

Zárójelentés

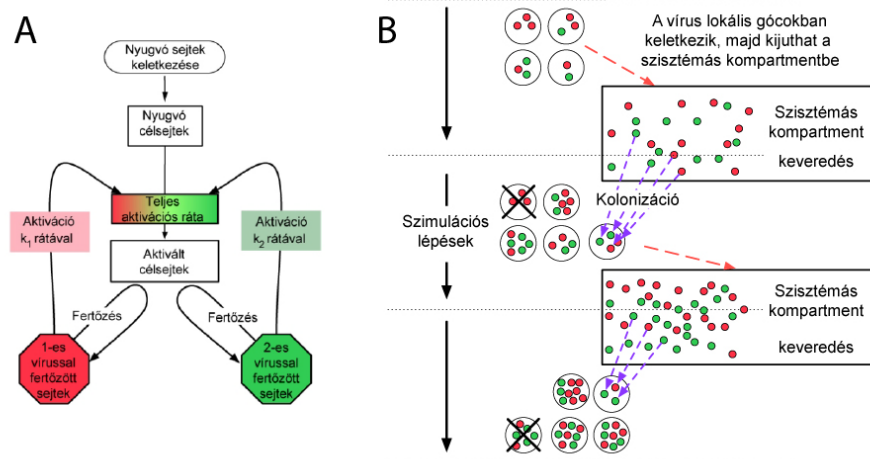
In silico virológia és immunológia: modellezés, szimuláció és adatelemzés

A pályázat keretében a HIV-fertőzés folyamatait vizsgáltuk a molekulák szintjétől egészen a járványok szintjéig, a matematikai és szimulációs modellezés, illetve a komplex adatelemzés módszereinek segítségével. Az OTKA támogatása hozzájárult e hazánkban fiatalnak számító tudományterület megőrzéséhez és megerősítéséhez: a témavezetőkön kívül két fiatal kutató és egy doktorandusz vett részt a kutatásokban, akikre a jövőben további kutatások építhetők. A publikált kutatási eredmények zömében nyílt hozzáféréssel olvashatók: Open Access kiadványok esetén a kiadó, egyéb esetekben az MTA REAL archívumának honlapján (a legfrissebb, nem nyílt hozzáférésű cikkek kéziratát az előírt várakozási idő után fogjuk feltölteni az archívumba). Az egyes kutatási témák az alkalmazott módszerek, illetve a vizsgálati szintek szerint többszörös átfedéssel, hálózatosan kapcsolódnak egymáshoz: alább igyekeztünk laza tematikus sorrendbe fűzni az eredményeket. Az eredeti munkatervben szereplő kutatásokat MT rövidítéssel, a többi *új* projektként jelöljük.

1. Az immunaktiváció és a kapcsolódó patogenezis evolúciója HIV-ben (MT)

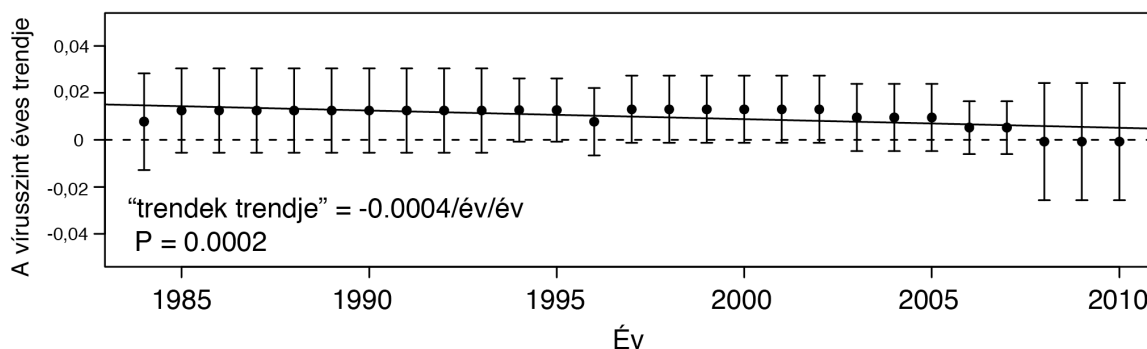
A kóros immunaktiváció a HIV-fertőzés patogenezisének kulcsfolyamata, de nem világos, hogy ez a folyamat magának a vírusnak hasznos-e, avagy evolúciós „véletlen”. Az immunaktiváció lehetséges előnye (a vírus számára), hogy az aktivált immunsejtek hatékonyabban fertőzhetőek. Modelljeink (1. ábra) segítségével azonban megmutattuk, hogy ez csak rövid hatósugarú aktivációs hatás esetén jelent valódi szelekciós előnyt a szervezetben belüli vírusváltozatok versengésében [1]. Mivel a fertőzés patogenezise elsősorban a hosszú hatótávú aktivációhoz köthető, van remény arra, hogy a patogenezis mechanizmusa idővel eltűnjön – amennyiben szétkapcsolható a stabilizáló szelekció alatt álló lokális immunaktiváció képességétől. Az eredményeket egy hazai és egy külföldi konferencián, valamint egy tudományos közleményben mutattuk be.

