Федеральное государственное автономное образовательное учреждение   
высшего образования   
«Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»   
Министерства здравоохранения Российской Федерации   
(ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России)

Медико-биологический факультет  
Кафедра медицинской кибернетики и информатики им. С.А. Гаспаряна

Дипломная работа  
по специальности 30.05.03 «Медицинская кибернетика»

Смирнов Антон Сергеевич

Тема: Предсказание антигенов по последовательностям белка

**Работа выполнена:**на кафедре биоинформатики МБФ  
ФГАОУ ВО РНИМУ   
им. Н.И. Пирогова

**Научный руководитель:**Лагунин А.А., д.б.н., профессор РАН,  
зав. кафедрой биоинформатики МБФ

Москва, 2023 г.

Оглавление

[Список сокращений 4](#_Toc135746382)

[Введение 6](#_Toc135746383)

[1. Литературный обзор 10](#_Toc135746384)

[1.1. Главный комплекс гистосовместимости 10](#_Toc135746385)

[1.2. Процессинг антигенов для MHC I 15](#_Toc135746386)

[1.3. Программы и сервисы для предсказания Т-клеточных эпитопов 22](#_Toc135746387)

[2. Материалы и методы 25](#_Toc135746388)

[2.1. Базы данных 25](#_Toc135746389)

[2.2. Методы моделирования 25](#_Toc135746390)

[3.1. Концептуальная схема модели 26](#_Toc135746391)

[3.2. Модель работы протеасомы 26](#_Toc135746392)

[3.3. Модель работы ТАР-транспортера 26](#_Toc135746393)

[3.4. Модель взаимодействия эпитоп-МНС 26](#_Toc135746394)

[3.5. Объединенная модель 26](#_Toc135746395)

[3.6. Веб-сервис 26](#_Toc135746396)

[4. Выводы 26](#_Toc135746397)

[15. Обсуждение 26](#_Toc135746398)

[Приложение 26](#_Toc135746399)

[Список литературы 26](#_Toc135746400)

**Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки.Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки.Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки.Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки.Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки.Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки.Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки.Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки.Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки.Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки.Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки.Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки.Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки.Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки.Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки.Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки.Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки.**

# Список сокращений

* МНС - Major histocompatibility complex - главный комплекс гистосовместимости
* ТКР - Т-клеточный рецептор
* CDR - complementarity determining region - регион, определяющий комплементарность
* HLA - Human Leukocytes Antigen - человеческий лейкоцитарный антиген, название человеческих генов МНС.
* ЭПР - эндоплазматический ретикулюм
* АПК - антигенпрезентирующая клетка
* ЦПМ - цитоплазматическая мембрана
* UPS - ubiquitin-proteasomal system - убиквитин-протеосомальная система
* DRiP - defective ribosomal products - дефективные рибосомальные продукты
* мРНК - матричная рибонуклеиновая кислота
* CD - cluster of differntation - кластер дифференцировки
* PCPS - proteosome-catalyzed peptide splicing - пептидный сплайсинг, катализируемый протеосомой
* PLC – peptide-loading complex – пептид-загружающий комплекс
* ERAAP - endoplasmatic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing - аминопептидазы, ассоциированные с антигенным процессингом
* БД – база данных
* ANN – artificial neural network – искусственная нейронная сеть
* SVM – support vector machine – метод опорных векторов

# Введение

Каждый живой организм на нашей планете стремится передать свой генетический материал потомкам. Для осуществления этой цели у каждого вида организмов должны быть механизмы защиты от конкурентов. Эти механизмы эволюционируют вместе с организмами. Примерно 500 миллионов лет назад, у хордовых возник ароморфоз: адаптивная иммунная система [1]. Иммунная система - специализированная система органов и тканей, обеспечивающих иммунитет [2]. Иммунитет - способ защиты организма от живых тел и веществ, несущих признаки чужеродной информации [2]. Вещества, которые несут такие признаки называются антигенами.

Адаптивная иммунная система названа так потому, что спектр антигенов, против которых защищает адаптивная иммунная система, не наследуется, а формируется в процессе жизни организма и определяется антигенами, встреченными организмом на протяжении жизни. То есть иммунная система организма адаптируется к своему окружению. Т- и В-лимфоциты, основные составляющие адаптивной иммунной системы, распознают участок молекулы антигена, которые называется эпитоп (антигенная детерминанта) с помощью специализированных молекул-рецепторов на своих цитоплазматических мембранах.

Существуют разница в том, как и с помощью каких молекул распознается антиген Т- и В-лимфоцитами. B-лимфоциты способны распознавать нативный антиген с помощью своего В-клеточного рецептора. Т-лимфоциты способны распознавать только антигены, презентированные на главном комплексе гистосовместимости (МНС), с помощью своих Т-клеточных рецепторов (ТКР). Такое ограничение называют в иммунологии МНС-рестрикцией. МНС представляет своеобразную систему “свой-чужой”, в состав которой входят не только молекулы, отвечающие за процессинг и презентацию антигенов, но и помогающие в реализации иммунного ответа. Для развития эффективного иммунного ответа, как правило, необходимо, чтобы Т-хелперы или Т-киллеры с помощью своих ТКР распознали антиген и передали сигнал о наличии чужеродного антигена. В данной работе будет рассмотрено, как организм подготавливает антигены для распознавания Т-лимфоцитами и как этот процесс можно предсказывать, и будет предложен новый подход к предсказанию результата этого процесса.

Математическая оценка возможного количества -цепей ТКР равно [3]. Количество возможных белков длины n из 20 основных протеиногенных аминокислот равняется и из этого разнообразия возможно появление ещё большего числа пептидов, которые могут быть эпитопами. Невозможно и нецелесообразно проверять все сочетания этого разнообразия на предмет наличия или отсутствия взаимодействия экспериментально. Однако за 50 лет активной работы был накоплен огромный массив данных о процессах подготовки антигенов, их презентации и распознавания целевыми молекулами, в нашем случае ТКР. Эти данные аккумулированы в различные базы данных и базы знаний, которые позволяют учёным строить математические модели для предсказания результатов разных этапов процессинга антигенов, наличия или отсутствия иммуногенности и аллергенности эпитопов.

Над созданием математических моделей прогноза эпитопов работает большое количество ученых уже больше двадцати лет: первые программы начали появляться в начале нулевых годов этого века. Данные модели крайне полезны в вакцинологии и онкологии. В вакцинологии они используются для проектирования вакцин от различных заболеваний, в частности от лихорадки Эбола и COVID-19 [4, 5]. Методология разработки вакцин, когда сначала ведут компьютерный поиск антигенов, предсказывают их иммунногенность, а потом проверяют экспериментально, называется обратной вакцинологией (reverse vaccinology). В онкологии они используются для предсказания неоантигенов. Неоантигены - новые антигены, которых нет в здоровых клетках и которые появились в раковых в процессе накопления новых генетических вариантов в сравнении с исходными, герминальными клетками. Точное предсказание антигенов и неоантигенов открывает новые возможности в персонализированной иммунотерапии опухолей [6]. С течением времени качество моделей заметно росло и современные модели показывают хорошие результаты, но они ограничены небольшой выборкой людей, к которым они применимы. Существующие аналоги, как правило, позволяют предсказывать результат одного из этапов процессинга и работают на алгоритмах, требующих эмбеддинга, то есть представления последовательности белка в виде числовых векторов []. Самые современные программы работают на нейронных сетях различных архитектур []. Их главная проблема в том, что крайне трудно определить, почему программа пришла к такому выводу.

**Цель** работы – создать подход на основе моделей связи “структура-активность” процессинга антигенов для МНС первого класса у человека (Homo sapiens) на основе структурных формул белков и их фрагментов. **Новизна** настоящей работы заключается в использовании представления белков в виде совокупности молекулярных фрагментов, а не числовых векторов.

