

Трансплантационный и специфический противоопухолевый иммунитет в ретроспективе: новые модели, основанные на трансгенезе индивидуальных цепей Т-клеточного рецептора

Д.Б. Казанский, Ю.Ю. Силаева, А.А. Калинина, М.А. Замкова,
Л.М. Хромых, Н.А. Персиянцева, Л.Х. Джолохава

НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Дмитрий Борисович Казанский kazansky1@yandex.ru

Открытия экспериментальной онкологии начала прошлого века и достижения генетики тканевой совместимости привели к разделению и последующему независимому развитию иммунологии тканевой совместимости и онкоиммунологии. Вместе с тем центральные достижения обеих дисциплин основываются на едином феномене взаимодействия Т-клеточного рецептора (T-cell receptor, TCR) с молекулами главного комплекса гистосовместимости. В настоящем обзоре мы описываем историю становления идей, достижения и уникальный опыт, полученный сотрудниками лаборатории механизмов регуляции иммунитета НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Этот опыт свидетельствует о том, что репертуар TCR и особенности их структуры критически влияют на эффективность иммунологической защиты организма, включая иммунологический надзор над возникновением и ростом клонов злокачественных клеток. Одним из возможных путей направленного воздействия на репертуар Т-лимфоцитов является трансгенез индивидуальных цепей TCR на уровне зиготы. Функциональные последствия такого трансгенеза различны в связи с тем, что экспрессия α - и β -цепей в разной степени подчинена правилам аллельного исключения. Экспрессия α -цепей ими не контролируется и поэтому приводит к расширению репертуара TCR. Экспрессия β -цепей строго подчинена правилам аллельного исключения, в связи с чем экспрессия трансгена β -цепи приводит к образованию репертуара рецепторов, в подавляющем большинстве которых присутствует трансгенная β -цепь, сужающая разнообразие репертуара. Ранее нами были клонированы гены β - и α -цепей TCR-клеток памяти CD8⁺, специфичных к молекуле главного комплекса гистосовместимости H-2K^b. В результате их внесения в геном оплодотворенной яйцеклетки нами были получены трансгенные линии животных, которые можно использовать для моделирования взаимодействий опухолевых клеток с иммунной системой опухоленосителя. Мыши линии B10. D2 (R101) в норме отторгают клетки лимфомы EL4 в течение 12–14 дней, несмотря на то, что трансплантационные различия клеток опухоли и клеток хозяина представлены единственной молекулой гистосовместимости H-2K^b. В отличие от них животные, несущие трансгены β -цепи, имеют ослабленный иммунитет к клеткам опухоли, который приводит к их длительной персистенции в организме, сопровождающейся прогрессией, необратимой утратой опухолевыми клетками молекулы H-2K^b и гибелью животных через 2–3 мес после трансплантации им опухолевых клеток. В этой модели удастся проследить все 3 фазы взаимодействия опухоли с иммунной системой опухоленосителя — элиминацию, равновесие и ускользание, в ходе которых опухолевые клетки под давлением иммунной системы реципиента утрачивают экспрессию молекулы H-2K^b и в итоге убивают опухоленосителя. Трансгены α -цепи, напротив, ускоренно отторгают опухолевые клетки в течение 3–6 дней с динамикой вторичного иммунного ответа. В отторжение этого типа вовлечены интраэпителиальные Т-лимфоциты, обладающие свойствами резидентных клеток памяти, — неспособностью к рециркуляции, экспрессией интегрина CD103, раннего активационного антигена CD69 и промежуточным уровнем экспрессии Т-клеточных маркеров CD3 и CD8. Способность этих клеток локализоваться в тканях и быстро уничтожать опухолевые клетки делают эту субпопуляцию наиболее вероятным носителем функций иммунологического надзора.

Ключевые слова: трансплантация, противоопухолевый иммунитет, главный комплекс гистосовместимости, Т-клеточный рецептор, иммунологическая память, клонирование, аллельное исключение, иммунологический надзор

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-1-14-27

Transplantational and specific antitumor immunity in retrospective view: new models based on transgenesis of individual chains of T-cell receptor

D.B. Kazanskiy, Yu.Yu. Silaeva, A.A. Kalinina, M.A. Zamkova, L.M. Khromykh, N.A. Persiyantseva, L.Kh. Dzholokhava

Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Findings in experimental oncology in beginning of last century and subsequent achievements of genetics of tissue compatibility resulted in divergence of transplantational immunology and oncoimmunology. However, central achievements of both scientific fields are based on unified phenomenon of interaction between T-cell receptor (TCR) and histocompatibility molecules. In this review we describe the history of ideas, achievements and unique experience of the team of the Laboratory of Regulatory Mechanisms in Immunity at Scientific Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center for all time of existence. This experience shows that efficiency of immunological defense including immunological surveillance are critically influenced by T-cell receptor repertoire. Transgenesis of individual chains

of TCR is one of possible means to manage T-cell repertoire. Functional outcomes of transgenesis may be different due to diverse extent of dependence of α - and β -chains expression on the rules of allelic exclusion. Expression of transgenic β -chains results in the expansion of TCR repertoire diversity. Expression of β -chains is under strong control by allelic exclusion, resulting in formation of repertoire bearing mainly invariant transgenic β -chain paired with different α -chains and overall narrowing of repertoire. Earlier, we cloned genes encoding α - and β -chains of TCR of CD8⁺ memory cells specific to histocompatibility molecule H-2K^b. After introduction them in zygotes we have obtained transgenic mouse strains, which could be used for modeling of interactions between tumor cells and immune system of recipient. Normally, B10. D2 (R101) mice reject lymphoma EL4 cells in 12–14 days after transplantation, in spite of the fact, that allogeneic difference between B10. D2 (R101) (K^dI^dD^b) mice and lymphoma EL4 (H-2b) cells is only in one product of MHC, the H-2K^b molecule. Transgenics carrying β -chains of TCR displayed compromised immunity to tumor cells resulting to their long persistence, tumor progression, the loss of H-2K^b molecule and death in 2–3 months after transplantation. This model allows to see all three phases of interaction between tumor and immune system of recipient – elimination, equilibrium and escape. Against, transgenics carrying α -chain reject tumor cells much more quickly, as in secondary immune response, in 3–6 days after transplantation. This rejection was mediated by intraepithelial T lymphocytes displaying features of resident memory cells – inability to recirculation, expression of CD103 and early activation antigen CD69 and intermediate density of T-cell markers CD3 and CD8. The capability to be located in nonlymphoid tissue and quickly destroy tumor cells makes them to be the most probable candidate to perform immunological surveillance functions.

Key words: transplantation, antitumor immunity, major histocompatibility complex, T-cell receptor, immunological memory, cloning, allelic exclusion, immunological surveillance

Введение

Начало развитию современной иммунологии и генетики тканевой совместимости положили достижения экспериментальной онкологии. J. Klein в своей работе изложил историю первых открытий [1]. В начале прошлого века исследования рака не имели такого приоритета и поддержки, как в наши дни. Тем не менее уже тогда многие исследователи пытались понять, какой дефект вызывает бесконтрольный рост клеток опухоли — находится ли он исключительно в злокачественно трансформированной клетке или в организме, в котором она появилась. В попытках ответить на этот вопрос исследователи выделяли фрагменты опухолевой ткани и трансплантировали их здоровому хозяину. Но результаты, которые они получали, были крайне противоречивы. Иногда трансплантированные опухоли могли приживаться и расти в организме нового хозяина и даже поддерживаться пассивированием от одного животного другому, но затем необъяснимо и неожиданно погибали. В других случаях пересаженные опухоли вовсе не росли.

Первые открытия

Что определяет рост опухоли или его отсутствие, оставалось неясным до тех пор, пока исследователи не отметили, что животные, которых они использовали как реципиентов, имеют существенные различия. В 1901 г. Карл Йенсен занимался перевивкой карциномы легкого белым мышам. Когда животных для экспериментов не хватало, он использовал обычных диких мышей. Он был поражен четким и очевидным различием: опухоль, произошедшая из белых мышей, хорошо росла при перевивании мышам этой колонии, но совсем не росла у диких животных. Результаты этой работы были опубликованы им в 1903 г., и основной вывод заключался в том, что опухоли могут поддерживаться методом серийной трансплантации животным той же «расы», из которой опухоль произошла [2]. Ис-

следователь Лео Лёб, работавший в Пенсильванском университете в Филадельфии над проблемой инстинктивного и приобретенного поведения, стал хозяином небольшой колонии так называемых «японских вальсирующих мышей» (на самом деле происходящих из Китая, чей «танец», куда более похожий на рок-н-ролл, чем на вальс, вызывается генетическим дефектом в развитии внутреннего уха). Когда у одной из мышей развилась спонтанная опухоль, Л. Лёб, подобно К. Йенсену, попытался трансплантировать ее другим «вальсирующим» мышам и диким животным. Как и в экспериментах К. Йенсена, опухоль росла у «вальсирующих», но не диких животных. Подобно К. Йенсену, Л. Лёб не знал о генетике, чтобы сделать правильный вывод из этого эксперимента, и заключил, что успешная трансплантация опухолей зависит от «расы» реципиентов [3]. Первым исследователем, который подошел к проблеме с точки зрения генетики, был Эрнест Тайзер. Он воспроизвел результаты Л. Лёба на «вальсирующих» мышах и показал, что опухоль успешно растет у гибридов 1-го поколения обычных мышей, но не у 2-го поколения, в котором наблюдается необычное расщепление признака, не вполне соответствующее законам Менделя, что указывает на его нахождение под контролем нескольких генов [4]. Их количество можно было определить при достаточно большой статистике исследования. Когда эксперименты были завершены и воспроизведены другими группами исследователей, оказалось, что частота успешных трансплантаций в поколении F₂ может варьировать в зависимости от мышей и применяемой опухоли. Лишь около 1 % животных поколения F₂ чувствительны к росту опухоли, т. е. ее способность к росту у постороннего хозяина определяется примерно 15 генами. Отсюда следует вывод о несостоятельности попыток исследовать специфический противоопухолевый иммунитет, используя нелинейных животных и перевивание им опухолевых линий неизвестного происхождения либо

произошедших из беспородных животных. Несоблюдение этого правила неизбежно приведет к той или иной форме ответов на главные и минорные антигены гистосовместимости, не имеющие отношения к антигенам опухолей.

