

IN SILICO АНАЛИЗ ИММУНОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ПРИ ПОЛНОСТЬЮ HLA-СОВМЕСТИМОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

© 2016 г. Н.А. Быкова*, Д.Б. Малько*, А.С. Вдовин*, Г.А. Ефимов*

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Гематологический научный центр»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Поступила: 29.01.2016. Принята: 19.02.2016

Несинонимичные однонуклеотидные полиморфизмы в экзоте человека могут приводить к изменениям в репертуаре пептидов, презентруемых молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). В контексте трансплантации подобные полиморфные пептиды известны как минорные антигены гистосовместимости (МАГ). Вместе с МНС они играют роль в развитии посттрансплантационной аллореактивности. При полностью HLA-совместимой трансплантации МАГ являются единственными мишенями аллогенного иммунного ответа. *In silico* моделирование трансплантации может служить инструментом прогнозирования тяжести иммунного ответа. Для этого могут быть использованы алгоритмы, рассчитывающие константы связывания полиморфных пептидов с МНС. На данный момент накопился значительный массив данных по полногеномному секвенированию, который можно использовать для изучения потенциально иммуногенных МАГ. В данной работе публичные геномные данные были использованы для сравнения количества потенциальных МАГ между HLA-идентичными парами донор-пациент. Количество потенциально иммуногенных SNP в исследуемых парах в среднем составило 3594, из них около 10% может приводить к образованию полиморфных пептидов, способных связываться с МНС с высокой аффинностью. Мы показали, что главным фактором, влияющим на количество минорных антигенов является набор МНС аллелей, в то время как индивидуальный набор полиморфизмов оказывает меньший эффект. Мы также выявили, что большинство минорных антигенов происходит от редких и уникальных полиморфизмов, что указывает на актуальность применения в трансплантации подходов персонализированной медицины, в частности полноэкзомного секвенирования доноров и реципиентов.

Ключевые слова: трансплантация, главный комплекс гистосовместимости, минорные антигены, аллореактивность, однонуклеотидные полиморфизмы

ВВЕДЕНИЕ

Развитие нормального Т-клеточного иммунного ответа обеспечивается специфическим распознаванием чужеродного пептида в контексте собственной молекулы МНС [1, 2]. При аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК), также как и при трансплантации органов, в качестве побочного эффекта может наблюдаться явление аллореактивности, то есть способности иммунных клеток распознавать и атаковать чужие ткани и клетки [3]. В качестве аллоантигенов при этом могут выступать либо чужие молекулы МНС, несущие собственные пептиды; чужеродные пептиды, презентруемые в составе как аутологических, так и аллогенных

Адрес: 125167, Москва, Новый Зыковский пр., д.4, ФГБУ ГНЦ Минздрава России, Тел.: (495) 612-44-43, Ефимов Григорий Александрович. **E-mail:** efimov.g@blood.ru

Авторы:

Быкова Н.А., н.с. лаборатории трансплантационной иммунологии ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, Москва, Россия;

Малько Д.Б., к.т.н., н.с. лаборатории трансплантационной иммунологии ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, Москва, Россия;

Вдовин А.С., н.с. лаборатории трансплантационной иммунологии ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, Москва, Россия;

Ефимов Г.А., к.б.н., зав. лабораторией трансплантационной иммунологии ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России Москва, Россия

МНС [4]. В том случае, если между донором и реципиентом нет различий по аллелям МНС, такими аллоантигенами являются исключительно полиморфные пептиды, которые в контексте трансплантации называются минорными антигенами гистосовместимости (МАГ). Вариантные пептиды образуются из-за наличия в геноме однонуклеотидных полиморфизмов (SNP — single-nucleotide polymorphism). Количество SNP в человеческом геноме исчисляется миллионами, но далеко не все из них способны вносить вклад в аллогенный иммунный ответ [5, 6]. Чтобы конкретный SNP был значимым в контексте трансплантации, необходимо, чтобы он находился в кодирующем участке генома и приводил к несинонимичной замене в кодирующем триплете. Получившаяся таким образом аминокислотная замена может попадать в состав пептидов, образовавшихся в результате деградации белков в иммунопротеасоме, которые в дальнейшем могут представляться молекулами МНС на поверхности клетки [7]. Наконец, для пары донор-реципиент иммунный ответ возможен только при отсутствии у донора иммуногенной аллели данного SNP на обеих хромосомах. Так в случае SNP с двумя аллельными вариантами для распознавания пептида из аллели A1 как чужеродного донор должен являться гомозиготой A2/A2, а реципиент хотя бы на одной хромосоме должен иметь аллель A1.

В случае алло-ТГСК присутствие в трансплантате аллореактивных клонов может приводить к развитию иммунного ответа как на опухолевые клетки (реакция «трансплантат против опухоли» (РТПО)), так и на здоровые ткани реципиента (реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [8]). В силу того, что РТПХ и РТПО по сути являются частью общего процесса, влиять на них независимо сложно. Обнаружение новых МАГ и изучение и их роли в формировании РТПХ и РТПО позволит заранее предсказывать последствия алло-ТГСК и вовремя корректировать курс лечения, а лимитирование иммунного ответа тканеспецифичными МАГ может быть использовано для разделения этих двух эффектов [9].

Выделение аллореактивных лимфоцитов и последующий поиск их мишеней путем экспериментального скрининга множества кандидатных последовательностей является стандартным способом обнаружения МАГ [10-13]. Среди этого класса методов следует

выделить метод полногеномных ассоциаций как наиболее высокопроизводительный [14, 15]. В целом методы поиска МАГ очень трудоемки и привели к выявлению всего лишь около 50 МАГ, известных на сегодняшний день [16].