1. ábra. A HIV által okozott immunaktiváció modelljei. Két vírusváltozat verseng, amelyek eltérő hatékonysággal aktiválják a célsejteket. A szisztémás (hosszú hatótávú) modellben (A) a hatás a teljes rendszerben érvényesül, míg a lokális modellben (B) a fertőzés helyi gócjaira korlátozódik.



2. A HIV virulenciájának evolúciója (új)

A vírus betegségkötő képességének (virulenciájának) evolúcióját a populáció szintjén is vizsgáltuk, ezúttal az adatelemzés módszereivel. A virulencia mérőszámaként nem kezelt páciensekben mért klinikai paramétereket (a CD4-sejtszám kezdeti értéke, illetve fogyási sebessége; vírusszint) választottunk, ezek változását, időbeli tendenciáit vizsgáltuk nagy számú HIV-fertőzött adatain. Olaszországi adatok elemzésével a nyolcvanas évek óta növekvő virulenciára találtunk bizonyítékot [2], ami azonban ellentmondott korábbi, svájci adatokon kapott eredményeinknek [3]. Mivel más kutatócsoportok hasonló vizsgálatai szintén vegyes következtetésekre jutottak, meta-analízissel vizsgáltuk a rendelkezésre álló adatokból kirajzolódó konszenzusos képet [4]. Eredményeink szerint az európai és észak-amerikai HIV-járványban a virulencia az elmúlt három évtizedben összességében nőtt, a növekedés üteme azonban szerencsére lassul (2. ábra). Az eredményeket egy hazai és két külföldi konferencián, valamint két tudományos közleményben mutattuk be. Végül ehhez a témához kapcsolódóan áttekintő cikkben tárgyaltam a HIV virulenciájának öröklött (vírusgenetikai) hátterét alátámasztó eredményeket, illetve azok elméleti következményeit [5].



2. ábra. Az átlagos vírusszint növekedésének évekre lebontott rátái (a populáció szintjén). A ráták csökkenése lassuló trendet jelez: a szaggatott vonal stabil átlagos vírusszintnek felel meg.

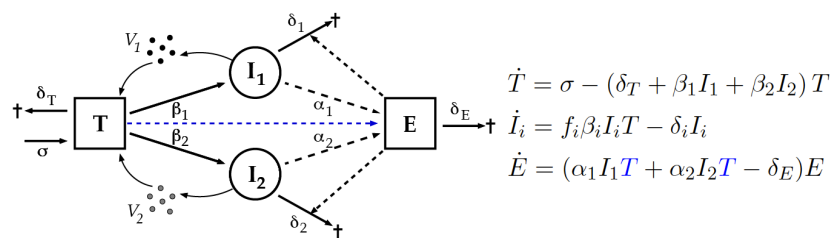
3. A rasszok és a HIV betegségprogresszió kapcsolata (MT)

A vírus génjei mellett az emberi gazdaszervezet genetikai háttere is hatással van a HIV-fertőzés lefolyására. Mi svájci adatokon (ahol a HIV-fertőzöttek körében viszonylag magas az afrikai bevándorlók aránya) azt mutattuk ki, hogy az afrikai származású páciensekben átlagosan lassabb a CD4-sejtszám csökkenése, mint az európai származású fertőzöttekben [6]. Eredményeink szerint a különbség fő oka, hogy az afrikai eredetű fertőzöttek szervezete jobban tolerálja a magas vírusszinteket. Az eredményeket a legrangosabb retrovírus konferencián (CROI) és tudományos közleményben mutattuk be.

