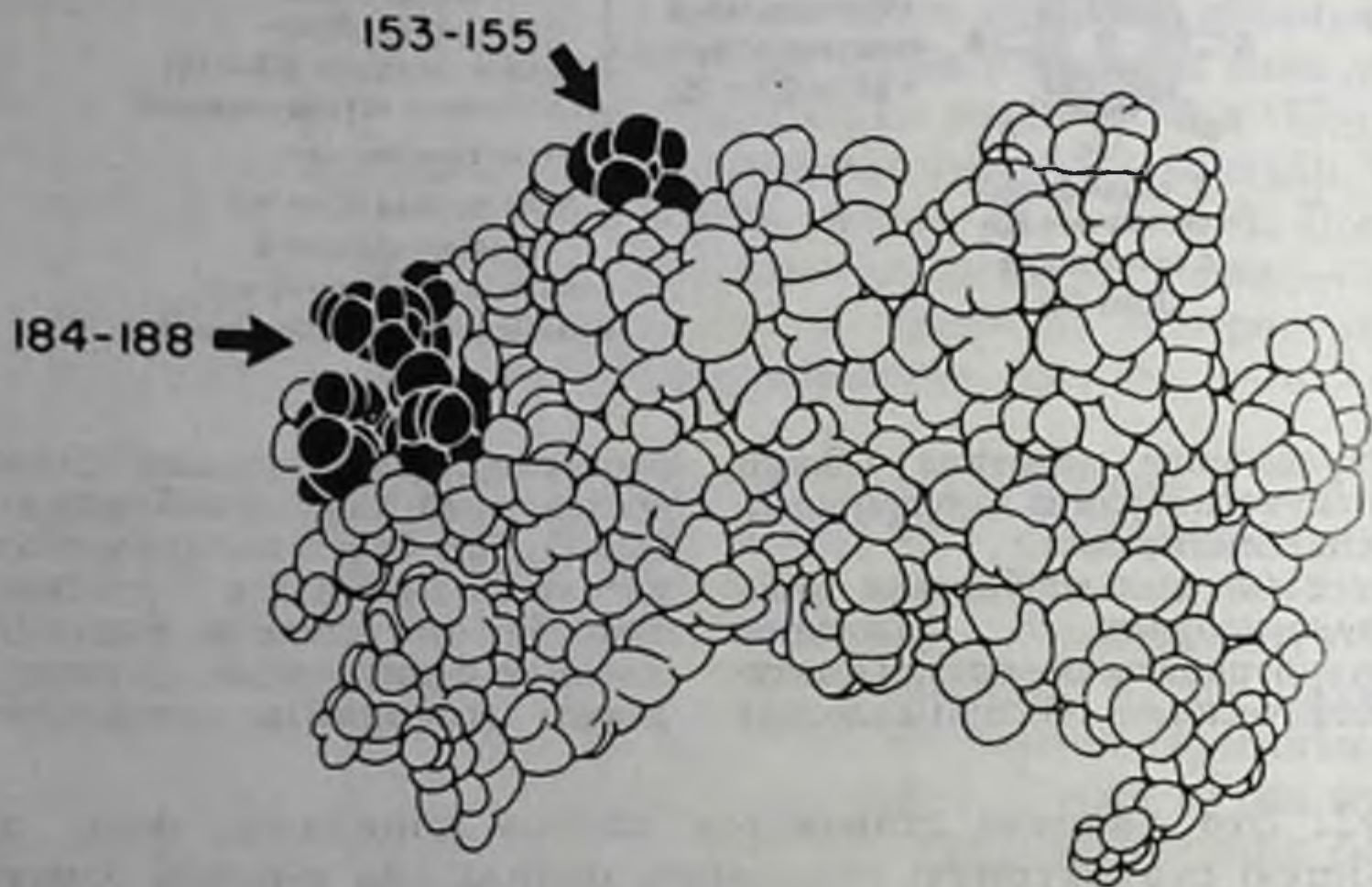


Рис. 9.3. Пространственная модель C_H -домена иммуноглобулина крысы.

Закрашены аминокислотные остатки 153—155 и 184—188, на которые приходится 5 из 11 замен аминокислот, описанных для аллотипических вариантов крысиного C_H [5]. В близком соседстве с участками, отмечен-

ными на рисунке, расположены аминокислоты, варьирующиеся в K μ -аллотипах κ -цепи и изотипах λ -цепи человека. Указанные остатки экспонированы на поверхности молекулы, где они легкодоступны для аллотипических антител и поэтому легко могут быть идентифицированы серологически [5].

найденно. Иммуноглобулины с нормальными γ_3 - и γ_1 -цепями обнаружены не были, в то время как молекулы с нормальными γ_2 - и γ_4 -цепями в сыворотке присутствовали. Появление гибридной тяжелой цепи объясняли негомологичной рекомбинацией генов C_{γ_3} и C_{γ_1} . У другого больного с миеломой в гибридной цепи C_{H1} и C_{H2} домены γ_4 -цепи были присоединены к C_{H3} -домену γ_2 -цепи [25]. Образование этих необычных пептидных цепей позволило составить предположительную последовательность (5' → 3') C_H -генов человека: C_{γ_4} - C_{γ_2} - C_{γ_3} - C_{γ_1} . Данная модель согласовывалась со всеми приведенными выше наблюдениями при условии, что в каждом случае ген, кодирующий гибридную цепь, получался в результате лишь одной рекомбинации. Однако осуществленное недавно картирование ДНК человека показало, что действительный порядок расположения генов C_{γ_2} и C_{γ_4} следующий: 5'- C_{γ_2} - C_{γ_4} -3' [26], а генов C_{γ_1} и C_{γ_3} : 5'- C_{γ_1} - C_{γ_3} -3' [27]. Для того чтобы факт образования гибридных цепей наряду с нормальными иммуноглобулинами не противоречил вновь определенной после-

довательности генов, необходимо постулировать, что в этой области произошла более чем одна рекомбинация.

Возможно, что аллотипы A2m(1) и A2m(2) также возникли в результате негомологичного кроссинговера между генами C_{a2} и C_{a1} . Аминокислотная последовательность C_{H3} -домена аллотипа A2m(1) идентична последовательности того же домена $\alpha 1$ -цепи; C_{H3} -домен у альтернативного аллотипа A2m(2) отличается четырьмя аминокислотными заменами [28]. Таким образом, C_{H3} -домен аллотипа A2m(1), присутствующий во всех $\alpha 1$ -цепях, не является маркерным. В результате негомологичной рекомбинации или конверсии генов он возможно, оказался в составе A2m(1)-аллеля.

Аллотипические детерминанты Km присутствуют на κ -цепях иммуноглобулинов человека. Три аллотипа, Km(1), Km(1, 2) и Km(3), отличаются друг от друга аминокислотными заменами в положениях 153 и 191 C_{κ} -области (табл. 9.1). В пространственной структуре C_{κ} -области аминокислоты, находящиеся в указанных положениях, находятся рядом, и, по-видимому, сочетание этих аминокислот образует Km-детерминанты. На рис. 9.3 видно, что остатки 153 и 191 расположены на поверхности C_{κ} -домена, где они легко доступны для антиаллотипических антител. Это объясняет ту легкость, с которой удается серологически обнаружить данные аллотипические замены. Заслуживает внимания тот факт, что другие хорошо известные серологические маркеры легких цепей (изотипические детерминанты λ -цепей человека Oz и Keph и C_{κ} -аллотипы крысы) также локализуются в C_L -областях в положениях, близких к аминокислотным остаткам 153 и 191.

9.1.5. Аллотипы мыши и крысы

У мышей аллотипические детерминанты обнаружены у всех классов тяжелых цепей, за исключением IgG3. На легких цепях иммуноглобулинов мыши серологически детектируемые аллотипические детерминанты отсутствуют¹. Для C_{κ} -области иммуноглобулинов крысы описаны два аллотипа.

Номенклатура аллотипов тяжелых цепей иммуноглобулинов мыши была разработана Херценбергами [1,4] еще до того, как были идентифицированы и классифицированы их C_H -изотипы. По этой номенклатуре номера, первоначально приписанные каждому аллотипическому локусу, отличаются от номеров, обозначающих C_H -изотипы. Например, локус *Igh-1* принадлежит гену $C_{\gamma 2a}$, локус *Igh-4* — гену $C_{\gamma 1}$ и т. д. (табл. 9.1). В локусе *Igh-1* имеется 12 аллелей: *Igh-1^a*, *Igh-1^b* и т. д.; другими словами, существует 12 $C_{\gamma 2a}$ -аллотипов мыши. Позднее Либерман [4] предложила номенклатуру, включающую наименование самого C_H -локуса. По этой номенклатуре аллотипы $C_{\gamma 2a}$ -цепи обозначаются как IgG2a^a, IgG2a^b и т. д. Как и в случае C_H -аллотипов человека, рекомбинации между аллотипическими маркерами различных C_H -генов мыши отсутствовали, и поэтому уже давно стало ясно, что эти гены очень тесно сцеплены. Картирование ДНК локуса *Igh-C*, в котором находятся все мышинные гены C_H , подтвердило данное предположение (гл. 8). Определенный набор тесно сцепленных C_H -аллотипов мыши составляет аллогруппу (или гаплотип), что также напоминает C_H -аллотипы человека. Инбредные линии мышей имеют характерные *Igh*-гаплотипы, и, таким образом, они могут служить удобным источником иммуноглобулинов известного аллотипа. Например, $\gamma 2a$ -цепи мышей BALB/c

¹ В V_{κ} -области иммуноглобулинов некоторых, но не всех линий мышей присутствует уникальнейший пептид «I_B». Поэтому κ -цепи, в состав которых входит I_B, можно рассматривать как аллельные варианты цепей, не имеющих I_B [29].

(гаплотип Igh^a) имеют аллотип $Igh-1^a$, а $\gamma 2a$ -цепи мышей C57BL/6 (гаплотип Igh^b) — $Igh-1^b$.

Нередко между различными аллотипами тяжелых цепей иммуноглобулинов мыши наблюдаются перекрестные реакции. Например, частичной перекрестной реактивностью обладают аллотип $Igh3^a$ (IgG2b) иммуноглобулина мышей линии BALB/c и аллотип $Igh-3^b$ (IgG2b) мышей линий C57BL. (Антисыворотки, полученные с помощью которых обнаруживают подобные перекрестные реакции, получают иммунизацией мышей третьей линии, иммунная система которой распознает антигенные детерминанты обоих названных выше иммуноглобулинов.) Это означает, что некоторые, но не все аллоантигенные детерминанты $\gamma 2b^a$ и $\gamma 2b^b$ -цепей являются общими. Антигенным детерминантам (как правило, их называют «специфичностями»), распознаваемым антиаллотипическими антисыворотками, были присвоены определенные номера. В приведенном выше примере $\gamma 2b^a$ -цепь имеет специфичности 9, 11, 22, 31, 33 и 34, а $\gamma 2b^b$ — 9, 16, 22, 33 и 34. Специфичности (9, 22, 33 и 34), имеющиеся в обеих молекулах, называют «общими», в то время как уникальные аллотипические детерминанты, встречающиеся только у иммуноглобулинов определенных линий мышей с определенным аллотипом, называют «частными».

Аллотипы, подобные тем, которые обнаруживаются у инбредных линий, имеются и у диких мышей. Однако для диких мышей характерны и новые комбинации аллотипов (гаплотипы), которые указывают на рекомбинации внутри локуса $Igh-C$ [30]. По всей видимости, некоторые необычные аллотипы иммуноглобулинов диких мышей произошли путем внутригенной рекомбинации вследствие неравного кроссинговера, аналогично описанному выше образованию у людей гибридных тяжелых цепей иммуноглобулинов по типу «Lероге».

Локус $Igh-1$ (ген $C_{\gamma 2a}$) мыши исключительно полиморфен — он имеет 12 аллелей. Из остальных локусов наибольшее число аллелей — шесть — обнаружено у $Igh-3$ ($\gamma 2b$). Аллотипы $Igh-1^a$ и $Igh-1^b$ различаются по меньшей мере 36 аминокислотными остатками; 8 из них локализованы в C_H2 -, а 28 — в C_H3 -домене. Вследствие этого аллотипы локуса $Igh-1$ являются комплексными и напоминают кроличьи аллотипы локуса b . Однако модель, предложенная для комплексных аллотипов локусов a и b кролика и предполагающая наличие псевдоаллельных генов, по-видимому, неприменима в данном случае, поскольку картирование мышинной гаметной ДНК свидетельствует о присутствии лишь одного гена $C_{\gamma 2a}$ на хромосоме. Многочисленные различия в аминокислотных последовательностях аллотипов, в частности в C_H3 -домене, могут объясняться либо негомологичным внутригенным кроссинговером, либо конверсией генов. Новый аллель $C_{\gamma 2a}$ в одной хромосоме мог возникнуть в результате внутригенной рекомбинации C_H3 -сегмента одного из генов C_H с геном $C_{\gamma 2a}$ [31]. Описана также рекомбинация между мышинными генами $C_{\gamma 2a}$ и $C_{\gamma 2b}$, происшедшая, вероятно, вследствие неправильного переключения генов [32]. Подобные внутригенные рекомбинации или конверсии генов объясняют и неожиданную идентичность последовательностей C_H3 -домена $Ca1$ и $A2m$ (2)-аллели гена $Ca2$, и экспрессию у человека гибридных γ -цепей типа «Lероге».

9.1.5.1. C_x -аллотипы крысы

У мышей имеется лишь один ген C_x , и весьма удивительно, что до настоящего времени не известны его аллотипические варианты. В то же время Гутман и др. [5] подробно охарактеризовали два аллеля гена C_x крысы. Крысиный локус C_x обозначают $RI-1$. Аллотип $RI-1a$ найден у иммуноглобулинов инбредной линии DA, а аллотип $RI-1b$ — у линии Lew. Различие между этими C_x -аллоти-

пами обуславливается 11 аминокислотными заменами, что позволяет отнести их к комплексным аллотипам. Псевдоаллельная модель, призванная объяснить экспрессию комплексных C_x -аллотипов кролика, видимо, неприменима и в данном случае: картированием генов удалось обнаружить только один ген C_x с ожидаемой последовательностью нуклеотидов в ДНК как линии DA (RI-1a), так и линии Lew (RI-1b) [33]. Интересно, что первичная структура ДНК аллотипа RI-1a аллеля C_x очень похожа на структуру гена мыши C_x ; возможно, аллель RI-1a эволюционно более близок предковому гену C_x грызунов.

9.1.6. Заключение: организация и экспрессия генов, кодирующих аллотипы

Аллотипы можно разделить на две большие группы. В первую входят простые аллотипы, различающиеся лишь одной или же небольшим числом аминокислотных замен, обусловленных мутациями одного-единственного структурного гена. Ко второй группе относятся комплексные аллотипы, отличающиеся друг от друга многочисленными аминокислотными заменами. Для некоторых аллотипов из обеих групп наблюдается латентная экспрессия: они обнаруживаются у животных, чей генотип предполагает экспрессию иных, т. е. номинальных аллотипов, которые, казалось бы, должны исключить появление латентных аллотипов. Организация и эволюция генов, кодирующих простые аллотипы, не представляют загадки. Более трудны для понимания комплексные аллотипы и феномен латентности. Чтобы объяснить появление некоторых сложных аллотипов (например, кроличьих аллотипов локусов *a* и *b*), предполагают наличие в каждой хромосоме набора псевдоаллельных или тандемно дублированных структурных генов. Такой набор генов мог бы обеспечить появление значительного разнообразия молекул в процессе эволюции. В этом случае кажущийся аллелизм должен обуславливаться регуляторным геном или набором генов, контролирующих экспрессию индивидуальных структурных генов. С помощью псевдоаллельной модели можно также объяснить появление латентных аллотипов, поскольку ошибки системы регуляции могут позволить экспрессироваться близлежащим структурным генам. Однако данная модель неприменима к комплексным аллотипам локусов мыши *Igh-1* (C_{y2a}) и крысы *RI-1* (C_x), для которых картированием геномной ДНК было обнаружено наличие лишь одного структурного гена для каждой из цепей. Значительные различия в первичной структуре, характерные для комплексных аллотипов этих локусов, могли возникнуть в результате неравного кроссинговера или конверсии генов с расположенными поблизости структурными генами, кодирующими другие idiotипы. Для подтверждения этой гипотезы нужны дальнейшие структурные исследования генов.

9.2. Идиотипы

9.2.1. Основные понятия. Исторический очерк

Идиотипическими детерминантами называют антигенные детерминанты, локализованные на переменных областях цепей иммуноглобулинов. Идиотоп — это единичная детерминанта, а вся группа идиотопов отдельно взятого переменного домена составляет идиотип. Во многих случаях не известно, обнаруживается ли при использовании данной антисыворотки один или более идиотопов, и поэтому большинство исследователей называют антисыворотки к переменным областям цепей антиидиотипическими. Вследствие весьма

существенного разнообразия структур переменных доменов число idiotипов, которые может экспрессировать индивидуальное животное, очень велико. Это позволяет широко использовать антисыворотки к idiotипическим детерминантам для обнаружения и сравнения переменных областей.

Теоретически любой экспонированный участок переменной области тяжелых и легких цепей может быть иммуногенным. Описаны как idiotипы, локализованные лишь на V_L - или V_H -цепях, так и idiotипы, получающиеся в результате комбинации V_L -цепей с V_H -цепями. Idiotипические детерминанты обнаружены в участках связывания антигена и на каркасных участках. Поэтому нелегко вывести общие закономерности об idiotипических детерминантах.

А. Получение антиidiotипической сыворотки к ФХ-специфическому миеломному белку НОРС 8



Б. Разделение антител к участку связывания и антител к каркасным участкам



Рис. 9.4. Приготовление антиidiotипических антисывороток.

В данном примере кролики были иммунизированы мышьяным миеломным белком, специфичным к ФХ. В антисыворотке содержались антитела к детерминантам S_L -, S_H -, V_L - и V_H -областей. А. Показано, что антитела к константным областям могут быть удалены из антисыворотки преципитацией нормальными иммуноглобулинами мыши (как показано на схеме) либо абсорбцией на этих же иммуноглобулинах, фиксированных на неразстворимом носителе. Остающиеся антитела специфичны к idiotипическим детерминантам. Б. Показано, каким образом можно

очистить антиidiotипические антитела и отделить антитела к idiotипам, локализованным в антигенсвязывающем участке, от антител к idiotипам, лежащим вне его (обозначены как антитела к каркасным участкам). Антитела к idiotипическим детерминантам и детерминантам константных областей адсорбируются на колонке с иммуносорбентом, содержащим ковалентно связанный иммуноген. Антитела к idiotипу антигенсвязывающего участка избирательно элюируются с колонки гаптенем, специфическим к участку связывания иммуногена. Этот гаптен конкурирует за участок связывания с антителами к указанному idiotипу.

Поскольку потенциально idiotипических детерминант у иммуноглобулиновой молекулы очень много, то большинство антиidiotипических антисывороток, скорее всего, полиспецифично, что вносит дополнительные сложности в изучение idiotипов.

Впервые о наличии в иммуноглобулинах общих и индивидуальных антигенных детерминант сообщили Канкель, Лосс и сотрудники (цит. по [1]) около тридцати лет назад. К середине 60-х годов стало очевидно, что индивидуальные антигенные детерминанты характерны для переменных доменов. Антисыворотки, полученные к гомогенным миеломным белкам человека, после тщательного истощения другими миеломными белками и нормальными сывороточными иммуноглобулинами все-таки сохраняли способность к связыванию иммуногена. Используя подобный подход, Канкель установил, что должно быть всего по меньшей мере 10^7 вариантов переменных областей иммуноглобулинов человека. Удэн, получая обычным способом антитела к переменным участкам, показал, что существуют idiotипы, общие для антител разной специфичности [1]. Таким образом, хотя первоначально предполагалось, что idiotип явля-

ется уникальной характеристикой отдельного клопа, позднее понятие это расширилось, и к одному идиотипу стали относить семейства антител с одинаковой или различной специфичностью, но с одинаковыми идиотипическими свойствами.

Для получения антисывороток к вариабельным участкам цепей миеломных белков использовали различные подходы: один из них изображен на рис. 9.4, А. Как правило, иммунизацию проводят миеломным белком, а истощение — нормальной сывороткой или другим миеломным белком с такими же константными, но с отличающимися вариабельными областями цепей. В результате должна получаться антисыворотка против всех тех идиотипических детерминант иммуногена, которых почти нет у иммуноглобулинов нормальной сыворотки или у миеломных белков, использованных для истощения.

9.2.2. Идиотипы у индуцированных антител

9.2.2.1. Антитела к фосфохолину

Наиболее изученными из всех иммуноглобулинов являются антитела, индуцируемые у мышей С-полисахаридом пневмококков. Это объясняется ограниченным разнообразием названных антител: первоначально данный факт был установлен при изучении идиотипов, а позднее нашел подтверждение при структурном и молекулярно-генетическом анализе. Неожиданно большое число миеломных белков мышей BALB/c связывается с С-полисахаридом за счет иммунодоминантной детерминанты — фосфохолина (ФХ), причем многие из таких белков имеют общие идиотипические детерминанты [34]. Эти данные свидетельствуют либо об ограниченном репертуаре ФХ-специфичных клеток-предшественников у мышей BALB/c, либо о повышенной склонности к злокачественной трансформации клона (клонов) клеток, экспрессирующего общий для ФХ-связывающих белков идиотип.

Убедительно показано, что доминирующими среди ФХ-специфических предшественников являются клетки, экспрессирующие так называемый Т15-идиотип. Более чем у 80% антител к ФХ, образующихся при иммунизации мышей гаплотипа *Igh^a* С-полисахаридом, обнаруживаются общие идиотипические детерминанты с миеломными белками Т15. Более того, эти антитела обладают весьма ограниченной специфичностью связывания.

Не все антитела к ФХ у мышей BALB/c имеют общий с Т15 идиотип. Описаны три белка, М167, М511 и М603, отличающиеся от Т15 как по специфичности, так и по идиотипическим характеристикам. Похожие свойства проявляет незначительная часть индуцированных антител к ФХ. Недавно Клаффин и сотр. [35, 36] с помощью гибридомной технологии показали, что антитела, напоминающие Т15, М603 и М511, представляют собой семейства иммуноглобулинов с различающейся тонкой специфичностью антигенсвязывающего центра и с L-цепями, неотличимыми при изоэлектрофокусировании от L-цепей соответствующих миеломных белков [35].

Более подробное изучение идиотипов анти-ФХ антител типа Т15 показало, что существуют по меньшей мере три класса идиотипических детерминант. Одна из детерминант, Т15, локализована вне участка связывания антигена, и для ее активности необходимо наличие как легкой, так и тяжелой цепи. Как было отмечено выше, данная детерминанта является доминирующей у мышей с аллотипом *Igh^a*, однако может встречаться и у мышей других линий. Вторая детерминанта, H8S, обнаруживаемая с помощью антисыворотки, полученной, как описано на рис. 9.4, Б, ассоциирована с антигенсвязывающим участком

и её наличие коррелирует со специфичностью антител. Она встречается практически у всех анти-ФХ антител мышей с любым аллотипом [36]. Третья детерминанта, V_H -ФХ, имеется на V_H -домене большинства антител к ФХ независимо от их аллотипа или специфичности связывания. Тесной ассоциации V_H -ФХ с антигенсвязывающим участком антитела не наблюдается, поскольку связывание анти- V_H -ФХ антител с названной детерминантой тормозится конъюгатами ФХ-белок, но не свободным ФХ.

Таким образом, исследования идиотипов антител к ФХ указывают на существование родства практически всех мышинных антител, имеющих подобную специфичность. Эти данные недавно нашли подтверждение на структурно-генетическом уровне [37]. Следовательно, антитела к ФХ можно рассматривать как семейство белков, имеющих как общие свойства, так и различные; характерными признаками таких структур являются идиотипы.

9.2.2.2. Антитела к $\alpha(1 \rightarrow 3)$ -декстрану

Гетерогенность антител, вырабатывающихся у мышей BALB/c в ответ на введение $\alpha(1 \rightarrow 3)$ -декстрана, также относительно невелика. Все они, как показали Бломберг и др. [38], имеют легкую цепь λ -типа и общие идиотипические детерминанты с декстрансвязывающим миеломным иммуноглобулином J558. Эти исследования были продолжены другими авторами; выяснилось, что антитела к декстрану представляют собой семейство белков, имеющих как общие, так и уникальные структурные черты. К трем разным миеломным антидекстрановым белкам, J558, M104 и UPC102, были получены серии антиидиотипических антисывороток. Одна из антисывороток одинаково хорошо реагировала со всеми тремя белками; распознаваемую ею детерминанту(ы) назвали IdX, чтобы подчеркнуть ее общность для многих антител к декстрану (т. е. наличие перекрестных реакций). Кроме того, каждый белок имел индивидуальные детерминанты, обозначенные как IdI (J558), IdI (M104) и IdI (U102); их можно было обнаружить после адсорбции антител к IdX из антиидиотипической антисыворотки. Эти детерминанты присутствуют и на индуцированных антителах к декстрану, причем общая детерминанта(ы) экспрессируется приблизительно на половине антител, а индивидуальная — на 1—10% антител в зависимости от типа детерминанты [39]. Приведенные данные говорят о том, что существуют десятки или сотни отдельных клонов клеток (если индивидуальные детерминанты считать клональными маркерами), из которых половина образует подобные по структуре белки. Как будет показано ниже, структурные исследования подтверждают это предположение.

9.2.2.3. Антитела к азофениларсонату (АФА)

Более широкий набор антител образуется к гаптену АФА. Конъюгаты этого заряженного гаптена с белками индуцируют у мышей образование гетерогенной популяции антител. В отличие от случая с ФХ и декстраном, не было найдено миеломных белков, которые могли бы служить простыми иммуногенами для получения антиидиотипических антисывороток и стандартами для сравнения. Используя другой подход, Нисонов и др. [40] выделили с помощью электрофокусирования (ИЭФ) из сыворотки А/А-мышь, иммунизированной АФА субпопуляцию антител к этому гаптену и получили к ней антиидиотипическую антисыворотку. Заслуживает внимания тот факт, что антиидиотипические антитела реагировали только с теми антителами к АФА, изоэлектрическая точка которых находилась в пределах pI иммуногена. Данный перекрестно-реагиру-

ющий идиотип, обозначаемый CRI, экспрессируется у незначительного числа линий мышей с аллотипом Igh^c и Igh^d [40]. Однако наследование CRI зависит от генов, контролирующих экспрессию κ -цепей. Эти данные коррелируют с локализацией идиотипа на полипептидных цепях антител с CRI-детерминантами. Изучение рекомбинации легких и тяжелых цепей показало, что этот идиотип экспрессируется только в том случае, если и V_H -, и V_L -домены получены от CRI-положительных молекул.

9.2.2.4. Антитела к 4-гидрокси-3-нитрофенилу (НФ)

У некоторых линий мышей (например, C57BL/6) в ходе первичного ответа на белки с присоединенным НФ вырабатываются антитела, связывающиеся с большим сродством (аффинностью) к сходному по строению гаптену 4-гидрокси-5-под-3-нитрофенилу, чем к самому НФ. Эти так называемые гетероклитические антитела имеют характерные ρI и представляют собой $IgG1 \lambda_1$ и $IgM1 \lambda_1$. Подробное изучение моноклональных антител с такими же характеристиками показало существование по меньшей мере двух групп идиотипических детерминант, одна из которых (группа 1) ассоциирована с антигенсвязывающим участком, а другая (группа 2) — нет [41]. Детерминанты группы 2 имеются у большей части гетероклитических антител, тогда как детерминанты группы 1 — лишь у 1—10% таких антител. Сходными чертами обладают описанные ранее идиотипы антител к декстрану. Таким образом, вероятно, гетероклитические анти-НФ-антитела — это семейство белков, имеющих и общие, и уникальные структурные особенности.

9.2.3. Корреляция с аминокислотной последовательностью и пространственной структурой

При сравнении сывороточных антител с миеломными белками к одной и той же антигенной детерминанте часто обнаруживалось наличие у них общих идиотипов и сходство в специфичности связывания. Уже на ранних этапах изучения сывороточных антител к описанным выше антигенам выяснилась относительная ограниченность репертуара В-клеток, а также тот факт, что структуры вариабельных областей антител и миеломных белков, имеющих общий идиотип, скорее всего, идентичны. Это предположение нашло подтверждение при определении N-концевых аминокислотных последовательностей поликлональных антител к декстрану и ФХ, которые оказались весьма похожими на аминокислотные последовательности миеломных белков с тем же идиотипом. Однако более детальное исследование репертуара антител стало возможным лишь с появлением техники моноклональных антител. Это позволило изучить структуру и идиотипы антител, секретлируемых индивидуальными клонами гибридных клеток, и выяснить молекулярные основы разнообразия антител.

С помощью такого подхода были изучены антитела к нескольким антигенным детерминантам. Наиболее четко идиотипические детерминанты были идентифицированы у антител, специфических к декстрану. Был получен набор мышинных (BALB/c) гибридом, секретлирующих антитела ($IgM\lambda$) указанной специфичности. Результаты определения аминокислотной последовательности вариабельных областей тяжелых цепей приведены на рис. 9.5 [42]. Распределение вариабельных участков в структуре этих молекул согласуется с тем фактом, что V_H -области кодируются тремя генами, V_H , D и J_H . Обнаружена гомология для первых 99 аминокислотных остатков всех белков. Значительная гетероген-

ность характерна для двух следующих аминокислотных остатков, 100 и 101; за ними идет участок (102 — 117), отличающийся незначительной вариабельностью. У двенадцати изученных иммуноглобулинов обнаружены четыре варианта V-сегмента, девять вариантов D-сегмента и три варианта J-сегмента, V_H-домены антител к декстрану образуются в результате случайного объединения указанных сегментов.

Миеломные белки M104 и J558 различаются лишь двумя аминокислотами, кодируемыми D-сегментами: остальная часть V_H-области и все V_λ-области полностью идентичны. Поэтому следовало бы ожидать, что индивидуальные идиотипические детерминанты этих белков должны коррелировать со строением D-сегментов, что и было экспериментально подтверждено. На рис. 9.5 обобщены данные об идиотипах антител к декстрану. Три из 12 белков экспрессируют IdI (M104)-детерминанту; в положениях 100 и 101 этих белков находятся YD, YD и AD¹. Ни в одном из остальных изученных иммуноглобулинов в этих положениях названных аминокислот нет. Два белка имеют идиотоп IdI (J 558), причем у обоих в положениях 100 и 101 находятся RY. Еще у двух белков эта же детерминанта выражена слабо: и у того и у другого в D-области присутствуют остатки NY. Другие антидекстрановые белки не имеют Y в положении 101. Таким образом, оба IdI-идиотопа коррелируют с двумя аминокислотами, занимающими в полипептидной цепи положения 100 и 101.

Сейчас выяснено расположение детерминанты IdX. У десяти из изученных иммуноглобулинов эта детерминанта полностью активна. У одного она слабо выражена и еще в одном случае эта детерминанта вообще не обнаруживается. Последний белок отличается от всех остальных двумя участками, D и hV2. Все десять IdX-положительных белков имеют идентичную структуру в hV2, но отличаются по D-участку. Поэтому прослеживается четкая корреляция IdX со структурой hV2, в частности с наличием двух аминокислот NN в положениях 54 и 55 и (или) присутствием углеводной цепи. У белка (Hdex 8) со слабоактивной IdX-детерминантой положения 54-55 заняты SN, а у IdX-отрицательного иммуноглобулина (Hdex 10) — KK; у Hdex 10 кроме этого, отсутствует углеводная цепь. Таким образом, наличие детерминанты IdX связано со структурой hV2, а обеих IdI-детерминант — с hV3.

На рис. 9.5 изображены полученные с помощью компьютера модели вариабельных доменов белков M104 и J558. Стрелками показаны участки, коррелирующие с IdX- и IdI-детерминантами. Заслуживает внимания тот факт, что оба участка представляют собой выступающие в раствор области молекулы. D-область выдается из нижней части антиген-связывающего участка, причем на краю ее находится IdX. Из приведенных данных не следует делать вывод об участии в образовании идиотипических детерминант лишь двух аминокислотных остатков. На это, в частности, указывают результаты изучения рекомбинаций H- и L-цепей, показавшие, что определенный вклад в активность вносит и λ-цепь. Однако совершенно очевидно, что идентифицированные аминокислотные остатки играют решающую роль в активности идиотипических детерминант.

Еще один идиотоп был обнаружен в участке hV2. Поттер и сотр. [43] исследовали ряд миеломных белков мышей BALB/c, специфических к β(1 → 6)-D-галактану. Знание аминокислотных последовательностей этих белков и данные об их взаимодействии с антиидиотипическими антисыворотками позволили установить корреляцию между идиотипическими детерминантами и структурой. Антиидиотипическая антисыворотка к белку X24 [анти-IdI(X24)] не

¹ Однобуквенные обозначения аминокислот см. в гл. 7. — Прим. ред.

взаимодействовала с восемью другими галактансвязывающими белками. При сравнении аминокислотных последовательностей иммуноглобулинов, реагирующих и не реагирующих с IdI (X24), было показано, что наиболее вероятная локализация детерминанты — это положение 53 тяжелой цепи [43]. Таким образом, IdI-детерминанта ассоциирована с hV2.

Данные о первичной структуре мышечных моноклональных иммуноглобулинов позволили также объяснить разнообразие антител к ФХ. Были исследованы три семейства анти-ФХ-антител, сходных по идиотипическим характеристикам и по антигенсвязывающим свойствам с миеломными белками T15, M511 и M603. Как и предполагалось на основании данных изоэлектрофокусирования, эти семейства имеют разные L-цепи. В то же время их L-цепи очень схожи с L-цепями соответствующих белков T15, M511 и M603, а иногда идентичны им [44]. Интересно, что тяжелые цепи всех трех семейств, по-видимому, произошли от одного и того же сегмента V_H -гена, кодирующего V_H -область T15. По-видимому, соматические мутации ответственны за незначительные изменения структуры в отдельных районах V-области, поскольку в геномной ДНК мышей BALB/c найден лишь один функциональный ген, ответственный за специфичность к ФХ. Структура этого гена идентична структуре, предсказанной для гена белка T15 [37]. Дополнительный вклад в разнообразие генов иммуноглобулинов может вносить также и конверсия генов [45].

Важно было бы выяснить, является ли идиотип T15 маркером V_H или V_L . Генетически экспрессия этого идиотипа сцеплена с аллотипом тяжелой цепи, однако рекомбинации H- и L-цепей в этом случае еще не изучены. Из данных о первичной структуре следует, что белки с одинаковыми V_H -областями, но разными L-цепями могут быть как T15-положительными, так и T15-отрицательными. Скорее всего, для активности T15 важное значение имеют детерминанты как V_H -, так и V_L -областей. Более точно локализовать какие-либо идиотипические детерминанты антител, специфичных к ФХ, пока не удалось.

9.2.4. Идиотипы и гены иммуноглобулинов

С помощью антиидиотипических антител можно следить за наследованием генетических маркеров переменных областей иммуноглобулинов, картировать гены переменных областей и изучать регуляцию экспрессии генов V. Идиотипы были первыми маркерами, позволившими установить связь между генами переменных и константных областей. Большинство описанных идиотипических детерминант обнаруживается лишь у ограниченного числа линий животных. При скрещивании особей линий, иммуноглобулины которых различаются двумя генетическими маркерами, например идиотипом и аллотипом, иногда удается наблюдать рекомбинации между указанными маркерами (у потомства при скрещивании гибридов F_1 с родительской линией). Прослеживая у таких животных экспрессию других генетических маркеров иммуноглобулинов и измеряя частоту рекомбинаций между любыми двумя маркерами, можно построить генетическую карту.

Несомненно, для такого подхода необходимо, чтобы антиидиотипические антитела были специфическими лишь к одному идиотипу. Кроме того, в идеальном случае идиотип должен формироваться V-областью только одной из цепей и не зависеть от строения переменной области другой цепи (например, идиотипы V_H -области не должны зависеть от V_L). И наконец, для правильной интерпретации результатов требуется знать генетическое происхождение идиотипа (кодируется ли он V- или D-сегментом). Из рассмотренного в данной главе материала должно быть ясно, что эти критерии часто не соблюдались. Тем

не менее идиотипы оказались полезными маркерами в генетических исследованиях.

Были изучены рекомбинации более чем двадцати различных идиотипических детерминант. На основании этих данных можно сделать вывод, что комплекс генов V_H-C_H тяжелой цепи занимает по меньшей мере 5 ед. генетической карты — участок, достаточный для расположения сотен V_H -генов. Хотя очевидно, что V_H -гены, которые кодируют иммуноглобулины, специфические к декстрану, расположены вблизи C_H -генов, а другие гены, в частности кодирующие идиотип А5А (идиотип, обнаруженный у антител к полисахариду стрептококков группы А), отстоят от них на расстояние трех единиц, точный порядок расположения генов на карте и расстояние до остальных генов V_H -области не известны [7].

9.2.5. Идиотипы Т-клеточных факторов

Одним из основных нерешенных вопросов иммунологии является природа Т-клеточного рецептора. Десятилетнее изучение его так и не дало ясного ответа, используют ли Т- и В-клетки для построения антиген-специфических молекул одни и те же или разные гены. Даже клонированные антиген-специфические Т-клетки синтезируют лишь незначительные количества антиген-специфических факторов, что затрудняет прямое химическое сравнение этих факторов с антителами. Поэтому широкое применение нашел анализ идиотипов: результаты его кажутся очевидными, однако интерпретировать их надо с известной осторожностью. Рядом исследователей было показано, что Т-клеточные факторы и антитела имеют общие идиотипические детерминанты. Наиболее четко это следует из результатов изучения идиотипов мышинных антител к НФ [46] и ГАТ — сополимеру глутаминовой кислоты, аланина и тирозина [47]. Косвенные данные были получены также для идиотипов Т15 и А5А при изучении стимуляции и ингибирования антиидиотипическими антителами функций Т-клеток [48]. Однако, несмотря на наличие у этих факторов идиотипических детерминант, у них не было детерминант, типичных для C_H - и L-цепей. С другой стороны, у Т-клеточных факторов были обнаружены детерминанты константной области (C_T), возможно характерные лишь для этих молекул [49]. Поэтому не исключено, что одни и те же гены V_H могут ассоциироваться и с C_H -, и с C_T -генами, приводя к образованию родственных семейств антиген-специфических молекул. Подтверждением этой интересной, но все же гипотетической модели должны послужить данные биохимических и молекулярно-генетических исследований. Кроме того, необходимо объяснить, каким образом Т-клеточные факторы, состоящие из единичных полипептидных цепей, взаимодействуют с антиидиотипическими реагентами, направленными к идиотопам, активность которых зависит от наличия и V_H -, и V_L -доменов.

9.2.6. Заключение: идиотипы

Идиотипические детерминанты чрезвычайно удобны для быстрого и достаточно точного сравнения переменных областей, однако лишь в последнее время удалось на немногих примерах охарактеризовать их на молекулярном уровне. Парадоксален тот факт, что очень легко получить антиидиотипы, но очень трудно подвергнуть их детальному изучению. Еще предстоит выяснить, не обнаружатся ли в результате изучения строения идиотипов общие черты, которые позволят дать понятию «идиотип» определение, более ясное, чем определение, используемое сейчас. Знание структуры отдельных детерминант и ан-

тиднотипов по меньшей мере уменьшит неразбериху, всегда сопутствующую исследованиям, в которых для характеристики молекул со многими детерминантами применяются гетерогенные реагенты. Обращает на себя внимание тот факт, что у изученных на молекулярном уровне пднотипических детерминанты существенно важными для активности оказались лишь единичные аминокислоты. Однако ясно и то, что эти детерминанты являются конформационно-зависимыми и для их активности, как правило, необходимо сочетание соответствующих пар V_H - и V_L -доменов.

Благодарности

Авторы хотели бы поблагодарить д-ров Richard Feldman, Michael Potter и Stuart Rudikoff за предоставление неопубликованных данных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nisonoff A., Hopper J. E., Spring S. B. Allotypes of rabbit, human, and mouse immunoglobulins. In: *The Antibody Molecule*, pp. 346—406, Academic Press, New York (1975).
2. Mage R. The phenotypic expression of rabbit immunoglobulins: A model of complex regulated gene expression and cellular differentiation, *Contemp. Top. Mol. Immunol.*, 8, 89—112 (1981).
3. Fudenberg H. H., Pink J. R. L., Wang A.-C., Douglas S. D. Allotypic markers of human immunoglobulins. In: *Basic Immunogenetics*, 2d ed., pp. 57—76. Oxford University Press, New York (1978).
4. Lieberman R. Genetics of IgCH (allotype) locus in the mouse. *Springer Semin. Immunopathol.*, 1, 7—30 (1978).
5. Gutman G. A. Genetic and structural studies on rat kappa chain allotypes. *Transplant. Proc.*, 13, 1483—1488 (1981).
6. Janeway C., Sercarz E. E., Wigzell H., eds. *Immunoglobulin Idiotypes*. Academic Press, New York (1981).
7. Weigert M., Riblet R. The genetic control of antibody variable regions in the mouse. *Springer. Semin. Immunopathol.*, 1, 133—169 (1978).
8. Rudikoff S. Immunoglobulin structure-function correlates: Antigen binding and idiotypes, *Contemp. Top. Mol. Immunol.* (in press) (1983).
9. McBride O. W., Hieter P. A., Hollis G. F., Swan D., Otey M. C., Leder P. Chromosomal lokation of human kappa and lambda immunoglobulin light chain constant region genes, *J. Exp. Med.*, 155, 1480—1490 (1982).
10. Baltimore D. Gene conversion: Some implications for immunoglobulin genes, *Cell*, 24, 592—594 (1981).
11. Strosberg A. D., Hamers-Casterman C., VanDerLoo W., Hamers R. A rabbit with the allotypic phenotype: ala2a3 b4b5b6, *J. Immunol.*, 113, 1313—1318 (1974).
12. Mudgett M., Fraser B. A., Kindt T. J. Nonallelic behavior of rabbit variable-region allotypes, *J. Exp. Med.*, 141, 1448—1452 (1975).
13. Knight K. L., Gilman-Sachs A., Fields R., Dray S. Allotypic determinants on the Fab fragment of rabbit Aa locus negative IgG-immunoglobulin, *J. Immunol.*, 106, 761—767 (1971).
14. Chersi A., Alexander C. B., Mage R. Partial primary structure of the immunoglobulin light chain constant region of a single rabbit of b5 allotype, *Mol. Immunol.*, 17, 1515—1523 (1980).
15. Sogn J. A., Kindt T. J. A genetic polymorphism in the constant region of rabbit b4 kappa chains, *J. Exp. Med.*, 143, 1475—1482 (1976).
16. Heidmann O., Rougeon F. Multiple sequences related to a constant-region kappa light chain gene in the rabbit genome, *Cell*, 28, 507—513 (1982).
17. Gilman-Sachs A., Mage R. G., Young G. O., Alexander C., Dray S. Identification and genetic control of two rabbit immunoglobulin allotypes at a second light chain locus, the c locus, *J. Immunol.*, 103, 1159—1167 (1969).
18. Kindt T. J., Mandy W. J., Todd C. W. Association of allotypic specificities A11 and A12 in rabbit immunoglobulin. *Biochemistry*, 9, 2028—2032 (1970).
19. Yarmush M. L., Mandy C. J., Kindt T. J. Evidence for linked expression of latent allotypes of the heavy chain constant and variable regions, *J. Immunol.*, 124, 2864—2869 (1980).
20. Naessens J., Hamers-Casterman C., Hamers R., Okerman F. IgM allotypes in the rabbit. 1. a locus associated allotypic determinants, *Immunogenetics*, 6, 17—27 (1978).

21. Knight L. K., Lichter E. A., Hanly W. C. Papain cleavage of rabbit secretory immunoglobulin A. Differential sensitivity of f and g subclasses, *Biochemistry*, 12, 3197—3203 (1973).
22. Knight K. L., Rosenzweig M., Lichter E. A., Hanly W. C. Rabbit secretory IgA; Identification and genetic control of two allotypes of secretory component, *J. Immunol.*, 112, 877—882 (1974).
23. Review of the notation for the allotypic and related markers of human immunoglobulins, *J. Immunol.*, 117, 1056—1058 (1976).
24. Kunkel H. G., Natvig J. B., Joslin F. G. A «Lepore» type of hybrid γ globulin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 62, 144—149 (1969).
25. Natvig J. B., Kunkel H. G. A hybrid IgG4 — IgG2 immunoglobulin, *J. Immunol.*, 112, 1277—1284 (1974).
26. Ellison J., Hood L. Linkage and sequence homology of two immunoglobulin γ heavy chain constant region genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 1984—1988 (1982).
27. Takahashi N., Ueda S., Obata M., Nikaido T., Nakai S., Honjo T. Structure of human immunoglobulin gamma genes: Implications for evolution of a gene family, *Cell*, 29, 671—679 (1982).
28. Tsuzukida Y., Wang C.-C., Putnam F. W. Structure of the A2m (1) allotype of human IgA — a recombinant molecule, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 1104—1108 (1979).
29. Edelman G. M., Gottlieb P. D. A genetic marker in the variable region of light chains of mouse immunoglobulins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 67, 1192—1199 (1970).
30. Herzenberg L. A., Huang C.-M., Oi V. T., Parsons M. The structure and genetics of mouse immunoglobulin heavy chain constant regions defined by monoclonal anti-allotype antibodies. In: *Immunoglobulin Idiotypes*, edited by C. Janeway, E. E. Sercarz, and H. Wigzell, pp. 199—208, Academic Press, New York (1981).
31. Ollo R., Rougeon F. Mouse immunoglobulin allotypes: Postduplication divergence of γ_{2a} and γ_{2b} chain genes. *Nature*, 296, 761—763 (1982).
32. Kenter A. L., Birshstein B., Chi, a promoter of generalized recombination in λ phage, is present in immunoglobulin genes, *Nature*, 293, 402—404 (1981).
33. Sheppard H. W., Gutman G. A. Allelic forms of rat k chain genes: Evidence for strong selection at the level of nucleotide sequence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 7064—7068 (1981).
34. Lieberman R., Potter M., Mushinski E. B., Humphrey W. Jr., Rudikoff S. Genetics of a new IgV_H (T15 idio type) marker in the mouse regulating natural antibody to phosphorylcholine, *J. Exp. Med.*, 139: 983—1001 (1974).
35. Claflin J. L., Hudak S., Maddalena A. Antiphosphocholine hybridoma antibodies. I. Direct evidence for three distinct families of antibodies in the murine response, *J. Exp. Med.*, 153, 352—364 (1981).
36. Claflin J. L., Davie J. M. Clonal nature of the immune response to phosphorylcholine. IV. Idiotypic uniformity of binding site-associated antigenic determinants among mouse anti-phosphorylcholine antibodies, *J. Exp. Med.*, 140, 673—686 (1974).
37. Crews S., Griffin J., Huang H., Calame K., Hood L. A single V_H gene segment encodes the immune response to phosphorylcholine: Somatic mutation is correlated with the class of the antibody, *Cell*, 25, 59—66 (1981).
38. Blomberg B., Geckeler W. R., Weigert M. (1972). Genetics of the antibody response to dextran in mice, *Science*, 177, 178—180 (1972).
39. Hansburg D., Briles D. E., Davie J. M. Analysis of the diversity of the murine response to dextran B1355. II. Demonstration of multiple idiotypes with variable expression in several strains, *J. Immunol.*, 119, 1406—1412 (1977).
40. Nisonoff A., Ju. S.-T., Owen F. L. Studies of structure and immunosuppression of a cross-reactive idio type in strain A mice, *Immunol. Rev.*, 34, 89—118 (1977).
41. Reth M., Imanishi-Kari T., Rajewsky K. Analysis of the repertoire of anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP) antibodies in C57BL/6 mice by cell fusion. II. Characterization of idiotopes by monoclonal anti-idio type antibodies, *Eur. J. Immunol.*, 9, 1004—1013 (1979).
42. Schilling J., Clevinger B., Davie J. M., Hood L. Amino acid sequence of homogeneous antibodies to dextran and DNA rearrangements in heavy chain V region gene segments, *Nature*, 283, 35—40 (1980).
43. Potter M., Pawlita M., Mushinski E., Feldmann R. J. Structure of idiotypes and idiotopes. In: *Immunoglobulin Idiotypes*, edited by C. Janeway, E. E. Sercarz, and H. Wigzell, pp. 1—20, Academic Press, New York (1981).
44. Gearhart 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).
45. Clarke S. H., Claflin J. L., Rudikoff S. Polymorphisms in immunoglobulin heavy chains suggesting gene conversion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 3280—3284 (1982).
46. Krawinkel U., Cramer M., Melchers I., Imanishi-Kari T., Rajewsky K. Isolated hapten-binding receptors of sensitized lymphocytes. III. Evidence for idiotypic restriction of T-cell receptors, *J. Exp. Med.*, 147, 1341—1347 (1978).

47. Germain R. N., Ju S.-T., Kipps T., Benacerraf B., Dorf M. E. Shared idiotypic determinants on antibodies and T-cell-derived suppressor factor specific for the random terpolymer L-glutamic acid⁶⁰-L-alanine³⁰-L-tyrosine¹⁰, *J. Exp. Med.*, 149, 613-622 (1979).
48. Eichmann K., Expression and function of idiotypes on lymphocytes, *Adv. Immunol.*, 26, 195-254 (1978).
49. Owen F. L., Spurill G. M. Evidence for a T cell constant region gene family: Characterization of cell surface antigens by immunoprecipitation with alloantisera and monoclonal antibodies. In: *Immunoglobulin Idiotypes*, edited by C. Janeway, E. E. Sercarz, and H. Wigzell, pp. 419-428, Academic Press, New York (1981).

Рецепторы В-лимфоцитов

Эллен С. Витетта, Кэтрин Брукс, Питер Айзексон,
Джудит Лейтон, Эллен Пюре, Дороти Юан

*(Ellen S. Vitetta, Kathryn Brooks, Peter Isakson,
Judith Layton, Ellen Puré, Dorothy Yuan)*

Как это явствует из предыдущего материала, основное назначение В-лимфоцита — секреция антител. Именно поэтому В-клетки каждого клона несут на своей поверхности уникальные антигенсвязывающие молекулы Ig, играющие роль первичных рецепторов антигена. Однако если бы В-клетки находились в нерегулируемой, богатой антигенами среде, то они, вероятно, наводнили бы вскоре организмы огромным количеством нежелательных и ненужных антител либо, наоборот, утратили бы способность продуцировать необходимые защитные антитела. Поскольку этого не происходит, очевидно, что синтез и секреция антител В-клетками должны контролироваться с помощью весьма сложных регуляторных механизмов. Такие регуляторные механизмы могут отвечать за торможение нежелательных и стимуляцию защитных иммунных ответов, а также за образование клеток памяти. Действие внешних сигналов опосредуется большей частью разнообразными неиммуноглобулиновыми рецепторами, расположенными на поверхности В-клеток.

За последние два десятилетия появилось много работ, посвященных детальному изучению рецепторов как иммуноглобулиновой, так и неиммуноглобулиновой природы, включающему определение их биохимической структуры и функциональных свойств, а также анализ механизма (механизмов), с помощью которого эти рецепторы передают клетке внешние сигналы. Во многих случаях для таких исследований использовали антисыворотки к поверхностным рецепторам с известными функциями, в других — эти молекулы сначала охарактеризовывали серологически, а уже потом устанавливали их функцию. Кроме того, были частично очищены и функционально изучены многие клетки, несущие на своей поверхности определенные рецепторы.

В этой главе мы рассмотрим только те из молекул, локализованных на поверхности В-клетки, которые, как было показано, служат рецепторами для известных лигандов, а именно: иммуноглобулиновый рецептор для антигена, рецептор для комплемента, рецептор для Fc-участка иммуноглобулинов, рецепторы для лимфокинов и рецепторы для митогенов. Во многих случаях имеющаяся на сегодняшний день информация и сделанные выводы являются спорными — поэтому всякий раз, когда это возможно, мы приводим упрощенную точку зрения. Тех, кто желает более глубоко ознакомиться с существующими разногласиями, мы отсылаем к списку литературы, помещенному в конце данной главы и включающему многие оригинальные работы по каждому из обсуждаемых вопросов.

10.1. Иммуноглобулины клеточной поверхности

10.1.1. Обнаружение

В 1900 г. Пауль Эрлих (Paul Ehrlich) впервые высказал предположение о том, что рецепторы для антигенов на поверхности иммунокомпетентных клеток представляют собой мембранно-связанные антитела, обладающие той же антигенной специфичностью, что и антитела, секретируемые клеткой после стимуляции определенным антигеном [1]. Лишь в середине 60-х годов Селл и Гелл [2] впервые получили прямые данные в пользу этой гипотезы. С помощью антител к иммуноглобулинам им удалось индуцировать бластогенез у части лимфоцитов кролика. Таким образом, анти-Ig оказались способны имитировать действие антигена. Дальнейшие опыты подтвердили, что иммуноглобулины клеточной поверхности (sIg) не были адсорбированы клеткой из сыворотки [3].

Впоследствии sIg были идентифицированы на поверхности лимфоцитов методами флуоресцентной микроскопии, радиоавтографии, световой и электронной микроскопии, с помощью анти-Ig, меченных флуоресцентом, ^{125}I , пероксидазой или ферритином [4]. В процессе этих экспериментов было также установлено, что основную часть sIg составляют IgM и IgD, в то время как другие классы sIg экспрессируются лишь небольшим количеством В-клеток [5, 6].

10.1.2. sIg являются антиген-специфическими рецепторами

Ряд данных свидетельствует в пользу того, что молекулы sIg, синтезируемые определенным клоном В-клеток, служат рецепторами антигена у клеток этого клона. Так, антисыворотка, полученная к легким или тяжелым цепям sIg, блокирует связывание антигена [7] и может предотвратить радиоактивное самоуничтожение (т. е. препятствует гибели клеток в присутствии радиоактивного антигена) [8,9]. Такое ингибирование нельзя объяснить неспецифическими стерическими помехами, поскольку кэппинг рецепторов антигена сопровождается перераспределением практически всех sIg [10]; следовательно, антиген действительно связан с sIg.

10.1.3. Биохимический анализ

Большим достижением в области изучения sIg была разработка метода, позволившего с помощью лактопероксидазы метить компоненты клеточной поверхности радиоактивным иодом [11, 12]. Если меченные этим способом клетки лизировать в условиях, предохраняющих антигенные детерминанты молекул клеточной поверхности, последние можно изолировать, используя специфическую иммунопреципитацию.

Ассоциированные с клеткой Ig метили также биосинтетически, добавляя к культуре лимфоцитов радиоактивный метаболический предшественник. Затем молекулы клеточной поверхности, содержащие метку, связывали со специфическими анти-Ig, после чего клетки лизировали [13], а иммунные комплексы, в состав которых вошли sIg, отделяли от внутриклеточных иммуноглобулинов.

10.1.3.1 Субъединичная структура

Несмотря на то что IgM секретируются в сыворотку в виде 19S-пентамеров, sIgM представляют собой мономеры (8S). Они содержат две тяжелые и две легкие цепи, связанные дисульфидными мостиками [11]. Что касается молекул IgD, то лишь около 50 % их присутствует на В-лимфоцитах в форме мономеров, остальные же 50 % существуют в виде половинных (HL) молекул [14].

10.1.3.2. Структура H-цепей

Наличие общих серологических детерминант у μ -цепей секретируемого и мембранно-связанного IgM указывает на большое сходство тяжелых цепей обоих белков. Однако уже много лет назад было предсказано, что их С-концевые участки должны различаться, поскольку один белок остается ассоциированным с плазматической мембраной, а другой секретируется [15]. Сравнение тщательно измеренных значений молекулярных масс соответствующих полипептидов показало, что действительно μ -цепь мембранно-связанного IgM больше μ -цепи секретируемого IgM приблизительно на 1700 Да [16, 17]. С помощью дальнейших экспериментов удалось объяснить наблюдаемое различие разной длиной белковой части этих молекул, а не разной степенью их гликозилирования [18]. Аналогичные результаты были получены для Ig других классов (IgG, IgD, IgA), — оказалось, что во всех случаях молекулярная масса тяжелых цепей мембранно-связанных форм на 2000—8000 Да больше молекулярной массы тяжелых цепей соответствующих секретируемых форм [19, 20], причем это также обусловлено различиями в длине белковой части H-цепей. Кроме того, мембранно-связанные Ig в отличие от секретируемых обладают гидрофобными свойствами. Так, например, sIgM растворяются только в присутствии детергента, а при седиментации и электрофорезе с изменением заряда (ЭИЗ, charge-shift) ведут себя как типичные детергентсвязывающие гидрофобные белки [21]. Такие же выводы были сделаны на основании результатов электрофореза с изменением заряда sIgD [22].

Поскольку тяжелые цепи мембранно-связанных Ig имеют больший размер и в значительной степени гидрофобны, было высказано предположение, что они, вероятно, содержат гидрофобные области, отвечающие за закрепление этих Ig в мембране. Хотя в настоящее время известны полные аминокислотные последовательности целого ряда мембранных белков и секретируемых Ig, первичные структуры sIg до сих пор не определены, что связано с трудностями получения sIg в достаточных количествах. Поэтому для решения этой проблемы был весьма успешно использован другой подход, основанный на расшифровке последовательностей соответствующих нуклеиновых кислот.

Сравнение мРНК для μ -цепей в клетках некоторых линий В-лимфом, синтезирующих в основном мембранно-связанные IgM, с аналогичными мРНК из ряда гибридом, секретирующих большие количества IgM, показало, что для трансляции двух μ -цепей используются два разных вида мРНК [23, 24]. мРНК для мембранно-связанных и секретируемых белков различаются как по размеру (2,7 т.н. и 2,4 т.н. соответственно), так и по своей 3-концевой последовательности. Из этих данных следует, что соответствующие μ -цепи имеют разные С-концевые аминокислотные последовательности. Как изображено на рис. 10.1 (вверху), мембранные μ -цепи оканчиваются сегментом из 41 остатка, отсутствующим в секретируемых μ -цепях. Этот фрагмент содержит участок из гидрофобных аминокислот, который, по-видимому, представляет собой трансмембранный сегмент поверхностного Ig [24]. Анализ последовательностей клонирован-

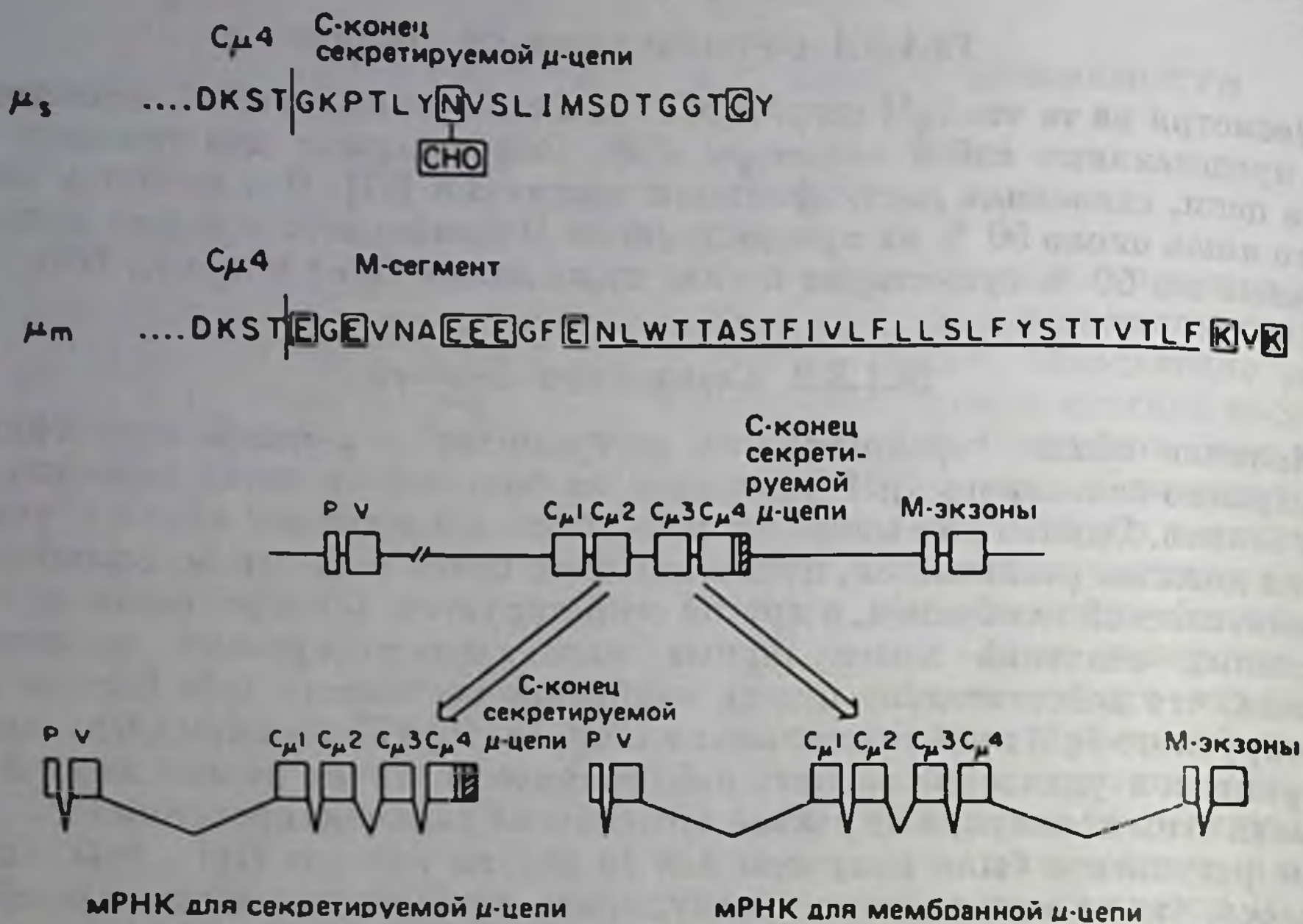


Рис. 10.1. Верхняя часть: С-концевые аминокислотные последовательности секреторируемых и мембранных μ-цепей.

Заряженные остатки заключены в рамки, а гидрофобная последовательность, которая, по-видимому, пронизывает мембрану, подчеркнута.

Нижняя часть: схематическое изображение сплайсинга, приводящего к образованию

mРНК для секреторируемых и мембранных μ-цепей. Прямоугольниками обозначены экзоны; нетранслируемые 3'-концевые последовательности заштрихованы. Участки между экзонами, вырезаемые в процессе сплайсинга, представлены в виде изогнутых линий. Р — сигнальный пептид; V — V_H-экзон [23—25].

ных фрагментов гаметной ДНК, содержащих гены μ-цепей, показал, что mРНК для мембранно-связанных и секреторируемых μ-цепей считываются с одного и того же гена, в котором имеются два сайта полиаденилирования [25]. Первый сайт полиаденилирования располагается вблизи от экзона, кодирующего С4-домен, а второй — за двумя «мембранными» экзонами, находящимися с 3'-стороны от С4-домена. Как схематически представлено на рис. 10.1 (внизу), транскрипция mРНК для секреторируемой μ-цепи заканчивается в первом сайте полиаденилирования, тогда как синтез mРНК для мембранной μ-цепи включает удаление (с помощью сплайсинга) части mРНК, кодирующей концевой домен секреторируемой μ-цепи и первого центра аденилирования. Механизмы, контролирующие предпочтительный синтез той или другой mРНК, неизвестны; очевидно, однако, что они должны регулировать либо полиаденилирование, либо синтез и (или) активацию ферментов сплайсинга [25].