In silico предсказание МАГ является перспективным направлением, так как может позволить обнаружить сразу большое количество МАГ. Предсказание МАГ основывается на данных о SNP донора и реципиента, на основании которых генерируется исходный набор полиморфных пептидов, по которому могут отличаться донор и реципиент. В дальнейшем из этого набора должны быть отобраны пептиды, которые будут представляться только на поверхности клеток реципиента. Необходимым условием представленности в иммунопептидоме является возможность связывания пептида с имеющимися МНС аллелями.

Сила связывания пептидов с наиболее изученными аллелями МНС может быть довольно хорошо предсказана компьютерными алгоритмами (наиболее известные программы предсказания это netMHCpan [17], netMHC [18], SMM [19]; хорошие результаты дает также комбинирование результатов этих программ [20]), что было подтверждено экспериментально [21].

В то же время множество других факторов, влияющих на процесс представления пептидов (специфичность деградации белков протеасомой, работа пептидаз цитоплазмы и эндоплазматического ретикулула, специфичность белков Tap1/2) не позволяют в настоящее время достоверно предсказать, будет ли тот или иной пептид представлен в пептидоме. Поэтому зачастую применяются лишь программы предсказания связывания с МНС для генерации заведомо более широких наборов потенциальных МАГ, которые требуют дальнейшей тщательной экспериментальной проверки [20], отсеивающей большую часть кандидатов. Тем не менее изначальные *in silico* предсказания могут быть использованы для изучения статистических характеристик МАГ, которые, вероятно, не изменятся значительно при отсеивании части пептидов, в реальности не представленной в иммунопептидоме.

Были предприняты попытки предсказать и отсортировать по значимости все возможные МАГ на основе баз данных по часто встречающимся человеческим SNP [22].

Следующий шаг в этом направлении — это определение индивидуальных МАГ для каждой пары донор-реципиент, что с развитием технологии секвенирования, повышением ее доступности, становится со временем все более реальной перспективой.

В недавней работе [23] была предпринята попытка *in silico* оценить аллореактивный потенциал в парах донор реципиент, прошедших трансплантацию, а также сравнить родственные и неродственные пары.

Для изучения потенциала аллореактивности SNP не обязательно иметь данные по реально проведенным трансплантациям. На данный момент накопился большой массив данных по секвенированию человеческого генома, которые можно использовать для изучения потенциально возможных МАГ, составляя пары возможных доноров и реципиентов. В данной работе были использованы геномные данные из проекта 1000 Genomes [24] для сравнения количества потенциальных МАГ между HLA-идентичными парами донор-пациент, конкретными наборами аллелей, изучения распределения МАГ по тканям и характеристики порождающих их SNP.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Геномные данные

Индивидуальные геномные данные были взяты из проекта 1000 Genomes [24]. Аннотация HLA аллелей для этого проекта была взята из базы данных dbMHC [25]. Были отобраны 15 образцов, образующих 9 пар с полным соответствием А, В и С аллелей HLA, что позволяет моделировать 18 HLA-совместимых трансплантаций от донора к реципиенту.

Получение полиморфных пептидных последовательностей

Индивидуальные полиморфизмы с двух аллелей каждого образца были наложены на изоформы белок-кодирующих генов, аннотированных в проекте UCSC Genome Browser версии *hag18* [26]. Полученные индивидуальные изоформы были транслированы в аминокислотные последовательности и нарезаны на пептиды длиной 9. Таким образом, для каждого образца был сформирован набор пептидов, соответствующий его протеому. Для отбора пептидов, которые могли бы являться мишенями алло-реактивного ответа в случае трансплантации, из набора пептидов условного ре-

ципиента вычитались пептиды, совпадающие с пептидами условного донора.

Предсказание силы связывания пептидов с MHC аллелями

Расчет константы IC_{50} при связывании пептида с молекулой комплекса гистосовместимости проводился с использованием алгоритма SMM, реализованного в программном пакете IEDB tools [19], и программ NetMHC [18], netMHCpan [17] по формуле:

$$IC50_{mean} = 3 / (1 / IC50_{smm} + 1 / IC50_{NetMHC} + 1 / IC50_{netMHCpan}),$$

где $IC50_{smm}$ — значение, полученное алгоритмом SMM, $IC50_{NetMHC}$ — значение, полученное программой NetMHC, $IC50_{netMHCpan}$ — значение, полученное программой netMHCpan.

Для MHC-аллелей A*02:07, A*33:03, B*52:01, C*01:02, C*03:02, C*03:04, C*12:02 и C*14:03 не доступны библиотеки обучающих выборок алгоритма SMM и программы NetMHC, поэтому значение IC_{50} в этих случаях рассчитывалось только программой netMHCpan.

Данные по экспрессии

Для оценки тканеспецифичной экспрессии генов были использованы данные ресурса Expression Atlas [27]. Присутствие данного минорного антигена в той или иной ткани определялось по наличию достаточного уровня экспрессии соответствующего исходного гена. Порог минимального уровня экспрессии гена в ткани принимался равным 0,5 FPKM.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для проведения 18 модельных трансплантаций из данных проекта 1000 Genomes было отобрано 9 пар, совпадающих по MHC-генам (табл. 1). Каждому направлению пересадки в паре соответствует свой набор потенциально иммуногенных SNP, поскольку геномные полиморфизмы являются потенциально иммуногенными только, если донор гомозиготен по одной аллели, а реципиент несет альтернативную аллель. Количество потенциально иммуногенных SNP в исследуемых парах в среднем составило 3594 ± 221 . Известно, что большую часть пептидов, представляемых молекулами MHC I, составляют пептиды длиной 9 аминокислот [28], поэтому в данной работе анализировались только такие пептиды. Набор несинонимичных SNP был преобразован

Таблица 1. Используемые в работе образцы данных полногеномного секвенирования из проекта «1000 геномов».

