

ВИЗНАЧЕННЯ *in silico* Т-ЕПІТОПІВ ПРОТЕЇНІВ *Mycobacterium tuberculosis*

О. І. Криніна
Д. В. Колибо
С. В. Комісаренко

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

E-mail: OlyaKrynina@gmail.com

Отримано 17.10.2014

Метою роботи був порівняльний аналіз *in silico* восьми відомих антигенів *Mycobacterium tuberculosis* (MPT83, MPT63, ESAT-6, CFP10, SodA, leuD, panD та HbHA) на предмет наявності Т-епітопів, що здатні зв'язуватись із декількома молекулами МНС II класу, кодованими найпоширенішими у східноєвропейській популяції алелями гена HLA-DRB1.

Одержані результати свідчать, що найбільш імуногенними є протеїни SodA, MPT83, leuD та MPT63, для яких було знайдено найбільшу кількість Т-епітопів серед досліджуваних алелів. Відповідно ці антигени або їх комбінації є перспективними для створення новітніх вакцин та діагностикумів з метою формування протитуберкульозного імунітету серед широкого кола жителів східноєвропейського регіону та визначення стану захищеності популяції.

Ключові слова: *Mycobacterium tuberculosis*, Т-епітоп.

Туберкульоз — це інфекційне захворювання, що наразі широко розповсюджене у всьому світі і є другою за значущістю причиною смерті серед інфекційних хвороб, поступаючись лише ВІЛ/СНІДу. Вважають, що майже третина населення планети є переносником збудника туберкульозу — *M. tuberculosis*, проте активна форма туберкульозу розвивається лише в 0,01–0,1% інфікованих. Так, згідно з даними ВООЗ, у 2013 р. було зареєстровано 8,6 млн. випадків захворювання на туберкульоз і 1,3 млн. людей померли від нього [1]. Туберкульоз вже тривалий час залишається однією із глобальних проблем здоров'я людей. Ефективний контроль захворюваності на туберкульоз потребує вдосконалення існуючих засобів діагностики. Перспективним є також створення новітніх вакцин для формування протективного імунітету в популяції на основі антигенів патогенних мікроорганізмів, які мають високу імуногенність і здатні зв'язуватися з різними молекулами генного комплексу HLA (англ. *Human Leucocyte Antigens*), що кодує молекули головного комплексу гістосумісності (*major histocompatibility complex*, МНС) у людей.

На цей час єдиним засобом імунізації людей проти туберкульозу є вакцина БЦЖ (фр. *BCG* — *Bacillus Calmette-Guérin*). Три-

вала практика її застосування виявила велику кількість недоліків, серед яких одним з найважливіших є нестабільна ефективність у різних географічних регіонах планети. Тому контроль захворюваності на туберкульоз потребує створення безпечних вакцин, які б індукували стійкий протективний імунітет у людей в різних частинах світу, а також вдосконалення існуючих засобів діагностики цього захворювання.

Вивчення особливостей імунного розпізнавання бактеріальних протеїнів відіграє важливу роль у передбаченні їхніх імуногенних властивостей. Саме тому аналіз наявності Т-епітопів у структурі антигенів є необхідним для конструювання новітніх вакцин, а також створення засобів діагностики та імунотерапії інфекційних захворювань. Відбір протеїнових антигенів до складу діагностикумів і вакцин зазвичай базується на біохімічних та імунологічних дослідженнях, які включають імунізацію тварин цими антигенами, дослідження особливостей імунної відповіді й аналізі антигенних властивостей цих протеїнів на великих популяційних вибірках. Зазначені дослідження дають змогу одержати необхідну інформацію, проте вони потребують великих фінансових затрат і часу. Протягом останніх років з розвитком програмного за-

безпечення для прогнозування епітопів стало можливим зменшити число протеїнів для потенційних досліджень, що дало змогу зменшити кількість експериментів *in vitro* та *in vivo*. На сьогодні є багато доступних інтернет-ресурсів та інструментів для вивчення взаємодій пептид–МНС і проведення прогнозування *in silico* наявності в структурі протеїнових антигенів епітопів для В-й Т-лімфоцитів [2].

