

Analyse der Sequenzvariabilität des Hepatitis B Virus unter dem Einfluss der CD8 T-Zellantwort auf Populationsebene

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Tatjana Schwarz
aus Nowokusnezsk

Düsseldorf,
Dezember 2021

aus dem Institut für Virologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Jörg Timm
2. Prof. Dr. Johannes Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.06.2022

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
SUMMARY	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das Hepatitis B Virus.....	1
1.1.1 Historie und Taxonomie von Hepatitis B	1
1.1.2 Struktur und Replikationszyklus von HBV	2
1.1.3 HBV-Proteine.....	5
1.1.3.1 Das PräCore- und Core-Protein	5
1.1.3.2 Die Polymerase	6
1.1.3.3 Das Hüllprotein	6
1.1.3.4 Das HBx-Protein	7
1.1.4 Sequenzvariabilität	7
1.2 Klinischer Verlauf der Hepatitis B	8
1.2.1 Epidemiologie und Transmission.....	8
1.2.2 Serologische Marker.....	9
1.2.2.1 HBV-Viruslast	9
1.2.2.2 HBsAg und anti-HBs.....	9
1.2.2.3 Anti-HBc.....	10
1.2.2.4 HBeAg und anti-HBe	10
1.2.2.5 Transaminasen	10
1.2.3 Infektionsverlauf.....	11
1.2.4 Prävention und Therapie	13
1.2.4.1 Neue therapeutische Ansätze	15
1.3 Immunpathogenese der HBV-Infektion	16
1.3.1 Angeborene Immunantwort auf die HBV-Infektion	16
1.3.2 Adaptive Immunantwort auf die HBV-Infektion.....	18
1.3.2.1 Humorale Immunantwort gegen HBV	18
1.3.2.2 Einfluss von CD4 ⁺ T-Zellen auf eine HBV-Infektion	18
1.3.2.3 Rolle von CD8 ⁺ T-Zellen in der HBV-Infektion	19
1.3.2.4 CD8 T-Zell-assoziiertes Selektionsdruck	21
1.4 Zielsetzung der Arbeit	22

2	MATERIALIEN UND PATIENTEN	23
2.1	Materialien	23
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	23
2.1.2	Zellkultur-, Bakteriennährmedien und Zusätze	24
2.1.3	Zusammensetzung der Nährmedien für Zell- und Bakterienkulturen	24
2.1.4	Bakterien	25
2.1.5	Verbrauchsmaterialien	25
2.1.6	Geräte	25
2.1.7	Kits	27
2.1.8	Oligonukleotide	27
2.1.9	Peptide	28
2.1.10	Antikörper und fluoreszierende Farbstoffe	29
2.1.11	Vektoren	30
2.1.12	HBV-Referenzsequenzen	31
2.1.13	Software und Internetseiten	31
2.2	Patienten	32
3	METHODEN	33
3.1	Zellbiologische Methoden	33
3.1.1	Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes	33
3.1.2	Auftauen und Kultivieren von PBMCs	34
3.2	Molekularbiologische Methoden	34
3.2.1	Isolation von DNA aus PBMCs	34
3.2.2	Typisierung des humanen Leukozyten-Antigens	34
3.2.3	Bestimmung von HBV-DNA, HBeAg und HBsAg	35
3.2.4	Extraktion von viraler DNA aus Plasma	35
3.2.5	Amplifikation des HBV-Genoms	35
3.2.6	Aufreinigung der PCR-Produkte	37
3.2.7	Sequenzierung des HBV-Genoms	37
3.2.8	Klonierung des HBV-Polymerase-Fragments	38
3.2.9	Transformation der Plasmide in chemisch-kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	39
3.2.10	Blau-Weiß-Selektion	39
3.2.11	Detektion der HBV-Quasispezies in Einzelklonen	40
3.3	Immunologische Methoden	41
3.3.1	Expansion von HBV-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen	41
3.3.2	Identifizierung HBV-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen mittels intrazellulärer Zytokinfärbung	41

3.4	Statistische Analysen	43
3.4.1	SeqFeatR.....	43
3.4.2	Identifizierung von möglichen Epitop-Kandidaten	43
3.4.3	Weitere statistische Analysen.....	44
4	ERGEBNISSE	45
4.1	Identifizierung von humanen Leukozyten-Antigen-Klasse-I-assoziierten Polymorphismen in allen HBV-Proteinen	45
4.1.1	Amplifikation des kompletten HBV-Genoms ist Genotyp-unabhängig und auch bei niedrigen Viruslasten erfolgreich	45
4.1.2	Charakterisierung der HBV-Kohorte.....	46
4.1.3	In allen HBV-Proteinen sind HLA-Klasse-I-assoziierte Virussequenzpolymorphismen zu finden	47
4.1.3.1	HLA- <i>Footprints</i> sind im Core-Protein angereichert	47
4.1.3.2	Unterschiedliche Gründe für Assoziationen von Sequenzpolymorphismen an einer Position mit multiplen HLA-Allelen.....	56
4.1.4	Über statistische Analysen lassen sich potenzielle neue HBV-Epitope identifizieren.....	59
4.1.5	Experimentelle Validierung von neuen CD8-Epitopen	63
4.2	Zusammenhang zwischen HLA-Klasse-I-assoziiertem-Selektionsdruck und virologischen Parametern	65
4.2.1	Die Anzahl von Substitutionen korreliert mit der HBV-Viruslast.....	65
4.2.2	HBeAg-positive Patienten haben signifikant erhöhte Viruslasten	67
4.2.3	Die relative Häufigkeit von Substitutionen in Positionen unter HLA-Selektionsdruck ist in W28*/HBeAg-negativen Patienten signifikant erhöht.....	69
4.2.4	Einzelne Substitutionen beeinflussen die HBV-Viruslast	70
4.3	In Regionen mit Deletionen im HBV-Genom sind CD8 T-Zell Epitope lokalisiert 74	
4.3.1	Durch Klonierung von PCR-Produkten lassen sich Varianten in der HBV-Quasispezies mit Deletionen detektieren.....	74
4.3.2	HLA-A*24 und HLA B*35 als Risikoallele für Deletionen	76
4.3.3	Bestätigung von CD8-Epitopen in Regionen mit Deletionen.....	78
5	DISKUSSION	80
5.1	HLA-Klasse-I-assoziiertes Selektionsdruck hat einen Einfluss auf die Evolution von HBV	80
5.1.1	Mit Hilfe der <i>SeqFeatR</i> -Analyse können multiple Positionen unter Selektionsdruck in HBV-Proteinen identifiziert werden	80