С. Литтл и Б. Джонсон в 1922 г. трансплантировали животным небольшие части селезенки вместо опухоли и показали, что, как и в случае с опухолью, фрагменты селезенки выживают у малой части реципиентов поколения F_2 , полученных скрещиванием 2 инбредных линий мышей [5]. Эти наблюдения открыли широкий фронт последующих исследований генетики тканевой совместимости и генетических ограничений иммунного ответа.

Законы трансплантации. Открытие главного комплекса гистосовместимости

Для успеха этих исследований решающее значение имело получение высокоинбредных линий экспериментальных животных, которые благодаря продолжительной серии близкородственных скрещиваний становились генетически идентичными. Работы по пересадке опухолей и трансплантатов кожи, проведенные в процессе их получения, позволили сформулировать 5 основных законов трансплантации.

1. Сингенные трансплантаты приживаются.
2. Аллогенные трансплантаты отторгаются.
3. Трансплантаты любой из родительских линий приживаются на гибридах поколения F_1 .
4. Трансплантаты родительской линии, пересаженные гибридам поколения F_2 или потомкам возвратного скрещивания гибридов поколения F_1 с другой родительской линией, приживаются у очень небольшой части реципиентов.

5. На гибридах поколения F_1 приживаются трансплантаты от гибридов поколения F_2 и всех последующих гибридных поколений, а также трансплантаты от потомков возвратного скрещивания.

Приживление трансплантатов у генетически идентичных индивидуумов, отторжение их при наличии генетических различий, полное доминирование восприимчивости над резистентностью, расщепление по восприимчивости и резистентности в поколениях, — все это подходит к признаку, детерминированному генами в соответствии с законами Менделя.

Ранние работы по серологической идентификации продуктов генов гистосовместимости, открытие главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) мыши H-2 и его неоднородности связаны с именем Питера Горера [6, 7]. Методом генетической изоляции H-2 послужило выведение конгенных резистентных линий, которые получают серийой возвратных скрещиваний потомков поколения F_1 с одной из родительских линий [8, 9]. К началу 1970-х годов было выведено 192 линии мышей, 104 из которых отличались по генам МНС мыши H-2, а 88 линий несли другие отличия [10]. Анализ внутрилокусных

рекомбинаций, использование рекомбинантных инбредных линий и гистогенетических методов их тестирования к концу 1970-х годов позволили исправить ошибки, допущенные в ранних работах по серологической идентификации продуктов H-2 и сформировать представление о МНС, наиболее близкое к современному. Были идентифицированы 2 локуса — K и D, кодирующие молекулы МНС класса I. Позднее был идентифицирован локус L, настолько тесно сцепленный с D, что их не удается разделить рекомбинацией [1]. Полученные чистые линии животных стали также сильным средством анализа генов, не связанных с МНС, но тем не менее существующих в аллельных формах и поэтому вызывающих иммунный ответ при межлинейных иммунизациях. Многие из них оказались важными ввиду их участия в функциях лимфоцитов или возможности их использования как гистогенетических маркеров. Одним из наиболее известных примеров может служить антиген *Thy-1*, который в течение нескольких десятилетий использовался как гистогенетический маркер Т-лимфоцитов [11]. Другой хорошо известный пример — антиген *Ly-2,3* (*CD8*), являющийся корцептором CTL и их предшественников [12].

Распознавание продуктов главного комплекса гистосовместимости рецепторами Т-лимфоцитов

Участие малых лимфоцитов тимусного происхождения в специфических ответах на аллогенные и ксеногенные опухолевые клетки стало очевидным, когда выяснилось, что мыши линии nude, имеющие генетический дефект в развитии тимуса, Т-лимфоцитов и реакций специфического клеточного иммунитета, считаются прекрасными реципиентами для перевивки не только аллогенных, но даже ксеногенных опухолевых клеток. Это обстоятельство диктует необходимость более подробного рассмотрения биологии и закономерностей функционирования Т-лимфоцитов, которые являются наиболее универсальными и изменчивыми компонентами иммунной системы. Они циркулируют через кровь и лимфатические сосуды и заселяют лимфоидные органы: тимус, селезенку и лимфатические узлы, но обнаруживаются также в коже, кишечнике и печени. Они выполняют широкий ряд функций — уничтожение измененных клеток, контроль над активностью иммунной системы, секреция регуляторных молекул, а также, возможно, и ряд других, пока неизвестных. Т-лимфоциты ответственны за многие иммунные реакции, такие как клеточно-опосредованный цитоллиз, гиперчувствительность замедленного типа, отторжение трансплантата и реакция «трансплантат против хозяина». Они также являются главным элементом ряда аутоиммунных реакций. Т-лимфоциты убивают клетки-мишени, обеспечивают «помощь» таким киллерам, активируют другие клетки иммунной системы (например, макрофаги), помогают В-лимфоцитам развить гуморальный ответ, подавляют активность

других клеток иммунной системы, секретируют цитокины, хемокины и другие медиаторы. К таким клеткам относятся: киллеры $CD8^+$, Т-хелперы и регуляторы $CD4^+$, число типов которых в последние годы возросло до 5 ($Th1$, $Th2$, $Th17$, T_{reg} , T_{FH}), или популяции активированных клеток и клеток памяти [13]. Часто различные типы Т-клеток можно различить по экспрессии некоторых поверхностных маркеров, например, Т-хелперы экспрессируют $CD4$, но не $CD8$. Инверсная картина характеризует основную популяцию киллеров.

Одним из первых в мире в этом направлении начал работать Борис Давидович Брондз, изучавший взаимодействие лимфоцитов иммунизированных животных с культурами сингенных и аллогенных клеток. В 1964 г. он описал эффект разрушения монослоев макрофагов при добавлении к ним лимфоцитов иммунизированных животных [14]. Эти исследования поднимали вопрос об антигенспецифических рецепторах цитотоксических Т-лимфоцитов и об их лигандах на клетке-мишени. Б.Д. Брондз увидел и показал связь специфической цитотоксической функции лимфоцитов с распознаванием ими продуктов МНС. В 1968 г. он продемонстрировал связь между специфичностью рецепторов эффекторных CTL и их адсорбцией на монослоях макрофагов, несущих различные антигены гистосовместимости [15]. Это открытие стало первым указанием на то, что мишенью рецепторов цитотоксических лимфоцитов со специфической функцией являются молекулы МНС [1]. В экспериментах он наглядно показал эффект, получивший позднее название прямого аллогенного распознавания. Более того, возможность разделения цитотоксических лимфоцитов в соответствии со специфичностью их рецепторов МНС стало первым прямым экспериментальным указанием на клональную организацию репертуара Т-лимфоцитов. Следует отметить, что косвенные указания на это появились в мировой литературе лишь в начале 1970-х годов, и в конце десятилетия были получены сами Т-клеточные клоны [16]. Следующий шаг в исследовании природы взаимодействия антигенспецифических рецепторов Т-лимфоцитов с молекулами гистосовместимости стал возможным, когда Б.Д. Брондз разработал метод выделения лимфоцитов, специфически прикрепившихся к монослою аллогенных макрофагов [17]. Удаление неприкрепившихся клеток и последующая обработка лимфоцитов, прикрепившихся к монослою, проназой позволяла смыть их с монослоя макрофагов и добиться существенного обогащения антигенспецифических клеток с полным сохранением ими функциональных свойств. Дальнейшие исследования привели к пониманию того, что рецепторы Т-клеток распознают молекулы гистосовместимости иначе, чем антитела. В частности, обнаружили несовпадение между эпитопами, определяемыми серологически и распознаваемыми цитотоксическими Т-лимфоцитами. В то время, как Т-лимфоциты могли распознать даже единичные аминокислотные замены

в структуре тяжелой цепи молекулы гистосовместимости класса I, возникшие в результате точечных мутаций, почти никаких различий не обнаруживали во взаимодействии этих мутантных форм с антителами, специфичными к молекуле дикого типа [1]. Иммунологи пытались описать антигенную специфичность антител, основываясь на изучении паттернов их кросс-реактивности. Когда такой же метод применили к исследованию специфичности CTL, в системе, основанной на реципрокных иммунизациях всего лишь 8 типов мутантов молекулы гистосовместимости H-2K^b, приводящих к выраженному аллогенному ответу, обнаружили несколько десятков различных паттернов кросс-реактивности, которые могли быть приписаны возникновению либо исчезновению отдельных антигенных детерминант [18]. Это противоречило как картине, выявляемой антителами, которые не могли «увидеть» различий между этими мутантами, так и чрезвычайно высокой частоте клонов Т-лимфоцитов, отвечающих на аллогенные молекулы МНС.

Б.Д. Брондз разрешил это противоречие следующим образом: в его экспериментах получалось, что обогащение популяции иммунных лимфоцитов на монослое макрофагов донора приводит к одновременному обогащению CTL, перекрестно реагирующих с другими аллельными формами молекул МНС. Эта популяция клеток составляла около 5 % CTL, реагирующих с молекулой гистосовместимости донора. Он выделил эту кросс-реактивную популяцию CTL на монослое макрофагов посторонней линии мышей и исследовал ее специфичность. По его замыслу в случае верной гипотезы о множественности антигенных детерминант результатом должна стать высокая специфичность выделенных клеток к мишеням, несущим именно ту форму посторонней молекулы гистосовместимости, которая была использована для абсорбции. Результат получился противоположный — выделенные лимфоциты активно убивали мишени, несущие молекулу гистосовместимости донора, использованного для иммунизации, и гораздо слабее мишени, несущие молекулу гистосовместимости, использованную для выделения кросс-реактивных клеток [19]. Таким образом, он показал, что кросс-реактивность в системе иммунизаций аллогенными клетками обусловлена различиями Т-клеток в аффинности их антигенсвязывающих рецепторов. Из данного наблюдения следовал вывод о лабильности иммунодоминантного эпитопа, распознаваемого рецепторами аллоспецифических CTL [20]. Структура этого эпитопа и взаимодействие с ним рецепторов CTL, очевидно, могли меняться в зависимости от последовательности аминокислот тяжелой цепи, ассоциации ее с мембраной клетки мишени или с антигенными пептидами. По идее Б.Д. Брондза структура сложного «мозаичного» эпитопа для CTL на сингенной молекуле МНС могла бы при ассоциации с каким-либо антигенным пептидом частично имитировать структуру аллогенной молекулы. С получением генетически чис-

тых линий экспериментальных животных оказалось возможным в течение неограниченного времени пересаживать опухолевые клетки от одного животного другому и получать воспроизводимые результаты.