Т-хелперні лімфоцити розпізнають антигенні детермінанти (або Т-епітопи) протеїнів у комплексі з молекулою головного комплексу гістосумісності II класу. Саме ця взаємодія ініціює початкові етапи активації Т-хелперів, зумовлені сигнальною трансдукцією від антигенспецифічного рецептора TCR (*T-cell receptor*). Диференційовані Т-хелпери регулюють розвиток адаптивної імунної відповіді шляхом безпосередньої або гуморальної активації низки імунокомпетентних клітин, таких як макрофаги, Т-кілери, В-лімфоцити.

Т-хелперні клітини відіграють важливу роль у контролі мікобактеріальних інфекцій через продукування цитокіну IFN- γ та наступній активації бактерицидних механізмів макрофагів [3]. Для активації Т-хелпер має одержати відповідний сигнал від спеціалізованих антигенпрезентуючих клітин, які представляють імуногенні Т-епітопи у комплексі з молекулами МНС II класу.

Молекули МНС II класу зв'язуються з пептидними фрагментами, отриманими від антигенів, та експресуються на поверхні антигенпрезентувальних клітин. Вони експресуються на поверхні антигенпрезентуючих клітин і зв'язуються з пептидними фрагментами антигенів. Довжина приєднуваних пептидів залежить від будови епітопзв'язувального сайту молекули і може варіювати в межах від 11 до 18 амінокислотних залишків, при цьому основна кірва зв'язувальна ділянка пептидів складається з 9 залишків. Молекули МНС II класу є високополіморфними, особливо їхні пептидзв'язувальні домени [4]. Унаслідок цього різні алельні варіанти молекул МНС II класу здатні «знаходити» і зв'язувати різні Т-епітопи у структурі однієї поліпептидної послідовності.

Різні демографічні популяції людей характеризуються наявністю характерних частот алелів МНС II класу, що може зумовлювати загальні особливості вияву імуногенних властивостей протеїнів для певної популяції. Цим можна пояснити різну чутливість окремих популяцій до різноманітних інфекційних агентів, а також несталу ефективність

вакцин, застосовуваних у різних регіонах. Саме тому передбачення вияву імуногенних властивостей протеїнів мікобактерій для східноєвропейської популяції дасть змогу зосередити увагу на найбільш перспективних протеїнових антигенах для включення їх до складу вакцин чи діагностиків.

Прогнозування зв'язування з МНС II класу є складним процесом, тому було розроблено різні алгоритми для полегшення ідентифікації Т-епітопів у протеїнових антигенах. Наразі існує велика кількість біоінформаційних інструментів *in silico*, які використовують для прогнозування зв'язування протеїнових антигенів чи пептидних послідовностей з певними алелями молекул МНС II класу. Частина алгоритмів засновано на використанні позиційно-вагових матриць для пошуку консервативних мотивів у послідовності, що відповідають за зв'язування. Інші методи уможливають передбачення взаємодії з молекулою МНС за допомогою множинного вирівнювання пептидів та з використанням штучних нейронних мереж [5].

Отже, метою роботи був пошук характерних для населення Східної Європи алелів гена HLA та антигенів мікобактерій, які, згідно з експериментальними даними, можуть бути використані для створення діагностичних і терапевтичних імунологічних препаратів. Основним є оцінювання *in silico* наявності в обраних антигенах Т-епітопів, що здатні зв'язуватись з різними продуктами алелів генів HLA, обраними саме для східноєвропейської популяції.

Матеріали і методи

Відбір антигенів мікобактерій для аналізу

Для вибору антигенів *M. tuberculosis* було застосовано базу даних VIOLIN: Vaccine investigation and online information network, яка доступна за посиланням <http://www.violinet.org/>. Цей веб-ресурс об'єднує і зберігає відомості наукових та клінічних досліджень стосовно вакцин, створених для боротьби з інфекційними захворюваннями з невідомими епідеміологічними показниками, особливо у слаборозвинених країнах [6]. На цей час у базі нараховується 3 248 існуючих вакцин та вакцин на різних стадіях клінічного розроблення для 200 патогенних організмів або неінфекційних захворювань, зокрема раку [7].

Спочатку за під базою Vaxquery здійснювали пошук інформації про *M. tuberculosis*. Далі у розділі II «Пов'язані з вакцинами патогенні гени» (англ. *Vaccine Related Pathogen*

Genes) обирали невеликі антигени з довжиною послідовності приблизно 100–200 а.к. Для кожного протеїну на сторінці наявні основні характеристики, посилання на нього в інших базах даних (NCBI, Genbank), а також амінокислотна послідовність у форматі FASTA, яка є необхідною на етапах прогнозування епітопів.

