

Lynn Tyers¹, Matt Moeser², Ansie Yssel¹, Melissa-Rose Abrahams¹, Sarah Beth Joseph², Nigel Garrett³, Ronald Swanstrom², Carolyn Williamson^{1,3}

¹University of Cape Town Faculty of Health Sciences, Division of Medical Virology, Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, Cape Town, South Africa,
²University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, United States,
³Centre for the AIDS Programme of Research in South Africa (CAPRISA), Durban, South Africa

Uittreksel

Alhoewel antiretrovirale terapie (ART) die replisering van die virus in mense wat leef met HIV (People living with HIV; PLWH) suksesvol kan onderdruk, bly die virus potent in latent-geïnfekteerde selle en kan terugslaan indien terapie onderbreek word. Ons het waargeneem dat onder vrouens uit die CAPRISA 002 akute infeksiekoort, in Kwa-Zulu-Natal, die meerderheid repliseringskompetente virusse geïnduseer uit hierdie latensie-reservoir die nouste verwant is aan viruse wat in die bloed sirkuleer in die jaar wat ART-aanvang voorafgaan. Alhoewel terugslanende en geïnduseerde viruse uit dieselfde poel ontstaan en oorvleuel, is hul nie noodwendig dieselfde populasie nie. Ons wou filogenetiese bepaal wanneer die terugkerende virus gesaai is in die latensie-reservoir van nege vrouens vanuit dieselfde kohort wat virale terugslag (>1000 RNA kopieë/ml) minstens een jaar post-ART-aanvang ervaar het. Drie geenstreke, twee in env en een in nef, is geamplifiseer en gesekwenseer uit plasmaafgeleide, virale RNA, gemiddeld elke ses maande na akute infeksie tot met ART-aanvang, en tydens terugslag, deur gebruik te maak van Illumina Miseq met Primer ID (PID). Die moontlike verwantskap tussen terugslagvirus en pre-ART-virusse is bepaal met behulp van maksimum-waarskynlikheidsagtige bome met patristiese, klade- en plasingmetodes deur benutting van 'n aangepaste dateringspyplyn (<https://primer-id.org/ogv>). Al drie geenstreke is suksesvol geamplifiseer en gesekwenseer vir al nege vrouens. Gemiddeld 354 PID-konsensussekwensies (met strekking 18-4760) per tydspunt per streek pre-ART, en 293 PID-konsensus-terugslag-virussekwensies (strekking 3-2383) is met terugslag vir elke deelnemer gegenereer. Dubbelsinnigheid in die filogenetiese bome, waarskynlik weens multivariante infeksie en afwykende afkoms, is geïdentifiseer as 'n uitdaging vir ons tydsberekenningsbenadering. Dit is absoluut belangrik dat die geskikste metode(s) bepaal word vir boomproduksie deur middel van optimale longitudinale belyning en vir die aanspreek van die dubbelsinnigheid geskep deur multivariante infeksie en divergente of herverbindingsafkoms.

Agtergrond

- Die latente HIV-1 reservoir bly die grootste belemmering tot genesing in mense wat leef met HIV (PLWH), ten spyte van effektiewe antiretrovirale terapie (ART).
- Onderbreking van onderdrukkende ART lei tipies tot spoedige virale terugslag vanuit die latensie reservoir.
- Virusse wat tydens terugslag manifesteer, verteenwoordig 'n fraksie van hierdie latente reservoir.
- Verdermeer, die virusse gestimuleer in vitro deur byvoorbeeld kwantitatiewe virale uitgroei-toetse (qVOA) en daardie wat manifesteer gedurende terugslag/behandeling-onderbrekings oorvleuel, maar bly onderskeidend^{1,2}.
- Vorige studies het getoon dat die grootste deel van die reservoir, soos gemeet deur provirale uitgroei-virussekwensering na in tyd aan ART-insiëring^{3,4,5}. Ons beoog om te evalueer of hierdie bevinding konsekwent is met terugslagvirusse.

Beduidendheid

- Analise van die temporale oorsprong van terugslagvirus sal groter insig bring t.o.v. die fraksie van die latensie reservoir wat in staat is tot terugslag te midde van behandelingsonderbreking.
- Verhoogde begrip van HIV-1-reservoirdinamiek mag wel strategieë tot beperking van die vorming en hardnekkigheid daarvan.

Erkennings

Alle deelnemers van CAPRISA 002 akute infeksiekoort.