Открытие мембранных экзонов в генах, кодирующих sIgM, привело к предположению, что аналогичные мембранные экзоны имеются в генах и других классов Ig, представленных на поверхности клетки. Анализ последовательностей ДНК, расположенных с 3'-стороны от кодирующих экзонов для δ [26], γ1, γ2b [27] и γ2a [28], выявил существование мембранных экзонов для каждого из этих изотипов. Последовательности мембранных экзонов sIg в значительной степени гомологичны [26, 27]; однако аминокислотные последовательности,

предсказанные на основе анализа мембранных экзонов sIg, существенно отличаются от трансмембранных участков sIg и других белков клеточной поверхности, таких, как H-2 и HLA [29, 30], гликофорин [31] и тропомиозин [32].

10.1.3.3. Количественные оценки

Для определения количества молекул sIg на поверхности В-лимфоцитов был разработан целый ряд методов. Эксперименты, в которых интактные клетки использовались в качестве ингибитора реакции антиген — антитело в растворе, привели к заключению, что на поверхности одной В клетки находятся от 50 000 до 150 000 молекул sIg [33]. Этот вывод был подтвержден опытами по прямому связыванию меченых молекул анти-Ig с В клетками [34]. Однако следует иметь в виду, что эти цифры могут оказаться заниженными, поскольку не все клеточные sIg могут быть доступны для анти-Ig антител [13]. Кроме того, эти цифры представляют собой усредненную величину для популяции В-клеток, поскольку внутри этой популяции наблюдается гетерогенность по количеству молекул Ig, приходящихся на клетку [35].

10.1.4. Детерминанты sIg

10.1.4.1. Идиотипы

Согласно теории боковых цепей Эрлиха [1], антигенсвязывающие участки sIg и антител, секретируемых той же самой клеткой, должны быть идентичны. Ранние исследования показали, что поверхностные и секретируемые Ig миеломных клеток могут связываться с одним и тем же эпитопом [36]. Однако наилучшее доказательство этой гипотезы было получено при использовании моноклональных популяций неопластических В-клеток, экспрессирующих sIg. Некоторые из этих клеток также секретируют (или могут быть индуцированы к секреции) большие количества Ig. Из препарата антител, полученных к секретируемому Ig, можно удалить все антитела, реагирующие с общими детерминантами Ig; в результате останутся антитела, специфически реагирующие с переменными доменами легких и тяжелых цепей (антиидиотипы). Такая антиидиотипическая антисыворотка связывается только с теми клетками, которые продуцируют данный Ig [37]. Недавно были проведены обратные эксперименты: антиидиотипическая антисыворотка, полученная к индивидуальному опухолевому sIgM, была использована для связывания Ig, секретируемых клетками той же линии [38]. При изучении одной из опухолевых систем было также показано, что пептиды V-области μ -цепи sIgM идентичны соответствующим участкам μ -цепи секретируемого IgM [39]. Кроме того, оказалось, что IgM и IgD, локализованные на поверхности одной неопластической В-клетки, имеют одинаковый идиотип [40]. Аналогично sIgM и sIgD нормальной В-клетки обладают одинаковой антигенсвязывающей специфичностью [41].

10.1.4.2. Аллотипы

Поскольку аллотипические маркеры являются отличительным признаком сывороточных иммуноглобулинов, то в клетках, секретирующих антитела и содержащих цитоплазматический Ig, оказалось возможным продемонстрировать феномен аллельного исключения [42]. С помощью окрашивания цитоплазматических Ig плазматических клеток мышей F₁ было показано, что индиви-

дуальная клетка способна производить иммуноглобулины только одного из двух возможных родительских аллотипов, но не обоих вместе.

Решение вопроса о наличии аллельного исключения в случае малых лимфоцитов, не секретирующих sIg, сталкивалось с экспериментальными трудностями до тех пор, пока не были обнаружены аллотипы поверхностных изотипов IgM и IgD. Аллельные формы мышинных sIgD были выявлены случайно при изучении аллоантисывороток, полученных к другим антигенам клеточной поверхности, — при определенных комбинациях, используемых для иммунизации линейных мышей, аллоантисыворотки реагировали с sIgD [43]. В результате последующих серологических опытов, проведенных с клетками мышей различных линий, было обнаружено, что существуют по крайней мере три аллотипа IgD, кодируемых генами (локус *IgH-5*), тесно сцепленными с локусом *IgH-1* [44]. Биохимические исследования с использованием нескольких моноклональных антиаллотипических сывороток позволили локализовать аллотипические детерминанты δ-цепи как в Fd-, так и в Fc-фрагментах тяжелой цепи [45]. Известные в настоящее время четыре аллельные формы IgM кодируются локусом *IgH-6* [46].

Идентификация аллотипических маркеров IgM и IgD дала возможность прямо продемонстрировать наличие аллельного исключения как в случае поверхностных, так и в случае секретируемых Ig [47]. Кроме того, с помощью В-клеток мышей F₁ было показано, что тяжелые цепи и sIgM, и sIgD кодируются генами, расположенными в одной родительской хромосоме [48].

10.1.5. Биосинтез и оборот

Биосинтез sIg осуществляется, по-видимому, таким же путем, который был установлен в случае секретируемых Ig [49]. Молекулы sIg собираются на мембранно-связанных рибосомах [49] и транслоцируются через мембрану

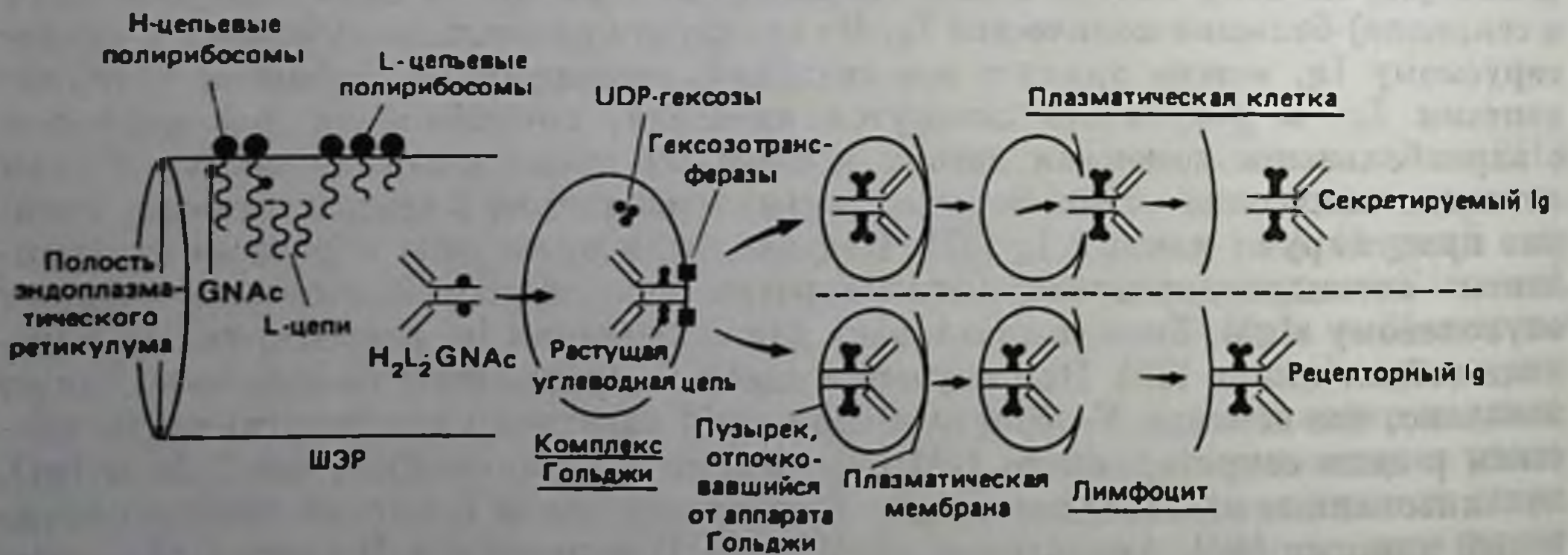


Рис. 10.2. Предполагаемый путь биосинтеза секретируемых и мембранных IgM [15, 18, 19, 49].

ШЭР — шероховатый эндоплазматический ретикулум.

с помощью N-концевого сигнального пептида, который впоследствии удаляется [18]. К образующимся полипептидным цепям присоединяются каркасные сахара. По мере передвижения полипептида из цистерн эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи углеводы процессируются [49]. Терминальные углеводы, связанные с поверхностными и секретируемыми Ig, различаются,

скорее всего, по содержанию сialовой кислоты, — этим можно объяснить тот факт, что те и другие гликопротеины имеют разные изоэлектрические точки [19]. В итоге sIg попадают на поверхность мембраны, вероятно, посредством обратного пиноцитоза [15]. Описанные события суммированы на рис. 10.2.

Клетки большинства изученных линий лимфом и миелом (включая те, которые не обладают способностью активно секретировать IgM) содержат мРНК как для секретируемых, так и для мембранно-связанных IgM [23, 24], однако изучение биосинтеза sIgM позволяет предположить, что скорость синтеза sIgM существенно ниже скорости синтеза секретируемого IgM [13]. Время полужизни sIgM в нормальных клетках составляет примерно 20—80 ч [50]. Приблизительно такое же время полужизни имеет и sIgD [22].

10.1.6. Экспрессия в период онтогенеза

В период онтогенеза первыми из sIg на мембране В-клеток появляются IgM. С помощью чувствительного метода розеткообразования sIgM⁺-клетки были обнаружены в печени 13-дневных мышинных эмбрионов [51], а с помощью методов радиоавтографии и иммунофлуоресценции — в селезенке, печени и костном мозге 15—17-дневных эмбрионов [52]. Предполагают, что предшественниками этих незрелых В-клеток служат «пре-В-клетки», обнаруженные в эмбриональной печени и костном мозге взрослых особей и содержащие в цитоплазме небольшое количество μ -цепей, но не экспрессирующие мембранный IgM [53]. С этой теорией согласуются результаты недавних экспериментов Осмонда и др. [54], наблюдавших появление sIgM⁺-клеток при культивировании *in vitro* популяции, обогащенной пре-В-клетками, выделенными из костного мозга. Большинство В-клеток продолжают экспрессировать sIgM, хотя по мере их созревания плотность sIgM уменьшается [35].

Вслед за sIgM в период онтогенеза на мембране В-клеток появляются sIgD, которые впервые удается обнаружить на поверхности клеток мышинной селезенки с помощью метода иммунофлуоресценции на 3—5-день после рождения [55]. С возрастом содержание В-клеток sIgD⁺ в селезенке увеличивается и достигает уровня, наблюдаемого у взрослой особи, на 6—10-й неделе жизни в зависимости от использованной линии мыши [56]. В это время приблизительно 90 % В-клеток, несущих IgM, одновременно экспрессируют также IgD. На всех стадиях онтогенеза доля В-клеток sIgD⁺ в лимфатических узлах и пейеровых бляшках выше, чем в селезенке. В костном мозге клетки, несущие значительные количества IgD, обнаруживаются лишь на поздних стадиях онтогенеза. Так, у взрослых животных лишь около 30—40 % В-клеток костного мозга экспрессируют одновременно IgM и IgD, основная же часть содержит на своей поверхности только IgM [55]. Все эти данные в совокупности говорят о том, что IgD появляется на мембране относительно зрелых В-клеток (рис. 10.3).

Другие изотипы sIg (IgG, IgA, IgE) присутствуют лишь на незначительной части клеток селезенки непримированной мыши, т. е. мыши, не подвергавшейся воздействию антигена. Поэтому исследовать их экспрессию в процессе онтогенеза технически трудно. Существует одно сообщение об обнаружении IgG и IgA на поверхности клеток селезенки новорожденной мыши, причем до того момента, когда начинают обнаруживаться IgD [6]. Однако имеются и другие данные, согласно которым эти изотипы появляются только после антигенной стимуляции [57].

Онтогенез и распределение клеток, несущих sIgE, изучали на крысах [58]. Сравнение стерильных и нормальных взрослых животных привело к заключению, что sIgE⁺-клетки возникают преимущественно в пейеровых бляшках

и мигрируют в брыжеечные лимфатические узлы только после антигенной стимуляции [58]. Было показано также, что около 50 % sIgE⁺-клеток являются sIgA⁺ [58].

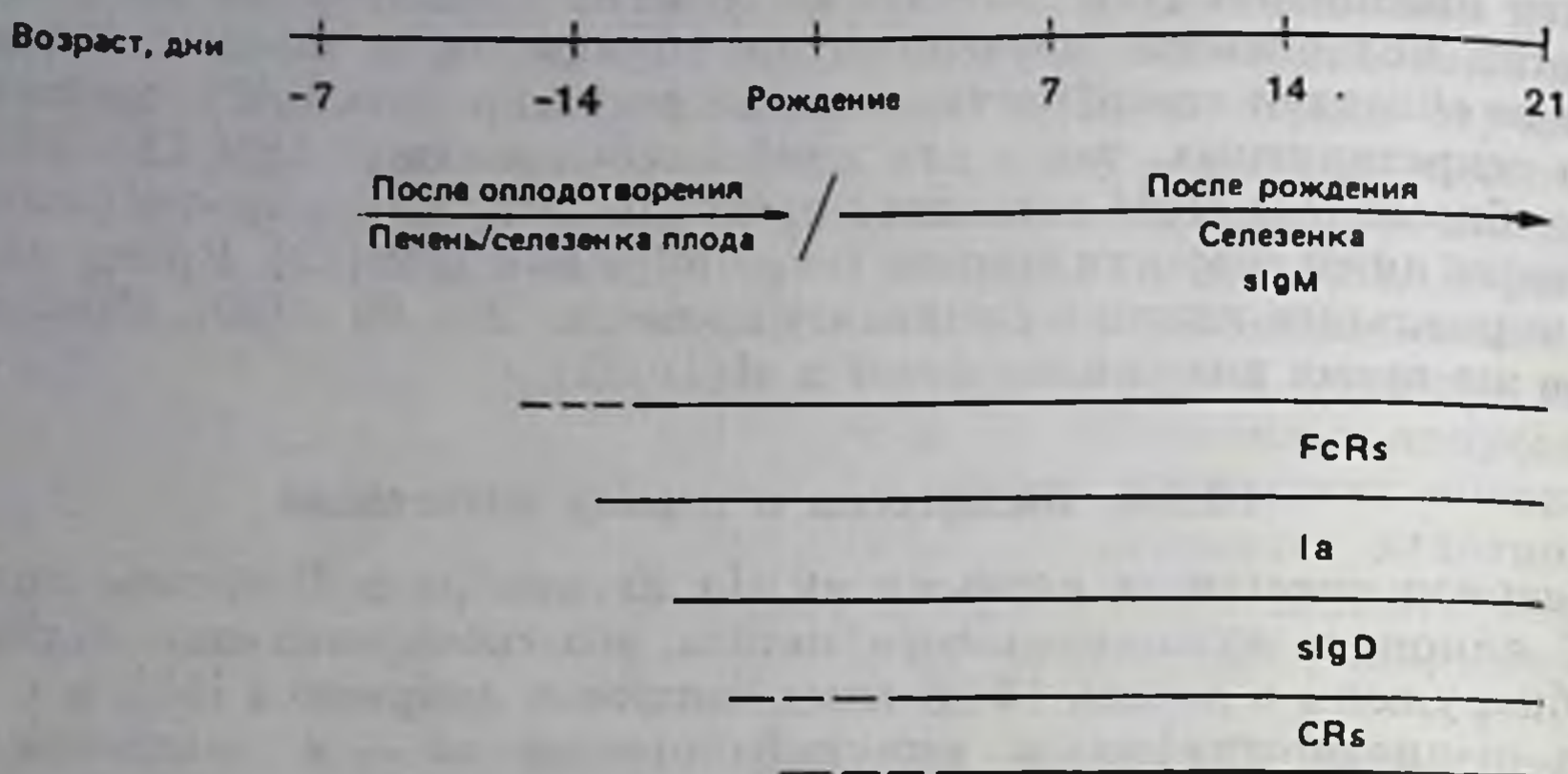


Рис. 10.3. Экспрессия в период онтогенеза некоторых маркеров В-клеток мышей. Время появления различных маркеров на поверхности В-клеток селезенки или печени

эмбрионов. Данные взяты из следующих работ: sIgM [51, 25], FcR [221], Ia [55], sIgD [55, 56], CR [198, 199].

У человека «взрослый» характер экспрессии Ig достигается еще во внутриутробный период, а именно на 15-й неделе развития плода [53], и очень похож на тот, который наблюдается у грызунов [59].

10.1.7. sIg-опосредованная активация В-клеток

Экспериментально доказано, что экспрессия sIg носит клональный характер и что эти sIg отвечают за связывание антигена. Однако точный механизм опосредованной рецепторами подачи соответствующего сигнала В-клетке изучен недостаточно полно. Поскольку практически все зрелые В-клетки коэкспрессируют молекулы Ig двух, а возможно, трех различных изотипов с одинаковой антигенной специфичностью, можно предположить, что либо рецепторы разных изотипов выполняют на одной и той же В-клетке разные функции, либо для выполнения определенной функции необходимо их кооперативное взаимодействие. Роль различных по изотипу рецепторов в активации и развитии толерантности В-клеток исследовали с помощью трех типов экспериментальных подходов: а) определение действия антиизотипических антител на пролиферацию или дифференцировку В-клеток, б) изучение способности антиизотипических сывороток ингибировать ответ В-клетки на антиген или толероген и в) исследование функций субпопуляций В-клеток, экспрессирующих рецепторы только одного изотипа. Картина, которая вырисовывается в результате таких опытов, осложняется многими противоречивыми наблюдениями, вызванными применением различных экспериментальных систем. Тем не менее уже удается сформулировать некоторые общие принципы. Во-первых, лигандзависимая сшивка sIg (но не связывание само по себе) индуцирует пролиферацию зрелых В-клеток, не оказывая такого влияния на незрелые В-клетки. Для последующей дифференцировки в Ig-секретирующие клетки необходимо взаимодействие с Т-клетками или лимфокинами, продуцируемыми Т-клетками. Рецепторы

для этих лимфокинов, вероятно, появляются после взаимодействия IgM и (или) IgD с лигандом. Во-вторых, IgD, возможно, связаны с Т-зависимой подачей сигнала и образованием клеток памяти и (или) IgG-ответа. В-третьих, sIgM в одних случаях могут вызывать толерогенный сигнал, а в других способны передавать сигнал, запускающий процессы пролиферации и дифференцировки. В-четвертых, поскольку sIgM и sIgD по-разному взаимодействуют с другими мембранно-связанными молекулами, такими, как Fc-рецепторы (FcR) или рецепторы для комплемента (CR), этим может определяться характер сигнала (положительный или отрицательный), получаемого В-клеткой.

В последующих разделах эти вопросы рассматриваются детально, причем особое внимание уделяется анализу экспериментальных систем, использованных для исследования функций рецепторов различных изотипов.

10.1.8. Изотип-специфические антисыворотки

10.1.8.1. Поликлональный ответ *in vitro*

Поверхностные Ig играют решающую роль в узнавании и связывании антигена, что с очевидностью следует из специфичности антительного ответа. Вопрос о том, выполняют ли sIg другие функции, такие, как передача специфических сигналов В-клетке, остается спорным. Прямой подход в выявлении участия sIg в передаче сигнала В-клетке заключается в следующем: необходимо продемонстрировать, что специфическое антитело к sIg может индуцировать изменение в скорости пролиферации В-клеток. Используя изотип-специфические антитела (анти- μ или анти- γ), можно оценить индивидуальную способность каждого из двух типов рецепторов к передаче сигнала В-клетке.

Пролиферация, вызванная добавлением анти-Ig, была впервые продемонстрирована на примере кроличьих и человеческих клеток [2, 60]. Недавно было показано также, что антитела к Ig [62], μ [62] и δ [63] могут индуцировать пролиферацию мышинных лимфоцитов. Однако не все анти-Ig-сыворотки эффективны в этом отношении — как правило, стимуляция наблюдается при использовании аффинно-очищенных антител и клеток зрелой селезенки [64]. Кроме того, F(ab')₂-фрагменты этих антител обладают значительно более высокой митогенной активностью, чем интактные Ig [65], что, возможно, обусловлено негативным действием Fc-участков IgG-антител, взаимодействующих с FcR В-клеток. Недавно было обнаружено, что связывание анти-Ig с нерастворимой основой не только повышает митогенность таких реагентов, но позволяет также обойти многие технические трудности, с которыми сталкиваются обычно при работе с растворимыми антителами [61, 63].

Необходимо подчеркнуть, что простого взаимодействия sIg с анти-Ig недостаточно для индукции пролиферации — необходима, по-видимому, перекрестная сшивка sIg. Это заключение было сделано на основе экспериментов с кроличьими В-клетками, выявивших наличие митогенной активности у бивалентных F(ab')₂-фрагментов анти-Ig и отсутствие ее у моновалентных Fab'-фрагментов [66, 67].

Другие данные свидетельствуют в пользу уникальной роли sIg в передаче пролиферативного сигнала. Установлено, что гибридомные антитела против антигенов комплекса гистосовместимости (H-2K и I-A) не являются митогенами для В-клеток соответствующих гаплотипов [64]. Из этих результатов можно сделать следующий вывод: либо Ia и H-2K менее эффективно перекрываются с помощью антител, чем молекулы sIg, либо пролиферация не является общим ответом на взаимодействие лиганда с любой молекулой клеточной поверхности.

Как уже отмечалось выше, связывание антигена или анти-Ig с sIg недостаточно для индуцирования дифференцировки В-клеток в Ig-секретирующие. В большинстве случаев дифференцировка В-клеток требует участия Т-клеток. Данные Шимпла и Уекера [68] свидетельствуют о том, что помимо индукции пролиферации связывание антигена может вызывать также появление у В-клеток чувствительности к помощи Т-клеток. Это предположение подтверждается экспериментами с использованием анти-Ig, связанных с гранулами нерастворимого матрикса, и Кон А-супернатантов, т.е. супернатантов, полученных после обработки лимфоцитов Кон А. Кон А-супернатанты служили источником факторов, продуцируемых Т-клетками [69]. Было обнаружено, что Кон А-супернатанты сами по себе не индуцируют секрецию IgM, но в комбинации с анти-Ig вызывают появление большого количества клеток, секретирующих IgM [69]. Одно из возможных объяснений этих результатов состоит в следующем: сшивка sIg стимулирует экспрессию рецепторов для Т-клеточных факторов. Что касается работ, в которых описывается способность некоторых препаратов, содержащих растворимые Т-клеточные факторы, индуцировать секрецию Ig в отсутствие сигнала, опосредованного sIg [70], то, вероятно, В-клетки, использованные в таких экспериментах, уже были активированы *in vivo*.

10.1.8.2. Антиген-специфический ответ *in vitro*

В противоположность опытам, демонстрирующим анти-Ig-индуцированную пролиферацию, ряд данных свидетельствует о способности анти-Ig ингибировать образование антител, вызываемое добавлением антигена. Было показано, что анти- μ -антитела подавляют ответы как на тимуснезависимые (T-cell independent, TI), так и на тимусзависимые (T-cell dependent, TD) антигены¹, причем наблюдается ингибирование секреции антител, принадлежащих ко всем классам: IgM, IgG и IgA [71]. Появилось сообщение [72] о том, что анти- δ подавляют ответы на антигены TI-2 [73] и TD, но не ингибируют ответ на антигены TI-1 [73]. Вначале на основе этих результатов было высказано предположение, что sIgM⁺IgD⁻-клетки реагируют на антигены TI-1, а sIgM⁺IgD⁺-клетки — на антигены TI-2 и TD. Затем было сформулировано другое предположение: удаление IgD-рецепторов с поверхности sIgM⁺IgD⁺-клеток вызывает подавление ответа на антигены TD и TI-2, но не влияет на способность этих клеток реагировать на антигены TI-1. Результаты, полученные в опытах с изолированными субпопуляциями В-клеток, согласуются со вторым предположением (см. ниже). Что касается других изотипов sIg, то эксперименты Пайерса и др. [71] продемонстрировали ингибирующий эффект анти- γ -антител на секрецию IgG (но не IgM и IgA) в ответ на добавление SRBC, а также подавление продукции IgA (но не IgM и IgG) в присутствии анти- α -антител. Таким образом, секрецию IgA и IgG в значительной степени обеспечивают, по-видимому соответственно sIgA⁺- и sIgG⁺-клетки, которые, вероятно, экспрессируют также и IgM.

Кажется парадоксальным, что анти-Ig могут, с одной стороны, стимулировать пролиферацию В-клеток, а с другой — угнетать их специфический ответ

¹ Антигены подразделяют на два больших класса (TI и TD), различающихся по зависимости от участия специфических к носителю Т-хелперов в индукции антителообразования. Кроме того, среди TI-антигенов различают антигены классов TI-1 и TI-2. Ответы на антигены TI-1 могут быть получены на ранних стадиях онтогенеза, тогда как ответы на антигены TI-2 развиваются позднее. Мыши линии CBA/N-id не отвечают на антигены TI-2. Примеры антигенов каждого класса: TI-1, гаптенизированный полимеризованный флагеллин (POL) и гаптенизированные клетки *Brucella abortus* (BA); TI-2, гаптенизированный фиколин; TD (гаптенизированные) эритроциты барана (SRBC), гаптенизированный гемоцианин фиссуреллии (KLH).

на антиген. Однако следует иметь в виду следующее: а) за пролиферацию и секрецию антител могут отвечать различные субпопуляции клеток и б) анти-Ig способны стимулировать пролиферацию и угнетать дифференцировку одних и тех же клеток, поскольку эти процессы, возможно, протекают независимо друг от друга.

10.1.8.3. Действие антиизотипических антисывороток *in vivo*

Было показано, что введение мышам ксеноантисывороток, специфичных к μ -, γ - и α -тяжелым цепям, приводит к снижению содержания циркулирующих в крови антител, а также супрессирует ответы на антигены. При этом анти- γ и анти- α подавляют соответственно образование только IgG и IgA, тогда как анти- μ подавляет синтез всех классов иммуноглобулинов, особенно в том случае, когда антисыворотка вводится новорожденным животным [74]. Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными в опытах *in vitro*, и доказывают, что IgG или IgA секретируются клетками, экспрессирующими sIg того же изотипа, а потомки клеток, имеющих sIgM, могут продуцировать Ig всех изотипов.

Действие анти- δ *in vivo* изучали у мышей, крыс и обезьян. Было обнаружено, что анти- δ полностью подавляет экспрессию sIgD, а также уменьшает в некоторой степени относительное содержание sIgM⁺-клеток [56]. Были описаны разнообразные функциональные эффекты, наблюдающиеся *in vivo*, причем подчас весьма противоречивые: а) усиление IgG-ответа на антигены [75], б) угнетение IgG-ответа на антигены [56], в) супрессия первичных, но не вторичных ответов (при введении анти- δ после примирования), г) угнетение примирования (при введении анти- δ до него), д) снижение концентрации циркулирующих в крови IgD, IgE и некоторых подклассов IgG [77]. Кроме того, появилось сообщение об увеличении количества Ia-антигенов на поверхности В-клеток мышей, получивших анти- δ , что привело к предположению об активации экспрессии Ia-антигенов под действием анти- δ [78]. Исследования, проведенные относительно недавно на мышах, показали, что супрессия одного δ -аллотипа у гетерозиготного животного вызывает компенсаторное увеличение образования антител несупрессированного аллотипа [79]. Оказалось также, что, варьируя способы введения животным анти- δ , можно получить различные эффекты [79], — это наблюдение позволяет объяснить некоторые явно противоречивые результаты, касающиеся влияния анти- δ на образование IgG. В общем, на основании имеющихся данных о действии анти- δ *in vivo* справедливо заключить, что в норме sIgD⁺-клетки отвечают за образование большинства сывороточных антител, а супрессия может приводить к компенсаторному синтезу антител sIgD⁻-клетками. Неясно, однако, насколько эти результаты подтверждают или опровергают представление о том, что sIgD является обязательным рецептором В-клеток, поскольку анти- δ -антитела сами по себе способны непосредственно стимулировать В-клетки. Кроме того, в системах *in vivo* трудно определить, на что именно действуют анти- δ : расселение клеток в организме (homing), жизнеспособность, дифференцировку или активацию.

10.1.9. Ответы индивидуальных субпопуляций В-клеток

При изучении ответов субпопуляций В-клеток, характеризующихся sIg определенного изотипа, был получен ряд явно противоречивых результатов, что обусловлено, по-видимому, использованием различных методов разделения

клеток, а также применением разных функциональных тестов [80]. В случае сравнения активности различных клеточных популяций необходимо проверить, соблюдается ли линейная зависимость между интенсивностью наблюдаемого ответа и количеством анализируемых клеток. Это не всегда имеет место, особенно в опытах по адоптивному переносу, в которых активность минорных субпопуляций может не поддаваться определению (быть ниже необходимого для этого уровня). Кроме того, следует иметь в виду, что у клеток, первоначально лишенных какого-либо изотипа, этот изотип может появиться после адоптивного переноса и стимуляции с помощью антигена. Таким образом, трудно определить, присутствовал ли данный изотип во время истинной стимуляции.

10.1.9.1. Митогены

В-клетки, несущие либо IgM, либо и IgM и IgD, секретируют IgM- и IgG-антитела в ответ на добавление липополисахарида (ЛПС) [81]. В отличие от этого В-клетки, несущие на поверхности только IgG (в отсутствие IgM), секретируют IgG в ответ на ЛПС [81]. Это означает, что sIgG⁺-клетки утрачивают способность к секреции IgM.

10.1.9.2. TI-антигены

С помощью метода адоптивного переноса было показано, что на TI-антигены отвечают как sIgM⁺IgD⁻ [82], так и sIgM⁺IgD⁺-клетки [83]. Относительный вклад каждой субпопуляции зависит, вероятно, от иммунологической «предыстории» животного-донора, поскольку недавние исследования показали, что неспецифическая стимуляция может быстро изменять фенотип реагирующих клеток, превращая их из sIgM⁺IgD⁻ в sIgM⁺IgD⁺ [84]. В экспериментах *in vitro* было обнаружено, что даже при использовании В-клеток новорожденных животных, у которых большая часть этих клеток представлена субпопуляцией sIgM⁺IgD⁻, ответ в основном определяется sIgM⁺IgD⁻-клетками [66, 83]. С другой стороны, применение метода лимитирующих разведений позволило заключить, что в ответе принимают участие как sIgM⁺IgD⁻, так и sIgM⁺IgD⁺-субпопуляции, хотя частота предшественников среди sIgM⁺IgD⁻-клеток ниже [85].

Таким образом, любой из способов определения позволяет наблюдать ответ sIgM⁺IgD⁺-клеток на TI-антигены. Что касается аналогичной способности sIgM⁺IgD⁻-клеток, то пока на этот счет нет единого мнения. Особенно остро разногласия возникают при интерпретации опытов *in vitro*. Результаты опытов по адоптивному переносу свидетельствуют в пользу того, что sIgM⁺IgD⁻-клетки способны к ответу, но при этом не исключено, что перенесенные IgD-клетки должны для этого сначала приобрести IgD.

10.1.9.3. TD-антигены

С помощью различных систем тестирования было показано, что на TD-антигены отвечает большинство субпопуляций В-клеток. При использовании метода адоптивного переноса ответ давали sIgM⁺IgD⁻, sIgM⁺IgD⁺ и sIgG⁺-клетки (возможно, также IgM⁺IgD⁺) субпопуляции [83]. Единственные различия между субпопуляциями заключаются, по-видимому, в том, что sIgM⁺IgD⁻-клетки не продуцируют IgG-антител (за исключением опытов с долговременным культивированием) [86], а sIgG⁺-клетки не продуцируют IgM-антител [86]. В опытах *in vitro* большую часть IgM и IgG секретируют sIgM⁺IgD⁺-клетки [83], тогда как при использовании метода селезеночных колоний IgM- и IgG-

антитела продуцировались и $sIgM^+IgD^+$, и $sIgM^+IgD^-$, и $sIgM^+IgG^+$ -клетками [87]. Кроме того, на основании результатов, полученных с помощью метода селезеночных колоний [57], был сделан вывод, что первичных $sIgG^+$ -клеток не существует, и, следовательно, появление таких клеток у нестимулированных животных либо вызывается непредусмотренной антигенной стимуляцией, либо является артефактом, связанным с использованием метода окрашивания флуоресцирующими красителями.

Итак, весьма вероятно, что все субпопуляции В-клеток могут давать первичный ответ на TD-антигены, регистрируемый с помощью относительно долговременного адаптивного переноса и метода колоний фрагментов селезенки. Однако по-прежнему остается открытым вопрос, должны ли $sIgM^+IgD^-$ -клетки приобретать для этого IgD. Так, Лейтон и др. [87] обнаружили, что добавление анти- δ -сыворотки к культивируемым фрагментам селезенки, состоящим из $sIgD^-$ -клеток, не влияет на способность этих клеток отвечать на антиген в условиях, когда ответ $sIgD^+$ -клеток подавлен. В противоположность этому Бак и др. [83] сообщили об ингибирующем действии анти- δ и комплемента на первичный IgM-ответ *in vitro*.

10.1.10. Изменения sIg -фенотипа под воздействием антигена или митогена

Связывание антигена с $sIgM^+IgD^+$ -клетками вызывает их дифференцировку, т. е. запускает целый ряд последовательных процессов, приводящих к образованию антителообразующих клеток (АОК) и В-лимфоцитов иммунологической памяти. Дифференцировка сопровождается изменениями sIg фенотипа. В общем можно сказать, что в результате стимуляции В-клеток антигеном или митогеном происходит утрата $sIgD$ и приобретение $sIgG$. Так, было показано [88], что после иммунизации появляется популяция антигенсвязывающих $sIgM^+IgD^+IgG^+$ -клеток. В течение 12 дней эти клетки лишаются сначала $sIgD$, а затем и $sIgM$, хотя неясно, происходит ли изменение в sIg антигенсвязывающих клеток на пути их дифференцировки в АОК или в клетки памяти. Блэк и др. [89] отмечали об утрате $sIgD$ практически всеми клетками памяти в течение первых 14 недель после стимуляции. Лафренц и др. [90] подтвердили этот факт в опытах с долговременно культивируемыми примированными популяциями, хотя получили менее выраженный эффект, нежели описанный Блэком и др. [89]. Сообщалось также об утрате $sIgD$ после стимуляции ЛПС [91]. Образующиеся $sIgM^+IgD^-$ -клетки отличаются от незрелых $sIgM^+IgD^-$ -клеток, которые еще не экспрессировали IgD.

Во время процесса дифференцировки происходит также исчезновение $sIgM$, что, по-видимому, коррелирует с неспособностью клеток генерировать IgM-АОК при повторной стимуляции антигеном [57, 86].

10.1.11. Изотипы иммуноглобулинов, локализованных на поверхности В-клеток памяти

Изотипы sIg -долгоживущих клеток памяти были исследованы в нескольких лабораториях. Согласно общепринятому мнению, предшественником IgG-АОК среди долгоживущих примированных В-клеток является IgG^+ -популяция [89]. Кроме того, $sIgM^+IgG^+$ -популяция клеток памяти может давать АОК, продуцирующие и IgM, и IgG [92]. Среди фенотипов Ig, обнаруженных в примированных популяциях, имеется $sIgD^+$; такие клетки, вероятно, несут также и поверхностные IgG [89, 90].

В ряде экспериментов с длительно культивируемыми примированными клетками сравнивали способность определенного числа клеток давать вторичный IgM- или IgG-ответ. Данные, касающиеся относительного вклада каждой из субпопуляций в общий ответ, весьма разрозненны. Юан и др. [92] обнаружили, что две трети вторичного IgG-ответа определяются IgG⁺-клетками, а оставшаяся одна треть — клетками, несущими и IgM, и IgG, или клетками, имеющими на своей поверхности IgD. С помощью метода селезеночных колоний Тил и др. [57] показали, что примерно половина общего вторичного ответа зависит от IgM⁺-клеток, около одной трети — от sIgM⁺IgG⁺-клеток, а оставшаяся часть — от sIgM⁻IgG⁻-клеток. Ни в одной из этих работ не был прямо оценен вклад клеток, несущих sIgD. Однако Коффман и Кон [93] продемонстрировали, что одновременное удаление sIgG⁺ и sIgD⁺ из популяции В-клеток памяти защищает значительную часть этих клеток от радиоактивного самоубийства после повторного добавления антигена, тогда как одни анти-IgG-антитела защищают лишь около двух третей клеток. Следовательно, sIgD⁺-клетки могут вносить вклад во вторичный IgG-ответ.

Зав-Бар и др. [94] сообщили, что sIgD⁺-клетки представляют собой субпопуляцию клеток памяти, способных генерировать дополнительные клетки памяти в ответ на антигенную стимуляцию. Эта гипотеза прямо противоречит данным Блэка и др. [95], согласно которым за размножение клеток памяти отвечает sIgD⁻-субпопуляция.

10.1.12. Толерантность, опосредованная рецептором

В-клетки новорожденных чрезвычайно чувствительны к индукции толерантности [96], а также к инактивации с помощью анти-μ-антител [97]. Эти наблюдения согласуются с гипотезой о том, что для приобретения устойчивости к индукции толерантности В-клетками, отвечающими на TD-антигены, необходима экспрессия sIgD, поскольку появление sIgD коррелирует с потерей чувствительности к индукции толерантности [98]. В пользу этой теории свидетельствуют эксперименты, показавшие, что в результате удаления sIgD либо гидролизом папаином [99], либо предварительной обработкой клеток анти-δ-сывороткой (но не анти-μ) [100] зрелые В-клетки могут стать чувствительными к индукции толерантности. Наоборот, в других опытах, в которых исследовали восприимчивость к толерантности разделенных sIgD⁺- и sIgD⁻-субпопуляций, было обнаружено, что эти субпопуляции идентичны [85, 87]. Действительно, как было продемонстрировано с помощью метода селезеночных колоний, крайне высокая чувствительность к индукции толерантности полностью утрачивается до появления sIgD [87]. Итак, в одних системах клетки могут лишаться восприимчивости к индукции толерантности, не приобретая sIgD, тогда как в других именно те клетки, которые экспрессируют sIgD, могут становиться чувствительными к индукции толерантности после обработки их анти-δ-сывороткой. По-видимому, эта очевидная противоречивость результатов частично объясняется различиями в используемых экспериментальных системах, т. е. природой толерогена (например, гаптенизированные Ig и неиммуноглобулиновые молекулы), антигена (TI и TD), а также условиями культивирования клеток (метод селезеночных колоний и системы Мишелла — Даттона).

10.2. Рецепторы для факторов роста и дифференцировки

10.2.1. Рецепторы для митогенов

Митогены — это вещества, которые могут вызвать клеточное деление, а в случае В-клеток стимулировать неспецифическим образом (т. е. независимо от связывания антигена) также и секрецию Ig. Некоторые митогены стимулируют как Т-, так и В-клетки, тогда как другие относительно специфичны только в отношении В-клеток. Последние называются поликлональными В-клеточными активаторами (ПВА) [101]. У человека стимуляция В-клеток с помощью ПВА, как правило, зависит от Т-клеток, так что непонятно, действуют ли эти вещества непосредственно на В-клетки [102]. Мышьные В-клетки, по-видимому, отвечают на некоторые ПВА в отсутствие Т-клеток; поэтому принято считать, что такие ПВА действуют прямо на В-клетки и что В-клетки несут специфические рецепторы для каждого из них [101]. Перечень некоторых ПВА приведен в табл. 10.1. Несмотря на наличие обширной литературы, посвященной биоло-

Таблица 10.1. Поликлональные активаторы В-лимфоцитов

Поликлональные β-клеточные активаторы	Источник
Липополисахарид (ЛПС)	Грамотрицательные бактерии
Липопротейн (ЛП)	то же
Водорастворимый митоген из <i>Nocardia</i>	<i>Nocardia</i>
Полинуклеотиды, например полипозин-полицитозин	Синтетический
Очищенный белок туберкулина	Микобактерия
Декстран	Синтетический
Декстран-сульфат	"
Вирус Эпштейна-Барр	—
Митоген из фитолакки	Фитолакка

гическим эффектам ПВА, биохимическая природа рецепторов для ПВА до сих пор неизвестна.

Поскольку не все В-клетки способны отвечать на любой ПВА, чувствительность к тому или иному ПВА служит одним из отличительных признаков субпопуляции В-клеток. Например, у мышей приблизительно одна из трех В-клеток селезенки отвечает на ЛПС [103]. Кроме того, в период онтогенеза чувствительность к различным ПВА появляется на разных стадиях [104]. Хотя одна зрелая В-клетка может отвечать на несколько митогенов [105], Ветцель и Кеттман [106] показали, что смесь двух ПВА, ЛПС и декстран-сульфата вызывает непосредственную стимуляцию каждой мышинной В-клетки. Следовательно, все В-клетки имеют рецепторы для ЛПС и (или) декстран-сульфата. Физиологическая роль ПВА неясна; тот факт, что целый ряд этих веществ выделяют из клеточных стенок бактерий, позволяет предположить, что поликлональный ответ может играть важную роль в защите хозяина от патогенных микроорганизмов.

Наиболее хорошо изученным ПВА является компонент бактериальной клеточной стенки — ЛПС, вызывающий несколько биологических эффектов. Химические и биологические свойства ЛПС подробно рассмотрены в обзоре Моррисона и Райана [107]. Липополисахарид состоит из полисахаридного остова, к кото-

рому ковалентно присоединен липид, обладающий собственно биологической активностью и называемый липидом А [108]. Следует отметить, что ЛПС часто содержит примесь липопротеинов, также представляющих собой ПВА [109]. Действие липопротеина отличается от действия липидной части ЛПС. С целью идентификации предполагаемого «рецептора для ЛПС» были проведены исследования прямого связывания радиоактивно меченного ЛПС с клетками [110, 111]. По крайней мере в одном случае наблюдали предпочтительное взаимодействие ЛПС с В-клетками по сравнению с Т-клетками или тимоцитами [111]. Однако в других опытах было продемонстрировано, что ЛПС столь же эффективно присоединяется и к Т-клеткам [112]. Взаимодействие ЛПС с В-клетками в этих опытах представляло собой типичный случай неспецифического связывания, т.е. не достигалось насыщения и не наблюдалось конкурентного ингибирования с помощью ЛПС [111, 112]. Это и неудивительно, поскольку липидная часть ЛПС весьма липофильна и может встраиваться в искусственные мембраны [113]. Таким образом, ЛПС, вероятно, связывается неспецифически с любой мембраной, а обнаруженная клеточная специфичность [111] обусловлена, по-видимому, иными эффектами присоединенного митогена [112]. Можно думать поэтому, что эксперименты по связыванию вряд ли дадут какую-либо ценную информацию о «рецепторах» для ЛПС, хотя подобный подход может быть успешным в случае других ПВА. С этой точки зрения вызывают интерес данные о взаимодействии В-клеточного митогена polyI·polyC с отдельной субпопуляцией В-клеток [114].

Более убедительный довод в пользу существования специфического рецептора для ЛПС был получен при использовании мышей линии СЗН/HeJ, клетки которых не отвечают на липидную часть ЛПС [115] (но чувствительны к липопротеину). Это наследуемый признак, и он кодируется единственным геном, локализованным в хромосоме 4 [116]. В остальных отношениях мыши линии СЗН/HeJ совершенно нормальны, и их клетки отвечают на другие ПВА, что говорит о наличии какой-то генетически детерминированной «структуры», необходимой для проявления действия ЛПС. Должен ли такой структурой быть мембранный рецептор, не ясно, однако, согласно данным Форни и Кутиныо [117], В-клетки мышей СЗН/HeJ, по-видимому, действительно, лишены мембранного рецептора для ЛПС. В опытах упомянутых авторов кроликов иммунизировали клетками селезенки мышей линии СЗН/Tif (которые нормально отвечают на ЛПС), а затем полученную антисыворотку адсорбировали с помощью клеток СЗН/HeJ. Поскольку единственным различием между двумя линиями мышей является способность их клеток отвечать на ЛПС, адсорбированная антисыворотка должна была узнавать только продукт предполагаемого «гена ответа на ЛПС». Она и на самом деле обладала свойствами, ожидаемыми для антител против рецептора для ЛПС.

Было описано несколько других антител, обладающих митогенной активностью по отношению к В-клеткам. В частности, у мышей В-клеточными митогенами оказались антитела против вируса лейкемии Френд, причем их действие могло быть блокировано с помощью анти-gr 70 [118]. Это означает, что один из вирусных белков, вероятно, функционирует в качестве рецептора ПВА. Некоторые миеломные белки, включая антиидиотипические [118] и антигаптенные [119], также представляют собой ПВА. Пока не понятно, обусловлена ли митогенная активность этих белков их антигенной специфичностью или же она определяется какими-то иными свойствами. То, что sIg сами по себе могут быть рецепторами для ПВА, подтверждается наличием митогенных свойств у анти-Ig-антител, хотя в данном случае анти-Ig-антитела, стимулирующие сшивку sIg, вероятно, просто имитируют эффект антигена.

Вирус Эпштейна — Барр (ВЭБ) служит примером ПВА, обладающего уникальным способом действия [120]. Этот вирус, вызывающий инфекционный мононуклеоз, является митогеном для В-клеток приматов (но не грызунов) [121] и индуцирует поликлональную секрецию Ig [122]. В отличие от других человеческих ПВА действие ВЭБ ограничивается только В-клетками и, очевидно, не обусловлено первичной активацией Т-клеток [123]. Замечательное свойство ВЭБ заключается в его способности трансформировать В-клетки, — инфицирование их этим вирусом приводит к бесконечной пролиферации клеток и образованию трансформированных клеточных линий [124]. Строгая специфичность ВЭБ по отношению к В-лимфоцитам связана, по-видимому, с тем, что только эти клетки экспрессируют рецепторы для ВЭБ [125]. И хотя такие рецепторы имеются у большинства В-лимфоцитов [125], лишь небольшая часть этих клеток в ответ на ВЭБ начинает секретировать Ig [126] или трансформируется [122, 123]. Существует ряд данных, указывающих на идентичность рецепторов для ВЭБ и для комплемента. Так, в частности, оба рецептора коэкспрессируются на поверхности В-клеток и клеток В-лимфоидных линий и подвергаются коэкспонированию (как установлено с помощью метода иммуофлуоресценции). Кроме того, связывание С3 препятствует связыванию ВЭБ [127]. Однако некоторые клеточные линии, экспрессирующие рецепторы для комплемента, не взаимодействуют с ВЭБ [128], что свидетельствует против идентичности двух рецепторов. Это видимое противоречие может объясняться, по-видимому, структурной гетерогенностью рецепторов для комплемента.

Следует привести еще два соображения. Во-первых, очевидно, что продукты Т-клеток могут индуцировать пролиферацию В-клеток и секрецию ими Ig. Во-вторых, Моллер и др. [101] считают, что все Т1-антигены, независимо от их структуры, являются ПВА по определению и, следовательно, должны существовать ПВА-рецепторы для каждого Т1-антигена. Прямых данных в пользу существования таких ПВА-рецепторов практически нет, и вывод об их наличии основан исключительно на особенностях биологической активности Т1-антигенов.

10.2.2. Рецепторы для Т-клеточных факторов

После первого сообщения Даттона и др. [129] и последующих работ Шимпла и Уекера [68], показавших, что бесклеточные супернатанты, полученные от активированных Т-клеток, могут заменять Т-клетки при индукции секреции антител, стало очевидным, что растворимые вещества, или факторы, продуцируемые Т-клетками, могут влиять на рост и дифференцировку В-клеток. В результате возникло предположение о наличии у В-клеток рецепторов (или акцепторов) для этих «хелперных» Т-клеточных факторов. В настоящее время имеется множество публикаций, содержащих сведения о различных Т-клеточных факторах, к которым относятся: антиген-неспецифические факторы, замещающие Т-клетки (ТЗФ, T-cell replacing factors) [68], интерлейкин 2 (IL-2), стимулирующий Т-клеточную пролиферацию [130], антиген-специфические хелперные факторы [131], аллогенный эффекторный фактор (allogeneic effect factor — AEF) [132] и факторы дифференцировки В-клеток (B-cell differentiation factors), активирующие секрецию как IgM (BCDF μ), так и IgG (BCDF γ) [133, 134]. Обычный метод, применяемый для тестирования активности неспецифических хелперных факторов (например, ТЗФ), сводится к измерению количества секретлируемых антител в ответ на какой-либо TD-антиген (обычно SRBC) при замене Т-клеток растворимыми медиаторами в системе *in vitro* [68]. Пока неизвестно, связана ли активность ТЗФ с одним или несколькими компонентами. Использованные до сего времени препараты факторов весьма гетеро-

генны, как, впрочем, и популяции отвечающих В-клеток. Принимая это во внимание, а также учитывая отсутствие очищенных факторов и стандартных тест-систем для идентификации рецепторов, кажется преждевременным говорить о В-клеточных рецепторах для Т-клеточных факторов. В большинстве опытов непонятно даже, действительно ли В-клетки являются первичными мишенями изучаемых растворимых медиаторов. Для решения вопросов, касающихся исследования Т-клеточных продуктов, их клеток мишеней, а также природы соответствующих рецепторов, представляется перспективным использование продуктов тех линий Т-клеток и опухолей, которые секретируют ограниченный набор факторов [134].

Имеется несколько сообщений о том, что IL-2 действует непосредственно на В-клетки [135]. Однако эти данные в настоящее время подвергаются сомнению [136, 137]. В частности, наблюдаемый эффект IL-2 может быть связан либо с загрязнением препаратов В-клеток остаточными Т-клетками [36], либо с загрязнением препаратов IL-2 другими факторами. Последнее предположение нашло подтверждение в работе Говарда и др. [138], показавших, что препараты IL-2 могут содержать В-клеточный фактор роста (BCGF), который удается физически отделить от IL-2. Поскольку BCGF не индуцирует секрецию Ig, вероятно, что он стимулирует деление В-клеток, которые в результате приобретают рецепторы к фактору, продуцируемому Т-клетками. Этот фактор, вероятно, похож на описанный Мельхерсом и др. [70] так называемый «фактор размножения и созревания В-клеток» («В cell-replication and maturation factor — BRMF»).

Хотя секрецию Ig В-клетками можно вызвать с помощью ТЗФ [68, 133], BCDF_μ [133] и BCDF_γ [133], отсутствие очищенных препаратов этих факторов делает невозможным прямое изучение соответствующих рецепторов. Такацу и др. [139] применили иной подход к решению этой проблемы — они сравнивали действие индуцированных антигеном ТЗФ (растворимых) и антиген-специфических Т-клеток на коммитированные В-клетки. Оказалось, что В-клетки одной из линий мышей — DBA/2На — нормально отвечают на Т-клетки, но не отвечают на растворимые ТЗФ. Из этого можно было предположить, что В-клетки не одинаково отвечают на Т-клетки и растворимые Т-факторы. Отсутствие ответа, по-видимому, было обусловлено каким-то генетическим дефектом в Х-хромосоме и позволяло предположить, что клетки мышей DBA/2На могут быть лишены рецепторов для ТЗФ. В последующих экспериментах кроликов проиммунизировали В-клетками нормальных мышей линии DBA/2 и затем полученную антисыворотку адсорбировали с помощью клеток мышей DBA/2На (эти клетки должны были обладать всеми антигенами, за исключением рецепторов для ТЗФ). Адсорбированная антисыворотка блокировала ответ нормальных В-клеток на ТЗФ *in vitro*, т.е. узнавала «ТЗФ-рецептор», но парадоксальным образом та же самая антисыворотка увеличивала *in vivo* ответ на TD-антигены [140]. Таким образом, в различных условиях антитела к рецептору могут либо ингибировать действие ТЗФ (*in vitro*), либо увеличивать ответ (*in vivo*), причем наблюдаемый эффект может зависеть от дозы антисыворотки [140].

Опыты с В-клеточными опухолями также подтвердили предположение о существовании рецепторов для ТЗФ. Мурагуши и др. [141] обнаружили, что неопластические В-клетки человека (от больных с хронической лимфоцитарной лейкемией) можно индуцировать к секреции Ig с помощью препаратов, содержащих ТЗФ, как впервые было отмечено в работе Фу и др. [142], и что эти клетки адсорбируют ТЗФ, но не IL-2. Аналогично опухолевые В-клетки мышей BCL₁ можно индуцировать к секреции IgM препаратами, содержащими ТЗФ [143]. В результате было высказано предположение, что неопластические В-клетки некоторых линий экспрессируют рецепторы для Т-хелперных факто-

ров, хотя точная природа этих факторов неизвестна. Описанные наблюдения могут оказаться чрезвычайно полезными при разработке стандартизированных тест-систем для определения активности этих факторов.

В заключение следует упомянуть работу Хьюбера и др. [144], обнаруживших, что добавление антител против Lyb-3, дифференцировочного антигена В-клеток, к популяции В-клеток, очищенной от Т-клеток, приводит к значительному увеличению ответа этой популяции на Т-зависимый антиген. Авторы предположили, что Lyb-3 играет, вероятно, основную роль в процессе В-клеточной активации. Это весьма интересное соображение, однако в настоящее время его невозможно соотнести с другими способами активации В-клеток.

10.3. Fc-рецепторы

10.3.1. Определение и экспрессия

Клетки определенных типов связывают молекулы иммуноглобулинов благодаря наличию рецепторов, специфически узнающих детерминанты, локализованные в Fc-фрагменте иммуноглобулина. Связывание иммуноглобулина происходит с помощью ассоциированного с мембраной рецептора FcR. Первоначально Fc-рецепторы были обнаружены на поверхности макрофагов. Впоследствии оказалось, что FcR имеются у клеток других типов, в том числе у В- и Т-лимфоцитов.

10.3.2. Методы выявления

Fc-рецепторы можно выявить на поверхности клеток, используя их способность связывать агрегированный IgG или иммунные комплексы. По-видимому, агрегаты IgG и комплексы антиген — антитело присоединяются к одним и тем же участкам на мембране лимфоцитов. Это было продемонстрировано в экспериментах по ингибированию: связывание агрегированных IgG препятствовало последующему присоединению иммунных комплексов и наоборот [145—147]. Связавшиеся агрегаты IgG и растворимые иммунные комплексы наиболее часто выявляются с помощью методов радиоавтографии или флуоресценции [146].

Для изучения FcR-зависимого связывания с лимфоцитами комплексов антиген — антитело применяется также метод розеткообразования [148]. В большинстве случаев для этого используют сенсibilизированные какими-либо антителами эритроциты (ЕА). Недавно Шоберг и Инганас [149] модифицировали технику розеткообразования, заменив ЕА гранулами латекса, покрытыми IgG.

Анклиссу [150] удалось получить моноклональные крысиные антитела к мышиным FcR и показать, что с помощью этих антител FcR можно выявлять FcR на поверхности некоторой части В-лимфоцитов и В-клеток нескольких линий ([150], а также Дж. Анклисс, личное сообщение). Использование анти-FcR-антител является наиболее удобным методом выявления и выделения FcR. Он удобен для проведения целого ряда функциональных и биохимических исследований.

10.3.3. Присутствие на поверхности В-лимфоцитов

Получены данные о наличии Fc-рецепторов на поверхности мышинных [151], человеческих [152] и кроличьих [153] В-лимфоцитов. На мышинных В-лимфоцитах FcR впервые обнаружили Бастен и др. [154] и Параскевас и др. [155].

Бастен и др. [154, 156] продемонстрировали связывание агрегированных IgG и комплексов антиген — антитело с лимфоцитами, выделенными из грудных протоков. Клетки, присоединяющие IgG, не являлись фагоцитами, и при этом на связывание IgG не влияло добавление ЭДТА — реагента, ослабляющего взаимодействие Ig с FcR макрофагов [154]. Кроме того, IgG-связывающие клетки оказались sIg⁺. Связывание осуществлялось за счет Fc-участка молекул Ig, поскольку F(ab')₂-фрагменты Ig не присоединялись к клеткам. И наконец, для связывания Ig не требовалось присутствия комплемента (C'), — следовательно, CR, очевидно, не участвовал в процессе взаимодействия Ig с FcR. Сходные результаты получили Параскевас и др. [155]. В отличие от предыдущих авторов они показали, что IgG_{2a} столь же эффективно связывается с FcR, как и IgG₁ [155].

Наличие FcR на В-лимфоцитах человека описали Диклер и Канкел [152], установившие, что 22 % лимфоцитов периферической крови человека несут FcR, причем основная часть FcR⁺-клеток представляет собой также и sIg⁺. Связывание агрегированных IgG происходило независимо от C'.

В тех случаях, когда FcR выявляются с помощью описанных выше методов, все зрелые В-клетки оказываются FcR⁺ [155]. Недавно возникло предположение, что Fc-рецепторам В лимфоцитов свойственна гетерогенность, поскольку было обнаружено, что моноклональные анти-FcR антитела реагируют только с частью FcR⁺ В-клеток (Дж. Анклисс, личное сообщение).

10.3.4. Онтогенез

На ранних этапах исследования было высказано предположение, что FcR являются, вероятно, одним из маркеров зрелых В-лимфоцитов. Бастен и др. [156] показали, что стволовые клетки костного мозга представляют собой FcR⁻, тогда как зрелые В-клетки — FcR⁺. В процессе дифференцировки В-клеток в антителообразующие плазматические клетки FcR теряется. Хотя FcR⁺-клетки обнаруживаются уже на ранних стадиях онтогенеза, значительное большинство их — это не В-клетки. У мышей количество клеток, несущих одновременно FcR и sIg, существенно возрастает на 9—10-й день после рождения — в это время появляются также sIgD. В костном мозге вначале преобладают sIgM⁻FcR⁻CR⁻-клетки, затем в отсутствие CR или FcR на поверхности В-клеток экспрессируются sIgM. В конечном итоге В-клетки коэкспрессируют IgM, IgD, FcR и CR [157].

Таким образом, sIgM, по-видимому, являются самым ранним маркером В-клеток мышей (печень 15—17-дневных эмбрионов). Fc-рецепторы появляются чуть позже (печень 17-дневных эмбрионов), а затем экспрессируются Ia-антигены (селезенка однодневных новорожденных особей), sIgD (на 5-й день после рождения) и CR (на 10—14-й день) (рис. 10.3).

10.3.5. Взаимодействие с другими молекулами на поверхности В-клеток

Хотя FcR отличаются от других клеточных маркеров (sIg, MHC-антигенов и CR) [157, 158], в некоторых случаях на поверхности клетки могут возникать определенные взаимодействия между FcR и этими молекулами. Не исключено, что такие взаимодействия имеют важное значение при активации и (или) индукции толерантности В-клеток.

10.3.5.1. Рецепторы для комплемента

Как уже говорилось, в ранних работах было показано, что FcR-опосредованное связывание происходит независимо от C' [152—155]. Кроме того, Иден и др. [145] показали, что FcR и CR, локализованные на поверхности мышинных лимфоцитов, не идентичны. Авторы сравнили способность клеток FcR⁺ и CR⁺-популяций связывать иммунные комплексы в присутствии и в отсутствие C'. И хотя оказалось, что данные популяции в значительной степени перекрываются, тем не менее существуют целый ряд особенностей, характеризующих реакцию связывания в том и другом случаях, четко указывающих на различие двух типов таких рецепторов: а) необходимость C', б) чувствительность к трипсину, в) ингибирование связывания иммунных комплексов с помощью агрегатов IgG (но не с помощью иммунных комплексов) в присутствии C', г) ингибирование CR-связывания, но не FcR-связывания после предварительного добавления C' и д) ингибирование CR-зависимого, но не FcR-зависимого связывания с помощью фактора из яда кобры.

10.3.5.2. Поверхностные иммуноглобулины

Данные о взаимосвязи между sIg и FcR противоречивы. Большинство имеющихся в литературе данных было получено в экспериментах, связанных с изучением кокэппинга sIg и FcR. Часто кэппинг sIg или образование выпуклых полосок sIg («stripping») на поверхности мышинных лимфоцитов, вызываемых анти-Ig-антителами или их F(ab')₂-фрагментами, сопровождаются кокэппингом FcR [159]. Однако имеются и противоположные сообщения, согласно которым кэппинг sIg, наблюдаемый после добавления анти-Ig, не изменяет диффузного характера распределения FcR [145, 146]. Это противоречие, вероятно, обусловлено количественными, а не качественными различиями, поскольку были описаны случаи выявления остаточных FcR в результате их неполного кэппинга. Так, Юнануе и Эббас [159] продемонстрировали наличие кокэппинга FcR с sIg на поверхности лимфоцитов, используя интактные анти-κ; с F(ab')₂-анти-κ кокэппинг был выражен в меньшей степени, хотя наличие некоторого кокэппинга было очевидным. Кроме того, Баст и др. [160] обнаружили, что после обработки F(ab')₂-анти-Ig кокэппинг FcR и sIg наблюдается только у 60 % FcR⁺-клеток. В противоположность этому Диклеру [146] не удалось обнаружить с помощью метода розеткообразования перераспределения FcR по поверхности человеческих лимфоцитов после кэппинга sIg. Как было отмечено выше, это можно отнести скорее за счет количественных, а не качественных различий.

Интересно, что кокэппинг FcR и sIg, по-видимому, является нереципрочным. Так, кэппинг FcR не вызывает кокэппинга sIg [161], указывая на отличие друг от друга молекул sIg и FcR. Эти данные позволили предположить, что связывание с лигандами меняет конформацию sIg, причем эти конформационные изменения приводят в свою очередь к ассоциации sIg и FcR.

Недавно было проведено сравнительное изучение взаимодействия FcR с sIgM и с sIgD. Форни и Пернис [162] показали, что кокэппинг FcR можно вызвать с помощью F(ab')₂-анти-μ-антител, тогда как F(ab')₂-анти-δ-антитела такой способностью не обладают. Авторы заключили, что обнаруженное различие связано с существованием специфической ассоциации между sIgM и FcR. Эти результаты нашли подтверждение в работе Диклера и Кубичек [161], которые также наблюдали кокэппинг FcR с sIgM, причем продемонстрировали, что для возникновения ассоциации необходимо, чтобы рецепторы обоих типов

были связаны с соответствующими лигандами: FcR с иммунными комплексами или мономерными IgG, а sIg с F(ab')₂-анти-Ig. Кроме того, Диклер и др. [163] сообщили, что кокэппинг FcR с sIgD возможен в том случае, когда FcR «заняты» иммунными комплексами, но не мономерными Ig. В то время как FcR взаимодействуют с sIgM на поверхности всех В-клеток, ассоциация FcR-sIgD свойственна только какой-то одной субпопуляции В-клеток [163].

10.3.5.3. Молекулы, кодируемые главным комплексом гистосовместимости

Хотя имеются сообщения о том, что анти-МНС-антитела (в особенности анти-Ia-антитела) блокируют связывание иммунных комплексов и агрегированных Ig с FcR, этот феномен, по-видимому, не является специфическим [164]. Нескольким лабораториям не удалось обнаружить кокэппинг FcR с Ia-молекулами, что, с одной стороны, говорит о неидентичности этих молекул, а с другой — об отсутствии их ассоциации на поверхности клетки [165]. Частичное угнетение FcR-связывания с помощью анти-Ia антисывороток обусловлено, вероятно, либо неспецифическими стерическими помехами, либо присутствием в препаратах анти-Ia-сывороток иммунных комплексов.