Вибір алелів гена HLA

Для відбору алелів гена HLA було використано інтернет-ресурс Allele frequency net database, який містить відомості про частоти генів імунної системи та алелів, що їм відповідають, для різних демографічних популяцій. Дані й пошукові інструменти є у вільному доступі через портал <http://www.allelefrequencies.net>. На 2014 рік база даних містила інформацію з 1427 популяцій щодо частоти генів із різних поліморфних регіонів, таких як лейкоцитарний антиген людини (HLA), імуноглобулінподібних рецепторів НК-клітин, генів, подібних до МНС класу I, та низку поліморфних генів цитокінів [8]. Вибір алелів гена HLA здійснено для популяцій, які належать до регіону Східної Європи, за умови, що розмір вибірки (*sample size*) становить не менше 100 осіб. Рівень роздільної здатності (*level of resolution*) обирали рівним 4 цифрам (4 digits).

Програмні засоби для прогнозування зв'язування антигенів M. tuberculosis із молекулами МНС II класу

ProPred аналіз антигенів M. tuberculosis

ProPred — графічний веб-інструмент, який дає змогу проводити пошук ділянок антигенної послідовності, що можуть зв'язуватись із декількома алелями HLA-DR. Цей сервер реалізовує алгоритм прогнозування на основі матриць з використанням амінокислотних/позиційних коефіцієнтів, розрахованих із дослідних даних. Прогнозовані результати можуть бути представлені у вигляді піків на графіку або забарвлених амінокислотних залишків у HTML-інтерфейсі [9]. Для пошуку епітопів антигенів було використано обрані алелі HLA-DR за значення величини порогу 3%.

RANKPEP-аналіз антигенів M. tuberculosis

RANKPEP — пошуковий алгоритм на основі позиційно-вагових матриць, який дає можливість передбачити наявність епітопів Т-лімфоцитів у послідовності антигену [10]. Результати аналізу на сайті подано у вигляді таблиці, яка містить послідовності прогнозованих пептидів, їхню молекулярну масу та розташування у загальній послідовності, а також оцінку для конкретного пептиду

й відсоткове значення відносно консенсусної послідовності для даного профілю. Пептиди, які вірогідно добре зв'язуються з відповідними алелями, забарвлені у червоний колір. Аналіз антигенів проведено за стандартних налаштувань (значення величини порогу для даного інструмента 2%) для 10 обраних алелів гена HLA-DR.

Прогнозування епітопів антигенів M. tuberculosis за допомогою NetMHCIIpan

NetMHCIIpan — онлайн-ресурс, який використовує алгоритм штучних нейронних мереж для прогнозування зв'язування протеїнів з молекулами МНС II класу [11]. Цей метод є доступним на сайті www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/. Результат оцінюють в одиницях IC_{50} , при цьому пептиди, що мають значення $IC_{50} < 50$ nM, мають високу спорідненість до кожного обраного алеля гена HLA-DR.

Аналіз антигенів M. tuberculosis на основі SMM-align методу

SMM-align — метод аналізу зв'язування пептидів та молекул МНС II класу на основі матриць, що включає фланкуючі залишки поза зв'язувальним доменом [12]. Метод є доступним за інтернет-адресою <http://tools.immuneepitope.org/mhcii/>. Оцінювання результатів здійснюється з розрахованими для кожного пептиду значеннями IC_{50} . Аналіз антигенів було проведено для восьми обраних алелів HLA-DR. Пептиди, що мають значення $IC_{50} < 500$ nM, вважали такими, що здатні зв'язуватись із молекулами МНС II класу.

Результати та обговорення

Для порівняльного аналізу епітопів за допомогою бази даних VIOLIN було обрано такі антигени *M. tuberculosis*: MPT83, MPT63, ESAT-6, CFP10, SodA, leuD, panD та HBHA (табл. 1).

Багато досліджень присвячено імунобіологічним властивостям антигенів мікобактерій з ензиматичною активністю. У біосинтезі лейцину у *M. tuberculosis* одним із ключових ензимів є протеїн leuD. Ген *leuD* активно експресується у хворих як з активною, так і з латентною формою туберкульозу, що дає підстави припустити причетність цього протеїну до розвитку захворювання [20]. Делеція зазначеного гена виявила втрату здатності штаму бактерії розмножуватись у макрофагах та мишах і підтвердила імуногенність leuD [21].