Для выполнения цели данной работы необходимо решить следующие **задачи**:

1. Подготовить выборки для обучения и валидации моделей прогноза сайтов расщепления белков протеасомой, активности белковых фрагментов по отношению к ТАР транспортеру, связывания белковых фрагментов с конкретными аллелями MHC I;
2. Используя подготовленные выборки построить модели связи структура-активность для прогноза сайтов расщепления белков протеасомой, активности белковых фрагментов по отношению к ТАР транспортеру, связывания белковых фрагментов с конкретными аллелями MHC I и оценить их качество;
3. Объединить построенные модели в единую систему для прогноза эпитопов, презентируемых на МНС I
4. Разработать веб-сервис для свободного доступа к разработанной системе. Целевая аудитория разработанного сервиса – ученые-иммунологи, разработчики вакцин и препараты для иммунотерапии.

# Глава 1. Литературный обзор

## 1.1. Главный комплекс гистосовместимости

Главный комплекс гистосовместимости - комплекс тесно связанных генетических локусов, расположенных на коротком плече 6-ой хромосомы (6р), а также их белковых продуктов, отвечающих за развитие иммунного ответа и синтез трансплантационных антигенов. Этот комплекс содержит больше 200 генов [7]. Эти гены отличаются высокой полиморфностью, кодоминантностью [8]. В базе данных IPD-IMGT/HLA на 27 февраля 2023 года содержится информация о 35820 человеческих аллелях HLA [9]. В популяциях по генам МНС наблюдается большой процент гетерозигот [10]. Сцепленные группы генов МНС называются гаплотипами. Функции генов МНС заключается в следующем (жирным выделены функции, обозначающие цель существования такой системы):

* **Обеспечение процессинга и презентации антигенных пептидов - индукторов и мишеней иммунного ответа;**
* Обеспечение взаимодействия клеток;
* Распознавание собственных, измененных собственных и чужеродных клеток; запуск и реализация иммунного ответа против носителей генетической информации;
* Поддержание иммунологической толерантности (в том числе во время беременности);
* Участие в селекции Т-лимфоцитов;
* **Создание генетического разнообразия и обеспечение выживаемости вида.**

Все гены локуса МНС поделены на три класса: первый, второй и третий. На [рисунке 1](#fig-hlamap) представлена генетическая карта генов МНС [11].

|  |
| --- |
| **Рисунок 1.** Генетическая карта генов HLA [11]. |

К классическим генам относят три пары генов, кодирующих - и - цепи МНС второго класса: HLA-DR, HLA-DP и HLA-DQ - и три гена кодирующие -цепь МНС первого класса: HLA-A, HLA-B, HLA-C. Зрелые продукты этих генов располагаются на цитоплазматической мембране и непосредственно участвуют в презентации антигенов. У многих людей кластер HLA-DR содержит дополнительный ген -цепи, который может соединяться с DR-цепью [12]. Помимо этого существует большое количество генов “неклассических” МНС, которые по структуре напоминают гены МНС, но их продукты не презентируют пептиды обычным Т-лимфоцитам, но выполняют ряд других функций в клетке [12]. Например, MIC A, MIC B ответственны за обеспечение контакта с NK-клетками, Т-лимфоцитами, HLA-DM и HLA-DO участвуют в процессинге антигенов для HLA второго класса [13, 14], HLA-G подавляют способность цитотоксических лимфоцитов секретировать IFN- и стимулируют секрецию TGF-, что играет важную роль в обеспечении толерантности матери к антигенам плода [15]. В локусе генов МНС содержатся гены, чьи продукты принимают участие в процессинге антигенов для MHC первого класса (TAPBP, TAP1, TAP2, LMP1, LMP2). Выделяют особую группу генов МНС третьего класса, продукты которых не участвуют в презентации антигенов, но играют важную роль в обеспечении иммунитета [16]. Это компоненты комплемента (С4А, С4В, С2), белки теплового шока (HSPA1A, HSPA1B), белки семейства фактора некроза опухоли (LTB, LTA, TNF-).

Рассмотрим строение главных комплексов гистосовместимости первого и второго класса. МНС первого класса - гетеродимер, состоящий из большой -цепи, которой он заякорен в цитоплазматической мембране, и -микроглобулина. -цепь имеет 3 домена. - и -домены формируют особый сайт - пептидсвязывающую бороздку, которую иногда в литературе называют в честь учёной, впервые описавшей структуру МНС I и МНС II, по фамилии Бьоркман [17]. Ген -микроглобулина не относится к генам МНС и расположен на 15 хромосоме. -цепь связана с -цепью нековалентными взаимодействиями. Этот комплекс нестабилен, пока в пептидсвязывающей бороздке нет пептида. В эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) он стабилизируется шапероном кальнексином. Комплексы, которые презентируют слабоаффинные эпитопы, быстро диссоциируют на цитоплазматическую мембрану (ЦПМ), и цепи возвращаются обратно в ЭПР благодаря реакциям белкового разрушения, связанным с ЭПР (endoplasmatic reticulum-associated protein degradation, ERAD) [18]. Геометрия бороздки Бьоркман у МНС первого класса “закрытая”, поэтому в неё помещаются пептиды ограниченного размера, длиной 8-10 аминокислот [19]. МНС второго класса представляет из себя гетеродимер. Обе цепи, и , имеют по два домена и связаны между собой нековалентными связями. Пептидсвязывающую бороздку формируют и домены [20], и она, в отличии от МНС первого класса, “открытая”, поэтому в неё помещаются более длинные пептиды. Обычно длина пептидов, презентируемых на МНС второго класса, колеблется от 12 до 25 аминокислот [21]. Как и МНС первого класса, МНС второго класса нестабилен без эпитопа.

Структуру пептидсвязывающей бороздки у МНС первого класса можно разделить на 6 карманов, причем крайние карманы А и F отличаются консервативностью [22]. Поэтому для связывания с МНС первого класса важную роль играют N-концевые и C-концевые остатки, которые связываются с крайними карманами. От силы, характера нековалентных взаимодействий этих карманов с некоторыми остатками пептида, которые называют якорными, зависит спектр связываемых эпитопов этим МНС. В зависимости от аллеля МНС может быть дополнительные первичные якорные остатки. Между ними могут находиться аминокислотные остатки с сильно различающимися физико-химическим свойствами. У МНС второго класса якорные остатки могут быть расположены на различном удалении друг от друга. Кроме этого, пептид может выходить за пределы пептидсвязывающей бороздки, следовательно, в его связывании также участвуют и другие структуры белка [12].

МНС двух классов презентируют свой пептид разным клеткам: МНС первого класса презентирует пептиды, распознаваемые CD8+ лимфоцитами, известные также как Т-киллеры, а МНС второго класса - CD4+ лимфоцитам (Т-хелперы) [23]. МНС первого класса экспрессируется практически на всех ядросодержащих клетках организма [24]. Единственное исключение - клетки ворсинчатого трофобласта. Показано, что экспрессия классических аллелей МНС I на них приводит к иммуноопосредованному аборту [25]. МНС второго класса экспрессируются конституциально клетками иммунной системы, в особенности антигенпрезентирующими клетками: дендритными клетками, макрофагами, В-лимфоцитами, эпителиальными клетками тимуса, но их экспрессия может быть индуцирована IFN- на остальных клетках [26].

От локализации патогена зависит, на каком МНС будут презентироваться его антигены. Например, разрушенные белки цитозольных патогенов - вирусов, некоторых бактерий - транспортируются в ЭПР и там встраиваются в вновь синтезированные МНС первого класса и оттуда готовые комплексы доставляются на цитоплазматическую мембрану [27]. Такой каскад реакций называют непосредственным презентированием. При непосредственном презентировании белки разрушаются специальным белковым комплексом - протеасомой. Помимо непосредственного презентирования существует каскад реакции, когда экзогенные пептиды презентируются на МНС I. Существуют патогены, способные не напрямую поражать АПК. Существует специальный тип дендритных клеток, который презентирует пептиды, полученные фаголизосомальной системой, на МНС первого, а не второго класса, как это протекает в других АПК [28]. Такой каскад называется перекрестной презентацией, а активацию Т-клеток, с помощью этого каскада - кросс-праймингом. Рассмотрение перекрестного презентирования и презенитрования на МНС II выходит за рамки данные работы, поэтому далее речь пойдет о процессах, протекающих при непосредственной презентации антигена.