5.1.2	Die CD8 ⁺ T-Zell-Immundominanz beeinflusst den Selektionsdruck auf dem PräCore/Core-Protein	83
5.1.3	HLA- <i>Footprints</i> ermöglichen die Identifizierung von neuen Core- und Polymerase-spezifischen CD8 T-Zell-Epitopen	85
5.2	HBeAg-Serokonversion ist assoziiert mit einer Verminderung der viralen Replikation und einer Zunahme des CD8 T-Zell-Selektionsdrucks	87
5.2.1	CD8 T-Zell-assoziiertes Selektionsdruck korreliert negativ mit der HBV-Viruslast.....	87
5.2.2	HBeAg-Status beeinflusst nicht nur die Viruslast, sondern auch den CD8 T-Zell-Selektionsdruck	90
5.2.3	Das HBeAg modelliert die Immunantwort zur Erhaltung der Immuntoleranz.....	91
5.3	Sind Deletionen ein weiterer <i>Escape-Mechanismus</i>?	93
6	ANHANG	96
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	133
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	155
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	159
10	TABELLENVERZEICHNIS.....	161
11	CURRICULUM VITAE	162
12	PUBLIKATIONEN	164
12.1	Dissertationsbezogene Publikationen.....	164
12.2	Weitere Publikationen	164
13	DANKSAGUNG.....	168
14	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	169

Zusammenfassung

Trotz der Verfügbarkeit einer prophylaktischen Impfung haben schätzungsweise 296 Millionen Menschen weltweit eine chronische Hepatitis B Virus (HBV)-Infektion. Davon sterben jährlich um die 820.000 Menschen an den Folgen einer HBV-induzierten Zirrhose oder einem hepatozellulären Karzinom. Bei einer Infektion im Erwachsenenalter können bis zu 95 % der infizierten Patienten das Virus eliminieren. Allerdings kann nach der Ausheilung einer akuten Hepatitis das virale Genom als cccDNA in infizierten Hepatozyten weiterhin persistieren. Derzeit sind in Deutschland zwei pharmakologische Therapieansätze zur Behandlung einer chronischen HBV-Infektion zugelassen. Diese führen jedoch nur selten zu einer Ausheilung der Infektion, sodass häufig eine dauerhafte Therapie notwendig ist. Daher ist die Suche nach neuen therapeutischen Ansätzen von großer medizinischer Bedeutung.

Eine mögliche neue Therapiestrategie basiert auf der Entwicklung einer therapeutischen Impfung unter Verwendung von zytotoxischen CD8 T-Zellen, da diese maßgeblich an der Ausheilung beteiligt sind. Allerdings hat HBV verschiedene Immunevasionsmechanismen entwickelt, um der CD8 T-Zellantwort zu entkommen. Beispielsweise werden unter dem immunologischen Druck Substitutionen in Zielantigenen selektiert. Um das Ausmaß dieser Form der Anpassung an den Immundruck über das komplette HBV-Genom zu charakterisieren, wurde in dieser Dissertation die Sequenzvariabilität des HBV unter dem Einfluss der CD8 T-Zellantwort auf Populationsebene analysiert. Dazu wurde eine Kohorte von 544 chronisch HBV-infizierten Patienten rekrutiert und zunächst das komplette HBV-Genom amplifiziert und sequenziert. Die phylogenetische Analyse der Sequenzen ergab, dass Patienten in dieser Kohorte überwiegend mit dem in Europa sehr verbreiteten Genotyp D (n=379) infiziert waren. Die anschließende HLA-Klasse-I-Genotypisierung von allen Patienten ermöglichte die Durchführung von Assoziationsstudien zwischen der HBV-Sequenz und dem HLA-Klasse-I-Allel des Wirts. Mit Hilfe des *Tools SeqFeatR* wurde analysiert, ob es Assoziationen zwischen Aminosäurepolymorphismen bei Genotyp D infizierten Patienten und bestimmten HLA-Klasse-I-Allelen gab, welche als *HLA-Footprints* bezeichnet werden. Insgesamt wurden 111 *HLA-Footprints* identifiziert, davon 78 im PräCore/Core-Protein, 25 in der Polymerase, 2 im Hüllprotein und 5 im HBx-Protein. Somit wurde einerseits deutlich, dass in allen HBV-Proteinen eine Anpassung an den CD8 T-Zell-Selektionsdruck erfolgt und andererseits, dass der Selektionsdruck auf das Core-Protein besonders ausgeprägt ist. Die 111 *HLA-Footprints* verteilten sich auf 70 Positionen, wobei in 44 Positionen Assoziationen von Substitutionen mit nur einem HLA-Klasse-I-Allel und in 26 Positionen Assoziationen mit multiplen HLA-Klasse-I-Allelen gefunden wurden. Aufgrund der überlappenden offenen Leserahmen wurde ein HLA-Klasse-I-assoziiertes Selektionsdruck im Core-Protein und der Polymerase detektiert, der zu Substitutionen in beiden Proteinen führte. Für die Detektion von

Assoziationen mit multiplen Allelen waren zwei Gründe verantwortlich; erstens übten mehrere HLA-Klasse-I-Allele einen Selektionsdruck auf eine Position aus, und zweitens wurde HLA-Klasse-I *Linkage Disequilibrium* beobachtet. Durch die Identifizierung von HLA-*Footprints* konnten gleichzeitig neue HBV-Epitope erfolgreich gefunden werden. Mit Hilfe der Sequenzanalyse und Algorithmen zur Vorhersage von Peptid-Liganden für die entsprechenden HLA-Allele wurden 30 neue potenzielle CD8 T-Zell-Epitope identifiziert, von denen sieben Epitope (fünf im Core-Protein und zwei in der Polymerase) durch die Stimulation von PBMCs mit Peptiden immunologisch bestätigt.

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der in dieser Dissertation untersucht wurde, ist der Einfluss des CD8 T-Zell-Selektionsdrucks auf klinische Parameter wie Viruslast und die Bedeutung des HBeAg-Status. Dabei wurde deutlich, dass es eine negative Korrelation zwischen der Anzahl von Substitutionen in den 70 Positionen unter Selektionsdruck und der HBV-Viruslast gibt. Je mehr HLA-Klasse-I-assoziierte Substitutionen im HBV-Genom eines Patienten waren, desto niedriger war die Viruslast. Darüber hinaus fanden sich Hinweise, dass auch einzelne Substitutionen die virale Fitness entweder beeinträchtigen oder fördern können. Auch der HBeAg-Status hatte einen Einfluss auf die HBV-Viruslast; HBeAg-positive Patienten hatten eine signifikant höhere Viruslast als HBeAg-negative Patienten. Dies ging damit einher, dass die relative Häufigkeit von Substitutionen in Anwesenheit des relevanten HLA-Klasse-I-Allels in HBeAg-positiven Patienten signifikant niedriger war als in HBeAg-negativen Patienten. Zusätzlich dazu hatten HBeAg-negative Patienten, die an Position W28 des PräCore-Proteins ein Stoppcodon (W28*) hatten und somit kein HBeAg mehr exprimieren konnten, signifikant häufiger HLA-Klasse-I-assoziierte Substitutionen als HBeAg-negative Patienten, die an Position W28 die Prototypsequenz hatten. Der Selektionsdruck scheint also über die Stadien HBeAg positiv – HBeAg negativ ohne PräCore-Mutation – HBeAg negativ mit PräCore Mutation kontinuierlich zuzunehmen. Dabei könnte die W28*-Substitution nach HBeAg-Serokonversion eine Art „übergeordnete“ Immunevasionsvariante sein, indem die Verfügbarkeit des Proteins und damit der Epitope im Core-Protein reduziert wird.