Схожий підхід було застосовано для визначення антигенних властивостей ензиму panD, який каталізує одну з реакцій синтезу пантотенової кислоти — ключової ланки метаболізму ліпідів. Було створено мутантний

Таблиця 1. Характеристика відомих антигенів мікобактерій

Функціональна група	Назва антигена	Локус гена	кДа	Посилання
Структурні протеїни	MPT83	Rv2873	22	13
	HBHA	Rv0475	21,5	14
Секреторні протеїни	MPT63	Rv1926c	17	15
	ESAT-6	Rv3875	6	16
	CFP10	Rv3874	10	17
Ензими	SodA	Rv3846	23	18
	leuD	Rv2987c	22	18
	panD	Rv3601c	15	19

штам з відсутнім геном *panD*, який не спричинював активного розвитку захворювання в імунodefіцитних мишей порівняно зі штамом дикого типу [22].

Протеїн SodA має різноманітну активність, основою якої є швидке знешкодження супероксидних радикалів. Зменшуючи утворення IFN- γ та вивільнення токсичних радикалів, протеїн пригнічує процеси апоптозу макрофагів і погіршує набуття адаптивного імунітету [23, 24]. Секреція цього протеїну перешкоджає ранній елімінації мікобактерій і зумовлює подальший розвиток захворювання [25].

Під час активної проліферації *M. tuberculosis* спостерігається секреція протеїну MPT63. Імунологічна характеристика біохімічно очищеного MPT63 свідчить, що протеїн є імуногенним та індукуює антитіла [26]. Експериментально показано стимуляцію продукції антигеном IFN- γ у мононуклеарних клітинах периферійної крові. Також у цьому дослідженні для MPT63 з використанням засобів біоінформатики здійснено пошук ділянок, що зв'язуються з МНС II класу [27].

Комплекс секреторних протеїнів *M. tuberculosis* CFP10 та ESAT-6 відіграє важливу роль у патогенезі туберкульозу. Їхні гени регулюються координаційно, часто експресуються у вигляді димера [28]. ESAT-6 і комплекс ESAT-6/CFP10 впливає на утворення IFN- γ , а також підвищує синтез інтегринів, що сприяє адгезії макрофагів і призводить до утворення гранульоми [29].

MPT83 — поверхневий ліпопротеїн, виділений з культури *M. tuberculosis*, який має антигенні властивості. Є дані, згідно з якими MPT83 — основний протеїн, що стимулює клітинну відповідь клітин Th1. Також він може викликати імунну відповідь у HLA-гетерогенних донорів і зв'язуватися з молекулами, що кодуються різними алелями HLA [30]. Інший мембранний протеїн — гепаринзв'язувальний гемаглютинін (HBHA), який забезпечує позалегенове розповсюдження мікобактерій, опосередковуючи взаємодію з епітеліальними, але не з фагоцитарними клітинами [31, 32].

Вибір алелів гена HLA-DRB1

Першим етапом аналізу зв'язування обраних протеїнів *M. tuberculosis* із Т-лімфоцитами був пошук алелів гена HLA-DRB1, поширених на території Східної Європи. За допомогою інтернет-ресурсу Allele*Frequencies Всесвітньої бази даних популяцій було отримано список алелів HLA-DRB1 та їх частоту у представників певних країн. У табл. 2 наведено найпоширеніші для аналізованого регіону алелі та відповідні країни з мінімальними і максимальними значеннями частоти.

Для подальшого аналізу вибирали лише ті алелі, які є доступними у всіх програмах для прогнозування зв'язування досліджуваних антигенів з молекулами МНС II класу. Таким чином із представлених 13 алелів HLA-DRB1 було обрано 8: 0101, 0301, 0401, 0404, 0701, 1101, 1302 та 1501.

Прогнозування епітопів

Прогнозування епітопів проводили з використанням онлайн-програм Propred, RANKPEP, NetMHCIIpan та SMM-align. Робота обраних програм ґрунтується на різних алгоритмах, таких як штучні нейронні мережі (NetMHCIIpan), позиційно-вагові матриці (RANKPEP), матриці TEPITOPE (Propred). У низці експериментів було продемонстровано, що передбачення зв'язування з використанням одного ресурсу не можна вважати достовірним через низькі показники точності, специфічності й чутливості окремого алгоритму. Застосування консенсусного підходу (з декількома різними алгоритмами) дає змогу одержати результати, які точніше відповідатимуть експериментальним даним.