## 1.2. Процессинг антигенов для MHC I

Процессинг антигенов для МНС первого класса проходит в 6 стадий [29]:

1. Получение антигена (фагоцитозом, пиноцитозом и прочими способами),
2. Присоединение метки к белку в цитоплазме,
3. Гидролиз меченого белка протеасомой на отдельные пептиды,
4. Транспорт пептидов в ЭПР,
5. Встраивание пептида в белок МНС первого класса,
6. Транспорт комплекса на ЦПМ.

В качестве метки используется особый небольшой консервативный белок - убиквитин. Мечение осуществляется специальной убиквитин-протеасомальной системой (Ubiquitin-proteasomal system, UPS). Каскад реакций мечения описан в этой работе [30]. Сначала 1 молекула убиквитина ковалентно присоединяется к остатку цистеина убиквитин-активирующего фермента своим С-концевым остатком с затратой АТФ, затем он пересносится на убиквитин-конъюгирующий фермент. Следующим этапом убиквитин-конъюгирующий фермент формирует комплекс с убиквитинлигазой, с которой связан некоторый белковый субстрат. Убиквитинлигаза катализирует реакцию ковалентного связывания остатка лизина субстрата с С-концевым остатком глицина молекулы убиквитина. Дальнейший рост метки осуществялется убиквитинлигазой. Метка состоит из 4 молекул убиквитина, соединённых между собой ковалентной связью между лизинами в 48 положении одной молекулы и С-концевым остатком глицина другой [12].

Меченые белки поступают в особый белковый комплекс - протеасому. Существует множество типов протеасом, в зависимости от комбинации составляющих её каталитических субъединиц [31]. Стандартная человеческая 26S протеасома состоит из 3 частей: активной зоны - 20S “бочонка”, который состоит из 28 субъединиц, которые организованы в стопку из 4 колец: 2 -кольца в центре и 2 -кольца по краям, - и 2 регуляторных 19S частей, регулирующие доступ внутрь каталитической области, распознающие меченый субстрат [32]. Каталитическими являются лишь 1, 2 и 5 субъединицы -колец. Разные субъединицы обладают разным типом химической активности, но нет определенных правил, позволяющих сказать по какому аминокислотному остатку точно произойдет расщепление в определенной последовательности. Характеристика каталитических субъединиц приведена в [таблице 1](#tbl-proteasome). Существуют специальные каталитические субъединицы, которые экспрессируются при наличии IFN-, и они обладают несколько другим профилем активности, чем стандартные каталитические субъединицы. Кроме этого, есть специальная пятая субъединица, которая экспрессируется только в кортикальном слое тимуса эпителиальными клетками. По типу входящих в активную зону каталитических субъединиц выделяют конститутивные протеасомы, иммунопротеасомы и тимопротеасомы. Конститутивные протеасомы - те протеасомы, в состав которых входят только конститутивные субъединицы , и . Иммунопротеосомами называют протеосому, в которой есть , и субъединицы [33]. Тимопротеосомой же называют специфичный для эпителиальных клеток кортикального слоя тимуса белковый комплекс, в состав которого входят , и субъедиинцы [34]. Также существуют промежуточные формы иммунопротеосом, в которых произошла неполная замена конститутивных субъединиц на индуцированные.

**Таблица 1.** Характеристика каталитических субъединиц протеасом. Суффикс i означает индуцированный, суффикс t - тимус-специфичный. Каспазо-подобная активность означает, что гидролиз пептидной связи предпочтителен после кислотных остатков аспартата и глутамат, трипсин-подобная активность - после основных остатков лизина и аргинина, химотрипсин-подобная - после гидрофобных остатков лейцина, триптофана, тирозина и фенилаланина.

| **Субъединица** | **Общепринятое имя** | **Альтернативное имя** | **Ген** | **Предпочтительная активность** |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Бета тип-6 |  | Y, Delta, LMP19, Pre3 | PSMB6 | Каспазо-подобная |
| Бета тип-9 |  | Lmp2, RING12, MC7 | PSMB9 | Химотрипсин-подобная |
| Бета тип-7 |  | Z, MC14, Lmp9, Pup1 | PSMB7 | Трипсин-подобная |
| Бета тип-10 |  | MECL-1, Lmp10 | PSMB10 | Трипсин-подобная |
| Бета тип-5 |  | X, epsilon, Lmp17, MB1, Pre2, Doa3, Prg1 | PSMB5 | Химотрипсин-подобная |
| Бета тип-8 |  | Lmp7, RING10, Y2, C13 | PSMB8 | Химотрипсин-подобная |
| Бета тип-11 |  | Thymus-specific β5 | PSMB11 | Химотрипсин-подобная |

Анализ субстратной специфичности показывает, что конститутивная протеасома предпочитает выпускать пептиды с гидрофобными или основными остатками на С-конце, но это не означает, что не бывает других аминокислот на С-конце, к тому же у протеасом нет особых предпочтений по другим позициям в итоговом пептиде, а наблюдаемые частоты аминокислотных остатков зависят от строения регуляторных и каталитических субъединиц используемой протеасомы [35]. Индуцированные субъединицы обладают отличающимся профилем каталитической активности: субъединица предпочитает гидрофобные остатки с разветвленной цепью, в отличие от , предпочитающей кислотные остатки, обладает ещё большим сродством к гидрофобным остаткам, чем , а профиль активности и идентичен [33]. субъединица обладает пониженной химотрипсин-подобной активностью без влияния на каспазо-подобную и трипсин-подобную активности, что увеличивает долю пептидов с кислотным С-концевым остатком [36]. Тимопротеасома участвует в положительной селекции CD8+-лимфоцитов [37]. Для положительной селекции лимфоцитов важно, чтобы они распознали комплекс “свой пептид-МНС”, поэтому тимопротеасома генерирует пептиды более похожие на собственные, в то время как для иммунопротеасомы важно генерировать пептиды максимально непохожие на собственные для скорейшей реализации иммунного ответа.

С помощью убиквитин-протеасомальная система (ubiquitin-proteasomal system – UPS) клетка избавляется как от поврежденных или ненужных белков, так и от дефективных рибосомальных продуктов (defective ribosomal products, DRiP). DRiP представляют из себя пептиды, транслированные с интронов на неправильно сплайсированных мРНК, транслированные со сдвигом рамки считывания и неправильно уложенные белки, меченные убиквитином для их быстрого разрушения протеосомой [12]. Нарушения утилизации DRiP могут приводить к различным заболеваниям [38]. DRiP также служат важным источником антигенных пептидов для презентирования на МНС I [39].

В цитоплазме с продуктами гидролиза белков протеасомой могут произойти следующие события: утрата пост-трансляционных модификаций, пептидный сплайсинг, катализируемый протеосомой (proteasome-catalyzed peptide splicing, PCPS), дальнейший гидролиз с N-конца цитозольными протеазами. Например, гликопротеины теряют N-связанные гликаны [40]. Эта реакция конвертирует остаток аспарагина в остаток аспартата, что важно для распознания некоторых опухолевых антигенов [41]. PCPS впервые наблюдали при анализе антигенов рака почки [42]. Несмотря на то, что некоторые ученые сомневаются в существовании этого явления [43], оно наблюдается и изучается разными коллективами учёных [44–48], и большая часть иммунопептидома, который презентируется на HLA I класса, до 35% в некоторых клеточных линиях, может быть представлен сплайсированными пептидами [49]. PCPS - процесс соединения двух пептидов, продуцированных протеасомой. Она же и катализирует реакцию сплайсинга. Механизм реакции заключается в атаке свободной аминогруппой одного пептида ацил-ферментного интермедиата [50]. Присоединение возможно в трех вариантах в зависимости от происхождения пептидов и порядка присоединения. Когда два пептида происходят из одного белка, говорят о цис-сплайсинге, если из двух разных белков, то о транс-сплайсинге. При цис-сплайсинге возможно два варианта. В первом случае пептиды присоединяются в том же порядке, как они идут в исходной последовательности, во втором случае же в обратном: пептид, который был ближе к С-концу исходного белка формирует N-конец сплайсированного пептида.