4. A HIV-felülfertőződés gyakorisága és következményei (~MT)

Felülfertőződésről akkor beszélünk, ha egy HIV-fertőzött ember egy későbbi kontaktusban újabb HIV-törzssel fertőződik. Az ilyen eseményeknek elvben komoly következményei lehetnek: az új vírustörzs megváltoztathatja a betegség lefolyását, vagy akár a gyógyszerek hatását csökkentő rezisztenciamutációkat is hozhat magával. Matematikai modellek segítségével megvizsgáltuk, mi a felülfertőződés várható hatása, különféle lehetőségeket (pl. az immunválasz lehetséges működési módjait) feltételezve. Megállapítottuk, hogy a legtöbb esetben a felülfertőződés szükségképpen maga után vonja a klinikai állapot (CD4-sejtszám) romlását, mivel az új vírustörzs csak abban az esetben képes elszaporodni a régi mellett (esetleg ki is szorítva azt), ha hatékonyabban elkerüli az immunválaszt, vagy hatékonyabban hasznosítja a fertőzhető sejteket. Néhány esetben azonban más a helyzet: ha az immunválasz keresztreaktivitást mutat (vagyis mindkét törzsre ugyanaz a válasz hat: 3. ábra) vagy a CD4-sejtek fogyása döntően a nyugvó sejtek aktivációján múlik, akkor előfordulhat, hogy a felülfertőződés hatására emelkedik a CD4-sejtszám. Ezt az intuíciónak ellentmondó eredményt két külföldi konferencián mutattuk be, jelenleg a tudományos közlemény kéziratán dolgozunk.

3. ábra. A HIV-fertőzés egyik lehetséges modelljének sémája és egyenletei. Ezen a példán ugyanazok az effektoros immunsejtek (E) képesek mindkét (az eredeti, illetve a felülfertőző) típusú vírussal fertőzött sejteket (I1 és I2) elpusztítani: a hatás az f vagy a delta paraméterekbe épül be. Egyes modellváltozatokban az immunválasz hatékonysága a CD4+ célsejtek (T) szintjétől is függött (kék nyíl és kiemelés).



A modellezés mellett adatelemzéssel is vizsgáltuk a HIV-felülfertőződést, nagy kollaboratív páneurópai adatbázisra építve. Olyan pácienseket vehettünk bele a vizsgálatba, akikből legalább két időpontból rendelkezésre állt (részleges) vírusszekvencia, így következtetni lehetett a két szekvencia rokonsági fokára, esetleges független eredetére. Módszerünk lényege, hogy egy óriási szekvencia-adatbázisból választunk „hasznos” szekvenciákat egy-egy páciens valamennyi szekvenciájához, és az így kapott szekvenciahalmazból építünk törzsfát: ha a páciens szekvenciái különböző pontokon kapcsolódnak a háttérszekvenciák fájához (vagyis nem monofiletikusak), gyanítható a felülfertőződés. A projekt során rengeteg gyakorlati nehézséggel szembesültünk. A rendelkezésre álló szekvenciaszakasz viszonylag gyenge filogenetikai szignált tartalmaz, és többedszeri próbálkozásra sikerült csak olyan elemzési módszert találni, amely megbízható eredményt ad. Az eredmények ellenőrzése során (újraszekvenálás, amit a külföldi partnerek végeztek) kiderült, hogy a legtöbb felülfertőzés-gyanús eset a laborokban elcserélt mintákból származott. A módszerünk működik, a jövőben is alkalmazható lesz felülfertőződés kimutatására rutin genotípusos adatokból – a felülfertőződés azonban rendkívül ritka a vizsgált populációban. A projektet motiváló eredeti kérdéseinkre azonban meggyőző – és szerencsére megnyugtató – választ kaptunk: a gyógyszerrezisztencia génjeinek terjedésében elhanyagolható szerepet játszik a felülfertőzés. Az

eredményeket két hazai és egy külföldi konferencián mutattuk be. A napokban kaptuk meg az utolsó validációs szekvenálások adatait (a régi minták szekvenálásával is nehézségek adódtak), ezek feldolgozása után hamarosan lezárjuk és tudományos közleményben publikáljuk az eredményeket.