Образец	МНС аллель А		МНС аллель В		МНС аллель С	
HG00114	01:01	03:01	07:02	08:01	07:01	07:02
HG00266	01:01	03:01	08:01	35:01	04:01	07:01
HG00345	01:01	03:01	08:01	35:01	04:01	07:01
HG00357	01:01	02:01	08:01	57:01	06:02	07:01
HG00473	02:07	33:03	46:01	58:01	01:02	03:02
HG01133	01:01	03:01	08:01	35:01	04:01	07:01
NA07056	01:01	02:01	08:01	57:01	06:02	07:01
NA11829	02:01	02:01	15:01	44:02	05:01	03:04
NA11831	01:01	03:01	07:02	08:01	07:01	07:02
NA11893	02:01	02:01	15:01	44:02	05:01	03:04
NA18542	11:01	33:03	46:01	58:01	01:02	03:02
NA18628	02:07	33:03	46:01	58:01	01:02	03:02
NA18632	11:01	33:03	46:01	58:01	01:02	03:02
NA18992	24:02	33:03	44:03	52:01	12:02	14:03
NA19085	24:02	33:03	44:03	52:01	12:02	14:03

гут быть представлены на поверхности клетки в значительном количестве. Стандартные пороговые значения связывания, используемые в алгоритмах предсказания составляют $IC_{50} < 50$ для сильно взаимодействия и $50 < IC_{50} < 500$ для слабого. Количество высокоаффинных пептидов в среднем составило 1012 (минимальное значение — 449, максимальное — 2648), а низкоаффинных 5794 (минимальное значение — 1805, максимальное — 9100), что составляет 2% и 11% от исходного среднего количества пептидов соответственно (**рис. 1**). Таким образом, абсолютное количество потенциальных минорных антигенов для пары донор-реципиент довольно велико, хотя необходимо оговорить, что это верхняя оценка этого значения, так как количество представляемых на поверхности клетки пептидов дополнительно регулируется специфичностью протеасомного расщепления и других факторов, ограничивающих разнообразие иммунопептидома.

Интересно отметить, что количество пептидов, связывающихся с МНС в общем довольно слабо зависит от количества исходных пептидов, подаваемых на вход программам предсказания как для высокоаффинных, так и для слабоаффинных пептидов (**рис. 2**). Это объясняется тем, что на количество связываемых пептидов влияет в первую очередь индивидуальный набор МНС аллелей. У доноров, имеющих одинаковые аллели, зависимость прослеживается лучше. Это хорошо видно на примере 3 индивидуумов, несущих одинаковые МНС аллели и, соответствен-

но, образующих 6 трансплантационных пар (**рис. 2**). Наблюдаемая в отдельных случаях незначительная обратная зависимость числа взаимодействующих пептидов от общего их количества, по-видимому, объясняются стохастическими эффектами, вносимыми уникальным набором SNP в каждой модельной трансплантации.

Количество пептидов, аффинных к МНС, существенно варьирует как между типами МНС аллелей (А, В и С), так и для конкретных аллелей внутри этих типов. Так, среднее значение количества сильно связывающихся пептидов для МНС аллелей типа А равно 153 с минимальным значением 8 пептидов для аллели А*02:07 и 476 пептидов для аллели А*02:01. Для аллелей типа В среднее значение составило 123 с минимумом 0 для аллелей В*52:01 и В*46:01 и максимумом 301 для аллели В*07:02. Соответствующие значения для аллелей типа С: 257, 0 (аллели С*01:02 и С*04:01), 901 (аллель С*05:01) (**рис. 3А**). Таким образом, уникальный набор МНС аллелей может существенно влиять на количество минорных антигенов в конкретной паре донор-реципиент.

Любопытно, что на проанализированной в данной работе выборке у значительной части доноров низкое количество высокоаффинных пептидов для отдельных МНС аллелей частично уравновешивается оставшимися аллелями, связывающими большое количество пептидов (**рис. 3В**). Это наблюдение может объясняться сцепленностью более и менее селективных МНС аллелей внутри гаплотипов и требует