После выхода из протеасомы, пептиды достаточно длинные, чтобы не помещаться в пептидсвязывающую бороздку, могут дальше разрушаться с N-конца цитозольными протеазами. Есть убедительные доказательства, что после выхода из протеосомы, процессинг с С-конца не происходит в клетках [51, 52]. Показано, что участие в дальнейшем укорочении пептидов могут принимать участие пуромицин-чувствительная аминопептидаза, блеомуцингидролаза, анти-трипептидилпептидаза II [53, 54]. От полного разрушения пептиды защищены шаперонами, например, кольцевым комплексом (TCP-1 ring complex, TRiC) [55].

Далее пептиды подлежат транспорту в ЭПР, где должно произойти их встраивание в МНС I. Их транслокацию обеспечивают специальные транспортеры, ассоциированные с антигенным процессингом (transporters associated with antigen processing, TAP). Это два белка, ТАР-1 и ТАР-2, из семейства АТФ-связывающих кассет (ATP-binding cassette, ABC), состоящие из N-концевого трансмембраного домена и С-концевого нуклеотид-связывающего домена [56]. Гомодимеры этих белков не имеют функциональной активности [57]. Между трансмембранным доменом TAP-белков и белком тапасином есть солевой мостик, который важен для сборки пептид-загружающего комплекса (peptide-loading complex, PLC) [58]. Пептид связывается с транспортером, когда он в релаксированном состоянии, и инициирует в нем конформационные перестройки, в результате которых попадает в полость ЭПР [59]. Гидролиз АТФ возвращает транспортер в исходное состояние [60]. Пептиды не покидают ЭПР через TAP-транспортеры, так как их высокая концентрация в полости ЭПР вызывает транс-ингибирование комплекса [61]. Только один пептид в один момент времени связывается с ТАР-комплексом [62]. Оптимальная длина пептида для переноса 8-16 аминокислот, хотя ТАР-1/2 способен переносить пептиды до 40 аминокислот [63, 64]. Важными для связывания с транспортером являются первые три N-концевые и одна С-концевая аминокислота [65]. Есть некоторые предпочтения по якорным остаткам у ТАР-транспортеров, а между ними участки могут сильно отличаться по длине и физико-химическим свойствам [59]. В позиции 1 и 2 N-конца предпочтительны положительно заряженные аминокислоты, в позиции 3 предпочтительны ароматические аминокислоты, в первых трех позициях не должно быть пролина, гиброфобные или основные аминокислоты на С-конце [12, 66, 67].

После попадания пептида в ЭПР он сразу поступает в PLC. PLC состоит из собранной молекулы HLA I, шаперона кальретикулина, ТАР-ассоциированного белка тапасина и тиоловой редуктазы ERp57 [68]. Этот комплекс ответственен за присоединение эпитопа к молекуле HLA. Комплекс не загружает в молекулу HLA первый попавшийся пептид, а подбирает наиболее аффинный, удаляя низкоафинные. Этот процесс называется пептидным корректированием [12]. Кроме этого, в полости ЭПР есть специальные аминопептидазы, ассоциированные с антигенным процессингом (endoplasmatic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing, ERAAP). Это два фермента, ERAP1 и ERAP2, которые представляют из цинковые протеазы с консервативным мотивом His-Glu-X-X-His-X18-Glu, которые также нарезают пептиды с N-конца [69]. Экспрессия этих ферментов увеличивается под действием IFN- [69]. Здоровые клетки с нокаутом этих генов продуцируют неиммунногенные пептиды или пептиды, которые вызывают гибель клетки из-за действия на них цитотоксических Т-лимфоцитов [70]. Пептиды, которым не удалось связаться с MHC удаляются из ЭПР с помощью АТФ-зависимого транспортера Sec61 [71].

Следует иметь в виду, что процессинг антигена не совсем последовательный процесс. Например, получение эпитопа IYMDGTADSFSF из фермента тирозиназы проходит следующие стадии [44]:

1. После синтеза белок попадает в ЭПР, где происходит N-гликозилирование по специфичным аспарагиновым остаткам;
2. После этого белок переносится в цитоплазму, но некоторые молекулы из них неправильно собираются, поэтому идут на утилизацию в UPS;
3. У неправильно собранных белков происходит потеря N-связанных гликанов с конверсией аспарагина в аспартат;
4. В протеасоме два пептида с такими конвертированными сайтами, IYMDGT и ADSFSF, соединяются (цис-прямой сплайсинг, катализированный протеасомой);
5. Пептид IYMDGTADSFSF переносится в ЭПР, загружается в молекулу MHC и полученный комплекс транспортируется на ЦПМ.

## 1.3. Программы и сервисы для предсказания Т-клеточных эпитопов

Моделированию антигенного процессинга чуть больше 20 лет и за это время были опробованы различные подходы и использовались разные источники данных. За это время накопился огромный массив данных, собранный независимо в несколько баз данных и баз знаний. Immune Epitope Database (IEDB) - наиболее значимый ресурс, который содержит, огромную базу данных иммунологических данных, онтологию и сервисы для предсказания различных взаимодействий [72]. Эта база данных (БД) - основа всех современных исследований в области моделирования связывания эпитопов с МНС, распознавания комплексов TCR-pMHC и других исследований, так как содержит в себе миллионы записей.

Также накоплен большой массив масс-спектрометрических данных, посвященных предсказанию продуктов расщепления белков протеасомой, который был объединен в БД InvitroSPI [73]. InvitroSPI объединяет три больших датасета *in vitro* экспериментов с протеасомой и содержит 16 631 уникальный пептид. Присутствуют как сплайсированные пептиды, так и несплайсированные. Однако есть данные, показывающие, что по *in vitro* данным нельзя прогнозировать, что будет *in vivo* [74]. До появления источников этой БД основным датасетом были данные о сайтах разрезания для дрожжевой енолазы I и -казеина [75, 76].

Данные по связыванию пептидов с TAP содержатся в двух БД: MHC BN 4.0 и AntiJen 2.0 [77, 78]. Однако на момент 09 апреля 2023 года выгрузить данные из AntiJen 2.0 не представлялось возможным. Также некоторые датасеты выложены в открытый доступ разработчиками программ [79]. Эти БД небольшие, насчитывают около тысячи записей. Активность по отношению к ТАР представлена в виде значений IC50 относительно пептида RRYNASTEL с радиоактивной меткой. Кроме IEDB существует ещё несколько небольших баз данных, хранящие порядка несколько десятков тысяч записей с данными об эпитопах, аллелях МНС и узнающих последовательностях ТКР: VDJdb, McPAS-TCR, EPIMHC, SYFPEITHI и другие [80–83].

Первые компьютерные программы, посвящённые моделированию отдельных шагов процессинга также появились в начале 2000-ых годов [84, 85]. Как было замечено, процессинг антигенов далеко не всегда протекает последовательно, однако уже в 2006 году была предпринята попытка его моделирования как единого процесса [86]. EpiJen моделирует три основополагающих этапа процессинга: расщепление белков протеасомой, транспорт в ЭПР и связывание с МНС - и выдает топ-5% пептидов, которые связываются с прогнозируемыми ТКР. Методы, ставшие классическими, собраны на сайте Immune Epitope Database Analysis Resource (IEDB-AR) [87]. Сервисы по предсказанию процессинга антигенов можно разделить на 2 группы: сервисы, которые предсказывают отдельные этапы процессинга, и сервисы, которые учитывают несколько этапов процессинга.

На данный момент исследователи моделируют реакцию разрушения белков протеасомой, транспорт пептидов ТАР, связывание пептидов с МНС. Наиболее известные примеры программ представлены в [таблице 2](#tbl-programs).