10.3.6. Специфичность FcR-зависимого связывания

FcR специфически взаимодействуют с Fc-участками молекул Ig. Легкие цепи, Fab- и F(ab')₂-фрагменты, а также комплексы, образованные этими фрагментами, не связываются [146, 148, 152, 155] и не ингибируют связывания intactных Ig с В-клетками [148, 156]. Изолированные Fc-фрагменты присоединяются к В-клеткам [166], но FcR проявляют намного более высокую авидность в реакциях с Ig, связанными в комплексе, по сравнению с растворимыми Ig [146, 152, 154, 155, 164].

Область Fc-фрагмента, за счет которой осуществляется связывание с лимфоцитами, по-видимому, локализована в CH₃-домене, поскольку молекулы IgG с делециями в этом домене не способны взаимодействовать с FcR [167]. Однако не исключено, что в связывании принимает участие CH₂-домен, так как CH₃-фрагменты IgG не ингибируют реакцию Ig с кроличьими FcR [153].

10.3.6.1. Классовая и подклассовая специфичность

До сих пор окончательно не решен вопрос, касающийся относительной эффективности связывания В-клетками различных подклассов IgG. У мышей IgG₁, очевидно, взаимодействует с В-клетками более эффективно, чем IgG₂ [148, 156]. У человека IgG₁ и IgG₃ обладают большей авидностью по сравнению с IgG₂ и IgG₄ [166]. Недавно на поверхности некоторых опухолевых [168] и нормальных [169] клеток были обнаружены FcR для IgM.

10.3.6.2. Видоспецифичность

В экспериментах по связыванию с использованием мышинных и человеческих В-клеток не было получено данных в пользу наличия у FcR видовой специфичности. Однако Басти др. [153, 160] обнаружили, что FcR кроличьих лимфоцитов видоспецифичны. С помощью ингибиторного анализа было показано, что иммуноглобулины животных видов взаимодействуют с одними и теми же участками мембраны В-клеток [145, 146, 164], что тем не менее не исключает возможности существования различий в авидности разных Ig.

10.3.7. Биохимия

Ранние работы, в которых были предприняты попытки охарактеризовать FcR биохимически, показали, что рецепторы устойчивы к трипсину и чувствительны к трипсиногену [145, 146]. Они чувствительны, хотя и в меньшей степени, к фосфолипазе С и устойчивы к нейраминидазе и фосфолипазе А [170]. Все это привело к заключению, что FcR представляет собой белок, гликопротеин или фосфолиппротеин. В других опытах была продемонстрирована возможность мечення FcR с помощью ^3H -боргидрида натрия. Таким образом, было показано, что рецептор гликозилирован [150].

При определении мол. массы FcR экспериментаторы столкнулись с большими трудностями, связанными, во-первых, с гетерогенностью по размеру рецепторов из различных типов клеток [171] и, во-вторых, с повышенной чувствительностью изолированных FcR к протеолитическому расщеплению. Для выделения и очистки FcR был использован метод аффинной хроматографии на колонках с IgG, иммобилизованным на твердом носителе [150, 171]. Оказалось, что молекулярные массы рецепторов варьируют от 20 000 до 255 000 Да в зависимости от типа клеток. Столь широкий диапазон значений молекулярной массы можно объяснить чрезвычайно высокой чувствительностью FcR к протеолизу. Так, Буржуа и др. [172] сообщили, что в условиях, когда протеолитическое расщепление и химическое восстановление сведены к минимуму, FcR имеет кажущуюся мол. массу 120 000 Да, однако если протеолиз не подавлен, то в препаратах FcR обнаруживаются пептиды с мол. массой 75 000, 45 000, 20 000 и 10 000 Да, которые при отсутствии в системе восстанавливающих реагентов могут связывать иммунные комплексы. Авторы заключили, что фрагменты, образующиеся в результате протеолитического расщепления, остаются в течение какого-то времени ассоциированными между собой за счет дисульфидных связей. Несколько других групп исследователей также показали, что в условиях минимального протеолиза и отсутствия химического восстановления мол. масса FcR составляет 100—130 000 Да [173]. Эти наблюдения могут объяснить более низкие значения молекулярной массы, полученные в ряде работ. Так, Раск и др. [174] получили из грубой мембранной фракции лимфоцитов растворимые макромолекулы, которые были затем очищены с помощью аффинной хроматографии на сефарозе, конъюгированной с агрегированными IgG. Элюированный материал был подвергнут радиоактивному мечению и проанализирован методом ДСН-ПААГ-электрофореза. В препарате были обнаружены пептиды с мол. массой 65 000, 18 000 и 15 000 Да. Ни один из этих пептидов не изменял своих свойств в результате восстановления с последующим алкилированием; следовательно, каждый из них представлял собой, по-видимому, одну полипептидную цепь. Ряд данных свидетельствовал о том, что пептиды 18 000 и 15 000 Да представляют собой продукты расщепления пептида 65 000 Да. Недавно Fc-рецепторы были выделены из клеток многих типов (в том числе из клеток В-клеточных линий) с помощью моноклональных анти-FcR-антител [171]. Все FcR, полученные таким способом, оказались гликопротеинами с мол. массой около 46 000 Да. Сузуки и др. [175] выделяли FcR из лизатов клеток больных с хроническим лимфоцитарным лейкозом и охарактеризовали FcR для IgG как липопротейн, содержащий одну полипептидную цепь, имеющий мол. массу 30 000 Да и связанный специфически с фосфолипидами в молярном соотношении белок : фосфолипид, равном 1 : 1. До сих пор остается неясным, связаны ли различия в опубликованных значениях молекулярной массы FcR с существующей на самом деле гетерогенностью этих рецепторов или же они обусловлены использованием разных методов выделения FcR.

10.3.8. Функция

Было высказано несколько предположений, касающихся возможной функции FcR, локализованных на поверхности В-лимфоцитов. Наиболее широко распространенная точка зрения отводит этим рецепторам существенное место в регуляции иммунного ответа. Действительно, известно, что антитела могут ингибировать или, наоборот, усиливать образование антител [176]. При использовании антител различных классов [176] и подклассов [177] наблюдаются разные эффекты, которые зависят от интактного Fc-участка молекулы IgG [178]. Имеются сообщения о FcR-зависимом подавлении образования антител по типу обратной связи, осуществляемому с помощью специфических антител [179]; правда, неизвестно, какие клетки участвуют в этом процессе.

Было детально изучено влияние агрегированных Ig и иммунных комплексов на поликлональную активацию В-клеток. Оказалось, что комплексы антиген — антитело (Ag-Ab) увеличивают синтез ДНК в лимфоцитах человека [180]. В противоположность этому было показано, что крупные агрегаты Ig ингибируют индуцированный митогеном синтез ДНК в мышечных В-клетках [181]; в случае же растворимых комплексов этот эффект не наблюдается. Морган и Вейль [182] обнаружили митогенное действие одного из фрагментов Fc-участка Ig на В-клетки. Вначале они предположили, что Fc-фрагмент стимулирует В-клетки прямо, возможно, через посредство FcR. Однако впоследствии те же самые авторы сообщили, что активация В-клеток с помощью Fc-фрагментов вызывается их процессингом, осуществляемым макрофагами [183], и активацией макрофагов [184].

Изучение влияния анти-Ig-антител на митогенез показало, что анти-Ig, но не F(ab')₂-анти-Ig способны блокировать ЛПС-индуцированный митогенез [185]. На основе этих данных было высказано предположение, что, когда анти-Ig-антитела могут связываться с В-клетками одновременно как за счет sIg, так и за счет FcR [185], наблюдается Fc-зависимое ингибирование.

Действие анти-Ig антител самих по себе на пролиферацию В-клеток было исследовано с помощью более прямого подхода, позволившего сделать четкие выводы: анти-Ig-антитела, способные связываться с FcR, подавляют пролиферацию [185], а анти-Ig-антитела, не связывающиеся с FcR, могут стимулировать пролиферацию. Следовательно, F(ab')₂-анти-Ig обладают митогенной активностью. Вообще говоря, анти-Ig могут выполнять роль стимуляторов при том условии, что предотвращается поступление FcR-зависимого доминантного ингибиторного сигнала (например, путем блокирования Fc-связывания). Кроме того, негативный сигнал наиболее эффективно передается В-клетке, если sIg и FcR перекрестно сшиваются с помощью одного и того же лиганда [186].

До сих пор непонятен биологический смысл наличия в препарате FcR, полученном Сузуки и др. [175], активности фосфолипазы A₂. Авторы предположили, что функциональная роль Fc-рецепторов В-клеток человека заключается в активации фосфолипазы A₂ в плазматической мембране [174]. Однако точное определение функций FcR В-лимфоцитов требует, очевидно, более детальных исследований.

10.4. Рецепторы для комплемента

10.4.1. Определение и экспрессия

О рецепторах для комплемента на поверхности лимфоидных клеток впервые заговорили в середине 60-х годов благодаря опытам Ура и Филлипса [187], которые обнаружили, что комплексы антиген — антитело — комплемент

(Ag — Ab — C) связываются с частью лимфоцитов морской свинки, причем количество связанных комплексов значительно уменьшается, если из их состава исключить комплемент. Впоследствии Лей и Нуссенцвайг [188] показали, что эритроциты, сенсибилизированные антителами и комплементом (ЕАС'), могут присоединяться к мышинным моноцитам, макрофагам, полиморфно-ядерным нейтрофилам (ПМН) и к 10—25 % лимфоцитов лимфатических узлов. Используя технику розеткообразования, авторы продемонстрировали различия между CR на поверхности клеток нелимфоцитарного и лимфоцитарного рядов, — оказалось, что только в первом случае формирование розеток зависит от присутствия бивалентных катионов и может быть снято с помощью ЭДТА.

Рецепторы для комплемента были идентифицированы на поверхности лимфоидных клеток людей, морских свинок, кроликов и мышей [189, 190]. Из всех лимфоидных клеток только В-клетки имеют CR, поскольку во всех случаях CR обнаруживаются на клетках, которые несут также и иммуноглобулины. Однако не все В-клетки представляют собой CR⁺ [188]. CR⁺-клетки распределяются в организме следующим образом: они составляют 10—25 % клеток лимфатических узлов, 30—40 % клеток селезенки, 10—20 % клеток грудных протоков, 5—8 % клеток костного мозга и совершенно не встречаются в тимусе [189]. Результаты, полученные при изучении содержания CR⁺В-клеток в лимфоидных органах, варьируют в зависимости от метода, используемого для выявления этих клеток, причем различия определяются, вероятно, плотностью рецепторов на поверхности мембран. Так, метод ЕАС' позволяет, по-видимому, идентифицировать В-клетки с самой высокой плотностью CR, тогда как связывание СЗb, меченого флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ), дает возможность выявить клетки с более низкой плотностью рецепторов [191].

Существуют CR двух типов, CR1 и CR2. Они отличаются друг от друга по структуре и локализованы на разных мембранных молекулах [192, 193]. CR1 связывают СЗb, С4 и С5 и обнаруживаются на поверхности как лимфоидных клеток, так и эритроцитов. У мышей CR1 специфически узнают не-С3d-участок СЗb, в то время как CR2 связывает и С3d-, и С3c-участки СЗb [193]; CR2 имеются только на В-клетках [194]. Недавно было показано, что В-лимфоциты человека могут связывать С1q [195].

Количество CR на одну В-клетку составляет в среднем 21 000—50 000 [196], константа связывания СЗb или С3 с лимфобластоидными В-клетками человека равна 10^6 M^{-1} [196]. Ингибиторы протеиназ влияют на связывание С3, но не СЗb. Это означает, что мембранно-связанные протеиназы могут участвовать в экспонировании того участка нативной молекулы С3, который взаимодействует с CR. Рецепторы для СЗb и С3 кодируются генами, связанными с генами HLA-A и HLA-B [197].

10.4.2. Онтогенез и изменения при дифференцировке В-клеток

Рецепторы для комплемента появляются на поверхности мышинных В-клеток приблизительно через 2 недели после рождения, и через несколько недель их количество достигает постоянного уровня [198]. У мышей разных линий скорость появления CR различна, и, по-видимому, связана с комплексом H-2 [199]. При адоптивном переносе CR⁻-клеток костного мозга облученным мышам CR⁺-клетки обнаруживаются в селезенке через 20—25 дней [200]. И в этом случае скорость появления CR⁺-клеток зависит от линии используемых мышей. Кроме того, CR⁻В-клетки памяти служат предшественниками CR⁺-клеток, хотя секреция IgG-антител в ответ на вторичную стимуляцию может осуще-

ствляться как CR⁺, так и CR⁻-В-лимфоцитами [201]. Когда на конечном этапе дифференцировки В-лимфоциты превращаются в антителопродуцирующие плазматические клетки, они утрачивают свои CR [189]. Взятые вместе, эти, а также некоторые другие данные [202] позволяют предположить, что генеалогический ряд В-лимфоцитов начинается с наименее зрелых Ig⁺CR⁻-клеток и CR экспрессируются координированно с другими маркерами, свойственными иммунокомпетентным В-клеткам, таким, как IgD [203] и LymB [144]. Поскольку некоторые клетки иммунологической памяти и все плазматические клетки утрачивают CR, дальнейшая дифференцировка В-клеток характеризуется изменением фенотипа в обратном направлении от CR⁺ к CR⁻.

10.4.3. Рецепторы для комплемента как мембранные белки

Эксперименты с использованием лимфоцитов периферической крови и лимфобластоидных клеток человека показали, что время полужизни рецепторов для C3 составляет 3—4 ч и что в некоторых случаях (но не всегда) процессы, связанные с обменом этих рецепторов, чувствительны к циклогексимиду [204]. При культивировании лимфобластоидных клеток в культуральной среде обнаруживается CR⁺-материал, что говорит о возможном сбрасывании рецепторов с плазматической мембраны [204]. Подобно многим другим мембранным белкам, CR при 37 °C могут подвергаться кэппингу и модуляции, причем кэппинг сопровождается энергозависимыми процессами с участием внутриклеточных сократительных систем [205].

Чтобы выяснить, взаимодействуют ли между собой CR и другие маркеры В-лимфоцитов, было проведено изучение кокэппинга. Ситна и др. [206] показали, что понижение плотности IgD, локализованных на поверхности В-лимфоцитов, приводит к уменьшению числа клеток, экспрессирующих CR1 и CR2 на 40 и 13 % соответственно. В противоположность этому при понижении плотности sIgM количество CR1⁺- и CR2⁺-клеток не уменьшается. Эти результаты позволяют предположить, что, по-видимому, IgD и CR1 каким-то образом связаны друг с другом в плазматической мембране. Ширмахер и Фестенштейн [207] сообщили об обнаруженной ими ассоциации рецепторов для C3 с Ia-H-2-антигенами на лимфоидных клетках у мышей и HLA 4A/4B (W4/W6) — у человека. Как было продемонстрировано ранее [127], существует также связь между CR и рецепторами для ВЭБ, расположенными на поверхности лимфоидных клеток человека. Взаимодействие CR с МНС-антигенами, рецепторами для вируса и иммуноглобулиновыми рецепторами может иметь важное значение при активации В-клеток и (или) возникновении толерантности.

10.4.4. Биохимия

До недавнего времени мы располагали очень скудными сведениями о биохимических свойствах CR — было известно лишь, что рецепторы чувствительны к трипсину [189]. Ло и Левин [208] выделили из плазматической мембраны В-лимфоцитов комплекс, обладавший способностью связывать C3b. Этот комплекс оказался устойчивым к ряду детергентов и веществ, денатурирующих белки, к воздействию высоких температур, к солям, изменениям pH, но диссоциировал в присутствии гидроксиламина или додецилсульфата натрия. Дирих и др. [209] выделили из сыворотки крови человека гликопротеин, который ингибировал связывание EAC' с человеческими В-клетками (α_1 -антитрипсин). Это свойство утрачивалось после обработки препарата α_1 -антитрипсина иодной кислотой, но сохранялось при нагревании, что указывало на углеводную природу связы-

вающей активности. Действительно, углевод, выделенный из α_1 -антитрипсина, блокировал связывание ЕАС'. Было показано, что ФИТЦ-F (ab')₂-фрагменты антител против α_1 -антитрипсина окрашивают клетки Raji, а сами антитела ингибируют активность рецептора для СЗ.

Применение аффинной хроматографии для очистки CR из смеси компонентов плазматической мембраны помогло получить новую информацию о структуре рецепторов. С помощью аффинной хроматографии на сефарозе-СЗ Фиэрон [210] выделил из эритроцитов человека гликопротеин с мол. массой 205 000 Да (gr 205). Оказалось, что gr 205 ускоряет расщепление α -полипептида СЗd под действием СЗb-инактиватора. Кроличья анти-gr 205-сыворотка ингибирует функцию рецептора для СЗb, локализованного на поверхности эритроцитов, ПМН, В-клеток и моноцитов. Кроме того, эта антисыворотка осаждает мембранный белок с мол. массой 205 000 Да из гомогенатов клеток всех четырех типов. Аналогичные результаты получили Добсон и др. [211], выделившие рецепторы CR1 типа с мол. массой 195 000 Да. Иммунофлуоресцентный анализ выявил наличие таких рецепторов у Ig⁺-В-клеток, моноцитов и нейтрофилов и отсутствие их у эритроцитов.

В противоположность CR1-рецепторам CR2-рецепторы, выделенные из среды, в которой культивировались клетки Raji, представляли собой одну полипептидную цепь с многочисленными внутриклеточными S—S-связями и мол. массой 72 000. Этот материал связывался SRBC, покрытыми СЗd, но не СЗb. Кроме того, антитела к CR2 угнетали образование розеток ЕАС' с СЗd, но не с СЗb. С помощью антител были выявлены CR2 на В-клетках, но не на Т-клетках, моноцитах или нейтрофилах [212].

10.4.5. Функции

Хотя в настоящее время не вызывает сомнений, что часть зрелых В-лимфоцитов имеет CR либо CR1-, либо CR2-типа [187] и что эти рецепторы представляют собой самостоятельные молекулы, которые связываются с разными участками различных компонентов системы комплемента и могут быть, по крайней мере частично, охарактеризованы биохимически [188], функции CR тем не менее остаются загадкой. Для решения этой проблемы за последнее десятилетие было разработано три основных экспериментальных подхода.

Первый подход заключается в сравнительном изучении функциональных активностей CR⁺- и CR⁻-популяций В-клеток, разделенных либо с помощью техники розеткообразования и седиментации, либо путем избирательного удаления CR⁺-клеток на колонках с СЗ-сефарозой. К сожалению, существующие методы получения индивидуальных популяций страдают целым рядом недостатков, связанных с неполным отделением друг от друга CR⁺- и CR⁻-клеток, а также с обеднением и (или) обогащением популяций Т-клетками и макрофагами в процессе разделения. Этим и объясняется противоречивость имеющихся сообщений [213—215], касающихся определения иммунного потенциала CR⁻- и CR⁺-клеток. В лучшем случае с помощью данного подхода можно лишь получить непрямую информацию о том, нужны ли не нужны CR для активации В-клеток. Было показано, что и CR⁺, и CR⁻-клетки отвечают на митогены и антигены в различных экспериментальных системах, хотя, принимая во внимание все вышесказанное, к этим результатам следует относиться с некоторой осторожностью.

В основе второго подхода лежит установление взаимосвязи между компонентами системы комплемента и последующей способностью В-клеток пролиферировать, дифференцироваться или выделять лимфокины [216—218]. Во мно-

гих случаях исследования такого рода проводились с недостаточно хорошо очищенными В-клетками, в связи с чем полученные результаты не могут быть интерпретированы однозначно. Помимо этого, нельзя исключить возможности загрязнения некоторых препаратов системы комплемента митогенами или другими растворимыми веществами, способными вызывать наблюдаемые эффекты.

Третий подход связан с обработкой животных веществами, разрушающими компоненты системы комплемента в условиях *in vivo*, например фактором пята кобры (СоF). После такой обработки животным инъектируют антигены и оценивают первичный и (или) вторичный иммунные ответы [219, 220]. При использовании этого метода необходимо иметь в виду, что СоF может содержать какие-либо примеси, оказывающие неспецифическое действие на другие компоненты иммунной системы, и активировать комплемент. Тем не менее совокупность данных, полученных в результате применения трех описанных подходов, указывает на участие СR в концентрировании антигена на поверхности В-клеток, усилении клеточной кооперации, получении второго сигнала в процессе активации В-клеток и облегчения межклеточного взаимодействия.

Заключительное обсуждение

Несмотря на большие успехи, сделанные за прошедшие десять лет в изучении биохимических и биологических свойств многих рецепторов на поверхности В-клеток, мы до сих пор не способны еще соединить вместе все фрагменты этой головоломки. В следующем десятилетии, несомненно, будет достигнут значительный прогресс в объединении имеющихся у нас знаний в более полную картину того, каким образом осуществляется управление ростом и дифференцировкой В-клеток, а также доставкой их в строго определенные места в организме. Кроме того, методы молекулярной генетики, бесспорно, должны помочь нам понять, как воспринимаются и проявляются на молекулярном уровне внешние «сигналы».

Благодарности

Мы выражаем благодарность мисс Ms. G.A. Cheek за терпеливую и высококвалифицированную техническую помощь, а также д-ру J.W. Uhr за многочисленные полезные советы и предложения по тексту.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Erhlich P.* On immunity with special reference to cell life, *Proc. R. Soc. Lond. [Biol.]*, 66, 448 (1900).
2. *Sell S., Gell P. G. H.* Studies on rabbit lymphocytes *in vitro*. I. Stimulation of blast transformation with anti-allotype serum, *J. Exp. Med.*, 122, 423—440 (1965).
3. *Sell S.* Development of restrictions in the expression of immunoglobulin specificities by lymphoid cells, *Transplant. Rev.*, 5, 22—44 (1970).
4. *Abbas A. K., Unanue E. R., Karnovsky M. J.* Current techniques for the detection of surface Ig on lymphocytes, *Tech. Biochem. Biophys. Morphol.*, 3, 139—176 (1976).
5. *Bozel J., van, Paul W. E., Terry W. D., Green I.* IgD-bearing human lymphocytes, *J. Immunol.*, 109, 648—651 (1972).
6. *Abney E. R., Cooper M. D., Kearney J. F., 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).
7. *Warner N. L., Byrt P., Ada G. L.* Blocking of the lymphocyte antigen receptor site with anti-immunoglobulin sera *in vitro*, *Nature*, 226, 942—943 (1970).
8. *Ada G. L., Byrt P.* Specific inactivation of antigen reactive cells with 125 I-labeled antigen, *Nature*, 222, 1291—1292 (1969).
9. *Golan D. T., Borel Y.* Deletion of hapten-binding cells by a highly radioactive 125 I conjugate, *J. Exp. Med.*, 136, 305—317 (1972).

10. Raff M. C., Feldman M., de Petris S. Monospecificity of bone marrow-derived lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 137, 1024—1029 (1973).
11. Vitetta E. S., Baur S., Uhr J. W. Cell surface Ig. II. Isolation and characterization of Ig from mouse splenic lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 134, 242—264 (1971).
12. Marchalonis J. J., Cone R. E., Atwell J. L. Isolation and partial characterization of lymphocyte surface immunoglobulins, *J. Exp. Med.*, 135, 956—971 (1972).
13. Vitetta E. S., Uhr J. W. Cell surface Ig. IX. A new method for the study of synthesis, intracellular transport and exteriorization in murine splenocytes, *J. Exp. Med.*, 139, 1599—1620 (1974).
14. Eidels L. IgD is present on the cell surface of murine lymphocytes in two forms: δ_2L_2 and δL , *J. Immunol.*, 123, 896—902 (1979).
15. Vitetta E. S., Uhr J. W. Synthesis, transport, dynamics, and fate of cell surface Ig and alloantigens in murine lymphocytes, *Transplant. Rev.*, 14, 50—75 (1973).
16. Melcher U., Uhr L. W. Cell surface Ig. XVI. Polypeptide chain structure of mouse IgM and IgD-like molecules, *J. Immunol.*, 116, 409—415 (1976).
17. Vassalli P., Tartakoff A., Pink J. K. L., Jaton J.-C. Biosynthesis of two forms of IgM heavy chains by normal mouse B lymphocytes, *J. Biol. Chem.*, 255, 11882—11826 (1980).
18. McCune J. M., Lingappa V. R., Fu S. M., Blobel G., Kunkel H. G. Biogenesis of membrane-bound and secreted immunoglobulins, *J. Exp. Med.*, 152, 463—468 (1980).
19. Kikutani H., Sitia R., Good R. A., Stauneger J. Synthesis and processing of the α heavy chains of secreted and membrane-bound IgA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 6436—6440 (1981).
20. Word C. J., Kuehl W. M. Expression of surface and secreted IgG2a by a murine B lymphoma before and after hybridization to myeloma cells, *Mol. Immunol.*, 18, 311—322 (1981).
21. Melcher U., Eidels L., Uhr J. W. Are Igs membrane proteins? *Nature*, 258, 434—435 (1976).
22. Goding J. W. Structural studies of murine lymphocyte surface IgD, *J. Immunol.*, 124, 2082—2088 (1980).
23. Alt F. W., Bothwell A. L. M., Knapp M., Siden E., Mather E., Koshland M., Baltimore D. Synthesis of secreted and membrane-bound immunoglobulin mu heavy chains is directed by mRNAs that differ at their 3' end, *Cell*, 20, 293—302 (1980).
24. Rogers J., Early P., Carter C., Calame K., Bond M., Hood L., Wall R. Two mRNAs with different 3' ends encode membrane-bound and secreted forms of immunoglobulin chain, *Cell*, 20, 303—312 (1980).
25. Early P., Rogers J., Davis M., Calame K., Bond M., Wall R., Hood L. Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin μ gene by alternative RNA processing pathways, *Cell*, 20, 313—319 (1980).
26. Cheng H.-J., Blattner F. R., Fitzmaurice L., Mushinski J. F., Tucker P. W. Structure of genes for membrane and secreted murine IgD heavy chains, *Nature*, 296, 410—415 (1982).
27. Rogers J., Choi E., Sonja L., Carter C., Word C., Kuehl M., Eisenberg D., Wall R. Gene segment encoding transmembrane carboxy termini of immunoglobulin γ chains, *Cell*, 26, 19—27 (1981).
28. Tyler B. M., Cowman A. F., Adams J. M., Harris A. W. Generation of long mRNA for membrane immunoglobulin γ_2a chains by differential splicing, *Nature*, 293, 406—408 (1981).
29. Nathanson S. G., Vekara H., Ewenstein B. M. Primary structural analysis of the transplantation antigens of the murine H-2 major histocompatibility complex, *Annu. Rev. Biochem.*, 50, 1025—1052 (1981).
30. Ploegh H. L., Orr H. T., Strominger J. Major histocompatibility antigens: Murine (H-2K, H-2D) class I molecules, *Cell*, 24, 257—299 (1981).
31. Furthmayr H., Galardy R. E., Tomita M., Marchesi V. T. The intramembranous segment of human erythrocyte glycophorin A, *Arch. Biochem. Biophys.*, 185, 21—29 (1978).
32. Hodges R. S., Sodek J., Smillie L. B., Jurasek L. Tropomyosin: Amino acid sequence and coiled-coil structure. In: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 72, 299—310 (1972).
33. Rabellino E., Colon S., Grey H. M., Unanue E. R. Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. I. Distribution and quantitation. *J. Exp. Med.*, 133, 156—167 (1971).
34. Unanue E. R., Karnovsky M. J. Redistribution and fate of Ig complexes on surface on B lymphocytes: Functional implications and mechanisms, *Transplant. Rev.*, 14, 184—210 (1973).
35. Scher I., Sharrow S. O., Wistar R., Asofsky R., Paul W. E. B lymphocyte heterogeneity: Ontogenetic development and organ distribution of B lymphocyte populations defined by their density of surface immunoglobulin, *J. Exp. Med.*, 144, 494—506 (1976).
36. Lynch R. G., Graff R. J., Sirisinha S., Simms E. S., Eisen H. N. Myeloma proteins as tumor-specific transplantation antigens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 1540—1545 (1972).

37. Fu S. M., Winchester R. J., Fegi T., Walger P. D., Kunkel H. G. Idiotypic specificity of surface Ig and the maturation of leukemic bone marrow-derived lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 4487—4492 (1974).
38. Vitetta E. S., Yuan D., Krolick K., Isakson P., Knapp M., Slavin S., Strober S. Characterization of a spontaneous murine B cell leukemia (BCL₁). III. Evidence for monoclonality using anti-idiotypic antibody, *J. Immunol.*, 122, 1649—1654 (1979).
39. Yuan D., Uhr J. W., Vitetta E. S. A peptide difference between the μ chains from cell-associated and secreted IgM of the BCL₁ tumor, *J. Immunol.*, 125, 40—46 (1980).
40. Salsano P., Froland S. S., Natvig J. B., Michaelson T. E. Same idiotype of B lymphocyte membrane IgD and IgM. Formal evidence for monoclonality of chronic lymphocytic leukemia cells, *Scand. J. Immunol.*, 3, 841—846 (1974).
41. Goding J. W., Layton J. E. Antigen-induced cocapping of IgM and IgD-like receptors on murine B cells, *J. Exp. Med.*, 144, 852—857 (1976).
42. Pernis B., Chiappino G., Kelus A. S., Gell P. G. H. Cellular localization of different allotypic determinants in rabbit lymphoid tissues, *J. Exp. Med.*, 122, 853—876 (1965).
43. Goding J. W., Warr G. W., Warner N. L. Genetic polymorphism of IgD-like cell surface Ig in the mouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 1305—1309 (1976).
44. Goding J. W. Allotypes of IgM and IgD receptors in the mouse: A probe for lymphocyte differentiation, *Contemp. Top. Immunobiol.*, 8, 203—243 (1978).
45. Kessler S. W., Woods V. L., Finkelman F. D., Scher I. Membrane orientation and location of multiple and distinct allotypic determinants of mouse lymphocyte IgD, *J. Immunol.*, 123, 2772—2778 (1979).
46. Warner N. L., Goding J. W., Gutman G. A., Warr G. W., Herzenberg L. A., Osborne B. A., van der Loo W., Black S. J., Loken M. R. Allotypes of mouse IgM immunoglobulin, *Nature*, 265, 447—449 (1977).
47. Vitetta E., Krolick K. A. Allelic exclusion of IgD allotypes on murine B cells, *J. Immunol.*, 124, 2988—2990 (1980).
48. Herzenberg L. A., Herzenberg L. A., Black S. J., Loken M. R., Okumura K., van der Loo W., Osborne B. A., Hewgill D., Goding J. W., Gutman G., Warner N. L. Surface markers and functional relationships of cells involved in murine B lymphocyte differentiation, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 41, 33—45 (1976).
49. Uhr J. W. Intracellular events underlying synthesis and secretion of immunoglobulin, *Cell Immunol.*, 1, 228—242 (1970).
50. Anderson J., Lafleur L., Melchers F. IgM in bone marrow derived lymphocytes, Synthesis surface deposition, turnover and carbohydrate composition in unstimulated mouse B cells, *Eur J. Immunol.*, 4, 170—180 (1974).
51. Rosenberg Y. J., Parish C. R., Ontogeny of the antibody-forming cell line in mice. IV. Appearance of cells bearing Fc receptors, complement receptors, and surface immunoglobulin, *J. Immunol.*, 118, 612—617 (1977).
52. Nossal G. J. V., Pike B. Studies on the differentiation of B lymphocytes in the mouse, *Immunology*, 25, 33—45 (1973).
53. Gathings W. E., Kubagawa H., Cooper M. D. A distinctive pattern of B cell immaturity in perinatal humans, *Immunol. Rev.*, 57, 107—126 (1981).
54. Osmond D. G., Saveriano N., Drinner M., Santer V., Rahal M. D., Owen J. J., Rinjbeck A-M. Lectin binding by bone marrow lymphocytes: Pre-B cells have a surface receptor for peanut agglutinin. In: *B Lymphocytes in the Immune Response*, ed. by N. Klinman, D. E. Mosier, I. Scher and E. S. Vitetta, pp. 103—110, Elsevier/North Holland, New York, 1981.
55. Kearney J. F., Cooper M. D., Llein J., Abney E. R., Parkhouse R. M. E., Lawton A. R. Ontogeny of Ia and IgD on IgM-bearing B lymphocytes in mice, *J. Exp. Med.*, 145, 297—301 (1977).
56. Layton J. E., Johnson G. R., Scott D. W., Nossal G. J. L. The anti-delta suppressed mouse, *Eur. J. Immunol.*, 8, 325—330 (1978).
57. 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).
58. Durkin H. G., Bazin H., Waksman B. H. Origin and fate of IgF-bearing lymphocytes. I. Peyer's patches as differentiation site of cells simultaneously bearing IgA and IgE, *J. Exp. Med.*, 154, 640—648 (1981).
59. Vossen J. M., Hijmans W. Membrane-associated immunoglobulin determinants on bone marrow and blood lymphocytes in the pediatric age group and on fetal tissues, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 254, 262—279 (1975).
60. Kishimoto T., Miyake T., Nishizawa Y., Watanabe T., Yamamura Y. Triggering mechanism of B lymphocytes. I. Effect of anti-immunoglobulin and enhancing soluble factor on differentiation and proliferation of B cells, *J. Immunol.*, 115, 1179—1184 (1975).

61. *Parker D. C.* Stimulation of mouse lymphocytes by insoluble anti-mouse immunoglobulin. *Nature*, 258, 361—363 (1975).
62. *Sieckmann D. G., Asofsky R., Mosier D., Zitron I., Paul W. E.* Activation of mouse lymphocytes by anti-immunoglobulin. I. Parameters of the proliferative response. *J. Exp. Med.*, 147, 814—829 (1978).
63. *Pure E., Vitetta E. S.* Induction of murine B cell proliferation by insolubilized anti-immunoglobulin. *J. Immunol.*, 125, 1240—1242 (1980).
64. *Sieckmann D. G., Scher I., Asofsky R., Mosier D. E., Paul W. E.* Activation of mouse lymphocytes by anti-immunoglobulin. II. A thymus-independent response by a mature subset of B lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 148, 1628—1643 (1978).
65. *Vitetta E. S., Pure E., Isakson P. C., Buck L., Uhr J. W.* The activation of murine B cells: The role of surface immunoglobulins. *Immunol. Rev.*, 52, 211—231 (1980).
66. *Fanger M. W., Hart D. A., Wells J. V., Nisonoff A.* Requirement for cross-linkage in the stimulation of transformation of rabbit lymphocytes by antiglobulin reagents. *J. Immunol.*, 105, 1484—1492 (1970).
67. *Sidman C. L., Unanue E. R.* Requirements for mitogenic stimulation of murine B cells by soluble anti-IgM antibodies. *J. Immunol.*, 122, 406—413 (1979).
68. *Schimpl A., Wecker E.* A third signal in B cell activation given by TRF. *Transplant. Rev.*, 23, 176—202 (1975).
69. *Parker D. C., Fothergill J. J., Wadsworth D. C.* B lymphocyte activation by insoluble anti-immunoglobulin: Induction of immunoglobulin secretion by a T cell-dependent soluble factor. *J. Immunol.*, 123, 931—941 (1979).
70. *Melchers F., Andersson J., Lernhardt W., Schreier M. H.* Functional studies on receptor complexes of B lymphocytes involved in regulation of growth and maturation. *Biochem. Soc. Symp.*, 45, 75—88 (1980).
71. *Pierce C. W., Solliday S. M., Asofsky R.* Immune responses in vitro. IV. Suppression of primary γ M, γ G and γ A PFC responses in mouse spleen cell cultures by class-specific antibody to mouse immunoglobulins. *J. Exp. Med.*, 135, 675—697 (1972).
72. *Ligler F. S., Cambier J. C., Vitetta E. S., Kettman J. R., Uhr J. W.* Inactivation of antigen-responsive clones with antisera specific for IgM or IgD. *J. Immunol.*, 120, 1139—1142 (1978).
73. *Zitron I. M., Mosier D. E., Paul W. E.* The role of surface IgD in the response to thymic-independent antigens. *J. Exp. Med.*, 146, 1707—1718 (1977).
74. *Cooper M. D., Kearney J. F., Gathings W. E., Lawton A. R.* Effects of anti-Ig antibodies on the development and differentiation of B cells. *Immunol. Rev.*, 52, 29—53 (1980).
75. *Finkelman F. D., Woods V. L., Wilburn S. B., Mond J. J., Stein K. E., Berning A., Scher I.* Augmentation of in vitro humoral immune responses in the mouse by an antibody to IgD. *J. Exp. Med.*, 152, 493—506 (1980).
76. *Dresser D. W., Parkhouse R. M. E.* The effect of the parenteral administration of a rabbit anti-(mouse)-IgD serum on the immune response of mice to sheep erythrocytes. *Immunology*, 35, 1027—1036 (1978).
77. *Bazin H., Platteau B., Beckers A., Pauwels R.* Differential effect of neonatal injections of anti- μ or anti- δ antibodies on the synthesis of IgM, IgD, IgE, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG2c immunoglobulin classes. *J. Immunol.*, 121, 2083—2087 (1978).
78. *Mond J. J., Seghal E., Kung J., Finkelman F. D.* Increased expression of I-region-associated antigen (Ia) on B cells after cross-linking of surface immunoglobulin. *J. Immunol.*, 127, 881—888 (1981).
79. *Jacobson E. B., Baine Y., Chen Y. W., Flotte I., O'Neil M. J., Pernis B., Siskind G. W., Thorbecke G. J., Tonda P.* Physiology of IgD I. Compensatory phenomena in B lymphocyte activation in mice treated with anti-IgD antibodies. *J. Exp. Med.*, 154, 318—332 (1981).
80. *Howard M. C., Fidler J. M., Baker J., Shortman K.* Antigen-initiated B lymphocyte differentiation. XIII. Different B cell subsets give different AFC-production kinetics and respond in different functional assays. *J. Immunol.*, 122, 309—319 (1979).
81. *Brandon D. L., Edwards A. J., Parkhouse R. M. E.* The response to lipopolysaccharide of mouse spleen lymphocytes fractionated on the basis of surface immunoglobulin and complement receptor using fluorescence-activated cell sorting and rosetting techniques. *Immunology*, 36, 865—873 (1979).
82. *Layton J. E., Baker J., Bartlett P. F., Shortman K.* Antigen-initiated B lymphocyte differentiation. XVII. Pre-progenitor B cells that give primary adoptive responses are sIgM⁺sIgM⁺IgD-Ia⁺. *J. Immunol.*, 126, 1227—1233 (1981).
83. *Buck L. B., Yuan D., Vitetta E. S.* A dichotomy between the expression of IgD on B cells and its requirement for triggering such cells with two T-independent antigens. *J. Exp. Med.*, 149, 987—992 (1979).
84. *Shortman K., Layton J. E., Baker J.* Cell surface markers and surface immunoglobulin status of a class of intermediate (pre-progenitor) B cell. In: *B Lymphocytes in the Immune*

- Response, ed. by N. Klinman, D. E. Mosier, I. Scher, and E. S. Vitetta, pp. 121—128, Elsevier/North Holland, New York, 1981.
85. Layton J. E., Pike B. L., Battye F. L., Nossal G. J. V. Cloning of B cells positive or negative for surface IgD. I. Triggering and tolerance in T-independent systems, *J. Immunol.*, 123, 702—708 (1979).
 86. Zan-Bar I., Vitetta E. S., Assissi F., Strober S. The relationship between surface immunoglobulin isotype and immune function of murine B lymphocytes. III. Expression of a single predominant isotype on primed and unprimed B cells, *J. Exp. Med.*, 147, 1374—1404 (1978).
 87. Layton J. E., Teale J. M., Nossal G. J. V. Cloning of B cells positive or negative for surface IgD. II. Triggering and tolerance in the T-dependent splenic focus assay, *J. Immunol.*, 123, 709—713 (1979).
 88. Kanowitz-Klein S., Vitetta E. S., Kern E. L., Ashman R. F. Antigen-induced changes in the proportion of antigen-binding cells expression IgM, IgG and IgD receptor, *J. Immunol.*, 122, 2349—2355 (1979).
 89. Black S. J., van der Loo W., Loken M. R., Herzenberg L. A. Expression of IgD by murine lymphocytes. Loss of surface IgD indicates maturation of memory B cells, *J. Exp. Med.*, 147, 984—996 (1978).
 90. Lafrenz D., Strober S., Vitetta E. S. The relationship between surface immunoglobulin isotype and the immune function of murine B lymphocytes. V. High affinity secondary antibody responses are transferred by both IgD-positive and IgD-negative memory B cells, *J. Immunol.*, 127, 867—872 (1981).
 91. Bourgois A., Litajima K., Hunger I. R., Askonas B. A. Surface immunoglobulins of lipopolysaccharide-stimulated cells. The behavior of IgM, IgD and IgG, *Eur. J. Immunol.*, 7, 151—153 (1977).
 92. Yuan D., Vitetta E. S., Kettman J. Cell surface immunoglobulin. XX. Antibody responsiveness of subpopulations of B lymphocytes bearing different isotypes, *J. Exp. Med.*, 145, 1421—1436 (1977).
 93. Coffman R. L., Cohn M. The class of surface immunoglobulin on virgin and memory B lymphocytes, *J. Immunol.*, 118, 1806—1815 (1977).
 94. Zan-Bar I., Strober S., Vitetta E. S. The relationship between surface immunoglobulin isotype and immune function of murine B lymphocytes. IV. Role of IgD-bearing cells in the propagation of immunologic memory, *J. Immunol.*, 123, 925—930 (1979).
 95. Black S. J., Tokuhisa T., Herzenberg L. A., Herzenberg L. A. Memory B cells at successive stages of differentiation: Expression of surface IgD and capacity for self renewal, *Eur. J. Immunol.*, 10, 846—851 (1980).
 96. Nossal G. J. V., Pike B. L. Evidence for the clonal abortion theory of B lymphocyte tolerance induction, *J. Exp. Med.*, 141, 904—917 (1975).
 97. Nossal G. J. V., Pike B. L., Battye F. L. Mechanisms of clonal abortion tolerogenesis. II. Clonal behavior of immature B cells following exposure to anti- μ chain antibody, *Immunology*, 37, 203—215 (1979).
 98. Vitetta E. S., Uhr J. W. Immunoglobulin-receptors revisited, *Science*, 189, 964—969 (1975).
 99. Vitetta E. S., Uhr J. W. Cell surface immunoglobulin. XIX. Susceptibility of IgD and IgM on murine splenocytes to cleavage by papain, *J. Immunol.*, 117, 1579—1637 (1976).
 100. Vitetta E. S., Cambier J. C., Ligler F. S., Kettman J. R., Uhr J. W. B cell tolerance. IV. Differential role of surface IgM and IgD in determining tolerance susceptibility of murine B cells, *J. Exp. Med.*, 146, 1804—1808 (1977).
 101. Moller G., Coutinho A., Gronowicz E., Hammarstrom L., Smith E. Role of mitogenic components of thymus-independent antigens. In *Mitogens in Immunology*, ed. by J. J. Oppenheim and D. L. Rosenstreich, pp. 291—311 (1976).
 102. Keightley R. G., Cooper M. D., Lawton A. R. The T cell dependence of B cell differentiation induced by pokeweed mitogen, *J. Immunol.*, 117, 1538—1544 (1976).
 103. Andersson J., Coutinho A., Lernhardt W., Melchers F. Clonal growth and maturation to immunoglobulin secretion in vitro of every growth-inducible B lymphocyte, *Cell*, 10, 27—34 (1977).
 104. Growowicz E., Coutinho A., Moller G. Differentiation of B cells: Sequential appearance of responsiveness to polyclonal activators, *Scand. J. Immunol.*, 3, 413—421 (1974).
 105. Anderson J., Coutinho A., Melchers F. Mitogen-activated B cell-blasts reactive to more than one mitogen, *J. Exp. Med.*, 149, 553—564 (1979).
 106. Wetzel G. D., Kettman J. R. Activation of murine B lymphocytes. III. Stimulation of B lymphocyte clonal growth with lipopolysaccharide and dextran sulfate, *J. Immunol.*, 126, 723—728 (1981).
 107. Morrison D. C., Ryan J. L. Bacterial endotoxins and host immune responses, *Adv. Immunol.*, 28, 293—450 (1980).

108. *Andersson J., Melchers F., Galanos C., Luderitz O.* The mitogenic effect of lipopolysaccharides on bone marrow-derived mouse lymphocytes. Lipid A as the mitogenic part of the molecule, *J. Exp. Med.*, 137, 943—953 (1973).
109. *Melchers F., Braun U., Galanos C.* The lipoprotein of the outer membrane of *Escherichia coli*: A B lymphocyte mitogen, *J. Exp. Med.*, 142, 473—482 (1975).
110. *Adler W. H., Osunkoya B. O., Takiguchi T., Smith R. T.* The interactions of mitogens with lymphoid cells and the effect of neuraminidase on the cells responsiveness to stimulation, *Cell. Immunol.*, 3, 590—605 (1972).
111. *Zimmerman D. H., Gregory S., Kern M.* Differentiation of lymphoid cells: The preferential binding of the lipid A moiety of lipopolysaccharide to B lymphocyte subpopulations, *J. Immunol.*, 119, 1018—1923 (1977).
112. *Kabir S., Rosenstreich D. L.* Binding of bacterial endotoxins to murine spleen lymphocytes, *Infect. Immunol.*, 15, 156—164 (1977).
113. *Benedetto D. A., Shands J. W., Shah D. O.* The interaction of bacterial lipopolysaccharide with phospholipid bilayers and monolayers, *Biochem. Biophys. Acta*, 298, 145—157 (1973).
114. *Diamantstein T., Blitstein-Willinger E.* Specific binding of poly(I)—poly(C) to the membrane of murine B lymphocyte subsets, *Eur. J. Immunol.*, 8, 896—899 (1978).
115. *Sulzer B. M., Nilsson B. S.* PPD-tuberculin-A B cell mitogen, *Nature New Biol.*, 240, 198—200 (1972).
116. *Watson J., Riblet R.* Genetic control responses to bacterial lipopolysaccharides in mice. I. Evidence for a single gene that influences mitogenic and immunogenic responses to lipopolysaccharides, *J. Exp. Med.*, 140, 1147—1161 (1974).
117. *Forni L., Coutinho A.* An antiserum which recognizes lipopolysaccharide-reactive B cells in the mouse, *Eur J. Immunol.*, 8, 56—62 (1978).
118. *Moroni C., Forni L., Hunsmann G., Schumann G.* Antibody directed against friend leukemia virus stimulates DNA synthesis in a subpopulation of mouse B lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 1486—1490 (1980).
119. *Coutinho A., Forni L., Blomberg B.* Shared antigenic determinants by mitogen receptors and antibody molecules to the same thymus-independent antigen, *J. Exp. Med.*, 148, 862—870 (1978).
120. *Epstein M. A., Achong B. G.*, eds. *The Epstein-Barr Virus*, Springer-Verlag, Berlin, 1979.
121. *Gerber P., Hoyer B. H.* Induction of cellular DNA synthesis in human leucocytes by Epstein-Barr virus, *Nature*, 231, 46—47 (1971).
122. *Rosen A., Gergely M., Jondal M., Klein G., Britton S.* Polyclonal Ig production after Epstein-Barr virus infection of human lymphocytes in vitro, *Nature*, 267, 52—54 (1977).
123. *Thorley-Lawson D. A., Chess L., Strominger J. L.* Suppression of in vitro Epstein-Barr virus infection. A new role for adult human T lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 146, 495—508 (1977).
124. *Pope J. H.* Transformation by the virus in vitro. In: *The Epstein — Barr Virus*, ed. by M. A. Epstein and B. G. Achong, pp. 205—223, Springer — Verlag, Berlin, 1979).
125. *Jondal M., Klein G.* Surface markers on human B and T lymphocytes. II. Presence of Epstein — Barr virus receptors on B lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 138, 1365—1378 (1973).
126. *Bird A. G., Britton S., Ernberg I., Nilsson K.* Characteristics of Epstein — Barr virus activation of human B Lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 154, 832—839 (1981).
127. *Jondal M., Klein G., Oldstone M. B. A., Bokishn V., Yefenof E.* Surface markers on human B and T lymphocytes. Association between complement and EBV receptors on human lymphoid cells, *Scand. J. Immunol.*, 5, 401—410 (1976).
128. *Einhorn L., Steinitz M., Yefenof E., Ernberg I., Bakacs T., Klein G.* Epstein — Barr virus (EBV) receptors, complement receptors and EBV infectivity of different lymphocyte fractions of human peripheral blood. II. Epstein — Barr virus studies, *Cell. Immunol.*, 35, 43—58 (1978).
129. *Dutton R. W., Falkoff R., Hirst J. A., Hoffmann M., Kappler J. W., Kettman 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—368 (1971).
130. *Smith K. A.* T-cell growth factor, *Immunol. Rev.*, 51, 337—357 (1980).
131. *Tada T., Okumura O.* The role of antigen-specific T cell factors in the immune response, *Adv. Immunol.*, 28, 1—87 (1979).
132. *Amerding D., Katz D. H.* Activation of T and B lymphocytes in vitro. II. Biological and biochemical properties of an allogenic effect factor (AEF) active in triggering specific B lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 140, 19—37 (1974).
133. *Isakson P. C., Pure E., Vitetta E. S., Krammer P.* T-cell-derived B cell differentiation factor(s) (BCDF): Effect on the isotype switch, *J. Exp. Med.*, 155, 734—748 (1982).
134. *Moller G.*, ed., *T cell stimulating growth factors*, *Immunol., Rev.*, Vol. 54 (1980).

135. Swain S. L., Dennert G., Warner J. F., Dutton R. W. Culture supernatants of a stimulated T cell line have helper activity that synergises with IL-2 in the response of B cells to antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 2517—2521 (1981).
136. Harwell L., Skidmore B., Marrack P., Kappler J. Concanavalin A-inducible interleukin-2-producing T cell hybridoma, *J. Exp. Med.*, 152, 893—904 (1980).
137. 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).
138. Howard M., Farrar J., Hilfiker M., Johnson B., Takatsu K., Paul W. Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2, *J. Exp. Med.*, 155, 914—923 (1982).
139. Takatsu K., Tanaka K., Tominaga A., Kumahara Y., Hamaoka T. Antigen-induced T cell-replacing factor (TRF). III. Establishment of T cell hybrid clone continuously producing TRF and functional analysis of released TRF, *J. Immunol.*, 125, 2646—2653 (1980).
140. Takatsu K., Sano Y., Tomita S., Hashimoto N., Hamaoka T. Antibody against T cell-replacing factor acceptor site(s) augments in vivo primary IgM responses to suboptimal doses of heterologous erythrocytes, *Nature*, 292, 360—362 (1981).
141. Muraguchi A., Kishimoto T., Miki Y., Kuritani 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).
142. Fu S. M., Chiorazzi N., Kunkel H. G. Differentiation capacity and other properties of the leukemic cells of chronic lymphocytic leukemia, *Immunol. Rev.*, 48, 23—44 (1980).
143. Pure E., Isakson P. C., Takatsu K., Hamaoka T., Swain S. L., Dutton R. W., Dennert G., Uhr J. W., Vitetta E. S. Induction of B cell differentiation by T cell factors. I. Stimulation of IgM secretion by products of a T cell hybridoma and a T cell line, *J. Immunol.*, 127, 1953—1958 (1981).
144. Huber B., Gershon R. K., Cantor H. Identification of a B-cell surface structure involved in antigen-dependent triggering: Absence of this structure on B cells from CBA/N mutant mice, *J. Exp. Med.*, 145, 10—20 (1977).
145. Eden A., Bianco C., Nussenzweig V. Mechanism of binding of soluble immune complexes to lymphocytes, *Cell. Immunol.*, 7, 459—473 (1973).
146. Dickler H. B. Studies of the human lymphocyte receptor for heataggregated or antigen-complexed immunoglobulin, *J. Exp. Med.*, 140, 508—522 (1974).
147. Dickler H. B. Lymphocyte receptors for immunoglobulin, *Adv. Immunol.*, 24, 167—214 (1976).
148. Cline M. J., Sprent J., Warner N. L., Harris A. W. Receptors for immunoglobulin on B lymphocytes and cells of a cultured plasma cell tumor, *J. Immunol.*, 108, 1126—1128 (1972).
149. Sjoberg O., Inganas M. Detection of Fc receptor-bearing lymphocytes using IgG coated latex particles. *Scand. J. Immunol.*, 9, 547—552 (1979).
150. Unkeless J. C. Characterization of monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptor, *J. Exp. Med.*, 150, 580—596 (1979).
151. Brown J. C., DeJesus D. G., Holborow E. J., Harris G. Lymphocyte-mediated transport of aggregated human γ -globulin into germinal center areas of normal mouse spleen, *Nature*, 228, 367—369 (1970).
152. Dickler H. B., Kunkel H. G. Interaction of aggregated γ -globulin with B lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 136, 191—196 (1972).
153. Bast B. J. E. G., Mantel-Slengerland R., Roholl P., Gmelig Meyling F. H. J., Ballieux R. E. Fc receptors on rabbit lymphocytes. Existence of receptors for IgG antibody complexed with antigen; conditions for its detection, *Eur. J. Immunol.*, 10, 192—197 (1980).
154. Basten A., Miller J. F. A. P., Sprent J., Pye J. A receptor for antibody on B lymphocytes. I. Method of detection and functional significance, *J. Exp. Med.*, 135, 610—626 (1972).
155. Paraskevas F., Lee S. T., Orr K. B., Israels G. A receptor for Fc on mouse B lymphocytes, *J. Immunol.*, 108, 1319—1327 (1972).
156. Basten A., Warner N. L., Mandel T. A receptor for antibody on B lymphocytes. II. Immunochemical and electron microscopy characteristics, *J. Exp. Med.*, 135, 627—642 (1972).
157. Elson C. J., Jenkinson E. J., Billington W. D. Fc receptor on mouse placenta and yolk sac cells, *Nature*, 255, 412—414 (1975).
158. Chan F. P. H., Osmond D. G. Maturation of bone marrow lymphocytes. III. Genesis of Fc receptor-bearing «Null» cells and B lymphocyte subsets defined by concomitant expression of surface IgM, Fc and complement receptors, *Cell. Immunol.*, 47, 366—377 (1979).
159. Unanue E. R., Abbas A. K. Relationship on the B cell surface of immunoglobulin, Fc receptors and histocompatibility antigens. In: *Membrane Receptors of Lymphocytes*, ed. by M. Seligmann, J. L. Preud'homme, and K. M. Kourilsky, pp. 281—285, American Elsevier, New York, 1975.

160. *Bast B. J. E. G., Manten-Slengerland R., Roholl P., van Graft M., Ballieux R. E.* Fc receptors on rabbit lymphocytes. Identification and organ distribution of rosette-forming cells; cocapping with surface immunoglobulins, *Eur. J. Immunol.*, 10, 198—202 (1980).
161. *Dickler H. B., Kubicek M. T.* Interactions between lymphocyte membrane molecules. I. Interaction between B lymphocyte surface IgM and Fc IgM receptor requires ligand occupancy of both receptors, *J. Exp. Med.*, 153, 1329—1343 (1981).
162. *Forni L., Pernis B.* Interactions between Fc receptors and membrane immunoglobulins on B lymphocytes. In: *Membrane Receptors of Lymphocytes*, ed. by M. Seligmann, J. L. Preud'homme, and F. M. Kourilsky, pp. 193—201, American Elsevier, New York, 1975.
163. *Dickler H. B., Kubicek M. T., Finkelman F. D.* Interactions between lymphocyte membrane molecules. II. Characterization of an interaction between B lymphocyte surface IgD and Fc IgG receptors which differs from the surface IgM-Fc receptor interaction, *J. Immunol.* (1982) (in press).
164. *Dickler H. B., Sachs D. H.* Evidence for identity or close association of the Fc receptor of B lymphocytes and alloantigens determined by the I_r region of the H-2 complex, *J. Exp. Med.*, 140, 779—796 (1974).
165. *Unanue E. R., Dorf M. E., David C. S., Benacerraf B.* The presence of I-region-associated antigens on B cells in molecules distinct from immunoglobulin and H-2K and H-2D, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 5014—5016 (1974).
166. *Lawrence D. A., Weigle W. O., Spiegelberg H. L.* Immunoglobulins cytophilic for human lymphocytes, monocytes and neutrophils, *J. Clin. Invest.*, 55, 368—376 (1975).
167. *Ramasamy R., Secher D. S., Adetugbo K.* CH3 domain of IgG as binding site for Fc receptor on mouse lymphocytes, *Nature*, 253, 656—658 (1975).
168. *Baker C. R., Burns G. F., Cawley J. C., Hayhoe F. G. J.* IgM receptors on the surface of hairy cells of leukaemic reticuloendotheliosis, *Lancet*, 1, 303 (1976).
169. *Pichler W. J., Broder S.* Fc-IgM and Fc-IgG receptors on human circulating B lymphocytes, *J. Immunol.*, 121, 887—890 (1978).
170. *Basten A., Miller J. F. A. P., Abraham R., Gamble J., Chia E.* A receptor for antibody on B lymphocytes. III. Relationship of the receptor to immunoglobulin and Ia determinants, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 50, 309—321 (1976).
171. *Mellman I. S., Unkeless J. C.* Purification of a functional mouse Fc receptor through the use of a monoclonal antibody, *J. Exp. Med.*, 152, 1048—1069 (1980).
172. *Bourgeois A., Abney E. R., Parkhouse R. M. E.* Structure of mouse Fc receptor, *Eur. J. Immunol.*, 7, 691—695 (1977).
173. *Frade R., Kourilsky F. M.* Preliminary characterization of a glycoprotein having Fc receptor properties extracted from a T cell lymphoma (L-5178-Y), *Eur. J. Immunol.*, 7, 663—666 (1977).
174. *Rask L., Klareskog L., Ostberg L., Peterson P. A.* Isolation and properties of a murine spleen cell Fc receptor, *Nature*, 257, 231—233 (1975).
175. *Suzuki T., Taki T., Hachimire K., Sadasivan R.* Biochemical properties of biologically active Fc γ receptors of human B lymphocytes, *Mol. Immunol.*, 18, 55—65 (1981).
176. *Uhr J. W., Moller G.* Regulatory effect of antibody on the immune response, *Adv. Immunol.*, 8, 81—84 (1968).
177. *Murgita R. A., Vas S. I.* Specific antibody-mediated effect on the immune response. Suppression and augmentation of the primary immune response in mice by different classes of antibodies, *Immunology*, 22, 19—331 (1972).
178. *Sinclair N. R. St. C.* Regulation of the immune response. I. Regulation in ability of specific antibody to inhibit long-lasting IgG immunological priming after removal of the Fc fragment, *J. Exp. Med.*, 129, 1183—1201 (1969).
179. *Lee R. K., Sinclair N. R. St. C.* Regulation of the immune response. VII. In vitro immunosuppression by F(ab')₂ or intact IgG antibodies, *Immunology*, 24, 735—750 (1973).
180. *Moller G.* Induction of DNA synthesis in normal human lymphocyte cultures by antigen-antibody complexes, *Clin. Exp. Immunol.*, 4, 65—82 (1969).
181. *Ryan J. L., Arbeit R. D., Dickler H. B., Henkart P. A.* Inhibition of lymphocyte mitogenesis by immobilized antigen-antibody complexes, *J. Exp. Med.*, 142, 814—826 (1975).
182. *Morgan E. L., Weigle W. O.* Regulation of Fc fragment-induced murine spleen cell proliferation, *J. Exp. Med.*, 151, 1—16 (1980).
183. *Morgan E. L., Weigle W. O.* The requirement for adherent cells in the Fc fragment-induced proliferative response of murine spleen cells, *J. Exp. Med.*, 150, 256—270 (1979).
184. *Morgan E. L., Thoman M. L., Walker S. M., Weigle W. O.* Regulation of the immune response. II. Characterization of the cell population(s) involved in the Fc fragment-induced adjuvant effect, *J. Immunol.*, 125, 1275—1279 (1980).
185. *Stidman C. L., Unanue E. R.* Control of B lymphocyte function. I. Inactivation of mitogenesis by interactions with surface immunoglobulin and Fc receptor molecules, *J. Exp. Med.*, 144, 882—896 (1976).