Neben einzelnen T-Zell-assoziierten Substitutionen wurde anhand der Sequenz-Datenbank *in-frame* Deletionen im überlappenden Leserahmen der Polymerase und des Hüllproteins beobachtet. Sowohl klonale Experimente als auch NGS-Daten bestätigten diese Deletionen und zeigten, dass innerhalb der Quasispezies Viren mit und ohne Deletionen vorhanden waren. Des Weiteren zeigte die durchgeführte Assoziationsstudie, dass Deletionen in Anwesenheit von HLA-A*24 bzw. HLA-B*35 angereichert waren. Der immunologische Nachweis von HLA-B*35-restringierten Epitopen innerhalb der Region mit Deletionen stützt die Hypothese, dass CD8 T-Zell Selektionsdruck zur Entstehung von Deletionen beigetragen

haben könnte. Folglich könnten Deletionen einen weiteren Evasionsmechanismus von HBV darstellen.

Abschließend lässt sich sagen, dass die hier präsentierten Ergebnisse darauf hinweisen, dass der CD8 T-Zell-assoziierte Selektionsdruck großen Einfluss auf die Evolution von HBV hat, einerseits durch die Selektion von einzelnen Substitutionen und andererseits durch *in-frame* Deletionen. Vor allem der beobachtete prädominante Selektionsdruck auf das Core-Protein könnte ein Hindernis für die therapeutische Impfstoffentwicklung darstellen, da Core-spezifische CD8 T-Zellen aufgrund ihrer Assoziation mit der Ausheilung einer HBV-Infektion als gute Kandidaten für eine Immuntherapie angesehen werden. Weitere Studien sind notwendig, um z. B. die Bedeutung der Selektion von HBeAg-Varianten für die CD8 T-Zellantwort besser zu charakterisieren.

Summary

Although prophylactic vaccination against HBV is widely available, worldwide 296 million people are chronically infected with HBV. Annually, an estimated 820,000 people die from HBV-induced cirrhosis or hepatocellular carcinoma. HBV infection acquired in adulthood leads to virus elimination in up to 95 % of cases. However, after recovery from acute hepatitis, the viral genome can persist as cccDNA in infected hepatocytes. In Germany, two pharmacological therapy approaches have been approved for treatment of chronic HBV infection. Nevertheless, a cure is rarely achieved, synonymous with long-term therapy for the patient. Therefore, the search for new therapeutic approaches is of great importance.

A potential new therapeutic strategy is based on the development of a therapeutic vaccine consisting of cytotoxic CD8 T cells, as they are significantly involved in recovery. To escape the CD8 T cell response, HBV has developed several immune evasion mechanisms. For example, substitutions in target antigens are selected under immunological pressure. To characterize the extent of adaptation to immune pressure across the complete HBV genome, the sequence variability of HBV under the impact of the CD8 T cell response was analyzed at population level. A cohort of 544 chronically HBV-infected patients was recruited, and the complete HBV genome was amplified and sequenced. Phylogenetic analysis indicated that patients in this cohort were predominantly infected with genotype D (n=379), the most prevalent genotype in Europe. Following HLA class I genotyping of all patients, association studies between the HBV sequence and the host HLA class I allele were performed. The SeqFeatR tool was used to analyze potential associations between amino acid polymorphisms in genotype D infected patients and specific HLA class I alleles, referred to as HLA footprints. In total, 111 HLA footprints were identified; 78 in the precore/core protein, 25 in the polymerase, 2 in the envelope protein, and 5 in the HBx protein. These results showed that an adaptation to CD8 T cell selection pressure occurs in all HBV proteins and that selection pressure on the core protein is particularly pronounced. The 111 HLA footprints were found in 70 positions, with substitutions in 44 positions associated with only one HLA class I allele and in 26 positions with an association to multiple HLA class I alleles. Notably, due to the overlapping open reading frames, HLA class I associated selection pressure was detected in the core protein and polymerase, resulting in substitutions in both proteins. The association with multiple alleles was caused by two factors, firstly multiple HLA class I alleles exerted selection pressure on one position and secondly a HLA class I linkage disequilibrium. In parallel, new HBV epitopes could be detected through the identification of HLA footprints. Using sequence analyses and algorithms to predict peptide ligands to the corresponding HLA allele, 30 new potential CD8 T cell epitopes were identified, of which seven epitopes, five in

core and two in polymerase, were immunologically confirmed by stimulating PBMCs with peptides.

Furthermore, the influence of CD8 T cell selection pressure on clinical parameters such as viral load and the relevance of HBeAg status was studied. The HBV viral load negatively correlated with the number of substitutions in the 70 positions under selection pressure. The greater the number of HLA class I-associated substitutions in a patient's HBV genome, the lower the viral load. In addition, some substitutions could either impair or promote viral fitness. The HBeAg status also had an impact on HBV viral load, HBeAg-positive patients had a significantly higher viral load than HBeAg-negative patients. This was accompanied by the fact that the relative frequency of substitutions in the presence of the relevant HLA class I allele was significantly lower in HBeAg-positive patients compared to HBeAg-negative patients. In addition, HBeAg-negative patients whose HBV sequence had a stop codon (W28*) at position W28 of the precore protein and therefore failed to express HBeAg had significantly more frequent HLA class I associated substitutions compared to HBeAg-negative patients who harbored the prototype sequence at position W28. Hence, the selection pressure seems to continuously increase from the stages HBeAg positive - HBeAg negative without precore mutation - HBeAg negative with precore mutation. In this context, the W28* substitution after HBeAg seroconversion could be a 'higher-order' immune evasion variant by reducing the availability of the protein and thus the epitopes of the core protein.

Apart from single T cell associated substitutions, in-frame deletions in the overlapping open reading frame of the polymerase and envelope protein were detected using the sequence database. Both, clonal experiments and NGS data confirmed these deletions and showed that viruses with deletions were present within the quasispecies. Furthermore, the association studies showed an enrichment of deletions in the presence of HLA-A*24 and HLA-B*35. The immunological identification of HLA-B*35-restricted epitopes within the deletion regions supports the hypothesis of CD8 T cell selection pressure contributing to the development of deletions. Consequently, deletions might represent another evasion mechanism of HBV.