Отже, за допомогою чотирьох різних методів було визначено сумарну кількість епітопів, що зв'язуються з різними молекулами МНС II класу. Середні значення кількості епітопів наведено в табл. 3 для кожного з восьми обраних антигенів.

З метою візуалізації результатів передбачення зв'язування антигенами мікобактерій молекул МНС II класу, що кодуються різними алелями гена HLA, на основі середніх зна-

Таблиця 2. Алелі гена HLA-DRB1, поширені в регіоні Східної Європи

Алель	Мінімум		Максимум		Середня частота	
	Частота	Країна	Частота	Країна		
DRB1*01:01	0,046	Туреччина	0,101	Польща	0,074	✓
DRB1*03:01	0,067	Македонія	0,115	Польща	0,091	✓
DRB1*04:01	0,012	Македонія	0,128	Білорусь	0,070	✓
DRB1*04:02	0,010	Чехія	0,051	Греція	0,031	
DRB1*04:04	0,006	Македонія	0,025	Польща	0,016	✓
DRB1*07:01	0,038	Хорватія	0,162	Чехія	0,100	✓
DRB1*08:01	0,006	Греція	0,040	Польща	0,023	
DRB1*11:01	0,065	Польща	0,185	Україна	0,125	✓
DRB1*11:04	0,042	Польща	0,186	Греція	0,114	
DRB1*13:01	0,020	Греція	0,118	Хорватія	0,069	
DRB1*13:02	0,023	Македонія	0,042	Туреччина	0,033	✓
DRB1*14:01	0,014	Хорватія	0,058	Македонія	0,036	
DRB1*15:01	0,037	Хорватія	0,128	Польща	0,083	✓

Таблиця 3. Кількість епітопів антигенів *M. tuberculosis* для 8 різних алелів гена HLA-DRB1, що її отримано з використанням 4 різних алгоритмів

Алелі HLA-DRB1	MPT83	SodA	leuD	MPT63	panD	HBHA	ESAT-6	CFP10	Умовна порівняльна гістограма
0101	26	24	20	19	14	22	13	7	
0301	4	4	7	2	5	3	2	2	
0401	16	15	11	14	7	6	10	5	
0404	11	10	8	9	6	3	5	2	
0701	10	13	10	10	8	6	3	2	
1101	7	14	10	5	5	5	4	3	
1302	4	8	6	6	5	2	2	2	
1501	7	10	6	6	7	2	2	1	

чень кількості епітопів було побудовано гістограми (подано в останньому стовпчику). Вони відображають порівняльний аналіз кількості епітопів обраних протеїнів мікобактерій залежно від різних алелів DRB1, поширених у людей східноєвропейського регіону.

Виходячи із цих даних можна зробити висновок, що найбільш імуногенними є протеїни SodA, MPT83 та leuD. Для них знайдено найбільшу кількість епітопів майже для кожного з досліджуваних алелів. Ці протеїни вирізняються з-поміж інших більшою довжиною амінокислотної послідовності (207, 220 та 198 відповідно), що корелює з кількістю і різноманіттям виділених в їхній структурі епітопів.

Проміжну позицію займають протеїни MPT63, panD та RD1, які також демонструють високий рівень зв'язування з обраними молекулами МНС II класу. Проте для цих протеїнів було визначено певні алелі DRB1, для яких кількість можливих епітопів істотно відрізняється від загального рівня. Так, згідно з табл. 3 фрагменти протеїну MPT63 з найменшою ймовірністю будуть презентовані у комплексі з молекулами МНС II класу, кодованими алелями DRB1*03:01 та DRB1*11:01.