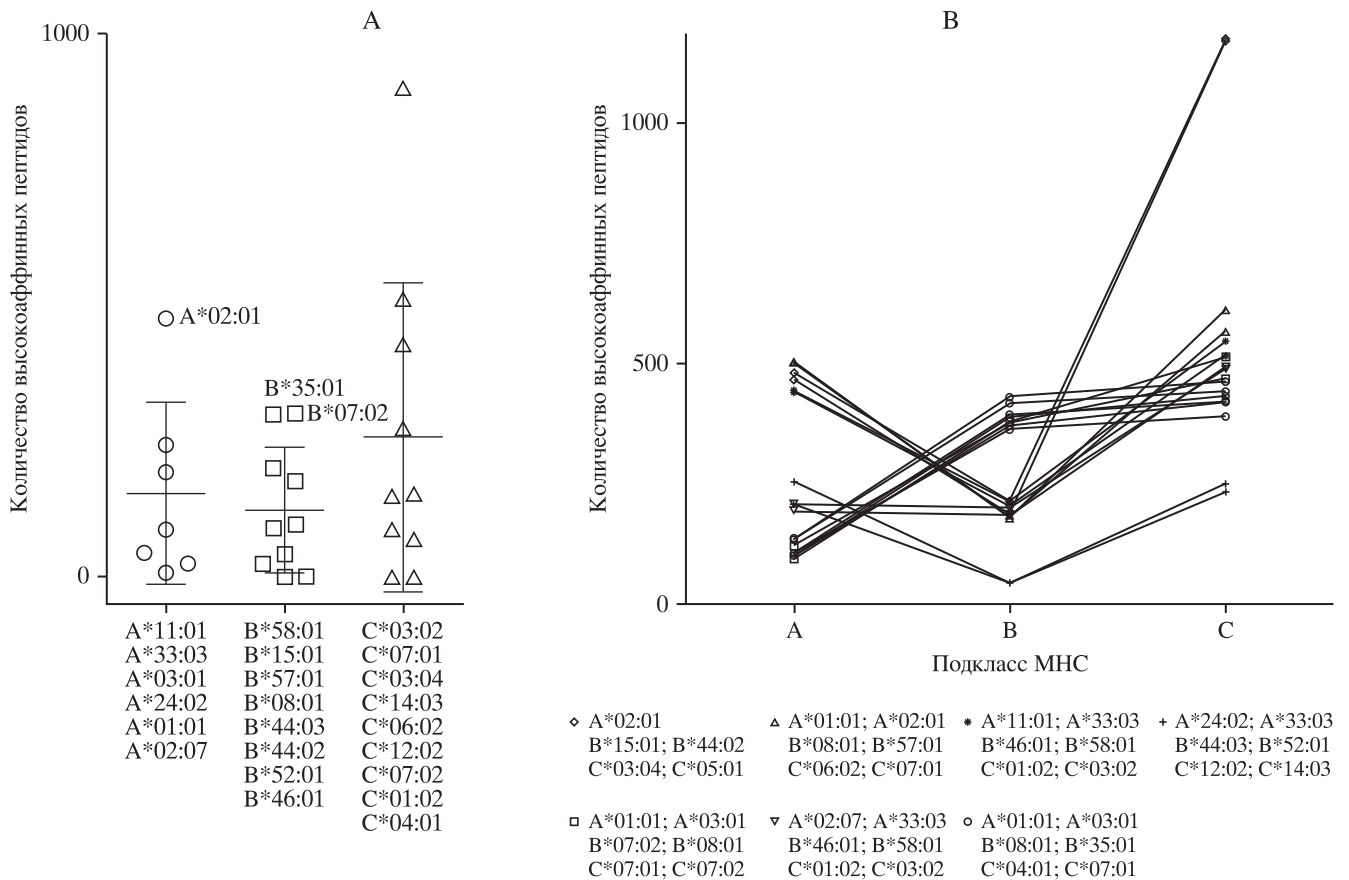


Рис. 3. Количество пептидов, связывающихся разными аллелями МНС. А — среднее количество пептидов, связывающихся с различными аллелями МНС. Для выбивающихся значений аллели указаны на графике. Остальные аллели указаны под горизонтальной осью в порядке убывания количества пептидов. Показано распределение значений, среднее значение и стандартное отклонение. В — суммарное количество пептидов, связывающихся с разными типами аллелей МНС (А, В, С) для каждой пары донор-реципиент. Значения для каждой пары объединены линиями и отмечены одинаковыми символами. Указан HLA генотип для каждой пары.

дальнейшей проверки на большей выборке данных.

Геномные полиморфизмы принято разделять на частые, встречающиеся в более 1% популяции, и редкие, которые встречаются в менее 1% популяции. В данной работе мы оценили соотношение частых и редких полиморфизмов, формирующих потенциально иммуногенные МАГ в парах изучаемых индивидуумов. Оказалось, что большинство связывающихся с МНС пептидов (83% высоко- и 84% низкоаффинных) формируется на основе редких и уникальных SNP (**рис. 4**). Интересно отметить, что полученные данные указывают, что количество SNP внутри одной пары может сильно отличаться в зависимости от направления пересадки (**рис. 4**).

Также было проанализировано распределение полиморфных пептидов по геному

(**рис. 5**). Исследуемые пептиды присутствуют на всех хромосомах. Было показано, что отдельные участки дают существенно повышенное количество пептидов, что как минимум в некоторых случаях вызвано наличием SNP, сдвигающими рамки считывания для обширных участков ДНК на одной из хромосом реципиента, которая приводит к трансляции большого количества нонсенс-продуктов. Подобными SNP, приводящими к образованию новых открыток рамок считывания, возможно, объясняется сильное различие в количестве потенциально иммуногенных полиморфизмов в зависимости от направления трансплантации внутри одной пары.

Важной характеристикой минорного антигена является его тканеспецифичность. Так, минорные антигены, представленные на кровяных клетках, могут участвовать в реакции «трансплантат против опухоли», в то вре-