Taken together, CD8 T cell associated selection pressure has a major impact on the evolution of HBV, on the one hand through the selection of single substitutions and on the other hand by in- frame deletions. Especially, the observed predominant selection pressure on the core protein might be an obstacle for therapeutic vaccine development, as core-specific CD8 T cells are considered as good candidates for immunotherapy due to their association with the clearance of HBV infection. Further studies are necessary, for example, to characterize the impact of HBeAg variant selection on the CD8 T cell response.

1 Einleitung

1.1 Das Hepatitis B Virus

1.1.1 Historie und Taxonomie von Hepatitis B

Einer der ersten historischen Beschreibungen einer Hepatitis-Infektion wurde 1885 vom deutschen Mikrobiologen August Lürmann erbracht. Er beobachtete das Auftreten einer Gelbsuchtepidemie bei Bremer Werftarbeitern, nach einer Pockenimpfung mit Gewebsflüssigkeit, die aus Bläschen von anderen vakzinierten Menschen gewonnen worden war (Lürmann, 1885). Aufgrund von weiteren Hepatitis-Ausbrüchen unterteilte der britische Arzt F.O. MacCallum infektiöse Hepatitis in zwei Typen, Hepatitis A wurde mit fäkal-oralen Übertragung und Hepatitis B mit parenteraler Übertragung assoziiert (Anonymous, 1947; MacCallum, 1972).

Lange Zeit war der Erreger der Hepatitis B unbekannt, jedoch gelang es Baruch S. Blumberg 1963 ein 20 nm großes unbekanntes Antigen aus dem Blut von australischen Ureinwohnern zu isolieren, das als *Australia-Antigen* (AuAg) bezeichnet wurde (Blumberg et al., 1965). Da das AuAg keine Nukleinsäure enthielt, kam es als Erreger nicht in Frage. Allerdings entdeckte Blumberg einige Zeit später einen Zusammenhang zwischen dem Antigen und einer Hepatitis B-Infektion (Blumberg et al., 1967). Für diese Entdeckung wurde ihm 1976 der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin verliehen. Schließlich gelangte es David S. Dane 1970 mit Hilfe eines Elektronenmikroskops ein 42 nm großes virusähnliches Partikel (Dane-Partikel) nachzuweisen, welches das AuAg auf der Oberfläche trug und einen inneren Kern hatte (Dane et al., 1970). Somit war das AuAg das Hüllantigen und wurde zu HBsAg umbenannt. Schon ein Jahr später wurde aus dem Dane-Partikel das Core-Antigen (HBcAg) und der gegen das HBcAg gerichtete Antikörper (anti-HBc) extrahiert (Almeida et al., 1971), gefolgt vom Nachweis einer endogenen DNA-Polymerase-Aktivität (Kaplan et al., 1973) und schlussendlich der zirkulären, doppelsträngigen viralen DNA (Robinson et al., 1974). Nach diesen Entdeckungen wurden die infektiösen Dane-Partikel als Hepatitis B Virus (HBV) bezeichnet.

Das HBV gehört zur Familie der *Hepadnaviridae* (Mason et al., 2005), die in zwei Genera unterteilt werden, die *Orthohepadnaviren* und *Avihepadnaviren*. Beide Gattungen weisen eine hohe Wirtsspezifität und einen Lebertropismus auf (Robinson, 1980). Die *Orthohepadnaviren* infizieren Säugetiere und wurden sowohl bei Menschen (HBV) als auch bei Altweltprimaten wie Gorillas (GoHBV), Schimpansen (ChHBV) oder Orang-Utans (OuHBV) und bei Neuweltprimaten wie dem Wollaffen (WMHBV) entdeckt (Vaudin et al., 1988; Lanford et al., 1998; Warren et al., 1999; Grethe et al., 2000). Ebenfalls wurden *Orthohepadnaviren* bei einigen Nagetieren wie dem Waldmurmeltier (WHV) oder dem Hörnchen (GSHV und ASHV)

sowie bei Fledermäusen identifiziert (Summers et al., 1978; Marion et al., 1980; Testut et al., 1996; Drexler et al., 2013). Die *Avihepadnaviren* kommen in diversen Vogelarten wie Enten (DHBV), Graureihern (HHBV) oder Störchen (STHBV) vor (Mason et al., 1980; Sprengel et al., 1988; Pult et al., 2001).

1.1.2 Struktur und Replikationszyklus von HBV

Das HBV ist mit seinem 3,2 Kilobasen (kB) großen Genom eins der kleinsten bekannten pathogenen Viren. Das Virion besteht aus einer äußeren Lipidhülle, in der die Hüllproteine verankert sind. Diese umhüllen das Nukleokapsid, welches auch als Core bezeichnet wird. Es gibt drei Hüllprotein-Antigene (HBsAg), die den gleichen C-Terminus besitzen, jedoch am N-Terminus unterschiedlich lang sind. Diese werden nach ihrer Größe in das große (LHB, auch PräS1 genannt), das mittlere (MHB, auch PräS2 genannt) und das kleine (SHB) Hüllprotein unterteilt. Die Hüllproteine werden bis zu 10.000-fach häufiger sezerniert als Virionen und liegen als sogenannte subvirale Partikel (SVP) vor (Ganem and Prince, 2004). Diese ca. 22 nm große Partikel können in sphärischer oder filamentöser Form vorliegen. Da sie keine Nukleinsäure enthalten (Abbildung 1.1A), sind sie nicht infektiös. Das HBsAg von SVP und infektiösen Virionen besteht hauptsächlich aus dem SHB, da es in einem Verhältnis von 4:1:1 zum MHB und LHB produziert wird (Heermann et al., 1984). Innerhalb der Virionen befindet sich das ikosaeder-förmige Kapsid, welches einen Durchmesser von ca. 32 bis 36 nm hat und entweder aus 90 Core-Protein-Dimeren mit einer T3-Symmetrie oder aus 120 Core-Protein-Dimeren mit einer T4-Symmetrie besteht (Crowther et al., 1994). Innerhalb des Core-Proteins liegt die partiell doppelsträngige, relaxierte zirkuläre DNA (rcDNA), welche je nach Genotyp zwischen 3182 und 3248 Basenpaaren (bp) lang ist. Die komplette genomische Information liegt auf dem Minusstrang, wobei dieser 15 bis 45 % länger ist als der Positivstrang (Landers et al., 1977). Am 5'-Ende des Positivstrangs liegen kurze RNA-Elemente vor, welche von der prägenomischen RNA (pgRNA) stammen und als Primer für die Strangsynthese fungieren (Beck and Nassal, 2007). Das 5'-Ende des Minusstrangs ist kovalent mit der viralen Polymerase verknüpft (Gerlich and Robinson, 1980; Bartenschlager and Schaller, 1988). Nachdem das LHB von HB Virionen eine Bindung mit dem NTCP-Rezeptor (*sodium-taurocholate co-transporting polypeptide*) auf den Hepatozyten eingeht, gelangt es über Endozytose in die Hepatozyten (Yan et al., 2012). Nach der Auflösung der Virushülle werden die Core-Partikel in den Zellkern transportiert, wo die rcDNA in kovalent geschlossene zirkuläre DNA (cccDNA) umgewandelt wird. Diese cccDNA dient als Matrize für die Transkription der 3,5 kB, 2,4 kB, 2,1 kB und 0,7 kB mRNA durch die zelluläre RNA-Polymerase II. Alle mRNAs haben eine Cap-Struktur am variablen 5'-Ende und ein gemeinsames polyadenyliertes 3'-Ende. Über die vier überlappenden offenen Leserahmen (ORF) im Genom werden die sieben Proteine PräCore, Core, Polymerase, LHB, MHB, SHB und HBx kodiert (Abbildung 1.1.B). Der längste ORF codiert für die Polymerase und überlappt