Таким образом, первые попытки вызвать противоопухолевый иммунный ответ привели к пониманию того, что в корректной экспериментальной системе исследования противоопухолевого иммунитета трансплантационные антигены на клетках опухоли и реципиента должны совпадать. Несоблюдение этого правила дает иммунный ответ преимущественно на трансплантационные антигены, а не на антигены опухоли. К середине прошлого века это привело к разделению научных направлений, занимающихся вопросами иммунологии трансплантации и противоопухолевого иммунитета.

Экспериментальные модели противоопухолевого иммунитета

Существование противоопухолевого иммунитета впервые было продемонстрировано Л. Гроссом в 1943 г. Он показал, что саркомы, индуцированные метилхолантеном у мышей линии СЗН, можно трансплантировать мышам той же линии внутрикожно, а затем удалять хирургически либо простым наложением лигатуры и прекращением кровоснабжения опухоли. У животных, подвергнутых такой процедуре, вторичная трансплантация той же опухоли приводит к ее отторжению [21]. Убедительное доказательство существования опухолеспецифического отторжения трансплантированных опухолей было получено в 1957 г. в экспериментах Р.Т. Прена и Д.М. Мэйна, которые показали, что антигены, вызывающие отторжение опухолей, являются опухолеспецифическими и не присутствуют в нормальных тканях. Они продемонстрировали также, что иммунизация опухолевыми клетками не вызывает отторжения трансплантатов кожи и других нормальных тканей [22]. Следующее важное доказательство было получено в 1960 г. Г. Клейном и соавт., которые показали, что резистентность к опухолям, индуцированным метилхолантеном, имеет место непосредственно у так называемого аутохтонного хозяина, т. е. у животного, у которого эта опухоль была индуцирована [23]. В последующие годы было доказано, что индукция опухолеспецифической трансплантационной резистентности может быть вызвана опухолями, индуцированными другими химическими или физическими (такими, как ультрафиолет) канцерогенами, а также спонтанно возникшими опухолями [24, 25].

Отторжение опухолевых клеток или его альтернатива — рост опухоли в этой системе — по-видимому, подчиняется закону «все или ничего». За исключением высокоиммуногенных опухолей, как правило, существует пороговая доза опухолевых клеток, превышение которой приводит к опухолевому росту, остановить который иммунная система не в состоянии.

Иммуногенность опухолей в значительной мере зависит от способа их индукции, который, возможно,

тесно связан с иммуносупрессивным действием канцерогенного фактора. Известно, что наименее иммуногенными являются спонтанные опухоли. Далее, в порядке усиления иммуногенности, могут быть названы опухоли, индуцированные метилхолантеном, который вызывает кратковременное состояние иммуносупрессии, и опухоли, индуцированные ультрафиолетовым излучением — наиболее иммуногенные в этом ряду. Пересадка последних обычно возможна только у реципиентов с нарушенным клеточным иммунитетом, например мышей линии nude, лишенных тимуса и Т-клеток, тогда как у нормальных реципиентов такие опухоли не растут. Особенностью экспериментальной системы, использующей ультрафиолетовое излучение в качестве канцерогенного фактора, является стойкая и длительная системная супрессия иммунного ответа, связанная с подавлением стимуляторной функции дендритных клеток кожи — клеток Лангерганса [26, 27]. На фоне подавления клеточного иммунитета вполне вероятно возникновение иммуногенных вариантов опухолей, подавить рост которых нарушенная иммунная система не может. Таким образом, иммуногенность опухолей может быть тесно связана с эффективностью иммунологического надзора, в зависимости от которой в организме может происходить селекция тех или иных вариантов опухолевых клеток. Эта концепция подтверждается тем, что опухоли, индуцированные метилхолантеном у мышей, подверженных ультрафиолетовому излучению, часто являются более иммуногенными, чем опухоли, индуцированные метилхолантеном у нормальных животных [28]. Поскольку трансплантации опухолевых клеток человеку невозможны, были предприняты попытки создать экспериментальные системы с использованием животных, в которых было бы можно поддерживать линии опухолевых клеток человека и тестировать ответы на них. В качестве реципиентов для создания таких систем чаще всего используют мышей, несущих мутации beige и nude, лишенных NK- и Т-клеток, либо мышей линии SCID, лишенных Т- и В-клеток. Иммунная система таких животных неспособна распознать трансплантационные антигены клеток человека, поэтому трансплантации как опухолевых, так и иммунокомпетентных клеток человека, отвечающих на опухолевые клетки, проходят успешно. Такие мыши с трансплантированными иммунокомпетентными клетками человека получили название humanized mice [29].

В последние годы широко используются также трансгенные экспериментальные животные и нокаут-животные по иммунологически значимым генам. Трансгенные Т-клеточные рецепторы (T-cell receptor, TCR) позволяют получить значительное количество клеток с заранее известной специфичностью и, соответственно, значительно более выраженный иммунный ответ животных к отдельным комбинациям молекула МНС-пептид, чем животных дикого типа. Перевод таких трансгенных животных на генетическую основу нока-

утов по генам рекомбиназ, осуществляющих реаранжировку Т- и В-клеточных рецепторов (и поэтому лишенных Т- и В-клеток), позволяет получить трансгенных животных с Т-клетками, экспрессирующими только 1 тип антигенспецифического TCR без примеси Т-клеток, экспрессирующих эндогенные рецепторы [30]. Мыши, экспрессирующие трансгенный зеленый флуоресцентный белок, могут быть с успехом использованы при изучении процессов метастазирования опухолевых клеток и механизмов дифференцировки предшественников иммунокомпетентных клеток и клеток памяти при адоптивном переносе нетрансгенным реципиентам [31]. Интерес в последнее время представляет использование в исследованиях трансгенных моделей с тканеспецифической и стадиоспецифической экспрессией антигенов. Следует ожидать, что в скором времени эти модели будут привлечены к исследованию процессов внутритимусной селекции Т-лимфоцитов, специфичных к опухолеассоциированным антигенам. Использование нокаутов по иммунологически значимым генам значительно расширяет аналитические возможности исследователя в изучении механизмов индукции противоопухолевого ответа. В частности, применение нокаутов по генам β_2 -микроглобулина и транспортеров, ассоциированных с процессингом антигенов, позволяет выявить роль эндогенного процессинга и презентации антигена в организме реципиента и понять, распознается ли он непосредственно на опухолевой клетке, или для возникновения иммунного ответа на него необходима кросс-презентация дендритными клетками [32]. Использование нокаутов по генам *CD4* и *CD8* позволяет оценить роль кооперации таких типов клеток в иммунном ответе на конкретный антиген и определить его зависимость от соответствующей субпопуляции Т-лимфоцитов [33].

В последние годы предприняты попытки генетической модификации опухолевых клеток, нацеленной на усиление их иммуногенности трансфекцией генов цитокинов и костимулирующих лигандов профессиональных антигенпрезентирующих клеток (АПК). Наиболее часто для этого используются аденовирусные векторы, позволяющие получить транзитную экспрессию трансгенного белка в опухолевых клетках. В последние годы широкое распространение получают методы трансфекции, основанные на использовании ретровирусных и лентивирусных векторов, позволяющие с высокой эффективностью получать стабильные трансфектанты с фиксированным количеством копий трансгена на геном [34, 35].

Несмотря на то, что метод обнаружения опухолеспецифического иммунитета по отторжению трансплантированных линий опухолевых клеток был разработан в середине прошлого века, он до сих пор остается основным средством оценки эффективности противоопухолевого иммунитета в эксперименте. В той или иной модификации он, как правило, присутствует в экспериментальных работах, нацеленных

на разработку противоопухолевых терапевтических вакцин, изменение антигенных свойств опухолевых клеток, усиление их иммуногенности трансфекциями генов цитокинов и костимуляторных лигандов, иммунизацию пептидами и т. д.

Во взаимодействии иммунной системы с сингенными опухолевыми клетками, совпадающими с реципиентом по МНС, обычно удается разглядеть 3 фазы: элиминацию, равновесие и ускользание опухолевых клеток от иммунного ответа [36, 37]. В процессе элиминации иммунная система распознает опухолевые клетки и активно устраняет их из организма, но интенсивность ответа оказывается недостаточной для того, чтобы довести этот процесс до конца. В фазе равновесия удается наблюдать опухолевые клетки, неограниченный рост которых все еще контролируется иммунной системой. В ходе давления, оказываемого иммунной системой на опухолевые клетки, последние претерпевают отбор, приводящий к накоплению клеток, способных этому давлению противостоять. Наиболее часто встречающимися способами сделать это являются утрата опухолевыми клетками молекул МНС и продукция супрессорных факторов, таких как TGF β [38] и фермент индоламин-2,3-диоксигеназа. Этот фермент разрушает триптофан в сайтах контакта Т-лимфоцитов с опухолевыми клетками, достаточное наличие которого во внеклеточной среде считается критически важным для успешной активации Т-лимфоцитов [39]. Появление таких опухолевых клеток характеризует 3-ю фазу взаимодействия — ускользание, — в ходе которого опухолевые клетки уходят из-под контроля иммунной системы и разрушают организм опухоленосителя. В иммунных ответах на трансплантированные аллогенные опухолевые клетки увидеть обычно удается лишь фазу элиминации, которая приводит к полному отторжению опухоли и излечению реципиента [40].