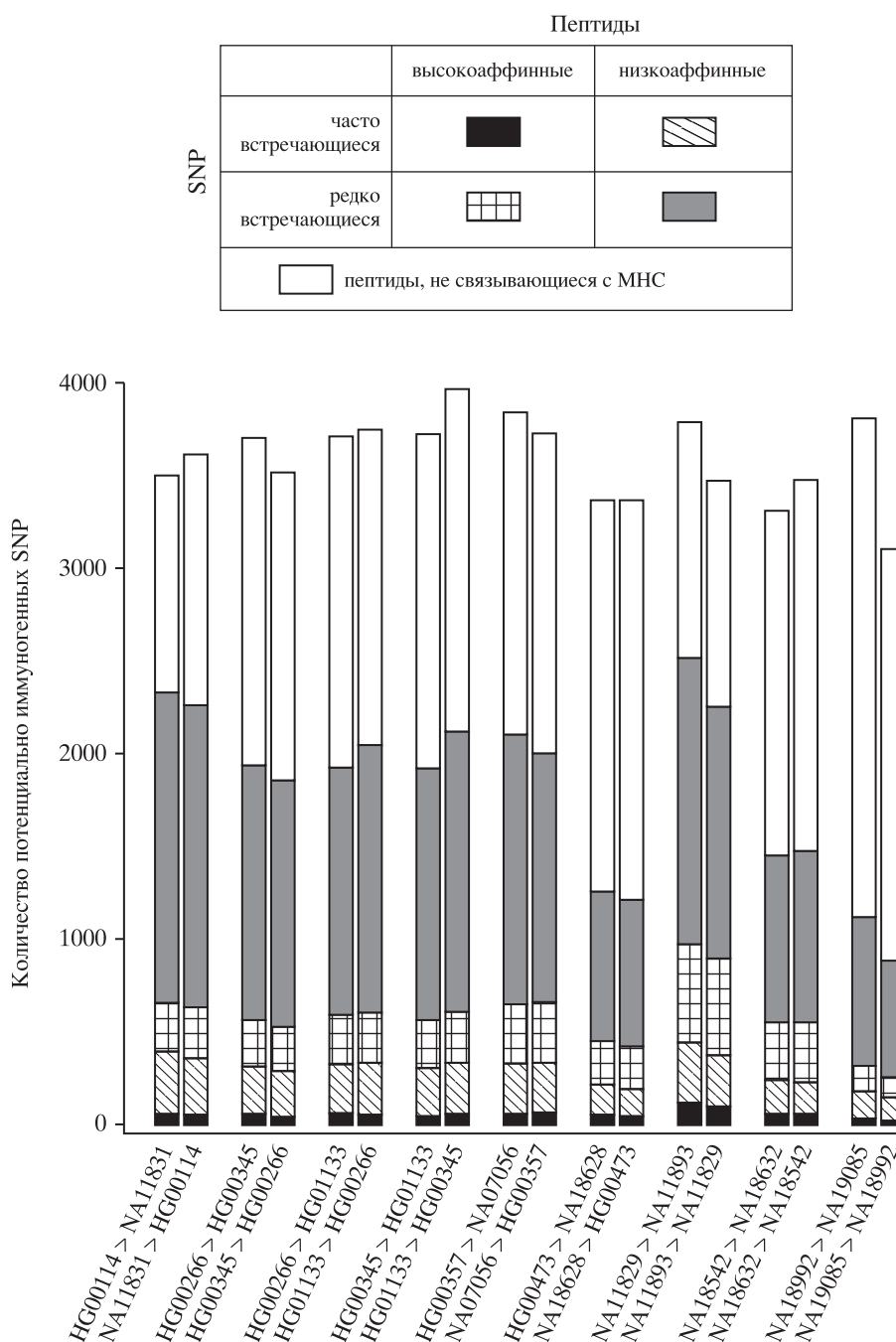


Рис. 4. Доля редко и часто встречающихся SNP среди потенциально иммуногенных полиморфизмов. Значения для симметричных персадов в пределах одной пары сгруппированы по оси X. Разные заливки отражают частоту встречаемости SNP силу связывания предсказанного полиморфного пептида с МНС, расшифровки представлены в таблице легенды.

мя как минорные антигены, представленные на поверхностях остальных клеток (в большей степени кожи, легких, печени), являются также мишенями реакции «трансплантат против хозяина». Мы использовали данные по экспрессии генов в различных тканях, полученных из ресурса Expression Atlas, чтобы исследовать распределение предсказанных

минорных антигенов в тканях. Эти данные существуют лишь для 10% белок кодирующих генов, поэтому и распределение по тканям было рассчитано только для небольшой части МАГ. Оказалось, что рассмотренные потенциальные минорные антигены присутствуют в одинаковом количестве во всех тканях за исключением кожи (рис. 6), что объясняется

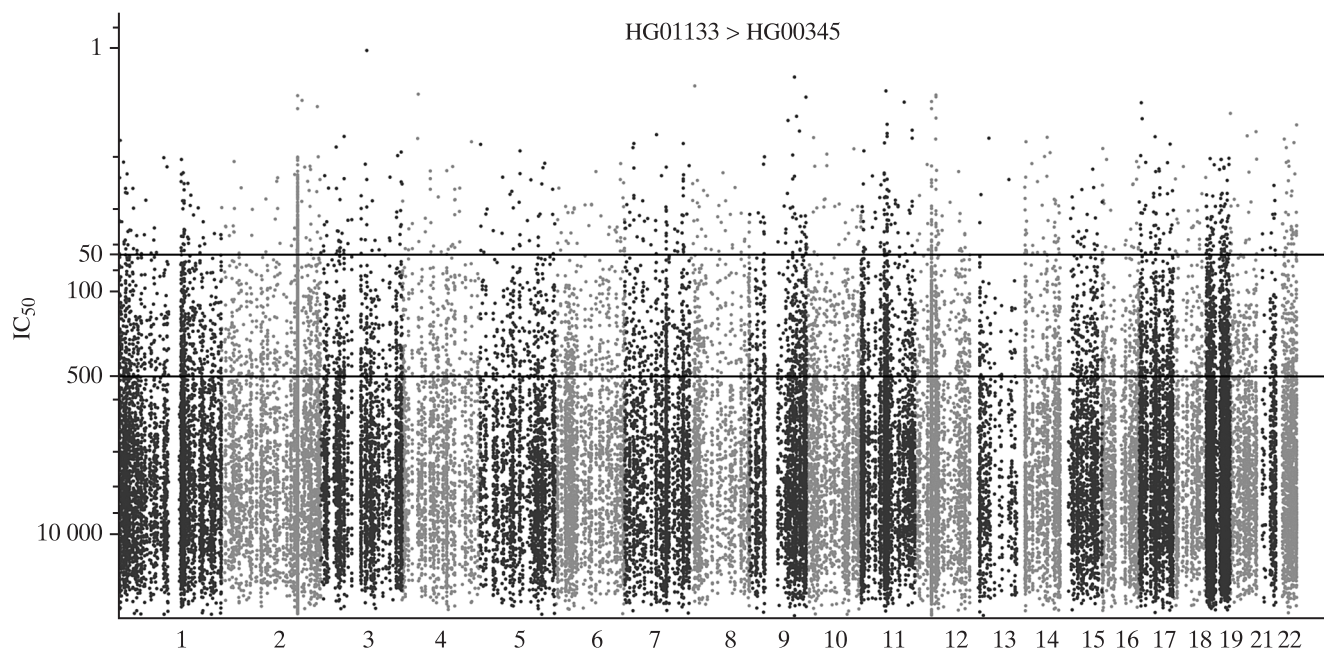


Рис. 5. Проекция потенциально иммуногенных полиморфизмов на геном на примере пары HG01133 > HG00345. Горизонтальные линии соответствуют пороговым значениям сильного и слабого связывания с МНС.