**Таблица 2.** Примеры программ для моделирования отдельных этапов процессинга антигенов

| **Программа** | **Моделируемый этап** | **Источник обучающей выборки** | **Алгоритм** | **Литературный источник** |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Pcleavage | Протеосома | Данные по енолазе и казеину, МНС BN, | SVM | [88] |
| NetChop | Протеосома | SYFPEITHI, MHCPEP, HIV Immunology Database, Данные по енолазе и казеину | ANN | [89] |
| PCPS | Протеосома | HIV Immunology Database, EPIMHC, Immuneepitope, Los Alamos database | N-граммы | [90] |
| PREDTAP | TAP | Экспериментальные данные | ANN + HMM | [91] |
| TAPREG | TAP | Экспериментальные данные, Antijen | SVM | [79] |
| NetMHCpan | MHC | IEDB | ANN | [92] |
| MHCSeqNet | MHC | IEDB, MHCflurry | ANN | [93] |

Программы NetCTLpan и MHCflurry моделируют несколько этапов процессинга. MHCflurry состоит из двух моделей на основе нейронных сетей: по предсказанию процессинга и связыванию с МНС - результат агрегирует с помощью логистической регрессии [94]. NetCTLpan предсказывает разрезание белков протеасомой, транспорт и связывание по отдельности [95]. Эти методы являются пан-аллельными, то есть предсказывают результат для почти всего многообразия известных аллелей HLA. Это достигается путем особого подхода представления аллелей в виде псевдопоследовательности остатков, находящихся на расстоянии до 4 Å от пептидов длиной 9 аминокислот в любых репрезентативных структурах комплекса HLA-пептид [92]. Активно ведется разработка пан-специфичных фреймворков для предсказания связывания пептидов с HLA и все они основаны на нейронных сетях [93, 96, 97]. Современные методы предсказания связывания пептида с МНС имеют высокий AUC ROC, больше 0,95, однако предсказания ограничены определенными аллелями MHC, а также какой-то конкретной длиной пептида, чаще в 9 аминокислот [98, 99]. Следует отметить, что в современных работах моделируют расщепление белков протеасомой и связывание пептидов с MHC. Активность по отношению к TAP транспортеру не является главным направлением моделирования из-за недостатка данных и трудоемкости экспериментов, в которых их получают.

# Глава 2. Материалы и методы

## 2.1 Источники данных для моделирования

### 2.1.1. Модель протеасомы

Для моделей протеасомы существуют два типа данных: *in vitro* эксперименты и *in vivo* эксперименты. Эксперимент *in vitro* заключается в инкубировании небольших, длиной в 20-30 аминокислотных остатков, фрагментов белков с каталитическим ядром протеасомы или с цельной протеасомой в пробирке несколько часов и в определении получившихся пептидов методами масс-спектрометрии. Эксперимент *in vivo* заключается в элюировании комплексов пептид-МНС с поверхности ЦПМ живых клеток и определении аллеля МНС и последовательности пептида методами масс-спектрометрии. Для обучения и валидации моделей *in vitro* была использована БД InvitroSPI [73], дополненная обучающей выборкой программы pepsickle [100]. Были отобраны данные, полученные на 20S субъединице человеческой протеасомы с временем инкубации не более 5 часов; отфильтрованы сплайсированные пептиды, с посттрансляционными модификациями или ошибками химического синтеза, с ошибками записи последовательности. Правильно записанной считается последовательность, записанная в однобуквенном коде и состоящая из 20 основных протеиногенных аминокислот.

Данные *in vivo* были извлечены из копии IEDB, локально развернутой на базе СУБД MySQL. Для извлечения данных был написан скрипт на языке программирования SQL. С его помощью были извлечены данные об экспериментах *in vivo*, проведенных на человеке с определенным HLA аллелем первого класса.

# 2.1. Базы данных

# 2.2. Методы моделирования

**3. Результаты**

# 3.1. Концептуальная схема модели

# 3.2. Модель работы протеасомы

# 3.3. Модель работы ТАР-транспортера

# 3.4. Модель взаимодействия эпитоп-МНС

# 3.5. Объединенная модель

# 3.6. Веб-сервис

# 4. Выводы

# 15. Обсуждение

# Список литературы

1. Ярилин А.А.Иммунология / А. А. Ярилин – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010.– 752c.

2. Ганковская Л.В.Основы общей иммунологии. Учебно-методическое пособие для студентов медицинских вузов / Л. В. Ганковская, Л. С. Намазова-Баранова, Р. Я. Мешкова – Москва: ПедиатрЪ, 2014.

3. Murugan A. Statistical inference of the generation probability of T-cell receptors from sequence repertoires / Murugan A., Mora T., Walczak A.M., Callan C.G. // Proceedings of the National Academy of Sciences – 2012. – Т. 109 – № 40 – С.16161–16166.

4. Dash R. In silico-based vaccine design against Ebola virus glycoprotein / Dash R., Das R., Junaid M., Akash M.F.C., Islam A., Hosen S.Z. // Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry – 2017. – Т. Volume 10 – С.11–28.

5. Viana Invenção M. da C. Development of synthetic antigen vaccines for COVID-19 / Viana Invenção M. da C., Melo A.R. da S., Macêdo L.S. de, Costa Neves T.S.P. da, Melo C.M.L. de, Cordeiro M.N., Aragão Batista M.V. de, Freitas A.C. de // Human Vaccines & Immunotherapeutics – 2021. – Т. 17 – № 11 – С.3855–3870.

6. Schmidt J. Prediction of neo-epitope immunogenicity reveals TCR recognition determinants and provides insight into immunoediting / Schmidt J., Smith A.R., Magnin M., Racle J., Devlin J.R., Bobisse S., Cesbron J., Bonnet V., Carmona S.J., Huber F., Ciriello G., Speiser D.E., Bassani-Sternberg M., Coukos G., Baker B.M., Harari A., Gfeller D. // Cell Reports Medicine – 2021. – Т. 2 – № 2 – С.100194.

7. consortium M. sequencing Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex / consortium M. sequencing // Nature – 1999. – Т. 401 – № 6756 – С.921–923.

8. Robinson J. IPD-IMGT/HLA Database / Robinson J., Barker D.J., Georgiou X., Cooper M.A., Flicek P., Marsh S.G.E. // Nucleic Acids Research – 2019.

9. IPD-IMGT/HLA Database Statistics [Электронный ресурс]. URL: https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/about/statistics/ (дата обращения: 27.02.2023).

10. Cao K. Analysis of the frequencies of HLA-A, B, and C alleles and haplotypes in the five major ethnic groups of the United States reveals high levels of diversity in these loci and contrasting distribution patterns in these populations / Cao K., Hollenbach J., Shi X., Shi W., Chopek M., Fernández-Viña M.A. // Human Immunology – 2001. – Т. 62 – № 9 – С.1009–1030.

11. Autoimmunity: From Bench to Bedside / / под ред. J.-M. Anaya, Y. Shoenfeld, A. Rojas-Villarraga, R.A. Levy, R. Cervera. – – Bogota (Colombia): El Rosario University Press, 2013.

12. Мерфи К.Иммунобиология по Джанвею / К. Мерфи, К. Уивер – Москва: Логосфера, 2020. Вып. 9– 1184c.

13. Lanier L.L. NK CELL RECOGNITION / Lanier L.L. // Annual Review of Immunology – 2005. – Т. 23 – № 1 – С.225–274.

14. Alfonso C. Nonclassical MHC Class II Molecules / Alfonso C., Karlsson L. // Annual Review of Immunology – 2000. – Т. 18 – № 1 – С.113–142.

15. Тибирькова Е.В. РОЛЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ В ПОДДЕРЖАНИИ ГОМЕОСТАЗА / Тибирькова Е.В., Белан Э.Б., Желтова А.А., Садчикова Т.Л.