186. *Tony H. P., Schimpl A.* Stimulation of murine B cells with anti-Ig antibodies: Dominance of a negative signal mediated by the Fc receptor, *Eur. J. Immunol.*, 10, 726—729 (1980).
187. *Uhr J. W., Phillips J. M.* In vitro sensitization of phagocytes and lymphocytes by antigen-antibody complexes, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 129, 793—798 (1966).
188. *Lay W. H., Nussenzweig V.* Receptors for complement on leukocytes, *J. Exp. Med.*, 128, 991—1007 (1968).
189. *Bianco C., Patrick R., Nussenzweig V.* A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody complement complexes. I. Separation and characterization, *J. Exp. Med.*, 132, 702—720 (1970).
190. *Michlmayr G., Huber H.* Receptor sites for complement on certain human peripheral blood lymphocytes, *J. Immunol.*, 105, 670—676 (1970).
191. *Sleese R. B., Gadek J. D., Frank M. M., Scher I.* Distribution of complement receptors on human normal and malignant mononuclear cells, *Blood*, 56, 792—797 (1980).
192. *Ross G. D., Polley M. J., Rabellino E. M., Grey H. M.* Two different complement receptors on human lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 138, 798—811 (1973).
193. *Ross G. D., Polley M. J.* Specificity of human lymphocyte complement receptors, *J. Exp. Med.*, 141, 1163—1180 (1975).
194. *Ross G. D.* Identification of human lymphocyte subpopulations by surface marker analysis, *Blood*, 53, 799—811 (1979).
195. *Tenner A. J., Cooper N. R.* Identification of types of cells in human peripheral blood that bind C1, *J. Immunol.*, 126, 1174—1179 (1981).
196. *Frade R., Strominger J.* Binding of soluble ¹²⁵I-human C3b, the third component of complement, to specific receptors in human cultured B lymphoblastoid cells: Characterization of low affinity interaction, *J. Immunol.*, 125, 1132—1339 (1980).
197. *Curry R. A., Dierich M. P., Pellegrino M. A., Hoch J. A.* Evidence for linkage between HLA antigens and receptors for complement complements C3b and C3d in human-mouse hybrids, *Immunogenetics*, 3, 465—471 (1976).
198. *Gelfand M. C., Elfenbein G. J., Frank M. M., Paul W. E.* Ontogeny of B lymphocytes. II. Relative rates of appearance of lymphocytes bearing surface immunoglobulin and complement receptors, *J. Exp. Med.*, 139, 1125—1141 (1974).
199. *Gelfand M. C., Sachs D. H., Lieberman F., Paul W. E.* Ontogeny of B lymphocytes. III. H-2 linkage of a gene controlling the rate of appearance of CR lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 139, 1142—1153 (1974).
200. *Baum L. L., Miller H. C.* Development of C3 receptors on B lymphocytes derived from normal and memory marrow cells, *Cell. Immunol.*, 35, 124—133 (1978).
201. *Mason D. W.* The requirement of C3 receptors on the precursors of 19S and 7S antibody-forming cells, *J. Exp. Med.*, 143, 1111—1121 (1976).
202. *Yang W. C., Osmond D. G.* Maturation of bone marrow lymphocytes. I. Quantitative rosetting methods of detecting Fc and CR in sIg, *J. Immunol. Meth.*, 25, 211—225 (1979).
203. *Vitetta E. S., Uhr J. W.* IgD and B cell differentiation, *Immunol. Rev.*, 37, 50—88 (1977).
204. *Rosso U. E. W., di San Secendo L., Meroni P. L., Fortes C., Tedesco F.* Study of the turnover of the receptor for the third component of complement on human lymphoid cells, *J. Immunol.*, 122, 1658—1662 (1981).
205. *Gormus B. J., Basara M. L., Arneson M. A., Kaplan M. E.* Capping of mouse spleen lymphocyte C3 receptors. Effects of pharmacologic agents, *J. Immunol.*, 124, 2747—2753 (1980).
206. *Sitia R., Rabellino E., Sockell M., Hammerling U.* A spacial association between membrane IgD and the receptor for C3b (CR₁) at the cell surface of murine B lymphocytes, *J. Immunol.*, 126, 107—112 (1981).
207. *Schirrmacher V., Festenstein H.* Interaction of Fc and C3 receptors of lymphoid cells with antibodies against products of the MHC, *Transplant. Rev.*, 30, 140—173 (1976).
208. *Law S. K., Levtne R. P.* Interaction between the third complement component protein and cell surface macromolecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 2701—2705 (1977).
209. *Dierich B., Landen R., Schmitt M.* Complement receptor analogous factors in human serum. I. Isolation of a molecule inhibitory for complement dependent rosette formation, its identification as α_1 -anti-trypsin and its functional characterization, *Immunobiology*, 156, 153—167 (1979).
210. *Fearon D. T.* Regulation of the amplification C3 convertase of human complement by an inhibitory protein isolated from human erythrocyte membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 5867—5871 (1979).
211. *Dobson N. J., Lambiris J. D., Ross G. D.* Characteristics of isolated erythrocyte complement receptor type one (CR, C4b—C3b receptor) and CR-specific antibodies, *J. Immunol.*, 126, 693—698 (1981).
212. *Lambiris J. D., Dobson N. J., Ross G. D.* Isolation of lymphocyte membrane complement

- receptor type 2 (the C3d receptor) and preparation of receptor-specific antibody. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78, 1828—1832 (1981).
213. Hammerling U., Chua R., Hoffmann M. K. Polyclonal activation of CR⁺ and CR⁻B lymphocytes: The kinetics of initiation of DNA and immunoglobulin synthesis by lipopolysaccharide. J. Immunol., 120, 750—753 (1978).
214. Dukor P., Dietrich F. M., Gisler R. H., Schumann G., Bitter-Suermann D. Possible targets of complement action in B cell triggering, Prog. Immunol., 3, 99—109 (1974).
215. Nariuchi H., Kakiuchi T. Antibody response of murine spleen cells with or without receptors for C3 to antigenic or mitogenic stimulation, Cell. Immunol., 54, 264—273 (1980).
216. Wahl S. M., Iverson G. M., Oppenheim J. J. Induction of quinea pig B-cell lymphokine synthesis by mitogenic and nonmitogenic signals to Fc, Ig, and C3 receptors, J. Exp. Med., 140, 1631—1645 (1974).
217. Mackler B. F., Altman L. C., Rosenstreich D. L., Oppenheim J. J. Induction of lymphokine production by EAC and of blastogenesis by soluble mitogens during human B cell activation, Nature, 249, 834—837 (1974).
218. Koopman W. J., Sandberg A. L., Wahl S. M., Mergenhagen S. E. Interaction of soluble C3 fragments with quinea pig lymphocytes; comparison of effects of C3a, C3b, C3c and C3d in lymphokine production and lymphocyte proliferation, J. Immunol., 117, 331—336 (1976).
219. Gotze O., Muller-Eberhard H. J., The C3- activator system: An alternate pathway of complement activation, J. Exp. Med., 134, 90—108 (1971).
220. Matsuda T., Martinelli G., Osler A. Studies on immunosuppression by CoF. II. On responses to DNP-Ficoll and DNP-Polyacrylamide, J. Immunol., 121, 2048—2051 (1978).
221. Sidman C. L., Unanue E. R. Development of B lymphocytes. I. Cell populations and a critical event during ontogeny, J. Immunol., 114, 1730—1735 (1975).

Рецепторы Т-лимфоцитов

Чарлз А. Джейнуэй, Роберт Е. Коун, Фрэнсиз Л. Оуэн

(Charles A. Janeway, Robert E. Cone, Frances L. Owen)

Первый вопрос, неизбежно возникающий при изучении экспрессируемых Т-лимфоцитами рецепторов для антигена, заключается в следующем: а существуют ли эти рецепторы на самом деле как физические структуры? Иммунологи уже давно считают, что наличие специфической иммунологической памяти у Т-лимфоцитов свидетельствует о способности Т-клеток экспрессировать специфические клеточные поверхностные рецепторы антигена. И действительно, многое из того, что нам теперь известно о функциональной специфичности Т-клеток, было получено в результате исследований, посвященных именно этому вопросу. Однако идентифицировать молекулы, выполняющие данную специфическую по отношению к антигену функцию, до сих пор не удалось. В основе имеющейся у нас информации о Т-клеточных рецепторах лежат данные, полученные в опытах, имеющих весьма косвенное отношение к специфичности ответа Т-лимфоцитов, а не при прямом выделении рецепторов или антигенсвязывающих молекул, находящихся в поверхности этих клеток. Более того, по крайней мере некоторые из выделенных молекул отличаются по своим антигенсвязывающим свойствам от клеток, в которых эти молекулы синтезируются. В результате в настоящее время вопрос о молекулярной и генетической характеристике рецепторов Т-лимфоцитов остается открытым из-за отсутствия необходимой информации об общей структуре и локализации молекул, участвующих в связывании с антигеном¹.

Вторая проблема, связанная с первой, — это необходимость доказать, что данная выделенная молекула действительно является рецептором. В основе используемых сейчас химических способов изучения мембранных молекул Т-клеток лежит их выделение с помощью антител, влияющих на функции, специфические по отношению к антигену. Однако гораздо труднее оказалось продемонстрировать, что молекулы, выделенные таким образом, на самом деле выполняют в клетке функцию рецепторов. Результаты, получаемые при работе с выделенными из Т-клеток антигенсвязывающими молекулами, часто лишь запутывают вопрос, поскольку остается неясным, из какой же именно клетки или клеток выделены рассматриваемые молекулы².

Это подводит нас к третьей проблеме, связанной с очень большой гетерогенностью Т-лимфоцитов. Хотя с функциональной гетерогенностью Т-клеток в течение последних 10 лет сталкиваются в каждой лаборатории, исследующей данную проблему, тем не менее все еще часто говорят о Т-клеточном рецепторе

¹ За последние годы строение предполагаемых антигенных рецепторов Т-лимфоцитов было в главных чертах выяснено (см. стр. 402). — *Прим. ред.*

² Твердо установлено, что молекулы рецепторов к определенному антигену могут быть выделены только из клеток того клона Т-лимфоцитов, который высокоспецифичен к тому же антигену. — *Прим. ред.*

вообще, подразумевая однородность Т-клеток. Можно утверждать, что антигенсвязывающие рецепторы различных классов Т-лимфоцитов строятся из либо определенной популяции Т-клеток, либо необходимо тщательно очистить эти клетки и охарактеризовать их. Представляется маловероятным, что рецепторы различных классов Т-лимфоцитов окажутся достаточно сходными, чтобы модель функционирования Т-клеточного рецептора одного типа можно было применить к рецепторам всех Т-клеток¹. Все это крайне осложняет анализ литературных данных, поскольку большинство работ посвящено исследованию либо антигенсвязывающих молекул, принадлежащих Т-клеткам отдельных популяций неизвестного функционального типа, либо определению функциональной специфичности смешанных Т-клеточных популяций. Однако ситуация оказывается не совсем безнадежной, так как некоторую полезную информацию можно извлечь и из ранних источников, если соотнести с ними более поздние результаты.

Наконец, при изучении Т-клеточных рецепторов мы сталкиваемся с некоторыми трудноразрешимыми генетическими проблемами. Пример антигенсвязывающих рецепторов В-клеток всегда вызывает удивление — как по организации генов иммуноглобулинов, так и по их перестройкам, благодаря которым в конце концов образуются молекулы рецепторов и антител. Производимые Т-клетками антигенсвязывающие молекулы резко отличаются от обычных иммуноглобулинов: создается впечатление, что в некоторых случаях, по-видимому, в одной полипептидной цепи присутствуют участки, информация о которых имеется в двух разных хромосомах. Возможно ли это? Трудно дать окончательный ответ². Обнаруженные факты позволяют надеяться, что молекулярно-генетический анализ Т-клеточных рецепторов расскажет нам многое не только о самих рецепторах и кодирующих их генах, но также и о механизмах перестроек, характерных для других систем эукариотических генов. Поэтому совершенно очевидно, что революция в молекулярной биологии, связанная с возможностью клонирования генов, должна значительно расширить представления о крайне запутанных процессах образования Т-клеточных рецепторов. При этом, по-видимому, окажется необходимым использование моноклональных антител, клонированных Т-клеток и клонированных фрагментов нуклеиновых кислот. В настоящей главе мы попытаемся лишь в общих чертах обрисовать рассматриваемую проблему, которая еще далека от полного разрешения. Мы обсудим все, что известно о восприимчивости Т-клеток к антигену, а также приведем неполный список Т-клеточных популяций и опишем их специфичность по отношению к антигенам. Кроме того, мы рассмотрим связывание антигена Т-клетками и приведем список специфических серологических свойств, связанных с Т-клеточными рецепторами, и известных генов, кодирующих данные рецепторы. Затем мы представим данные по химической характеристике антигенсвязывающих молекул из Т-клеток. На основе этой информации в настоящее время сформулированы различные модели функционирования Т-клеточных рецепторов. Мы обсудим эти модели и приведем веские аргументы за и против них, оставив разрешение имеющихся противоречий на будущее. Различным аспектам данной проблемы посвящены подробные обзоры [1—10].

¹ Имеющиеся экспериментальные данные указывают на то, что антигенные рецепторы Т-хелперов и Т-киллеров кодируются одними и теми же генами. Эти данные, однако, не соответствуют существенным различиям между Т-хелперами и Т-киллерами как по условиям и механизмам распознавания, так и по эпитопам распознаваемого антигена. — *Прим. ред.*

² В пользу этого предположения свидетельствует разнообразие перестроек в парных хромосомах генов β-цепей рецепторов Т-хелперов, специфических к лизоциму курицы в комплексе с молекулой I-A^b (Govegman J. et al., Cell, 1985, 40, 859—867). — *Прим. ред.*

11.1. Функциональный подход в изучении Т-клеточных рецепторов

О «проблеме» Т-клеточных рецепторов всерьез заговорили после первых экспериментов по изучению ответа лимфоцитов на антиген. Среди данных, полученных в результате этих исследований, наибольший интерес представляют следующие три. Во-первых, неожиданно большой (1—5 %) оказалась доля лимфоцитов, реагирующих на некоторые антигены главного комплекса гистосовместимости (МНС — от англ. major histocompatibility complex) трансплантата. Во-вторых, иммунизация комплексами гаптен — белок вызывала образование антител, специфических к гаптenu, независимо от природы белка-носителя, в то время как иммунные лимфоциты обладали иммунологической памятью, специфической к носителю. В-третьих, влияние генов иммунного ответа (или генов *Ir*), относящихся к главному комплексу гистосовместимости, на количество образующихся антител против гаптен, сшитых с простыми синтетическими молекулами, зависело от носителя. Решению этой проблемы значительно способствовали следующие обстоятельства. Было осуществлено разделение лимфоцитов на Т- и В-клетки; было обнаружено, что среди В-клеток находятся предшественники клеток, секретирующих антитела, и что В-лимфоциты несут на своей поверхности молекулы иммуноглобулинов в качестве антигенсвязывающих рецепторов, причем специфичность этих рецепторов совпадает со специфичностью секретируемых впоследствии антител. Все это позволило понять второй из трех рассмотренных вопросов: В-клетки являются гаптен-специфическими, в то время как Т-клетки, необходимые для оказания «помощи» секретирующим антитела В-клетками, обнаруживают специфичность к носителю. Однако при этом сразу же возникают два новых вопроса. Первый: если Т-клетки-помощники (Т-хелперы) действительно антигенспецифичны, то почему тогда они не узнают детерминант гаптена с такой же легкостью, как и В-клетки в тех же самых системах, преодолевая таким образом «эффект носителя» во вторичном иммунном ответе ¹? Второй вопрос: если Т-клетки не используют молекул иммуноглобулинов в качестве своих рецепторов (иммуноглобулины вообще не обнаруживаются на мембране Т-клеток; см. ниже), существует ли тогда еще одно семейство генов, кодирующих Т-клеточные рецепторы, не уступающее по сложности семейству генов иммуноглобулинов? На эти вопросы до сих пор не получено исчерпывающих ответов ².

Идентификация Т-клеток позволила также понять назначение клеток этой популяции лимфоцитов, реагирующих с МНС-антигенами в реакциях, протекающих при трансплантации. Таким образом, при изучении узнавания антигена Т-клетками можно столкнуться с дополнительной трудностью: необходимо понять, почему основная часть Т-клеток направлена против чужеродных МНС-антигенов. Более того, собственные МНС-антигены также, по-видимому, существенны для восприимчивости Т-клеток к антигенам, поскольку гены *Ig*, сцепленные с генами главного комплекса гистосовместимости, очевидно, влияют на способность Т-клеток реагировать на специфические белки и синтетические полипептиды, но не влияют на способность В-клеток реагировать на эти же самые антигены.

¹ Т-хелперы узнают гаптен при условии, что он ассоциирован с молекулой МНС, четко различая детерминанты того же гаптена, если он представлен в различных изомерных формах. — *Прим. ред.*

² Гены Т-клеточных антигенных рецепторов охарактеризованы за последнее время с достаточной полнотой (см. стр. 403). — *Прим. ред.*

Все эти данные, взятые вместе, приводят к привлекательной гипотезе, согласно которой гены I-района кодируют Т-клеточные рецепторы для антигена. Это предположение, хотя и не пользуется популярностью, тем не менее в настоящее время не полностью отвергнуто, особенно в отношении генов I-J-субрайона¹.

Эти исследования привели к необходимости вновь исследовать специфичность Т-клеток к антигену. Хотя наличие у Т-лимфоцитов антиген-специфической иммунологической памяти дает основание думать, что Т-клетки проявляют высокую степень специфичности, тем не менее это предположение нуждалось в прямом доказательстве. Многочисленные исследования, большинство из которых проведено на хелперных, пролиферирующих или цитотоксических эффекторных Т-клетках, ясно показали, что Т-клетки узнают чужеродный антиген с очень высокой точностью. Отдельные небольшие изменения в строении гаптенных детерминант оказываются существенными для такого узнавания. Что касается белков-носителей, то Т-клетками могут быть обнаружены даже различия всего лишь по одной аминокислоте. Таким образом, по специфичности узнавания антигена между Т- и В-клетками нет существенной разницы. Более того, подобные исследования показали, что по специфичности к чужеродному или тест-антигену Т-клетки делятся на клоны: все Т-клетки данного клона специфичны только к своему тест-антигену. Из этих данных с достаточной определенностью следует, что рецепторы Т-клеток кодируются «мультигенным семейством», аналогичным семейству генов, кодирующему В-клеточные рецепторы и иммуноглобулины. Следует выяснить, специфично ли данное мультигенное семейство только для Т-клеток или же Т-лимфоциты используют то же самое семейство генов, что и В-лимфоциты, но сборка Т-клеточных рецепторов идет другим путем, в результате чего получают полипептиды, различающиеся по антигену (рецепторы с другой антигенной специфичностью)².

Эти ранние исследования специфичности Т-клеток зашли в тупик по двум причинам. Во-первых, Т-клетки очень гетерогенны, а во многих экспериментах использовалась, очевидно, смесь субпопуляции Т-клеток (гл. 4). Во-вторых, ответ многих Т-клеток на антиген включает в себя узнавание не только чужеродного антигена, но также и антигенных детерминант собственных МНС-антигенов (в этих исследованиях для обозначения чужеродного антигена используется термин «тест-антиген»). В следующем разделе этой главы мы рассмотрим более детально различия в функции и узнавании разных субпопуляций Т-лимфоцитов. Остальная часть этого раздела посвящена роли МНС в узнавании антигена Т-клетками. При этом в качестве важнейшего примера такого процесса мы рассмотрим узнавание Т-хелперами антигена, презентированного вместе с молекулами, которые кодируются МНС-генами I-района, и ответную пролиферацию этих клеток. Аналогичные исследования, касающиеся цитотоксических клеток-эффекторов, обсуждаются лишь тогда, когда это полезно или необходимо, хотя при этом признается, что молекулы данных клеток, участвующие в узнавании антигена, по своей природе могут значительно отличаться от рецепторов Т-хелперов.

¹ Гены Т-клеточного антигенного рецептора и гены МНС расположены в разных хромосомах. Ген, кодирующий молекулу I-J, пока не идентифицирован. Молекула I-J входит в состав антигенсвязывающего фактора Т-супрессоров (Herzenberg L. A. et al., Ann. Rev. Immunol., 1, 609—632, 1983; Takai Y et. al., J. Immunol., 132, 56—61, 1984).— Прим. ред.

² Гены Т-клеточных антигенных рецепторов охарактеризованы за последнее время достаточно полно (см. стр. 403.— Прим. ред.

11.1.1. Роль генов *I*-района *MHC* в узнавании антигена Т-клетками [71]

Продукты генов, локализованных в *I*-районе *MHC*, по-разному влияют на ответ Т-клеток на антиген. Во-первых, чужеродные или аллогенные антигенные детерминанты, кодируемые этими генами, стимулируют способность Т-клеток к делению в ответ на антиген (так называемые аллореакции). Частота ответа Т-клеток на данный аллогенный продукт *I*-района составляет 1—5%. Такой ответ на аллогенные продукты генов *I*-района соответствует высокой частоте клеток-предшественников, которую наблюдали в ранних исследованиях, посвященных изучению ответов на различия по всему *MHC*-гаплотипу.

Во-вторых, гены, картируемые в *I*-районе, определяют способность Т-хелперов отвечать на антигены, представляющие собой различные белки и синтетические полипептиды. Эти гены называются генами иммунного ответа или *I*-генами. Они обсуждаются подробно в гл. 15.

В-третьих, гены, картируемые в *I*-районе, определяют, будет ли Т-хелпер взаимодействовать с какой-либо В-клеткой или отвечать на антиген, презентированный антиген-презентирующими клетками (АПК); В-клетки (или АПК) способны действовать совместно с Т-хелперами (или презентировать им антиген) мышши, имеющей точно такие же гены *I*-района, и не смогут реагировать с Т-хелперами, если между генами *I*-районов донора и реципиента имеются различия.

В-четвертых, гены, картируемые в этом районе, контролируют образование серологически обнаруживаемых поверхностных антигенов В-клеток и АПК.

Исследования, проведенные сравнительно недавно с использованием моноклональных антител против *Ia*-белков или мутантных по *I*-району линий, показали, что все эти свойства контролируются единственной парой генов, кодирующих две полипептидные цепи, которые имеют серологически определяемые детерминанты *Ia*-антигенов. Хотя выяснение деталей механизма до сих пор остается основной проблемой в иммунологии (гл. 15), тем не менее становится все более очевидным, что пролиферирующие Т-клетки и Т-хелперы узнают антиген только в виде комплекса со своими *Ia*-антигенами. Поэтому только антигенсвязывающие В-клетки, имеющие на своей поверхности соответствующие *Ia*-антигены, могут узнаваться Т-хелперами (специфичными к тому же самому антигенному комплексу). Лишь в этом случае Т-хелперы помогают образованию антител. Еще не ясно, на что именно влияют дефекты *Ig*-генов — на узнавание Т-клетками антигена, образование антигенного комплекса или на какие-то иные этапы процесса.

Тот факт, что Т-хелперы узнают антиген только вместе со своими *Ia*-молекулами, имеет глубокий смысл. Изменения структуры антигена могли бы прямо влиять на специфичность узнавания его Т-клеточным рецептором, однако не менее вероятно, что они оказывают влияние на ассоциацию антигена с полиморфными частями *Ia*-гликопротеинов, способствуя образованию такого комплекса *Ia*-антиген. Специфичность ответа Т-клетки обусловлена именно ориентацией двух компонентов этого комплекса, а не взаимодействием антигена с антигенузнающими участками на поверхности Т-клетки, специфическими к измененной антигенной детерминанте. Другими словами, из того, что Т-клетки могут легко различать два белка, отличающиеся друг от друга по одной или более аминокислотам, совсем не обязательно следует, что Т-клеточный рецептор прямо распознает данное различие в аминокислотной последовательности. Такое различие может создавать определенную структуру комплекса тест-антигена с собственным *Ia*-антигеном, а Т-клетка в действительности связывается с инвариантной частью тест-антигена.

То, что Т-хелперы способны узнавать антиген только вместе с собственными Ia-белками, могло бы означать, что между Т-клеткой и АПК происходит взаимодействие «подобного с подобным». Однако это оказалось не так при исследовании Т-клеток F1 (у которых узнавание родительских Ia-молекул, как и собственных, клонально-специфично), а также радиационных химер костного мозга (имеются в виду мыши, у которых собственные лимфоциты разрушены облучением, а популяция Т-клеток восстановлена путем пересадки стволовых клеток костного мозга от аллогенных или полусингенных доноров). Наиболее четкие данные получены для Т-хелперов. Заключаются они в следующем: в качестве собственных Т-клетки узнают те Ia-антигены, которые экспрессируются устойчивыми к облучению частями тимуса, где идет созревание Т-клеток. Чтобы обнаружить такую специфичность, иммунизация должна идти в присутствии АПК, имеющих на своей поверхности те же самые Ia-антигены. Наконец, индукция толерантности (отрицательная селекция) к Ia-белкам (своим или чужим) — это процесс, не зависящий от происходящей в тимусе положительной селекции зрелых периферических Т-клеток, специфических в отношении Ia-белков, поскольку различные химеры толерантны к Ia-антигенам, не экспрессируемым устойчивыми к облучению клетками тимуса, а привносимым самими лимфоцитами (табл. 11.1). Следовательно, детерминанты МНС-антигенов влияют на онто-

Таблица 11.1. Узнавание Ia-антигенов Т-клетками — потомками донорских клеток в радиационных химерах костного мозга¹⁾

Донор стволовых клеток	Донор тимуса	Т-клетки толерантны к	Т-клетки узнают как собственные
A	A × B	A, B	A, B
A × B	A	A, B	A
A	B	A, B	B

1) Буквами A и B обозначены МНС-гаплотипы, имеющие независимое происхождение. Приведенные данные обсуждаются в обзорах [4] и [10].

генез Т-клетки и селекцию ее анти-МНС-репертуара по крайней мере двумя способами. Первый из них (не обязательно по времени) заключается в том, что Ia-антигены, присутствуя в окружающей среде (имеются в виду свои Ia-белки), взаимодействуют с Т-клеткой и активируют ее, а это, по-видимому, прямо приводит к инактивации Т-клетки на ранней стадии онтогенеза и обеспечивает толерантность к своим Ia-белкам. Связан ли данный процесс с подавлением такого ответа или с уничтожением соответствующих клонов, пока неизвестно. Второй способ заключается в следующем. Т-клетки узнают на периферии антиген в комплексе с детерминантами собственных Ia-белков, экспрессируемых тимусным эпителием или какой-нибудь другой устойчивой к облучению частью тимуса. В результате происходит отбор этих Т-клеток, их популяция увеличивается и в конце концов начинает доминировать среди других Т-лимфоцитов. Хотя узнавание Т-клетками антигена в комбинации с собственными Ia-белками является общим правилом, тем не менее необходимо отметить, что некоторые Т-клетки либо перекрестно реагируют с Ia-антигенами других гаплотипов, либо созревают в тимусе независимо от узнавания МНС-молекул, поскольку можно активировать периферические Т-клетки с помощью антигена в ком-

плексе с Ia-молекулами, с которыми Т-клетки не сталкивались во время онтогенеза. Частота появления таких клеток точно не определена, однако в большинстве работ предполагается, что Т-клетки, узнающие антиген в комбинации с чужими Ia-белками, довольно редки. Роль этих клеток в нормальном иммунном ответе, возможном только при одновременном узнавании антигена и собственных Ia-белков, точно не известна¹.

Подобные химеры были также использованы для изучения регуляции иммунного ответа. Было показано, что генотип тимуса отвечает за поведение Т-лимфоцитов, если использовать соответствующие АПК при иммунизации Т-клеток, в то время как В-клетки и антиген-презентирующие клетки ведут себя в соответствии со своим МНС-генотипом. Таким образом, I γ -гены определяют способность Т-лимфоцитов отвечать на антиген; они в действительности экспрессируются в генетическом и молекулярном смысле на поверхности устойчивых к облучению клеток тимуса, на антиген-презентирующих клетках и на В-клетках.

Эти исследования отчетливо демонстрируют эффект генов I-района, опосредованный их молекулярными продуктами (Ia-гликопротеинами), при узнавании антигена Т-лимфоцитами. Т-хелперы не только узнают антиген, когда тот презентирован на поверхности АПК вместе со своими Ia-молекулами, но, кроме того, экспрессируемый в каждом конкретном случае аллельный вариант Ia-белка определяет, будет или нет Т-клетка отвечать на данный антиген, а если будет, то на какие именно детерминанты антигена.

Для объяснения приведенных фактов были предложены рассматриваемые ниже модели двух различных типов. Для удобства изложения экспериментальных данных мы лишь упомянем их характерные особенности. В моделях одного типа предполагается, что в Т-клеточном рецепторе имеется единственный участок, способный узнавать антигенную детерминанту, отсутствующую у своих МНС-молекул и у тест-антигена, которая возникает в результате их взаимодействия. В моделях второго типа принимается, что Т-клеточный рецептор имеет два участка, один из которых узнает собственные МНС-детерминанты, а второй — детерминанты тест-антигена.

В последние годы удалось подтвердить факт узнавания Т-клеткой антигена совместно с узнаванием своих Ia-детерминант. В этих опытах были использованы клонированные антигенспецифические линии длительно культивируемых Т-клеток. Такие клетки обладали всеми ожидаемыми свойствами: 1) прямые потомки одной Т-клетки могут делиться в ответ на специфический антиген, презентируемый вместе с соответствующими МНС-антигенами, 2) оказывать помощь В-клеткам в образовании антител при ответе на антиген; 3) опосредовать реакции гиперчувствительности замедленного типа. Такие клетки, кроме того, в некоторых случаях способны реагировать на чужие МНС-молекулы. Это было продемонстрировано независимо в нескольких лабораториях и подтвердило результаты более ранних исследований, проведенных на уровне популяций Т-клеток. Отсюда можно предположить, что аллореактивность — это свойство тех же самых Т-клеток, которые узнают тест-антиген в комбинации со своими Ia-белками. Во многих моделях Т-клеточного рецептора на основе этих данных делается попытка объяснить аллореактивность одновременным узнаванием своего и тест-антигенов с помощью одного рецептора или рецепторного комплекса. Различие между своим и чужим в данном контексте представляется

¹ Комбинации фрагмента антигена-1 со своим Ia-белком и фрагмента антигена-2 с определенным чужим Ia-белком могут иметь сходную мозаичную структуру, что обеспечивает их узнавание одним и тем же клоном Т-лимфоцитов. — Прим. ред.

несколько расплывчатым; в действительности оно может быть довольно тонким. Например, описано несколько ответов мышей F1 на антигены родителей. В одном из наиболее интересных примеров показано, что у мыши F1 могут образовываться такие цитотоксические эффекторныe Т-лимфоциты, которые способны убивать родительские клетки, но не клетки F1. Интересно, что эти Т-лимфоциты узнают МНС-антигены, находящиеся на клетках F1, поскольку последние могут специфически предотвращать убийство родительских клеток. Следовательно, клетки F1 имеют на своей поверхности антиген, узнаваемый Т-киллерами F1, но не убиваются ими. Из этого следует, что между толерантностью и аутоиммунным ответом имеется очень тонкая грань, основанная на незначительных качественных различиях в уровне экспрессии антигена. Ни одна из имеющихся моделей функционирования Т-клеточного рецептора не способна объяснить этот факт. Из этого очевидно, как плохо мы еще представляем себе природу этих процессов.

Чтобы выяснить, состоят ли Т-клеточные рецепторы из двух различных узнающих единиц, одна из которых специфична к тест-антигену, а другая к своему Ia-белку, были получены гибриды двух Т-клеток, различающихся по специфичности как к тест-антигену, так и к Ia-белку. Результаты одного из таких экспериментов ясно показывают, что в гибридных клетках оба типа специфичности всегда спарены друг с другом так же, как и в родительских клетках. Из этого можно сделать вывод, что либо для Т-клеточного рецептора справедлива модель одного участка узнавания или одной полипептидной цепи, либо на поверхности АПК имеет место точная ассоциация тест-антигена и своего Ia-белка.

Итак, многие Т-лимфоциты узнают антиген вместе с каким-либо из своих МНС-антигенов. Это налагает сильные ограничения как на типы МНС-молекул, так и на специфические антигенные детерминанты, узнаваемые такими Т-клетками, и в значительной степени усложняет функциональный анализ специфичности Т-клеточных рецепторов, поскольку в реакции Т-клеток с антигенами участвует третий компонент — еще до конца не охарактеризованные гликопротеины, кодируемые МНС.

11.2. Различия в специфичности разных субпопуляций Т-клеток

Через некоторое время после того, как были выяснены различия между Т- и В-лимфоцитами, стало понятным, что Т-клетки в свою очередь функционально гетерогенны. Хотя до сих пор не существует единого мнения о степени разнообразия Т-клеток и не известны даже критерии, по которым можно четко отличить одну субпопуляцию от другой, тем не менее сам по себе факт наличия этой гетерогенности поднимает вопрос о различиях рецепторов между субпопуляциями Т-лимфоцитов. Теперь уже очевидно, что изучение поверхностных молекул Т-клетки, участвующих в узнавании антигена и (или) собственных молекул организма, следует проводить на определенных субпопуляциях Т-клеток. В идеале это означает, что определение специфичности и функциональной активности каждой субпопуляции должно включать в себя клонирование Т-клеток и изучение молекулярных продуктов данного клона. Это было сделано лишь в двух случаях. Темпы изучения данной проблемы таковы, что в ближайшие несколько лет, по-видимому, будет получено много новой информации, а это в свою очередь позволит яснее представить общую картину функционирования как самих лимфоидных клеток, так и их молекул, участвующих

Таблица 11.2. Функциональные Т-клеточные популяции, их свойства и антигенсвязывающие продукты

Название Т-клетки	Функция	Поверхностно-клеточные антигены				Специфичность по отношению к своим антигенам		Антигенсвязывающие продукты	Источники данных
		Ly1	Ly2	Qa1	I-J1)	тест-антигену	своим антигенам		
Т-хелперы	Помогают В-клеткам	+	-	-	-	Белки, углеводы, гаптены	I-A	33К, 45К	[11-13]
Т-хелперы, узнающие иммуноглобулин	Помогают В-клеткам, активированным Т-хелперами	+	-	+	?	Белки, углеводы	I-E Ig (идиотип, аллотип, изотип)	?	[14-15]
Т-клетки, секретирующие лимфокины	Опосредуют DTH некоторые типы помощи	+	-	?	?	то же	I-A	?	[16]
Индукторы супрессии	Активируют превращение Ly12 → Ly2	+	-	+	+	Эритроциты барана	I-E Igh-V	?	[17, 18]
Клетки-супрессоры первого порядка	Активируют Ts2	+	-	?	+	Гаптены	?	?	[19, 20]
Клетки-супрессоры второго порядка	Активируют Ts3	?	+	?	+	Идиотипы	I-J ¹)	?	[21]
Супрессорные клетки, специфические к антигенам	Активируют превращение Ly12 Т-клеток в супрессорные эффекторные Т-клетки	(+)	+	?	+	Белки, гаптены, эритроциты барана	I-J ¹)	1 Ag-связывающий 11-J ⁺	[22]
Супрессорные эффекторные Т-клетки	Инактивируют Т-хелперы	+	+	-	-	Белки, углеводы, эритроциты барана	I-J ¹)	70 кДа	[23, 24]
Клетки-супрессоры третьего порядка	Супрессируют DTH	?	+	?	+	Гаптены	I-J ¹)	?	[25]
Ia-узнающие супрессоры	Подавляют ответ В и Т клеток	-	+	?	?	Белки, гаптены	I-A	?	[26]
Супрессоры, узнающие идиотип	Подавляют ответ В клеток	-	+	?	?	Белки, идиотипы	I-E	?	[27, 28]
Цитотоксические эффекторные Т-клетки	Убивают аллогенные или модифицированные или сингенные клетки	±	+	-	-	Вирусы, гаптены, TSTA, аллоантигены	Идиотипы, ? свои MHC K, D	?	[10]
Контрсупрессорные эффекторные Т-клетки	Защищают Т-хелперы от супрессии	+	-	+	+	Эритроциты барана, гаптены	(Ig?)	?	[29]
Т-клетки Ly12	Передают сигналы при иммунорегуляции	+	+	+	+	Неизвестны	Неизвестны	?	30

1) Не все эти I-J-детерминанты идентичны [31].

Ч. Джейнуэй, Р. Коун, Ф. Оуэн

в специфическом связывании антигена. Неполный список различных типов Т-клеток с некоторыми их характерными особенностями приведен в табл. 11.2. Ниже следует краткое описание Т-клеток каждого типа.

11.2.1. Т-хелперы

Т-клетки, участвующие в активации эффекторных клеток, называются *Т-хелперами* или *индукторами*. Здесь мы будем употреблять термины «Т-хелперы» и «Т-индукторы» в их классическом смысле для обозначения Т-клеток, активирующих соответственно эффекторные и регуляторные клетки. Различие между ними может оказаться довольно искусственным. Существуют, по-видимому, по крайней мере три типа Т-хелперов.

11.2.1.1. Т-хелперы, узнающие МНС

Классические Т-хелперы обладают специфичностью к антигену, презентированному в комбинации со своими Ia-молекулами. Эти клетки пролиферируют в ответ на антиген, связанный с собственными Ia-белками (антиген и собственные Ia-белки при этом презентруются АПК), и индуцируют пролиферацию В-клеток, связавших данный антиген и имеющих на своей поверхности Ia-молекулы. Подобные Т-клетки способны индуцировать как пролиферацию В-лимфоцитов, так и их дифференцировку до антителообразующих клеток.

11.2.1.2. Т-хелперы, узнающие иммуноглобулины

Некоторые Т-хелперы, судя по всему, обладают специфичностью как к антигену, так и к собственным идиотипическим детерминантам. По-видимому, они активируют В-клетки, которые имеют такие идиотипические детерминанты; при этом В-клетки активируются также и Ia-узнающими Т-хелперами. Не исключено, что такие клетки вообще не узнают МНС-детерминант. Имеются также сообщения о существовании аналогичных Т-клеток, специфичных к собственным идиотипическим или аллотипическим маркерам.

Некоторые Т-клетки узнают собственные идиотипы в комплексе со своими Ia-молекулами и, возможно, могут активировать В-клетки в отсутствие антигена или других Т-клеток. Физиологическая роль этих клеток точно не известна. Их можно отнести к одному классу с узнающими Т-хелперами, поскольку функция идиотипа в данном случае аналогична функции тест-антигена.

11.2.1.3. Т-клетки, секретирующие лимфокины

Некоторые Т-клетки осуществляют свою «хелперную» функцию через освобождение «дальнедействующих» факторов, таких, как интерлейкин-2 и фактор, замещающий Т-клетки, которые активируют или способствуют активации других Т- или В-клеток. Похожи ли эти клетки на МНС-узнающие Т-хелперы или нет, неизвестно. Клетки, характерным свойством которых является освобождение таких факторов, по-видимому, узнают тест-антиген в комплексе с собственными Ia-детерминантами. Эти клетки могут также индуцировать реакции гиперчувствительности замедленного типа, опосредуемые лимфокинами.

11.2.2. Индукторы супрессии

Т-клетки, индуцирующие превращения других Т-клеток в Т-супрессоры, были описаны в нескольких различных системах. Эти клетки могут иметь как одинаковые, так и разные свойства, в соответствии с которыми мы их и рассмотрим.

11.2.2.1. Индукторы супрессии, действующей по принципу обратной связи

Ly1Т-клетки, являющиеся антигенспецифическими, индуцируют превращение Т-клеток Ly12 в Т-супрессоры Ly2. Этот процесс может осуществляться под действием секретлируемых продуктов, построенных из двух цепей, одна из которых связывает антиген, а другая несет антигенные детерминанты, кодируемые генами *I-J-субрайона*, и, кроме того, узнает свою мишень с помощью продукта гена, сцепленного с *Igh-V*. Индукторная функция этих клеток не связана с узнаванием ими ни иммуноглобулина, ни продуктов генов *MHC*, однако данные гены, возможно, влияют на их специфичность.

11.2.2.2. Ts1

Бенацерафф (Benaceraff) и сотрудники описали Т-клетки Ly1, активирующиеся при иммунизации, проводимой по такой схеме, которая обычно приводит к возникновению толерантности. Клетки Ts1 антигенспецифичны, несут идиотипические детерминанты, обнаруживаемые на антителах, специфических к тем же самым антигенным детерминантам, и секретируют фактор супрессии, имеющий *I-J-детерминанты* и идиотипические детерминанты и способный при этом связывать антиген (все эти свойства физически связаны друг с другом). Данный фактор активирует антиидиотипические клетки Ts2, которые в свою очередь активируют клетки третьего типа (Ts3) в цепи супрессии.

11.2.2.3. Ts2

Клетки Ts1, описанные Бенацераффом, или секретлируемый ими фактор TsF1 активируют антиидиотипические Т-клетки, имеющие маркер Ly2 и экспрессирующие *I-J-детерминанты*. Эти клетки на клетках-мишенях узнают, по-видимому, и *I-J-детерминанты*. Клетки Ts2 в свою очередь активируют иммунные клетки, называемые Ts3, которые, как считается, и представляют собой собственно эффекторы супрессии в данной системе.

11.2.2.4. Антиген-специфические супрессорные Т-клетки

Тада, Танигуши (Tada, Taniguchi) и другие авторы описали Т-клетки Ly2, способные связывать антиген и имеющие детерминанты *I-J*. Эти Т-клетки секретируют фактор супрессии (TsF), построенный из двух цепей, одна из которых связывает антиген, а другая представляет собой продукт генов *I-J*. Фактор TsF стимулирует превращение Т-клеток Ly12 в супрессорные эффекторные Т-клетки Ly2. Этот процесс зависит от генов *I-J*.

Условия опытов, в которых изучались упомянутые типы клеток, были различными, и поэтому вполне возможно, что мы будем приписывать данным клеткам большие различия, чем есть на самом деле. Тем не менее клетки каждого типа обладают уникальными свойствами, в связи с чем вряд ли их можно объединять в одну группу.

11.2.3. Супрессорные Т-клетки

К настоящему моменту времени описано очень большое количество различных супрессорных Т-клеток. И опять-таки не ясно, сколько из них представляют собой уникальный тип клеток с уникальными свойствами. Тем не менее некоторые из этих клеток имеют, по-видимому, отличительные особенности.

11.2.3.1. Супрессорные эффекторные Т-клетки

Т-клетки Ly2, I-J⁻, по-видимому, вызывают супрессию при иммунизации эритроцитами барана. Эти клетки связывают антиген и секретируют факторы, инактивирующие Т-хелперы Ly1. Согласно последним данным, можно предположить, что для инактивации Т-хелперов Ly1 требуются молекулы, имеющие антиген I-J, и что для взаимодействия фактора супрессорных эффекторных Т-клеток со своей мишенью необходимо, чтобы этот фактор узнавал антиген I-J на несущих его клетках или молекулах.

11.2.3.2. Ts3-клетки

Бенацерраф и сотрудники описали иммунные Т-клетки, которые активируются клетками Ts2 или фактором TsF2, превращаясь при этом в эффекторов супрессии. Для первоначальной активации этих клеток антигеном требуется иммунизация, включающая к тому же узнавание I-J. Если клетки активировать антигеном и TsF2, они приобретают способность к неспецифической супрессии. Их мишень точно определена, однако окончательный результат их активации — это супрессия реакций гиперчувствительности замедленного типа.

11.2.3.3. Ia-узнающие супрессорные Т-клетки

Недавно в опытах с несколькими различными системами было показано, что существуют I-A- или I-E-специфические Т-супрессоры. Одни из этих Т-супрессоров предотвращают пролиферацию клеток в ответ на антиген, обуславливая иллюзорную идентификацию I-B-субрайона. Другие могут супрессировать секрецию антител антигенсвязывающими В-клетками.

11.2.3.4. Супрессорные Т-клетки, узнающие идиотип

Во многих исследовательских группах были обнаружены Т-супрессоры, узнающие идиотип и даже связывающиеся с ним. Подобные Т-клетки Ly2 могут прямо супрессировать секрецию антител В-клетками, несущими соответствующие идиотипические детерминанты, однако они не супрессируют В-клетки, специфические к тому же самому антигену, но отличающиеся по идиотипу поверхностных рецепторов. Узнают ли такие клетки также и МНС-детерминанты, пока не известно¹.

11.2.4. Цитотоксические Т-клетки

Цитотоксические Т-клетки (Т-киллеры), по-видимому, представляют собой более простой случай, чем регулярные Т-клетки. Они имеют фенотип Lyt-2⁺ и узнают антиген в комплексе с собственными МНС-молекулами класса I (К или

¹ Судя по способности идиотипузнающих Т-супрессоров прямо прикрепляться к фиксированному на пластинке иммуноглобулину с тем же идиотипом, узнавания такими клетками МНС-детерминант для их функции не требуется. — *Прим. ред.*

D), а в отсутствие тест-антигена — аллогенные молекулы класса I. Описаны Т-киллеры, специфические к МНС-молекулам класса II (Ia). Их отношение к классическим цитотоксическим эффекторным Т-клеткам, специфическим к МНС-молекулам I-района (CTL), не выяснено; они могут, вероятно, секретировать цитотоксические лимфокины вместо того, чтобы убивать свои клетки-мишени непосредственно. Непонятно, узнают ли эти Т-киллеры тест-антиген в комплексе с собственными молекулами класса II¹.

11.2.5. Контрсупрессорные Т-клетки

Описаны Т-клетки с фенотипом Ly1, способные предотвращать инактивацию Т-хелперов и Т-индукторов супрессорными эффекторными Т-клетками. Об антигенной специфичности и функциональной роли контрсупрессорных Т-клеток известно немного. В некоторых случаях они, по-видимому, специфичны по отношению к антигену и, кроме того, имеют важное значение для развития иммунологической памяти при активной супрессии.

11.2.6. Т-клетки Ly12

Т-клетки, имеющие поверхностные антигенные маркеры Ly12, выполняют роль медиаторов иммунорегуляции, получая стимулирующие сигналы и передавая их (или трансформируясь под их влиянием) регуляторным клеткам других типов. Т-клетки Ly12, как было показано, участвуют в амплификации хелперов и супрессоров, а также в активации супрессоров и контрсупрессоров. Эти клетки трудно идентифицировать экспериментально, и хотя в intactных иммунных системах они выполняют, несомненно, исключительно важную роль, в действительности ничего не известно об их специфичности или гетерогенности, за исключением самого факта их существования.

11.2.7. Специфичность по отношению к тест-антигену клеток различных типов

Было проведено несколько работ, посвященных изучению антигенных детерминант, узнаваемых различными субпопуляциями Т-клеток. Исходя из этих, хотя и ограниченных, данных, можно предположить, что одни детерминанты белковых антигенов у определенных линий мышей стимулируют активацию Т-хелперов, в то время как другие вызывают в основном активацию Т-супрессоров. В большинстве этих исследований тип активируемых хелперов или супрессоров не был охарактеризован. Однако представляется вероятным, что выбор класса Т-клеток, которые будут активироваться, определяется какими-то свойствами самого антигена. Таковыми могут оказаться способность к ассоциации с собственными молекулами организма или же сходство с этими молекулами, по отношению к которым система либо толерантна, либо супрессивна. Для построения общей теории, предсказывающей, какие субпопуляции Т-клеток у разных линий будут стимулироваться данными антигенными детерминантами, необходимо более тщательное изучение компонентов иммунной системы и их взаимодействий.

В целом сейчас можно выделить по крайней мере дюжину различных типов Т-клеток, и нам, несомненно, предстоит обнаружить еще большее разнообразие.

¹ Существование Т-киллеров и их клонов, узнающих вирусные белки в комплексе с собственной молекулой класса II, твердо установлено (Lukacher A. E. et al., J. Exp. Med., 162, 171—187, 1985).

Кроме того, следует ожидать, что определения даже этих идентифицированных типов клеток, по-видимому, будут изменяться по мере того, как наши знания о них будут увеличиваться. В любом случае представляется вероятным, что у различных классов Т-клеток, вкратце перечисленных выше, антиген узнают разные рецепторные молекулы¹. Насколько глубоки различия между этими молекулами, можно выяснить лишь с помощью биохимического, серологического и молекулярно-генетического анализа клонированных популяций Т-клеток.

11.3. Связывание антигена Т-лимфоцитами

Вместо трудоемких функциональных анализов специфичности Т-лимфоцитов для характеристики Т-клеточных рецепторов можно применить альтернативный подход, заключающийся в изучении связывания антигена Т-лимфоцитами. В данном разделе мы опишем эксперименты, поставленные с целью продемонстрировать связывание антигена Т-клетками; затем мы рассмотрим связывание антигена белками-продуктами Т-клеток.

Если бы было возможно продемонстрировать связывание антигена небольшой частью Т-лимфоцитов и при этом можно бы было показать, что Т-клетки, которые связывают антиген, также ответственны и за различные реакции Т-клеток на этот антиген, то у нас имелся бы способ характеристики специфичности связывания антигена Т-клетками. Этот подход был успешно использован для изучения В-клеток и помог установить, что антигенные рецепторы данной В-клетки неотличимы по своим антигенным свойствам и по способности связывать антиген от секретируемых той же клеткой иммуноглобулинов. Попытки продемонстрировать таким же образом связывание антигена Т-клетками натолкнулись на значительные трудности.

На ранних этапах исследования, чтобы обнаружить связывание антигена с Т-клетками и корреляцию этого связывания с функцией клеток, Т-клетки пропускали через колонки с антигеном или монослой антигена и затем тестировали функции адсорбированных и неадсорбированных Т-клеток. Впервые использование этого подхода увенчалось успехом при изучении СТЛ, специфических к чужим МНС-антигенам. Эти СТЛ задерживались на соответствующих монослоях прикрепленных клеток и затем могли быть сняты с них; после этого они проявляли такую специфическую СТЛ-активность, которую можно было ожидать, если бы связывание было антигенспецифическим. В данных экспериментах обнаруживалось связывание только активированных СТЛ, но не их предшественников. Впоследствии появилось утверждение, что предшественники СТЛ также специфично реагируют с монослоями аллогенных клеток, однако единого мнения по этому вопросу пока еще нет.

При проверке способности Т-клеток отвечать пролиферацией на нужные МНС-антигены после адсорбции на аллогенных монослоях было обнаружено, что такие клетки не прикрепляются к тем монослоям, на которые адсорбируются СТЛ. Далее, в условиях, в которых предшественники СТЛ прикреплялись к клеточным монослоям, клетки, способные пролиферировать в ответ на чужие МНС-антигены, этой способностью не обладали. Следовательно, субпопуляции реагирующих на аллоантиген Т-клеток различаются по способности прикрепляться к монослоям аллогенных клеток, однако причина этих различий не ясна².

¹ См. примечание на стр. 375.

² Установлено, что иммунные Т-клетки, пролиферирующие в ответ на аллоантиген донора, специфически прикрепляются к монослою клеток гибрида F₁, несущих на своей поверхности Ia-молекулы и донора, и реципиента. — *Прим. ред.*

Подобные эксперименты *in vivo* оказались более чувствительными, хотя при этом осложнилось количественное определение, и, кроме того, такие эксперименты связаны с некоторыми техническими сложностями. Ряд исследователей показал, что количество Т-клеток, способных пролиферировать в ответ на чужие МНС-антигены в смешанных культурах лимфоцитов, может быть уменьшено при «фильтрации» через облученных аллогенных хозяев благодаря специфическому связыванию с МНС-антигенами последних. Такие предшественники пролиферирующих клеток, очевидно, попадают в лимфоидные органы облученного аллогенного хозяина. Здесь они активируются в результате взаимодействия с детерминантами аллогенных МНС-антигенов и через 4—5 дней делаются и выходят в конце концов в выносящие лимфатические сосуды. Эти процессы, как теперь считается, определяются специфическим связыванием Т-клетки с антигеном. Таким образом, Т-клетки, специфические к чужим Ia-белкам, способны функционально связываться с антигеном, однако в опытах *in vitro*, когда клетки находятся в покое, этого наблюдать не удается.

В одной работе при изучении связывания чужих МНС-антигенов на поверхности Т-клеток было показано, что антигенсодержащие субклеточные везикулы специфически связываются с Т-клеточными бластами, активированными в смешанной культуре лимфоцитов. Более того, Т-клетки $Ly-1^+, 2^-$ избирательно связывали чужие Ia-антигены, в то время как Т-клетки $Ly-1^-, 2^+$ связывали чужие H-2K-молекулы. Однако, что представляет собой связывающийся в этой системе антиген, определено не было. Последующие исследования привели к предположению, что на данной Т-клетке рецепторы для своих и специфических чужих Ia-антигенов либо одни и те же, либо тесно связаны друг с другом. Это согласуется с уже упоминавшимися данными о том, что клонированные Т-клетки, специфичны как к тест-антигену, ассоциированному со своими Ia-белками, так и к чужим Ia-белкам.

В описанных выше системах в роли антигена всегда использовались детерминанты аллогенных МНС-антигенов. Возникает вопрос: что будет, если изучать связывание Т-клеток с тест-антигеном? Подобные эксперименты были проведены с примерно теми же самыми популяциями лимфоцитов, и при этом были получены в основном сходные результаты. Например, CTL сорбируются на монослой тест-антигена, но только в том случае, когда тест-антиген (например, вирус) презентруется в комплексе с соответствующими детерминантами собственных МНС-антигенов, в то время как только с тест-антигеном или только с собственными МНС-антигенами CTL не связываются.

С Т-клетками, отвечающими на тест-антиген, презентированный в комплексе с собственными Ia-детерминантами, дело обстоит еще яснее. Публикуемые время от времени сообщения о якобы прямом связывании таких Т-клеток с тест-антигеном могут обуславливаться примесью антиген-презентирующих клеток, несущих на своей поверхности тест-антиген. В большинстве исследований Т-клетки, узнающие собственные Ia-белки, могли связывать тест-антиген не сам по себе, а лишь в том случае, если он был «процессирован» в сингенных АПК. Для такого связывания, по-видимому, необходимо соответствие тест-антигена и МНС-генотипа процессирующей АПК. Подвергшийся процессингу антиген оказывается физически сцепленным с Ia-антигенами этих клеток. Но даже и при таких условиях связывание антигена Т-клетками зависит от стимуляции последними лимфокинами или монокинами, в частности IL-1, что, возможно, необходимо для активации или поддержания необходимого уровня экспрессии рецепторов на поверхности Т-клетки. Подобные исследования недавно проведены с клонированными Т-хелперами и их гибридами. В обоих случаях были получены оди-

ваковые результаты. Таким образом, в большинстве опытов *in vitro* Т-клетки, узнающие свои Ia-белки, по какой-то причине не связывали тест-антигена.

Что касается связывания антигена в условиях *in vivo*, то оно было обнаружено с помощью «фильтрации» Т-клеток через облученных сингенных хозяев, которым был введен тест-антиген. Эти исследования показали, что Т-клетки, обладающие специфичностью по отношению к антигену и к собственным Ia-белкам, удерживаются в лимфоидных органах в течение 3—4 дней, после чего в большом количестве выходят оттуда в высокоактивной форме. Хотя такая задержка Т-клеток в лимфоидных органах, по-видимому, прямо коррелирует со специфическим функциональным узнаванием антигена, использовать систему такого типа для характеристики антигенсвязывающих рецепторов Т-клеток довольно трудно.

Иные результаты были получены после удаления Т-супрессоров с помощью колонок с антигеном или монослоев антигена или же путем розеткообразования с эритроцитами, нагруженными антигеном. В большинстве случаев при этом оказалось, что Т-супрессоры легко связываются со свободным антигеном, причем количество этих клеток можно увеличить или уменьшить, используя пластинки или колонки с прикрепленным антигеном, а также путем розеткообразования с эритроцитами, нагруженными антигеном. Кроме того, было показано, что Т-супрессоры, специфичные к собственным идиотипическим детерминантам, способны связываться прямо с эритроцитами, нагруженными белками с теми же самыми идиотипическими детерминантами; при этом функциональная активность могла быть снижена путем удаления розеткообразующих Т-клеток из популяций, содержащих идиотипспецифические Т-супрессоры. Таким образом, Т-супрессоры, по-видимому, прямо связываются с тест-антигеном или с собственным идиотипом, — это согласуется со специфичностью функционально активных продуктов этих клеток. Почему Т-супрессоры отличаются по этому важному свойству от Т-хелперов и цитотоксических эффекторных Т-клеток, не ясно. Тем не менее в большинстве исследованных случаев узнавания этими антигенсвязывающими Т-супрессорами антигена в комбинации со своими МНС-детерминантами не наблюдалось.

Помимо приведенных случаев связывание с антигеном наблюдалось и у некоторых Т-клеток с неизвестной функцией. Наиболее яркий пример такого взаимодействия — это описанное Кравинкелем, Крамером и Раевским (Krawinkel, Cramer, Rajewsky) и сотрудниками связывание иммунокомпетентных клеток с антигеном, молекулы которого присоединены к волокнам найлона. Эти клетки прочно связываются с волокнами при 4 °С, но могут быть удалены с волокон при изменении температуры культуры с 4 до 37 °С. Волокна после этого, как было показано, покрываются антигенсвязывающими белками в основном не В-клеточного происхождения. Характеристики этих гаптенсвязывающих молекул, имеющих, по-видимому, Т-клеточную природу, обсуждаются ниже. Обладают ли эти клетки или выделенные из них антигенсвязывающие белки специфичностью по отношению к собственным МНС-молекулам, неизвестно.

Из предшествующего ясно, что изучение связывания антигена оказалось весьма полезным для доказательства клонального распределения специфичности Т-клеток, но не для определения специфичности поверхностных клеточных рецепторов интактных Т-лимфоцитов. Наверняка можно сказать, что в отличие от определенных классов Т-супрессоров, которые, по-видимому, способны сами по себе связывать тест-антиген, Т-клетки, узнающие и (или) отвечающие на антиген в комплексе с собственными МНС-антигенными детерминантами, в отсутствие этих детерминант не связывают тест-антиген с высокой эффективностью.

Почему не удается наблюдать сколько-нибудь существенного связывания тест-антигена Т-клетками, узнающими собственные МНС-антигены, понять не так просто. Было сделано несколько попыток объяснить это, однако ни одно из высказанных предположений не было доказано. Одна из возможностей сводится к тому, что Т-клетки просто не узнают детерминанты нативного тест-антигена, а вместо этого узнают и отвечают на простые пептидные антигенные фрагменты, образующиеся из тест-антигена в результате процессинга или связывания с собственными МНС-молекулами. Таким образом, Т-клетки можно рассматривать как клетки, способные узнавать детерминанты, отсутствующие у тест-антигена и не способные связывать тест-антиген, если он не изменен в результате ассоциации с собственными МНС-молекулами. Эта гипотеза получила название «гипотезы измененного своего» (altered self hypothesis). Второе объяснение заключается в том, что контакт Т-клетки с собственными МНС-антигенными детерминантами вызывает появление на поверхности Т-клетки рецептора к тест-антигену. В полном соответствии с этой гипотезой оказалось, что образование IL-1 является МНС-зависимым, а также то, что IL-1 способен индуцировать специфическое связывание тест-антигена с Т-клетками. Третье объяснение заключается в том, что связывание своих Ia-антигенов с их предполагаемым рецептором на поверхности Т-клетки изменяет конформацию находящегося рядом участка, специфичного по отношению к тест-антигену, вследствие чего связывание тест-антигена Т-клеткой становится возможным. Наконец, не исключено, что Т-клетка сама по себе связывает тест-антиген с низким сродством, а располагающийся рядом участок способен связывать собственные Ia-белки, причем также с низким сродством. Поэтому стабильное связывание будет иметь место лишь в том случае, когда тест-антиген и собственный Ia-белок ассоциированы друг с другом предпочтительно на мембране какой-нибудь клетки. В настоящее время трудно сказать, какое (или какие) из этих предположений окажется верным.

Таким образом, функциональная специфичность Т-клеток и их способность к избирательному связыванию антигена, презентированного в комплексе с соответствующими собственными МНС-антигенными детерминантами, свидетельствует, очевидно, о существовании антигенсвязывающего рецептора на поверхности Т-клетки. Приведенные данные ничего не говорят нам о структуре этого рецептора. Многочисленные попытки подавить связывание антигена с Т-клеткой добавлением определенных антител против Т-клеточных рецепторов не увенчались успехом¹ (об этом пойдет речь в следующей части этой главы).

11.4. Серологическое определение антигенсвязывающих рецепторов Т-клеток

Как детально описали Витетта (Vitetta) и др. в гл. 10, с помощью различных методов можно показать, что на поверхности В-клеток имеются молекулы иммуноглобулинов, специфически связывающие антиген, причем после активации эти клетки начинают секретировать молекулы иммуноглобулинов, способных связывать антиген точно так же, как и поверхностные иммуноглобулины предшественников этих антителообразующих клеток. Очевидно, что наличие такой

¹ Недавно, однако, это было осуществлено при связывании фрагмента инсулина, специфического к инсулину клон Т-клеток, с сингенной Ia-молекулой, снятой с поверхности макрофагов, презентирующих антиген (Puri J. et al., Eur. J. Immunol., 15, 362—368, 1985). — *Прим. ред.*

предопределенности отражает существование уникальных перестроек генов *Igh-V* и *V_κ* или *V_λ* в клетках-предшественниках. В ходе этих исследований весьма плодотворным оказалось изучение взаимодействия В-клеточных рецепторов не с антигеном, а с антителами против иммуноглобулинов. С помощью последних было показано, что у всех В-клеток антигенные детерминанты поверхностных иммуноглобулинов полностью сходны с детерминантами сывороточных иммуноглобулинов, что экспрессируемые В-клеткой изотипические или аллотипические маркеры совпадают по изотипу или аллотипу с синтезируемыми и секретирруемыми в дальнейшем этой же клеткой иммуноглобулинами и что В-клетки, несущие данные идиотипические детерминанты, в дальнейшем синтезируют антитела того же самого идиотипа. Наконец, антитела против иммуноглобулинов часто использовались для эффективной стимуляции В-клеток к делению, индуцировавшей деление клеток (или) секрецию антител.

Поэтому многим исследователям представлялось очевидным, что использование антиидиотипических, антиаллотипических и антиизотипических антител, специфичных к антигенсвязывающим Т-клеточным молекулам, которые, возможно, аналогичны сывороточным иммуноглобулинам, могло бы облегчить изучение генетики и химии рецепторов Т-клеток. В первых исследованиях из соображений экономии были использованы антитела против иммуноглобулинов, поскольку казалось маловероятным, что в Т- и В-клетках для кодирования белков, специфичных к одним и тем же антигенам, могут существовать два различных сложных мультигенных семейства и, следовательно, Т-клетки для синтеза своих рецепторов должны использовать те же самые гены, что и В-клетки. Однако попытки продемонстрировать наличие на поверхности Т-клеток обычных иммуноглобулиновых детерминант, включая изотипические и аллотипические, закончились неудачей. Хотя в некоторых сообщениях и говорилось о существовании функциональной активности у анти-Ig-антисывороток, при этом, однако, не приводилось убедительных доказательств того, что данные эффекты обусловлены именно антителами против иммуноглобулинов, а не другими компонентами этих сложных сывороток. Имеется несколько сообщений о том, что подобные сыворотки действительно содержат антитела, реагирующие с Т-клеточными антигенсвязывающими молекулами. Однако детерминанты, о которых наверняка можно сказать, что они являются общими для антигенсвязывающих молекул Т- и В-клеток, пока не известны. Кроме того, как было показано, результаты таких экспериментов в большой степени зависят от антисыворотки, выбранной для исследования, а это приводит к значительным противоречиям и обесценивает получаемую информацию.

Тем не менее один тип антисывороток, как оказалось, может быть весьма полезным при изучении Т-клеточных рецепторов. Сыворотки данного типа специфичны к идиотипическим детерминантам молекул сывороточных иммуноглобулинов. Антитела, содержащиеся в этих сыворотках, связываются также и с Т-клетками или с выделенными из них антигенсвязывающими молекулами. Два наблюдения делают эти данные особенно интересными. Первое заключается в том, что антиидиотипические антисыворотки реагируют с иммуноглобулинами, синтезированными в В-клетках, и с Т-клетками, специфичными к тем же антигенным детерминантам. Это может означать, что либо эти Т- и В-клеточные молекулы кодируются одними и теми же генами, либо существует несколько различных путей образования молекул, имеющих данную антигенную детерминанту; структурное сходство этих молекул не позволяет антиидиотипическим антителам отличать их друг от друга. Что такие молекулы закодированы в одном блоке генов, можно предположить, исходя из данных по изучению конгенных и рекомбинантных мышей и крыс, у которых идиотипические детерминанты Т-клеток

кодируются генами *Igh-V*, ответственными за экспрессию идиотипических детерминант В-клеточных иммуноглобулинов с такой же специфичностью.

Эти результаты, хотя и получены в нескольких лабораториях и при использовании Т-клеток нескольких различных типов, все же не доказывают окончательно, что Т- и В-клетки для кодирования своих антигенсвязывающих рецепторов используют одни и те же гены *Igh-V*, а лишь указывают на возможную роль сегмента хромосомы 12 мыши, в котором расположены гены, кодирующие эти детерминанты. Однако тот факт, что не удается обнаружить изменений в участке *Igh* ДНК Т-клеток, аналогичных изменениям, происходящим в участке *Igh* ДНК В-клеток, навело многих исследователей на мысль о том, что наблюдаемую идентичность идиотипических детерминант Т- и В-лимфоцитов можно, по-видимому, объяснить иначе.

Еще один подход связан с использованием антител, специфических к отдельным частям структуры VH, общим для многих антител. Такие антитела к каркасной части VH, как показал ряд экспериментов, реагируют с Т-клетками. И хотя иммуногистохимическими методами часто не удается выявить это взаимодействие, тем не менее было обнаружено, что данные антитела препятствуют связыванию антигена Т-клетками, обработанными IL-1, в опытах *in vitro* блокируют хелперную функцию Т-клеток, реагируют с Т-клеточными антигенсвязывающими белками, выделенными из гаптенсвязывающих Т-клеток, а также связываются с факторами индукции и супрессии из Т-клеточных гибридов. В одной из работ было продемонстрировано, что свойства различных Т-клеток, проявляющиеся при их взаимодействии с антителами к каркасной части VH, определяются генами *Igh*. Таким образом, эти результаты, так же как и результаты, полученные с помощью антиидиотипических антител, дают основание думать, что для кодирования антигенсвязывающих рецепторов Т- и В-клетками используется один и тот же пул генов *Igh-V*¹. Попытки аналогичным образом обнаружить на поверхности Т-лимфоцитов детерминанты каркасной части VL привели к противоречивым результатам, так что в настоящее время нет надежных данных о том, принимают ли VL участие в образовании Т-клеточных рецепторов или нет.