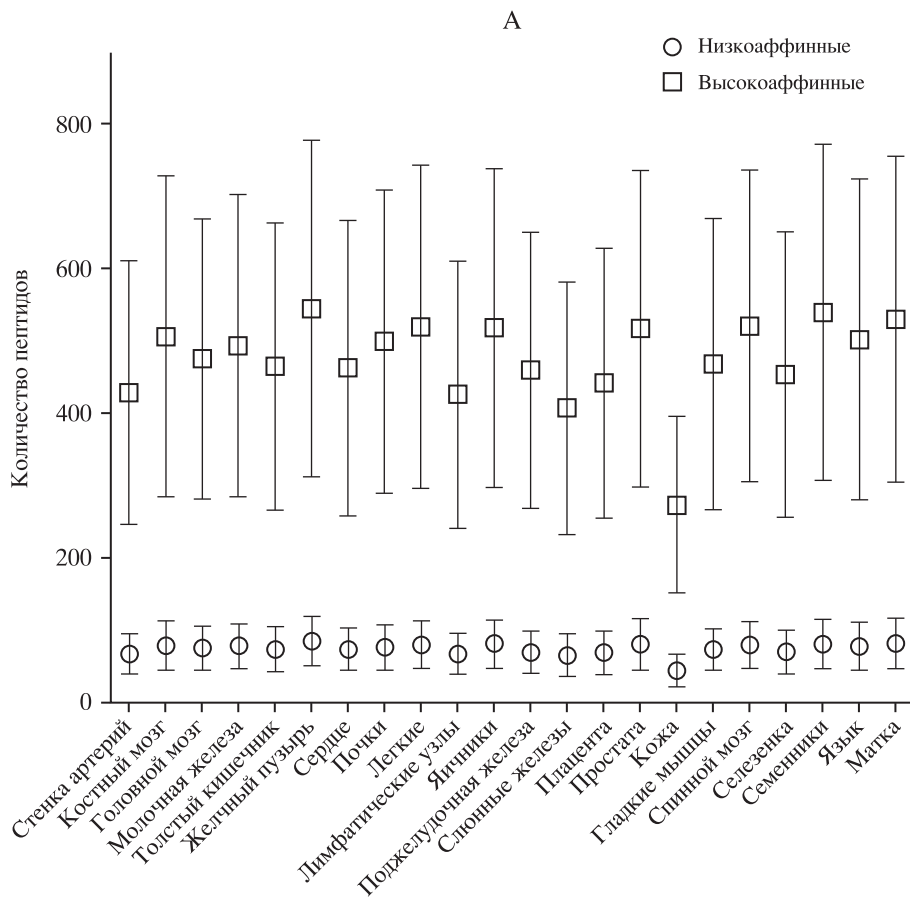


Рис. 6. Количество потенциально иммуногенных полиморфизмов в различных тканях. Показано среднее значение для 18 пар и стандартное отклонение.

меньшим количеством экспрессируемых в этой ткани генов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Целью данного проекта являлось *in silico* моделирование аллогенной трансплантации. Для этого были использованы публично доступные данные полногеномного секвенирования, которые позволяют вычислить для двух индивидуумов все отличающиеся полиморфизмы. Наличие в базе данных 9 пар доноров с одинаковыми наборами МНС аллелей позволило нам смоделировать 18 полностью HLA-совместимых трансплантаций. С помощью программ предсказания для каждой пары были предсказаны потенциально иммуногенные пептиды.

Мы показали, что главным фактором, влияющим на количество минорных антигенов, является набор МНС аллелей, в то время как индивидуальный набор полиморфизмов оказывает меньший эффект: в группах с одинаковыми наборами аллелей, как правило, наблюдается ожидаемая положительная корреляция количества аффинных к МНС пептидов и исходного количества пептидов. Существенное различие в количества аффинных пептидов для разных аллелей соотносится с описанными в литературе данными [29].

Мы также выявили, что большинство минорных антигенов в каждой паре происходит от редких и уникальных полиморфизмов, что указывает на то, что для определения мишеней РТПХ и РТПО генотипирования донора и реципиента по набору известных минорных антигенов может быть недостаточно и, возможно, потребуется применять подходы персонализированной медицины, основанные на полногеномном секвенировании. Доля SNP, приводящих к образованию аффинных к МНС пептидам, является оценкой сверху для количества потенциальных МАГ, она составила в среднем 10 и 40% для высоко- и низкоаффинных SNP соответственно. Ранее были опубликованы данные, в которых методом масс-спектрометрии оценивалась доля SNP, вызывающих образование потенциально иммуногенных пептидов в паре сиблингов [30]. При этом необходимо учитывать, что масс-спектрометрическое исследование иммунопептидома имеет относительно невысокую чувствительность [31], что означает, что эти данные могут служить оценкой снизу.

Анализ тканеспецифичности минорных антигенов в тканях показал, что в коже может

содержаться меньше МАГ по сравнению с остальными органами.