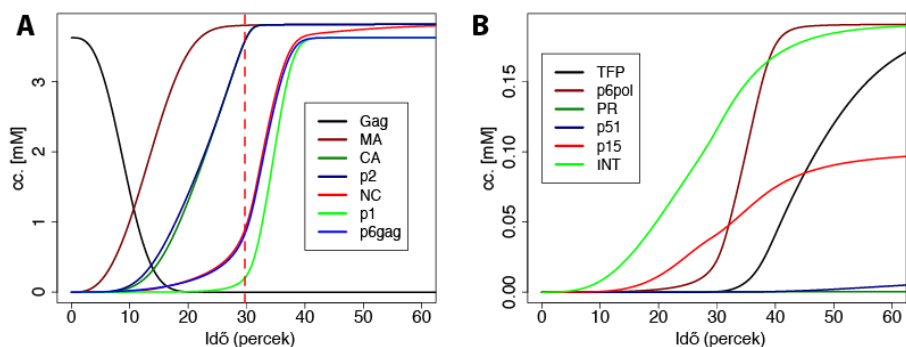
5. Gyógyszerrezisztencia: további eredmények (Új)

A HIV gyógyszerrezisztenciájához kapcsolódóan még két kollaboratív tanulmányban vállaltunk részt [7, 8]. A fő cél a tényleges rezisztenciaprofil (fenotípus) jóslása az érintett vírusgének szekvenciájának (genotípus) ismeretében. Kovariációs analízissel kerestük azokat a kompenzációs mutációkat, amelyek helyreállítják az egyik legfontosabb gyógyszer-célpontot jelentő virális proteáz enzim működőképességét az elsődleges rezisztenciamutációk megjelenése után [7]. Megállapítottuk, hogy a jelenlegi genotípusból fenotípust jósló szakértői rendszerek hasonló hatékonysággal teljesítenek, ami alighanem arra utal, hogy a jelenlegi alapelveket követő módszerek elérték a teljesítőképességük határát [8]. Végül e témában egy *Science*-cikkről részletes kritikát jelentettünk meg [9].

6. Proteáz hasítás modellezése a vírusrészecskék érése során (MT)

Reakciókinetikai modellt építettünk a vírusérés egyik kulcsfolyamatának modellezésére. A fertőzött sejtről lefűződő vírusrészecskék a HIV főbb fehérjét összekapcsolt poliproteinek (Gag és Gag-Pol) formájában tartalmazzák: a vírus fertőzővé válásához a poliproteineket fel kell darabolni, amit a virális proteáz enzim végez. Ez a folyamat a proteázgátló gyógyszerek célpontja. Modellünk nyomon követi (egyetlen vírusrészecskére skálázva) a hasítás közti- és végtermékeit, illetve a különféle enzimformákat, amelyek maguk is több hasítási lépésben szabadulnak fel (4. ábra).

4. ábra. Szemelvények a proteáz hasítási folyamat modelljének eredményeiből: a Gag (A) és a Pol (B) poliproteinek hasítási végtermékeinek (szabad monomerek) időbeli lefutása. A piros szaggatott vonal a vírusérés feltételeinek teljesülését jelzi. (A PR és RT enzimek elsősorban dimer formájában vannak jelen).



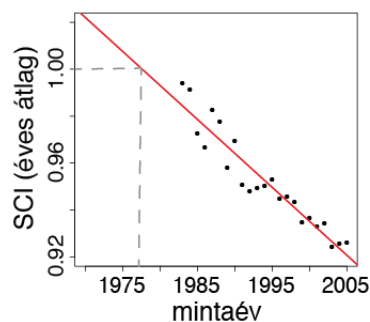
A kísérleti irodalomból származó paraméterbecsléseket alkalmazva a modell reális időtávot (kb. fél óra) ad az érési folyamatra (amelynek teljesülési kritériumait szintén az empirikus adatok alapján adtuk meg). A modell érzékenységi vizsgálatával megállapítottuk, hogy a vírusérés idejére (így áttételesen alighanem a vírus fertőzőképességére) a hasítási folyamatot elindító önhasító lépés, valamint a Gagben található CA/p2 hasítás sebessége van a legnagyobb hatással – e két rátához képest az összes többi (37) paraméter hatása elhanyagolható. A két paraméter közötti kompenzációs dinamikát multiplikatív kölcsönhatás jellemzi, míg a két lépés együttes gátlása additív kölcsönhatást