16. Deakin J.E. Evolution and comparative analysis of the MHC Class III inflammatory region / Deakin J.E., Papenfuss A.T., Belov K., Cross J.G., Coggill P., Palmer S., Sims S., Speed T.P., Beck S., Graves J.A.M. // BMC Genomics – 2006. – Т. 7 – № 1 – С.281.

17. Bjorkman P.J. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens / Bjorkman P.J., Saper M.A., Samraoui B., Bennett W.S., Strominger J.L., Wiley D.C. // Nature – 1987. – Т. 329 – № 6139 – С.512–518.

18. Meusser B. ERAD: the long road to destruction / Meusser B., Hirsch C., Jarosch E., Sommer T. // Nature Cell Biology – 2005. – Т. 7 – № 8 – С.766–772.

19. Trolle T. The Length Distribution of Class I–Restricted T Cell Epitopes Is Determined by Both Peptide Supply and MHC Allele–Specific Binding Preference / Trolle T., McMurtrey C.P., Sidney J., Bardet W., Osborn S.C., Kaever T., Sette A., Hildebrand W.H., Nielsen M., Peters B. // The Journal of Immunology – 2016. – Т. 196 – № 4 – С.1480–1487.

20. Bjorkman P.J. Structures of two classes of MHC molecules elucidated: crucial differences and similarities / Bjorkman P.J., Burmeister W.P. // Current Opinion in Structural Biology – 1994. – Т. 4 – № 6 – С.852–856.

21. White K.D. HLA and the Pharmacogenomics of Drug Hypersensitivity Elsevier, 2014. – 437–465с.

22. Matsumura M. Emerging Principles for the Recognition of Peptide Antigens by MHC Class I Molecules / Matsumura M., Fremont D.H., Peterson P.A., Wilson lan A. // Science – 1992. – Т. 257 – № 5072 – С.927–934.

23. Bjorkman P.J. Structures of two classes of MHC molecules elucidated: crucial differences and similarities / Bjorkman P.J., Burmeister W.P. // Current Opinion in Structural Biology – 1994. – Т. 4 – № 6 – С.852–856.

24. Hewitt E.W. The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion / Hewitt E.W. // Immunology – 2003. – Т. 110 – № 2 – С.163–169.

25. Rutigliano H.M. Trophoblast Major Histocompatibility Complex Class I Expression Is Associated with Immune-Mediated Rejection of Bovine Fetuses Produced by Cloning / Rutigliano H.M., Thomas A.J., Wilhelm A., Sessions B.R., Hicks B.A., Schlafer D.H., White K.L., Davies C.J. // Biology of Reproduction – 2016. – Т. 95 – № 2 – С.39–39.

26. Ting J.P.-Y. Genetic Control of MHC Class II Expression / Ting J.P.-Y., Trowsdale J. // Cell – 2002. – Т. 109 – № 2 – С.S21–S33.

27. Rock K.L. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules / Rock K.L., Reits E., Neefjes J. // Trends in Immunology – 2016. – Т. 37 – № 11 – С.724–737.

28. Bevan M.J. Cross-priming / Bevan M.J. // Nature Immunology – 2006. – Т. 7 – № 4 – С.363–365.

29. Pishesha N. A guide to antigen processing and presentation / Pishesha N., Harmand T.J., Ploegh H.L. // Nature Reviews Immunology – 2022. – Т. 22 – № 12 – С.751–764.

30. Gong B. The Ubiquitin-Proteasome System: Potential Therapeutic Targets for Alzheimer’s Disease and Spinal Cord Injury / Gong B., Radulovic M., Figueiredo-Pereira M.E., Cardozo C. // Frontiers in Molecular Neuroscience – 2016. – Т. 9.

31. Tanaka K. The proteasome: Overview of structure and functions / Tanaka K. // Proceedings of the Japan Academy, Series B – 2009. – Т. 85 – № 1 – С.12–36.

32. Kloetzel P.-M. Antigen processing by the proteasome / Kloetzel P.-M. // Nature Reviews Molecular Cell Biology – 2001. – Т. 2 – № 3 – С.179–188.

33. Murata S. The immunoproteasome and thymoproteasome: functions, evolution and human disease / Murata S., Takahama Y., Kasahara M., Tanaka K. // Nature Immunology – 2018. – Т. 19 – № 9 – С.923–931.

34. Murata S. Regulation of CD8 + T Cell Development by Thymus-Specific Proteasomes / Murata S., Sasaki K., Kishimoto T., Niwa S., Hayashi H., Takahama Y., Tanaka K. // Science – 2007. – Т. 316 – № 5829 – С.1349–1353.

35. Harris J.L. Substrate specificity of the human proteasome / Harris J.L., Alper P.B., Li J., Rechsteiner M., Backes B.J. – С.11.

36. Takahama Y. β5t-containing thymoproteasome: specific expression in thymic cortical epithelial cells and role in positive selection of CD8+ T cells / Takahama Y., Takada K., Murata S., Tanaka K. // Current Opinion in Immunology – 2012. – Т. 24 – № 1 – С.92–98.

37. Kniepert A. The unique functions of tissue-specific proteasomes / Kniepert A., Groettrup M. // Trends in Biochemical Sciences – 2014. – Т. 39 – № 1 – С.17–24.

38. Mediani L. Defective ribosomal products challenge nuclear function by impairing nuclear condensate dynamics and immobilizing ubiquitin / Mediani L., Guillén‐Boixet J., Vinet J., Franzmann T.M., Bigi I., Mateju D., Carrà A.D., Morelli F.F., Tiago T., Poser I., Alberti S., Carra S. // The EMBO Journal – 2019. – Т. 38 – № 15.

39. Dolan B.P. Defective Ribosomal Products Are the Major Source of Antigenic Peptides Endogenously Generated from Influenza A Virus Neuraminidase / Dolan B.P., Li L., Takeda K., Bennink J.R., Yewdell J.W. // The Journal of Immunology – 2010. – Т. 184 – № 3 – С.1419–1424.

40. Suzuki T. The cytoplasmic peptide:N-glycanase (NGLY1) — Structure, expression and cellular functions / Suzuki T., Huang C., Fujihira H. // Gene – 2016. – Т. 577 – № 1 – С.1–7.

41. Kasteren S.I. van Chemical biology of antigen presentation by MHC molecules / Kasteren S.I. van, Overkleeft H., Ovaa H., Neefjes J. // Current Opinion in Immunology – 2014. – Т. 26 – С.21–31.

42. Hanada K. Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing / Hanada K., Yewdell J.W., Yang J.C. // Nature – 2004. – Т. 427 – № 6971 – С.252–256.

43. Admon A. Are There Indeed Spliced Peptides in the Immunopeptidome? / Admon A. // Molecular & Cellular Proteomics – 2021. – Т. 20 – С.100099.

44. Vigneron N. Peptide splicing by the proteasome / Vigneron N., Ferrari V., Stroobant V., Abi Habib J., Van den Eynde B.J. // Journal of Biological Chemistry – 2017. – Т. 292 – № 51 – С.21170–21179.

45. Mansurkhodzhaev A. Proteasome-Generated cis-Spliced Peptides and Their Potential Role in CD8+ T Cell Tolerance / Mansurkhodzhaev A., Barbosa C.R.R., Mishto M., Liepe J. // Frontiers in Immunology – 2021. – Т. 12 – С.614276.

46. Mishto M. An in silico—in vitro Pipeline Identifying an HLA-A\*02:01+ KRAS G12V+ Spliced Epitope Candidate for a Broad Tumor-Immune Response in Cancer Patients / Mishto M., Mansurkhodzhaev A., Ying G., Bitra A., Cordfunke R.A., Henze S., Paul D., Sidney J., Urlaub H., Neefjes J., Sette A., Zajonc D.M., Liepe J. // Frontiers in Immunology – 2019. – Т. 10 – С.2572.

47. Kato K. Characterization of Proteasome-Generated Spliced Peptides Detected by Mass Spectrometry / Kato K., Nakatsugawa M., Tokita S., Hirohashi Y., Kubo T., Tsukahara T., Murata K., Chiba H., Takahashi H., Hirano N., Kanaseki T., Torigoe T. // The Journal of Immunology – 2022. – Т. 208 – № 12 – С.2856–2865.