sich mit dem 3'-Ende des PräCore/Core-ORF, vollständig mit dem Hüllprotein-ORF (S-ORF) und dem 5'-Ende des HBx-ORF (X-ORF). Nach dem Transport der transkribierten mRNAs in das Zytoplasma wird die 3,5 kB große pgRNA in die Polymerase und das PräCore- und Core-Protein translatiert. Der S-ORF umfasst die PräS1-, PräS2, und S-Domäne, welche von einer 2,4 kB und einer 2,1 kB mRNA in die Hüllproteine translatiert werden. Die Transkription der 2,1 kB mRNA wird über den PräS2-Promotor reguliert und codiert sowohl das MHB als auch das SHB. Je nachdem, welches Startsignal verwendet wird, wird entweder das MHB oder das SHB gebildet. Das LHB wird über die 2,4 kB mRNA codiert und vom PräS1-Promotor gesteuert. Der kleinste ORF codiert das HBx-Protein, welches aus einem 0,7 kB großen Transkript gebildet wird. Nach der Transkription der unterschiedlichen mRNAs, bildet die pgRNA die Matrize für die Reverse Transkription (Lamontagne et al., 2016). Durch die Bindung der viralen Polymerase an die am 5'-Ende liegende ϵ -Struktur der pgRNA, wird die Enkapsidierung eingeleitet und ein unreifes Kapsid gebildet. Im Anschluss findet die Reverse Transkription des Minusstrangs mit anschließender Synthese des Plusstrangs statt, sodass wieder rcDNA vorliegt (Beck and Nassal, 2007). Das reife Kapsid wird entweder zurück in den Kern transportiert, um eine kontinuierliche cccDNA-Synthese zu gewährleisten, oder kann vom Hüllproteinen umhüllt werden. Anschließend können die neuen Virionen und die gebildeten SVPs über den zellulären ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) und MVBs (*multivesicular bodies*) exportiert werden (Lambert et al., 2007; Watanabe et al., 2007; Jiang et al., 2015). Gelegentlich wird bei der reversen Transkription nicht rcDNA, sondern doppelsträngige lineare DNA (dsIDNA) gebildet, welche durch DNA-Doppelstrangbrüche ins Wirtsgenom integrieren kann (Summers and Mason, 2004). Die daraus resultierende genomische Instabilität kann zur Entstehung eines Hepatozellulären Karzinoms (HCC) beitragen (Feitelson and Lee, 2007; Yan et al., 2015). Eine Zusammenfassung über den viralen Replikationszyklus ist in Abbildung 1.1C dargestellt.

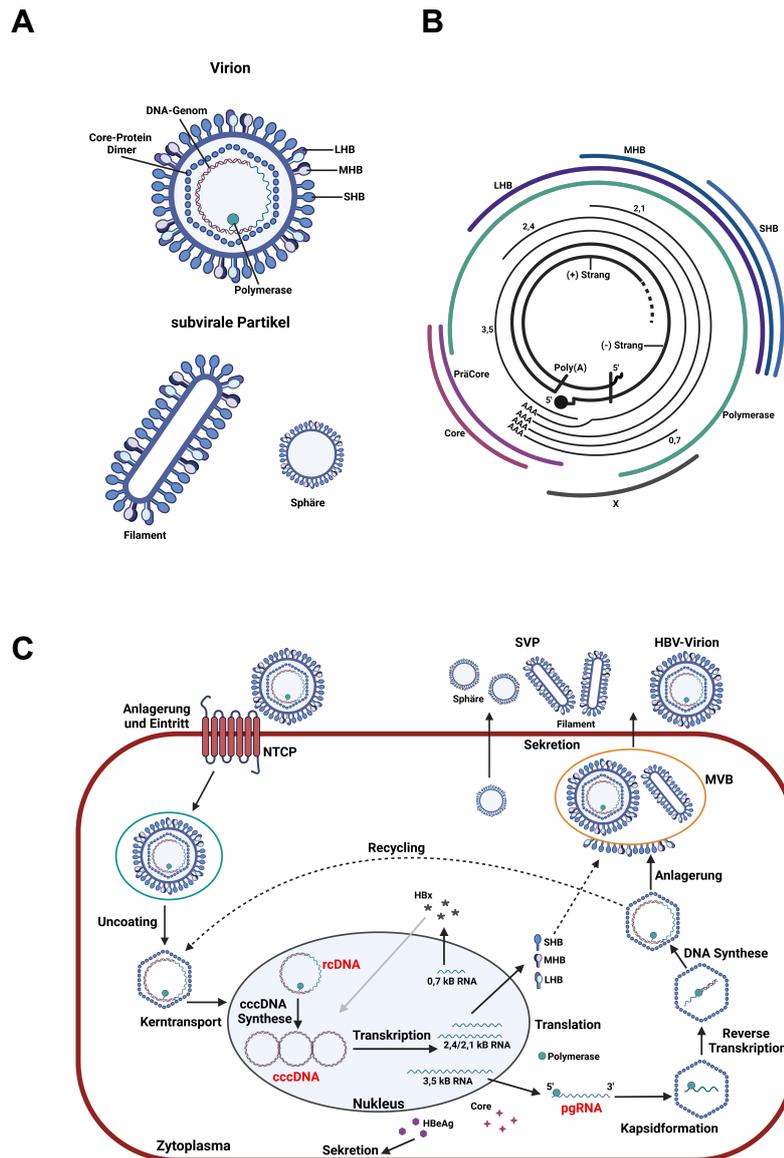


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Struktur und des Replikationszyklus von HBV