Хотя представленные данные основаны на расчетной константе связывания с МНС потенциал связывания с МНС, необходимо также учитывать, что набор пептидов дополнительно ограничивается работой протеасомы. В дальнейшем планируется добавить предсказание протеасомной деградации белков, однако по нашим оценкам соотношение исследуемых параметров существенно не изменится.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Surh C.D., Sprent J. T-cell apoptosis detected *in situ* during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 199, 372(6501), 100-3.
2. Babbitt B.P., Allen P.M., Matsueda G., Haber E., Unanue E.R. Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. 1985. *J Immunol.* 2005, 175(7), p. 4163-5.
3. Kanellopoulos-Langevin C., Caucheteux S.M., Verbeke P., Ojcius D.M. Tolerance of the fetus by the maternal immune system: role of inflammatory mediators at the fetomaternal interface. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003, 1, 121.
4. Felix N.J., Allen P.M. Specificity of T-cell alloreactivity. *Nat Rev Immunol.* 2007, 7(12), 942-53.
5. Armistead P.M., Liang S., Li H., Lu S., Van Bergen C.A., Alatrash G., St John L., Hunsucker S.A., Sarantopoulos S., Falkenburg J.H., Mollrem J.J. Common minor histocompatibility antigen discovery based upon patient clinical outcomes and genomic data. *PLoS One* 2011, 6(8), e23217.
6. Trowsdale J., Knight J.C. Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2013, 14, 301-23.
7. Tian S., Maile R., Collins E.J., Frelinger J.A. CD8+ T cell activation is governed by TCR-peptide/MHC affinity, not dissociation rate. *J Immunol.* 2007, 179(5), 2952-60.
8. Shlomchik W.D. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol.* 2007, 7(5), 340-52.
9. Spencer C.T., Gilchuk P., Dragovic S.M., Joyce S. Minor histocompatibility antigens: presentation principles, recognition logic and the potential for a healing hand. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010, 15(4), 512-25.
10. Wang W., Meadows L.R., den Haan J.M., Sherman N.E., Chen Y., Blokland E., Shabanowitz J., Agulnik A.I., Hendrickson R.C., Bishop C.E. Human H-Y: a male-specific histocompatibility antigen derived from the SMCY protein. *Science* 1995, 269(5230), 1588-90.
11. Dolstra H., Fredrix H., Maas F., Coulie P.G., Bras-seur F., Mensink E., Adema G.J., de Witte T.M., Figdor C.G., van de Wiel-van Kemenade E. A human minor histocompatibility antigen specific for