Молекулы главного комплекса гистосовместимости в распознавании трансплантационных и опухолевых антигенов

Одной из наиболее существенных проблем является вопрос о том, в каком виде Т-клетки распознают аллогенные молекулы МНС — в виде пептидов аллогенных молекул, процессированных и представленных клетками реципиента (непрямое аллогенное распознавание), или нативные молекулы аллоантигенов распознаются непосредственно на опухолевой клетке (прямое аллогенное распознавание). Очевидно, что привычная схема, в соответствии с которой дендритные клетки представляют Т-лимфоцитам пептиды белков патогена, в этом случае не годится, так как мишенью эффекторных Т-лимфоцитов становятся опухолевые клетки, экспрессирующие нативные аллогенные молекулы МНС, а не их пептиды в комплексе с молекулами МНС реципиента. Наши эксперименты показали, что ведущим механизмом распознавания аллоантигенов опухолей клетками CD8⁺ является прямое аллогенное распознавание [41, 42].

Этот результат противоречит устоявшейся догме, заключающейся в том, что только профессиональные АПК способны индуцировать первичный ответ Т-лимфоцитов. Действительно, для активации Т-клеток CD4⁺ необходима коэкспрессия антигенспецифического и костимулирующего лигандов на поверхности одной и той же АПК [43]. Природа этой зависимости состоит в необходимости формирования организованного иммунологического синапса между Т-лимфоцитом и АПК для успешной активации Т-лимфоцита CD4⁺ [44, 45]. Зависимость Т-клеток CD8⁺ от презентации антигена профессиональной АПК гораздо менее очевидна, поскольку активация наивных клеток CD8⁺ не требует образования организованного иммунологического синапса и формирования центрального супрамолекулярного активационного кластера [46, 47]. Эти факты допускают возможность существования 3-клеточной системы кооперации, в которой Т-клетка CD8⁺ распознает аллогенную молекулу МНС на поверхности непрофессиональной аллогенной АПК, а костимуляторный лиганд — на поверхности дендритной клетки, не участвующей в презентации. Такую модель предлагали неоднократно по мере накопления фактов, противоречащих догме «2 сигнала от 1 АПК», а механизм костимуляции, реализованный в ней, получил название транс-костимуляции [48, 49]. Данная модель могла бы объяснить, каким образом индуцируется ответ Т-клеток CD8⁺ на непрофессиональные аллогенные АПК, оставаясь зависимым от костимуляции, а также почему фибробласт, трансфецированный генами белков LCMV, становится эффективной АПК, когда попадает в лимфоидную ткань [50, 51].

Результаты наших исследований показали, что роль АПК реципиента в ответе на аллоантигены опухолевых клеток может быть пассивной и сводиться к предоставлению лишь спектра костимуляторных сигналов, необходимых Т-клеткам для пролиферации. Не исключено, что при первичном ответе на клетки аллогенной опухоли в роли таких АПК могут выступать другие типы клеток миелоидного происхождения, например нейтрофилы. Это предположение основано на том, что согласно нашим данным нейтрофилы являются единственным источником CD80 и IL-12, индуцируемым в ответе на клетки аллогенной опухоли. Поэтому они могут быть существенным фактором, определяющим преимущественное развитие иммунного ответа Т-лимфоцитов CD8⁺ в отсутствие индукторов врожденного иммунитета. Такая секвестрация могла бы «включаться» в результате первичного распознавания молекулы МНС класса I Т-лимфоцитом CD8⁺, приводить к массивной миграции нейтрофилов в селезенку и преимущественной индукции CTL и тем самым обуславливать высокую эффективность ответа на аллогенные опухолевые клетки [52, 53]. Это предположение не является столь невероятным, как может показаться на первый взгляд: трансдифференцировка нейтрофилов человека и приобретение ими функций

профессиональных АПК могут иметь место при инкубации с некоторыми цитокинами, а также в клинике при системных инфекциях и хронических воспалительных заболеваниях [54]. Неоднократно показано, что нейтрофилы принимают участие в противоопухолевом адаптивном иммунном ответе, способствуя его поляризации по первому типу [55]. Способность нейтрофилов усиливать ответы Т-клеток в реакциях на трансплантат отмечалась и другими авторами [56].

Альтернативное объяснение тому, как непрофессиональные аллогенные опухолевые АПК вызывают иммунный ответ у реципиента, появилось недавно: было показано, что сформированные МНС/пептидные комплексы могут переноситься на поверхность дендритной клетки в ходе контакта с другими типами клеток. Этот процесс в литературе получил название кросс-дрессинга [57]. В качестве возможных механизмов такого переноса рассматривают трофоцитоз, продукцию экзосом и образование межклеточных микротоннелей [58].

В 1997 г. было установлено, что способность TCR к взаимодействию с молекулами МНС не формируется в процессе тимусной селекции, как полагали ранее, а присутствует в репертуаре исходно [59]. Врожденная способность к распознаванию Т-клетками молекул МНС поставила вопрос о том, каковы ее структурные основы. Подробное исследование варибельности первичной структуры молекул МНС класса млекопитающих стало информативным для углубленного понимания их функций. Синтетические пептиды, соответствующие варибельным участкам доменов α_1 и α_2 молекулы K^b, при внутривенном введении интактным и иммунным экспериментальным животным вызывают появление в их селезенке клеток, способных к специфической супрессии иммунного ответа. Оказалось, что не все эпитопы молекулы МНС способны вызвать супрессию иммунного ответа — из 6 использованных нами пептидов биологически активными были 3 (AA62-83, AA149-160, AA163-174), соответствующие последовательности С-концевых участков α -спиралей доменов α_1 и α_2 молекулы K^b [60]. Было обнаружено, что выявленные супрессорные пептиды полностью совпадают с участками молекулы МНС, контактирующими с рецепторами CTL [61]. Возможность функциональной трансформации CTL в Т-супрессоры при различных условиях их культивирования показывает, что выявленный эффект не связан с особой эпитопной специфичностью Т-супрессоров [62]. Интересен тот факт, что пептиды С-концевых участков α -спиралей подавляют ответы на молекулы МНС класса II и даже приводят к некоторому продлению периода жизни аллогенных кожных трансплантатов. Иммунологическая специфичность этого эффекта указывает на то, что он может быть обусловлен взаимодействием пептидов с антигенспецифическими рецепторами Т-клеток. С учетом способности линейных пептидов α -спиралей молекул МНС образовывать в растворе α -спиральные

структуры [63] можно предположить, что они способны к прямому консервативному взаимодействию с рецепторами Т-клеток, имитируя участки контактного взаимодействия молекул МНС с TCR. По всей видимости, эти консервативные взаимодействия являются отражением природы взаимодействия TCR с МНС, понимание которого существенно изменилось в последние годы.

На уровне распознаваемого лиганда способность различать аллельные формы молекул МНС может быть обусловлена ограниченностью разнообразия аминокислотных замен в тяжелых цепях, возникающей вследствие того, что ведущим механизмом формирования аллельного разнообразия молекул МНС являются генные конверсии с консервативными нетранскрибируемыми областями МНС [64, 65]. На уровне TCR распознавание такого ограниченного разнообразия и независимость от процессов внутритимусной селекции могут определяться только герминальными последовательностями генных сегментов TCR, не проходящими реаранжировку в процессе селекции. В структурном отношении эти последовательности могут быть отнесены к CDR2 α и CDR2 β , определяющим комплементарность взаимодействия TCR с С-концевыми участками α -спиралей первых 2 доменов молекул МНС класса I [66].

В некоторых зарубежных лабораториях было установлено, что ответ антигенспецифических CTL может наблюдаться при использовании аллогенных мишеней из мышей, нокаутированных по генам β_2 -микроглобулина и молекул-транспортёров TAP, и вследствие этого не имеющих на поверхности полноценных комплексов «молекула МНС/ β_2 -микроглобулин/пептид», а экспрессирующих лишь незначительное количество тяжелых цепей молекул МНС класса I [67, 68]. Это обстоятельство указывает на относительную независимость взаимодействия TCR аллоспецифических CTL от изменений в конформации молекул МНС класса I, определяемых связанным с ними пептидом, и на важную роль структуры тяжелых цепей молекул МНС в таком взаимодействии. Иными словами, утрата пептида в антигенсвязывающей щели молекулы МНС не приводит к исчезновению антигенных свойств молекул МНС класса I и способности к взаимодействию с TCR. Исследования термодинамики взаимодействия TCR с молекулами МНС показали «подвижность» контактных сайтов молекул МНС, взаимодействующих с TCR [69]. Таким образом, возможность имитации отдельных эпитопов молекул МНС синтетическими пептидами представляется реальной.

Поскольку иммуногенность антигена существенно зависит от аффинности его связывания с рецепторами иммунокомпетентных клеток, в последующих исследованиях мы попытались модифицировать ее путем создания синтетических древовидных пептидов с последовательностями сайтов контакта молекул МНС с TCR. Мы обнаружили, что древовидный тетрамер

пептида AA158-175, соответствующий области контакта α_2 -домена молекулы МНС с TCR, способен к эффективному примированию экспериментальных животных, экспрессирующих молекулы МНС класса I, содержащие идентичную последовательность аминокислотных остатков. Этот факт указывает на то, что стимулирующие свойства конструкции обусловлены ее мультиплетной структурой, а не способностью презентироваться в контексте МНС реципиента. Исследование спектра цитокинов и костимуляторных лигандов, которые экспрессируются линиями Т-лимфоцитов, индуцированными тетрамером *in vitro*, показало, что они экспрессируют мРНК CTLA-4, FasL, TNF α , TGF β и IL-4. Однократная иммунизация тетрамером приводит к существенному увеличению доли клеток CD4 $^{+}$ в периферических лимфоидных органах реципиентов, а также к стимуляции иммунного ответа Т-клеток на молекулы МНС, в том числе слабо иммуногенные (молекула Н-2D b) и даже сингенные. Это свойство тетрамерных конструкций позволило нам получить эффект увеличения продолжительности жизни у мышей линии bm1, получивших летальную дозу клеток лимфомы EL4 [70].