Из соображений здравого смысла и на основе цитированных выше данных, указывающих на роль генов иммуноглобулинов в формировании Т-клеточных рецепторов, были сделаны попытки получить антисыворотки, специфичные к аллотипам или аллельным вариантам Т-клеточных рецепторов. Это достигалось иммунизацией *Igh*-конгенных линий мышей активированными Т-клетками различных типов. Изучение свойств полученных антисывороток и моноклональных антител оказалось весьма плодотворным в двух отношениях. Во-первых, были получены новые данные, свидетельствующие в пользу участия генов иммуноглобулинов в образовании Т-клеточных рецепторов; во-вторых, результаты экспериментов позволили предположить, что различные функциональные классы Т-клеток предпочитают экспрессировать рецепторы с определенными Т-клеточными аллотипами. Таким образом, рецепторы Т-клеток могут нести аллотипические детерминанты, которые, подобно аллотипам иммуноглобулинов, экспрессируются на структурно-различных константных областях, выполняющих разные функции². Изучение экспрессии детерминант данного типа на выделенных Т-клеточных факторах с разной функциональной активностью

¹ См. примечание на стр. 394.

² Связь указанных детерминант разных функциональных подклассов Т-лимфоцитов с их рецепторами не доказана. Поскольку гены этих детерминант сцеплены с геном С иммуноглобулинов (хромосома 12), то следует полагать, что они не имеют отношения к генам Т-рецепторов, а их продукты — к константным областям Т-рецепторов.— Прим. ред.

дало возможность предположить, что эти изотипические маркеры в действительности связаны с различными функциями Т-клеток, хотя такая связь может и не быть абсолютной.

Данные, указывающие на возможность существования многочисленных изотипов Т-клеточных рецепторов¹, были получены с помощью моноклональных антител, индуцированных в опытах с конгенными мышами. Антитела одного такого типа связывались с четырьмя разными видами молекул Т-клеточной мембраны, которые, как и предполагалось, представляют собой изотипы Т-клеточных рецепторов, несущие различные аллельные маркеры. Эти четыре разновидности молекул были обозначены как Tpre, Tthy, Tind и Tsu. Они кодируются генами, находящимися в коротком сегменте хромосомы 12 (IgT-C), расположенным между локусами, кодирующими Igh-1 и преальбумин, на расстоянии около двух сантиморганид от Igh-1 в сторону теломера. Существуют некоторые функциональные ограничения для экспрессии изотипов. Например, у цитотоксических и хелперных клеток эти антигены не экспрессируются, у клеток Lyt1⁺2⁻ предпочтительно экспрессируются Tind, а у клеток Lyt1⁻2⁺ — Tsu. Однако на уровне клонов эти ограничения не являются абсолютными. Можно найти отдельные клоны клеток Lyt-2, экспрессирующих Tind, или клеток Lyt-1, экспрессирующих Tsu. По-видимому, на поверхности регуляторных клеток могут экспрессироваться любые изотипы, но при клонировании у различных субпопуляций возникает предпочтение к определенным изотипам. В указанном районе хромосомы 12 может оказаться значительное количество еще не описанных изотипов. Многие Т-клетки не экспрессируют ни одной из этих детерминант. Не исключена и другая ситуация, когда некоторые субпопуляции Т-клеток экспрессируют рецепторы других типов, кодируемые где-либо в другом месте генома.

Экспрессия Т-клеточных изотипов может иметь некоторые общие черты с экспрессией В-клеточных изотипов. Порядок появления изотипов в иммунокомпетентных клетках коррелирует с порядком их появления в период онтогенеза: Tpre — самый ранний поверхностный маркер, Tthy обнаруживается в течение непродолжительного времени после рождения, Tind появляется между 2-м и 3-м, а Tsu — между 5-м и 6-м днями. В том же порядке эти маркеры экспрессируются при развитии Т-клетки. Приведенные факты наводят на мысль о комплексе генов, организованных аналогично генам константной части иммуноглобулинов, где порядок экспрессии изотипов при созревании и в период онтогенеза соответствует порядку генов в хромосоме. Генетическая карта района IgT-C представлена на рис. 11.1.

То, что эти антитела действительно реагируют с антигенсвязывающими белками, было продемонстрировано в нескольких исследованиях. Во-первых, выяснилось, что эти антитела блокируют связывание идиотипа специфическими к данному идиотипу Т-супрессорами. Во-вторых, некоторые из этих антител реагируют с аффинно-очищенными антигенсвязывающими молекулами из клонированных Т-клеток и (или) Т-клеточных гибридов. В-третьих, было показано, что эти антитела могут быть использованы для очистки специфических антигенсвязывающих факторов супрессии и амплификации. Кроме того, они применяются для очистки антигенсвязывающей полипептидной цепи фактора супрессии, который образуется *in vitro* при трансляции соответствующей мРНК. Наличие у данных антител описанных свойств служит убедительным доводом

¹ До сих пор обнаружены два гена константной области бета-цепи Т-клеточного антигенного рецептора и лишь один ген его альфа-цепи. Как Т-хелперы, так и цитотоксические Т-лимфоциты могут экспрессировать либо один, либо другой ген С бета-цепей. Трудно представить, что будет обнаружено много изотипов пептидных цепей рецептора. — *Прим. ред.*

в пользу идеи, согласно которой вблизи от группы генов *Igh* находится участок, кодирующий некий фрагмент Т-клеточного рецептора¹. Эти антитела могут оказаться пригодными при изучении зависимости между структурами Т-клеточных изотипов и функцией соответствующих субпопуляций Т-клеток.

Другой способ получения антисывороток против антигенсвязывающих молекул Т-клеточного происхождения — это выделение таких молекул с помощью аффинной хроматографии и их использование для иммунизации животных других видов. Подобные гетероантитела выделены уже в нескольких лабораториях, и полученные с их помощью результаты в нескольких случаях были проверены в перекрестных опытах. Такие антисыворотки осаждают в основном

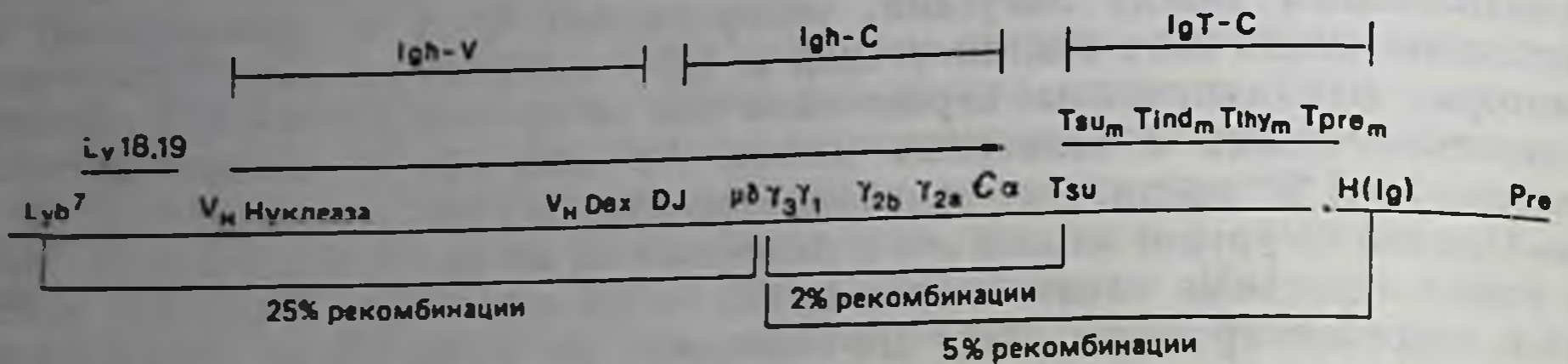


Рис. 11.1. Схематическое изображение участка мышечной хромосомы 12 от гена *Lyb-7* до гена, кодирующего преальбумин (*Pre*).

Показано расположение кластеров генов *Igh-V*, *Igh-C* и *IgT-C*, а также расстояния по карте между маркерными локусами.

молекулы с мол. массой 68 000 Да; при этом обнаруживается полный иммунологический перекрест. Многие из сывороток реагируют со значительной частью периферических Т-клеток и слабо взаимодействуют с тимоцитами. Такие сыворотки могут быть использованы для разделения или классификации Т-клеточных изотипов, не обнаруживаемых с помощью моноклональных антител, а также препаративного выделения Т-клеточных антигенсвязывающих молекул. Недостаток данных сывороток заключается в необходимости постоянно и тщательно контролировать их специфичность в течение всего времени приготовления, так что по надежности они уступают аналогичным моноклональным антителам. С другой стороны, подобные гетероантисыворотки узнают детерминанты, общие для всех линий мышей и крыс, в то время как получение моноклональных антител к этим детерминантам затруднено, за исключением, быть может, случаев, когда производится иммунизация Т-клетками бестимусных (*nude*) мышей. Поэтому с помощью таких сывороток можно получить информацию, недоступную нам при работе с моноклональными антителами.

Результаты некоторых исследований наводят на мысль, что в узнаваемых структурах на поверхности Т-клеток могут присутствовать фрагменты, кодируемые генами *MHC*. В одном из примеров было показано, что полипептид с мол. массой 25 000 Да, выделенный из определенного клона, связывает антиген, а также имеет идиотипическую детерминанту и антигенные детерминанты, кодируемые генами *I-J*. Характерен ли этот полипептид только для данного клона или же он имеется и у нормальных клеток, в настоящее время пока не ясно. В другом случае фактор, секретлируемый индукторами супрессии по типу обратной связи, имел антигенные детерминанты, кодируемые участками, расположенными как в хромосоме 12, так и в хромосоме 17 (*I-J*). Поскольку у моле-

¹ Такое предположение не соответствует действительности, поскольку гены иммуноглобулинов и Т-рецепторов локализованы в разных участках генома. — *Прим. ред.*

кул, продуцируемых Т-клетками радиационных химер, ни один из маркеров не изменен, при том, что во фрагменте данной полипептидной цепи, отвечающем за узнавание собственных антигенов, есть изменения, существует предположение, что этот полипептид образован продуктами двух несцепленных между собой генов. Каким образом это достигается, неизвестно. Очевидно лишь одно: для выяснения механизмов образования таких молекул необходимо более детальное изучение их структуры и молекулярно-генетических аспектов их синтеза.

Наконец, имеется ряд данных, свидетельствующих о том, что продукты генов *Lyt-2*, по-видимому, принимают участие в узнавании Т-клеток, поскольку антитела против *Lyt-2* могут блокировать функцию цитотоксических эффекторных клеток. Хотя гены *Lyt-2*, по-видимому, недостаточно вариабельны, чтобы обеспечить возможность распознавания индивидуальных антигенов, они тем не менее могли бы определять структуру каких-либо инвариантных частей рецептора. С другой стороны, не исключено, что продукт гена *Lyt-2* необходим лишь для функционирования рецепторов и не принимает участия в узнавании. То, что ген *Lyt-2* локализован очень близко к группе генов κ -легкой цепи в хромосоме 6, а также то, что гены *Tpre*, *Tthy*, *Tind* и *Tsu* расположены в хромосоме 12 близко к *Igh*, может оказаться существенным. Тот факт, что гены λ -легкой цепи располагаются в хромосоме 16, в большей части которой не обнаружено известных генетических маркеров, вызывает естественный вопрос: а не может ли быть, что хромосома 16 кодирует еще не идентифицированные Т-клеточные антигенсвязывающие молекулы?

Из серологических исследований стало очевидным, что есть очень много вопросов, на которые мы не можем дать окончательный ответ. Проблема осложнилась еще более, когда выяснилось, что покоящиеся клетки и Т-клеточные гибридомы образуют очень мало антигенсвязывающих молекул в расчете на одну клетку. Ранние данные по структуре иммуноглобулинов в большинстве случаев были получены при изучении миеломных белков, а более поздние данные — при изучении моноклональных иммуноглобулинов, секретлируемых клетками гибридных линий. Миеломные Т-клеточные линии неизвестны, а Т-клеточные гибриды секретируют не намного больше антигенсвязывающих молекул, чем покоящиеся клетки. Это, однако, не означает, что Т-клетки не могут секретировать факторы в больших количествах. Необходимы более совершенные методы идентификации и количественной оценки клеточных продуктов. Вероятно, имеет смысл осуществить получение моноклональных антирецепторных антител с помощью конгенных мышей и крыс (поскольку это позволит как охарактеризовать соответствующие молекулы, так и обнаружить их в системе трансляции *in vitro*) и исследовать клеточные популяции, экспрессирующие или секретирующие эти молекулы, что в целом даст возможность сопоставить данные молекулярной генетики с функцией разных клеток при сложных иммунных ответах. Различные антисыворотки и моноклональные антитела, которые, как предполагается, реагируют с Т-клеточными рецепторами или влияют на функцию Т-клеток, приведены в табл. 11.3¹.

¹ Первым этапом в изучении Т-клеточных антигенных рецепторов было получение в 1982—1983 гг. моноклональных антител, способных, с одной стороны, реагировать лишь с определенными клоонами Т-лимфоцитов, а с другой — тормозить антигенспецифическую активацию этих клеток. С помощью этих антирецепторных антител были выделены и изучены молекулы предполагаемого антигенного рецептора Т-клеток (Брондз Б. Д., Т-лимфоциты и их рецепторы в иммунологическом распознавании. М., Наука, 1987). — *Прим. ред.*

Таблица 11.3. Антитела против предполагаемых Т-клеточных рецепторов ¹⁾

Антисыворотки или антитела	Взаимодействие с Т-клетками или их продуктами	Генетическое сцепление ²⁾	Осаждаемые молекулы ⁴⁾	Источники данных
Антиидиотипические антитела				
Анти-(Льюис-анти-DA)	Lewis Т-клетки, аллореактивные по отношению к DA	<i>Igh</i>	70 (45, 25)	[3]
Анти-НФ ^b -(M) ¹⁾	НФ-связывающие молекулы, выделенные из Т-клеток	<i>Igh</i>	150 (75)	[1, 32]
Анти-T15 (M)	ФА-специфические Th- и T _{отг} -клетки	<i>Igh-V</i>		[33]
Анти-A5A	A-СНО-специфические Th-клетки	<i>Igh-V</i>		[34]
Анти-Nase	Nase-специфические Th-клетки	<i>Igh</i>		[1]
Анти-(CBA анти-B6)	CBA-Т-клетки, аллореактивные по отношению к H-2 ^b	<i>Igh-V</i>		[35]
Анти-(B6 анти-SJL)	B6 Т-клетки, аллореактивные по отношению к H-2 ^a	<i>Igh-V</i>		[36]
Антитела против мышечных антител к эритроцитам барана	Специфический TsF эритроцитов барана и Ly2-розетки эритроцитов барана	<i>Igh</i> + MHC	75 (62, 50)	[37]
Анти-A-анти-B6AF1	Пролиферирующие клоны A-анти-B6AF1-клеток	?		[39]
Анти-(B6-анти-H-2 ^d клон) (M)	Клоны D ^d -специфических цитотоксических эффекторных Т-клеток	?		[40]
Антитела к каркасной части вариабельной области антител				
Анти-VH	Т-хелперы, фактор индукции, факторы супрессии, молекулы из НФ-связывающих Т-клеток	<i>Igh-V</i>		[41, 42]
Анти-VL	0	<i>Igλ-V</i>		[41]
Аллотипические антитела против Т-клеток				
Анти-T _{pre} (M)	Пре-Т-клетки	<i>IgT-C</i>		[43]
Анти-T _{Thy} (M)	Пролиферирующие тимоциты	<i>IgT-C</i>	75	[44]
Анти-T _{su} (M)	Супрессорные Т-клетки; блокируют идиотипическое связывание	<i>IgT-C</i>	68	[8, 45]
Анти-T _{ind} (M)	Индукторные Т-клетки	<i>IgT-C</i>	62	[8, 46]
BALB/c-анти-C B.20 (M)	Антиген-специфические супрессорные клетки, TsF	<i>Igh</i>	68	[47]
BALB/c-анти-C, B20 (M)	Т-амплификаторы, TaF	<i>Igh</i>		[47]
Кроличьи анти-(CBA-анти-B6)-антитела	CBA-клетки-Ly1 (Ia-реактивные)	<i>Igh</i>	75	[36]

Продолжение табл. 11.3

Антисыворотки или антитела	Взаимодействие с Т-клетками или их продуктами	Генетическое сцепление ²⁾	Осаждаемые молекулы ⁴⁾	Источники данных
Гетерологичные антисыворотки против Т-клеточных рецепторов				
Кроличьи анти-(Льюис-анти-DA)-антитела	Т-клетки, идиотипы Т-клеточного происхождения, TsF (мышь и крыса)	Нет	68, (45, 25)	[48, 49]
Баранья антисыворотка против мышечных TsF—бараньи эритроциты	Антигенсвязывающие белки Т-клеточного происхождения, TsF (из мыши и крысы)	»	68 (45, 25)	[49, 50]
Кроличьи анти-TNP-TsF	Т-клетки, антигенсвязывающие белки Т-клеточного происхождения (из мыши и крысы)	»	68 (45, 25)	[49, 51]
Аллоантитела				
Анти-I-J (M)	Т-клетки, различные факторы Т-клеточного происхождения (см. табл. 11.4)	<i>I-J</i>	33, 34	[52, 53]
Анти-I-Ai (M)	Т-амплификаторы, TaF	<i>I-A</i>	33, 35	[54]
Анти-Lyt-2 (M)	Супрессорные Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, аллогенные Т-хелперы; блокируют функционирование Т-клеток	<i>Lyt-2,</i> <i>IgK</i>		[55]

1) (M) — имеются в виде моноклональных антител.

2) Молекулы или функциональные субпопуляции Т-клеток, реагирующие с данными антителами.

3) Показаны только гены, необходимые для экспрессии соответствующего Т-клеточного маркера.

4) Молекулярная масса (Da × 10⁻³) молекул (в скобках — основных продуктов расщепления этих молекул), выделенных с помощью данных анти-

11.5. Исследования структуры антигенсвязывающих молекул Т-клеточного происхождения

Из предыдущего очевидно, что проведенный функциональный анализ специфичности Т-клеток поставил новые вопросы относительно природы антигенсвязывающих Т-клеточных молекул. Являются ли структуры, узнающие свои и тест-антигены, одной или двумя независимыми единицами? Секретируют ли Т-клетки антигенсвязывающие молекулы, и если да, то какое эти молекулы имеют отношение к рецепторам антигена на поверхности клеточной мембраны? Последний вопрос в случае В-клеток оказался довольно простым, так как растворимые формы В-клеточных антигенсвязывающих молекул (иммуноглобулинов) присутствуют в сыворотке в относительно больших количествах. Поскольку иммуноглобулины имеют общие (изотипические) антигенные детерминанты, использование антиизотипических сывороток оказывается важнейшим методом обнаружения мембранных иммуноглобулинов как В-клеточных рецепторов для антигена.

Попытки с помощью антител к иммуноглобулинам показать, что последние служат также для узнавания антигена у Т-клеток, дали противоречивые результаты. Теперь уже ясно, что Т-клетки не синтезируют молекул, имеющих известные детерминанты тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов. Однако, как обсуждалось ранее, с помощью антител к детерминантам переменных районов тяжелых (а в некоторых случаях и легких) цепей иммуноглобулинов можно идентифицировать определенные молекулы, присутствующие на клеточной мембране и высвобождающиеся Т-клетками. Являются ли такие молекулы структурами, узнающими антиген?

Не могли ли мы, используя этот подход, обнаружить тех компонентов, которые специфически связывают антиген, но не несут детерминант, одинаковых с детерминантами В-клеточных иммуноглобулинов?

Возможное решение данной проблемы связано с идентификацией Т-клеточных продуктов, специфически связывающих антиген. Для этого были предложены два подхода. Иммунизированные Т-клетки, как было показано, секретируют растворимые продукты, обладающие антигенной специфичностью и, кроме того, выполняющих во многих случаях иммунорегуляторную функцию (табл. 11.4). Антигенсвязывающие и серологические свойства этих молекул можно выявить с помощью сорбции и элюции на антигенных и (или) аффинных колонках. Некоторые сведения о размере этих молекул удалось получить с помощью биологического тестирования фракций, получаемых методом гель-фильтрации. Кроме того, были проведены опыты, в которых чувствительные к антигену Т-клетки и Т-клеточные гибриды метили путем включения ^3H - или ^{35}S -аминокислот в синтезирующиеся белки, и полученные в результате меченые белки (которые либо секретировались клетками, либо были экстрагированы из них) адсорбировали на колонках с антигеном. Связавшиеся белки затем анализировали с помощью гель-хроматографии или электрофореза в полиакриламидном геле. Молекулы, выделенные таким способом, можно, кроме того, проверить на наличие серологических детерминант.

Данные, полученные в результате всех этих исследований, весьма противоречивы. Например, молекулярная масса антиген-специфических молекул Т-клеточного происхождения в неденатурирующих условиях колеблется в интервале от 25 000 до 150 000 Да. Наиболее согласующиеся между собой минималь-

ные значения молекулярной массы этих молекул в восстанавливающих условиях составляют 68 000—75 000 Да, причем они могут образовывать мультимерные комплексы, связываясь между собой с помощью нековалентных и (или) ковалентных взаимодействий. Ни одна из этих молекул не имеет изотипических детерминант, характерных для иммуноглобулинов. В ряде случаев они обладают антигенными детерминантами, сходными с детерминантами вариабельных областей иммуноглобулинов. Среди иммунорегуляторных молекул есть и такие, которые, по-видимому, имеют МНС-детерминанты, однако в сообщениях, описывающих такие молекулы, говорится о том, что эти молекулы не являются антигенсвязывающими. Может оказаться, что несущая МНС-детерминанты молекула придает некую эффекторную функцию находящейся с ней в комплексе антигенсвязывающей молекуле. Возможно, что аналогичная ситуация имеет место при ассоциации В-клеточных иммуноглобулинов с компонентами комплемента, кодируемыми МНС.

Один из наиболее интересных и многообещающих подходов в исследовании Т-клеточных антигенсвязывающих молекул включает в себя выделение таких молекул из Т-клонов и Т-гибридов, которые связывают антиген, процессированный макрофагом, несущим соответствующие (свои) Ia-антигены. Такой обработанный в макрофаге антиген, по-видимому, имеет Ia-детерминанты, поскольку он сорбируется на колонках с антителами против Ia-белков. Тем не менее следует ожидать, что выделенные из Т-клеток антигенсвязывающие белки будут сорбироваться на колонках с нативным антигеном, а растворимый антиген будет подавлять эту сорбцию. Кроме того, при сравнении эволюционных вариантов тест-антигена относительная прочность их связывания с данными Т-клеточными молекулами должна бы коррелировать с относительной способностью стимулировать пролиферацию клонированных Т-клеток. Результаты этих экспериментов, однако, довольно загадочны. Т-клетки, из которых выделяются белки, не связывают свободного антигена, а свободный антиген не может ингибировать связывание процессированного антигена. Несмотря на это, выделенные антигенсвязывающие молекулы связываются со свободным антигеном с относительно высоким аффинитетом (сродством). В настоящее время нет очевидного объяснения данного парадокса, однако полученные результаты дают основание думать, что Ia-узнающие Т-клетки имеют отдельный связывающий участок, специфичный по отношению к нативному тест-антигену.

Характерная особенность многих из этих антигенсвязывающих белков заключается в их крайней неустойчивости к действию протеиназ. Молекулярная масса основных продуктов расщепления составляет 45 000 и 25 000 Да, что свидетельствует о чувствительности доменов к протеиназам. Из полученных сравнительно недавно результатов следует, что протеолитическое расщепление фактора супрессии требуется для индукции супрессорной функции, осуществляемой фрагментом с мол. массой 45 000 Да, в то время как фрагмент с мол. массой 25 000 Да обладает специфичностью по отношению к антигену. Кроме того, некоторые клетки могут синтезировать полипептидные цепи с мол. массой 45 000 Да, которые ассоциируют с полипептидами еще большей молекулярной массы, влияя на их биологическую активность. Не исключено, что, подобно иммуноглобулинам, антигенсвязывающие белки Т-клеток имеют разновидности с неодинаковой структурой и различными изотипическими свойствами. К тому же многие из этих белков сильно гидрофобны. Одна из причин столь большого количества отрицательных и противоречащих друг другу результатов, может, в частности, объясняться лабильностью и гидрофобностью изучаемых молекул, что затрудняет их выделение и характеристику.

Таблица 11.4. Т-клеточные антигенсвязывающие молекулы

Источник	Форма существования		Специфичность 1)		Мол. масса 2) (Mr) ² (×10 ⁻³)
	мембранно-связанная	секретруемая	к тест-антигенам	к своим антигенам	
Т-клетки селезенки (крысы), нормальная сыворотка	+	+	Чужие Ia	(свои Ia)	70, (45, 25)
Алореактивные Т-бласты	+	+	то же		75, (62, 40, 25, 15)
ТНФ-С1-сенситилизованы		+	ТНФ		68
Ly1		+	?		68
TNBS-сенситилизованы		+	Эритроциты барана		68
Иммунокомпетентные Ly1		+	Неизв. Эритроциты барана	Igh-V I-J	68 (45, 25)
Иммунокомпетентные Ly2		+			
Клонированный Ly2-супрессор		+	Бычий инсулин	I-A	68 (45, 25)
Клонированный Ly1-хелпер		+	Инулин KLN	I-J	45, 33
Т-клеточный гибрид (345—704)	+	+			
Т-клеточный гибрид (F10)	+	+	? KLN	?	
Т-клеточный гибрид (258C4.4)		+	GAT		25
Т-клеточный гибрид (F12)		+	Arc	(Igh-псевдо)	
Т-клеточные гибриды		+	НФ ^b -идиотип	I-J, Igh	
Т-клеточный гибрид		+	НФ	I-J, Igh	
Т-клеточный гибрид		+	Arc		92
Т-клеточный гибрид		+	CGG	I-A	
Иммунокомпетентные Т-клетки		+	TGAL		30—60
Иммунокомпетентные Т-клетки	+	+	НФ	?	150, 75
Иммунокомпетентные Т-клетки	+		L (Glu ⁶⁰ Ala ⁴⁰)	?	66
Т-клетки селезенки, тимуса	+		Неизв.	?	68 (45, 25)

1) Специфичность по отношению к тест-антигену определяли по прямому связыванию с антигеном; тестов, за исключением Льюис-анти-DA-молекул, которые, как было показано, связывают с низким

2) Молекулярная масса, выраженная в тысячах дальтон. Соединения, значения молекулярных размеров молекулы [59].

3) Наличие антигенных детерминант обнаруживалось с помощью: Igh-V: антиидиотипических антигенных детерминант — демонстрацией отсутствия взаимодействия с различными анти-МНС-антителами или моноклональными антителами.

4) Существуют в виде двух ковалентно-несвязанных цепей, причем для проявления биологической активности могут оказаться продуктами как одной, так и двух разных клеток.

5) Существуют в виде двух субъединиц, которые в мембранно-связанной форме не связаны ковалентно.

Наличие антигенных детерминант ^{a)}						Эффекторная функция	Литература
Igh-V		Igh-C	IgT-C — с помощью		MHC		
идиотипических	VH		моноклональных антител	гетероантисывороток			
+		—		+	—	Аллореактивность (Льюис-анти-DA)	[1, 48, 56]
+		—		+	—	Аллореактивность	[36]
				+	— ⁴⁾	Супрессия ГЗТ	[57]
		—		—	— ⁴⁾	Индукция супрессии по принципу обратной связи	[58]
		—		—	— ⁴⁾		
+		—		+	I-J ⁴⁾	Супрессия Ly1Th	[23, 38]
+		—		+	—	то же	[24, 59]
	+	—	+		—	Активация В-клеток по ТНФ-инсулину	[13]
		—			— ⁵⁾	Активация клеток Ly12 для супрессии ТНФ-KLH-ответа	[60, 61]
		—			I-J ⁵⁾		
		—	+		I-At	Вторичное увеличение ТНФ-KLH	[62]
+		—			I-J	Индуктирует GAT-специфическую супрессию	[20]
+		—	+		I-J	Активирует Ts2 в АрС-специфической супрессии	[63]
		—			I-J	Активирует Ts3 в НФ-специфической супрессии	[64]
+		—			I-J	TsF3 : НФ-специфическая супрессия ГЗТ	[65]
+		—			—	Подавление образования антител при иммунном ответе	[66]
+	+	—			I-A/I-E	Фактор индукции	[67]
+	+	—			I-A	то же	[68, 69]
+	+	—	+	+	—	Неизвестна	[33]
		—				»	[70]
	+	—		+	—	»	[2, 49]

специфичность по отношению к собственным антигенам определялась с помощью функциональных средств собственные Ia-цепи [56].

масс которых даны в скобках, являются, по-видимому, продуктами расщепления большей

по антител (анти Id) или антител против каркасной части VH (анти-VH); Igh-C: антител (где это указано), Igh-C-зависимых или гетероантисывороток (во всех случаях) (см. табл. 3); MHC:

лами. В положительных случаях указаны субстраты, с белками которых реагируют данные антисывороточной активности необходимы обе цепи. Факторы, совместное действие которых вызывает супрессию, лентно друг с другом, а в секретируемой соединены дисульфидной связью. Дисульфидная связь не яв-

Поскольку стандартные биохимические подходы к изучению этих молекул оказались слишком трудоемкими и поскольку возможности молекулярно-генетических методов непрерывно растут, именно от последних следует ожидать наиболее интересных результатов¹.

11.6. Молекулярно-генетические подходы к изучению Т-клеточных рецепторов

Согласно ряду данных, в Т- и В-клетках функционируют одни и те же гены *Igh-V*. Кроме того, между локусами *Igh-C* и *Pre* обнаружен кластер генов *IgT-C*, которые, по-видимому, кодируют константную часть Т-клеточных рецепторов². Отсюда следует, что в Т-клетках гены *Igh-V* должны в результате перестроек вплотную примыкать к генам аналогично тому, как это происходит в В-клетках при формировании полных генов тяжелых цепей. Это в свою очередь предполагает наличие в Т-клетках перестроек и (или) делеций генетического материала у тех генов, которые лежат между генами *Igh-V* и *IgT-C*, т.е. у генов D_H и J_H и *Igh-C*. Попытки обнаружить такие перестройки были предприняты в нескольких лабораториях, и результаты оказались полностью отрицательными. Хотя перестройки генов внутри данного участка хромосомы и наблюдались в Т-лимфомах, Т-клеточных гибридах и в некоторых клонах Т-клеток, ни в одном случае не было показано, что они связаны с функцией этих клеток, и, кроме того, они происходили не во всех Т-клетках. Следовательно, эти перестройки, по-видимому, не существенны для формирования Т-клеточных рецепторов. Данная ситуация, очевидно, отлична от той, которая имеет место у В-клеток.

Руководствуясь теми же соображениями, в некоторых лабораториях попытались обнаружить перестройки генов *Igh-V* в клонированных Т-клетках. Это делалось с помощью *Igh-V*-специфических зондов, которые были получены из миелом или гибридом, секретирующих антитела, имеющие те же идиотипические детерминанты и антигенную специфичность, что и клонированные Т-клетки. Этот подход пока не увенчался успехом вопреки предположению, что если Т-клетки используют те же самые гены *Igh-V*, что и В-клетки, то мРНК Т-клеточных рецепторов должна прочно связываться с соответствующими зондами.

Означают ли эти результаты, что Т-клетки не используют те же гены *V*, что и В-клетки? На этот вопрос нельзя ответить до тех пор, пока кому-нибудь не удастся выделить и картировать ген, кодирующий антигенсвязывающий

¹ Согласно современным данным, молекула антигенного рецептора Т-лимфоцитов является гликопротеином, построенным из двух полипептидных цепей (альфа и бета), имеющих сходные размеры и организацию. К каждой из них присоединено по три углеводных компонента, составляющих в целом до трети всей массы молекулы. Полипептидные цепи построены из вариабельной (V) и константной (C) областей, короткого соединяющего пептида, трансмембранного участка (20—24 остатка) и цитоплазматической области (5—12 остатков). V-область складывается из вариабельного (V) сегмента в 88—98 остатков и соединяющего (J) сегмента в 14—21 остатков, а у бета-цепи имеется еще D-сегмент (12 остатков). Около C-конца обеих цепей находятся остатки цистеина, участвующие в образовании дисульфидного мостика между цепями. Пространственная укладка обеих областей полипептидных цепей сходна с таковой у доменов иммуноглобулинов: преобладает бета-складчатость с антипараллельным ходом цепи. Соответствующие области цепей образуют пары, причем V-области образуют участки, контактирующие с комплексом антиген — белок МНС. V-области являются высоковариабельными. Вариабельность этих областей у обеих цепей рецептора неодинакова (Krogberg M. et al., Ann. Rev. Immun., 1986, 4, 529—592). — Прим. ред.

² Группа генов между локусом *Igh-C* и локусом преальбумина не имеет отношения к генам Т-рецепторов, локализованных в иных хромосомах (или их участках), чем гены *Igh*, и не перестроенных в В-лимфоцитах. — Прим. ред.

участок Т-клеточного рецептора.¹ Тем не менее уже сейчас можно предложить разнообразные модели, которые могут примирить, с одной стороны, результаты серологических исследований, недвусмысленно указывающие на то, что в В- и Т-клетках рецепторы кодируются генами, принадлежащими одному и тому же семейству, а с другой — молекулярно-генетические данные, согласно которым в лимфоидных клетках этих типов для кодирования рецепторов используются разные семейства генов. Например, согласно одной из моделей, Т-клетки в действительности используют гены *Igh-V*, однако генетические перестройки, приводящие к образованию транскрибируемого гена рецептора, представляют собой не делецию, а обмен сестринских хроматид, так что при этом конфигурация *Igh*-блока генов в Т-клетках, по-видимому, не меняется. Можно также допустить, что Т-клетки при формировании гена рецептора используют разные соединяющие гены, а возможно, и разные *D*-сегменты, чем обеспечивается необходимое разнообразие рецепторов. Например, предположительно существующий ген *J* мог бы иметь спейсер размером 12 нуклеотидных пар между своими гептамерными нонамерными соединяющими участками, что позволило бы при соединении с генами *Igh-V* обойтись без *D*-сегмента. Другая возможность заключается в том, что семейство генов *IgT* имеет свои собственные гены *V*, возникшие в результате дупликации или инверсии предковых генов *Igh-V*. Если данные гены действительно произошли от общего предка, то они могут оказаться очень похожими, хотя при независимой эволюции двух генных семейств следует ожидать и определенных различий между ними². Механизмы изменения генов могли быть такими, что участки, отвечающие за идиотипию и специфичность связывания антигена, сохранили достаточное сходство, в то время как другие кодирующие участки и фланкирующие районы значительно

¹ Сейчас уже много известно о генах, кодирующих пептидные цепи антигенного рецептора Т-лимфоцитов. Их организация оказалась сходной с таковой генов иммуноглобулинов. Гены альфа-цепей рецептора локализуются у мышей в хромосоме 14 (C — D), у человека в хромосоме 14 (g11—12), а гены бета-цепей у мышей и человека — соответственно в хромосомах 6 (B) и 7 (q32—35). Гены бета-цепи рецептора мыши расположены на расстоянии 10—12 сантиморганид от тесно сцепленных генов *Ly-2* и каппа-цепей иммуноглобулинов. У человека гены альфа-цепей расположены в одной хромосоме с генами тяжелых цепей иммуноглобулинов, но не сцеплены с ними тесно. V-области бета-цепей кодируются V и J-сегментами, а V-области бета-цепей — V, D- и J-сегментами. Объединение этих сегментов происходит в результате перестроек аналогично генным перестройкам сегментов, кодирующих V-области иммуноглобулинов. Механизм этих перестроек заключается либо в делеции определенных участков ДНК между сегментами, либо, как это показано в случае генов бета-цепей, в инверсии V-сегмента, который находится в противоположном транскрипционном положении по сравнению с J-сегментом. Варибельность V-областей обусловлена несколькими причинами. Во-первых, в гаметном геноме имеется много сегментов, формирующих полные гены этих областей (например, у мыши насчитывают не менее 100V-альфа, 30V-бета, 2D-бета, около 50 J-альфа и 12J-бета). Во-вторых, соединение этих сегментов не всегда идет одинаково и делеции нуклеотидов с конца сегментов приводят к изменениям кодонов в местах соединения сегментов. В-третьих, после соединения сегментов между ними обнаруживаются иногда аминокислотные остатки, которых нет ни в одном из сегментов. Хотя в случае генов V-альфа и V-бета не обнаружено соматических мутаций, столь характерных для генов иммуноглобулинов, количество полных V-генов Т-рецепторов может быть не меньше, чем генов иммуноглобулинов, и репертуар у обоих семейств белков, вероятно, сходен (Meuer S.C. et al., Ann. Rev. Immun. 2, 23—50, 1984; Davis M. M., Ann. Rev. Immun., 3, 537—560, 1985; Kronenberg M. et al., Ann. Rev. Immun., 4, 529—591, 1986). — Прим. ред.

² Гены иммуноглобулинов и Т-клеточных антигенных рецепторов принадлежат к двум близкородственным семействам, имеющим общее эволюционное происхождение. Цепи белков обоих типов обладают выраженной гомологией по первичной структуре, что особенно заметно в расположении остатков аминокислот, от которых зависят домен-доменные взаимодействия, а также в локализации внутренних дисульфидных мостиков, образующих петли, которые включают около 65 аминокислотных остатков. Третичная структура цепей обоих типов белков (в частности, доменный принцип строения) также сходна (Hood L. et al., Cell, 1985, 40, 225—229). — Прим. ред.

дивергировали, и в результате *IgT-V* оказались неспособными гибридизоваться с *Igh-V*-зондами. Наконец, нельзя забывать, что попытки обнаружить участие генов *Igh-V* в образовании Т-клеточных рецепторов до сих пор заканчивались неудачей не из-за отсутствия такого участка на деле, а вследствие технических трудностей. Например, если Т-клетка синтезирует свои рецепторы в очень небольших количествах, то с помощью *Igh-V*-зондов обнаружить соответствующую этим рецепторам мРНК довольно трудно, поскольку ее очень мало.

В последнее время в идентификации генов, кодирующих Т-клеточные рецепторы, достигнуты определенные успехи. Две различные группы (С. Тонегавы и А.Л.М. Ботуэлл, личное сообщение) получили некоторые предварительные данные, касающиеся перестройки генов *Igh-V* в клонах или гибридах Т-клеток. Эти перестраивающиеся гены еще не клонированы и не секвенированы, так что пока невозможно установить, участвуют ли они в формировании Т-клеточных рецепторов¹.

Второй подход, который, по-видимому, в скором будущем принесет определенные плоды, связан с идентификацией разных мРНК с помощью биологического тестирования продуктов их трансляции *in vitro*. Двум группам путем трансляции в этих условиях мРНК, выделенной из гибридов Т-супрессоров, удалось получить биологически активные факторы супрессии [20, 61]. Поскольку биологические тесты имеют высокую чувствительность, они позволяют анализировать очень небольшие количества исходного материала. Обнаружение биологической активности дает уверенность в том, что транслируемая *in vitro* мРНК имеет интактную структуру и сохраняет присущие ей функциональные свойства. Обе группы исследователей сообщили о том, что среди продуктов трансляции в данной системе найдены антигены, кодируемые *I-J*-субрайоном *MHC*. Наличие подобных антигенных детерминант определяется лишь аминокислотной последовательностью, а не представляет собой продукт аллель-специфического посттрансляционного гликозилирования (если, конечно, пренебречь возможностью автокатализа). Одна из групп исследователей также сообщила о наличии в данной системе трансляции полипептидной цепи, несущей антигенный маркер, кодируемый генами *IgT-C*, и обладающей специфичностью по отношению к антигену. Приведенные факты должны облегчить выделение и изучение свойств клонов кДНК, содержащих фрагменты генома Т-гибридов, что в свою очередь даст возможность идентифицировать гены, требующиеся для образования таких молекул, и определить возможные перестройки этих генов².

11.7. Теории образования Т-клеточных рецепторов

Из предыдущих частей данной главы ясно, что в настоящее время мы не можем описать Т-клеточный рецептор для антигена во всех деталях³. Это связано, по-видимому, с двумя основными причинами: сравнительным отсутствием

¹ Дальнейшее развитие работ С. Тонегавы и сотр. см. Cell, 1985, 40, 259—269; Nature, 1985, 316, 828—832.— Приж. ред.

² Проблема идентификации и перестройки генов Т-клеточных рецепторов разрешена в 1984 г. благодаря использованию иной стратегии: из набора клонов кДНК данного клона Т-лимфоцитов вычитали те клоны кДНК, которые гибридизуются с мРНК иммуноглобулина.— Приж. ред.

³ Большинство исследователей склоняется в пользу модели единого рецептора с участием связывания по меньшей мере с фрагментом процессированного антигена и участком молекулы *MHC*. Механизм активации Т-лимфоцитов — процесс, по-видимому, достаточно

активно секретирующих опухолевых Т-клеточных клонов, а также большой гетерогенностью разных типов Т-клеток, в каждом из которых в качестве рецептора потенциально может выступать свой собственный отличный от других молекулярный комплекс. На попытки предсказать, какую молекулярную структуру мог бы иметь Т-клеточный рецептор, уже затрачено много интеллектуальных усилий. Обсуждение в основном концентрировалось на рецепторах МНС-узнающих Т-клеток и привело к выводу, что одна и та же клетка способна узнавать как тест-антиген в комплексе со своим МНС, так и сам по себе чужеродный МНС. При этом остается неясным, имеет Т-клеточный рецептор один участок узнавания или два. В первом случае рецептор должен узнавать комбинированную антигенную детерминанту, не обнаруживаемую ни на собственных МНС-молекулах, ни на тест-антигене, но образующуюся при их ассоциации (модель с одним участком связывания); во втором случае один из участков узнавания специфичен к тест-антигену, а другой — к собственным МНС, и для активации Т-клетки должно произойти узнавание обоими участками (модель с двумя участками связывания). Излишне говорить, что если мы выясним молекулярные структуры рецепторов всех классов Т-клеток, то, по-видимому, сможем ответить и на этот вопрос¹. Имеющимся сейчас экспериментальным данным одинаково удовлетворяют обе возможности.

Экспериментальные факты, подтверждающие предположение о существовании одного общего рецептора, узнающего новообразованную комбинированную антигенную детерминанту, можно разделить на две группы. Одна из них подтверждает наличие физической ассоциации между тест-антигеном и собственными МНС-молекулами, другие отрицают связывание с Т-клеточными рецепторами как в случае собственных МНС, так и в случае тест-антигена, даже если они присутствуют в высоких концентрациях.

Доказательства существования физической ассоциации между собственными МНС-молекулами и тест-антигеном получены в нескольких различных исследованиях, однако ни в одном случае доказательство не носит исчерпывающего характера¹. Наиболее убедительные данные касаются идентификации Ia-молекул, физически ассоциированных с тест-антигеном, а также экспериментов, в которых антиген, находясь в комплексе с Ia-белком, связывается и (или) активирует Т-клетки, специфические к данному антигену в комплексе с данным Ia-белком. Что представляют собой такие комплексы с химической точки зрения, неизвестно, однако изучение этого вопроса обещает привести к выяснению механизмов, благодаря которым антиген взаимодействует с Т-клеткой, безотносительно к тому, в какой форме он при этом находится. Следует отметить, что

сложный, поскольку в нем участвует, кроме двух цепей самого рецептора, еще так называемый ТЗ-белок. Он состоит из трех полипептидных цепей — гамма (25 кДа), дельта (20 кДа) и эпсилон (20 кДа) — и образует мультимерный комплекс с молекулой антигенного рецептора. Т-клетки могут быть активированы антигенами как к рецептору, так и к ТЗ-белку. Точная роль ТЗ-белка в процессе активации Т-клеток пока неизвестна. Кроме того, в Т-клетках найдено семейство так называемых гамма-генов, способных к перестройкам подобно альфа- и бета-цепям рецептора. Соответствующая полипептидная цепь обнаружена лишь недавно, но сами их гены изучены достаточно хорошо. Они напоминают гены других цепей рецептора, локализованы в хромосоме 13 (A2-3) мыши и 7 (p15) человека и перестраиваются, образуя полный V-ген из V-, J- и C-сегментов. У мыши найдено 3 гена C-гамма, не менее трех J-гамма- и несколько V-гамма-сегментов. Гамма-гены, вероятно, менее вариабельны, чем альфа- и бета-гены. Биологическая роль гамма-генов неизвестна (Quartermann T., Science, 231, 252—255, 1986; Weiss A., Ann. Rev. Immun., 4, 593—619, 1986). — Прим. ред.

¹ Опубликованы результаты ряда экспериментов, подтверждающие существование тесного взаимодействия между антигеном и Ia-белком (Babbit B. P. et al., Nature, 317, 359—361, 1985; Walls T. H. et al., Nature, 320, 179—181, 1986; Ashwell J. D., Schwartz R. H., Nature, 320, 176—179, 1986). — Прим. ред.

для этой цели нет необходимости выяснять структуру Т-клеточного рецептора, поскольку обнаружение физической ассоциации или даже серологически определяемых новых антигенных детерминант еще не доказывает, что Т-клеточный рецептор имеет один участок для связывания тест-антигенов и МНС-антигенов. Действительно, в некоторых моделях рецептора с незначительным связыванием этих антигенов предсказывается существование как раз таких физических ассоциаций, поскольку они повышают точность взаимодействия двух данных высокополиморфных структур, а это в свою очередь приводит к высокой точности узнавания тест-антигена Т-клеткой. Таким образом, следует ожидать, что факты, которые будут обнаружены при разработке данного направления, многое прояснят в том, что касается презентирования антигена, но ничего не скажут нам о структуре Т-клеточного рецептора.

Более серьезный аргумент в пользу рецептора с одним участком связывания у МНС-узнающих Т-клеток заключается в невозможности обнаружить связывание клонованными Т-клетками или только тест-антигена, или только Ia. Однако не исключено, что это отражает какие-то особенности постановки эксперимента, а не свойство самого рецептора, поскольку в последних исследованиях было отчетливо показано, что выделенные молекулы, секретлируемые клонами или гибридами МНС-узнающих Т-клеток, связываются со свободным антигеном и обнаруживают высокую специфичность по отношению к тест-антигену. Более того, некоторые группы исследователей утверждали, что обнаруженные связывание собственных МНС-молекул с Т-клетками или отдельными рецепторными молекулами этих клеток. Таким образом, данный аргумент, хотя и обоснован большим количеством данных, тем не менее также опровергается некоторыми исследованиями, в основном касающимися изучения антигенсвязывающих молекул, выделенных из Т-клеток. Неспособность интактных клеток связывать свободный антиген может объясняться условиями, в которых проводились данные эксперименты. Конечно, не исключено, что секретлируемые белки отличаются по своим антигенсвязывающим свойствам от рецепторных молекул, хотя это и кажется невероятным из-за одинаковой специфичности узнавания антигена клеткой и секретлируемыми ею продуктами. Более правдоподобным представляется то, что реально имеющее место связывание тест-антигена на поверхности Т-клетки почему-то не обнаруживается либо из-за низкой плотности антигенных рецепторов, либо из-за того, что они все время находятся внутри клетки, за исключением тех моментов, когда Т-клетка контактирует с АПК, несущей соответствующие собственные МНС-детерминанты. Таким образом, хотя и создается впечатление, что основная масса приведенных выше данных свидетельствует в пользу наличия лишь одного участка связывания у Т-рецептора, обнаружение Т-клеточных молекул, специфически связывающих растворимый антиген, представляет собой серьезный аргумент в пользу модели Т-клеточного рецептора с двумя участками связывания.

В пользу последней модели приводятся два аргумента: обнаружение одинаковых идиотипов у Т-клеточных рецепторов и иммуноглобулинов, специфических к той же антигенной детерминанте, а также определяющая роль тимуса в том, какие МНС-антигены будут узнаваться Т-клетками.

У Т-клетки, как уже говорилось, обнаруживаются одинаковые идиотипические детерминанты с антителами той же специфичности. Более того, гены, регулирующие экспрессию Т- и В-клеточных идиотипов, находятся в области *Igh-V*. Тем не менее имеются аргументы против простейшей интерпретации этих экспериментов, т.е. против предположения, что Т- и В-клетки используют одни и те же гены *V* для образования антигенсвязывающих молекул. Например, антитела против гормонов могут индуцировать появление антиидиотипических

антител, имитирующих гормоны в связывании с рецептором для гормона, который, несомненно, не кодируется генами *Igh-V*. Ни один из этих аргументов не может опровергнуть заключения, вытекающего из одинаковости идиотипов у В- и Т-клеток, специфичных к одной и той же антигенной детерминанте, т.е. того, что детерминанта определенно находится на самом тест-антигене. Если это так, то маловероятно, чтобы была правильной модель рецептора с одним участком связывания, утверждающая, что Т-клетка узнает новообразованную антигенную детерминанту, которой нет у тест-антигена. Основным недостатком экспериментов с антиидиотипами связан с природой характеризуемых клеток. Для большей части клеток, идиотипы которых, по имеющимся данным, совпадают с идиотипами антител, нет никаких данных о том, узнают ли они собственные МНС. Не исключено, что многие Т-клетки могут и не узнавать собственные МНС-антигены, что необходимо иметь в виду при оценке подобных данных.

Результаты многочисленных исследований тимусных химер (см. гл. 4, 6 и 15) говорят о том, что генотип донора тимуса определяет, какие МНС-антигены будут узнаваться как собственные аллогенными или семиаллогенными стволовыми клетками, созревающими в тимусе. Однозначность этих данных недавно была поставлена под сомнение при изучении бестимусных мышей (*nude*) с пересаженным им тимусом, в частности, тех, у которых имеются цитотоксические эффекторныe клетки¹. Однако цитотоксические клетки у этих животных, по-видимому, возникают в результате внетимусного созревания, и, следовательно, расхождение этих данных с общей тенденцией не так велико, как это может показаться. В любом случае обнаружение того факта, что именно МНС-антигены, экспрессируемые в тимусе, определяют, какие собственные МНС будут узнаваться (вероятно, с помощью какого-либо механизма селекции), дает основание думать, что по меньшей мере тимоциты, по-видимому, имеют независимые рецепторы для узнавания собственных МНС-молекул². Чтобы увязать этот факт с возможным отсутствием у Т-клетки рецепторов для узнавания собственных МНС, были предложены более тщательно разработанные схемы, отводящие определенную роль супрессорным Т-клеткам. Тем не менее эти данные очень легко укладываются в схему, согласно которой Т-клеточный рецептор имеет два участка узнавания, один из которых специфичен к тест-антигену, а другой — к собственным МНС-детерминантам³.

Остается дискуссионным вопрос о том, как следует объяснять аллореактивность в рамках таких схем. В модели рецептора с одним участком связывания,

¹ Зависимость генетической рестрикции функции Т-клеток от генотипа не своего, а того тимуса, в котором они созревали, установлена однозначно на разных моделях (включая пересадку тимуса бестимусным мышам) только в отношении Т-клеток хелперной группы, реагирующих на антиген в ассоциации с Ia-молекулой МНС класса II. Напротив, цитотоксические эффекторные клетки, созревшие в том же тимусе и распознающие антиген в ассоциации с молекулой МНС класса I, не имеют такого ограничения (исключением служит малая доля таких клеток, которые обнаруживаются не в периферической лимфоидной ткани, а в тимусе). — *Прим. ред.*

² Наличие рецептора к собственной молекуле МНС класса II установлено не только на тимоцитах, но и на периферических Т-клетках и выращенных из них клонах. — *Прим. ред.*

³ Получены убедительные данные в пользу того, что на одной и той же Т-клетке хелперной группы экспрессированы рецепторы двух типов. Один из них распознает антиген в ассоциации с молекулой МНС класса II (или саму по себе аллогенную Ia-молекулу), а второй — саму по себе сингенную Ia-молекулу. Взаимодействие рецептора первого типа (антигенраспознающего) с комплексом антиген + Ia-белок активирует Т-клетку и служит сигналом для экспрессии на ее поверхности рецептора второго типа. Контакт последнего с антигенной молекулой МНС класса II необходим для межклеточного кооперирования, что обеспечивает функцию как Т-супрессоров, блокирующих иммунный ответ, так и Т-хелперов, способствующих антителообразованию малыми (покоящимися) В-лимфоцитами. — *Прим. ред.*

например, просто утверждается, что аллоантигены очень похожи на собственные МНС-молекулы, модифицированные при взаимодействии с тест-антигеном. Что касается модели рецептора с двумя участками связывания, то на ее основе предложены схемы (хотя и более сложные), способные объяснить явление алло-реактивности. В основном они сводятся к одной из следующих возможностей: а) рецептор к собственным МНС с высоким сродством перекрестно реагирует с чужеродными МНС; б) рецептор к тест-антигену взаимодействует с высоким сродством с чужеродными МНС; в) оба участка узнают аллогенные МНС, связываясь при этом с двумя различными участками этих молекул.

11.8. Будущие вопросы, будущие ответы

Несомненно, что ответы на эти и другие вопросы, касающиеся Т-клеточных рецепторов к антигену и к собственным молекулам, будут в ближайшем будущем получены. Трудно, правда, сказать, когда конкретно это произойдет. В настоящее время во многих лабораториях последовательно проводится в жизнь программа исследований, которая в общих чертах обрисована ниже.

Первый этап, очевидно, заключается в клонировании необходимых Т-клеток, что может быть осуществлено либо выращиванием их *in vitro*, либо трансформацией вирусом, либо получением клонов гибридных клеток путем слияния с клетками злокачественной Т-клеточной лимфомы (см. гл. 30). Имеются примеры успешной реализации всех трех способов. Хотя условия выращивания некоторых Т-клеточных популяций изучены уже довольно хорошо, для значительной части Т-клеток еще предстоит получить индивидуальные клоны и охарактеризовать их, а это для начала потребует отработки условий роста неклонированных форм этих клеток. Представляется маловероятным, что все Т-клетки будут одинаково расти в ответ на одни и те же стимулы, а это затруднит регуляцию роста индивидуальных функциональных популяций Т-клеток.

Второй этап сводится к выделению специфических антигенсвязывающих белков из клонированных Т-клеток. Желательно показать, что данные молекулы не только связывают антиген, но также опосредуют какую-либо биологическую функцию, имеющую отношение к функционированию продуцирующей их клетки, так как это гарантирует, что молекула не просто прилипает к антигену, а обладает определенной иммунологической активностью. Хотя первичную структуру белка можно определить быстрее путем выделения и секвенирования кодирующих его фрагментов нуклеиновой кислоты, такие характеристики молекулы, как связывающая активность, структура субъединиц и их взаимное расположение, способность присоединяться к мембране и скорость обмена в разных условиях, могут быть определены лишь при изучении молекулы белка. Для этой цели весьма полезными окажутся моноклональные антитела. Их также можно будет использовать при изучении нормальных популяций лимфоцитов, в том числе в исследованиях *in vivo*.

Третий этап состоит в выделении информационной РНК, трансляции ее *in vitro* и доказательстве, что продукты трансляции сохраняют антигенсвязывающую и биологическую активности. Данная система может быть в дальнейшем использована для тестирования набора кДНК. Определив нуклеотидную последовательность клонированной кДНК, можно установить аминокислотную последовательность соответствующего белка, и, кроме того, эту кДНК можно использовать в качестве зонда для идентификации в геноме генов, кодирующих разные участки Т-клеточного рецептора. Другой возможный путь, позволяющий обойти этот этап, связан с использованием зондов для генов

VH для идентификации тех кДНК, которые, судя по всему, кодируют рецепторные молекулы. Этот подход предполагает идентичность или гомологию генов, кодирующих Т-клеточные рецепторы, и сегментов VH-генов. Наконец, с помощью антител против Т-клеточных антигенсвязывающих белков, возможно, удастся идентифицировать молекулы, образующиеся при трансляции *in vitro*, что дает, следовательно, еще один способ тестирования набора кДНК.

Если кДНК-зонд получен, то на уровне ДНК можно решать много разных задач. Помимо выделения и секвенирования генов, участвующих в формировании Т-клеточных рецепторов, хотелось бы знать, в каких хромосомах находятся фрагменты, кодирующие разные участки Т-клеточного рецептора, и имеют ли отношение к данному рецептору гены, о которых известно, что они кодируют антигенсвязывающие белки в других системах (например, иммуноглобулины). Поскольку гены иммуноглобулинов прежде, чем начать экспрессироваться, претерпевают перестройку, хотелось бы знать, используется ли в Т-клетках подобная стратегия, и если да, то включает ли она в себя перенос фрагментов ДНК из одной хромосомы в другую. Последний вопрос возник после того, как обнаружилось, что в хромосоме 12 кодируются идиотипические или аллотипические детерминанты тех молекул, которые несут также I-J-детерминанты, кодируемые хромосомой 17. Хотя в настоящее время считается, что в соматических клетках эти гены не переходят из одной хромосомы в другую, тем не менее, поскольку видимых препятствий для таких переходов нет, такую возможность необходимо учитывать. Явилось же полной неожиданностью, когда было обнаружено, что молекулы антител собираются из отдельных фрагментов, объединяющихся друг с другом в соматических клетках при перестройках ДНК. Наконец, кДНК-зонды можно будет с успехом использовать при изучении развития и дифференцировки Т-клеток. Выполняют ли Т-клетки, подобно В-клеткам, ряд функций, определяемых генами константной области, и изменится ли функция Т-клеток, специфичных к какому-либо антигену, в результате перестроек генов, которые приводят к экспрессии комбинированного антигенного рецептора, перестроенного таким образом, чтобы получилась новая функциональная константная область?

Альтернативный подход заключается в конструировании гибридных клеток, содержащих искусственно введенные гены Т-клеток. Трансфекция L-клеток или ооцитов Т-клеточной ДНК и последующее тестирование в этих клетках экспрессии продуктов, кодируемых введенным фрагментом ДНК, могут в принципе привести к быстрому выделению желаемого фрагмента ДНК. Этот подход имеет преимущество при изучении клеточных функций, которые могли бы утратиться при необходимости использования растворимого продукта. При использовании данного подхода клетка, несущая селективируемый маркер, трансформируется одновременно неким геном, использующим дефект генома клетки-хозяина и тотальной ДНК из Т-клеток, имеющих идентифицируемый рецептор. Из выживших клеток отбираются такие, которые экспрессируют соответствующий маркер.

Хотя такие перспективы молекулярно-генетического анализа Т-клеточных рецепторов кажутся весьма привлекательными, на некоторые вопросы можно получить более точные ответы с помощью других методов. Так, наличие Т-клеточных «изотип»-специфических реагентов или моноклональных антител позволяет выделить, охарактеризовать и клонировать эти клетки, а также уменьшать или увеличивать их содержание в клеточных популяциях, а это в свою очередь представляет собой единственный способ изучения связи структуры и функции на популяционном уровне, поскольку проведение молекулярно-генетического анализа предполагает гибель клетки. Кроме того, в некоторых случаях, чтобы

определить функцию белков, необходимо знать их внутриклеточную локализацию. Например, пре-B-клетки синтезируют μ -цепи, но не используют их в качестве поверхностных рецепторов, что было легко показано с помощью антител.

В заключение необходимо признать, что T-клеточный рецептор ныне так же неуловим, как и 10 лет назад. Мы не знаем ни его структуры, ни генов, которые его кодируют. Ситуация в некотором смысле стала даже более сложной, поскольку теперь мы понимаем, что T-клетки отличаются большим разнообразием и что их антигенсвязывающие молекулы также могут сильно отличаться друг от друга. Тем не менее значительные успехи, достигнутые в этой области, вселяют веру в то, что в ближайшее же время в исследовании структуры T-клеточных рецепторов и их разнообразия будет сделан существенный шаг вперед. Важнейшими направлениями исследований являются идентификация генов, кодирующих компоненты T-клеточного рецептора, и изучение генетических процессов, ведущих к образованию функциональных рецепторов, а также анализ узнавания T-клетками своих MHC-молекул и роли T-клеточных изотипов в функциях T-клетки. При таком анализе необходимо все время иметь в виду очень большую гетерогенность T-клеток, так чтобы избежать догматических утверждений о T-клеточном рецепторе вообще. Клонирование антителообразующих клеток (имеется в виду получение гибридом), функциональных T-клеток и фрагментов нуклеиновых кислот, по-видимому, позволит в будущем полностью решить данную проблему.

Благодарности

Авторы хотели бы поблагодарить своих многочисленных коллег, чьи работы, опубликованные и неопубликованные, легли в основу данной главы. Авторы также благодарят Carol Sanford за перепечатывание рукописи. Работа С. Janeway финансируется Howard Hughes Medical Institut и грантами AI-14579 и CA-29606 национальных институтов здоровья (NIH), R. Cone — грантами PCM-7921779 (NSF) и AI-16942 и CA-29606 (оба NIH), F. Owen — грантом AI-15262 (NIH).

ЛИТЕРАТУРА

1. Binz H., Wigzell H. Antigen binding idiotypic T cell receptors, *Contemp. Top. Immunobiol.*, 7, 113—117 (1978).
2. Cone R. E. Molecular basis for T lymphocyte recognition of antigens, *Prog. Allergy*, 29, 182—221 (1981).
3. Eichmann K. Expression and function of idiotypes on lymphocytes, *Adv. Immunol.*, 26, 195—254 (1978).
4. Janeway C. A., Jr., Jason J. M. How T lymphocytes recognize antigen, *CRC Crit. Rev. Immunol.*, 1, 133—164 (1980).
5. Janeway C. A., Jr., Jones R., Binz H., Frischnecht H., Wigzell H. T-cell receptor idiotypes, *Scand. J. Immunol.*, 12, 83—92 (1980).
6. Matzinger P. A one-receptor view of T cell behaviour, *Nature*, 292, 497—501 (1981).
7. Murphy D. B. Genetic fine structures of the H-2 gene complex. In: *Role of the Major Histocompatibility Complex in Immunobiology*, ed. by M. E. Dorf, pp. 1—32, Garland Press, New York, 1981.
8. Owen F. L. Evidence for a T cell constant region gene family. In: *Immunoglobulin Idiotypes*, ed. by C. Janeway, E. Sercarz, and H. Wigzell, pp. 419—428, Academic Press, New York, 1981.
9. Tada T., Okumura K. The role of antigen-specific T cell factors in the immune response, *Adv. Immunol.*, 28, 1—87 (1979).
10. 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, 52—177 (1979).