48. Lichti C.F. Navigating Critical Challenges Associated with Immunopeptidomics-Based Detection of Proteasomal Spliced Peptide Candidates / Lichti C.F., Vigneron N., Clauser K.R., Van den Eynde B.J., Bassani-Sternberg M. // Cancer Immunology Research – 2022. – Т. 10 – № 3 – С.275–284.

49. Liepe J. A large fraction of HLA class I ligands are proteasome-generated spliced peptides / Liepe J., Marino F., Sidney J., Jeko A., Bunting D.E., Sette A., Kloetzel P.M., Stumpf M.P.H., Heck A.J.R., Mishto M. // Science – 2016. – Т. 354 – № 6310 – С.354–358.

50. Vigneron N. Production of spliced peptides by the proteasome / Vigneron N., Stroobant V., Ferrari V., Abi Habib J., Van den Eynde B.J. // Molecular Immunology – 2019. – Т. 113 – С.93–102.

51. Rock K.L. Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides Elsevier, 2002. – 1–70с.

52. Craiu A. Two distinct proteolytic processes in the generation of a major histocompatibility complex class I-presented peptide / Craiu A., Akopian T., Goldberg A., Rock K.L. // Proceedings of the National Academy of Sciences – 1997. – Т. 94 – № 20 – С.10850–10855.

53. Stoltze L. Two new proteases in the MHC class I processing pathway / Stoltze L., Schirle M., Schwarz G., Schröter C., Thompson M.W., Hersh L.B., Kalbacher H., Stevanovic S., Rammensee H.-G., Schild H. // Nature Immunology – 2000. – Т. 1 – № 5 – С.413–418.

54. Rock K.L. Proteases in MHC Class I Presentation and Cross-Presentation / Rock K.L., Farfán-Arribas D.J., Shen L. // The Journal of Immunology – 2010. – Т. 184 – № 1 – С.9–15.

55. Kunisawa J. The Group II Chaperonin TRiC Protects Proteolytic Intermediates from Degradation in the MHC Class I Antigen Processing Pathway / Kunisawa J., Shastri N. // Molecular Cell – 2003. – Т. 12 – № 3 – С.565–576.

56. Daumke O. Functional asymmetry of the ATP-binding-cassettes of the ABC transporter TAP is determined by intrinsic properties of the nucleotide binding domains: Modular function of TAP domains / Daumke O., Knittler M.R. // European Journal of Biochemistry – 2001. – Т. 268 – № 17 – С.4776–4786.

57. Urlinger S. Intracellular Location, Complex Formation, and Function of the Transporter Associated with Antigen Processing in Yeast / Urlinger S., Kuchler K., Meyer T.H., Uebel S., Tampe R. // European Journal of Biochemistry – 1997. – Т. 245 – № 2 – С.266–272.

58. Blees A. Assembly of the MHC I peptide-loading complex determined by a conserved ionic lock-switch / Blees A., Reichel K., Trowitzsch S., Fisette O., Bock C., Abele R., Hummer G., Schäfer L.V., Tampé R. // Scientific Reports – 2015. – Т. 5 – № 1 – С.17341.

59. Lehnert E. Structure and Dynamics of Antigenic Peptides in Complex with TAP / Lehnert E., Tampé R. // Frontiers in Immunology – 2017. – Т. 8.

60. Abele R. The ABCs of Immunology: Structure and Function of TAP, the Transporter Associated with Antigen Processing / Abele R., Tampé R. // Physiology – 2004. – Т. 19 – № 4 – С.216–224.

61. Grossmann N. Mechanistic determinants of the directionality and energetics of active export by a heterodimeric ABC transporter / Grossmann N., Vakkasoglu A.S., Hulpke S., Abele R., Gaudet R., Tampé R. // Nature Communications – 2014. – Т. 5 – № 1 – С.5419.

62. Herget M. Purification and Reconstitution of the Antigen Transport Complex TAP / Herget M., Kreiβig N., Kolbe C., Schölz C., Tampé R., Abele R. // Journal of Biological Chemistry – 2009. – Т. 284 – № 49 – С.33740–33749.

63. Endert P.M. van A sequential model for peptide binding and transport by the transporters associated with antigen processing / Endert P.M. van, Tampé R., Meyer T.H., Tisch R., Bach J.-F., McDevitt H.O. // Immunity – 1994. – Т. 1 – № 6 – С.491–500.

64. Gorbulev S. Allosteric crosstalk between peptide-binding, transport, and ATP hydrolysis of the ABC transporter TAP / Gorbulev S., Abele R., Tampé R. // Proceedings of the National Academy of Sciences – 2001. – Т. 98 – № 7 – С.3732–3737.

65. Herget M. Conformation of peptides bound to the transporter associated with antigen processing (TAP) / Herget M., Baldauf C., Schölz C., Parcej D., Wiesmüller K.-H., Tampé R., Abele R., Bordignon E. // Proceedings of the National Academy of Sciences – 2011. – Т. 108 – № 4 – С.1349–1354.

66. Androlewicz M.J. Human transporters associated with antigen processing possess a promiscuous peptide-binding site / Androlewicz M.J., Cresswell P. // Immunity – 1994. – Т. 1 – № 1 – С.7–14.

67. Uebel S. Recognition principle of the TAP transporter disclosed by combinatorial peptide libraries / Uebel S., Kraas W., Kienle S., Wiesmüller K.-H., Jung G., Tampé R. // Proceedings of the National Academy of Sciences – 1997. – Т. 94 – № 17 – С.8976–8981.

68. Blees A. Structure of the human MHC-I peptide-loading complex / Blees A., Januliene D., Hofmann T., Koller N., Schmidt C., Trowitzsch S., Moeller A., Tampé R. // Nature – 2017. – Т. 551 – № 7681 – С.525–528.

69. Serwold T. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum / Serwold T., Gonzalez F., Kim J., Jacob R., Shastri N. // Nature – 2002. – Т. 419 – № 6906 – С.480–483.

70. Yewdell J.W. Don’t mess with ERAAP! / Yewdell J.W., Lu X. // Nature Immunology – 2012. – Т. 13 – № 6 – С.526–528.

71. Osborne A.R. PROTEIN TRANSLOCATION BY THE SEC61/SECY CHANNEL / Osborne A.R., Rapoport T.A., Berg B. van den // Annual Review of Cell and Developmental Biology – 2005. – Т. 21 – № 1 – С.529–550.

72. Vita R. The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update / Vita R., Mahajan S., Overton J.A., Dhanda S.K., Martini S., Cantrell J.R., Wheeler D.K., Sette A., Peters B. // Nucleic Acids Research – 2019. – Т. 47 – № D1 – С.D339–D343.

73. Roetschke H.P. InvitroSPI and a large database of proteasome-generated spliced and non-spliced peptides / Roetschke H.P., Rodriguez-Hernandez G., Cormican J.A., Yang X., Lynham S., Mishto M., Liepe J. // Scientific Data – 2023. – Т. 10 – № 1 – С.18.

74. Willimsky G. In vitro proteasome processing of neo-splicetopes does not predict their presentation in vivo / Willimsky G., Beier C., Immisch L., Papafotiou G., Scheuplein V., Goede A., Holzhütter H.-G., Blankenstein T., Kloetzel P.M. // eLife – 2021. – Т. 10 – С.e62019.

75. Toes R.E.M. Discrete Cleavage Motifs of Constitutive and Immunoproteasomes Revealed by Quantitative Analysis of Cleavage Products / Toes R.E.M., Nussbaum A.K., Degermann S., Schirle M., Emmerich N.P.N., Kraft M., Laplace C., Zwinderman A., Dick T.P., Müller J., Schönfisch B., Schmid C., Fehling H.-J., Stevanovic S., Rammensee H.G., Schild H. // Journal of Experimental Medicine – 2001. – Т. 194 – № 1 – С.1–12.