Поскольку анализ реальных процессов внутритимусной дифференцировки *in vivo* затруднен возможным вкладом миграции клеток, биологическую активность синтезированных препаратов оценивали в органных культурах фетального тимуса *in vitro*. Этот метод был использован также для оценки сиквенсной специфичности древовидного тетрамера пептида AA158-175 молекулы Н-2D b . Для этого биологическую активность исходного тетрамера сравнивали с активностью тетрамера с инвертированной последовательностью аминокислотных остатков («антисенса»). Обнаружено, что оба синтезированных пептида влияют на дифференцировку Т-клеток в органных культурах тимуса сходным образом, но «антисенс» вызывает сопоставимый эффект в концентрации, в 50 раз превышающей концентрацию исходного препарата. Таким образом, биологическая активность тетрамера AA158-175 молекулы Н-2D b обусловлена наличием в его структуре определенной последовательности аминокислот. В культуре *in vitro* присутствие тетрамера приводит к снижению доли клеток CD4 $^{+}$ CD8 $^{-}$ и увеличению CD4 $^{-}$ CD8 $^{-}$. Этот эффект сопровождается заметным увеличением количества клеток CD3 $^{-}$ в популяции CD4 $^{+}$ CD8 $^{-}$, что свидетельствует об активации Т-клеток CD4 $^{+}$ через комплекс TCR/CD3 и делеции части клонов Т-клеток, подобной делеции, вызываемой суперантигенами. Напротив, аллогенный тетрамер молекулы Н-2K k , добавленный в органные культуры эмбрионального тимуса, стимулирует образование однопозитивных Т-клеток, экспрессирующих CD3, что может рассматриваться как позитивная селекция.

Необычная специфичность Т-клеток CD4 $^{+}$ к пептидам молекул МНС класса I требовала разумного объяснения. В связи с этим мы предприняли попытку

определить, может ли разнообразие аллельных форм молекул МНС класса I млекопитающих быть описано в виде единой «формулы», содержащей информацию о мотивах в их первичной структуре. Данная попытка может быть успешной в отношении молекул МНС класса I плацентарных млекопитающих. В структуре доменов, играющих важную роль в распознавании рецепторами Т-клеток, удалось обнаружить позиции аминокислотных остатков, которые неизменны даже у видов, весьма отдаленных друг от друга в эволюционном отношении.

Идентификация единого мотива в первичной структуре молекул МНС класса I млекопитающих и спектра возможных аминокислотных замен их вариабельных остатков позволила увидеть сходство в структуре классических молекул МНС классов I и II. Она обнаружила короткий фрагмент, локализованный в районе аномальной укладки α -спирали в α_2 -домене молекул МНС класса I (AA154-164) и в β -цепях молекул МНС класса II (AA63-73 в A_β -цепях и AA69-79 в E_β -цепях), спектр возможных аминокислотных замен в котором почти полностью совпадает у молекул обоих классов. По всей видимости, этот фрагмент может играть роль «якоря» для взаимодействия с TCR. Именно в этом фрагменте находятся аминокислотные замены у мутанта bm12 — единственного известного мутанта по молекуле МНС класса II A_β^b , способного вызвать сильную аллогенную реакцию у реципиентов дикого типа, а также измененные аминокислотные остатки мутанта bm1, реакция на который приводит к пролиферации клонов, не проявляющих кросс-реактивности с какими-либо другими мутантами серии bm. По всей видимости, модификация этого фрагмента приводит к практически полной «смене образа» аллогенной молекулы и, соответственно, его распознаванию перекрывающейся частью репертуара Т-клеток [71].

Как отмечалось выше, в норме Т-клетки $CD4^+$ распознают молекулы МНС класса II, а $CD8^+$ — класса I. Эта особенность определяется специфичностью корцепторов, взаимодействующих с консервативными регионами молекул МНС. Таким образом, справедливость гипотезы о значимости структурного сходства молекул обоих классов можно было бы проверить в независимой экспериментальной системе, в которой корцептор Т-клетки был бы изменен. Для проверки данной гипотезы мы получили Т-гибридомы из клеток $CD8^+$, пролиферирующих в ответе на клетки мутанта bm3, и опухолевого партнера с экспрессией трансгенного корцептора $CD4$, который позволил бы выявить TCR, реагирующие с молекулами МНС класса II. Из 396 проанализированных гибридом 37 оказались реактивными в ответе на стимуляторы, экспрессирующие молекулу МНС класса II доноров клеток $CD8^+$. В целом это согласуется с частотой встречаемости клонов, перекрестно реагирующих на аллельные продукты МНС, что позволяет сделать заключение о существовании Т-клеточных клонов с рецепторами, облада-

ющими двойной специфичностью к молекулам МНС I и II классов [72].

Роль Т-клеточного репертуара и его рецепторов в противоопухолевом иммунном ответе

При развитии Т-лимфоциты подвергаются процессам позитивной и негативной селекции, имеющим целью создание клонального репертуара, способного распознать и элиминировать «чужое» и вместе с тем неспособного распознать и разрушить «свое». Нарушение процессов внутри тимусной селекции вследствие модификации или отсутствия естественных лигандов рецепторов Т-клеток — молекул МНС — приводит либо к развитию аутоиммунных патологий и разрушению организма, либо к иммунодефицитным состояниям, имеющим следствием неспособность организма контролировать инфекцию и рост трансформированных клонов.

Подавляющее большинство подходов к коррекции специфического противоопухолевого иммунитета ставит целью стимуляцию иммунного ответа на антигены опухолевых клеток. Как правило, этой цели пытаются достичь усилением или замещением костимуляторных функций клеток иммунной системы, например, при терапии цитокинами и векторами, усиливающими экспрессию цитокинов и костимуляторных лигандов, при терапии дендритными клетками, а также при экстракорпоральной стимуляции Т-лимфоцитов онкологических больных цитокинами. Очевидно, что такая стратегия может привести к успеху при стимуляции ответа на уникальные опухолеспецифические антигены. Вместе с тем, назначая курс иммунотерапии конкретному больному и не имея, как правило, информации о природе мутаций, приведших к злокачественной трансформации, и о спектре молекул HLA пациента, определяющем потенциальную эффективность такого лечения, врач вынужден действовать вслепую. Большие возможности для диагностики и иммунотерапии онкологических заболеваний представляет группа опухолеассоциированных антигенов — нормальных немутантных белков, которые экспрессируются в трансформированных клетках, но редко встречаются или слабо экспрессируются в нормальных клетках организма. Главная проблема в стимуляции иммунного ответа на такие антигены состоит именно в том, что они представляют собой нормальные белки организма, толерантность к которым развивается в процессе внутри тимусной селекции, отбирающей клоны с низкоаффинными рецепторами к «своему» [73, 74]. Вместе с тем в медулярном эпителии тимуса имеет место экспрессия широкого спектра сугубо тканеспецифических белков, включая антигены группы testis, контролируемые геном *Aire* [75–77]. По этой причине попытки стимуляции иммунного ответа на опухолеассоциированные антигены, а также попытки получения на их основе противоопухолевых вакцин, не учитывающие

необходимости параллельного воздействия на процессы внутритимусной селекции, обречены лишь на ограниченный успех.

Теоретически существуют 2 способа решить эту проблему. Первый заключается в том, чтобы использовать в ответе организма А на опухолеассоциированные антигены Т-клетки, сформировавшиеся в репертуаре организма Б, экспрессирующего иной спектр молекул МНС. В этом случае в организме Б могут существовать Т-клеточные клоны с рецепторами, способными к высокоаффинному взаимодействию с пептидами опухолеассоциированных антигенов, представленными в виде комплексов с молекулами МНС на клетках организма А, поскольку Т-клеточный репертуар организма Б не подвергался негативной селекции комплексами пептидов таких антигенов с молекулами МНС организма А. В литературе представлены успешные результаты, полученные группой Стаусса, при использовании такого подхода в иммунотерапии опухолей, экспрессирующих антиген Вильмса [78]. Однако широкое применение этого метода в клинике ограничено высокой стоимостью предварительных исследовательских работ, необходимых для лечения конкретного больного, и значительного времени, затраченного для корректного подбора донора и получения антигенспецифических клонов. Тем не менее эта технология уже работает и применяется в клинике [79, 80].

Второй способ заключается в коррекции репертуара антигенспецифических клонов в тимусе. Несмотря на кажущуюся очевидность, этот подход практически не разрабатывается иммунологами. Причиной тому является ограниченность подходов к изучению внутритимусной селекции и ее влияния на периферический пул Т-лимфоцитов. Как правило, существующие модели представляют собой искусственно выведенных животных, экспрессирующих трансгенные TCR, а также трансгенные молекулы МНС с ковалентно связанными пептидами. С использованием таких моделей удастся проследить судьбу Т-клеток, экспрессирующих определенный тип TCR в присутствии или в отсутствие специфического трансгенного лиганда. Однако из-за высокой технической сложности клонирования TCR и создания экспрессирующих систем *in vivo* количество клонированных TCR и экспериментальных моделей, основанных на их использовании, невелико.

Оригинальные трансгенные модели противоопухолевого и трансплантационного иммунитета

Одним из путей направленного воздействия на репертуар Т-лимфоцитов мог бы стать трансгенез индивидуальных цепей TCR на уровне зиготы. Функциональные последствия такого трансгенеза различны в связи с тем, что экспрессия α - и β -цепей в разной степени подчинена правилам аллельного исключения. Экспрессия α -цепей ими не контролируется и поэтому приводит к расширению репертуара TCR. Экспрессия

β -цепей строго подчинена правилам аллельного исключения, в связи с чем экспрессия трансгена β -цепи приводит к образованию репертуара рецепторов, в подавляющем большинстве которых присутствует трансгенная β -цепь, сужающая разнообразие репертуара. Накопленный нами в этом направлении опыт позволяет сделать первые обобщения.

Существующие модели с трансгенным TCR α/β имеют ряд недостатков, которые становятся серьезным препятствием для использования в исследованиях гомеостаза Т-лимфоцитов. К таким недостаткам относят глубокие нарушения характера дифференцировки Т-лимфоцитов в тимусе и нефизиологически высокое содержание Т-лимфоцитов с одинаковой специфичностью, что вынуждает исследователей применять инвазивные методы и схемы экспериментов, в частности адоптивные переносы трансгенных Т-клеток лимфопеничным животным дикого типа. Это побудило нас создать собственную трансгенную модель, в которой трансген кодирует одну из цепей TCR клеток памяти, допуская нормальную реаранжировку другой цепи и формирование разнообразного репертуара Т-лимфоцитов.