11. Jones R., Janeway C. A., Jr. Cooperative interaction of B lymphocytes with antigen-specific helper T lymphocytes is MHC restricted, *Nature*, 292, 547—549 (1981).
12. Sprent J., Lerner E. A., Bruce J., Symington F. W. Inhibition of T cell activation in vivo with mixtures of monoclonal antibodies specific for I-A and I-A/E molecules, *J. Exp. Med.*, 154, 188—192 (1981).
13. Cantor H. Personal communication.
14. Bottomly K. Activation of the idiotypic network: Environmental and regulatory influences. In: *Immunoglobulin Idiotypes*, ed. by C. Janeway, E. Sercarz, and H. Wigzell, pp. 517—532, Academic Press, New York, 1981.
15. Janeway C. A., Jr. Idiotypic control: The expression of idiotypes and its regulation. In: *Strategies of Immune Regulation*, ed. by E. Sercarz and A. Cunningham, pp. 179—198, Academic Press, New York, 1981.
16. Bianchi A. T. J., Hooijkaas H., Benner B., Tees R., Nordin A. A., Schreier M. H. Clones of helper T cells mediate antigen-specific, H-2 restricted DTH, *Nature*, 290, 62—64 (1981).
17. Eardley D. D., Shen F. W., Cantor H., Gershon R. K. Genetic control of immunoregulatory circuits. Genes linked to the Ig locus govern communication between regulatory T cell sets, *J. Exp. Med.*, 150, 44—50 (1979).
18. Yamauchi K., Murphy D. R., Cantor H., Gershon R. K. Analysis of antigen-specific, Ig-restricted cell-free material made by I—J Ly—I cells (Ly—I TsiF) that induces Ly2⁺ cells to express suppressive activity, *Eur. J. Immunol.*, 11, 905—912 (1981).
19. Germain R. N., Sy M.-S., Rock K., Dietz M. H., Greene M. I., Nisonoff A., Weinberger J. Z., Ju S.-T., Dorf M. E., Benacerraf B. The role of idio type and the MHC in suppressor T cell pathways. In: *Immunoglobulin Idiotypes*, ed. by C. Janeway, E. Sercarz, and H. Wigzell, pp. 709—723, Academic Press, New York, 1981.
20. Krupen K., Araneo B., Brink L., 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-Glu⁶⁰L-Ala³⁰L-Tyr¹⁰), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 1254—1258 (1982).
21. 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 induce second-order suppressor T cells which express antiidiotypic receptors, *J. Exp. Med.*, 151, 1183—1195 (1981).
22. Tada T. Regulation of the antibody response by T cell products determined by different I subregions. In: *Immune System: Genetics and Regulation*, ed. by L. A. Herzenberg, E. E. Sercarz, and C. F. Fox, pp. 345—361, Academic Press, New York, 1977.
23. Yamauchi K., Murphy D. B., Cantor H., Gershon R. K. Analysis of antigen-specific, H-2 restricted cell-free product(s) made by I—J⁻, Ly-2 cells (Ly2 TsF) that suppresses Ly-2 cell-depleted spleen cell activity, *Eur. J. Immunol.*, 11, 913—918 (1981).
24. Fresno M., McVay-Boudreau L., Nabel G., Cantor H. Antigen-specific T lymphocyte clones. II. Purification and biological characterization of an antigen-specific suppressive protein synthesized by T cells, *J. Exp. Med.*, 153, 1260—1274 (1981).
25. Sunday M. E., Benacerraf B., Dorf M. E. Hapten-specific T cell responses to 4-hydroxyl-3-nitrophenyl acetyl. VIII. Suppressor cell pathways in cutaneous sensitivity responses, *J. Exp. Med.*, 153, 811—822 (1981).
26. Baxevanis 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—3813 (1981).
27. Nisonoff A., Ju S.-T., Owen F. L. Studies of structure and immunosuppression of a cross-reactive idio type in strain A mice, *Immunol. Rev.*, 34, 89—118 (1977).
28. Lynch R. G., Milburn G. L., Hoover R. G., Rohrer J. W., Dieckgraefe R. Myeloma proteins are targets and inducers of immunoregulatory signals. In: *Immunoglobulin Idiotypes*, ed. by C. Janeway, E. Sercarz, and H. Wigzell, pp. 595—611, Academic Press, New York, 1981.
29. Gershon R. K., Eardley D. D., Durum S., Green D. R., Shen F. W., Yamauchi K., Cantor H., Murphy D. R. Contr suppression: A novel immunoregulatory circuit, *J. Exp. Med.*, 153, 1533—1546 (1981).
30. Eardley D. D., Hugenberger J., McVay-Boudreau L., Shen F.-W., Gershon R. K., Cantor H. Immunoregulatory circuits among T cell sets. II. T-helper cells induce other T cell sets to exert feedback inhibition, *J. Exp. Med.*, 147, 1106—1115 (1978).
31. Murphy D. B., Yamauchi K., Habu S., Eardley D. D., Gershon R. K. T cells in a suppressor circuit and non-T: non-B cells bear different I—J determinants, *Immunogenetics*, 13, 205—213 (1981).
32. Binz H., Wigzell H., Bazin H. T-cell idiotypes are linked to immunoglobulin heavy chain genes, *Nature*, 264, 639—641 (1976).
33. Cramer M., Reth M., Gritzmann R. T cell V_H versus B cell V_H. In: *Immunoglobulin Idiotypes*, ed. by C. Janeway, E. Sercarz, and H. Wigzell, pp. 429—439, Academic Press, New York, 1981.

34. Julius M. H., Cosenza H., Augustin A. A. Evidence for the endogenous production of T cell receptors bearing idiotypic determinants, *Eur. J. Immunol.*, 8, 484—491 (1978).
35. Nadler P. I., Miller G. G., Sachs D. H., Hodes R. J. The expression and functional involvement of nuclease-specific idiotype on nuclease-primed helper T cells, *Eur. J. Immunol.*, 12, 113—120 (1981).
36. Bourgois A., Kahn-Perles R., Rubin R. The T cell receptor heavy chain is coded for by loci linked to Ig—V_H and —CH loci, and it displays structural similarity with Ig heavy chains. In: *Immunoglobulin idiotypes*, ed. by C. Janeway, E. Sercarz, and H. Wigzell, pp. 449—458, Academic Press, New York, 1981.
37. Krammer P. H., Eichmann K. T cell receptor idiotypes are controlled by genes in the heavy chain linkage group and the major histocompatibility complex, *Nature*, 269, 733—735 (1977).
38. Iverson G. M., Eardley D. D., Janeway C. A., Jr., Gershon R. K. The use of anti-idiotypic immunosorbents to isolate circulating antigen specific T cell derived molecules from hyperimmune sera, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 80, 1435—1439 (1982).
39. Infante A. J., Infante P. D., Gillis S., Fathman C. G. Definition of T cell idiotypes using anti-idiotypic antisera produced by immunization with T cell clones, *J. Exp. Med.*, 155, 1100—1107 (1982).
40. Lancki D. W., Lorber M. I., Loken M., Fitch F. W. A clone specific monoclonal antibody which blocks T cell-mediated cytotoxicity, *Fed. Proc.*, 41, 609 (abstract) (1982).
41. Lonai P., Ben-Neriah Y., Steinman L., Givol D. Selective participation of immunoglobulin V region and major histocompatibility complex products in antigen binding by T cells, *Eur. J. Immunol.*, 8, 827—832 (1978).
42. Ben-Neriah Y., Givol D., Lonai P., Simon M. M., Eichmann K. Allotype-linked genetic control of polymorphic V_H framework determinant on mouse T-helper cell receptors, *Nature*, 285, 257—259 (1980).
43. Owen F. L. Tpre, a fourth member of the IgT-C family, *J. Exp. Med.* (1982) (in press).
44. Owen F. L., Spurll G. M., Pangeas E. A new thymocyte alloantigen linked to Igh-1, *J. Exp. Med.*, 155, 52—60 (1982).
45. Owen F. L., Riblet B., Taylor B. A. The T suppressor cell alloantigen Tsu^d maps near immunoglobulin allotype genes and may be a heavy chain constant region marker on a T cell receptor, *J. Exp. Med.*, 153, 801—810 (1981).
46. Spurll G. M., Owen F. L. A family of T-cell alloantigens linked to Igh-1, *Nature*, 293, 742—744 (1981).
47. 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—139 (1982).
48. Binz H., Wigzell H. T cell receptors with allomajor histocompatibility complex specificity from rat and mouse, Similarity of size, plasmin susceptibility, and localization of antigen-binding region, *J. Exp. Med.*, 154, 1261—1278 (1981).
49. Gershon R. K., Iverson G. M., Janeway C. A., Jr., Rosenstein R. W., Cone R. E., Murray J., Cantor H., Fresno M., Mattingly J. A., Wigzell H., Binz H., Frischnecht H., Ptak W. Heteroantisera against affinity purified antigen specific T cell products: Their use in the isolation and characterization of T cell derived molecules (1982) (submitted for publication).
50. Mattingly J. A., Kaplan J. M., Janeway C. A., Jr., Two distinct antigen-specific suppressor factors induced by the oral administration of antigen, *J. Exp. Med.*, 152, 545—554 (1980).
51. Cone R. E., Rosenstein R. W., Murray J. H., Iverson G. M., Ptak W., Gershon R. K. Characterization of T-cell surface proteins bound by heterologous antisera to antigen-specific T-cell products, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 6411—6415 (1981).
52. Waltenbaugh C. Regulation of immune responses by I-J gene products. I. Production of monoclonal anti I-J antibodies, *J. Exp. Med.*, 154, 1570—1583 (1981).
53. Kanno M., Koboyashi S., Tokuhisa T., Takei I., Shinozaki 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—1294 (1981).
54. Hiramatsu K., Ochi A., Miyatani S., Segawa A., Tada T. Monoclonal antibodies detecting a unique set of I region gene products expressed only on mature functional T cells, *Nature*, 296, 666 (1982).
55. Dialynas D. P., Loken M. R., Glasebrook A. L., Fitch F. W. Lyt2-Lyt3 variants of a cloned cytolytic T cell line lack an antigen receptor functional in cytotoxicity, *J. Exp. Med.*, 153, 595—604 (1981).
56. Binz H., Frischnecht H., Mercolli C., Dunst S., Wigzell H. Binding of purified, soluble major histocompatibility complex polypeptide chains onto isolated T cell receptors, *J. Exp. Med.*, 150, 1084—1097 (1979).

57. Ptak W., Rosenstein R. W., Gershon R. K. Interactions between molecules (subfactors) released by different T cell sets that yield a complete factor with biological (suppressive) activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 2375—2378 (1982).
58. Yamauchi K., Chao N., Murphy D. B., Gershon R. K. The molecular composition of an antigen-specific I-J⁺, Igh-V restricted Ly-1 T cell suppressor inducer factor: One molecule binds antigen and is I-J⁻; another is I-J, does not bind antigen and is the source of the Igh-V restriction, *J. Exp. Med.*, 155, 655—664 (1982).
59. Fresno M., McVay-Boudreau L., Cantor H. Antigen-specific T lymphocyte clones. III. Papan splits purified T suppressor molecules into two functional domains, *J. Exp. Med.*, 155, 981—993 (1982).
60. Tokuhisa T., Taniguchi M. Constant region determinants on the antigen binding chain of the suppressor T cell factor, *Nature*, 298, 174 (1982).
61. Taniguchi M., Saito T., Takei I., Tokuhisa T. Presence of interchain disulfide bonds between two gene products that compose the secreted from of an antigen-specific suppressor factor, *J. Exp. Med.*, 153, 1672—1677 (1981).
62. 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—1122 (1981).
63. Takaoki M., Sy M. S., Whitaker B., Nepom J., Finberg R., Germain R. N., Nisonoff A., Benacerraf B., Greene M. J. Biologic activity of an idiotype bearing T suppressor factor derived from a hybridoma, *J. Immunol.*, 128, 49—53 (1982).
64. 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—1402 (1981).
65. Okuda K., Minami M., Furusawa S., Dorf M. W. Analysis of T cell hybridomas. II. Comparisons among three distinct types of monoclonal suppressor factors, *J. Exp. Med.*, 154, 1838—1851 (1981).
66. Goodman J. W., Lewis G. K., Primi D., Hornbeck P., Ruddle N. H. Antigen-specific molecules from murine T cells and T cell hybridomas, *Mol. Immunol.*, 17, 933—946 (1980).
67. Lonai P., Bitton S., Savelkoul H. F. J., Puri J., Hammerling G. J. Two separate genes regulate self-Ia and carrier recognition in H-2 restricted helper factors secreted by hybridoma cells. *J. Exp. Med.*, 154, 1910—1921 (1981).
68. Mozes E., Haimovich J. Antigen-specific T cell helper factor cross reacts idiotypically with antibodies of the same specificity, *Nature*, 278, 56—57 (1979).
69. Eshar Z., Apte R. N., Lowy I., Ben-Neriah Y., Mozes E. T cell hybridoma bearing heavy chain variable region determinants producing TGAL-specific helper factor, *Nature*, 286, 270—272 (1980).
70. Callahan H. J., Maurer P. H. Preparation of an antigen-binding fragment from murine T lymphocyte membranes, *Mol. Immunol.*, 17, 897—904 (1980).
71. Klein J. Natural history of the major histocompatibility complex, Wiley, New York, 1986 [Прим. ред.]

Активация лимфоцитов

Роберт Ф. Эшмен

(Robert F. Ashman)

Клонально-селекционная теория, выдвинутая Мак-Фарлейном Бернетом в 1959 г., остается одной из основополагающих концепций в иммунологии. Согласно этой теории, при нормальном развитии в организме возникает набор из тысяч очень небольших субпопуляций лимфоцитов. Клетки каждой из них имеют на наружной мембране рецепторы лишь к какой-то одной антигенной детерминанте. Иммуный ответ оказывается специфическим, поскольку проникающий в организм антиген избирательно связывается только с теми клетками, на поверхности которых имеются соответствующие рецепторы, и не взаимодействует с остальными клетками. Связывание антигена вызывает активацию лимфоцита, т. е. запуск целого ряда процессов, приводящих к клеточному делению и дифференцировке. При дифференцировке происходит развитие эффекторных функций, таких, как образование антител у В-клеток или появление цитотоксической активности у части Т-клеток.

Клонально-селекционная теория остается отправной точкой при обсуждении процессов активации лимфоцитов, хотя она и возникла еще до того, как нам стало известно о сложных взаимодействиях между популяциями Т- и В-лимфоцитов, о клетках, презентующих антиген, или регуляторных клетках. Эта теория сыграла важную роль и при рассмотрении жизненного цикла лимфоцита, который делится на две фазы — антигеннезависимую, завершающуюся появлением покоящегося лимфоцита, способного реагировать на антиген, и антигензависимую, включающую избирательную активацию антигеном некоторых клонов.

Для обсуждения процессов активации лимфоцитов необходимо также иметь представление о клеточном цикле. Клетка в процессе деления проходит через: а) фазу G_1 , в которой она содержит нормальное диплоидное количество ДНК, и варьирующее количество РНК; б) фазу S , во время которой синтезируются копии каждой цепи ДНК; в) короткую фазу G_2 , когда клетка содержит двойное по сравнению с нормальным количество ДНК, и г) фазу M (митотическую), когда происходит собственно деление (при этом дочерние клетки оказываются в фазе G_1). Если же клетка активно не делится, то говорят, что она находится в фазе G_0 .

Термин «покоящийся лимфоцит» относится к лимфоцитам, которые находятся в фазе G_0 , характеризующейся низким уровнем метаболической активности, т. е. минимально допустимой для поддержания жизненных функций клетки скоростью синтеза белков и РНК и отсутствием синтеза ДНК. В этих небольших по размеру клетках рибосомы разбросаны поодиночке в небольшом количестве цитоплазмы, окружающей ядро. Реагирующие с антигеном клетки, согласно клонально-селекционной теории, по-видимому, обычно находятся

в покое, которое сохраняется стабильным до тех пор, пока не прерывается стимулирующим сигналом.

Под активацией лимфоцита понимают довольно сложный процесс, в результате которого взаимодействие клетки со стимулирующим агентом, например антигеном или митогеном, индуцирует ее переход из фазы G_0 в фазу G_1 — начальную стадию клеточного цикла. При этом в лимфоцитах помимо метаболических изменений, типичных для делящихся клеток, происходят процессы созревания, крайне различные в разных субпопуляциях. В результате каждая субпопуляция лимфоцитов характеризуется как набором поверхностных антигенов, так и функциями, появляющимися у клеток в процессе созревания.

Поскольку при активации лимфоцитов одни процессы предшествуют другим, было бы естественно предположить, что активация представляет собой линейную последовательность определенных этапов, начиная от контакта клетки со стимулирующим агентом и кончая более поздними, обычно регистрируемыми процессами, такими, как синтез ДНК, деление клетки или секреция иммуноглобулинов (в В-клетках). Согласно этому предположению, осуществление каждого этапа данной последовательности служит необходимым условием для последующих этапов. Чтобы установить принадлежность какого-либо конкретного процесса к линейной последовательности событий, составляющих активацию, необходимо доказать, что: а) условия (особенно концентрация стимулирующего агента), в которых включение ^3H -тимидина (характеризующее скорость синтеза ДНК) максимально, соответствуют и максимальному проявлению этого процесса; б) ингибитор, подавляющий данный процесс, препятствует осуществлению и последующих этапов, например синтеза ДНК или созревания; в) если данный индуцируемый митогеном процесс вызывается еще каким-то другим способом, то при этом индуцируются те же самые последующие этапы активации. Такие эксперименты действительно указывают на то, что данный процесс является одним из звеньев в цепи событий, составляющих в целом активацию лимфоцита, однако ни один из поставленных до сих пор экспериментов не смог доказать это однозначно. Например, если зависимость скорости раннего индуцированного белкового синтеза от концентрации митогена не совпадает с аналогичной зависимостью скорости синтеза ДНК, то это еще не означает, что ранний синтез белка не имеет отношения к активации лимфоцитов, поскольку для синтеза ДНК одни белки могут быть необходимыми, а другие — нет. Более того, хотя ингибирование синтеза белка может в принципе предотвращать синтез ДНК, однако эта зависимость совсем не обязательно оказывается прямой, а может быть обусловлена, например, гибелью клетки. Даже такие аргументы, что стадия А предшествует стадии Б во времени, необходимо рассматривать с осторожностью, поскольку результаты наблюдений могут сильно зависеть от чувствительности методов определения А и Б. Многие «ранние стадии» сильно перекрываются во времени, причем перекрывание увеличивается вследствие несинхронности активации в гетерогенной популяции клеток. Часто утверждение, что процесс А приводит к процессу Б, не подкрепляется доказательством того, что оба этих процесса происходят в одних и тех же клетках.

Наконец, исследования, проведенные сравнительно недавно, показали, что модель, рассматривающая активацию лимфоцита в виде простой линейной последовательности событий, слишком упрощена. На рис. 12.1 приведена более сложная схема программы активации. На схеме показано семь характерных особенностей активации, каждая из которых подробно рассматривается ниже.

1. Возможно, что существует линейная последовательность процессов, связанных друг с другом причинно-следственными отношениями, которая начинается со стимуляции и приводит к синтезу ДНК (цепь А). Существование

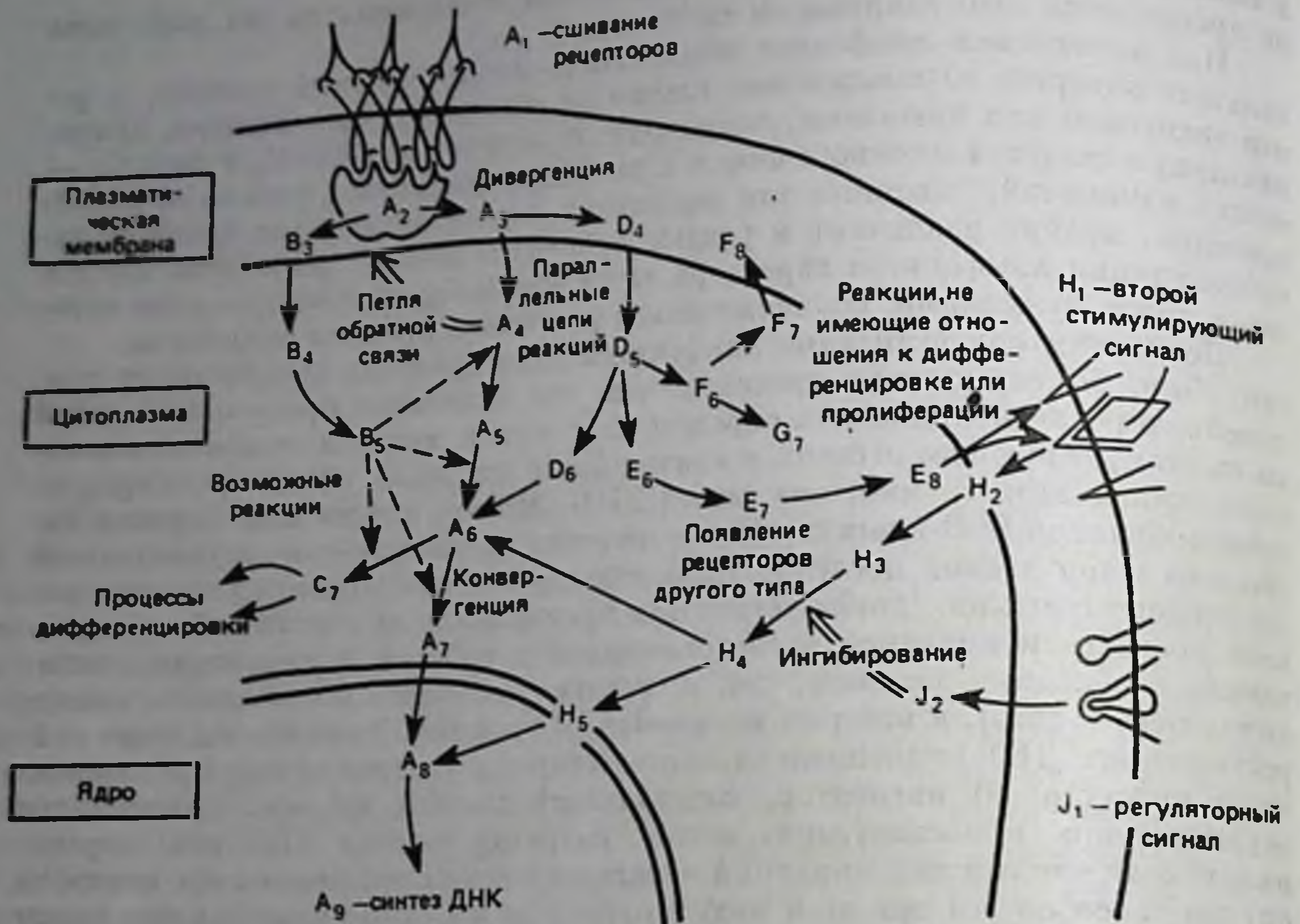


Рис. 12.1. Теоретическая схема активации клетки. Показано, как разнообразные процессы, вызванные сигналами, возникающими в клеточной мембране, могли бы оказывать влияние друг на друга. Процессы,

представляющие собой этапы активации клетки, изображены одиночными стрелками, ингибиторные процессы — двойными стрелками.

1. такой последовательности может оказаться условием, необходимым, но не достаточным для синтеза ДНК.
2. Некоторые клеточные реакции, измененные или не измененные стимуляцией, подобно пермиссивным реакциям в цепи В, могут оказаться необходимыми для нормального течения многих этапов активации лимфоцита (например, катализ мембранной $(Na^+ + K^+) - ATPазы$ или аэробный гликолиз).
3. Для осуществления некоторых сложных поздних процессов, таких, как синтез ДНК, может быть необходима конвергенция цепей реакций, т. е. протекание нескольких составляющих активацию процессов, не связанных причинно-следственной связью (последовательности А и D). Примерами таких процессов могут служить транспорт нуклеозидов, синтез полиаминов, фосфорилирование негистоновых белков, — все эти процессы необходимы для синтеза ДНК, но не опосредуют друг друга.
4. На некоторых этапах активации может наблюдаться дивергенция цепей реакций, т. е. данная реакция может одновременно вызывать несколько более поздних процессов (реакция A_3 и A_6). Примерами таких точек ветвления могут служить увеличение кальциевого потока или активация гуанилатциклазы.

стоянной. Подобный характер изменений не зависит от того, идет ли при этом синтез РНК или белков, и, судя по всему, обусловлен демаскировкой или сборкой новых переносчиков K^+ из предсинтезированных предшественников. Недавно было показано, что увеличение потока K^+ в клетку, приписываемое повышению активности $(Na^+ + K^+)$ -АТФазы, уравнивается увеличением потока K^+ наружу («утечка K^+ »), так что в целом концентрация K^+ в клетке не меняется. Кроме того, было установлено, что Na^+ входит в клетку, а повышение внутриклеточной концентрации Na^+ приводит к возрастанию активности $(Na^+ + K^+)$ -АТФазы. Возможно поэтому, что увеличение проницаемости мембраны по отношению к катионам является первичным эффектом действия митогенов, тогда как повышение активности катионного насоса представляет собой непосредственный компенсаторный ответ на это. Каплан и Оуэнс [23] предположили, что следствием важного для активации увеличения активности $(Na^+ - K^+)$ -АТФазы будет возросшая конкуренция за ограниченное количество АТФ между АТФазой и аденилат-циклазой, объясняющая наблюдаемое экспериментально временное уменьшение концентрации сАМР. В соответствии с данной гипотезой было показано, что убаин увеличивает концентрацию сАМР по крайней мере в клетках одной линии. Однако впоследствии оказалось, что некоторые ранние процессы (транспорт нуклеозидов и аминокислот) не ингибируются убаином, так что увеличение активности катионного насоса обуславливает не все процессы активации. Повышение концентрации K^+ в среде до 50 мМ приводит к деполяризации мембраны В-клеток и может заменить анти- μ при стимуляции по крайней мере одного из ранних процессов (усиления экспрессии Ia-белков), хотя без дополнительных сигналов об индукции синтеза ДНК не происходит [24].

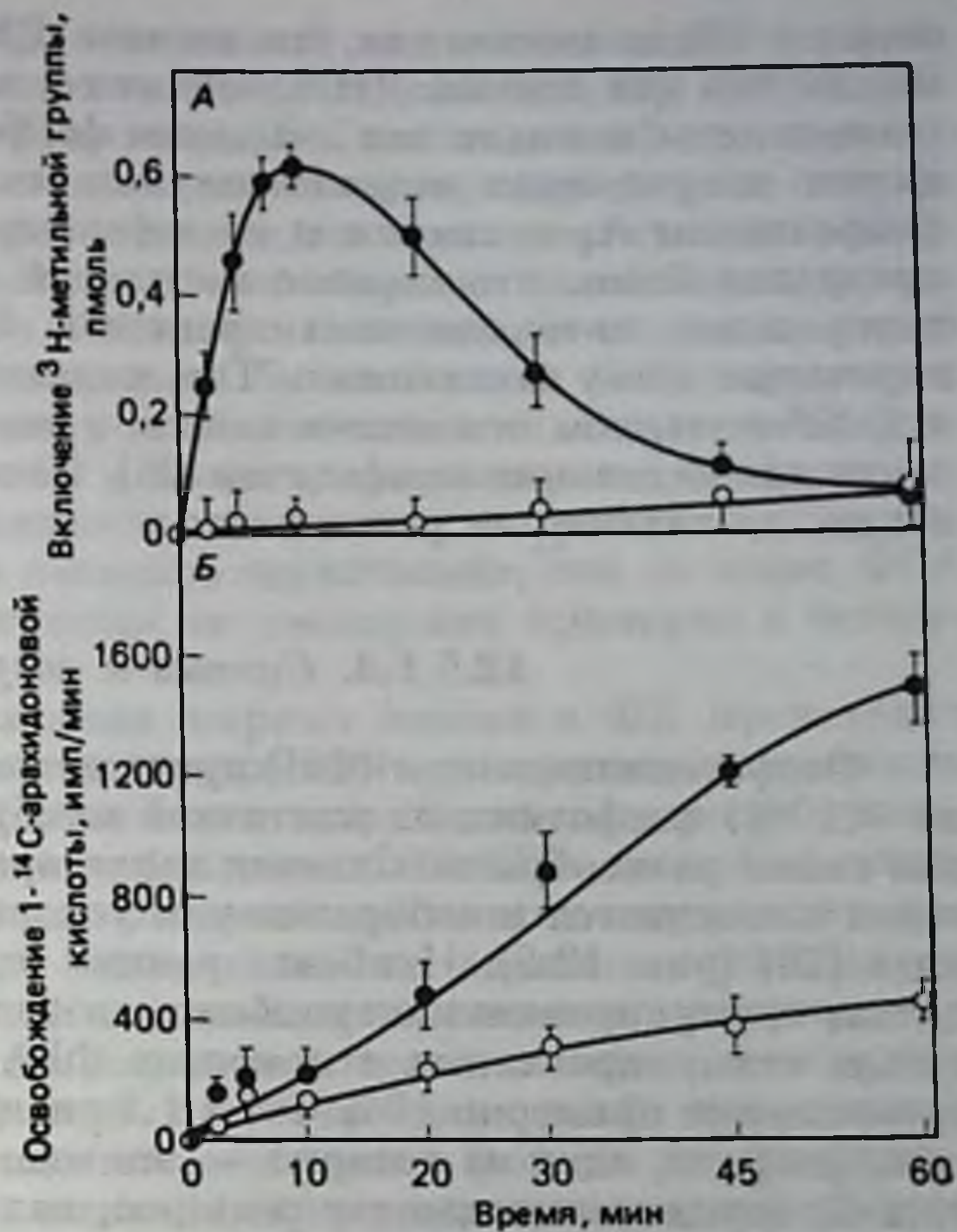
Изменение потоков катионов при активации связывают с изменением электрохимического потенциала мембраны. Из-за технических трудностей результаты, полученные при определении мембранного потенциала лимфоцитов разными способами, значительно расходятся. Многообещающим является новый подход, в котором используются положительно заряженные флуоресцентные липофильные красители цианин и оксанол, способные проникать через мембрану лимфоцита. Когда в течение непродолжительного времени при активации клеточные мембраны деполяризуются (внутренняя часть клетки при этом становится менее отрицательно заряженной), краситель выходит из клетки. В результате можно следить за деполяризацией мембраны по уменьшению интенсивности флуоресценции клетки [25]. Если бы были найдены нетоксичные для клетки красители, которые сами не влияли бы на ранние стадии активации, то их использование стало бы важным методом изучения переноса сигналов через мембрану.

12.5.1.2. Раннее трансметилирование липидов; активация фосфолипазы A_2

Одним из ранних регистрируемых биохимических процессов при стимуляции клетки с помощью Кон А и ФГА оказывается активация мембранных метилтрансфераз, катализирующих перенос метильных групп с S-аденозилметионина на атом азота аминогруппы мембранного фосфолипида фосфатидилэтаноламина (ФЭА). Хирата и др. [26] и Тойошима и др. [27] высказали привлекательную гипотезу о роли данного процесса в активации. Согласно этой гипотезе, однозамещенное, двузамещенное и трехзамещенное (фосфатидилхолин) метильные производные ФЭА быстро сменяют друг друга после контакта Кон А с Т-клетками мыши (рис. 12.5). Максимальное мечение фосфолипидов за счет радиоактивных метильных групп достигается на десятой минуте и затем сни-

Рис. 12.6. А. Влияние Кон А на метилирование фосфолипида. Б. Влияние Кон А на освобождение меченой арахидоновой кислоты из мембран клеток селезенки мыши.

Кон А — черные кружки, контроль (без Кон А) — белые кружки. В случае А клетки предварительно инкубировали с ^3H -метилметионином, что приводило к включению метильной группы, принятому за нулевой уровень. При добавлении Кон А включение метильной группы в общий фосфолипид увеличивалось (пмоль/млн·клеток). На графике каждая точка представляет собой среднее значение \pm стандартное отклонение средней величины из четырех опытов. Видно, что метильные группы включаются в мембранный фосфолипид и затем выходят из него, тогда как освобождение арахидоновой кислоты (Б) идет медленнее. В течение 60 мин высвободилось около 60% первоначально включенной в фосфолипид арахидоновой кислоты. Оба опыта можно было проводить на одних и тех же клетках, поскольку используемые изотопы (^3H и ^{14}C) имеют существенно различные энергии распада и могут одновременно регистрироваться сцинтиляционным счетчиком ([26], печатается с разрешения).



жается до первоначального уровня в течение 40 мин (рис. 12.6). В опытах на ретикулоцитах метилирование фосфолипидов (особенно до N-монометил-ФЭА) связывалось с уменьшением вязкости плазматической мембраны, что наблюдалось также в течение короткого промежутка времени после стимуляции лимфоцитов. Поскольку ингибитор метилтрансферазы S-изобутил-3-дезааденозин также ингибирует стимулированное митогеном проникновение Ca^{2+} в клетки, то было высказано предположение, что метилированные фосфолипиды играют роль в образовании существующих непродолжительное время кальциевых каналов. Поток Ca^{2+} внутрь клетки оказывается необходимым условием для осуществления следующего этапа — активации фосфолипазы A_2 , находящейся в плазматической мембране и отщепляющей жирную кислоту (часто арахидоновую кислоту) от 2-гидроксильной группы глицериновой части фосфатидилхолина (рис. 12.5 и 12.6) с образованием лизофосфатидилхолина (ЛФХ). В свою очередь ЛФХ, по-видимому, активирует гуанилат-циклазу и ингибирует аденилат-циклазу, т. е. вызывает изменения, имеющие важное значение для регуляции митоза. Арахидоновая кислота затем вступает в цепь реакций, приводящую к синтезу простагландинов (см. гл. 27). Кальциевый ионофор, вызывая резкое увеличение потока Ca^{2+} внутрь, может прямо активировать фосфолипазу A_2 , минуя стадию трансметилирования.

Кривые зависимости раннего резкого увеличения трансметилирования, потока Ca^{2+} внутрь клетки и синтеза ДНК от дозы добавленного Кон А одинаковы в опытах с лимфоцитами мыши [27]. Ингибитор трансметилязы S-изобутил-3-деза-аденозин предотвращает как проникновение Ca^{2+} внутрь, так и синтез ДНК. Изопротеренол, β -адренергический агонист, способен вызывать раннее увеличение включения метила, после чего, однако, не происходит ни харак-

терного спада включения, ни синтеза ДНК. Приведенные факты наводят на мысль, что для синтеза ДНК, возможно, необходимы как метилирование, так и расщепление липидов под действием фосфолипазы A_2 [27]. Эта идея подтверждается полученными недавно результатами, согласно которым ингибирование фосфолипазы A_2 мепакрином предотвращает и синтез ДНК. Поэтому кажется правдоподобным, что перенос метильной группы представляет собой один из центральных активационных процессов. Существуют, однако, данные, противоречащие этому заключению. Так, показано, что метилирование фосфолипидов в количественном отношении слишком невелико, чтобы иметь какое-либо значение для активации лимфоцитов [28]. Насколько этот процесс важен для активации, до сих пор не установлено.

12.5.1.3. Синтез и оборот фосфолипидов

Фосфатидилинозитол (ФИ) представляет собой минорный компонент (обычно $<10\%$) фосфолипидов клеточной мембраны млекопитающих. Тем не менее для самых разнообразных клеток характерный ранний ответ на внешние воздействия заключается в избирательном ускорении оборота именно этого фосфолипида [29] (рис. 12.5). Наиболее ранним изменением, происходящим в тромбоцитах, стимулированных тромбином в первые несколько секунд, а в лимфоцитах, стимулированных с помощью ФГА или Кон А за 5 мин, оказывается превращение примерно 10% ФИ в 1,2-диацилглицерол и водорастворимые инозитолфосфаты, один из которых — это инозитол-1,2-циклофосфат. Фосфолипаза С, осуществляющая эту реакцию, находится в цитоплазме, а не в клеточной мембране, и хотя для ее функционирования необходимо наличие низких концентраций Ca^{2+} , активация фосфолипазы С не зависит от внешнего кальция. Фосфатные группы затем вновь включаются в диацилглицерол с образованием CDP-диацилглицерола, а при добавлении инозитола опять получается ФИ. Поэтому наиболее прямым методом определения первой стадии оборота компонентов ФИ является измерение количества водорастворимой формы ^{32}P , предварительно включенного в ФИ. Но самый удобный способ связан с регистрацией включения ^{32}P -фосфата в ФИ, которое в присутствии митогена ускоряется на много часов. Специфические ингибиторы ферментов цикла ФИ не известны, и отчасти поэтому отношение оборота ФИ к более поздним активационным процессам пока не выяснено. Было предложено много различных гипотез, касающихся роли этого процесса в осуществлении локальных изменений липидного состава мембраны, регулировании потока Ca^{2+} клетки, а также, возможно, в выполнении инозитол-1,3-фосфатом функции, аналогичной функции циклических нуклеотидов. Не так давно была описана протеинкиназа, активируемая с помощью Ca^{2+} и диацилглицерола, и отличающаяся от киназ, активируемых циклонуклеотидами. Фосфолипидсвязывающие вещества, такие, как хлорпромазин, могут ингибировать активацию лимфоцитов, препятствуя работе этой киназы [30]. Циклические нуклеотиды не ускоряют оборот ФИ, т. е. они, по-видимому, действуют на более поздней стадии активации.

Оборот ФИ можно вызвать с помощью разных митогенных (но не немитогенных) лектинов. Для этого необходима сшивка рецепторов, что было показано на примере В-клеток свиньи, в которых обмен начинался после добавления целых молекул антител против иммуноглобулинов и не возникал при добавлении Fab-фрагментов этих же антител. К сожалению, в В-клетках других видов обнаружить аналогичный ответ на добавление таких митогенов, как МФЛ или ЛПС, оказалось довольно трудно [31].

В большинстве клеток оборот ФИ, измеряемый по включению ^{32}P -фосфата в ФИ, ускоряется значительно раньше и значительно сильнее, чем синтез ФИ *de novo*, измеряемый по включению ^3H -глицерола. Однако в лимфоцитах человека Кон А и ФГА в течение первого часа также стимулируют рост синтеза ФИ *de novo*, при этом синтез и других фосфолипидов также увеличивается [32].

Синтез фосфатидилхолина (ФХ) *de novo* тоже начинает линейно возрастать примерно через 1 ч после стимуляции Т-клеток митогеном, по-видимому после начала трансметилирования фосфолипидов. Обычно синтез ФХ измеряется по включению ^{14}C -холина, наблюдаемому одновременно с включением ^{32}P -фосфата или глицерола в ФХ [33]. Около 90% холина, включенного в фосфолипид, обнаруживается в ФХ. Хотя в покоящихся лимфоцитах нормальная скорость обмена компонентов мембраны и так довольно значительна, тем не менее ФГА и Кон А индуцируют четырех-пятикратное ее увеличение примерно к четвертому часу.

В покоящихся лимфоцитах включение жирных кислот в ФХ происходит в 100 раз более интенсивно, чем включение холина (т. е. превышает скорость синтеза ФХ). Тем не менее скорость включения жирных кислот также увеличивается в три раза через 10 мин после добавления ФГА [33]. Ацил-СоА-лизолецитинтрансферазы, ответственные за повторное включение жирных кислот в мембрану, высокоизбирательны по отношению к длинным ненасыщенным жирным кислотам с несколькими двойными связями, например к арахидоновой кислоте. Высокая скорость включения холина и жирных кислот поддерживается по крайней мере в течение двух дней, что связано с увеличением общего количества вещества мембраны в расчете на одну клетку. Однако если митоген удалить, то включение жирных кислот возвращается к нормальному для покоящихся клеток уровню в течение трех часов, т. е. для поддержания высокого уровня включения необходимо постоянно стимулировать клетку митогеном.

12.5.1.4. Метаболизм арахидоновой кислоты, простагландины

Одной из жирных кислот, освобождающейся из фосфолипидов под действием фосфолипазы A_2 при активации лимфоцитов, оказывается арахидоновая кислота (рис. 12.6). Некоторые продукты метаболизма арахидоновой кислоты играют важную роль в механизмах регуляции воспалительных процессов (гл. 27), однако изучение их возможной роли в дифференцировке активированных лимфоцитов только начинается. ФГА ускоряет освобождение арахидоновой кислоты из фосфолипидов плазматической мембраны, увеличивая в результате образование таких продуктов метаболизма арахидоновой кислоты, как гидроксипарахионовые кислоты 5-НЕТЕ и 15-НЕТЕ, простагландины, тромбоксан B_2 [34] и лейкотриен B_4 . Многие из этих веществ ингибируют митогенез по принципу отрицательной обратной связи. Некоторые простагландины, например, делают это путем стимуляции аденилат-циклазы, катализирующей образование циклического АМР, который в свою очередь ингибирует фосфолипазу A_2 . Высокоокисленные производные арахидоновой кислоты, такие, как 5-НЕТЕ и 15-гидропероксиарахионовая кислота (15-НРЕТЕ), ингибируют синтез белка, РНК и ДНК не только в клетках, стимулированных с помощью ЛПС, но и в клетках непрерывно растущих линий. Кроме того, они могут ингибировать возникающее при митогенезе увеличение подвижности Т-клеток. Первичное действие этих веществ сейчас объясняется их способностью ингибировать превращение арахидоновой кислоты в 5-липоксипарахионовую, что может иметь важное значение для активации. Недавно появилось сообщение, что ингибитор циклооксигеназы индометацин препятствует также и мито-

генезу. Аналогичные данные были получены в отношении ингибиторов липогеназы. Есть основания думать, что разнообразные функции производных арахидоновой кислоты в активации лимфоцита, включая стимуляцию и ингибирование отдельных процессов, будут выяснены в следующем десятилетии. Для выяснения механизмов действия этих производных, по-видимому, необходимо установить, когда и в каком месте клетки происходит их высвобождение.

12.5.1.5. Поток кальция в клетку

Концентрация ионов кальция (Ca^{2+}) в клетках млекопитающих значительно ниже, чем в окружающей среде. Это приводит к появлению направленного внутрь клетки электрохимического градиента Ca^{2+} . Поток Ca^{2+} не чувствителен к метаболическим ингибиторам и имеет низкий температурный коэффициент, что говорит о его независимости от источников энергии. Для потока Ca^{2+} из клетки наружу справедливо противоположное, поскольку в плазматической мембране лимфоцита есть Ca^{2+} -АТРаза, участвующая в активном транспорте Ca^{2+} . Ионы Ca^{2+} входят внутрь лимфоцита, используя насыщаемый переносчик, причем Mn^{2+} конкурентно ингибирует проникновение Ca^{2+} в клетку. Таким образом, механизмом попадания Ca^{2+} в клетку является, по-видимому, облегченная диффузия, а выход Ca^{2+} из клетки осуществляется путем активного транспорта.

Имеется пять основных экспериментально доказанных фактов, которые, будучи взятыми в совокупности, доказывают центральную роль Ca^{2+} в активации лимфоцитов. Во-первых, уменьшение концентрации Ca^{2+} снаружи ниже 10^{-3} М ингибирует синтез как ДНК, так и РНК в ответ на добавление ФГА или Кон А. Согласно Витни и Сазерленду [35], ингибирование митогенеза достигало 75—85%, если концентрацию Ca^{2+} снаружи снижали за два часа до стимуляции, и составляло лишь 25% в том случае, когда снижение проводили через 12 ч после начала контакта с митогеном. Изменение концентрации Ca^{2+} после 16 ч на активацию не влияло.

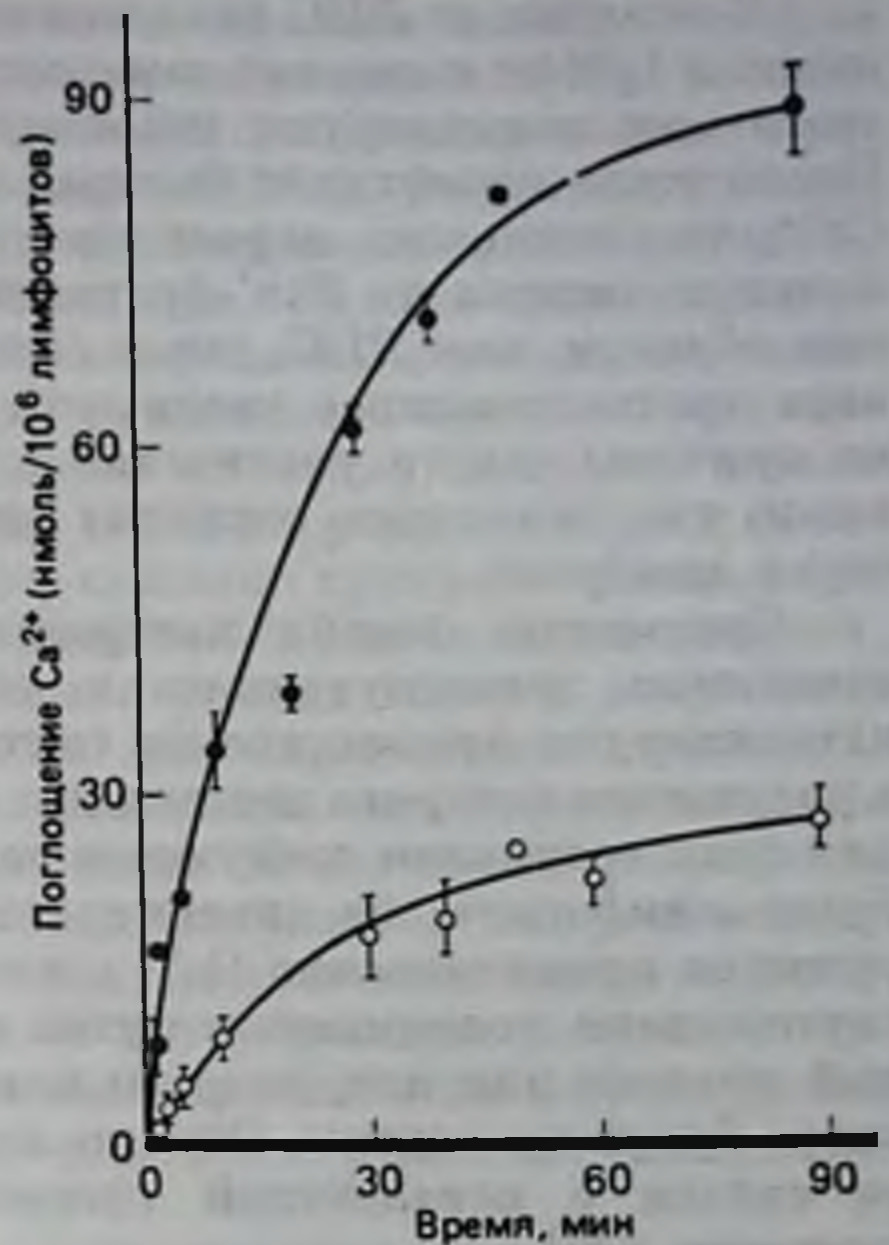
Во-вторых, кальциевый ионофор А23187, включаясь в плазматическую мембрану и становясь в результате интегральным белком, образует в мембране кальциевые каналы; в результате проникновение Ca^{2+} внутрь резко увеличивается, а через несколько дней начинается синтез ДНК. Добавление ионофора в первые 3 ч, а Кон А между 15 и 18 часами приводит точно к такому же синтезу ДНК, как если бы в обоих случаях добавлялся Кон А. Этот результат дает основание предполагать, что ключевая роль Кон А в первые 3 ч заключается в стимуляции проникновения Ca^{2+} внутрь клетки.

В-третьих, получены данные о том, что в течение 1—5 мин после контакта с митогеном поглощение $^{45}\text{Ca}^{2+}$ лимфоцитами резко (в 2—5 раз) увеличивается [27, 36] (рис. 12.7). Весь процесс занимает от 30 мин [37] до нескольких часов [35]. Данные о его амплитуде и длительности, полученные в разных лабораториях, сильно варьируют. В Т-лимфоцитах человека, обработанных ФГА, ускорение проникновения Ca^{2+} осуществляется в результате уменьшения K^M на 50% без значительного изменения $V_{\text{макс}}$, т. е., по-видимому, обработка с помощью ФГА увеличивает сродство «переносчика» к Ca^{2+} , а не количество «переносчиков» или скорость переноса Ca^{2+} каждым переносчиком. Поскольку выход Ca^{2+} из клеток, в которые предварительно был введен $^{45}\text{Ca}^{2+}$, также возрастает, эффект действия митогена сводится к увеличению кальциевого обмена.

В-четвертых, кривые зависимости интенсивности проникновения Ca^{2+} в клетку и синтеза ДНК от концентрации митогена, по данным нескольких исследователей, совпадают, тогда как АЗП и оксинелла (лектины, не стимули-

Рис. 12.7. Лимфоциты периферической крови человека культивировали вместе с $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в присутствии (черные кружки) и в отсутствие ФГА (белые кружки).

ФГА и изотоп добавляли в момент времени «0», после чего культуры инкубировались при 37°C . Поглощение Ca^{2+} выражено в наномолях/мл лимфоцитов \pm стандартная ошибка относительно величины, полученной усреднением по 3—4 культурам ([35]; печатается с разрешения).



рующие синтез ДНК) либо не влияют на скорость выхода Ca^{2+} , либо вызывают незначительные изменения [37].

В-пятых, Кон А и ФГА стимулируют проникновение Ca^{2+} только в Т-клетки, а ЛПС — только в В-клетки. В клетках линии С34/HeJ, не синтезирующих ДНК в ответ на воздействие с помощью ЛПС, также не наблюдается раннего увеличения потока Ca^{2+} внутрь.

Поскольку проникновение Ca^{2+} — процесс, независимый от энергии, действие митогенов сравнивается с открыванием «кальциевых ворот», позволяющих ионам диффундировать в клетку в направлении градиента концентрации [36]. По этим кальциевым каналам Ca^{2+} , по-видимому, и проникает в клетку. Некоторая часть попадающего в клетку Ca^{2+} может быть быстро удалена из цитоплазмы (например, поглощена митохондриями), однако большая часть должна быть выкачена наружу, поскольку общее количество Ca^{2+} в клетке, как следует из данных, полученных методом атомной абсорбционной спектрофотометрии, при индуцируемом ФГА митогенезе не увеличивается сколько-нибудь значительно. Ca^{2+} -каналы, по-видимому, чувствительны к регуляции с помощью структур, контактирующих с ними с внутренней стороны мембраны, поскольку проникновение Ca^{2+} в клетку подавляется колхицином (стимулирующим диссоциацию микротрубочек) и цитохалазинами D и B (препятствующими нормальному функционированию микрофиламентов). Даже несмотря на то, что проникновение Ca^{2+} в клетку не требует затрат энергии, оно ингибируется веществами, повышающими содержание циклического GMP или снижающими уровень циклического AMP [37]. Тем не менее цитоплазматическая гуанилат-циклаза активируется потоком Ca^{2+} в клетку (т. е. действует механизм отрицательной обратной связи). В принципе вполне возможно, что гуанилат-циклаза, функционируя совместно с кальмодулином, усиливает под действием проникшего внутрь Ca^{2+} фосфорилирование ключевых ферментов, передающих активационный сигнал.

В отличие от ЛПС бивалентные антитела против суммарных иммуноглобулинов и IgM не вызывают заметного увеличения потока Ca^{2+} в В-клетки. Вместо этого они стимулируют освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ. После этого происходит быстрая потеря клеткой 20—30% общего количества Ca^{2+} , что, возможно, играет важную роль в кэппинге [38]. В отличие от целых молекул антител их Fab'-фрагменты не стимулируют кальциевых потоков. Таким образом, как ЛПС, так и антитела против иммуноглобулинов могут вызывать кратковременное увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , однако причины такого увеличения в двух этих случаях оказываются неодинаковыми, что, возможно, отражает различие в механизмах прохождения сигналов через мембрану.

Существует весьма интересная гипотеза, рассматривающая роль Ca^{2+} -зависимых трансклутаминаз в активации. Как известно, трансклутаминазы катализируют присоединение глутаминовой кислоты к $\epsilon\text{-NH}_2$ -группе лизина, в результате которого два пептида оказываются ковалентно-связанными. В связи с этим возникают следующие вопросы: не находится ли этот фермент в мембране лимфоцита, не активируется ли он вследствие возникающего при стимуляции проникновения Ca^{2+} в клетку и не регулируется ли активность трансклутаминазы полиаминами путем изменения уровня Ca^{2+} ? Имеет место подобный процесс или нет, должны показать эксперименты, которые, по-видимому, скоро будут проведены. Однако, если этот процесс и существует, он, очевидно, не связан с ковалентной сшивкой поверхностных иммуноглобулинов при кэппинге [39].

Среди реагентов, ингибирующих такие индуцируемые митогеном процессы, как поглощение Ca^{2+} и синтез ДНК лимфоцитами, следует назвать липопротеины, полиамины и простагландины E_1 и E_2 .

12.5.1.6. Изменения концентраций циклических нуклеотидов

В самых разнообразных клетках регуляторные сигналы, инициированные гормонами и другими лигандами, связывающимися с рецепторами на плазматической мембране, передаются в клетку с помощью циклических нуклеотидов. Рецепторы всех типов, участвующие в связывании лиганда, могут предпочтительно активировать либо аденилат-циклазу, либо гуанилат-циклазу — ферменты, локализованные во внутреннем слое плазматической мембраны. В результате этой активации, осуществляемой с помощью Ca^{2+} -зависимого механизма, происходит синтез, соответственно либо циклического аденозин-3', 5'-монофосфата (сАМР), либо циклического гуанозин-3', 5'-монофосфата (сGMP). Эти так называемые вторые посредники часто оказывают противоположное действие на многие клеточные процессы. Внутриклеточные концентрации циклических нуклеотидов регулируются также путем их расщепления фосфодиэстеразами. сАМР и сGMP, по-видимому, оказывают свое действие, связываясь с регуляторными субъединицами протеинкиназных комплексов, в которых каталитические субъединицы затем переносят фосфаты на определенные ферменты. Именно активацией нескольких ферментов путем фосфорилирования можно, по-видимому, объяснить способность рецепторов одного типа инициировать в клетке сложный каскад расходящихся активационных процессов (см. следующий раздел).

Опубликованы убедительные данные об участии циклических нуклеотидов в стимулируемой с помощью митогенов активации лимфоцитов [3, 40]; в этих

работах рассматривается также история вопроса. Аналоги сАМР, которые могут быть транспортированы в клетку (например, дибутирил-сАМР), ингибируют синтез РНК, а у некоторых видов и синтез ДНК. Метилированные производные ксантина, ингибирующие расщепление сАМР и β -адренергические агонисты, например изопротеренол, активирующий аденилат-циклазу, также, по-видимому, ингибируют и активацию лимфоцитов. Однако для изучения роли циклических нуклеотидов в активации лимфоцитов необходимо выяснить, к каким изменениям в метаболизме этих нуклеотидов приводит контакт клетки с митогеном, однако данные, имеющиеся по этому вопросу, весьма противоречивы. Так, в частности, концентрация сАМР на ранних стадиях митоза, согласно одним авторам, увеличивается, согласно другим — уменьшается либо не изменяется, в то же время концентрация сGMP либо увеличивается, либо не изменяется. Расхождения между данными разных авторов могут быть обусловлены различием методов, используемых для определения концентрации циклических нуклеотидов, различиями концентрации митогена, условиями культивирования клеток и временем наблюдения. Более того, результаты могут изменяться при переходе от одной популяции лимфоцитов к другой и между одними и теми же клетками на разных стадиях клеточного цикла; в некоторых случаях вариации объясняются попыткой интерпретации данных, полученных на гетерогенных популяциях. Выяснение причин этих противоречий зависит от того, насколько существенны описанные выше различия концентраций циклических нуклеотидов.

Сравнительно недавно полученные результаты свидетельствуют о том, что стимуляция с помощью митогена может вызывать ранние (в течение первых 30 мин) асинхронные увеличения и уменьшения концентрации как сАМР, так и сGMP. В тимocyтах крысы, обработанных Кон А, повышение концентрации сGMP между 4-й и 8-й минутами так же, как и включение тимидина, наблюдаемого к 48-му часу, зависит от концентрации внеклеточного Ca^{2+} (т. е. от индуцируемого митогеном проникновения Ca^{2+} в клетки), в то время как повышение концентрации сАМР от Ca^{2+} не зависит. Это, возможно, говорит о том, что увеличение концентрации сGMP более тесно связано с синтезом ДНК. В лимфоцитах периферической крови человека, обработанных ФГА, повышение содержания GMP также коррелирует с наличием потока Ca^{2+} внутрь, а способность липопротеинов низкой плотности ингибировать синтез ДНК объясняется разобщением кальциевого потока и увеличением синтеза сGMP, приводящего в норме к активации. Имеются также данные о наличии обратного влияния циклических нуклеотидов на Ca^{2+} . Согласно этим данным, дибутирил-сАМР в концентрации 10 мкМ уменьшает поток Ca^{2+} внутрь клетки, в то время как 8Br-сGMP его увеличивает [38]. По-видимому, этим и можно объяснить влияние циклических нуклеотидов на активность Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы A_2 .

В клетках селезенки мыши, обработанных Кон А, в тех случаях, когда позднее увеличение концентрации сАМР (начинающееся к 10-му часу и достигающее максимума на 30-м часу) ингибируется индометацином или если последующее снижение содержания сАМР предотвращается экзогенными аналогами сАМР или ингибитором фосфодиэстеразы, синтез ДНК между 48 и 60 ч не наступает, в то время как начавшийся уже синтез РНК идет беспрепятственно. Эти клетки находятся в конце фазы G_1 , и если индометацин удалить, то синтез ДНК начинается и без контакта с митогеном [41] (рис. 12.8). Было бы очень интересно выяснить, происходят ли эти поздние изменения концентраций циклических нуклеотидов в ядре или нет. Хотя мы не знаем, что регулирует поток Ca^{2+} в ядро, однако известно, что ядерная аденилат-циклаза стимулируется как ионами Ca^{2+} , так и некоторыми простагландинами. Ядерный сАМР затем,

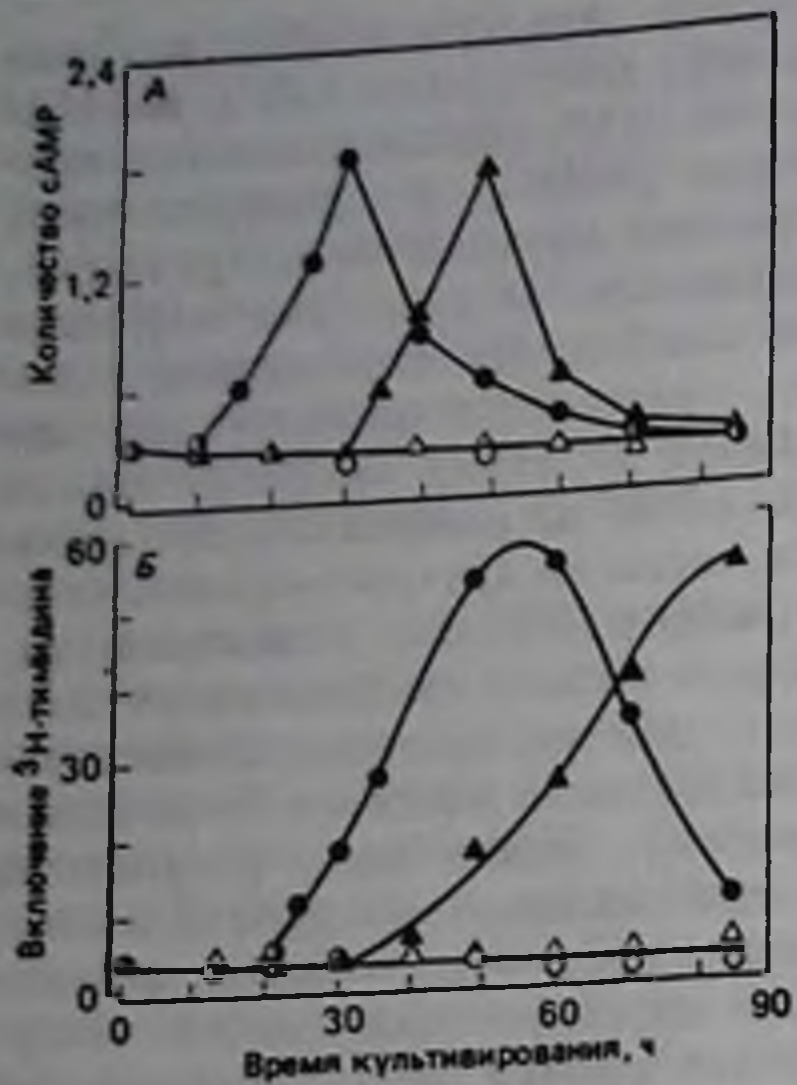


Рис. 12.8. Влияние добавления и удаления индометацина на включение сАМР (А) и ³Н-тимидина (Б) в лимфоциты мышинной селезенки, стимулированные Кон А.

Белыми кружками показаны результаты опытов, в которых клетки инкубировали без Кон А и без индометацина; черными кружками — с Кон А, но без индометацина; белыми треугольниками — с Кон А; при этом индометацин добавляли через два часа после стимуляции; черными треугольниками — с Кон А, а индометацин добавляли через два часа после стимуляции и удаляли через 30 ч. Индометацин в концентрации 0,2 мМ способен ингибировать как повышение уровня сАМР, нормально наблюдаемое к 30-му часу, так и повышение включения ³Н-тимидина, в норме достигающее максимума к 50-му часу. Однако оба этих процесса могут начинаться лишь с небольшим запаздыванием или вообще сразу после удаления индометацина, что свидетельствует о том, что многие ранние процессы активации, стимулируемые с помощью Кон А, проходят и в присутствии индометацина ([40]; печатается с разрешения).

по-видимому, участвует в фосфорилировании кислых негистоновых белков и гистонов, обуславливая транскрипцию.

В целом представляется вероятным, что изменения концентраций циклических нуклеотидов могут наблюдаться более чем на одном этапе активационной программы (в различных клетках? в различных компартментах одной и той же клетки?). При этом возрастание концентрации сАМР может иметь разное значение на различных стадиях, а временное понижение содержания сАМР может быть так же существенно, как и повышение. Наличие изменений концентраций циклических нуклеотидов при активации лимфоцитов не вызывает сомнений, однако в настоящий момент значение этих изменений неясно.

12.5.1.7. Фосфорилирование белков

Известно много белков, активирующихся при фосфорилировании. Поэтому тот факт, что Кон А вызывает небольшое (30—40%), но все же существенное увеличение включения ³²P-ортофосфата в белки лимфоцитов, достигающее максимума к 10-й минуте, дает основание думать, что активация протеинкиназ, фосфорилирующих ключевые ферменты, может быть важной ранней точкой ветвления в последовательности событий, ведущих к активации [42]. Существуют данные, согласно которым фосфорилирование на ранних этапах активации, возможно, зависит от предшествующих ему передислокаций Ca^{2+} , осуществляющихся при участии Ca^{3+} -связывающего цитоплазматического белка кальмодулина. Результаты опытов по определению увеличения фосфорилирования в большой степени зависят от использования ингибиторов дефосфорилирующих ферментов, которые в свою очередь тоже могут активироваться. Цитоплазматический белок с неизвестной функцией, имеющий мол. массу 65 кДа, легче выявляется среди других белков, фосфорилирующихся в первые 10 мин.

Во многих эукариотических клетках кислые негистоновые (ассоциированные с хроматином) белки, которые при активации фосфорилируются, играют

ключевую роль в регуляции экспрессии генов (этот вопрос обсуждается в следующем разделе). «Сердцевинные» белки гетерогенных ядерных рибонуклеопротеиновых частиц, содержащих первичные транскрипты, оказываются среди ядерных белков, фосфорилирующихся раньше всех остальных. Не исключено, что это свойство «сердцевинных» белков имеет определенное отношение к их роли в процессинге мРНК.

12.5.1.8. Активация сериновых эстераз

При активации тучных клеток посредством сшивки Fc_ϵ -рецепторов одним из самых ранних процессов, по-видимому, является активация мембранно-связанной эстеразы. Этот фермент ингибируется динизопропилфторофосфатом (ДФФ), который ковалентно связывается с сериновым остатком активного центра. Помимо эстеразы таким же образом ингибируются трипсин, химотрипсин, калликреин, плазмин и несколько других важных протеиназ. Путем активации аденилат-циклазы сериновая эстераза, как сейчас представляется, передает сигнал, вызывающий дегрануляцию тучных клеток. Кроме того, эстеразы, активируемые под действием внешнего сигнала, обнаружены также в тромбоцитах и нейтрофилах.