Ein Modell eines infektiösen Viruspartikels und der subviralen Partikel (SVP) ist dargestellt (A). Innerhalb des Virions liegt die genomische DNA vor, die kovalent an die Polymerase gebunden und eingekapselt von Core-Protein-Dimeren ist. Diese wiederum werden von großen (LHB), mittleren (MHB) und den kleinen Hüllproteinen (SHB) umhüllt. Die subviralen Partikel enthalten keine Nukleinsäure und sind daher nicht infektiös. Adaptiert nach (Glebe and Bremer, 2013). (B) Das ca. 3,2 kB große DNA-Genom beinhaltet einen vollständigen Minus (-) Strang mit einem gebundenen terminalen Protein am 5'-Ende und einen unvollständigen Plus (+) Strang (dicke schwarze Linien). Über vier überlappende offene Leserahmen (ORF) werden vier virale mRNAs transkribiert (3,5,; 2,4,; 2,1, und 0,7 kB) (dünne schwarze Linien), die in die sieben Proteine Polymerase, LHB, MHB, SHB, X, Core und PräCore translatiert werden (farbige Linien). Adaptiert nach (Rehermann and Nascimbeni, 2005). (C) Über den NTCP-Rezeptor gelangen Virionen in die Hepatozyten, wo sie entpackt werden. Im Anschluss wird die rcDNA in den Nukleus transportiert, in cccDNA umgewandelt und dient fortan als Matrize für die Transkription von vier viralen RNAs. Die pgRNA fungiert als Matrize für die Replikation und wird durch die Bindung mit der Polymerase in unreife Kapside eingeschlossen. Im Anschluss findet die Reverse Transkription des Minusstrangs und die Synthese des Plusstrangs statt, sodass wieder rcDNA vorliegt. Das reife Kapsid wird entweder zurück in den Kern transportiert oder von Hüllproteinen umhüllt. Die infektiösen Virionen und gebildeten subviralen Partikel (SVP) werden über multivesicular bodies (MVB) aus der Zelle exportiert. NTCP: *sodium-taurocholate co transporting polypeptide*, rcDNA: relaxierte zirkuläre DNA, cccDNA: kovalent geschlossene zirkuläre DNA, pgRNA: prägenomischen RNA, MVB: *multivesicular bodies*, SVP: subvirale Partikel. Adaptiert nach (Morikawa et al., 2016). Diese Abbildungen wurden mit BioRender.com erstellt.

1.1.3 HBV-Proteine

1.1.3.1 Das PräCore- und Core-Protein

Das HBV bildet insgesamt sieben Proteine, vier Strukturproteine (Core, LHB, MHB und SHB) und drei Nicht-Strukturproteine (PräCore, Polymerase und HBx).

Das Core-Protein (HBcAg) besteht je nach Genotyp aus 183-185 Aminosäuren und wird in drei Domänen unterteilt. Die N-terminale Domäne (NTD) besteht aus den ersten 140 Aminosäuren und ist an der Assemblierung der Kapside beteiligt (Birnbaum and Nassal, 1990). Ab der Aminosäure 150 bis zum Ende des Proteins liegt die basische argininreiche C-terminale Domäne (CTD), welche an der pgRNA-Enkapsidierung und der Reversen Transkription beteiligt ist (Nassal, 1992; Lewellyn and Loeb, 2011a). Zwischen der NTD und der CTD befindet sich ein 10 Aminosäuren langer Linker, dessen Funktion noch nicht vollständig geklärt ist. Es wird jedoch vermutet, dass der Linker eine Funktion in der Regulation der Kapsidassemblierung einnimmt (Liu et al., 2018). Die CTD wird von mehreren Kinasen phosphoryliert, wodurch die Verpackung der pgRNA, in Anwesenheit der Polymerase, und die DNA-Synthese reguliert wird (Perlman et al., 2005; Lewellyn and Loeb, 2011b). Neben dem zellständigen HBcAg wird auf dem gleichen ORF ein sekretiertes PräCore-Protein (HBeAg) codiert. Die Transkription beider Proteine wird über den basalen Core-Promotor (BCP) gesteuert, jedoch wird für das HBeAg das erste Startcodon auf dem Core-Gen verwendet, für das HBcAg hingegen das zweite Startcodon (Yuh et al., 1992; Yu and Mertz, 1996). Somit umfasst das HBeAg zusätzlich 29 Aminosäuren am N-terminalen Ende vom HBcAg (Standing et al., 1988). Für die Sekretion durchläuft das HBeAg zwei proteolytische Spaltungen. Die N-terminalen ersten 19 Aminosäuren fungieren als Signalpeptide und vermitteln den Transport des Proteins in das endoplasmatische Retikulum (ER), wo das Signalpeptid durch eine Signalpeptidase entfernt wird. Im Anschluss werden weitere 30 Aminosäuren am C-terminalen Ende proteolytisch gespalten (Ou et al., 1986; Bruss and Gerlich, 1988). Die Funktion des HBeAg ist nicht vollständig aufgeklärt, aufgrund von Maus-Experimenten wurde allerdings deutlich, dass das HBeAg nicht an der HBV-Infektion, der viralen Replikation oder der Core-Morphogenese beteiligt ist (Chang et al., 1987; Chen et al., 1992). Vor allem Publikationen von David R. Milich deuten darauf hin, dass das HBeAg eine immunmodulatorische Funktion zur Immunevasion besitzt und dadurch die virale Persistenz begünstigt. Über Experimente mit HBeAg/HBcAg transgenen Mäusen konnten Milich und Kollegen zeigen, dass die HBeAg-Expression eine T-Zell-Toleranz gegenüber dem HBeAg und HBcAg induziert, wobei das sekretierte HBeAg tolerogener ist als das HBcAg (Milich et al., 1998; Chen et al., 2004; Chen et al., 2005). Ebenfalls wurde festgestellt, dass das nicht-partikuläre HBeAg während einer Schwangerschaft die Plazentaschranke überschreiten kann, wodurch es zu einer T-Zell-Toleranz gegenüber HBeAg und HBcAg bei Neugeborenen kommt (Milich et al., 1990b; Hsu et al., 1992). Die Expression vom HBeAg kann einerseits über

den BCP und andererseits über die W28-Position des PräCore-Proteins gesteuert werden. Durch Substitutionen im BCP in Position A1762 und G1764 wird die Expression des HBeAg herunterreguliert (Buckwold et al., 1996). Hingegen führt die Substitution an Position G1896A auf Nukleotidebene zu einem Stoppcodon an Position 28 (W28*) des PräCore-Proteins. Aufgrund dieser Substitution wird die Expression des HBeAg komplett verhindert (Carman et al., 1989). Die Häufigkeit von Substitutionen in der BCP-Region bzw. der W28*-Substitution hängt stark vom HBV-Genotyp ab. In der europäischen Albatros-Studie hatten 58 % der chronischen HBV-Patienten eine BCP-Doppelsubstitution (A1762T/G1764A). Die höchste Prävalenz wurde dabei bei 96 % der Genotyp E-infizierten Patienten detektiert. Auch 75 % der mit Genotyp C-infizierten Patienten hatten eine BCP-Doppelsubstitution, gefolgt von 61 % der mit Genotyp A-infizierten Patienten. Die mit Genotyp D- (54 %) und B- (47 %) infizierten Patienten hatten die niedrigste Prävalenz an BCP-Doppelsubstitutionen. Die W28*-Substitution wurde in 23 % der Patienten beobachtet, mit der höchsten Häufigkeit in Genotyp B (56 %), C (40 %) und D (27 %). Lediglich 6 % der Genotyp A- und 4 % der Genotyp E-infizierten Patienten hatten die W28*-Substitution (Kuhnhenh et al., 2018). Sowohl für die BCP-Doppelsubstitution als auch für die W28*-Substitution wurde ein erhöhtes Risiko für die Progression eines HCC beschrieben (Kao et al., 2003; Yang et al., 2008).