- B cell acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med.* 1999, 189(2), 301-8.
12. Murata M., Warren E.H., Riddell S.R. A human minor histocompatibility antigen resulting from differential expression due to a gene deletion. *J Exp Med.* 2003, 197(10), 1279-89.
 13. Gubarev M.I., Jenkin J.C., Leppert M.F., Buchanan G.S., Otterud B.E., Guilbert D.A., Beatty P.G. Localization to chromosome 22 of a gene encoding a human minor histocompatibility antigen. *J Immunol.* 1996, 157(12), 5448-54.
 14. Oostvogels R., Lokhorst H.M., Minnema M.C., van Elk M., van den Oudenalder K., Spierings E., Mutis T., Spaapen R.M. Identification of minor histocompatibility antigens based on the 1000 Genomes Project. *Haematologica* 2014, 99(12), 1854-9.
 15. Van Bergen C.A., Rutten C.E., Van Der Meijden E.D., Van Luxemburg-Heijs S.A., Lurvink E.G., Houwing-Duistermaat J.J., Kester M.G., Mulder A., Willemze R., Falkenburg J.H., Griffioen M. High-throughput characterization of 10 new minor histocompatibility antigens by whole genome association scanning. *Cancer Res.* 2010, 70(22), 9073-83.
 16. Spierings E. Minor histocompatibility antigens: past, present, and future. *Tissue Antigens.* 2014, 84(4), 374-60.
 17. Hoof I., Peters B., Sidney J., Pedersen L.E., Sette A., Lund O., Buus S., Nielsen M. NetMHCpan, a method for MHC class I binding prediction beyond humans. *Immunogenetics* 2009, 61(1), 1-13.
 18. Lundegaard C., Lamberth K., Harndahl M., Buus S., Lund O., Nielsen M. NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11. *Nucleic Acids Res.* 2008, 36 (Web Server issue), W509-12.
 19. Peters B., Sette A. Generating quantitative models describing the sequence specificity of biological processes with the stabilized matrix method. *BMC Bioinformatics* 2005, 6, 132.
 20. Gubin M.M., Zhang X., Schuster H., Caron E., Ward J.P., Noguchi T., Ivanova Y., Hundal J., Arthur C.D., Krebber W.J., Mulder G.E., Toebes M., Vesely M.D., Lam S.S., Korman A.J., Allison J.P., Freeman G.J., Sharpe A.H., Pearce E.L., Schumacher T.N., Aebersold R., Rammensee H.G., Melief C.J., Mardis E.R., Gillanders W.E., Artyomov M.N., Schreiber R.D. Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature* 2014, 515(7528), 577-81.
 21. Hombrink P., Hadrup S.R., Bakker A., Kester M.G., Falkenburg J.H., von dem Borne P.A., Schumacher T.N., Heemskerk M.H. High-throughput identification of potential minor histocompatibility antigens by MHC tetramer-based screening: feasibility and limitations. *PLoS One* 2011, 6(8), e22523.
 22. Feldhahn M., Donnes P., Schubert B., Schilbach K., Rammensee H.G., Kohlbacher O. miHA-Match: computational detection of tissue-specific minor histocompatibility antigens. *J Immunol Methods* 2012, 386(1-2), 94-100.
 23. Jameson-Lee M., Koparde V., Griffith P., Scalora A.F., Sampson J.K., Khalid H., Sheth N.U., Batalo M., Serrano M.G., Roberts C.H., Hess M.L., Buck G.A., Neale M.C., Manjili M.H., Toor A.A. In silico Derivation of HLA-Specific Alloreactivity Potential from Whole Exome Sequencing of Stem-Cell Transplant Donors and Recipients: Understanding the Quantitative Immunobiology of Allogeneic Transplantation. *Front Immunol.* 2014, 5, 529.
 24. Genomes Project C., Abecasis G.R., Auton A., Brooks L.D., DePristo M.A., Durbin R.M., Handsaker R.E., Kang H.M., Marth G.T., McVean G.A. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 2012, 491(7422), 56-65.
 25. Helmborg W., Dunivin R., Feolo M. The sequencing-based typing tool of dbMHC: typing highly polymorphic gene sequences. *Nucleic Acids Res.* 2004, 32(Web Server issue), W173-5.
 26. Rosenbloom K.R., Armstrong J., Barber G.P., Casper J., Clawson H., Diekhans M., Dreszer T.R., Fujita P.A., Guruvadoo L., Haeussler M., Harte R.A., Heitner S., Hickey G., Hinrichs A.S., Hubley R., Karolchik D., Learned K., Lee B.T., Li C.H., Miga K.H., Nguyen N., Paten B., Raney B.J., Smit A.F., Speir M.L., Zweig A.S., Haussler D., Kuhn R.M., Kent W.J. The UCSC Genome Browser database: 2015 update. *Nucleic Acids Res.* 2015, 43 (Database issue), D670-81.
 27. Petryszak R., Keays M., Tang Y.A., Fonseca N.A., Barrera E., Burdett T., Fullgrabe A., Fuentes A.M., Jupp S., Koskinen S., Mannion O., Huerta L., Megy K., Snow C., Williams E., Barzine M., Hastings E., Weisser H., Wright J., Jaiswal P., Huber W., Choudhary J., Parkinson H.E., Brazma A. Expression Atlas update—an integrated database of gene and protein expression in humans, animals and plants. *Nucleic Acids Res.* 2016, 44(D1), D746-52.
 28. Falk K., Rotzschke O., Stevanovic S., Jung G., Rammensee H.G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 1991, 351(6324), 290-6.
 29. Paul S., Weiskopf D., Angelo M.A., Sidney J., Peters B., Sette A. HLA class I alleles are associated with peptide-binding repertoires of different size, affinity, and immunogenicity. *J Immunol.* 2013, 191(12), 5831-9.
 30. Granados D.P., Sriranganadane D., Daouda T., Zieger A., Laumont C.M., Caron-Lizotte O., Boucher G., Hardy M.P., Gendron P., Cote C., Lemieux S., Thibault P., Perreault C. Impact of genomic polymorphisms on the repertoire of human MHC class I-associated peptides. *Nat Commun.* 2014, 5, 3600.
 31. Kumari S., Walchli S., Fallang L.E., Yang W., Lund-Johansen F., Schumacher T.N., Olweus J. Alloreactive cytotoxic T cells provide means to decipher the immunopeptidome and reveal a plethora of tumor-associated self-epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, 111(1), 403-8.

IN SILICO ANALYSIS OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM IMMUNOGENIC POTENTIAL IN FULLY HLA-MATCHED TRANSPLANTATION

N.A. Bykova*, D.B. Malko*, A.S. Vdovin*, G.A. Efimov*

National Research Center for Hematology, Moscow, Russia

RECEIVED: 29.01.2016. ACCEPTED: 19.02.2016

Nonsynonymous single nucleotide polymorphisms (SNP) in the human exome can give rise to changes in immunopeptidomes presented on the cell surface by the major histocompatibility complex (MHC). In the transplantation context such polymorphic peptides are known as minor histocompatibility antigens (MiHA). Together with MHC they play role in the development of alloreactivity after allogeneic transplantation. In the setting of fully HLA-matched transplantation, MiHA are the exclusive targets of alloreactive response. *In silico* modeling of transplantation could serve as a valuable prediction tool of immune response severity. To this end algorithms calculating interaction constants of polymorphic peptides with MHC may be employed. Currently large amount of human genome sequencing data is available that could be used to study SNP alloreactive potential. In the current project we used public genomic data to compute the number of potential MiHA in 18 MHC-matched pairs. The average number of potential immunogenic SNP in the analyzed pairs was 3594, 10% of them lead to formation of polymorphic peptides predicted to bind to MHC with high affinity. We showed that the major factor that influences the number of MiHA is a particular set of MHC alleles, while the individual set of SNP gives smaller impact. We also found that the majority of MiHA are caused by rare or unique SNP, which shows the importance of using personalized medicine approaches (full exome sequencing of donors and patients in particular) to predict immunogenic antigens in the transplantation setting.


Key words: transplantation, major histocompatibility complex MHC, minor histocompatibility antigens MiHA, alloreactivity, single nucleotide polymorphism трансплантация

Authors:

Bykova N.A., research associate, Laboratory of Transplantation Immunology National Research Center for Hematology, Moscow, Russia;

Malko D.B., Ph.D., research associate, Laboratory of Transplantation Immunology National Research Center for Hematology, Moscow, Russia;

Vdovin A.S., research associate, Laboratory of Transplantation Immunology National Research Center for Hematology, Moscow, Russia;

Efimov G.A.,  Ph.D., research associate, Laboratory of Transplantation Immunology National Research Center for Hematology, Moscow, Russia.

125167, Moscow, New Zykovsky pr., 4, National Research Center for Hematology. Phone: +7(495) 612-44-43. **E-mail:** efimov.g@blood.ru