Имеются данные, согласно которым сериновая эстераза может быть активирована в течение нескольких минут после сшивки поверхностных иммуноглобулинов лимфоцита с помощью соответствующих антител. Поскольку ДФФ ингибирует резкое увеличение подвижности компонентов мышинных В-клеток, индуцируемое антителами против иммуноглобулинов, то возможно, что активация эстеразы необходима именно для повышения этой подвижности [19].

Кишимото и др. [16] также показали, что при контакте В-клеток кролика с антителами против иммуноглобулинов в течение 30 мин начинает проявлять свою активность находящаяся в мембране сериновая эстераза, причем ее субстратная специфичность подобна таковой трипсина (т. е. эстераза расщепляет те пептидные связи, в которых карбонильная группа принадлежит аргинину или лизину). Этот фермент ингибируется ДФФ, однако ингибирование можно предотвратить с помощью небольших аргининсодержащих пептидов. Было показано, что мембраны клеток, обработанных антителами против иммуноглобулинов, взаимодействуют с цитоплазматической молекулой с мол. массой 150 кДа (даже в клетках, не обработанных антителами), высвобождая фактор с мол. массой 45 кДа, который активирует ядерную протеинкиназу через 2 ч после начала контакта с антителами. Эта киназа специфически фосфорилирует негистоновые белки хроматина, которые, по-видимому, прямо регулируют транскрипцию или репликацию ДНК. Такая модификация, возможно, представляет собой один из последних этапов активационной программы перед синтезом РНК и ДНК.

При активации с помощью Кон А, возможно, имеет место аналогичная последовательность событий. Между 4 и 8 ч после добавления Кон А наблюдается кратковременное усиление фосфорилирования ядерных негистоновых белков. В дальнейшем между 24 и 48 ч, как раз перед началом включения тимидина, фосфорилирование негистоновых белков опять возрастает, достигает своего максимального уровня. Этот процесс связан с четырехкратным увеличением активности связанных с хроматином протеинкиназ (без изменения количества ферментов), которое, как было показано, в свою очередь зависит от активации ядерной аденилат-циклазы.

Было бы весьма интересно проверить, имеется ли сходство между процессами, индуцируемыми с помощью Кон А в Т-клетках (активируется ли

при этом сериновая эстераза?), и процессами, индуцируемыми с помощью анти-тел против иммуноглобулинов в В-клетках (активируется ли при этом ядерная аденилат-циклаза?). В настоящий момент эта притягательная схема, возможно, поможет разгадать, как активационный сигнал может передаваться в ядро.

12.5.1.9. Увеличение скорости трансмембранного транспорта малых молекул

Среди прочих изменений, вызываемых связыванием митогена с лимфоцитом, наблюдается также и ускорение переноса через мембрану различных сахаров, аминокислот и нуклеозидов. Например, уже через 10 мин после начала контакта с ФГА обнаруживается увеличение идущего за счет облегченной диффузии транспорта радиоактивно меченного неметаболизирующегося сахара 3-О-метилглюкозы¹, достигающее плато через 30 мин. Механизм данного явления, по-видимому, связан с резким увеличением количества имеющихся в наличии мест переноса, не отличающихся по связывающей способности от тех, которые есть в покоящихся клетках. Этот вывод следует из анализа соотношения между скоростью поступления и внешней концентрацией сахара, согласно которому ФГА индуцирует увеличение $V_{\text{макс}}$, не изменяя K_m . Необходимо, однако, заметить, что увеличение проникновения сахара в клетки не требует синтеза новых белков.

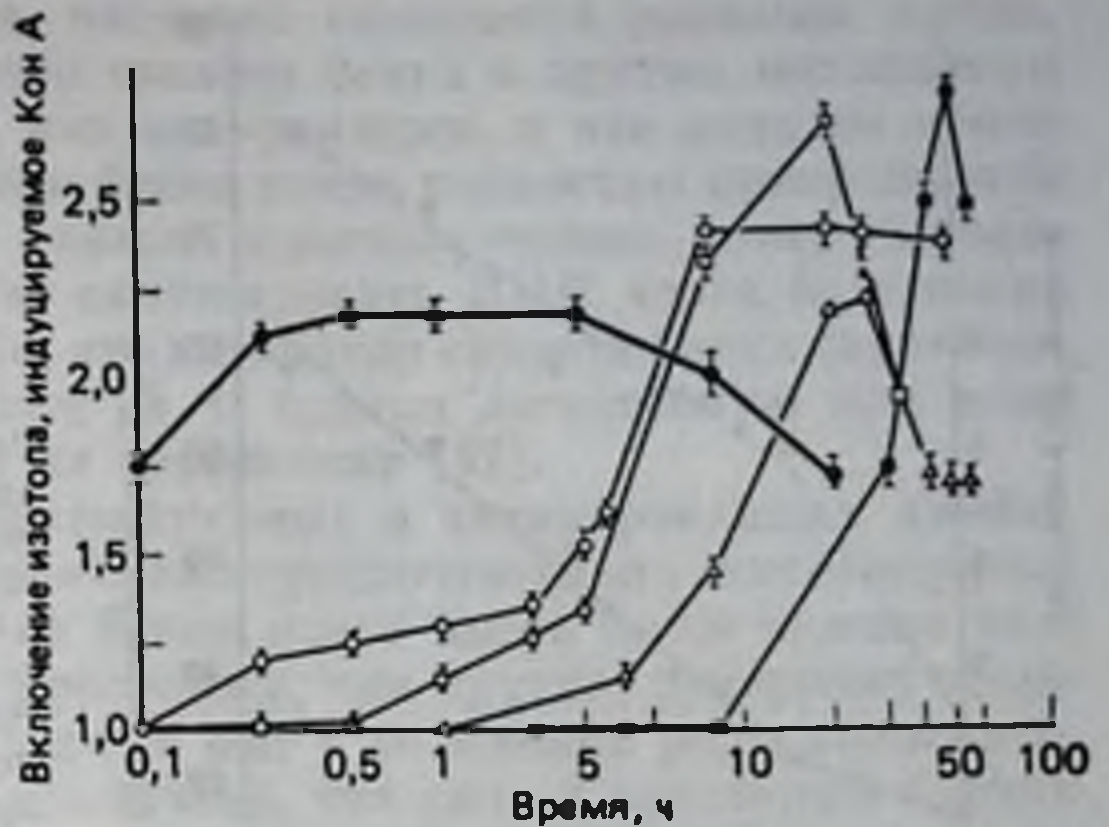
Когда стимуляция лимфоцитов происходит в среде, в которой нет Ca^{2+} , поступления глюкозы в клетку не наблюдается до тех пор, пока не будет восстановлено содержание Ca^{2+} . Ионифор кальция А23187 индуцирует увеличение транспорта глюкозы в клетку уже на первом часу [37]. В среде, не содержащей глюкозы, синтез ДНК не происходит, так что возрастание потока глюкозы, судя по всему, оказывается необходимым ранним этапом активации лимфоцита. Ингибирующий эффект цитохалазинов на синтез ДНК, по-видимому, объясняется не воздействием их на микрофиламенты, а способностью предотвращать индуцируемое митогеном проникновение внутрь глюкозы. Тем не менее ФГА способен несколько ускорять синтез РНК и белка, даже если в среде отсутствует глюкоза. Это наблюдение обосновывает сделанное ранее предположение, о том, что в программе активации лимфоцита имеются «точки ветвления», и поэтому не каждый ранний активационный процесс требуется для осуществления каждого позднего процесса. Наоборот, наличие глюкозы для генерирования энергии может играть роль выключателя, разрешая протекание многих поздних энергозависимых процессов (путь В на рис. 12.1).

Транспорт аминокислот и нуклеозидов также усиливается вследствие контакта с митогеном, однако позже, чем транспорт глюкозы. В стимулированных с помощью ФГА лимфоцитах свиньи увеличение скорости поступления внутрь пролина и метионина обнаруживается через один час, а достигает максимума к 24 ч, возрастая в 7—15 раз по сравнению со скоростью проникновения в покоящиеся клетки. Показано, что транспорт глутамин в клетки селезенки мыши имеет похожие кинетические характеристики [36] (рис. 12.9). Скорость поступления неметаболизирующейся аминокислоты (часто используемой для изучения транспорта через мембрану) внутрь стимулированных с помощью Кон А тимоцитов человека увеличивается в первые 2 ч. Для этого

¹ Преимущество использования неметаболизирующихся радиоактивно меченных веществ, проникающих в клетку при участии тех же механизмов, что и биологически важные таболических реакций.

В противном случае такое расщепление вносило бы ошибки в измерение скорости транспорта.

Рис. 12.9. Сравнение кинетики нескольких активационных процессов, стимулируемых с помощью Кон А (1 мкг/мл) в лимфоцитах селезенки мыши. Поглощение изотопа клеткой представлено в виде отношения величин, полученных со стимулированными и контрольными клетками. ^{45}Ca (черные кружки); ^{14}C -глюкоза (светлые кружки); ^{14}C -глутамин (светлые квадратики); ^{14}C -уридин (светлые треугольники); ^{14}C -тимидин (черные квадратики). Время отложено в логарифмической шкале ([36]; печатается с разрешения).



необходимо, чтобы одновременно происходил синтез белка и генерировалась энергия гликолиза. ЛПС стимулирует проникновение аминокислотной кислоты в В-лимфоциты крысы, причем в первые 4 ч поток оказывается очень слабым, а через 24 ч значительно усиливается. В тех случаях, когда связывание митогена на поверхности клетки не приводит к синтезу ДНК, увеличения транспорта аминокислот также не происходит. Это имеет место, например, при взаимодействии Кон А с клетками селезенки «голых» (nude) мышей, ЛПС с тимоцитами и определенных немитогенных лектинов с любыми лимфоцитами. Наличие подобной зависимости свидетельствует о том, что усиление транспорта аминокислот необходимо для последующего синтеза ДНК, однако связь между этими процессами скорее всего косвенная.

Раннее увеличение поглощения нуклеозидов, таких, как тимидин и уридин, происходящее при стимуляции клетки митогеном (рис. 12.9), будет подробно обсуждено далее в разделе, посвященном синтезу РНК и ДНК.

12.5.2. Процессы, протекающие в первые часы

12.5.2.1. Ускорение синтеза белка

Стимуляция с помощью митогена приводит к увеличению скорости синтеза белка, измеряемой обычно по включению радиоактивно меченных аминокислот во фракцию, нерастворимую в 5%-ной трихлоруксусной кислоте. В случае Кон А и ФГА это становится заметным уже через 2—3 ч [43, 44] (рис. 12.10). В дальнейшем скорость синтеза постепенно увеличивается, достигая максимального уровня (превышающего в 10—40 раз начальный) за 48—72 ч, — время, совпадающее с периодом наиболее быстрого клеточного деления. Увеличение скорости синтеза белка в первые 3 ч приписывается возросшей активности факторов инициации, что может объяснить наблюдаемое быстрое включение предсуществующих матричных РНК (мРНК) в полирибосомы [45]. На эту раннюю стадию синтеза белка не действуют ингибиторы синтеза или процессинга мРНК. Кроме того, при этом не происходит увеличения количества РНК в расчете на одну клетку.

В промежутке между 3 и 20 ч доля «активных» рибосом (имеются в виду рибосомы, содержащие новосинтезирующие пептиды и не диссоциирующие на субчастицы в буферных растворах с высоким содержанием соли) возрастает с начального уровня 25% до порядка 70—80% (рис. 12.10). Доля рибосом,

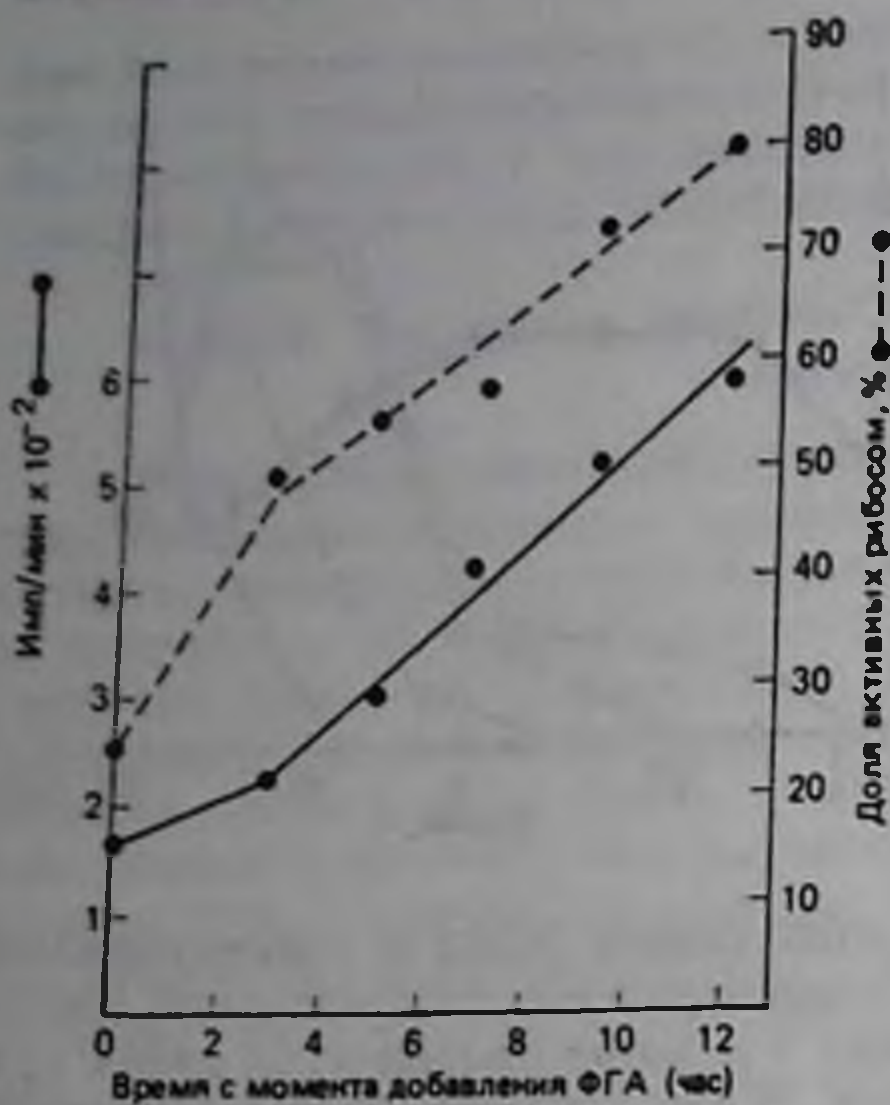


Рис. 12.10. Сравнение скорости включения аминокислот (непрерывная линия) и процентного содержания рибосом, активно участвующих в синтезе белка (прерывистая линия) в лимфоцитах периферической крови человека, стимулированных с помощью ФГА. На левой оси ординат отложено включение метки в лейцин (имп/мин/10⁶ клеток × 10⁻²) при 30-минутной импульсной метке, заканчивающейся в момент времени, указанный на оси абсцисс. На правой оси ординат отложено процентное содержание активных рибосом. ФГА добавляли в момент времени 0 в концентрации 2 мкг/мл ([43]; печатается с разрешения).

входящих в составе полирибосом, также увеличивается от 25 до примерно 70%. Кроме того, в результате преобладания синтеза РНК над ее распадом начинает увеличиваться количество РНК в расчете на одну клетку. Скорость ассоциации ³⁵S-Мет-тРНК с полисомами повышается, однако увеличения содержания белка в расчете на одну рибосому или скорости элонгации синтеза белка не наблюдается [43].

Через 48 ч интенсивность синтеза белка достигает максимального уровня, при этом количество РНК в клетке возрастает в 2 раза по сравнению с количеством, характерным для покоящихся клеток, а скорость трансляции и содержание белка в расчете на одну рибосому — в 10 раз. Увеличение количества полисом и активных рибосом, наблюдавшееся к 24-му часу, сохраняется. Имеются данные, что при переходе клеток обратно в состояние покоя эти характерные для бласттрансформации изменения прекращаются, возвращаясь к первоначальному уровню быстрее, чем синтез ДНК. Однако следует оговориться, что фаза затухания ответа изучена не так хорошо, как ранние стадии активации.

Необходим ли синтез белка для синтеза ДНК? Нетрудно показать, что клетки не синтезируют ДНК и не делятся, если стимуляция проходила в присутствии ингибиторов синтеза белка. Однако было бы рискованным утверждать, что если ингибитор какого-либо клеточного процесса предотвращает также и синтез ДНК, то эти процессы взаимозависимы. К тому же в отсутствие синтеза белка клетки теряют жизнеспособность и погибают. Более того, ингибитор может изменить до неузнаваемости течение каких-либо других процессов, которые как раз и необходимы для синтеза ДНК. Тем не менее в совокупности имеющиеся данные свидетельствуют в пользу важной роли раннего синтеза белка для активации. Если в культуру клеток добавить ингибитор синтеза белка пуромицин за 1,5 ч до добавления Кон А и удалить через 2,5 ч, то синтез ДНК, возникающий через 48 ч после стимуляции Кон А, подавляется. Для такого эффекта белковый синтез должен быть ингибирован по крайней мере на 75%. Если Кон А уже присутствовал за 6 ч до того, как был добавлен ингибитор, то синтез ДНК подавляться не будет. Это говорит о том, что белки, существенные для синтеза ДНК, образуются в первый час и не позже шестого

часа. Возражения, выдвинутые выше, частично снимаются данными о том, что циклогексимид (еще один ингибитор синтеза белка с другим механизмом действия) вызывает такой же эффект, как и пуромидин, и что влияние обоих этих реагентов на синтез как ДНК, так и белка почти полностью прекращается после их удаления [46]. Существуют данные, противоречащие этому выводу. Так, было показано, что клетка может синтезировать ДНК через 48 ч после добавления Кон А даже несмотря на то, что ингибитор синтеза белка (анизомидин) присутствует в культуре в первые 24 ч, однако достигаемую при этом степень ингибирования синтеза белка не определяли [47].

Количество различных белков, синтезируемых в активированных лимфоцитах, огромно. Поскольку определенные белки предпочтительно синтезируются в определенное время и поскольку одни белки могут иметь более важное значение для реализации активационной программы, чем другие, измерение общего уровня синтеза белка — это лишь первый шаг в выяснении роли новосинтезированных белков в активации. Не исключено, что синтез некоторых белков претерпевает значительные изменения в первые часы активации, задолго до появления изменений в скорости синтеза большинства остальных белков. Это предположение возникло в результате опытов, в которых методом ДСН-ПАГЭ (электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии 2% додецилсульфата натрия) исследовали белки, меченные с помощью радиоактивных предшественников и отбираемые через различные промежутки времени после стимуляции лимфоцитов воздействием ФГА или Кон А. Юдей и Паркер [44] описали гетерогенный по заряду белок с мол. массой 28 кДа, который они обнаружили в мембранах выделенных Т-клеток человека, обработанных Кон А. Этот белок, по-видимому, расположен на наружной поверхности мембраны клетки, поскольку он оказался чувствительным к действию протеолитических ферментов или нейраминидазы. Увеличение синтеза этого белка отмечается уже ко второму часу, что совпадает с самыми ранними данными об изменениях суммарного синтеза белка. Бото и Хэмфрейс [48] сообщили, что белок с мол. массой 55 кДа синтезировался с повышенной скоростью в течение как первого, так и второго дня с момента начала стимуляции воздействием Кон А или ФГА, белки с мол. массами 30 и 35 кДа — только во второй день, белок с мол. массой 120 кДа — только начиная с третьего дня, а белок с мол. массой 125 кДа, обнаруживаемый в покоящихся клетках, исчезал в первый день после стимуляции и вновь появлялся на четвертый и пятый дни. Хотя наборы белков, наблюдаемые при стимуляции с помощью Кон А и ФГА, во многом похожи, между ними существуют определенные различия, объясняющиеся, возможно, тем, что популяции Т-клеток, стимулируемые этими митогенами, не идентичны.

Через четыре часа после добавления Кон А наибольшая концентрация новосинтезированных белков оказывается в плазматической мембране, несколько меньшая — в цитоплазме и самая меньшая — в ядре и митохондриях. Сократительный белок актин выделяется среди цитоплазматических белков тем, что скорость его синтеза увеличивается в первые 12 ч. Через 12 ч наблюдается значительное увеличение размера ядра (бласттрансформация), зависимое от синтеза новых белков ядерного матрикса. Определенные ядерные негистоновые белки регулируют активность ДНК-полимеразы: синтез белков этой категории (особенно это касается негистонового белка с мол. массой 40 кДа) увеличивается через 12 ч после добавления ФГА к лимфоцитам человека или Кон А — к лимфоцитам кролика. Наблюдается увеличенный синтез гистонов, так же как и ядерных негистоновых белков в Т-клетках. Стимуляция В-клеток кролика с помощью антител к иммуноглобулинам вызывает аналогичные изменения.

В следующем десятилетии мы несомненно станем свидетелями того, насколько больше внимания будет уделяться кинетике синтеза определенных белков на ранних этапах стимуляции клеток митогенами, особенно в В-клетках, в случае которых вопрос на сегодняшний день изучен недостаточно. Выяснение природы и функции этих интересных белков, идентифицируемых только как полосы в геле, будет трудной, но благодарной задачей.

12.5.2.2. Ускорение синтеза РНК

Хотя в покоящемся лимфоците, находящемся в фазе G_0 клеточного цикла, ДНК не синтезируется, тем не менее в нем с небольшой скоростью идет синтез РНК и белков. Новообразованная РНК оказывается гетерогенной по размеру, а ее синтез компенсирует деградацию. На электронных микрофотографиях видно, что одиночные рибосомы рассеяны по цитоплазме. Из всей РНК покоящегося лимфоцита 85% приходится на рибосомную (рРНК).

Увеличение синтеза РНК вызывается стимуляцией лимфоцитов из представителей многих видов с помощью разнообразных митогенов и, по-видимому, является универсальным звеном активационной программы. Чаще всего за

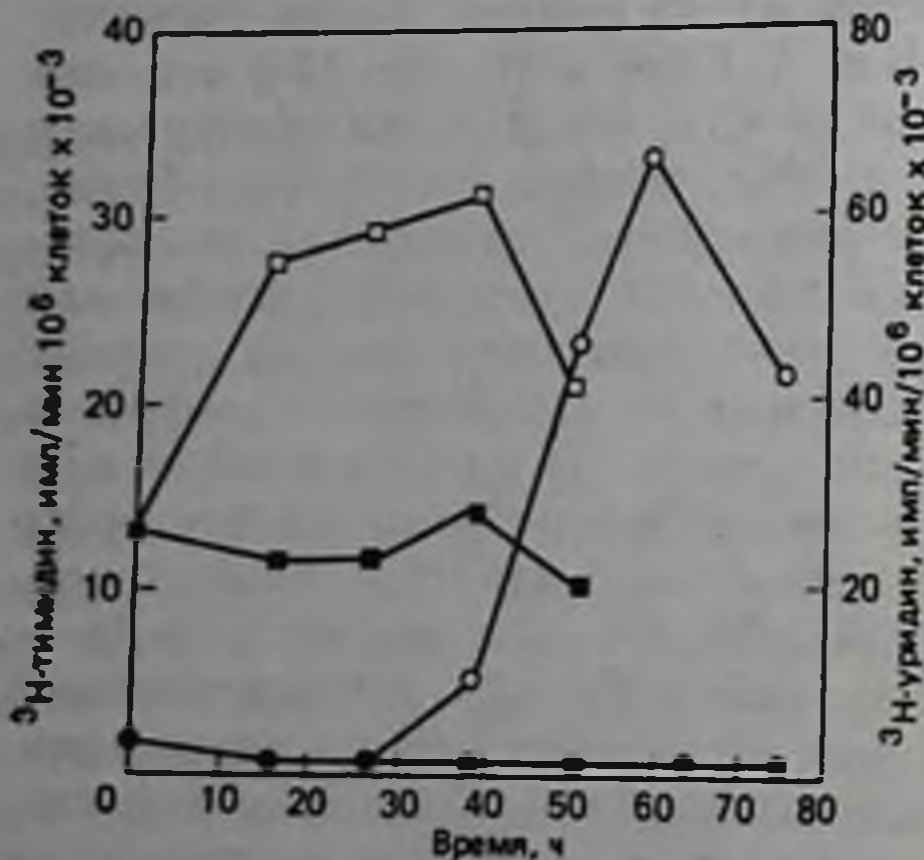


Рис. 12.11. Кинетические характеристики синтеза РНК и ДНК в лимфоцитах лошади, стимулированных ФГА.

Во время, указанное на графике, добавляли 5 мкКи ^3H -уридина или 2,5 мкКи ^3H -тимидина. После трехчасовой инкубации определялась радиоактивность фракции, нерастворимой в трехуксусной кислоте. На графике белыми квадратиками обозначено включение уридина в ФГА-стимулированные клетки, черными квадратиками — включение уридина в нестимулированные клетки, белыми кружками — включение тимидина в ФГА-стимулированные клетки, черными кружками — включение тимидина в нестимулированные клетки ([49]; печатается с разрешения).

ходом синтеза РНК следят по включению ^3H -уридина в кислотонерастворимую внутриклеточную фракцию за единицу времени. С помощью этого метода невозможно отличить усиление транспорта уридина (при котором количество меченой РНК может увеличиться за счет увеличения удельной радиоактивности пула предшественников) от повышения активности РНК-синтеза. Кроме того, при этом не учитываются гетерогенность РНК и скорость ее деградации, и, следовательно, величина включения не может служить количественной характеристикой синтеза РНК. Однако ввиду простоты выполнения данный метод получил самое широкое распространение. Ускорение включения уридина становится заметным в первые 6 ч после контакта с митогеном — примерно на 2 дня раньше, чем ускоряется включение тимидина в ДНК (рис. 12.11). Согласно последним данным, колацеямид и колцихин, ингибиторы сборки микротрубочек, часто используемые для блокирования митоза в метафазе, по-видимому, воздействуют независимо друг от друга на плазматическую мембрану, ингибируя транспорт уридина и тимидина, что в свою очередь приводит к уменьшению

синтеза РНК и ДНК [50]. Влияние колихицина на транспорт обнаруживается также и в нестимулированных лимфоцитах.

Инкубация с ^3H -уридином в течение 5 мин через один час после добавления ФГА приводит к избирательному мечению гетерогенной популяции небольших молекул РНК, подобных тем, которые синтезируются в покоящихся лимфоцитах, однако даже на данной ранней стадии скорость мечения этих РНК оказывается значительно увеличенной. Более быстрое мечение на первом часу полностью объясняется повышенным транспортом уридина (рис. 12.9) и как следствие этого более быстрым увеличением концентрации метки в цитоплазматическом и ядерном пулах нуклеозидов (оно регистрируется уже через 20 мин), а не возрастанием скорости синтеза РНК [51]. Эта фаза синтеза РНК особенно чувствительна к ингибированию кордицепином (3'-дезоксаденозином), препятствующим процессингу мРНК, что объясняется его включением в полиадениловый хвост.

Через час после добавления ФГА регистрируется увеличение транспорта метильных групп от метционина на гуаниловые основания транспортной РНК, достигающее максимума к 12-му часу. Это изменение сопровождается аминокципированием тРНК и связыванием ее с рибосомой [52]; оно препятствует увеличению скорости синтеза транспортных РНК, наблюдаемому к 24-му часу. Между 6 и 12 ч также становится заметным повышенное включение метки в 45S-ядерную РНК, которая, как представляется, содержит новотранскрибируемые последовательности, превращающиеся впоследствии в новые молекулы матричных РНК. Это наблюдаемое увеличение синтеза РНК может подавляться актиномицином D (50 нг/мл), но не кордицепином. Высокая нормальная скорость деградации 18S-рРНК уменьшается, что вызывает увеличение отношения 18S-РНК/28S-РНК. Это дает в руки исследователей новый показатель активации, независимый от весьма трудно измеряемого изменения размеров нуклеозидного пула [53]. Хотя общая тенденция заключается в увеличении синтеза и содержания мРНК, некоторые виды матричных РНК, существующие в покоящихся клетках, исчезают при активации.

ФГА также повышает активность поли(АDP-рибоза)-полимеразы, что обнаруживается к 48-му часу. При этом максимум синтеза РНК достигается к 60-му часу, а синтеза ДНК — к 72 часу. Никотинамид ингибирует действие этого фермента, предотвращая в результате трансформацию и пролиферацию клетки. Циклический аденозин-3',5'-монофосфат в концентрации 10^{-5} — 10^{-4} М может также увеличивать транскрипцию РНК, усиливая включение ^3H -уридина на 50% между 24 и 48 часами. Действительно, позднее увеличение концентрации сАМР может обуславливать повышение скорости синтеза РНК в ФГА-стимулированных лимфоцитах. Однако сАМР не индуцирует увеличения транспорта уридина и уменьшения деградации РНК и поэтому не может быть причиной всех особенностей метаболизма РНК, индуцируемых добавлением ФГА [49].

Превращение одиночных рибосом в полирибосомы и инициация синтеза белка становятся заметными в первые 20 ч после начала стимуляции с помощью ФГА; при этом после первых четырех часов соотношение между рРНК и мРНК несколько изменяется. К 48-му часу содержание РНК в лимфоцитах человека удваивается, а к 96-му часу — удваивается еще раз. Тем не менее отношение количества РНК к сухой массе клетки едва ли меняется, поскольку в течение этого времени происходит общее увеличение массы клетки [54].

Традиционной точке зрения, согласно которой митогены необходимы только для взаимодействия с поверхностными рецепторами, лежащими в основе инициации активационной программы, противоречат следующие данные. Через

1 ч после добавления ФГА к выделенным ядрам лимфоцитов увеличивается ДНК-направляемый синтез ^{45}S -РНК. Более того, в живых клетках, обработанных радиоактивно меченым ФГА, радиоактивность, согласно данным, полученным с помощью метода радиоавтографии, обнаруживалась в ядре. Хотя досих пор нет убедительных данных о том, что эта метка существует в виде интактных митогенных молекул, было бы преждевременным отбрасывать возможность того, что проникший внутрь митоген может вносить вклад в активацию, отличный от вклада, вносимого им при связывании с поверхностными рецепторами.

12.5.2.3. Ускорение синтеза полиаминов

Практически в любом типе клеток млекопитающих инициации роста сопутствует индукция орнитин-декарбоксилазы. Ее активность, регулируемая ионами Ca^{2+} , становится заметной на ранней стадии фазы G_1 клеточного цикла.



Рис. 12.12. Путь синтеза полиаминов.

Вследствие короткого времени полужизни этого фермента декарбоксилирование орнитина оказывается скоростью-лимитирующим этапом в цепи синтеза полиаминов (рис. 12.12).

Полиамины несут значительный положительный заряд и могут вытеснять такие катионы, как Ca^{2+} и Mg^{2+} , из различных мест связывания в клетке, в том числе из мембранных фосфолипидов. Поскольку в молекулах полиаминов имеются как гидрофобные участки, так и свободные аминогруппы, они способны вести себя подобно фенотиазинам (например, хлорпромазину) и некоторым местным анестезирующим средствам, также способным вытеснять Ca^{2+} и активировать синтез фосфатидилинозитола *de novo*.

Лимфоциты барана часто используются для изучения активации внутриклеточных ферментов в тех случаях, когда требуется особенно большое количество клеток. Если лимфоциты барана простимулировать в течение 3 ч с помощью Кон А, то в следующие 6 ч у них будет наблюдаться резкое увеличение активностей S-аденозилметионин-декарбоксилазы и орнитин-декарбоксилазы, приводящее к синтезу и накоплению полиаминов путресцина, спермидина и спермина. Добавление Кон А в концентрациях, слишком больших для того, чтобы вызвать активацию, приводит к точно такому же раннему увеличению синтеза полиаминов, как и добавление его в митогенных концентрациях, однако лишь в последнем случае уровень более позднего синтеза полиаминов между 20 и 30 ч остается высоким. Когда вместе с Кон А, взятым в таких высоких немитогенных дозах, добавляется еще и α -метилманнозид, сохраняются как высокая ферментативная активность между 20 и 30 ч, так и синтез ДНК между 48 и 72 ч [55].

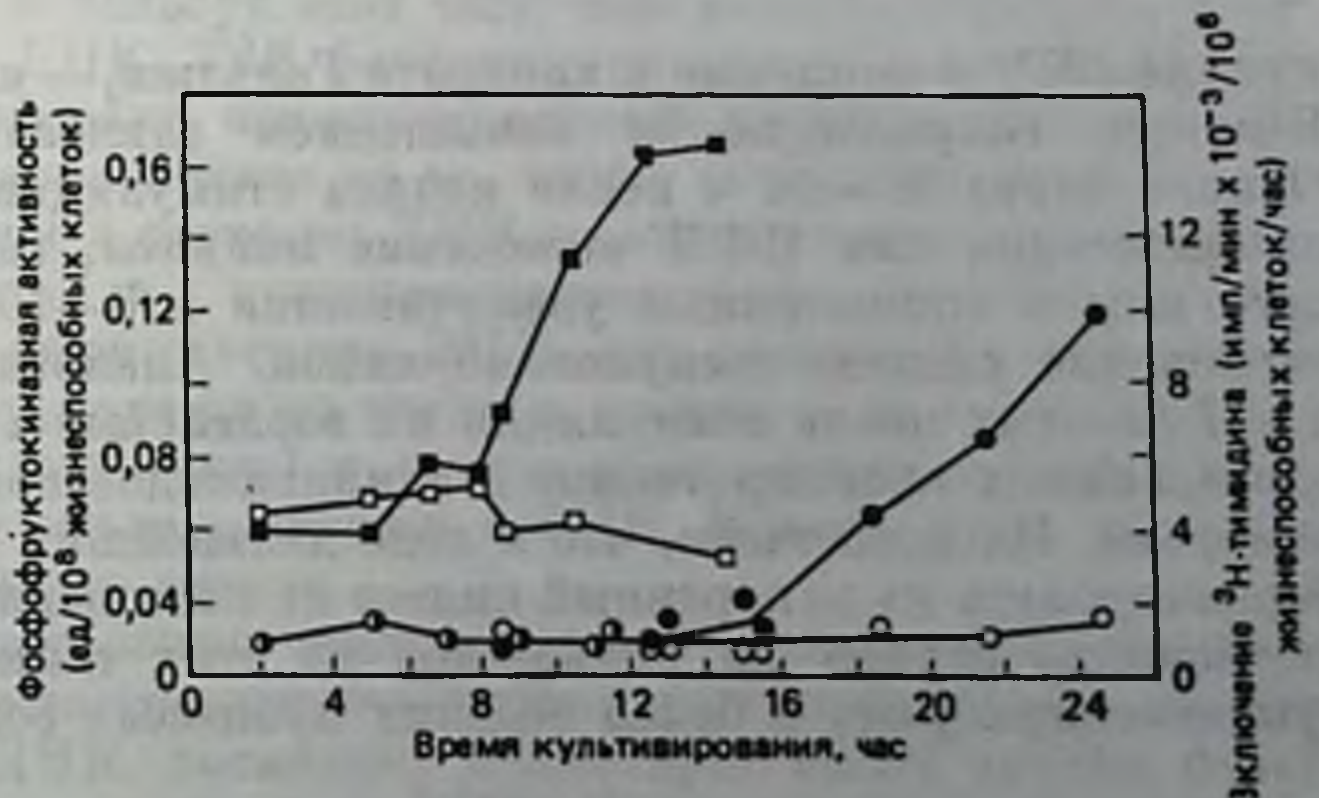
Ингибирование S-аденозилметилон-декарбоксилазы метилглиоксальбисгуанялгидразоном (МГБГ) предотвращает индуцируемое Кон А увеличение количества спермидина и спермина, что приводит к накоплению путресцина. Включение тимидина в ДНК при этом также ингибируется, а ускоренный синтез белка и РНК всех классов протекает нормально, как и изменения, наблюдаемые в процессинге и накоплении РНК [55]. Самое раннее повышение скорости синтеза РНК (через 6 ч в случае лимфоцитов крупного рогатого скота) всегда предшествует самому раннему увеличению содержания полиаминов (8—10 ч). При изучении работы двух ингибиторов, один из которых (α -метилорнитин, ингибитор синтеза всех трех полиаминов) действует на более ранней стадии, чем второй (S-аденозил-[\pm 2-метил]-метионин, ингибирующий лишь синтез спермина), оказалось, что оба они ингибируют синтез ДНК, но не РНК.

Все эти данные указывают на то, что по каким-то пока еще не известным причинам синтез спермина, особенно между 20 и 30 часами, по-видимому, необходим для перехода лимфоцитов из фазы G_1 в фазу S; для синтеза РНК, однако, спермина не требуется. Было высказано предположение, что за функциональную активность анионных полиаминов могут быть ответственны Ca^{2+} -связывающие свойства. Не исключено, что изменения в метаболизме РНК и изменения в синтезе полиаминов и ДНК представляют собой «параллельные ветви активационной программы», однако для такого утверждения необходимо доказать, что для синтеза полиаминов не требуется раннего синтеза РНК в критический период между 20 и 30 ч.

12.5.2.4. Изменения в метаболизме углеводов

Среди многих веществ, проникновение которых в клетку ускоряется после контакта с митогеном, особое место занимает глюкоза. Аэробный гликолиз служит основным источником энергии в покоящемся лимфоците. В процессе деления лимфоцитов и клеток многих других типов его интенсивность характерно

Рис. 12.13. Изменение во времени фосфофруктокиназной активности и включения 3H -тимидина в культивируемые лимфоциты селезенки мыши. Фосфокиназная активность показана квадратиками, а включение тимидина — кружками. Белые квадратик и кружки относятся к нестимулированным клеткам, а черные — к клеткам, культивируемым в присутствии Кон А (1 мкг/мл), добавленного в момент времени 0 ([56]; печатается с разрешения).



возрастает. В результате стимуляции с помощью Кон А активируется анаэробный гликолиз. При этом образование лактата и утилизация глюкозы возрастают линейно, начиная с момента добавления митогена. Позднее к этим изменениям добавляется увеличение активности таких ферментов, как фосфофруктокиназа [56] (рис. 12.13), лактат-дегидрогеназа и пируват-киназа, впервые определяемые к 8 ч. Активность этих ферментов достигает максимума около 48 ч, когда она превышает уровень активности в покоящихся клетках более чем в 10 раз.

Ингибитор синтеза белка циклогексимид, добавленный за 6 ч до этого повышения активности ферментов, ингибирует его, однако, если активность уже начала повышаться, то синтез белка больше не требуется [56]. Сходство кривых зависимости фосфофруктокиназной активности и включения тимидина от дозы добавленного митогена (рис. 12.14) свидетельствуют в пользу гипотезы, согласно которой повышенное генерирование энергии при гликолизе способствует энергозависимому синтезу ДНК, идущему позднее.

Значительно раньше, в пределах нескольких минут после сшивки рецепторов, оба типа гликолиза — как аэробный, так и анаэробный — необходимы для кэппинга, однако неизвестно, увеличивается ли при этом их интенсивность по сравнению с уровнем, наблюдаемым в покоящихся клетках.

Поскольку в процессе созревания секретируемых иммуноглобулинов к ним присоединяются углеводы — коровые в шероховатом эндоплазматическом рети-

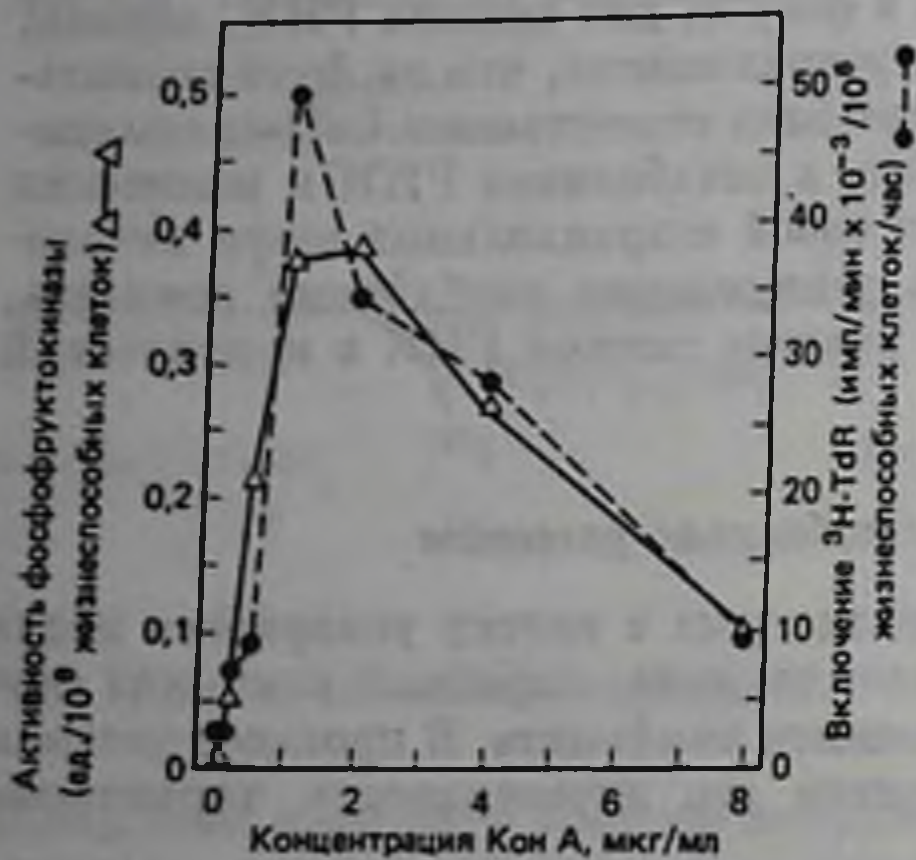


Рис. 12.14. Активность фосфофруктокиназы (белые треугольники) и скорость включения ³H-тимидина (черные кружки), регистрируемые через 48 ч после начала стимуляции лимфоцитов лошади с помощью Кон А. Кривые зависимости этих двух процессов от концентрации митогена совпадают. Данный результат совместим с гипотезой, согласно которой один из этих процессов зависит от другого, хотя строго ее не доказывает ([56]; печатается с разрешения).

кулуме (ЭР) и концевые в аппарате Гольджи, — неудивительно, что активация В-клеток сопровождается повышением гликозилтрансферазной активности. Однако через 30—40 ч после начала стимуляции В-клеток с помощью ЛПС, липопротейна или МФЛ включение маннозы, галактозы и фукозы в гликопротеины и гликолипиды увеличивается в 3—10 раз, что сильно опережает увеличение синтеза иммуноглобулинов. Аналогичные эффекты наблюдаются и в Т-клетках после стимуляции их воздействием ФГА или Кон А. Многие из образованных гликопротеинов и гликолипидов появляются на плазматической мембране. Не исключено, что в ходе дальнейших исследований удастся дифференцировать их ускоренный синтез от повышенного оборота и таким образом установить, играют ли какие-либо из этих гликопротеинов и гликолипидов существенную роль в более поздних процессах созревания.

12.5.2.5. Бласттрансформация

Наиболее известный способ идентификации активированных клеток заключается в определении у этих клеток под световым микроскопом морфологических изменений, называемых *бласттрансформацией*.

В Т- и В-лимфоцитах, находящихся в фазе G₁, между 12 и 24 ч начинает увеличиваться масса как ядра, так и цитоплазмы, появляется крупное ядрышко и наблюдается фрагментация эухроматина. При этом, как видно в электронный

микроскоп, эндоплазматический ретикулум, полирибосомы и аппарат Гольджи находятся в цитоплазме. Количество таких клеток (бластов) можно определить с помощью гемоцитометра, идентифицируя их по наличию морфологических особенностей или с помощью электронных счетчиков клеток, исходя из объема клеток (объем бласта в 3—30 раз больше, чем объем «покоящейся» клетки). Основным изменением в структуре ядра оказывается увеличение объема межхроматинового вещества, обусловленное накоплением новосинтезированных белков, в том числе сократительных, например актина. В связи с этим циклогексимид, ингибитор синтеза белка, способен также предотвращать и бласттрансформацию. Хотя бласттрансформация часто предшествует синтезу ДНК, это происходит не всегда. Например, некоторые антисыворотки против мю- и дельта-цепи могут индуцировать бласттрансформацию у В-клеток мыши, однако синтез ДНК в этих клетках начинается лишь при наличии факторов роста, продуцируемых Т-клетками. Ни один митоген не стимулирует все клетки. Даже при стимуляции тимоцитов или очищенных Т-клеток с помощью ФГА очень редко вступают в клеточный цикл более 50% всех клеток, а при использовании других митогенов это значение обычно лежит между 10 и 25%, тогда как в нестимулированных популяциях имеется лишь <3% бластов.

12.5.3. Процессы, протекающие через несколько дней: синтез ДНК

Критерием активации лимфоцита служит синтез ДНК, приводящий к митозу. После стимуляции с помощью ФГА или Кон А синтез ДНК (фаза S) может начаться примерно через 36 ч и достигнуть максимума между 48—72 ч (рис. 12.11), однако в случае других митогенов синтез ДНК может сдвигаться на более поздние сроки. Отсутствие синтеза ДНК служит одним из признаков того, что лимфоцит находится в фазе G_0 или G_1 . Для определения активации лимфоцита митогеном значительно шире используется поглощение клеткой ^3H -тимидина (^3H -TdR), хотя, используя этот тест, невозможно отличить транспорт нуклеозидов от синтеза ДНК; TdR фосфорилируется, как только входит в клетку, образуя тимидинтрифосфат, непосредственный предшественник ДНК. Простое улучшение метода, направленное на то, чтобы учитывать лишь поглощение ^3H -TdR, прямо связанное с синтезом ДНК, сводится к измерению количества ^3H -TdR, включенного в кислотонерастворимые макромолекулы (рис. 12.11). Тимидин, как предшественник ДНК, для данного метода удобен поскольку он быстро транспортируется из среды в клетку (в то время как его фосфорилированные производные — нет) и содержит единственное основание, обнаруживаемое в ДНК и не обнаруживаемое в РНК. Именно это и является основным преимуществом данного метода.

К сожалению, имеются серьезные сомнения относительно того, что скорость включения ^3H -TdR в макромолекулы можно интерпретировать просто как скорость синтеза новой ДНК, поскольку существует много других путей включения ^3H -TdR, не связанных с синтезом ДНК. Предположим, что в течение четырехчасовой инкубации в клетки популяции А включилось больше ^3H -TdR, чем в клетки популяции Б. Такой результат мог бы отражать различие скоростей синтеза ДНК (как это обычно интерпретируется). Если это действительно так, то все же необходимо провести дальнейшее исследование, с тем чтобы выяснить, характерно ли это различие для большинства клеток или же оно обусловлено существованием небольшой сверхактивной субпопуляции клеток А. Однако этот результат может отражать и: а) более высокую скорость транспорта TdR в А-клетки, приводящую к более высокой концентрации

меченых предшественников, а также повышение скорости транспорта нуклеотидов при стимуляции митогеном; б) меньшую концентрацию предшественников в А-клетках, что приводит к более высокой относительной концентрации метки, даже несмотря на то, что скорости транспорта в клетках обеих популяций одинаковы; в) различие скорости обмена нуклеозидов и нуклеотидов между различными содержащими их компартментами клетки (например, между цитоплазмой и ядром); г) различие скоростей фосфорилирования нуклеозидов; д) включение, обусловленное вырезанием и репарацией ДНК, а не синтезом новых цепей. После стимуляции с помощью ФГА повышается активность урицил-ДНК-гликозилазы, репарационного фермента, вырезающего любой остаток уридина в ДНК, причем кинетические характеристики работы этого фермента оказываются похожими на соответствующие характеристики классической ДНК-полимеразы; е) наличие любой комбинации перечисленных факторов.

К счастью, несколько авторов получили экспериментальные данные в пользу утверждения, что безотносительно к перечисленным выше возможным



Рис. 12.15. Цитофлуорограмма популяции лимфоцитов, включающей в себя клетки в различных стадиях клеточного цикла. С помощью такой цитофлуорограммы можно определить, какая часть клеток популяции находится в той или иной фазе клеточного цикла. Лимфоциты подвергались пожизненному окрашиванию акридиновым оранжевым, метящим РНК красной флуоресцентной меткой, а ДНК — зеленой. Интенсивность красной флуоресценции отложена на оси абсцисс, так что точки, расположенные правее, отвечают увеличивающемуся количеству РНК в клетке. По оси ординат отложена интенсивность зеленой флуоресценции, так что точки, расположенные выше, отвечают увеличивающемуся количеству ДНК в клетке. Линии, проведенные несколько произвольно на диаграмме, отделяют клетки, на-

ходящиеся в данной фазе клеточного цикла, от других клеток. Клетки, находящиеся в фазе G₀, содержат нормальное диплоидное количество ДНК и минимальное количество РНК. В клетках, находящихся в фазе G₁, начался синтез РНК, которая теперь накапливается, но клетка еще не вступила в фазу S. В фазах G₂ и M клетки содержат удвоенное (по отношению к нормальному диплоидному) количество ДНК, тогда как в фазе S — промежуточное количество. Точки, расположенные ниже нижней горизонтальной линии, соответствующие обломкам клеток, а также точки, расположенные слева от наклонной линии, соответствующие агрегатам клеток, в данном анализе не рассматриваются. Результаты были получены на тимocyтах мыши, стимулированных с помощью Кош А ([58], печатается с разрешения).

ошибкам в интерпретации включение TdR идет параллельно с синтезом ДНК. Тем не менее ряд других авторов до сих пор делает выводы с осторожностью. Используя холодовой гипотонический шок для увеличения проницаемости лимфоцитов человека по отношению к нуклеотидам, Баклей и Уэднер [57] смогли измерить скорость включения ^3H -тимидинтрифосфатов в ДНК по классическому полуконсервативному механизму. Этот метод позволяет избежать всех приведенных выше ошибок интерпретации, за исключением ошибки «д» [57]. Авторы подчеркивают, что основные различия в поглощении TdR между инбредными линиями мышей не совпадают с различиями во включении тимидинтрифосфатов и, следовательно, они могут объясняться одной из приведенных причин, а не различием собственно в синтезе ДНК. Бетел и др. [58] с помощью цитофлуориметрического анализа клеток, окрашенных флуоресцентным красителем акридиновым оранжевым, показали, что между включением TdR в мышечные тимоциты и увеличением количества ДНК в клетке заметной корреляции нет. Акридиновый оранжевый, флуоресцентный краситель, проникает в живые клетки, но в присутствии детергента и при низких значениях рН его поступление в клетку увеличивается. При условии что РНК гораздо раньше, чем ДНК, переходит под действием хелатирующих агентов в одноцепочечную форму, этот краситель окрашивает ДНК в зеленый, а РНК в красный цвет. Затем с помощью цитофлуориметрического анализа получают гистограмму интенсивностей красной и зеленой флуоресценции (характеризующих содержание ДНК и РНК) в индивидуальных клетках. По этой гистограмме можно оценить относительное количество клеток в той или иной фазе клеточного цикла (рис. 12.15). Было показано, что Кон А увеличивает включение TdR в 10—20 раз, но, если судить по увеличению количества ДНК, лишь удваивает долю клеток, находящихся в фазах S, G₂ или M. При удалении адгезивных клеток включение TdR почти полностью прекращается, хотя доля клеток, находящихся в цикле деления, при этом практически не изменяется. В то же время при добавлении новых адгезивных клеток включение TdR повышается в 25 раз, при том, что процентное содержание клеток, находящихся в цикле деления, лишь удваивается. Поскольку в каждой клетке во время цикла деления количество ДНК может лишь удваиваться, эти результаты свидетельствуют о том, что изменения во включении TdR могут иногда значительно превышать изменения собственно синтеза ДНК.

При использовании описанного выше цитофлуориметрического метода клетки с увеличенным содержанием (ДНК) (т. е. в фазах S, G₂ или M) и клетки с нормальным диплоидным содержанием ДНК, но с увеличенным содержанием РНК (т. е. в фазах G₀ или G₁) относят к «бластам», идентифицируемым по морфологическим признакам.

12.6. Активация посредством сшивки рецепторов для антигенов

12.6.1. Процессы, индуцируемые антигенами в антигенсвязывающих лимфоцитах

12.6.1.1. Роль антигенсвязывающих клеток в изучении иммунного ответа

В начале данной главы мы рассмотрели созданную более 20 лет назад клонально-селекционную теорию сэра Макфарлейна Бернета, блестяще объяснившую способность антигенов индуцировать специфический иммунный

ответ. Важнейшее предсказание этой теории заключается в том, что для каждого антигена в неиммунизированном животном должна существовать очень небольшая субпопуляция лимфоцитов, имеющих рецепторы, специфические к эпитопам антигена. Данное предсказание нашло экспериментальное подтверждение в 1967 г., когда Наор и Сулицеаню [59] впервые продемонстрировали, что существуют антигенсвязывающие клетки для альбумина крупного рогатого скота. После этого довольно скоро было доказано существование антигенсвязывающих клеток для гемодинамина брюхоногих моллюсков, синтетических полипептидов, флуоресценна, гетерологичных эритроцитов. Идентификацию таких клеток проводили методами радиоавтографии, флуоресценции и розеткообразования. Поскольку ранние активационные процессы при иммунном ответе на введение антигена должны протекать в клетках, имеющих рецепторы к данному антигену, можно было бы надеяться, что открытие антигенсвязывающих клеток поможет в короткий срок понять, как антигены стимулируют связывающиеся с ними лимфоциты. На самом же деле изучение механизмов, лежащих в основе индуцируемых антигеном изменений, развивалось очень медленно, и, как читатель уже, естественно, заметил, большая часть известной нам сейчас информации о ранних активационных процессах была получена при использовании митогенов. Решающее методологическое преимущество применения митогенов заключается в том, что доля лимфоцитов, активируемая при их воздействии, столь велика, что делает возможным изучение биохимических изменений в большом количестве материала. Невозможно прямым способом исследовать биохимические процессы в популяции антигенсвязывающих клеток, составляющей 1 : 10 000 часть всех присутствующих лимфоцитов, не выделяя эти антигенсвязывающие клетки, что в свою очередь оказывается весьма трудной задачей. Однако довольно рискованно, не имея необходимых экспериментальных данных, предполагать, что процессы, запускаемые в клетках данного типа под действием митогена, в точности аналогичны процессам, вызываемым антигеном. Совершенно очевидно, что, если мы хотим когда-либо понять, какие изменения вызывает антиген в клетках, с которыми реагирует, мы должны исследовать эти изменения прямыми методами.

Первая задача при изучении индуцируемых антигеном изменений — это идентификация соответствующей популяции антигенсвязывающих клеток (АВС — от англ. antigen binding cells) и накопление экспериментальных данных в пользу того, что свойства АВС в целом аналогичны свойствам иммунокомпетентных клеток, фигурирующих в клонально-селекционной теории. Известные популяции антигенсвязывающих клеток (среди них есть как В-, так и Т-клетки) способны связывать антиген с такой же специфичностью, как и антитело. Если аффинным способом выделить мышинные клетки, связывающиеся с эритроцитами барана, то среди выделенных клеток окажутся такие клетки, выполняющие важные функции в иммунном ответе, как В-клетки (предшественники антителообразующих клеток), Т-хелперы, Т-супрессоры и Т-киллеры. Ограниченные данные такого типа имеются и для нескольких других антигенов, АВС которых были изучены, в том числе для белков, связанных с гидрофобными гаптенами (нитрофенилом, флуоресценном), фосфорилхолином, а также синтетических полипептидов. Эффективные методы очистки АВС включают пришивку антигена или гаптена к твердому носителю, например к пластиковой чашке или волокнам нейлона. Если клетки пропустить через желатин, к которому пришит гаптен, то адсорбировавшиеся на желатине клетки, способные связывать гаптен, можно вновь освободить от связи с гаптеном, обработав их коллагеназой. В случае мышинных лимфоцитов, связывающих эритроциты барана (SRBC), последовательное использование градиентного центрифугирования для разделения по

константе седиментации и по плавучей плотности может повысить чистоту АВС от 0,05% до более чем 80% с выходом почти половины всех первоначально нанесенных на градиент антигенсвязывающих В-клеток, а при определении АВС из предварительно иммунизированных животных получают еще более хорошие результаты [60]. Клетки, очищенные таким способом, были исследованы с помощью анализа предшественников методом лимитирующих разведений. В результате было показано, что практически каждая клетка в SPBC-связывающей популяции, которую можно активировать ЛПС с последующей секрецией иммуноглобулинов (IgM или IgG), действительно секретирует антитела, специфичные к SRBC. На основе этих результатов можно высказать предположение, что индуцируемые с помощью антигена процессы, изучаемые в системе SRBC-ABC, существенны для последующего иммунного ответа на SRBC.

12.6.1.2. Ранние индуцируемые антигеном процессы в антигенсвязывающих клетках

Существуют два возможных пути изучения ранних активационных процессов, индуцируемых в SRBC-ABC с помощью SRBC. Для исследования биохимических процессов необходимо выделить АВС. Сейчас известен лишь один метод выделения АВС. Это связывание их с антигеном. Следовательно, самые ранние активационные процессы могут уже произойти до того, как клетки только начнут изучаться. Несмотря на это ограничение, с помощью упомянутого выше метода градиентного центрифугирования было показано, что в пределах 1—2 ч с начала контакта с SRBC включение холина в фосфатидилхолин, характеризующее синтез фосфолипида, ускоряется в SPBC-ABC в пять раз по сравнению с уровнем, наблюдаемым в покоящихся клетках, и что ускорение прекращается примерно через 3 нед после иммунизации. Более того, несмотря на наличие взаимодействия конъюгатов клеток с антигеном во время очистки, было показано, что тимус-зависимые и тимус-независимые конъюгаты гаптенов вызывают деполяризацию мембран тринитрофенил(ТНФ)-связывающих клеток, тогда как моновалентные гаптены не вызывают такого эффекта [24].

Второй подход заключается в использовании различного под микроскопом антигена, например SRBC, на поверхности АВС для идентификации этих клеток среди многих других и изучения таким способом ранних процессов. С помощью данного подхода, например, было выяснено, что в течение одного дня после начала контакта с SRBC скорость сбрасывания и замены рецепторов к SRBC на поверхности АВС значительно увеличивается. Об этом свидетельствовала скорость, с которой восстанавливалось связывание В-клеток с антигеном после удаления рецептора воздействием проназой. В неиммунизированных АВС замена поверхностных IgM и IgD, а также рецепторов Т-клеток требует около 18 ч, однако через 1 день после добавления SRBC поверхностные IgM В-клеток способны заместиться в течение 2 ч [61]. Скорость замены поверхностных IgD и рецепторов Т-клеток при этом не изменяется, хотя их сбрасывание и происходит быстрее. У тринитрофенилсвязывающих В-клеток из толерантных к ТНФ животных рецепторы к ТНФ не могут быть заменены даже за 18 ч. Способность к замене рецепторов у этих клеток вновь появляется лишь тогда, когда спонтанно восстанавливается их способность к иммунному ответу. Исходя из этого, можно предположить, что замена рецепторов необходима лимфоцитам для окончательной дифференцировки [62].

Примерно на третий день после контакта с антигеном и *in vivo*, и *in vitro* на мембране АВС начинают появляться IgG. Очевидно, что этот процесс требует экспрессии какого-то нового гена. Данный вывод делается на основании экспе-

риментов *in vitro*, в которых добавление 5-бромдезоксипуридина BUdR (предотвращающего экспрессию новых генов) в малых дозах блокировало появление поверхностных IgC. В дальнейшем клетки, несущие все три изотипа поверхностных иммуноглобулинов (IgM, IgD и IgG), могут потерять большую часть своих IgD (в течение пяти дней) и IgM (в течение 12 дней) и превратиться в популяцию G⁺M⁻D⁻ABC, доминирующую в первый месяц первичного иммунного ответа [62]. Следует отметить, что однократная инъекция SRBC *in vivo* может вызывать появление только что описанных поверхностных изотипов, что имеет место в большинстве антигенсвязывающих В-клеток селезенки, хотя только небольшая часть данных клеток впоследствии превратится в клетки, секретирующие иммуноглобулины, или хотя бы обнаружит способность к дифференцировке при стимуляции *in vitro* с помощью ЛПС. Эти наблюдения дают возможность предположить, что в значительной части ABC ранние активационные процессы могут не приводить к окончательной дифференцировке. Вместо этого они, возможно, вызывают развитие клеток памяти. Альтернативная точка зрения заключается в том, что в большинстве клеток процессы могут развиваться только до определенной точки, после чего дифференцировка лимитируется нехваткой необходимого регуляторного фактора. Подобное протекание экспрессии изотипов поверхностных иммуноглобулинов наблюдалось после стимуляции клеток мышинной селезенки с помощью ЛПС и лимфоцитов периферической крови человека с помощью МФЛ.

В течение примерно трех дней после контакта с антигеном *in vitro* антигенсвязывающие В- и Т-клетки пролиферируют. Кроме того, наблюдается более раннее увеличение количества Т-ABC, не связанное с пролиферацией. К моменту достижения максимума иммунного ответа *in vitro* 70% SRBC-ABC успевают поделиться в предыдущие 24 ч, однако по крайней мере 20% оказываются потомками рано разделившихся клеток, не имевших рецепторов к концу первого дня. Это свидетельствует о постепенном увеличении плотности рецепторов в течение нескольких первых дней после контакта с антигеном [62]. Данные, полученные на других объектах, показывают, что плотность поверхностных IgM в фазах S и G₂ клеточного цикла выше, чем в фазе G₁, причем плотность поверхностных иммуноглобулинов вновь уменьшается, как только клетки начинают их секретировать.

Очевидно, что мы располагаем весьма ограниченными сведениями о ранних процессах, индуцируемых антигенами. Возможно, для их осуществления окажутся существенными тип антигена, доза и способ его воздействия. Кроме того, совершенно неизвестно, какое влияние на ранние процессы в В-клетках оказывают важные регуляторные факторы из Т-клеток или макрофагов. В следующем десятилетии мы, по-видимому, достигнем значительного прогресса в выяснении тонких процессов клеточной иммунологии на уровне клеточной физиологии и биохимии.

12.6.1.3. Активация, индуцируемая антителами против иммуноглобулинов

Как уже говорилось, экспериментальная литература по активации митогенами довольно обширна, тогда как данные по активации антигенами значительно более ограничены. Если мы не устоим перед почти непреодолимым соблазном распространить закономерности митогенной активации на антигенную, то неизбежно столкнемся с тем фактом, что набор мембранных молекул, сшивающихся митогеном и антигеном, неодинаков. Даже несмотря на предположение о том, что поздние процессы, такие, как синтез РНК и ДНК, в ответ на воздей-

ствия митогена и антигена протекают одинаково, самые ранние процессы могут сильно различаться, если «включающие рецепторы» различны. В связи с этим представляется целесообразным исследовать ранние процессы, вызываемые сшивкой поверхностных иммуноглобулинов В-клеток с антителами к этим иммуноглобулинам, так как при этом главное преимущество использования митогена, т. е. активация значительной части клеток, будет сочетаться еще с тем преимуществом, что антитела сшивают у В-клеток лишь рецепторы для антигенов.