У послідовностях протеїнів HBHA, ESAT-6, CFP10 було виділено найменшу кількість імовірних епітопів. За результатами комп'ютерного аналізу ці протеїни є менш імуноген-

Таблиця 4. Прогнозовані *in silico* епітопи протеїнів мікобактерій

Протеїн	Потенційний епітоп	Алелі HLA-DRB1
HBHA	LLAALGAAD	0101, 0401, 0701, 1501
leuD	FRVVISSRF	0101, 0401, 0404, 0701, 1101, 1501
	FVLNLSPFD	0101, 0401, 0404, 1101
	ИТААТТТТ	0101, 0401, 0701, 1302
	WRSDPAFVL	0101, 0301, 0401, 0404, 0701
panD	FVDAYNKPI	0101, 0401, 0701, 1101, 1302
	LHYVGSVTI	0101, 0404, 0701, 1501
	VIGINGAAA	0101, 0404, 1302, 1501
SodA	FDKFRAQFH	0101, 0401, 0404, 0701
	ILLNEKNLA	0101, 0301, 0401, 0404, 1101, 1302
	LAFNLGHV	0101, 0701, 1302, 1501
	VKVDFAKAF	0101, 0301, 0701, 1302
	YDHQTNFPL	0101, 0401, 0701, 1302
ESAT-6	IMYNYPAML	0101, 0301, 0401, 0404, 0701, 1302, 1501
	LVRAYHAMS	0101, 0401, 0404, 0701, 1101, 1501
	YHAMSSTHE	0101, 0401, 0404, 1501
MPT63	IATFAAPVA	0101, 0401, 0404, 1501
	IKTAVAVVA	0101, 0401, 0404, 1302
	IRGSVTPAV	0101, 0401, 0404, 0701, 1302
	VNAIRGSVT	0101, 0404, 0701, 1501
	VVAMAAIAT	0101, 0401, 0701, 1501
MPT83	FDKLPAATI	0101, 0401, 0404, 0701, 1101
	LKTDKLLS	0301, 0401, 0404, 1101
	LSSILTYHV	0101, 0401, 0404, 0701, 1101, 1501
	LSTLTSALS	0101, 0401, 0404, 1101, 1501
	YHVIAGQAS	0101, 0401, 0404, 0701, 1101, 1501

ними, проте, маючи невелику кількість епітопів, вони здатні розпізнаватися імунною системою і викликати імунну відповідь.

Серед загальної кількості прогнозованих *in silico* за допомогою програм SMM-align та NetMHCIIrap епітопів антигенів було обрано збіжні пептиди, які здатні зв'язуватися з молекулами MHCII у 50% однакових досліджуваних алелів. У табл. 4 наведено кóрові послідовності епітопів завдовжки 9 амінокислот, антигени мікобактерій, у структурі яких ці епітопи виявлено, та перелік алелів HLA-DRB1. Комбінації цих пептидів, у разі підтвердження їхньої імуногенності в дослідках *in vitro* та *in vivo*, можуть бути використані для створення новітніх вакцин проти туберкульозу. Такі вакцини потенційно можна застосовувати для жителів східноєвропейського регіону, геноми яких містять різні алелі гена HLA-DRB1.

Таким чином, із використанням різних імунологічних баз даних було обрано 8 про-

теїнів, які забезпечують вірулентність мікобактерій і беруть участь у патогенезі туберкульозу. Аналіз розповсюдження різних алелів гена HLA-DRB1 виявив найбільш характерні алелі для жителів країн Східної Європи. Надалі було проведено прогнозування Т-епітопів *in silico*, яке є показовим та швидким способом зібрати, продемонструвати й порівняти основні характеристики цільових антигенів.

За допомогою біоінформаційних алгоритмів визначено найбільш імуногенні для представників східноєвропейської популяції антигени *M. tuberculosis*, які, у свою чергу, є перспективними для створення новітніх вакцин та тест-систем. Ці діагностичні чи терапевтичні препарати здатні забезпечити формування стійкого протективного імунітету і сприяти ефективному виявленню та ліквідації захворювання. Використання таких імунних препаратів у майбутньому позитивно позначатиметься на показниках захворюваності на туберкульоз на території Східної Європи.