76. Emmerich N.P.N. The Human 26 S and 20 S Proteasomes Generate Overlapping but Different Sets of Peptide Fragments from a Model Protein Substrate / Emmerich N.P.N., Nussbaum A.K., Stevanovic S., Priemer M., Toes R.E.M., Rammensee H.-G., Schild H. // Journal of Biological Chemistry – 2000. – Т. 275 – № 28 – С.21140–21148.

77. Toseland C.P. AntiJen: a quantitative immunology database integrating functional, thermodynamic, kinetic, biophysical, and cellular data / Toseland C.P., Clayton D.J., McSparron H., Hemsley S.L., Blythe M.J., Paine K., Doytchinova I.A., Guan P., Hattotuwagama C.K., Flower D.R. // Immunome Research – 2005. – Т. 1 – № 1 – С.4.

78. Lata S. MHCBN 4.0: A database of MHC/TAP binding peptides and T-cell epitopes / Lata S., Bhasin M., Raghava G.P. // BMC Research Notes – 2009. – Т. 2 – № 1 – С.61.

79. Diez-Rivero C.M. Computational analysis and modeling of cleavage by the immunoproteasome and the constitutive proteasome / Diez-Rivero C.M., Lafuente E.M., Reche P.A. // BMC Bioinformatics – 2010. – Т. 11 – № 1 – С.479.

80. Bagaev D.V. VDJdb in 2019: database extension, new analysis infrastructure and a T-cell receptor motif compendium / Bagaev D.V., Vroomans R.M.A., Samir J., Stervbo U., Rius C., Dolton G., Greenshields-Watson A., Attaf M., Egorov E.S., Zvyagin I.V., Babel N., Cole D.K., Godkin A.J., Sewell A.K., Kesmir C., Chudakov D.M., Luciani F., Shugay M. // Nucleic Acids Research – 2020. – Т. 48 – № D1 – С.D1057–D1062.

81. Tickotsky N. McPAS-TCR: a manually curated catalogue of pathology-associated T cell receptor sequences / Tickotsky N., Sagiv T., Prilusky J., Shifrut E., Friedman N. // Bioinformatics – 2017. – Т. 33 – № 18 – С.2924–2929.

82. Rammensee H.-G. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs / Rammensee H.-G., Bachmann J., Emmerich N.P.N., Bachor O.A., Stevanović S. // Immunogenetics – 1999. – Т. 50 – № 3–4 – С.213–219.

83. Reche P.A. EPIMHC: a curated database of MHC-binding peptides for customized computational vaccinology / Reche P.A., Zhang H., Glutting J.-P., Reinherz E.L. // Bioinformatics – 2005. – Т. 21 – № 9 – С.2140–2141.

84. Nussbaum A.K. PAProC: a prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the WWW / Nussbaum A.K., Kuttler C., Hadeler K.-P., Rammensee H.-G., Schild H. // Immunogenetics – 2001. – Т. 53 – № 2 – С.87–94.

85. Hattotuwagama C.K. Quantitative online prediction of peptide binding to the major histocompatibility complex / Hattotuwagama C.K., Guan P., Doytchinova I.A., Zygouri C., Flower D.R. // Journal of Molecular Graphics and Modelling – 2004. – Т. 22 – № 3 – С.195–207.

86. Doytchinova I.A. EpiJen: a server for multistep T cell epitope prediction / Doytchinova I.A., Guan P., Flower D.R. // BMC Bioinformatics – 2006. – Т. 7 – № 1 – С.131.

87. Dhanda S.K. IEDB-AR: immune epitope database—analysis resource in 2019 / Dhanda S.K., Mahajan S., Paul S., Yan Z., Kim H., Jespersen M.C., Jurtz V., Andreatta M., Greenbaum J.A., Marcatili P., Sette A., Nielsen M., Peters B. // Nucleic Acids Research – 2019. – Т. 47 – № W1 – С.W502–W506.

88. Bhasin M. Pcleavage: an SVM based method for prediction of constitutive proteasome and immunoproteasome cleavage sites in antigenic sequences / Bhasin M., Raghava G.P.S. // Nucleic Acids Research – 2005. – Т. 33 – № Web Server – С.W202–W207.

89. Nielsen M. The role of the proteasome in generating cytotoxic T-cell epitopes: insights obtained from improved predictions of proteasomal cleavage / Nielsen M., Lundegaard C., Lund O., Keşmir C. // Immunogenetics – 2005. – Т. 57 – № 1–2 – С.33–41.

90. Gomez-Perosanz M. Identification of CD8+ T cell epitopes through proteasome cleavage site predictions / Gomez-Perosanz M., Ras-Carmona A., Lafuente E.M., Reche P.A. // BMC Bioinformatics – 2020. – Т. 21 – № S17 – С.484.

91. Zhang G. PREDTAP: a system for prediction of peptide binding to the human transporter associated with antigen processing / Zhang G., Petrovsky N., Kwoh C., August J.T., Brusic V. // Immunome Research – 2006. – Т. 2 – № 1 – С.3.

92. Nielsen M. NetMHCpan, a Method for Quantitative Predictions of Peptide Binding to Any HLA-A and -B Locus Protein of Known Sequence / Nielsen M., Lundegaard C., Blicher T., Lamberth K., Harndahl M., Justesen S., Røder G., Peters B., Sette A., Lund O., Buus S. // PLoS ONE – 2007. – Т. 2 – № 8 – С.e796.

93. Phloyphisut P. MHCSeqNet: a deep neural network model for universal MHC binding prediction / Phloyphisut P., Pornputtapong N., Sriswasdi S., Chuangsuwanich E. // BMC Bioinformatics – 2019. – Т. 20 – № 1 – С.270.

94. O’Donnell T.J. MHCflurry 2.0: Improved Pan-Allele Prediction of MHC Class I-Presented Peptides by Incorporating Antigen Processing / O’Donnell T.J., Rubinsteyn A., Laserson U. // Cell Systems – 2020. – Т. 11 – № 1 – С.42- 48.e7.

95. Stranzl T. NetCTLpan: pan-specific MHC class I pathway epitope predictions / Stranzl T., Larsen M.V., Lundegaard C., Nielsen M. // Immunogenetics – 2010. – Т. 62 – № 6 – С.357–368.

96. Wu J. DeepHLApan: A Deep Learning Approach for Neoantigen Prediction Considering Both HLA-Peptide Binding and Immunogenicity / Wu J., Wang W., Zhang J., Zhou B., Zhao W., Su Z., Gu X., Wu J., Zhou Z., Chen S. // Frontiers in Immunology – 2019. – Т. 10 – С.2559.

97. Alvarez B. NNAlign\_MA; MHC Peptidome Deconvolution for Accurate MHC Binding Motif Characterization and Improved T-cell Epitope Predictions / Alvarez B., Reynisson B., Barra C., Buus S., Ternette N., Connelley T., Andreatta M., Nielsen M. // Molecular & Cellular Proteomics – 2019. – Т. 18 – № 12 – С.2459–2477.

98. Paul S. Benchmarking predictions of MHC class I restricted T cell epitopes in a comprehensively studied model system / Paul S., Croft N.P., Purcell A.W., Tscharke D.C., Sette A., Nielsen M., Peters B. // PLOS Computational Biology – 2020. – Т. 16 – № 5 – С.e1007757.

99. Mei S. A comprehensive review and performance evaluation of bioinformatics tools for HLA class I peptide-binding prediction / Mei S., Li F., Leier A., Marquez-Lago T.T., Giam K., Croft N.P., Akutsu T., Smith A.I., Li J., Rossjohn J., Purcell A.W., Song J. // Briefings in Bioinformatics – 2020. – Т. 21 – № 4 – С.1119–1135.

100. Weeder B.R. pepsickle rapidly and accurately predicts proteasomal cleavage sites for improved neoantigen identification / Weeder B.R., Wood M.A., Li E., Nellore A., Thompson R.F. // Bioinformatics – 2021. – Т. 37 – № 21 – С.3723–3733.

# Приложение