mutat. A proteázgátló gyógyszerek kötődését modellezve magyarázatot találtunk az erre a gyógyszer családra jellemző meredek dózis-hatás (dose-response) görbékre: az érési folyamathoz kevés szabad proteáz molekula is elegendő, így az inhibitorhatás csak olyan koncentrációnál kezd érvényesülni, ahol már szinte valamennyi enzim molekula kötésben van (vagyis érvényes lesz a „kritikus halmaz” modell: [10]). Az eredmények a jövőben elősegíthetik a HIV elleni terápiák optimalizálását, új gyógyszer-célpontok azonosítását. Kutatásainkat egy hazai és egy külföldi konferencián mutattuk be; a hasítási folyamat absztrakt, általános leírásáról tudományos közleményt publikáltunk [11], a vírusérés részletes modelljéről szóló cikket néhány héten belül benyújtjuk közzésre.

7. Szekvenciaelemzés (új)

A HIV-1 B szinonim kodonjainak diverzifikációját vizsgáltuk közel két évtizedet átfogó, nyilvános adatokon (>50000 szekvencia a Los Alamos HIV adatbázisból). Megállapítottuk, hogy a szinonim kodonok konzerváltsága az evolúció neutrális modelljének várakozásával egyezően, egyenletes rátával erodálódik (5. ábra). Figyelemre méltó azonban, hogy a diverzifikáció sebessége (évi 0,3%) körülbelül ötször lassabb annál, ami a vírus becsült generációs ideje és pontmutációs rátája alapján adódna. Elképzelhető, hogy a HIV effektív generációs ideje a korábban becsülnél jóval hosszabb, amire egy lehetséges magyarázat, ha a fertőzési láncok hosszú életű sejteket is tartalmaznak. Alternatív lehetőség, ha a diverzifikációt a nukleotid-sorrendre ható stabilizáló szelekció lassítja. Az eddigi eredményeket két külföldi konferencián mutattuk be. A projekt lezárása a többi párhuzamos kutatás miatt csúszik, de mindenképpen az idei évben várható.

5. ábra. A HIV-1 B altípus szinonim kodonjainak diverzifikációja. SCI: a kodonok átlagos konzerváltsága az adott évből származó szekvenciákban. Az SCI=1 érték feltehetőleg a szekvenciák közös őst jelöli, amit a módszer 1977-re becsül.



Egy további, rokon kutatásba is bekapcsolódtunk: széles együttműködés keretében azt vizsgáljuk, hogy a gazda (humán) genom milyen hatást gyakorol a vírus genomjára. Nagy számú (~1 millió) humán SNP és a páciensekből izolált teljes HIV-szekvenciák polimorfizmusai között keresünk korrelált párokat. Az eddigi vizsgálatok az MHC régió és ismert HIV epitopok között találtak összefüggést, ami a HIV elleni immunválasz hatását tükrözheti. Az előzetes eredményeket külföldi konferencián mutattuk be, tudományos közlemény az év második felében várható.

8. A járványos HIV-törzsek eredetének szimulációs vizsgálata (új)

Végül a molekulák után következnek a járvány szintjének modellezése. Részletes irodalmi, illetve újonnan feldolgozott levéltári adatokra építve azt vizsgáltuk, milyen feltételek tehetők lehetővé a HIV-járvány(ok) elindulását, körülbelül száz évvel ezelőtt Afrikában [12]. Az adatok, illetve az ezekre épülő szimulációs modell segítségével megállapítottuk, hogy a HIV kezdeti terjedésében kulcsfontosságú szerepet játszhattak a gyarmati időkben rendkívül elterjedt bakteriális nemi betegségek, amelyek nemi szervi fekélyeket okozva „kaput nyitnak” a HIV-fertőzésnek, jelentős mértékben növelve az átadódás kockázatát. Feltehető, hogy e „kedvező” környezet nélkül a HIV nem indulhatott volna el világhódító útjára, a további HIV-törzsek elterjedésének pedig a bakteriális járványok megfékezése szabhatott gátat a múlt század negyvenes éveitől. A kutatás fontos tanulsága, hogy a nemi szervi fekélyt okozó egyéb betegségeket kordában kell tartani, mert újbóli emelkedésük újabb HIV-törzsek számára nyithatna utat. Eredményeinket egy hazai és két külföldi konferencián, egy tudományos [12] és egy (OTKA-ÉT cikkpályázaton második díjat nyert) népszerűsítő [13] közleményben mutattuk be.