Как и в случае активации с помощью антигена, изучение активации, индуцированной антителами против иммуноглобулинов, началось с противоположных концов активационной программы. При этом значительный промежуток между началом и концом активации остался неизученным. В результате теперь мы имеем довольно глубокое представление о кэппинге и связанных с ним явлениях, рассмотренных в другой работе [19], и об условиях, вызывающих бласттрансформацию, синтез ДНК и синтез иммуноглобулинов [63], обсуждающихся в данном разделе. Для синтеза ДНК в В-клетках мыши, по-видимому, необходимо соблюдение следующих условий: а) антитела к иммуноглобулинам должны быть бивалентными, в то время как их моновалентные фрагменты оказываются неэффективными; б) Fc-фрагменты должны либо отсутствовать, либо связываться с Fc-рецепторами достаточно слабо. Например, F(ab')₂-фрагменты кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши и целые антитела козы к иммуноглобулинам В-клеток мыши могут индуцировать пролиферацию В-клеток, в то время как целые кроличьи иммуноглобулины не обладают такой способностью (Fc-рецепторы В-клеток мыши связываются с Fc-фрагментами иммуноглобулинов кролика сильно, а с иммуноглобулинами козы слабо). Кроличьи антитела, пришитые к полиакриламидным гранулам, могут оказаться эффективными, возможно, из-за того, что при их взаимодействии с поверхностью В-клеток не образуется кластеров Fc-фрагментов; в) если обобщить результаты нескольких лабораторий, то можно сделать вывод, что анти-μ оказываются, по-видимому, более эффективными стимуляторами, чем анти-Fab или анти-δ. Эффективность анти-μ увеличивается, если они шиты с полиакриламидными гранулами; г) степень зрелости В-клеток является важным определяющим фактором. Новорожденные или незрелые В-клетки селезенки, у которых значительно больше IgM, чем IgD, не способны эффективно заменять поверхностные иммуноглобулины и в отличие от зрелых В-клеток не отвечают на анти-μ. На поверхности зрелых клеток Lyb5⁺, отсутствующих в мышинной линии SWA/N, обнаруживается большое количество IgD. Эти клетки, по-видимому, более эффективно реагируют на добавление анти-μ; д) ответ на антитела против иммуноглобулинов доходит до максимальной пролиферации и синтеза иммуноглобулинов лишь в определенных условиях, когда в супернатантах культур клеток селезенки, инкубированных с Кон А в течение 48 ч, имеются в достаточном количестве и восстановитель и клеточные продукты (интерлейкин 1, факторы роста В-клеток). В качестве восстановителя можно взять 2-меркаптоэтанол в концентрации 5·10⁻⁶ М. В отличие от мышинных В-клеток синтез иммуноглобулинов в В-клетках кролика может быть легко стимулирован с помощью целых растворимых антител против иммуноглобулинов.

На первый взгляд, кажется парадоксальным, что антитела против иммуноглобулинов, добавленные к культурам, стимулированным с помощью ЛПС или антигенов, ингибируют синтез ДНК и созревание, однако на самом деле никакого противоречия здесь нет. (Fab')₂-фрагменты этих антител в такой же степени неспособны осуществлять это ингибирование, как и Fab-фрагменты. По-видимому, молекулы антител связывают поверхностные IgM с Fc-рецепторами.

Пока не ясно, действительно ли для ингибирования необходимо, чтобы этот Fc-рецептор находился на той же самой В-клетке, что и IgM, или же он может быть на вспомогательной (accessory) клетке. Тем не менее представляется более вероятным, что Fc-рецепторы В-клеток участвуют в коэкспинге с поверхностными IgM, если их сшить вместе с помощью целых анти- μ . Возможно, этот «негативный сигнал» через Fc γ -рецепторы также имеет какое-то отношение к неспособности целых антител, связывающих Fc-рецептор, активировать В-клетки.

Можно рассчитывать, что в следующем десятилетии будет получена новая информация по следующим ключевым вопросам: а) физиологические последствия связывания пар поверхностных рецепторов друг с другом, причем особое внимание будет уделено способности Fc-рецептора функционировать в качестве «выключателя»; б) более глубокая характеристика молекул, управляющих созреванием и пролиферацией В-клеток (например, молекул, присутствующих в супернатантах Кон А-стимулированных культур клеток), и выяснение способа их действия на биологическом уровне, и в) дальнейшее выяснение причин, благодаря которым различные субпопуляции В-клеток могут отвечать по-разному на воздействие одних и тех же активирующих агентов и факторов роста.

12.7. Некоторые природные регуляторы активации лимфоцитов

12.7.1. Интерлейкины

Эти важные регуляторы активации лимфоцитов обсуждаются значительно подробнее в гл. 21. Для оптимального синтеза ДНК в ответ на стимуляцию с помощью Кон А и ФГА (так же как и с помощью Т-зависимых антигенов) требуются адгезивные вспомогательные клетки (макрофаги). Митогены, по-видимому, индуцируют повышенную экспрессию молекул Ia-белков на поверхности макрофагов, и в результате эти макрофаги начинают играть ключевую роль в презентировании антигена Т-клеткам, рестриктированным по МНС. Растворимый продукт макрофага интерлейкин-1 (IL-1, первоначально называвшийся фактором активации лимфоцитов или LAF) может заменять целые макрофаги. Помимо многих других его свойств, он способен стимулировать образование Т-клетками другого фактора, интерлейкина-2 (IL-2, первоначально называвшегося фактором роста Т-клеток) [64]. Митогены и аллоантигены Т-клеток могут примерно через 5 ч индуцировать экспрессию рецепторов IL-2. С помощью этих рецепторов IL-2, расходуясь при этом сам, способен усиливать пролиферацию Т-клеток в ответ на митоген или антиген и поддерживать непрерывный рост популяций Т-клеток в культуре. Влияние макрофагов на рост Т-клеток в значительной степени опосредуется IL-1 и IL-2. Действие супернатанта из культуры стимулированных митогеном Т-клеток на экспрессию Thy-1 «предшественниками Т-клеток» из голых (nude) мышей, ранее приписывавшееся IL-2, по-видимому, обусловлено другим соединением, интерлейкином-3, действующим на ранних стадиях развития Т-клеток и индуцирующим, кроме того, созревание тучных клеток. Более того, получены данные в пользу предположения, что фактор, обеспечивающий неспецифическую помощь Т-клеткам, взятым от голых (nude) мышей в Т-зависимом ответе на добавление гетерологичных эритроцитов (ошибочно называемый общим термином «фактор, замещающий Т-клетки»), фактор(ы), способствующий пролиферации В-клеток (фактор роста В-клеток), и фактор(ы), вызывающий дифференцировку В-клеток (ФДВК; фактор дифференцировки В-клеток, в том числе ФДВК μ , индуцирую-

щий синтез IgM, и ФДВК_γ, индуцирующий синтез IgG), представляют собой различные продукты Т-клеток. Так, было показано, что в супернатантах культур клеток, принадлежащих разным клонам, относительные активности этих факторов сильно различаются. Окончательный вывод о том, что эти активности опосредованы различными молекулами, можно будет сделать лишь тогда, когда данные молекулы будут выделены в чистом виде. В настоящий момент успешно проводится очистка IL-1 и IL-2. При этом используется то преимущество, что эти факторы производятся *in vitro* непрерывно растущими линиями клеток [65]. Можно надеяться, что очистка этих факторов даст достаточно гомогенный материал для дальнейшего изучения молекулярной структуры, зависимости структура — функция, механизмов регуляции образования факторов и взаимодействия между факторами и рецепторами.

С точки зрения активации основной вопрос состоит в следующем: на каких этапах активационной программы в разных субпопуляциях Т- и В-клеток эти факторы действуют и как их влияние можно отдифференцировать от прямого воздействия митогена или антигена. Рассмотрим одно наблюдение, имеющее прямое отношение к этому вопросу: если количество макрофагов уменьшить их сорбцией на стеклянных гранулах до менее чем 0,2%, то Т-клетки не будут синтезировать ДНК в ответ на Кон А. Добавление макрофагов в начале активации полностью восстанавливает ответ. Даже при добавлении макрофагов на 24-м часу активации (когда Кон А уже не требуется) наблюдается 50%-ное восстановление синтеза ДНК. Эти результаты говорят о том, что Кон А сам по себе может индуцировать ранние активационные процессы в Т-клетках, в то время как интерлейкины должны вступать в активацию позднее, чтобы обеспечить синтез ДНК. Мы уже отмечали, что индукция рецепторов IL-2, возможно, является прямым следствием воздействия митогена на чувствительные к нему Т-клетки [66] (цепь реакций A₁ — E₈ на рис. 12.1). Можно предположить, что митогены запускают каскад активационных процессов и что некоторые из этих процессов делают клетки чувствительными к факторам. Эти факторы действуют на промежуточных стадиях активации, облегчая или затрудняя развитие в направлении дифференцировки или пролиферации или и того и другого (на рис. 12.1 H- и J-пути).

Хотя влияние интерлейкинов на рассмотренные в этой главе активационные процессы гипотетично, тем не менее есть все основания надеяться, что в следующем десятилетии будут достигнуты значительные успехи в выяснении физиологических и биохимических основ этой активации.

12.7.2. Липиды

Как *in vivo*, так и в содержащих сыворотку культуральных следах лимфоциты находятся в окружении сывороточных липопротеинов. Показано, что разнообразные липопротеины ингибируют включение тимидина в лимфоциты человека, стимулированные ФГА или МФЛ, и в клетки селезенки мыши, стимулированные с помощью ФГА или ЛПС. Наибольшей ингибирующей способностью обладают липопротеины с очень низкой плотностью (ЛОНП); за ними следуют липопротеины с низкой и высокой плотностью [67]. Согласно одной из оценок, у лимфоцитов 90% всех ЛОНП-связывающих участков при концентрациях, обнаруживаемых в сыворотке человека, оказываются насыщенными. Когда зависимость между связыванием и ингибированием будет выяснена (для этого необходимо идентифицировать связывающий участок у ЛОНП), возможно, удастся выяснить, как велика роль ЛОНП в качестве физиологических регуляторов пролиферации лимфоцитов. Наиболее предпочтительная на

сегодняшний день гипотеза о механизме действия ЛОНП постулирует разоб-
щение индуцируемого митогеном потока кальция в клетки и изменения концен-
траций циклических нуклеотидов, которое может быть обусловлено ингибиру-
ющим действием ЛОНП на стимуляцию фосфатидилинозитольного цикла
(рис. 12.5).

Экзогенные ганглиозиды, особенно трисналоганглиозиды при concentra-
циях, обнаруживаемых в сыворотке, также, по-видимому, ингибируют синтез
ДНК и РНК в ответ на добавление Кон А [68]. Данный эффект оказывается
обратимым; кроме того, при этом не ингибируется индуцируемое с помощью
Кон А ускорение метаболизма углеводов, так что в результате существенного
повреждения клеток не происходит. Ингибирование наблюдается даже в том
случае, когда Кон А добавляют на 24 ч раньше, чем ганглиозид.

12.7.3. Инсулин

Лимфоциты, свежесыведенные из человеческой крови, почти не имеют
рецепторов для инсулина (менее чем 6 рецепторов на одну клетку). Однако
между 30 и 48 ч после добавления Кон А быстро начинают появляться рецепторы
для инсулина. Процесс продолжается до тех пор, пока каждая клетка не смо-
жет связать примерно 350 молекул инсулина. Во многих тканях инсулин
выполняет функцию стимулятора роста. Инсулин сходен с Кон А по своему
метаболическому действию на мембранные везикулы, включая активацию
аденилат-циклазы. Инсулин не является митогеном, однако он предотвращает
возвращение клеток, уже стимулированных с помощью Кон А, в состояние
покоя [69].

12.7.4. Фрагменты компонентов системы комплемента

Установлено, что фрагменты компонента С3-системы комплемента ингиби-
руют пролиферацию Т-клеток в ответ на воздействие митогенов или аллогенных
клеток и образование цитотоксических клеток в смешанной культуре лимфоци-
тов человека [70]. Пролиферация может быть прервана, даже если она уже
началась. Кроме того, *in vivo* фрагменты С3 тормозят синтез антител в ответ на
стимуляцию с помощью антигена. Наибольшая активность обнаружена у фраг-
мента с кислотными свойствами, имеющего мол. массу от 6 до 10 кДА и являю-
щегося, по-видимому, С3e; однако, по имеющимся данным, С3с и С3d также
обладают ингибирующей активностью.

Заключение

Чтобы охватить современное состояние наших представлений об актива-
ции лимфоцитов, читателю предлагается представить, что бы мы могли узнать
о потолке Сикстинской капеллы, изучая его в темноте с помощью дюжины
узконаправленных фонарей с ограниченной подвижностью. Многие «ранние»
процессы освещены, однако любые попытки связать их один с другим в общую
схему в значительной степени произвольны. Выяснение полной последователь-
ности процессов при активации лимфоцита сейчас по существу лишь начинается.
Отрезвляюще действует осознание того факта, что во всех упомянутых иссле-
дованиях не проводилось четкого разделения отвечающих популяций клеток,
и, следовательно, вполне возможно, что некоторые из классических обсуждав-
шихся здесь «активационных процессов в лимфоцитах» в действительности
происходят в макрофагах! В связи с этим читатели вправе ожидать, что в сле-

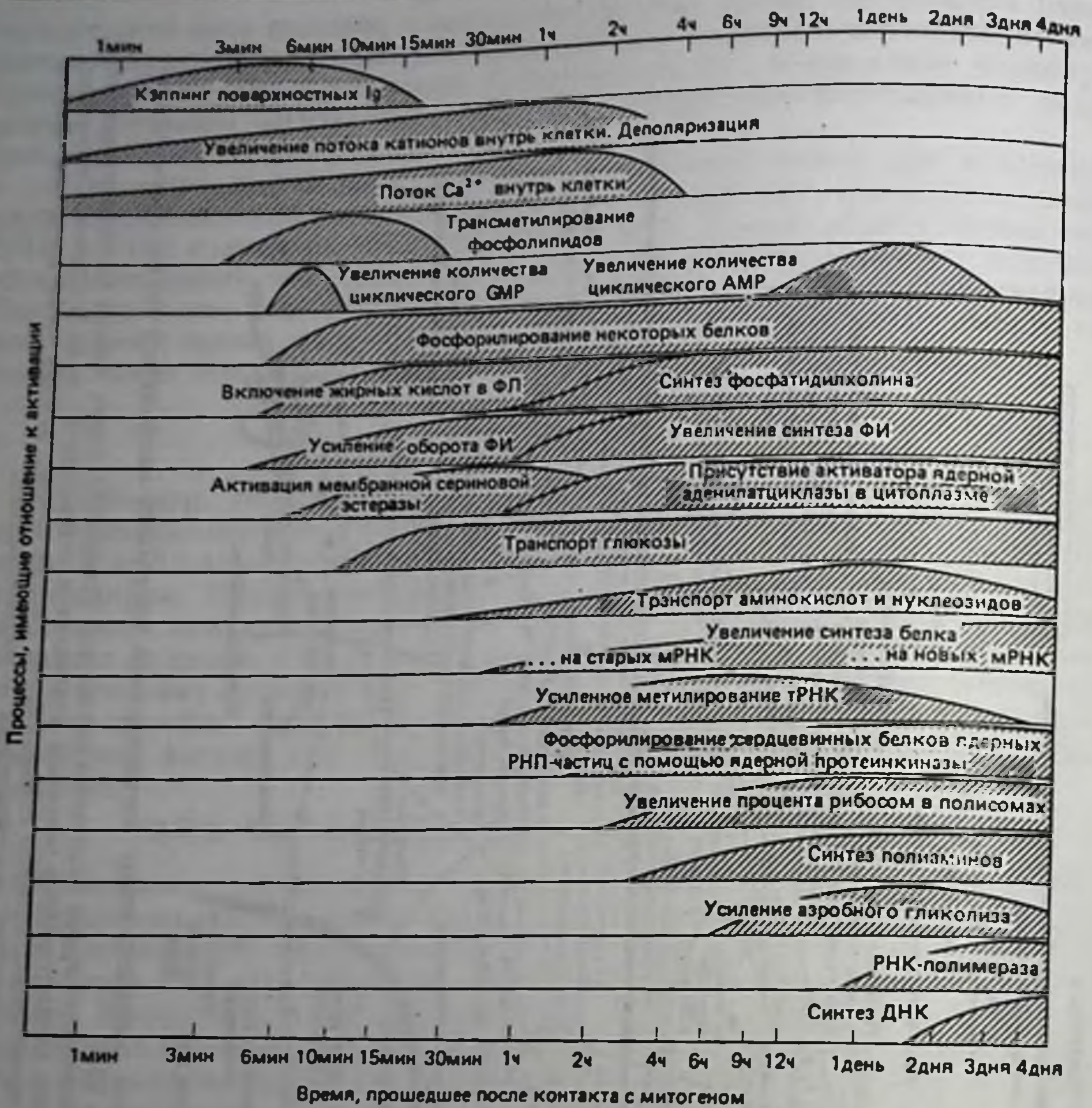


Рис. 12.17. Кинетические характеристики процессов, протекающих при активации лимфоцитов.

Заштрихованные участки приблизительно соответствуют временным интервалам, в течение которых протекают индуцируемые митогеном активационные процессы. Видно, что некоторые активационные процессы проходят за короткий период времени, тогда как другие продолжают в течение всей фазы S. Имеет место значительная асинхронность

активационных процессов в клетках одной популяции, и нет гарантий, что приведенный здесь порядок процессов справедлив для всех субпопуляций и видов. Так же, как и на рис. 12.15, большая часть данных (за исключением кэппинга поверхностных иммуноглобулинов) получена при изучении митогенов Т-клеток. Время отложено в логарифмическом масштабе. ФЛ — фосфолипид, ФИ — фосфатидилинозитол.

дующем издании этой книги приведенные ниже выводы, а также рис. 16 (являющийся опрометчивой попыткой составления «общей схемы») и рис. 17 (на котором сведены воедино данные о последовательности, с которой протекают активационные процессы во времени, даже несмотря на то, что эти процессы могут протекать в различных типах клеток, стимулированных различными митогенами) окажутся сильно измененными. Каждое из перечисленных выше утверждений, отмеченное символом*, основывается на надежных данных, сим-

волом ⁺ — на неоднозначно интерпретируемых данных, символом [‡] — на предварительных или спорных данных; символ § означает предположение.

1. Акцепторные молекулы на поверхности лимфоцита связывают стимулирующий лиганд и сшиваются друг с другом. Небольшие локальные кластеры сшитых акцепторов (рецепторов) наиболее эффективны в передаче «активационного сигнала» — более интенсивная сшивка может завести развитие событий в тупик и привести вместо активации к кэппингу [‡].

2. Увеличение проницаемости мембраны для одновалентных катионов приводит к деполяризации мембраны менее чем за 2 мин [‡], вызывая локальное увеличение концентрации Na^+ с внутренней стороны мембраны, активирующее $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-АТРазу}$.

3. Следствием (прямым или косвенным) сшивки акцепторов оказывается активация мембранной метилтрансферазы, осуществляющаяся в течение 10 мин после образования акцепторных кластеров [‡]. Как только путем переноса метильной группы с S-аденозилметионина на фосфатидилэтаноламин (ФЭА) образуется достаточное количество монометил-ФЭА[‡], повышаются текучесть мембраны и ее локальная перестройка §; в результате открываются каналы, через которые ионы Ca^{2+} могут диффундировать в клетку.

4. Такое локальное увеличение концентрации свободного Ca^{2+} с внутренней стороны мембраны активирует мембранную фосфолипазу A_2 [‡], которая катализирует образование лизолецитина и арахидоновой кислоты из фосфатидилхолина*. Под влиянием этого процесса повышается включение жирных кислот в лецитин. Обе реакции происходят в течение первых 30 мин*.

5. Возможно, что существует цитоплазматический фермент, активирующийся в результате локального высвобождения Ca^{2+} §, который за несколько минут расщепляет фосфатидилинозитол, обуславливая ФИ-ответ, по крайней мере в Т-клетках*. Этот процесс также протекает в первые 30 мин, поскольку повышенный оборот фосфолипидов предшествует повышенному синтезу*.

6. Арахидоновая кислота включается в цепь реакций синтеза лейкотриена и простагландинов[†]. Некоторые продукты реакций этой цепи регулируют синтез РНК и ДНК[‡], другие влияют на поглощение Ca^{2+} или активность аденилатциклазы[‡].

7. Лизолецитин с помощью Ca^{2+} активирует гуанилат-циклазу[‡], в то время как активность аденилат-циклазы уменьшается вследствие соседства с $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-АТРазой}$, конкурирующей с ней за АТФ §.

8. Временное локальное увеличение концентрации циклического GMP активирует протеинкиназы, фосфорилирующие несколько важных белков (ферментов)[‡], тогда как повышение концентрации циклического AMP на данной ранней стадии активации этому препятствует §.

9. Среди ферментов, активирующихся под действием cGMP (и, возможно, с помощью Ca^{2+}), могут оказаться трансферазы жирных кислот и ферменты, увеличивающие de novo синтез фосфатидилхолина, фосфатидилинозитола и других мембранных липидов[‡].

10. Из остальных протеинкиназ одни влияют на процессинг определенных мРНК, а другие увеличивают активность факторов инициации[‡], что приводит к избирательной более быстрой трансляции в течение первого часа определенных предсуществующих матричных РНК[†]. Увеличение синтеза белка в первые 3 ч[†] может относиться к ферментам, участвующим в синтезе полиаминов, гликолизе, переносу метильных групп и т. д. §.

11. Поскольку транспорт глюкозы является Ca^{2+} -зависимым процессом[‡], поток Ca^{2+} может играть роль в наблюдаемом в течение нескольких минут после стимуляции митогеном увеличении скорости ее транспорта[†], в ходе

которого поставляются энергия и исходные материалы для множества энергозависимых синтетических процессов*.

12. Более быстрый синтез белков между 3 и 6 ч вызывает повышенное образование полисом[†], в результате которого набор белков становится отличным от того, который был ранее[†]. Скорость синтеза белка возрастает на протяжении примерно 60 ч*. Повышенное метилирование тРНК наблюдается уже к первому часу. Увеличение синтеза рибосомной и матричной РНК, вносящее вклад в поддержание возросшего уровня синтеза белка, начинается около 6 ч* и достигает плато примерно к 48 ч*.

13. Поток Ca^{2+} в клетки приводит также к активации орнитин-декарбок-силазы[‡], лимитирующего фактора в цепи синтеза полиаминов[†]. Раннее возрастание ее активности наблюдается между 3 и 6 ч, однако для синтеза ДНК (но не РНК) требуется ее активность между 20 и 30 ч. Возможно, полиамины действуют подобно хлорпромазину и дибуканну, которые вытесняют Ca^{2+} из фосфолипидов и активируют синтез фосфатидилинозитола §.

14. Поток Ca^{2+} , кроме того, активирует сериновую эстеразу[†], вызывающую наблюдаемое на 5-й минуте повышение клеточной подвижности, возможно, благодаря изменениям в системе циклических нуклеотидов, как это, например имеет место в тучных клетках §.

15. В первые 2 ч эта сериновая эстераза отщепляет от цитоплазматического предшественника молекулу, которая при изменении локальной концентрации Ca^{2+} , регулируемой калмодулином или полиаминами, активирует ядерную аденилатциклазу §.

Увеличение концентрации циклического АМР в ядре вызывает активацию киназ[†], которые специфически фосфорилируют кислые негистоновые белки, регулирующие транскрипцию и синтез ДНК[†], что приводит к синтезу РНК и ДНК, начинающемуся на третий день и достигающему максимума между 4-м и 6-м днями[†].

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность Thomas Feldbush за критическое обсуждение материала и многим другим за отдельные замечания. Подготовка рукописи, сделанная Nancy Schmidt, заслуживает особой похвалы. Исследования автора субсидированы NAIAD и DHHS за счет грантов A117803 и A117990.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ling N. R., Kay I. E. Lymphocyte Stimulation, Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 1975.
2. Hume D. A., Weidemann M. J. Mitogenic Lymphocyte Transformation: A General Model for the Control of Mammalian Cell Proliferation and Differentiation, Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 1980.
3. Wedner H. J., Parker C. W. Lymphocyte activation, Prog. Allergy, 20, 195—300 (1976).
4. Singer S. J. Molecular biology of cellular membranes with applications to immunology, Adv. Immunol., 19, 1—66 (1974).
5. Nicolson G. L., Poste G. The cancer cell: Dynamic aspects and modifications in cell-surface organization, N. Engl. J. Med., 295, 197—203 (1976).
6. Sharon N., Lis H. Lectins: Cell agglutinating and sugar-specific proteins, Science, 177, 949—959 (1972).
7. Debray H., Decout D., Strecker G., Spik G., Montreuil J. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins, Eur. J. Biochem., 117, 41—55 (1981).

* См. также об активации Т-лимфоцитов: MacDonald, H. K., Nabholz M. Annual. Rev. Cell. Biol., 2, 231—254, 1986.

8. Greaves M. F., Bauminger S. Activation of T and B lymphocytes by insoluble phytomitogens, *Nature New Biol.*, 235, 67—70 (1972).
9. Hsu R., Miller J. R., Yachnin S., Dawson G. Purification and characterization of a glycopeptide derived from *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinating phytohemagglutinin, *Biochim. Biophys. Acta*, 579, 386—395 (1979).
10. Becker J. W., Reeke G. N., Jr., Cunningham R. A., Edelman G. M. New evidence on the location of the saccharide-binding site of concanavalin A, *Nature*, 259, 406—409 (1976).
11. Becker J. W., Reeke G. N., Jr., Wang J. L., Cunningham B. A., Edelman G. M. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides, *J. Biol. Chem.*, 250, 1513—1524 (1975).
12. Baenziger J. U., Fiete D. Structural determinants of concanavalin A specificity for oligosaccharides, *J. Biol. Chem.*, 254, 2400—2407 (1979).
13. Toyoshima S., Iwata M., Osawa T. Kinetics of lymphocyte stimulation by concanavalin A, *Nature*, 264, 447—449 (1976).
14. Wetzel G. D., Kettman J. R. Activation of murine B cells. II. Dextran sulfate removes the requirement for cellular interaction during lipopolysaccharide-induced mitogenesis, *Cell, Immunol.*, 61, 176—189 (1981).
15. Williams R. O., Loeb L. A. Zinc requirement for DNA replication in stimulated human lymphocytes, *J. Cell. Biol.*, 58, 594—601 (1973).
16. Kishimoto T., Kikutani H., Nishizawa Y., Sakaguchi N., Yamamura Y. Involvement of anti-Ig activated serine protease in the generation of cytoplasmic factor(s) that are responsible for the transmission of Ig-receptor-mediated signals, *J. Immunol.*, 123, 1504—1510 (1979).
17. Udey M. O., Chaplin D. D., Wedner H. J., Parker C. W. Early activation events in lectin-stimulated human lymphocytes: Evidence that wheat germ agglutinin and mitogenic lectins cause similar early changes in lymphocyte metabolism, *J. Immunol.*, 125, 1544—1550 (1980).
18. Segal D. M., Taurog J. D., Metzger H. Dimeric immunoglobulin E serves as a unit signal for mast cell degranulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 2993—2997 (1977).
19. Schreier G. F., Unanue E. R. Membrane and cytoplasmic changes in B lymphocytes induced by ligand surface Ig interaction, *Adv. Immunol.*, 24, 37—165 (1976).
20. Ashman R. F., Raff M. C. Direct demonstration of theta-positive antigen-binding cells with antigen-induced movement of thymus-dependent cell receptors, *J. Exp. Med.*, 137, 69—83 (1973).
21. Young-Karlan B. R., Ashman R. F. Order of events leading to surface immunoglobulin capping: analysis of a transmembrane signal, *J. Immunol.*, 127, 1177—1181 (1981).
22. Loo F. Plasma membrane and cell cortex interactions in lymphocyte functions, *Adv. Immunol.*, 30, 1—120 (1980).
23. Kaplan J. G., Owens T. Activation of lymphocytes of man and mouse: Monovalent cation fluxes, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 339, 191—200 (1980).
24. Monroe J. G., Cambier J. C. Plasma membrane depolarization is an early event in anti-immunoglobulin and antigen mediated B cell stimulation (abstract), *Immunobiology*, 163, 181 (1982).
25. Rink T. J., Montecucco C., Hesketh T. R., Tsieng R. Y. Lymphocyte membrane potential assessed with fluorescent probes, *Biochim. Biophys. Acta*, 595, 15—30 (1980).
26. Hirata F., Toyoshima S., Axelrod J., Waxdal M. J. Phospholipid methylation: A biochemical signal modulating lymphocyte mitogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 862—865 (1980).
27. Toyoshima S., Hirata F., Axelrod J., Beppu M., Osawa T., Waxdal M. J. The relationship between phospholipid methylation and calcium influx in murine lymphocytes stimulated with native and modified Con A, *Mol. Immunol.*, 19, 229—234 (1982).
28. Moore J. P., Smith G. A., Hesketh T. R., Metcalfe J. C. Early increases in phospholipid methylation are not necessary for the mitogenic activation of lymphocytes, *J. Biol. Chem.*, 257, 8183—8189 (1982).
29. Mitchell R. H. Inositol phospholipids and cell surface receptor function, *Biochim. Biophys. Acta*, 415, 81—147 (1975).
30. Ku Y., Kishimoto A., Takai Y., Ogawa Y., Kimura S., Nishizuka Y. A new possible regulatory system for protein phosphorylation in human peripheral lymphocytes. II. Possible relation to phosphatidylinositol turnover induced by mitogens, *J. Immunol.*, 127, 1375—1379 (1981).
31. Betel I., Martijnse J., van den Berg J. K. Absence of an early increase of phospholipid-phosphate turnover in mitogen-stimulated B lymphocytes, *Cell. Immunol.*, 14, 429—434 (1974).
32. Hasegawa-Sasaki H., Sasaki T. Phytomito-gen-induced stimulation of syntheses de novo of

- phosphatidylinositol, phosphatidic acid and diacylglycerol in rat and human lymphocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, 666, 252-258 (1981).
33. Resch K., Ferber E. The role of phospholipids in lymphocyte activation. In: *Immune Recognition*, ed. by A. Rosenthal, pp. 281-312, Academic Press, New York, 1975.
 34. Parker C. W., Stenson W. F., Huber M. G., Kelly J. P. Formation of thromboxane B₂ and hydroxyarachidonic acids in purified human lymphocytes in the presence and absence of PHA, *J. Immunol.*, 122, 1572-1577 (1979).
 35. Whitney R. B., Sutherland R. M. Characteristics of Ca⁺ accumulation by lymphocytes and alterations in the processing induced by phytohemagglutinin, *J. Cell. Physiol.*, 82, 9-20 (1973).
 36. Freedman M. H. Early biochemical events in lymphocyte activation. I. Investigations on the nature and significance of early calcium fluxes observed in mitogen-induced T and B lymphocytes, *Cell. Immunol.*, 44, 290-313 (1979).
 37. Freedman M. H. Investigations on the role of Ca⁺⁺ as a potential second messenger for T and B lymphocyte activation and its relevance in DNA synthesis. In: *Cell Biology and Immunology of Leukocyte Function*, ed. by M. R. Quastel, pp. 49-61, Academic Press, New York, 1979.
 38. Braun J., Sha'afi R. I., Unanue E. R. Crosslinking by ligands to surface immunoglobulin triggers mobilization of intracellular ⁴⁵Ca²⁺ in B lymphocytes, *J. Cell. Biol.*, 82, 755-766 (1979).
 39. Braun J., Hochman P. S., Unanue E. R. Ligand-induced association of surface immunoglobulin with the detergent-insoluble matrix of the B lymphocyte, *J. Immunol.*, 128, 1198-1204 (1982).
 40. Parker C. W. Role of cyclic nucleotides in regulating lymphocytes, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 332, 255-261 (1979).
 41. Wang T., Sheppard J. R., Foker J. E. Rise and fall of cyclic AMP required for onset of lymphocyte DNA synthesis, *Science*, 201, 155-157 (1978).
 42. Chaplin D. D., Wedner H. J., Parker C. W. Protein phosphorylation in human peripheral blood lymphocytes: Mitogen induced increases in protein phosphorylation in intact lymphocytes, *J. Immunol.*, 124, 2390-2398 (1980).
 43. Ahern T., Kay J. E. Protein synthesis and ribosome activation during the early stages of phytohemagglutinin lymphocyte stimulation, *Exp. Cell. Res.*, 92, 513-515 (1975).
 44. Udey M. C., Parker C. W. Membrane protein synthesis in mitogen-stimulated human T lymphocytes, *J. Immunol.*, 126, 1106-1113 (1981).
 45. Cooper H. L., Braverman R. Free ribosomes and growth stimulation in human peripheral lymphocytes: Activation of free ribosomes as an essential event in growth induction, *J. Cell. Physiol.*, 93, 213-225 (1977).
 46. Varesio L., Holden H. T. Mechanisms of lymphocyte activation: Linkage between early protein synthesis and late Lymphocyte proliferation, *J. Immunol.*, 124, 2288-2294 (1980).
 47. Milner J. Is protein synthesis necessary for the commitment of lymphocyte transformation? *Nature*, 272, 628-629 (1978).
 48. Boto W. O., Humphreys R. E. Variation in the synthesis of membrane proteins of human T lymphocytes during mitogenic activation: Recognition of a 70,000 dalton protein with anti-P23,30 heteroantiserum and a novel 42,000 dalton protein with anti-P44,12 heteroantiserum, *J. Immunol.*, 126, 759-765 (1981).
 49. Averner M. J., Brock M. L., Jost J. P. Stimulation of ribonucleic acid synthesis in horse lymphocytes by exogenous cyclic and adenosine 3',5'-monophosphate, *J. Biol. Chem.*, 247, 413-417 (1971).
 50. Vassalli J. D., Silverstein S. C. Colcemid and related alkaloids inhibit lectin-mediated stimulation of RNA synthesis in human peripheral blood lymphocytes, *Exp. Cell. Res.*, 106, 95-104 (1977).
 51. Weck P. K., Johnson T. C., Ekstedt R. D. Effect of PHA on rapidly synthesized RNA of murine splenic lymphocytes, *Immunochemistry*, 13, 885-890 (1976).
 52. Sharma O. K., Loeb L. A. Methylation of transfer RNA during transformation of human lymphocytes by phytohemagglutinin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 50, 172-178 (1973).
 53. Cooper H. L. Studies on RNA metabolism during lymphocyte activation, *Transplant. Rev.*, 11, 3-38 (1972).
 54. Sören L., Biberfeld P. Quantitative studies on RNA accumulation in human PHA-stimulated lymphocytes during blast transformation, *Exp. Cell. Res.*, 79, 359-367 (1973).
 55. Degen J. L., Morris D. R. Activation of early enzyme production in small lymphocytes in response to high, nonmitogenic concentrations of concanavalin A, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 3479-3483 (1977).
 56. Wang T., Foker J. E., Tsai M. Y. The shift of an increase in phosphofructokinase activity

- from protein synthesis-dependent to -independent mode during concanavalin A induced lymphocyte proliferation, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 95, 13—19 (1980).
57. Buckley P. J., Wedner H. J. Measurement of the DNA synthetic capacity of activated lymphocytes: Nucleotide triphosphate incorporation by permeabilized cells, *J. Immunol.*, 120, 1930—1940 (1978).
 58. Betel I., Martijnse J., van der Westen G. Mitogenic activation and proliferation of mouse thymocytes. Comparison between isotope incorporation and flow-microfluorometry, *Exp. Cell. Res.*, 124, 329—337 (1979).
 59. Naor D., Sulitzeanu D. Binding of radioiodinated bovine serum albumin to mouse spleen cells, *Nature*, 214, 687—688 (1967).
 60. Kenny J. J., Merrill J. E., Ashman R. F. A two-step centrifugation procedure for the purification of sheep erythrocyte antigen-binding cells. *J. Immunol.*, 120, 1233—1239 (1978).
 61. Ashman R. F. Accelerated loss and replacement of receptors on antigen-binding cells after immunization, *J. Immunol.*, 124, 893—901 (1980).
 62. Ashman R. F. Immunological role of the antigen binding cell, *Immunol. Today*, 3, 349—352 (1982).
 63. Möller G., ed., *Effects of Anti-Immunoglobulin Sera on B Lymphocyte Function: Immunological Reviews*, Vol. 52, Munksgaard, Stockholm, 1980.
 64. Stull D., Gillis S. Constitutive production of interleukin 2 activity by a T cell hybridoma, *J. Immunol.*, 126, 1680—1683 (1981).
 65. Watson J., Gillis S., Marbrook J., Moxhizuki D., Smith R. A. Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. I. Purification of a class of murine lymphokines, *J. Exp. Med.*, 150, 849 (1979).
 66. Larsson E. L. Mechanism of T cell activation. II. Antigen- and lectin-dependent acquisition of responsiveness to TCGF is a nonmitogenic, active response of resting T cells, *J. Immunol.*, 126, 1323—1326 (1981).
 67. Yi P. I., Beck G., Zucker S. Membrane receptors for very low density lipoprotein (VLDL) inhibitor of lymphocyte proliferation, *Blood*, 57, 1055—1064 (1981).
 68. Lengle E. E., Krishnaraj R., Kemp R. G. Inhibition of the lectin-induced mitogenic response of thymocytes by glycolipids, *Cancer Res.*, 39, 817—822 (1979).
 69. Kumagai J., Akiyama H., Iwashita S., Iida H., Yahara I. In vitro regeneration of resting lymphocytes from stimulated lymphocytes and its inhibition by insulin, *J. Immunol.*, 126, 1249—1254 (1981).
 70. Weiler J. M., Ballas Z. K., Needleman B. W., Hobbs M. V., Feldbush T. L. Complement fragments suppress lymphocyte immune responses, *Immunol. Today*, 3, 238—243 (1982).

Оглавление

Предисловие редакторов перевода	5
Предисловие	6
Введение	7
Список авторов	10

Часть I. Введение

Глава 1. ИММУННАЯ СИСТЕМА. Уильям Е. Пол. (Перевод Р. С. Незлипа)	14
1.1. Клетки иммунной системы	14
1.2. В-лимфоциты	15
1.2.1. Субпопуляции В-клеток	18
1.3. Иммуноглобулины	19
1.3.1. Структура	19
1.3.2. Переключение	21
1.3.3. Генетика	22
1.3.4. Аллельное исключение и экспрессия единичной L-цепи	23
1.3.5. Связывание антигена	24
1.4. Т-лимфоциты	26
1.4.1. Развитие Т-клеток	26
1.4.2. Субпопуляции Т-клеток	27
1.4.2.1. Хелперные Т-клетки	27
1.4.2.2. Супрессорные Т-клетки	29
1.4.2.3. Цитотоксические Т-клетки	30
1.4.2.4. Другие виды Т-зависимого иммунного ответа	31
1.5. Главный комплекс гистосовместимости	31
1.5.1. Молекулы МНС класса I	31
1.5.2. Молекулы МНС класса II	34
1.5.3. Другие молекулы, кодируемые МНС	35
1.5.4. Роль молекул класса II в клеточных взаимодействиях	35
1.5.5. Молекулы класса I как элементы рестрикции	36
1.5.6. Физиологическое значение одновременного распознавания эпитопов и гистотопов	37
1.5.7. Гены специфического иммунного ответа	37
1.6. Рецептор Т-клеток	39
1.7. Регуляция иммунного ответа и иммунологическая сеть	40
1.8. Эффекторные механизмы иммунитета	42
1.8.1. Система комплемента	43
Заключение	45

Глава 2. ИСТОРИЯ ИММУНОЛОГИИ. Артур М. Сильверстайн. (Перевод Р. С. Незлипа)	46
2.1. Ранние теории приобретенного иммунитета	46
2.1.1. Теории изгнания	47
2.1.2. Теория истощения	49
2.2. Рождение иммунологии как науки	51
2.2.1. Иммунизация и сывороточная терапия	51
2.2.2. Реакция антиген — антитело: иммунохимия	53
2.2.3. Серология и иммунодиагностика	55
2.2.4. Аллергия и иммунопатология	55
2.2.5. Аутоиммунитет	58
2.2.6. Иммуногематология	59
2.2.7. Противоречие между клеточным и гуморальным иммунитетом	59
2.3. Теории образования антител	62

2.3.1.	Теория боковых цепей Эрлиха	63
2.3.2.	Инструктивные теории образования антител	64
2.3.3.	Селективные теории образования антител	65
2.4.	Нобелевские лауреаты в иммунологии	66
	Литература	72

Часть II. Клетки иммунной системы

Глава 3. В-ЛИМФОЦИТЫ.	Макс Д. Купер, Джон Керри, Ирвин Шер. (Перевод А. А. Нейфаха)	74
3.1.	История исследования и филогенетическое распространение В-клеток	75
3.2.	Стволовые клетки — предшественники В-клеток	76
3.3.	Микроокружение, в котором образуются В-клетки	76
3.3.1.	Птицы	76
3.3.2.	Млекопитающие	77
3.3.3.	Земноводные	78
3.4.	Стадии дифференцировки В-клеток	78
3.4.1.	Пре-В-клетки	79
3.4.2.	В-клетки	80
3.4.3.	В-клетки памяти	82
3.4.4.	Плазматические клетки	82
3.5.	Гетерогенность В-клеток: различия в степени зрелости и функциональные различия	83
3.5.1.	Изменение поверхностных иммуноглобулинов В-клеток при дифференцировке	83
3.5.2.	Приобретение развивающимися В-клетками поверхностных Ia-молекул (pIa)	85
3.5.3.	Развитие других поверхностных маркеров и рецепторов В-клеток	85
3.5.4.	Субпопуляции В-клеток, различающиеся поверхностными антигенами и Ia-антигенами	86
3.5.5.	Функциональные различия между В-клетками	87
3.5.5.1.	Восприимчивость к индукции толерантности	87
3.5.5.2.	Реакция различных субпопуляций В-клеток на митогены	88
3.5.5.3.	Ответ В-клеточных субпопуляций на антигены типа I и II	88
3.5.5.4.	Ответ В-клеточных популяций на тимусзависимые антигены	88
3.5.5.5.	Способность В-клеточных популяций взаимодействовать со вспомогательными клетками, Т-клетками и продуктами Т-клеток	89
3.5.5.6.	Заключение: функциональные свойства В-клеток Lyb 5 ⁺ и Lyb 5 ⁻	89
	Литература	89
Глава 4. Т-ЛИМФОЦИТЫ.	Харви Кантор. (Перевод А. А. Нейфаха)	93
4.1.	Субпопуляции Т-клеток: определение	94
4.1.1.	Совместное распознавание субпопуляциями Т-клеток	95
4.1.2.	Антиген-реактивные Т-клетки (АРК): клетки Ly 123	96
4.2.	Регуляция иммунитета: взаимодействующие клеточные популяции	97
4.3.	Образование Т-клеток в онтогенезе	98
4.4.	Координированное программирование Т-клеток в онтогенезе	100
4.4.1.	Клональный анализ координированного программирования Т-клеток	102
4.5.	Молекулярные продукты Т-клеток	103
4.6.	Молекулы, синтезируемые клонами индукторных Т-клеток	104
4.6.1.	Неспецифические пептиды, секретируемые индукторными клетками	104
4.6.2.	Антиген-специфичные индукторные молекулы: в поисках методологии	104
4.6.3.	Гаптен-специфические клоны Т-клеток	105
4.6.4.	Расознавание инсулинов	106
4.6.5.	Расознавание индукторными клетками в онтогенезе	108
4.7.	Клетки и молекулы, осуществляющие специфичную иммунологическую супрессию	108
4.7.1.	Аналогии между Ig и 70 кДа Тс-молекулой	109
4.7.2.	Функциональные свойства Тс-молекул	110
	Заключение	110
	Литература	111

Глава 5. МАКРОФАГИ И ДРУГИЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ КЛЕТКИ. Итан М. Ше-		
	вак. (Перевод А. А. Нейфаха)	115
5.1.	Биологические свойства вспомогательных клеток	116
5.1.1.	Мононуклеарные фагоциты	116
5.1.2.	Тканевые макрофаги	119
5.1.3.	Нефагоцитирующие дендритические вспомогательные клетки	120
5.1.4.	В-лимфоциты как вспомогательные клетки в активации лимфоцитов	123
5.2.	Роль вспомогательных клеток в активации Т-клеток	124
5.2.1.	Антиген-специфическая пролиферация Т-клеток	124
5.2.2.	Активация Т-лимфоцитов в РСЛ	126
5.2.3.	Активация Т-клеток, индуцированная митогенами	128
5.2.4.	Взаимодействие вспомогательных клеток с Т-хелперами	131
5.2.5.	Взаимодействие вспомогательных клеток с В-клетками	132
5.3.	МНС-рестрикция при взаимодействии макрофагов с Т-лимфоцитами	134
5.4.	Превращения антигена в макрофагах	135
5.4.1.	Исследования <i>in vivo</i>	135
5.4.2.	Исследования <i>in vitro</i>	137
5.4.3.	Влияние антител к антигену	141
5.4.4.	Опыты с макрофагами, модифицированными гаптенем	144
5.4.5.	Имунофармакологические подходы к процессингу антигена в макрофагах	146
5.4.6.	Антиген-специфические продукты макрофагов	149
5.4.7.	Выводы из опытов по изучению процессинга антигена	151
5.5.	Физические взаимодействия между макрофагами и Т-лимфоцитами	152
5.5.1.	Антигеннезависимые взаимодействия	152
5.5.2.	Антигензависимые взаимодействия	153
5.5.3.	Значение физического взаимодействия	154
5.5.4.	Лимфоцитарно-макрофагальные кластеры	157
5.6.	Модуляция экспрессии Ia-антигенов макрофагами	159
5.7.	Макрофаг как эффекторная клетка	164
5.7.1.	Активация макрофагов	164
5.7.2.	Макрофаг как секреторная клетка	166
	Краткое содержание	167
	Литература	168
Глава 6. ЛИМФОИДНЫЕ ОРГАНЫ И ТКАНИ. Эжен С. Батчер, Ирвинг Л. Вайс-		
	ман. (Перевод Т. Н. Власик)	173
6.1.	Состав и строение первичных лимфоидных органов	173
6.1.1.	Раннее созревание лимфоцитов в костном мозге	173
6.1.2.	Созревание тимусных лимфоцитов в тимическом микроокружении	174
6.1.2.1.	Общие сведения о строении тимуса	175
6.1.2.2.	Эмбриогенез тимуса	176
6.1.2.3.	Раннее созревание тимуса в облученных химерах	177
6.1.2.4.	Тимусный субкапсулярный корковый слой: зона пролиферации тимусных лимфобластов и их взаимодействие с тимусными клетками-кормилицами	178
6.1.2.5.	Внутренний корковый слой тимуса содержит основную часть тимусных лимфоцитов, большинство из которых погибает, и особый класс дендритных эпителиальных клеток	179
6.1.2.6.	Мозговой слой содержит иммунокомпетентные клетки, а также несколько типов нелимфоидных клеток костномозгового и тимусного происхождения	182
6.2.	Состав и строение периферических лимфоидных органов	183
6.2.1.	Лимфоидный состав вторичных лимфоидных органов: рециркуляция лимфоцитов	183
6.2.2.	Роль антигена	186
6.2.3.	В- и Т-клеточные домены в лимфоидных органах	191
6.2.4.	Строение лимфоидных органов и иммунные реакции	194
	Литература	199

Часть III. Антитела и рецепторы

Глава 7. ИММУНОГЛОБУЛИНЫ: СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ. Дебра Дж. Джеске,		
	Дж. Доналд Кеппа. (Перевод Р. С. Незлина)	
7.1.	Легкие цепи	204
		209

7.2.	IgG	212
7.3.	IgA	216
7.4.	J-цепь	222
7.5.	Секреторный компонент	223
7.6.	IgM	224
7.7.	IgE	226
7.8.	IgD	230
7.9.	Сравнение свойств постоянных областей	231
7.9.1.	Дисульфидные связи	231
7.9.2.	Углеводы	234
7.9.3.	Шарнирная область	235
7.9.4.	Домены	238
7.9.5.	Эволюция генов иммуноглобулинов	239
7.10.	Структурные особенности вариабельных областей	241
7.10.1.	Подгруппы вариабельных областей	241
7.10.2.	Каркасные и гипервариабельные участки	243
7.10.3.	Область, контактирующая с антигеном	245
7.10.4.	Вариабельные области индуцированных антител	248
7.10.5.	Биологические или эффекторные функции иммуноглобулинов	249
	Литература	252
Глава 8.	ИММУНОГЛОБУЛИНЫ: МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА. Эдвард Е. Макс (Перевод Л. Г. Николаева)	255
8.1.	Гены легких цепей каппа у мыши	256
8.1.1.	Определение количества генов до «эры клонирования»	257
8.1.2.	Клонирование жДНК	257
8.1.3.	Блоттинг по Саузерну	259
8.1.4.	Наличие лишь одного гена C_k у мышей	261
8.1.5.	Множественность генов V	261
8.1.6.	Гены V и C соединяются в В-лимфоцитах	262
8.1.7.	Геномные клоны	263
8.1.8.	Перестроенный геномный клон	265
8.1.9.	Геномные гены V и C	265
8.1.10.	Сайт-специфическая рекомбинация	267
8.1.11.	Аберрантные перестройки	268
8.1.12.	Механизм рекомбинации	269
8.1.13.	Гены k у других видов	276
8.2.	Гены легких цепей лямбда	277
8.3.	Гены H-цепей	279
8.3.1.	Рекомбинация $V-D-J$ в H-цепях мыши	279
8.3.2.	$V-D-J$ -рекомбинация H-цепей человека	282
8.3.3.	Разнообразие и механизм рекомбинации $V-D-J$	282
8.3.4.	Локус гена C_H	283
8.3.5.	Геномные клоны C_H	285
8.3.6.	Переключение тяжелой цепи	286
8.3.7.	Клетки, несущие иммуноглобулины двух изотипов	288
8.4.	Разнообразие	290
8.4.1.	Анализ гаметного разнообразия V -областей L -цепи с помощью рекомбинантных ДНК	292
8.4.2.	Соматические мутации в легких цепях	293
8.4.3.	Разнообразие гаметных V -областей генов тяжелых цепей	294
8.4.4.	Многообразие тяжелых цепей: соматические мутации	295
8.4.5.	Биологическое значение соматических мутаций	298
8.5.	Регуляция перестроек иммуноглобулиновых генов	299
8.6.	Гены иммуноглобулинов: хромосомы и рак	302
	Заключение	305
	Литература	306
Глава 9.	ИММУНОГЛОБУЛИНЫ: АЛЛОТИПЫ И ИДИОТИПЫ. Джулиан Б. Флайшман, Джозеф М. Дейви. (Перевод В. А. Несмеянова)	313
9.1.	Аллотипы	313
9.1.1.	Простые и комплексные аллотипы. Латентная экспрессия	314
9.1.2.	Обнаружение аллотипов	315
9.1.3.	Аллотипы иммуноглобулинов кролика	317

		317
9.1.3.1.	Локус <i>a</i>	318
9.1.3.2.	Локус <i>b</i>	319
9.1.3.3.	Локус <i>c</i>	319
9.1.3.4.	Прочие аллотипы кролика	320
9.1.4.	Аллотипы иммуноглобулинов человека	323
9.1.5.	Аллотипы мыши и крысы	324
9.1.5.1.	S_x -аллотипы крысы	
9.1.6.	Заключение: организация и экспрессия генов, кодирующих аллотипы	325
9.2.	Идиотипы	325
9.2.1.	Основные понятия. Исторический очерк	327
9.2.2.	Идиотипы у индуцированных антител	327
9.2.2.1.	Антитела к фосфохолину	328
9.2.2.2.	Антитела к α (1 \rightarrow 3)-декстрану	328
9.2.2.3.	Антитела к азофениларсонату (АФА)	329
9.2.2.4.	Антитела к 4-гидрокси-3-нитрофенилу (НФ)	
9.2.3.	Корреляция с аминокислотной последовательностью и пространственной структурой	329
9.2.4.	Идиотипы и гены иммуноглобулинов	332
9.2.5.	Идиотипы Т-клеточных факторов	333
9.2.6.	Заключение: идиотипы	333
	Литература	334
Глава 10.	РЕЦЕПТОРЫ В-ЛИМФОЦИТОВ. Эллен С. Витетта, Кэтрин Брукс, Питер Айзексон, Джудит Лейтон, Эллен Пюре, Дороти Юан. (Перевод Т. В. Вла- сик)	337
10.1.	Имуноглобулины клеточной поверхности	338
10.1.1.	Обнаружение	338
10.1.2.	<i>sIg</i> являются антиген-специфическими рецепторами	338
10.1.3.	Биохимический анализ	339
10.1.3.1.	Субъединичная структура	339
10.1.3.2.	Структура Н-цепей	341
10.1.3.3.	Количественные оценки	341
10.1.4.	Детерминанты <i>sIg</i>	341
10.1.4.1.	Идиотипы	341
10.1.4.2.	Аллотипы	342
10.1.5.	Биосинтез и оборот	343
10.1.6.	Экспрессия в период онтогенеза	344
10.1.7.	<i>sIg</i> -опосредованная активация В-клеток	345
10.1.8.	Изотип-специфические антисыворотки	345
10.1.8.1.	Поликлональный ответ <i>in vitro</i>	346
10.1.8.2.	Антиген-специфический ответ <i>in vitro</i>	347
10.1.8.3.	Действие антиизотипических антисывороток <i>in vivo</i>	347
10.1.9.	Ответы индивидуальных субпопуляций В-клеток	348
10.1.9.1.	Митогены	348
10.1.9.2.	TI-антигены	348
10.1.9.3.	TD-антигены	349
10.1.10.	Изменения <i>sIg</i> -фенотипа под воздействием антигена или митогена	
10.1.11.	Изотипы иммуноглобулинов, локализованных на поверхности В-клеток памяти	349
10.1.12.	Толерантность, опосредованная рецептором	350
10.2.	Рецепторы для факторов роста и дифференцировки	351
10.2.1.	Рецепторы для митогенов	351
10.2.2.	Рецепторы для Т-клеточных факторов	353
10.3.	Fc-рецепторы	355
10.3.1.	Определение и экспрессия	355
10.3.2.	Методы выявления	355
10.3.3.	Присутствие на поверхности В-лимфоцитов	355
10.3.4.	Онтогенез	356
10.3.5.	Взаимодействие с другими молекулами на поверхности В-клеток	356
10.3.5.1.	Рецепторы для комплемента	357
10.3.5.2.	Поверхностные иммуноглобулины	357
10.3.5.3.	Молекулы, кодируемые главным комплексом гистосовместимости	358
10.3.6.	Специфичность FcR-зависимого связывания	35

10.3.6.1.	Классовая и подклассовая специфичность	358
10.3.6.2.	Видоспецифичность	358
10.3.7.	Биохимия	359
10.3.8.	Функция	360
10.4.	Рецепторы для комплемента	360
10.4.1.	Определения и экспрессия	360
10.4.2.	Онтогенез и изменения при дифференцировке В-клеток	361
10.4.3.	Рецепторы для комплемента как мембранные белки	362
10.4.4.	Биохимия	362
10.4.5.	Функции	363
	Заключительное обсуждение	364
	Литература	364
Глава 11. РЕЦЕПТОРЫ Т-ЛИМФОЦИТОВ. Чарльз А. Джейнсуэй, Роберт Е. Коуп, Фрэнсиз Л. Оуэн. (Перевод Т. Н. Власик)		
11.1.	Функциональный подход в изучении Т-клеточных рецепторов	374
11.1.1.	Роль генов I-района —НС в узнавании антигена Т-клетками	378
11.2.	Различия в специфичности разных субпопуляций Т-клеток	381
11.2.1.	Т-хелперы	383
11.2.1.1.	Т-хелперы, узнающие МНС	383
11.2.1.2.	Т-хелперы, узнающие иммуноглобулины	383
11.2.1.3.	Т-клетки, секретирующие лимфокинины	383
11.2.2.	Индукторы супрессии	384
11.2.2.1.	Индукторы супрессии, действующие по принципу обратной связи	384
11.2.2.2.	Ts1	384
11.2.2.3.	Ts2	384
11.2.2.4.	Антиген-специфические супрессорные Т-клетки	384
11.2.3.	Супрессорные Т-клетки	385
11.2.3.1.	Супрессорные эффекторные Т-клетки	385
11.2.3.2.	Ts3-клетки	385
11.2.3.3.	Ia-узнающие супрессорные Т-клетки	385
11.2.3.4.	Супрессорные Т-клетки, узнающие idiotип	385
11.2.4.	Цитотоксические Т-клетки	385
11.2.5.	Контрсупрессорные Т-клетки	386
11.2.6.	Т-клетки Lu12	386
11.2.7.	Специфичность по отношению к тест-антигену клеток различных типов	386
11.3.	Связывание антигена Т-лимфоцитами	387
11.4.	Серологическое определение антигенсвязывающих рецепторов Т-клеток	390
11.5.	Исследования структуры антигенсвязывающих молекул Т-клеточного происхождения	398
11.6.	Молекулярно-генетические подходы к изучению Т-клеточных рецепторов	402
11.7.	Теории образования Т-клеточных рецепторов	404
11.8.	Будущие вопросы, будущие ответы	408
	Литература	410
Глава 12. АКТИВАЦИЯ ЛИМФОЦИТОВ. Роберт Ф. Эшмен. (Перевод Т. Н. Власик)		
12.1.	Структура клеточной мембраны	414
12.2.	Вещества, активирующие лимфоциты: лектины и митогены	420
12.2.1.	Определения	420
12.2.2.	Свойства обычно используемых митогенов	421
12.2.2.1.	Фитогемагглютинин	421
12.2.2.2.	Конканавалин А	422
12.2.2.3.	Митоген из фитолаки (МФЛ)	424
12.2.2.4.	Гликолипиды и белки клеточной стенки бактерий	424
12.2.2.5.	Вещества, окисляющие гидроксильные группы в углеводах	425
12.2.2.6.	Декстран-сульфат	425
12.2.2.7.	Тяжелые металлы	425
12.2.2.8.	Протеиназы	426
12.2.2.9.	Ионофоры	426
12.2.2.10.	Агглютинин из зародышей пшеницы (АЗП): немитогенный лектин	426

	Первый этап активации: сшивка рецепторов	427
12.3.	Кэппинг и эндоцитоз	428
12.4.	Первые фазы индукции митогенами	432
12.5.	Процессы, идущие в первые секунды и минуты	432
12.5.1.	Изменение потока одновалентных катионов	433
12.5.1.1.	Раннее трансметилирование липидов; активация фосфолипазы A_2	436
12.5.1.2.	Синтез и оборот фосфолипидов	437
12.5.1.3.	Метаболизм арахидоновой кислоты, простагландины	438
12.5.1.4.	Поток кальция в клетку	440
12.5.1.5.	Изменения концентраций циклических нуклеотидов	442
12.5.1.6.	Фосфорилирование белков	443
12.5.1.7.	Активация сериновых эстераз	444
12.5.1.8.	Увеличение скорости трансмембранного транспорта малых молекул	445
12.5.1.9.	Процессы, протекающие в первые часы	445
12.5.2.	Ускорение синтеза белка	448
12.5.2.1.	Ускорение синтеза РНК	450
12.5.2.2.	Ускорение синтеза полиаминов	451
12.5.2.3.	Изменения в метаболизме углеводов	452
12.5.2.4.	Бласттрансформация	453
12.5.2.5.	Процессы, протекающие через несколько дней: синтез ДНК	455
12.5.3.	Активация посредством сшивки рецепторов для антигенов	455
12.6.	Процессы, индуцируемые антигенами в антигенсвязывающих лимфо- цитах	455
12.6.1.	Роль антигенсвязывающих клеток в изучении иммунного ответа	455
12.6.1.1.	Ранние индуцируемые антигеном процессы в антигенсвязывающих клетках	457
12.6.1.2.	Активация, индуцируемая антителами против иммуноглобулинов	458
12.6.1.3.	Некоторые природные регуляторы активации лимфоцитов	460
12.7.	Интерлейкины	461
12.7.1.	Липиды	462
12.7.2.	Инсулин	462
12.7.3.	Фрагменты компонентов системы комплемента	462
12.7.4.	Заключение	466
	Литература	466

Уважаемый читатель!

Ваши замечания о содержании книги,
ее оформлении, качестве перевода и другие
просим присылать по адресу:

129820, Москва, И-110, ГСП,
1-й Рижский пер., д. 2,
издательство «Мир»

Монография

Пол У., Сильверштейн А., Купер М. и др.

ИММУНОЛОГИЯ

Под ред. Уильяма Е. Пола

Заведующий редакцией чл.-корр. АН СССР Т. М. Турпаев
Зам. зав. редакцией М. Д. Гроздова
Старший научный редактор Л. Г. Тер-Саркисян
Младший научный редактор З. В. Соллертинская
Художник В. А. Медников
Художественный редактор А. Я. Мусия
Технический редактор А. Г. Резоухова
Корректор В. И. Киселева

ИБ № 6113

Сдано в набор 27.04.87. Подписано к печати 15.08.87.
Формат 70×100^{1/16}. Бумага типографская № 1. Печать
офсетная. Гарнитура обыкновенная новая. Объем 15 бум. л.
Усл. печ. л. 39. Усл. кр.-отт. 39. Уч.-изд. л. 43,93.
Изд. № 4/4954. Тираж 27000 экз. Зак. 01280. Цена 3 р. 50 к.
ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР» 129820,
ГСП, Москва, И-110, 1-й Рижский пер., 2.

Ордена Трудового Красного Знамени
Московская типография № 7 «Искра революции»
Союзполиграфпрома Государственного комитета СССР
по делам издательств, полиграфии и книжной торговли.
Москва, 103001, Трехпрудный пер., 9.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР» ВЫПУСКАЕТ В 1989 Г.
ПО ПОДПИСКЕ:

Вирусология, в 3-х томах. Под редакцией Б. Филдса и Д. Найпа. Пер. с англ.—113 л.—8 р. 70 к. за комплект.

Фундаментальное руководство по вирусологии, написанное известными специалистами из США. Книга может служить учебным и справочным пособием. В т. 1 рассмотрена таксономия, структурная организация, репродукция, общая и молекулярная генетика вирусов, эпидемиология и патогенез вирусных инфекций, трансформация вирусов и онкогенез. В т. 2 вошли материалы по системе интерферона, химиотерапии и иммунопрофилактике вирусных заболеваний, а также по отдельным группам вирусов (пикорнавирусам, реовирусам, тогавирусам, аренавирусам, буньявирусам, рабдовирусам, орто- и парамиксовирусам). В т. 3 рассмотрены следующие группы вирусов: коронавирусы, паповавирусы, парвовирусы, аденовирусы, герпес- и поксвирусы, вирус гепатита В, лимфотропные ретровирусы и необычные вирусы, вызывающие подострые поражения мозга.

Для вирусологов, молекулярных биологов, медиков, а также студентов и аспирантов, специализирующихся в области вирусологии.

Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека, в 3-х томах. Пер. с англ. — 98 л. — 7 р. 80 к. за комплект.

Книга двух известных генетиков из ФРГ и США является фундаментальным учебником по генетике человека, охватывающим практически все основные направления этой области науки.

Т. 1 посвящен истории генетики человека, вопросам цитогенетики и законам наследственности. В т. 2 проанализированы проблемы молекулярной генетики, механизмы известных наследственных болезней обмена, вопросы популяционной генетики и мутагенеза. В т. 3 рассматривается эволюция человека, генетика поведения, практическое применение генетических исследований в настоящем и перспективы на будущее.

Для генетиков, молекулярных биологов, антропологов, врачей, а также для студентов-медиков и биологов.