National Institute of Allergy and Infectious Diseases



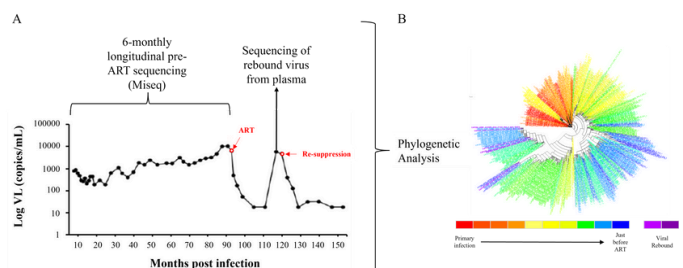
Metodiek

Deelnemers aan studie

- 9 chronies-geïnfekteerde PLWH uit die CAPRISA002-kohort wat virologies onderdruk is vir 'n minimum van 1 jaar, gevolg deur virale terugslag, is geïdentifiseer.

Sekwensering van pre-ART- en terugslagvirus

- Illumina MiSeq diep-sekwensering met Primer ID is aangewend om sekwensies te genereer vanuit virale RNA, afgelei uit plasma, geproefsteek elke 6 maande voor behandeling asook tydens terugslag (Figuur 1A).



Figuur 1: Oorsig van pre-ART- en terugslag virussekwenseringsbenadering.

- Tydsberekening van virale ingang deur die terugslagvirus na die reservoir is gedoen d.m.v. maksimum-waarskynlikheidsagtige bome met patristiese, klade- en plasingmetodes deur 'n pasgemaakte dateringspypplyn (<https://primer-id.org/ogy>) (Figuur 1B).
- Drie genomiese streke (V1V2, V4V5 en nef, HXB2: 8678-9156) is geamplifiseer in 'n multiplexe reaksie uit plasma-afgeleide RNA (Figuur 2). Geenstreke is geselekteer gebaseer op vorige werk wat aangedui het dat hul sterk filogenetiese sein5 produseer.
- Minder as 18 konsensussekwensies per tydspunt is as 'n mislukte proefloop beskou.



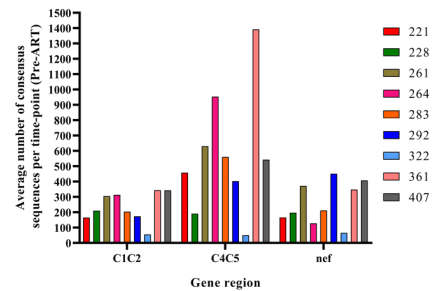
Figuur 2: Streke geamplifiseer in die multiplexe benadering vir Illumina Miseq-sekwensering met Primer ID.

- Rou sekwensielesings is geprosesseer d.m.v. 'n pasgemaakte pypplyn geskryf in Python en R-programmeringstale (https://github.com/HIVDiversity/NGS_processing_pipeline; DOI: 10.5281/zenodo.3372202).
- Kwaliteitsfiltering, saamvoeging van oorleuelende gepaarde-eindlesings en Primer ID is deur gebruik van die MotifBinner2.R program geprosesseer. (<https://github.com/HIVDiversity/MotifBinner2>; DOI:541 10.5281/zenodo.3372204).

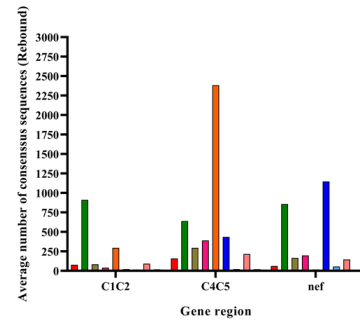
Data-analise

Multiplexe sekwensiediepte en tydsberekening van terugslagvirusse:

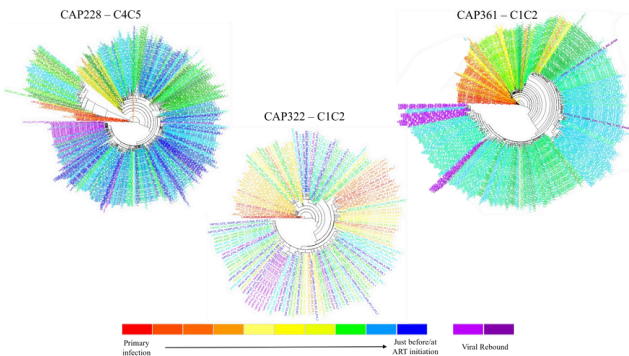
- Deelnemer was geïnfecteerde vir gemiddeld 5 jaar (strek van 2.6 tot 8.2 jare) en het 'n virale terugslag na gemiddeld 2.5 jaar (strek van 1.3 tot 4 jare) ondervind.
- Van hierdie deelnemers is 4 geïdentifiseer as potensieel multivariante infeksies (44.4%), vier as enkelvariant-infeksies (44.4%) en twee as onbepaalbaar, weens gebrek aan vroeësteekproef.
- Plasma-virale lading met terugslag het gestrek van 1250 kopieë/ml tot 640721 kopieë/ml.
- Gemiddeld 354 konsensussekwensies (strek van 18 tot 4760) per tydspunt per strek is gegeneer pre-ART (Figuur 3), en 293 terugslagvirus-konsensussekwensies (strek van 3 tot 2383) is per deelnemer aan die studie gegeneer.
- Boom R2 waardes het gestrek van 0.036 tot 0.712. Bome met R2 waardes <0.4 is beskou as onvoldoende evolusionêre sein/ leeragtige struktuur vir tydsberekeningsanalise.



Figuur 3: Gemiddelde getal konsensussekwensies verkry per tydspunt vir elke deelnemer.



Figuur 4: Gemiddelde aantal konsensussekwensies verkry na virale terugslag vir elke deelnemer.



Figuur 5: Verteenwoordigende maksimum waarskynlikheidsagtige bome aangewend om terugslagvirus-tydsberekening te skat. Steekproef tydspunte pre-ART is gekleurkodeer van rooi (studiedeelname) tot blou (jaar voor ART). Terugslagvirussekwensies is in pers aangedui. Die hiperveranderlike lusstreke van env is verwyder

- Multivariantinfeksie het boomstruktuur beïnvloed op verskeie wyses, soos aangedui deur die bome vir CAP228-C4C5 en CAP322-C1C2 (Figuur 5).
- CAP228-C4C5 illustreer 'n geval waar twee afkomste divergeer, en CAP322-C1C2 illustreer 'n geval waar sekwensies van longitudinale tydspunte meng met twee kenmerkend primêr-geïnfecteerde klusters teenwoordig. Beide hierdie situasies impakteer boomstruktuur ($R^2=0.256$ en 0.21 , onderskeidelik) negatief. Dit mag die tydsberekeningskattings gemaak deur ons pypplyn beïnvloed.

Doelwitte

- Om die beste benadering te bepaal om die dubbelsinnigheid wat multivariantinfeksie veroorsaak en potensieel herkombinerende aan te spreek.
- Om 'n enkele tydsberekeningskattings af te lei vir die terugslagvirus d.m.v. geenstreke waar tydsberekening vir elke geenstreke nie konkordant is.

Verwysings

1. Pannus, P., Rutsaert, S., De Wit, S., Allard, S. D., Vanham, G., Cole, B., Nescoi, C., Aerts, J., De Spiegelaere, W., Tsoumanis, A., Couttenye, M.-M., Herssens, N., De Scheerder, M.-A., Vandekerckhove, L. and Florence, E. Rapid viral rebound after analytical treatment interruption in patients with very small HIV reservoir and minimal on-going viral transcription. *J Int AIDS Soc.* 2020; 23(2):e25453
2. Salantes DB, Zheng Y, Mamepe F, Srivastava T, Beg S, Lai J, Li JZ, Tressler RL, Koup RA, Hoxie J, Abdel-Mohsen M, Sherrill-Mix S, McCormick K, Overton ET, Bushman FD, Learn GH, Siliciano RF, Siliciano JM, Tebas P, Bar KJ. HIV-1 latent reservoir size and diversity are stable following brief treatment interruption. *J Clin Invest.* 2018 Jul 2;128(7):3102-3115. doi: 10.1172/JCI120194. Epub 2018 Jun 18. PMID: 29911997; PMCID: PMC6026010.
3. Brodin J, Zanini F, Thebo L, et al. Establishment and stability of the latent HIV-1 DNA reservoir. *Elife.* 2016;1-15. doi:10.7554/eLife.18889
4. Abrahams M-R, Joseph SB, Garrett N, et al. The Replication-Competent HIV-1 Latent Reservoir is Primarily Established Near the Time of Therapy Initiation. *Sci Transl Med.* 2019;11(513). doi:10.1126/scitranslmed.aaw5589
5. Joseph SB, Abrahams M-R, Tyers L, et al Temporal dynamics of reservoir formation are not strongly influenced by replication competency or cellularity of HIV-1 proviruses [Manuscript in preparation].