Ранее мы нашли эффективный способ вызывать селективный ответ клеток памяти, специфичных к аллогенным молекулам МНС класса I без сопутствующей активации и вовлечения в ответ клонов наивных Т-лимфоцитов [81]. Для этого мы использовали смешанную культуру лимфоцитов животных, предварительно иммунизированных клетками аллогенных опухолей, в качестве отвечающих Т-лимфоцитов и аллогенные спленоциты, убитые острым тепловым шоком (+45 °C, 1 ч), в качестве стимулирующих клеток. Мы показали, что в такой экспериментальной системе избирательно пролиферируют Т-клетки памяти CD8, специфичные к аллогенной молекуле МНС класса I и способные распознавать ее мутантные формы [65, 82]. Этот простой метод позволил получить клоны и Т-клеточные гибридомы клеток памяти, что, в свою очередь, дало возможность молекулярной идентификации и клонирования их рецепторов [83]. Следующим шагом стало получение животных с трансгенной экспрессией отдельных цепей TCR [84]. В силу полного или частичного (функционального) аллельного исключения α - и β -цепей TCR репертуар Т-клеток у таких животных оказывается в различной степени суженным, что позволяет исследовать влияние индивидуальных цепей TCR на проявление широкого ряда феноменов иммунитета, таких как внутритимусная селекция Т-лимфоцитов, их выживание на периферии, аллогенное распознавание, аутоиммунитет и формирование Т-клеток памяти.

Мы изучали последствия экспрессии трансгенов α - и β -цепей TCR Т-гибридомы клеток памяти, клонированных нами ранее. При исследовании тимусов трансгенных мышей мы не обнаружили нарушений в развитии Т-клеток, вызванных экспрессией трансгена. После прохождения внутритимусной селекции

лимфоциты CD4⁺ и CD8⁺, экспрессирующие трансген, выходят на периферию, успешно там рециркулируют, и их нормальное соотношение не нарушается.

Одной из основных задач нашего исследования была оценка взаимосвязи структуры TCR с фенотипическими особенностями Т-лимфоцитов, так как неясно, в какой мере они определяются структурой TCR. Важно было выяснить, влияет ли экспрессия трансгенной β -цепи TCR клеток памяти на поверхностный активационный фенотип Т-клеток. При цитофлуориметрическом анализе субпопуляции наивных Т-клеток, эффекторов и Т-клеток памяти мыши обычно идентифицируют на основе экспрессии маркеров CD44 и CD62L. При этом фенотип CD44⁺CD62L⁺ характеризует наивные Т-клетки, CD44⁺CD62L⁻ — клетки памяти, а CD44⁺CD62L⁻ — эффекторы. Цитофлуориметрический анализ экспрессии этих маркеров Т-клетками селезенки созданных нами мышей трансгенной линии показал выраженное снижение доли Т-клеток с фенотипом активированных клеток и увеличение доли клеток с фенотипом наивных Т-лимфоцитов. Таким образом, мы установили, что баланс субпопуляций наивных и активированных Т-клеток может меняться под воздействием экспрессии трансгена β -цепи TCR. Интересным открытием стало то, что Т-лимфоциты трансгенных животных, экспрессирующие эндогенные цепи TCR, приобретают фенотип активированных Т-клеток, что обычно имеет место в условиях лимфопении, вызванной облучением или воздействием цитостатиков [85].

В нашем исследовании неожиданным оказалось то, что клетки, экспрессирующие трансген β -цепи TCR клеток памяти, вопреки нашим ожиданиям не приобретают поверхностный фенотип CD44⁺, а утрачивают его, тогда как Т-клетки, экспрессирующие эндогенные β -цепи, его приобретают аналогично Т-лимфоцитам, находящимся в условиях лимфопении. Механизмы, лежащие в основе этого феномена, пока неясны, но могут быть связаны с конкуренцией Т-лимфоцитов за эндогенные комплексы пептид-МНС в лимфоидной ткани. В любом случае, очевидно, что полученные результаты свидетельствуют о наличии тесной взаимосвязи между особенностями структуры TCR и поверхностным активационным фенотипом отдельных Т-клеток. Такая перестройка репертуара у трансгенов по β -цепям TCR оказывается фатальной для успешного распознавания аллогенных молекул гистосовместимости — у обеих полученных нами трансгенных линий животных присутствовали дефекты в распознавании молекул гистосовместимости аллогенных опухолей. По всей видимости, причиной этого служит аллельное исключение, правилам которого подчинена экспрессия β -цепей TCR. У полученных нами мышей линии 1D1bFM на генетической основе линии R101 можно наблюдать все 3 фазы взаимодействия опухоли с иммунной системой хозяина — элиминацию, равновесие и ускользание, тогда как у мышей дикого типа можно

наблюдать только фазу элиминации. Наши результаты свидетельствуют о том, что принципиальных различий между трансплантационным и противоопухолевым ответами не существует. По всей видимости, мы получили новую перспективную биологическую модель, пригодную для изучения биологии противоопухолевого иммунного ответа и способов его модуляции [86].

Напротив, экспрессия α -цепей не подвержена аллельному исключению, и один Т-лимфоцит способен экспрессировать два TCR, если реаранжировка α -локусов на обеих хромосомах будет продуктивной. Тем не менее и в этом случае одна из α -цепей может проигрывать в конкуренции за объединение с β -цепью и не обнаруживаться на поверхности Т-лимфоцита. Отсутствие трансгенной α -цепи клеток памяти на поверхности полученных нами трансгенных животных может быть отнесено именно к этому случаю. Однако в присутствии специфического антигена — молекулы H-2K^b — Т-лимфоциты с трансгенной цепью появляются в перитонеальной полости мышей, отвечающих на экспрессирующие ее клетки лимфомы. Более того, значительная часть таких Т-лимфоцитов, по всей видимости, ассоциирована с эпителиями и не рециркулирует. Ускоренное отторжение клеток лимфомы EL4 у таких животных свидетельствует о том, что трансгенная α -цепь способна изменить направление дифференцировки Т-лимфоцита и привести к формированию у него свойств, характерных для клеток памяти [87]. Это подтверждают наши данные о профиле поверхностных маркеров Т-клеток, мигрирующих в перитонеальную полость в ответ на введение клеток лимфомы EL4 (CD8^{lo}CD103⁺CD3^{int}CD69^{hi}), что совпадает с характеристиками открытой недавно субпопуляции резидентных клеток памяти [88]. Полученные нами результаты свидетельствуют также о возможности существования клеток памяти до контакта организма с антигеном, так как достаточным условием появления резидентных клеток памяти, способных немедленно вступить в борьбу с условным патогеном, является трансгенная α -цепь TCR. Если это действительно так, то образование клеток памяти *in vivo* может быть объяснено эффектами клональной конкуренции и постепенного вытеснения клетками памяти других типов Т-лимфоцитов из иммунного ответа. В этом случае теоретическая основа, описывающая биологию клеток памяти и эффекты вакцинации, потребует существенного пересмотра. Не менее важным фактом считается то, что резидентные клетки памяти являются перспективным кандидатом на выполнение функции иммунологического надзора. В пользу этого говорит их тканевая локализация и способность немедленно вступить в борьбу с введенными животному опухолевыми клетками. Парадигма, господствующая сейчас в иммунологии, предполагает разделение функций врожденного (немедленного, но неспецифического) и адаптивного (специфического, но требующего времени для его раз-

вития) иммунитетов. В обнаруженной нами субпопуляции Т-лимфоцитов мы видим пример успешного объединения их качеств и способности к выполнению функций специфического иммунитета врожденно.

Отторжение аллогенных опухолей, отличающихся от организма реципиента молекулами МНС класса I, может служить моделью развития иммунного ответа на внутриклеточные микроорганизмы и вирусы. Всестороннее углубленное исследование полученной модели может открыть перспективы использования этого подхода в ветеринарии, а также, возможно, и генной терапии инфекционных заболеваний у человека. Не исключено, что подход окажется перспективным для создания врожденной устойчивости к фатальным быстроразвивающимся вирусным инфекциям у человека (например, вирусных геморрагических лихорадок). Помимо экспрессии трансгенной α -цепи такие искусственно созданные клетки памяти будут иметь нормальные разнообразные TCR и широкий спектр специфичностей, неотличимый от животных дикого типа. При этом ожидается, что трансгенная α -цепь будет создавать усиленный пул клеток, обладающих свойствами клеток памяти. Таким образом, не исключено, что трансгенез индивидуальных α -цепей приведет к формированию иммунологической защиты организма не только против антигена, к которому был специфичен исходный TCR, но и против широкого спектра посторонних патогенов.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что:

- функциональный потенциал клеток памяти может быть сформирован и реализован без первичной иммунизации реципиента;
- наличие в Т-лимфоците TCR с соответствующей структурой является достаточным условием возникновения потенциала клеток памяти;
- трансгенез α -цепей TCR может быть использован для создания врожденного специфического иммунитета к антигенам опухолевых клеток;
- вклад α - и β -цепей TCR в распознавание МНС/пептидных комплексов может быть независимым;
- особенности феноменологии специфических противоопухолевых иммунных ответов могут быть воспроизведены в ответах на трансплантационные антигены опухолевых клеток путем ограничения репертуара Т-лимфоцитов;
- Т-лимфоциты, обладающие свойствами резидентных клеток памяти, могут быть центральным клеточным элементом, осуществляющим иммунологический надзор;
- разница между трансплантационным и противоопухолевым иммунитетом не является абсолютной — феноменологические проявления и того и другого укладываются в континуум, определяемый разнообразием репертуара Т-лимфоцитов отвечающего организма.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Klein J. Natural history of the major histocompatibility complex. A Wiley-Interscience Publication. New York: John Wiley & Sons, 1986.
2. Jensen C.O. Experimentelle untersuchungen ber krebs bei mausen. Zentralbl Bakteriол Parasitol Infect 1903;34:28–34.
3. Loeb L. Tumor growth and tissue growth. Proc Amer Phil Soc 1908;47:1–12.
4. Tyzzer E.E. The study of inheritance in mice with reference to their susceptibility to transplanted tumors. J Med Res 1909;21:519–73.
5. Little C.C., Johnson B.W. The inheritance of susceptibility to implants of splenic tissue in mice. I. Japanese waltzing mice, albinos, and their F1 generation hybrids. Proc Soc Exp Biol Med 1922;19:163–7.
6. Gorer P.A. The genetic and antigenic basis of tumor transplantation. J Pathol Bacteriol 1937;44:691–7.
7. Gorer P.A., Mikulska Z.B. The antibody response to tumor inoculation. Improved methods of antibody detection. Cancer Res 1954;14:651–5.
8. Snell G.D. Methods for the study of histocompatibility antigens. J Genet 1948;49:87–108.
9. Snell G.D., Dosse J., Nathenson S. Histocompatibility. Academic Press. New York, 1976.
10. Klein J. List of congenic lines of mice. I. Lines with differences at alloantigen loci. Transplantation 1973;15:137–53.
11. Reif A.E., Allen J.M. The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues. J Exp Med 1964;120:413–33.
12. Cantor H., Boyse E.A. Functional subclasses of T-lymphocytes bearing different Ly antigens. J Exp Med 1975;141:1376–89.
13. Murphy K.P. Janeway's immunobiology. New York: Garland Science, 2012.
14. Brondz B.D. Interaction of immune lymphocytes with normal and neoplastic tissue cells. Folia Biol 1964;10:164–76.
15. Brondz B.D. Complex specificity of immune lymphocytes in allogeneic cell cultures. Folia Biol 1968;14:115–31.
16. Peck A.B., Wigzell H., Janeway C. Jr, Andersson L.C. Environmental and genetic control of T-cell activation *in vitro*: a study using isolated alloantigen-activated T-cell clones. Immunol Rev 1977;35:146–80.
17. Brondz B.D., Egorova S.G., Kotomina I.F. Enrichment of effector T lymphocytes specific to H-2 antigens by elution from allogeneic target cells and characterization of the eluted lymphocyte population. Eur J Immunol 1975;5(11):773–41.
18. Melief C.J., de Waal L.P., van der Meulen M.Y. et al. Fine specificity of alloimmune cytotoxic T lymphocytes directed against H-2K. A study with Kb mutants. J Exp Med 1980;151(5):993–1013.
19. Брондз Б.Д., Пименов А.А., Бландова З.К., Ворнакова Г.Н. Изучение природы перекрестной реактивности рецепторов цитотоксических Т-лимфоцитов, иммунных к антигенам комплекса H-2 с помощью их фракционирования на монослоях клеток-мишеней. Молекулярная биология 1982;(16):481–92. [Brondz B.D., Pimenov A.A., Blandova Z.K., Vornakova G.N. Studies of the nature of the cross-reactivity of receptors of cytotoxic T-lymphocytes,

- immune to antigens of H-2 complex by means of its fractioning at monolayers of target cells. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular biology* 1982;(16):481–92. (In Russ.).
20. Брондз Б.Д. Т-лимфоциты и их рецепторы в иммунологическом распознавании. М.: Наука, 1987. С. 353. [Bronz B.D. T-lymphocytes and its receptors in the recognition. Moscow: Nauka, 1987. P. 353 (In Russ.).]
21. Gross L. Intradermal immunization of C3H mice against a sarcoma that originated in an animal of the same line. *Cancer Res* 1943;3:326–33.
22. Prehn R.T., Main J.M. Immunity to methylcholantrene-induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 1957;18:769–78.
23. Klein G., Sogren H.O., Klein E., Hellstrom K.E. Demonstration of resistance against methylcholantrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res* 1960;20:1561–72.
24. Kripke M.L. Antigenicity of murine skin tumors induced by ultraviolet light. *J Natl Cancer Inst* 1974;53:1333–6.
25. Vaage J. Nonvirus-associated antigens in virus-induced mammary tumors. *Cancer Res* 1968;28:2477–83.
26. Thorn R.M. Specific inhibition of cytotoxic memory cells produced against UV-induced tumors in UV-irradiated mice. *J Immunol* 1978;121(5):1920–6.
27. Denfeld R.W., Tesmann J.P., Dittmar H. et al. Further characterization of UVB radiation effects on Langerhans cells: altered expression of the costimulatory molecules B7–1 and B7–2. *Photochem Photobiol* 1998;67(5):554–60.
28. Roberts L.K., Daynes R.A. Modification of immunogenic properties of chemically induced tumors arising in hosts treated concomitantly with ultraviolet light. *J Immunol* 1980;125(1):438–47.
29. Verel I., Heider K.H., Siegmund M. et al. Tumor targeting properties of monoclonal antibodies with different affinity for target antigen CD44V6 in nude mice bearing head-and-neck cancer xenografts. *Int J Cancer* 2002;99(3):396–402.
30. Legrand N., Freitas A.A. CD8⁺ T lymphocytes in double alpha beta TCR transgenic mice. I. TCR expression and thymus selection in the absence or in the presence of self-antigen. *J Immunol* 2001;167(11):6150–7.
31. Ma X., Robin C., Ottersbach K., Dzierzak E. The Ly-6A(Sca-1) GFP Transgene is expressed in all adult mouse hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 2002;20(6):514–21.
32. Johnsen A.K., France J., Nagy N. et al. Systemic deficits in transporter for antigen presentation (TAP) – 1 or proteasome subunit LMP2 have little or no effect on tumor incidence. *Int J Cancer* 2001;91(3):366–72.
33. Matechak E.O., Killeen N., Hedrick S.M., Fowlkes B.J. MHC class-II-specific T-cells can develop in the CD8 lineage when CD4 is absent. *Immunity* 1996;4(4):337–47.
34. Quinonez R., Sutton R.E. Lentiviral vectors for gene delivery into cells. *DNA Cell Biol* 2002;21(12):937–51.
35. Sumimoto H., Tsuji T., Miyoshi H. et al. Rapid and efficient generation of lentivirally gene-modified dendritic cells from DC progenitors with bone marrow stromal cells. *J Immunol Methods* 2002;271(1–2):153–65.
36. Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H. et al. Cancer immunoediting: from immuno-surveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002;3(11):991–8.
37. Dunn G.P., Old L.J., Schreiber R.D. The three Es of cancer immunoediting. *Ann Rev Immunol* 2004;22:329–60.
38. Lin R.L., Zhao L.J. Mechanistic basis and clinical relevance of the role of transforming growth factor- β in cancer. *Cancer Biol Med* 2015;12(4):385–93.
39. Munn D.H., Mellor A.L. IDO in the tumor microenvironment: inflammation, counter-regulation, and tolerance. *Trends Immunol* 2016;37(3):193–207.
40. Silaeva Y.Y., Grinenko T.S., Vagida M.S. et al. Immune selection of tumor cells in TCR β -chain transgenic mice. *J Immunotoxicol* 2014;11(4):393–9.
41. Zvezdova E.S., Grinenko T.S., Pobezinskaya E.L. et al. Coreceptor function of CD4 in response to the MHC class I Molecule. *Mol Biol(Mosk)* 2008;42(4):662–72.
42. Kazansky D.B. MHC-restriction and allogeneic immune responses. *J Immunotoxicol* 2008;5(4):369–84.
43. Janeway C.A. Jr, Bottomly K. Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* 1994;76(2):275–85.
44. Grakoui A., Bromley S.K., Sumen C. et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T-cell activation. *Science* 1999;285(5425):221–7.
45. Holdorf A.D., Lee K.H., Burack W.R. et al. Regulation of Lck activity by CD4 and CD28 in the immunological synapse. *Nat Immunol* 2002;3(3):259–64.
46. Goldstein J.S., Chen T., Gubina E. et al. ICAM-1 enhances MHC-peptide activation of CD8⁺ T-cells without an organized immunological synapse. *Eur J Immunol* 2000;30(11):3266–70.
47. O’Keefe J.P., Blaine K., Alegre M.L., Gajewski T.F. Formation of a central supramolecular activation cluster is not required for activation of naive CD8⁺ T-cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(25):9351–6.
48. Ding L., Shevach E.M. Activation of CD4⁺ T-cells by delivery of the B7 costimulatory signal on bystander antigen-presenting cells (trans-costimulation). *Eur J Immunol* 1994;24(4):859–66.
49. Smythe J.A., Fink P.D., Logan G.J. et al. Human fibroblasts transduced with CD80 or CD86 efficiently trans-costimulate CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in HLA-restricted reactions: implications for immune augmentation cancer therapy and autoimmunity. *J Immunol* 1999;163(6):3239–49.
50. Kundig T.M., Bachmann M.F., DiPaolo C. et al. Fibroblasts as efficient antigen-presenting cells in lymphoid organs. *Science* 1995;268(5215):1343–7.
51. Ochsenbein A.F., Sierro S., Odermatt B. et al. Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature* 2001;411(6841):1058–64.
52. Побезинский Л.А., Побезинская Е.Л., Зvezdova E.S. и др. Накопление нейтрофилов в селезенке мышей, иммунизированных клетками аллогенных опухолей. Доклады академии наук 2005;402(3):421–6. [Pobezinskiy L.A., Pobezinskaya E.L., Zvezdova E.S. et al. Neutrophils’ accumulation in the spleen of mice, immunized with allogeneic tumors’ cells. Doklady akademii nauk = Reports of the Academy of Sciences 2005;402(3):421–6. (In Russ.).]
53. Марюхнич Е.В., Зvezdova E.S., Анфалова Т.В. и др. Функциональная роль нейтрофилоподобных клеток селезенки в иммунном ответе на клетки аллогенных опухолей. Доклады академии наук 2007;414(1):126–9. [Maryukhnich E.V., Zvezdova E.S., Anfalova T.V. et al. Functional role of neutrophil-like cells of the spleen in the immune response to cells of allogeneic tumors. Doklady akademii nauk = Reports of the Academy of Sciences 2007;414(1):126–9. (In Russ.).]
54. Iking-Konert C., Cseko C., Wagner C. et al. Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils: acquisition of CD83 and other functional characteristics of dendritic cells. *J Mol Med* 2001;79(8):464–74.
55. Tanaka E., Sendo F. Abrogation of tumor-inhibitory MRC-OX8⁺(CD8⁺) effector T-cell generation in rats by selective depletion of neutrophils in vivo using a monoclonal antibody. *Int J Cancer* 1993;54(1):131–6.
56. Buonocore S., Surquin M., Le Moine A., et al. Amplification of T-cell responses by neutrophils: relevance to allograft immunity. *Immunol Lett* 2004;94(3):163–6.
57. Wakim L.M., Bevan M.J. Cross-dressed dendritic cells drive memory CD8⁺ T-cell activation after viral infection. *Nature* 2011;471(7340):629–32.
58. Li L., Kim S., Herndon J.M. et al. Cross-dressed CD8 α ⁺/CD103⁺ dendritic cells prime CD8⁺ T-cells following vaccination. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2012;109(31):12716–21.
59. Zerrahn J., Held W., Raulet D.H. The MHC reactivity of the T-cell repertoire prior to positive and negative selection. *Cell* 1997;88(5):627–36.
60. Bronz B.D., Kazansky D.B., Chernysheva A.D., Ivanov V.S. Peptides of a major histocompatibility complex class I (Kb) molecule cause prolongation of skin graft survival and induce specific down-regulatory T-cells demonstrable in the mixed lymphocyte reaction. *Immunology* 1995;86(2):219–23.