1.1.3.2 Die Polymerase

Die etwa 837 Aminosäuren lange Polymerase besteht aus der terminalen Protein (TP)-Domäne, der Spacer-Domäne, der Reversen Transkriptase (RT)-Domäne und der RNase H-Domäne. Das terminale Protein dient als Primer für die Reverse Transkription, wodurch die pgRNA mittels einer Reversen Transkriptase-Aktivität in den Minusstrang umgeschrieben wird (Zoulim and Seeger, 1994). Zwischen der Reversen Transkriptase und der TP-Domäne befindet sich die sehr variable und entbehrliche Spacer-Domäne (Radziwill et al., 1990). Am C-Terminus der Polymerase ist die RNase H-Domäne lokalisiert, welche die RNA-Matrize, während der Reversen Transkription, abbaut (Beck and Nassal, 2007).

1.1.3.3 Das Hüllprotein

Der S-ORF codiert alle drei Hüllproteine, die den gleichen C-Terminus besitzen. Durch die Verwendung von drei unterschiedlichen Startcodons entstehen drei unterschiedlich lange Proteine. Das 226 Aminosäuren lange SHB besteht aus der S-Domäne, welche vier Transmembran-Domänen (TM1-4) umfasst. Diese Domänen sind durch hydrophobe Schleifen miteinander verbunden und interagieren mit der ER-Membran. Die Schleife zwischen TM2 und TM3, Aminosäure 99 bis 169, beinhaltet die Hauptantigendeterminante (α -Determinante), welche die wichtigsten Epitope zur Induktion einer humoralen Immunantwort enthält (Bhatnagar et al., 1982; Carman et al., 1997; Glebe and Bremer, 2013). Durch Substitutionen in dieser Region ist HBV in der Lage, der Immunantwort zu entkommen (Carman et al., 1990;

Hsu et al., 1997; Coleman, 2006). Das MHB besteht aus der PräS2- und S-Domäne und ist somit 55 Aminosäuren länger als das SHB. Das LHB beinhaltet die PräS1-Domäne, die je nach Genotyp zwischen 108 und 119 Aminosäuren lang ist, die PräS2-Domäne und die S-Domäne (Lamontagne et al., 2016). Welche Funktion das MHB einnimmt, ist weitgehend unbekannt, da es für die Infektion, die Replikation, die Morphogenese oder die Sekretion nicht essenziell ist (Fernholz et al., 1993). Dagegen ist das LHB essenziell für die Infektion, da es eine Bindung mit dem NTCP-Rezeptor auf den Hepatozyten eingeht und somit den Eintritt der Virionen in die Hepatozyten ermöglicht (Yan et al., 2012).

1.1.3.4 Das HBx-Protein

Das 145 Aminosäuren lange HBx-Protein ist ein multifunktionales regulatorisches Protein, welches die Transkription des HBV-Genoms fördert, zytoplasmatische Signaltransduktionswege beeinflussen kann, die Proteasomfunktion reguliert und die Mitochondrienfunktion steuern kann (Bouchard et al., 2001; Bouchard and Schneider, 2004; Zhang et al., 2004; Decorsiere et al., 2016). Des Weiteren reguliert das HBx-Protein die effiziente Transkription der cccDNA in infizierten Hepatozyten (Belloni et al., 2009). Neben der regulatorischen Funktion fungiert das HBx als karzinogener Cofaktor (Kim et al., 1991; Dandri et al., 1996).

1.1.4 Sequenzvariabilität

In einer chronischen HBV-Infektion kann eine *de novo* Produktionsrate von 10^{11} Virionen pro Tag erreicht werden (Nowak et al., 1996). Jedoch ist das HBV-Genom während der Replikation anfällig für Substitutionen aufgrund der fehlenden Korrekturaktivität (*proofreading*) der viralen Polymerase. So liegt schätzungsweise die Häufigkeit von Fehlinsertionen bei 6.28×10^{-4} (Park et al., 2003). Neben einzelnen Substitutionen können auch Insertionen und Deletionen entstehen, wahrscheinlich aufgrund des Wechsels der DNA-Matrize bei der Reversen Transkription, des Spleißens von pgRNA, der Topoisomerase-Spaltung und Ligation der HBV-DNA oder der nicht homologen Rekombination linearer HBV-DNA-Moleküle (Burda et al., 2001). All diese Faktoren führen *in vivo* zu einer Koexistenz zahlreicher verschiedener Varianten, die zusammen als virale Quasispezies bezeichnet werden. Anhand einer Sequenzvariabilität $> 7,5\%$ wird das humane HBV phylogenetisch in zehn Genotypen (A-J) eingeteilt (Okamoto et al., 1988; Kramvis, 2014). Wobei die Genotypen I und J wahrscheinlich intergenotypische Rekombinationen sind (Tran, Trinh et al. 2008, Tatematsu, Tanaka et al. 2009). Innerhalb der unterschiedlichen Genotypen gibt es eine Sequenzdivergenz von 4 bis 8 %, sodass die Genotypen A-D und F-I in 35 Subgenotypen weiter unterteilt werden (Kramvis, 2014). Die Genotypen und vereinzelt Subgenotypen sind geografisch verteilt (Abbildung 1.2). Genotyp A ist mit seinem Subgenotyp A2 überwiegend in Nord- und Westeuropa, sowie in den USA vertreten. Hingegen ist der Subgenotyp A1 in Afrika und Indien häufig. Im

ostasiatischen und australischen Raum treten häufig die Genotypen B und C auf. Der Genotyp D ist überwiegend mit den Subgenotypen D1 bis D3 in Europa, Mittleren Osten und Zentralasien verbreitet. Der Subgenotyp D4 ist in Australien und D5 in Indien lokalisiert. Der Genotyp E ist in West- und Zentralafrika zu finden, wohingegen Genotyp F und H in Südamerika beheimatet sind. Der Genotyp I wurde in Vietnam und Laos und der Genotyp J in Japan entdeckt. Eine Zusammenfassung über die verschiedenen Genotypen und Subgenotypen wurde von A. Kramvis (Kramvis, 2014) erstellt.