A kutatás mérlege: 9 impaktos ($\sum IF=45.865$) és 2 további folyóiratcikk, 1 könyvfejezet, 19 konferenciaprezentáció (ebből 8 a pályázat résztvevőinek szóbeli előadása), 4 további cikk előkészületben.

Amennyiben a pályázat minősítését az egy éven belül várható négy további (túlnyomórészt a pályázatból finanszírozott kutatásokra épülő) publikáció érdemben módosíthatja, úgy kérem, hogy ezeket a későbbiekben kiegészítő eljárásban szíveskedjenek figyelembe venni.

Irodalom

1. Bartha, I.; Simon, P.; Müller, V. Has HIV evolved to induce immune pathogenesis? *Trends Immunol.* **2008**, *29*, 322-328.
2. Müller, V.; Maggiolo, F.; Suter, F.; Ladisa, N.; De Luca, A.; Antinori, A.; Sighinolfi, L.; Quiros-Roldan, E.; Carosi, G.; Torti, C. Increasing clinical virulence in two decades of the Italian HIV epidemic. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000454.
3. Müller, V.; Ledergerber, B.; Perrin, L.; Klimkait, T.; Furrer, H.; Telenti, A.; Bernasconi, E.; Vernazza, P.; Günthard, H.F.; Bonhoeffer, S. Stable virulence levels in the HIV epidemic of Switzerland over two decades. *AIDS* **2006**, *20*, 889-894.
4. Herbeck, J.T.; Müller, V.; Maust, B.S.; Ledergerber, B.; Torti, C.; Di Giambenedetto, S.; Gras, L.; Günthard, H.F.; Jacobson, L.P.; Mullins, J.I.; Gottlieb, G.S. Is the virulence of HIV changing? A meta-analysis of trends in prognostic markers of HIV disease progression and transmission. *AIDS* **2012**, *26*, 193-205.
5. Müller, V.; Fraser, C.; Herbeck, J.T. A strong case for viral genetic factors in HIV virulence. *Viruses* **2011**, *3*, 204-216.
6. Müller, V.; von Wyl, V.; Yerly, S.; Boni, J.; Klimkait, T.; Burgisser, P.; Ledergerber, B.; Günthard, H.F.; Bonhoeffer, S. African descent is associated with slower CD4 cell count decline in treatment-naïve patients of the Swiss HIV Cohort Study. *AIDS* **2009**, *23*, 1269-1276.

7. Sloom, P.M.; Coveney, P.V.; Ertaylan, G.; Müller, V.; Boucher, C.A.; Bubak, M. HIV decision support: from molecule to man. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* **2009**, *367*, 2691-2703.
8. Frenz, D.; Boucher, C.A.; Assel, M.; De Luca, A.; Fabbiani, M.; Incardona, F.; Libin, P.; Manca, N.; Müller, V.; B, O.N.; Paredes, R.; Prospero, M.; Quiros-Roldan, E.; Ruiz, L.; Sloom, P.M.; Torti, C.; Vandamme, A.M.; Van Laethem, K.; Zazzi, M.; van de Vijver, D.A. Comparison of HIV-1 genotypic resistance test interpretation systems in predicting virological outcomes over time. *PLoS One* **2010**, *5*, e11505.
9. Abecasis, A.B.; Müller, V. Dynamics of transmitted HIV-1 drug resistance - the San Francisco model. *AIDS Rev* **2010**, *12*, 122-123.
10. Shen, L.; Rabi, S.A.; Sedaghat, A.R.; Shan, L.; Lai, J.; Xing, S.; Siliciano, R.F. A critical subset model provides a conceptual basis for the high antiviral activity of major HIV drugs. *Sci Transl Med* **2011**, *3*, 91ra63.
11. Sadiq, S.K.; Konnyu, B.; Muller, V.; Coveney, P.V. Reaction kinetics of catalyzed competitive heteropolymer cleavage. *J Phys Chem B* **2011**, *115*, 11017-11027.
12. de Sousa, J.D.; Muller, V.; Lemey, P.; Vandamme, A.M. High GUD incidence in the early 20 century created a particularly permissive time window for the origin and initial spread of epidemic HIV strains. *PLoS One* **2010**, *5*, e9936.
13. Müller, V. A HIV-járvány eredete: véletlen vagy szükségszerűség? *Élet és Tudomány* **2012**, *67*, 8-10.