REFERENCES

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2013. Available at: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.
2. Yang X., Yu X. An introduction to epitope prediction methods and software. *Rev. Med. Virol.* 2009, 19 (2), 77–96.
3. Orme I. M., Cooper A. M. Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis. *Immunol. Today.* 1999, 20 (7), 307–312.
4. Lin H. H., Zhang G. L., Tongchusak S., Reinherz E. L., Brusica V. Evaluation of MHC-II peptide binding prediction servers: applications for vaccine research. *BMC Bioinformatics.* 2008, 9 (12). doi: 10.1186/1471-2105-9-S12-S22.
5. Wang P., Sidney J., Dow C., Mothé B., Sette A., Peters B. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS Comput. Biol.* 2008, 4 (4).
6. Xiang Z., Todd T., Ku K. P., Kovacic B. L., Larson C. B., Chen F., Hodges A. P., Tian Y., Olenzek E. A., Zhao B., Colby L. A., Rush H. G., Gilsdorf J. R., Jourdain G. W., He Y. VIOLIN: vaccine investigation and online information network. *Nucleic Acids Res.* 2008, 36 (Database issue), 923–928.
7. Vaccine Investigation and Online Information Network (VIOLIN) Statistics. Available at: <http://www.violinet.org/stat.php>.
8. Gonzalez-Galarza F. F., Christmas S., Middleton D., Jones A. R. Allele frequency net: database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acid Research.* 2011, 39 (Database issue), 913–919.
9. Singh H., Raghava G. P. S. ProPred: Prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics.* 2001, 17 (12), 1236–1237.
10. Reche P. A., Glutting J. P., Reinherz E. L. Prediction of MHC class I binding peptides using profile motifs. *Human Immunolog.* 200, 63 (9), 701–709.
11. Nielsen M., Justesen S., Lund O., Lundegaard C., Buus S. NetMHCIIpan-2.0 — Improved pan-specific HLA-DR predictions using a novel concurrent alignment and weight optimization training procedure. *Immun. Res.* 2010, 6 (9), 1–10.
12. Kim Y., Ponomarenko J., Zhu Z., Tamang D., Wang P., Greenbaum J., Lundegaard C., Sette A., Lund O., Bourne P. E., Nielsen M., Peters B. Immune epitope database analysis resource. *Nucl. Acids Res.* 2012, 40 (Database issue), 525–530.
13. Juarez M. D., Torres A., Espitia C. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* region containing the mpt83 and mpt70 genes. *FEMS Microbiol Lett.* 2001, 203 (1), 95–102.
14. Menozzi F. D., Bischoff R., Fort E., Brennan M. J., Locht C. Molecular characterization of the mycobacterial heparin-binding hemagglutinin, a mycobacterial adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998, 95 (21), 12625–12630.
15. Manca C., Lyashchenko K., Wiker H. G., Usai D., Colangeli R., Gennaro M. L. Molecular cloning, purification, and serological characterization of MPT63, a novel antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 1997, 65 (1), 16–23.
16. Shams H., Klucar P., Weis S. E., Lalvani A., Moonan P. K., Safi H., Wizel B., Ewer K., Nepom G. T., Lewinsohn D. M., Andersen P., Barnes P. F. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* peptide that is recognized by human CD4+ and CD8+ T cells in the context of multiple HLA alleles. *J. Immunol.* 2004, 173 (3), 1966–1977.
17. Tully G., Kortsik C., Hohn H., Zehbe I., Hitzler W. E., Neukirch C., Freitag K., Kayser K., Maeurer M. J. Highly focused T cell responses in latent human pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* 2005, 174 (4), 2174–2184.
18. Stewart G. R., Wernisch L., Stabler R., Mangan J. A., Hinds J., Laing K. G., Young D. B., Butcher P. D. Dissection of the heat-shock response in *Mycobacterium tuberculosis* using mutants and microarrays. *Microbiology.* 2002, 148 (10), 3129–3138.
19. Gopalan G., Chopra S., Ranganathan A., Swaminathan K. Crystal structure of uncleaved L-aspartate-alpha-decarboxylase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteins.* 2006, 65 (4), 796–802.
20. Kumar M. L., Khan F. G., Sharma S., Kumar R., Faujdar J., Sharma R., Chauhan D. S., Singh R., Magotra S. K., Khan I. A. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* genes preferentially expressed during human infection. *Microb Pathog.* 2011, 50 (1), 31–38.
21. Hondalus M. K., Bardarov S., Russell R., Chan J., Jacobs W. R. Jr., Bloom B. R. Attenuation of and protection induced by a leucine auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 2000, 68 (5), 2888–2898.
22. Sambandamurthy V. K., Wang X., Chen B., Russell R. G., Derrick S., Collins F. M., Morris S. L., Jacobs W. R. Jr. A pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* is highly attenuated and protects mice against tuberculosis. *Nath. Med.* 2002, 8 (10), 1171–1174.
23. Jain R., Dey B., Khera A., Srivastav P., Gupta U. D., Katoch V. M., Ramanathan V. D., Tyagi A. K. Over-expression of superoxide dismutase obliterates the protective effect of BCG against tuberculosis by modulating innate and adaptive immune responses. *Vaccine.* 2011, 29 (45), 8118–8125.