61. Sun R., Shepherd S.E., Geier S.S. et al. Evidence that the antigen receptors of cytotoxic T lymphocytes interact with a common recognition pattern on the H-2K^b molecule. *Immunity* 1995;3(5):573–82.
62. Anfalova T.V., Galaktionov V.G., Brondz B.D. The functional transformation of cytotoxic lymphocytes into T-suppressors under the influence of two mediators. *Immunol Lett* 1997;59(2):121–6.
63. Constantine K.L., Mapelli C., Meyers C.A. et al. Micelle-bound conformational preferences of a peptide derived from a murine major histocompatibility complex class I molecule. *J Biol Chem* 1993;268(30):22830–7.
64. Nathenson S.G., Geliebter J., Pfaffenbach G.M., Zeff R.A. Murine major histocompatibility complex class-I mutants: molecular analysis and structure-function implications. *Annu Rev Immunol* 1986;4:471–502.
65. Kazanskii D.B., Chernysheva A.D., Sernova N.V. et al. The nature of epitopes, recognized by T-lymphocytes in the allogeneic immune response. *Mol Biol (Mosk)* 1998;32(4):692–702.
66. Davis M.M., Boniface J.J., Reich Z. et al. Ligand recognition by beta T-cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998;16:523–44.
67. Van Kaer L., Ashton-Rickardt P.G., Pleogh H.L., Tonegawa S. TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD8⁺ T-cells. *Cell* 1993;71(7):1205–14.
68. Kuhns S.T., Tallquist M.D., Johnson A.J. et al. T-cell receptor interaction with class I heavy-chain influence T-cell selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;97(2):756–60.
69. Willcox B.E., Gao G.F., Wyer J.R. et al. TCR binding to peptide-MHC stabilizes a flexible recognition interface. *Immunity* 1999;10(3):357–65.
70. Казанский Д.Б., Силаева Ю.Ю., Анфалова Т.В. и др. Использование мультиплетных пептидов для стимуляции специфического клеточного иммунитета. *Аллергия, астма и клиническая иммунология* 2001;(1):48–51. [Kazanskii D.B., Silaeva Yu.Yu., Anfalova T.V. et al. Use of multiplet peptides for the stimulation of the specific cell immunity. *Allergiya, astma i klinicheskaya immunologiya* = *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* 2001;(1):48–51. (In Russ.)].
71. Казанский Д.Б., Побезинский Л.А., Терещенко Т.С. Мотивы в первичной структуре молекул МНС класса I и их использование для создания синтетических лигандов Т-клеточных рецепторов. *Вестник РАМН* 2004;(12):25–32. [Kazanskii D.B., Pobezinskiy L.A., Tereshchenko T.S. Motives in the initial structure of MHC class I molecules and its use for the creation of synthetic ligands of T-cell receptors. *Vestnik RAMN* = *RAMS Herald* 2004;(12):25–32. (In Russ.)].
72. Побезинский Л.А., Побезинская Е.Л., Терещенко Т.С. и др. Периферический пул Т-клеток CD8⁺ содержит лимфоциты с антигенспецифическими рецепторами, распознающими сингенные молекулы МНС класса II. *Онтогенез* 2004;35(3):183–9. [Pobezinskiy L.A., Pobezinskaya E.L., Tereshchenko T.S. et al. The peripheral pool of CD8⁺ T-cells contains lymphocytes with antigen specific receptors, recognizing syngeneic molecules of MHC class II. *Ontogenez* = *Ontogenesis* 2004;35(3):183–9. (In Russ.)].
73. Казанский Д.Б. Внутритимусная селекция и иммунотерапия рака. *Русский журнал СПИД, рак и общественное здоровье* 2007;11(1):25–32. [Kazanskii D.B. Intrathymic selection and immune therapy of cancer. *Russkiy zhurnal SPID, rak i obshchestvennoe zdorov'e* = *Russian Journal for AIDS, Cancer and Public Health* 2007;11(1):25–32. (In Russ.)].
74. Kazansky D.B. Intrathymic selection: new insight into tumor immunology. *Adv Exp Med Biol* 2007;601:133–44.
75. Derbinski J., Schulte A., Kyewski B., Klein L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nature Immunol* 2001;2(11):1032–9.
76. Anderson M.S., Venzani E.S., Klein L. et al. Protection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 2002;289(5597):1395–401.
77. Liston A., Lesage S., Wilson J. et al. Aire regulates negative selection of organ-specific T-cells. *Nat Immunol* 2003;4(4):350–4.
78. Gao L., Bellantuono I., Elsasser A. et al. Selective elimination of leukemic CD34(+) progenitor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for WT1. *Blood* 2000;95(7):2198–203.
79. Rosenberg S.A., Restifo N.P. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* 2015;348(6230):62–8.
80. Klebanoff C.A., Rosenberg S.A., Restifo N.P. Prospects for gene-engineered T-cell immunotherapy for solid cancers. *Nat Med* 2016;22(1):26–36.
81. Казанский Д.Б., Петришев В.Н., Штиль А.А. и др. Использование теплового шока антигенпрезентирующих клеток для функционального тестирования аллоспецифических Т-клеток памяти. *Биоорганическая химия* 1999;(25):117–28. [Kazanskii D.B., Petrishchev V.N., Shtil' A.A. et al. Use of the thermal shock of antigen presenting cells for the functional testing of allospecific memory T-cells. *Bioorganicheskaya khimiya* = *Bioorganic Chemistry* 1999;(25):117–28. (In Russ.)].
82. Гриненко Т.С., Побезинская Е.Л., Побезинский Л.А. и др. Подавление клетками памяти CD8⁺ первичного аллогенного ответа. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2005;(140):556–61. [Grinenko T.S., Pobezinskaya E.L., Pobezinskiy L.A. et al. Suppression of the initial allogeneic response by CD8⁺ memory cells. *Byullyuten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* = *Bulletin of the Experimental Biology and Medicine* 2005;(140):556–61. (In Russ.)].
83. Побезинская Е.Л., Побезинский Л.А., Силаева Ю.Ю. и др. Кросс-реактивность Т-клеточного рецептора клона клеток памяти CD8⁺, полученного в ответе на иммунизацию клетками аллогенной опухоли. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2004;(137):563–8. [Pobezinskaya E.L., Pobezinskiy L.A., Silaeva Yu.Yu. et al. Cross-reactivity of the T-cell receptor of the clone of CD8⁺ memory cells, received in the response of for the immunization by allogeneic tumor cells. *Byullyuten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* = *Bulletin of the Experimental Biology and Medicine* 2004;(137):563–8. (In Russ.)].
84. Звездова Е.С., Силаева Ю.Ю., Вагида М.С. и др. Создание трансгенных животных, экспрессирующих α- и β-цепи аутореактивного TCR. *Молекулярная биология* 2010;(44):311–22. [Zvezdova E.S., Silaeva Yu.Yu., Vagida M.S. et al. Creation of transgenic animals, expressing α- and β-chains of the autoreactive TCR. *Molekulyarnaya biologiya* = *Molecular Biology* 2010;(44):311–22. (In Russ.)].
85. Силаева Ю.Ю., Калинина А.А., Вагида М.С. и др. Сокращение пула Т-лимфоцитов с поверхностным фенотипом эффекторов и клеток памяти под воздействием экспрессии трансгена β-цепи Т-клеточного рецептора. *Биохимия* 2013;78(5):714–26. [Silaeva Yu.Yu., Kalinina A.A., Vagida M.S. et al. Reduction of the pool of T-lymphocytes with the surface phenotype of effectors and memory cells, influenced by the expression of transgene of the β-chain of the T-cell receptor. *Biokhimiya* = *Biochemistry* 2013;78(5):714–26. (In Russ.)].
86. Silaeva Y.Y., Grinenko T.S., Vagida M.S. et al. Immune selection of tumor cells in TCR β-chain transgenic mice. *J Immunotoxicol* 2014;11(4):393–9.
87. Казанский Д.Б. Трансгенные технологии создания иммунологической защиты организма. Сборник докладов семинара Фонда перспективных исследований «Проблемные вопросы иммунологии» 03 октября 2014 г., М.: Б-принт, 2015. С. 17–25. [Kazanskii D.B. Transgene technologies of the creation of the immunologic protection of the organism. Volume of reports of the workshop of the Prospective Research Foundation "Problematic Immunology Issues" October 03 2014, Moscow: B-print, 2015. Pp. 17–25. (In Russ.)].
88. Mackay L.K., Rahimpour A., Ma J.Z. et al. The developmental pathway for CD103(+) CD8⁺ tissue-resident memory T-cells of skin. *Nat Immunol* 2013;14(12):1294–301.