24. Liao D., Fan Q., Bao L. The role of superoxide dismutase in the survival of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2013, 66 (6), 480–488.
25. Edwards K. M., Cynamon M. H., Voladri R. K., Hager C. C., DeStefano M. S., Tham K. T., Lakey D. L., Bochan M. R., Kernodle D. S. Iron-cofactored superoxide dismutase inhibits host responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 2001, 164 (12), 2213–2219.
26. Nagai S., Wiker H. G., Harboe M., Kinomoto M. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 1991, 59 (1), 372–382.
27. Mustafa A. S. Th1 cell reactivity and HLA-DR binding prediction for promiscuous recognition of MPT63 (Rv1926c), a major secreted protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand. J. Immunol.* 2009, 69 (32), 13–22.
28. Berthet F. X., Ramussen P. B., Rosenkrands I., Andersen P., Gicquel B. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology.* 1998, V. 144, P. 3195–3203.
29. Wang X., Barnes P. F., Dobos-Elder R. M., Townsend J. C., Chung Y. T., Shams H., Weis S. E., Samten B. ESAT-6 inhibits production of IFN- γ by *Mycobacterium tuberculosis*-responsive human T cells. *J. Immunol.* 2009, 182 (6), 3668–3677.
30. Mustafa A. S. Comparative evaluation of MPT83 (Rv2873) for T helper-1 cell reactivity and identification of HLA-promiscuous peptides in *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated healthy subjects. *Clin. Vaccine Immunol.* 2011, 1752–1759.
31. Menozzi F. D., Rouse J. H., Alavi M., Laude-Sharp M., Muller J., Bischoff R., Brennan M. J., Loch C. Identification of a heparin-binding hemagglutinin present in mycobacteria. *J. Exp. Med.* 1996, 184 (3), 993–1001.
32. Krishnan N., Robertson B. D., Thwaites G. The mechanisms and consequences of the extrapulmonary dissemination of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb).* 2010, 90 (6), 361–366.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ *in silico* Т-ЭПИТОПОВ ПРОТЕИНОВ *Mycobacterium tuberculosis*

О. И. Крынина
Д. В. Колибо
С. В. Комисаренко

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

E-mail: OlyaKrynina@gmail.com

Целью работы был сравнительный анализ *in silico* восьми известных антигенов *Mycobacterium tuberculosis* (MPT83, MPT63, ESAT-6, CFP10, SodA, leuD, panD и HBHA) на предмет наличия Т-эпитопов, которые способны связываться с несколькими молекулами МНС класса II, кодированными наиболее распространенными в восточноевропейской популяции аллелями гена HLA-DRB1.

Полученные результаты свидетельствуют, что наиболее иммуногенными являются протеины SodA, MPT83, leuD и MPT63, для которых было найдено наибольшее количество Т-эпитопов среди исследуемых аллелей. Соответственно эти антигены либо их комбинации могут быть перспективными для создания новейших вакцин и диагностикумов с целью формирования противотуберкулезного иммунитета среди широкого круга жителей восточноевропейского региона, а также определения состояния защищенности популяции.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, Т-эпитоп.

In silico DETERMINATION OF T-EPITOPES OF *Mycobacterium tuberculosis* PROTEINS

O. I. Krynina
D. V. Kolibo
S. V. Komisarenko

Palladian Institute of Biochemistry of the
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: OlyaKrynina@gmail.com

The comparative analysis of 8 antigens of *Mycobacterium tuberculosis* (MPT83, MPT63, ESAT-6, CFP10, SodA, leuD, panD and HBHA) *in silico* to determine T-epitopes that can bind MHC class II molecules coding the most common in Eastern Europe HLA-DRB1 alleles was the goal of the work.

The results show that the most immunogenic proteins are SodA, MPT83, leuD and MPT63, which have the largest number of T-epitopes for the alleles of interest. Accordingly, these antigens or their combinations could be promising candidates for development of new vaccines and diagnostics to form anti-TB immunity in Eastern European region and to determine the state of protection of the population.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, T-epitope.