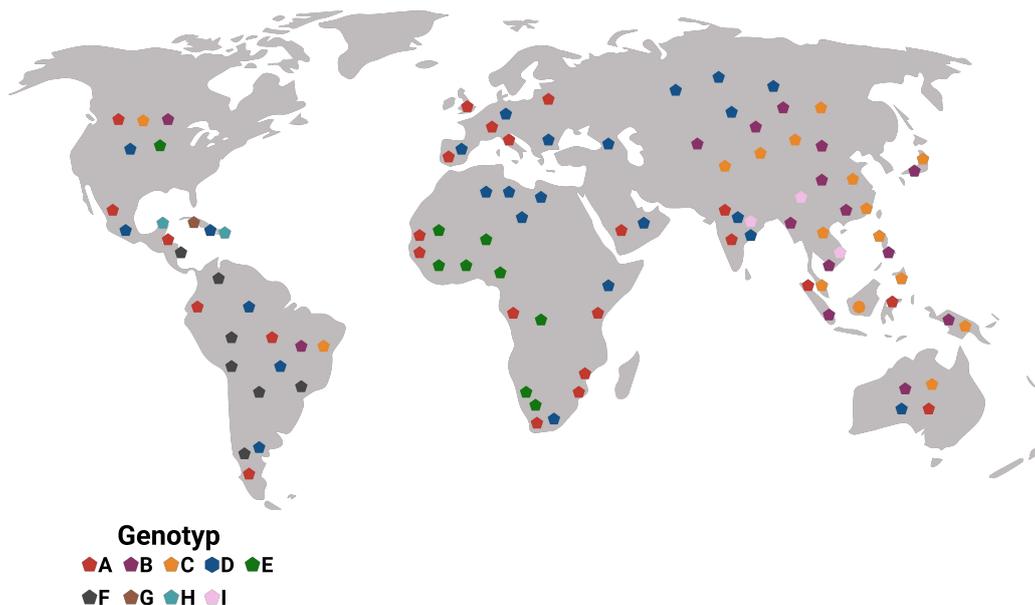


Abbildung 1.2: HBV-Genotyp Verteilung

Die geografische Verteilung der HBV-Genotypen A und I ist farblich dargestellt. Genotyp J fehlt auf dieser Karte, da dieser Genotyp noch nicht vollständig als Genotyp anerkannt ist. Adaptiert nach (Kramvis et al., 2018). Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

1.2 Klinischer Verlauf der Hepatitis B

1.2.1 Epidemiologie und Transmission

Trotz der Einführung einer erfolgreichen prophylaktischen Impfung in den 80er-Jahren lebten 2019 laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzungsweise 296 Millionen Menschen mit einer chronischen HBV-Infektion weltweit. Davon sterben jährlich 820.000 Menschen an den durch HBV verursachten Folgeerkrankungen wie der Leberzirrhose oder dem HCC (WHO, 2021). Ca. 30 % aller Fälle von Leberzirrhose und 53 % aller Fälle von HCC sind mit einer chronischen HBV-Infektion assoziiert (Perz et al., 2006). Die weltweite Prävalenz einer HBV-Infektion liegt bei 3,5 %, jedoch gibt es sehr starke regionale Unterschiede. Die höchste Prävalenz mit über 6 % wurde in den Westpazifikstaaten und Afrika und die niedrigste Prävalenz mit 0,7 % wurde in Nordamerika detektiert (WHO, 2017). Europa zählt ebenfalls zu der Niedrigprävalenzregion. Laut dem Europäischen Zentrum für Prävention und Kontrolle von

Krankheiten (ECDC) leben in der Europäischen Union und im Europäischen Wirtschaftsraum (EU/EWR) 4,7 Millionen Menschen mit einer chronischen HBV-Infektion, was einer Prävalenz von 0,9 % entspricht, wobei es auch hier starke regionale Schwankungen auftreten. Zum Beispiel hat Deutschland eine Prävalenz zwischen 0,1 bis 0,7 % hingegen Bulgarien eine Prävalenz von 3,2 % (Hofstraat et al., 2017; Sperle et al., 2020).

Die Transmission des HBV erfolgt generell durch Kontakt mit Körperflüssigkeiten wie Blut, Speichel oder Samenflüssigkeit, wobei zwei epidemiologische Muster zu erkennen sind. In Ländern mit einer niedrigen Prävalenz wie Deutschland wird HBV überwiegend durch Sexualkontakt übertragen. Nach einer Inkubationszeit von 45 bis 180 Tagen stellen Patienten mit frischer Infektion und Viruslasten von $>10^7$ IU/ml eine Infektionsgefahr für weitere Kontaktpersonen da, jedoch sinkt das Risiko für Übertragungen mit sinkender Viruslast (Gerlich, 2013; RKI, 2016). In Hochprävalenzländern wie Bulgarien vielen asiatischen oder afrikanischen Ländern, ist die perinatale Transmission von der infizierten Mutter auf den Säugling der häufigste Übertragungsweg (Mauss et al., 2018; Dudareva et al., 2019; WHO, 2021).

1.2.2 Serologische Marker

Um infizierte Patienten zu identifizieren, die klinische Phase der Infektion zu beurteilen und eine antivirale Therapie zu überwachen, werden neben der HBV-Viruslast auch serologische Parameter wie HBsAg, anti-HBs, anti-HBc, HBeAg und anti-HBe bestimmt. Dabei ist die Detektion dieser Marker abhängig vom Infektionsverlauf (Abbildung 1.3).

1.2.2.1 HBV-Viruslast

Nach einer HBV-Exposition kann eine Infektion über den Nachweis von HBV-DNA festgestellt werden. Der quantitative Nachweis von HBV-DNA aus Plasma oder Serum erfolgt in der Regel über eine *real time* Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die dabei detektierte Menge wird heutzutage in internationalen Einheiten pro Milliliter (international units =IU/ml), in der Vergangenheit als Kopien pro Milliliter, angegeben. Dabei entspricht 1 IU ~ 5 Genomkopien (Cornberg et al., 2011).

1.2.2.2 HBsAg und anti-HBs

Ab der 1. bis 10. Woche der Infektion kann das HBsAg nachgewiesen werden, welches der wichtigste serologische Marker zum Nachweis einer Infektion ist. Bei Patienten, die eine HBV-Infektion ausheilen, sinkt das HBsAg nach vier bis sechs Monaten unterhalb der Nachweisgrenze. Wenn das HBsAg nach mehr als sechs Monaten noch persistiert, hat der Patient per Definition eine chronische HBV-Infektion. Detektiert wird das HBsAg sowohl qualitativ als auch quantitativ über einen Chemilumineszenz-Mikropartikel-Immunoassay (CMIA). Der quantitative Nachweis ermöglicht Assoziationsstudien zwischen dem HBsAg-

Level und der HBV-Konzentration, wo wurde z. B. eine positive Korrelation zwischen beiden Parametern gefunden (Deguchi et al., 2004).

1.2.2.3 Anti-HBc

Da das HBcAg ein intrazelluläres Antigen ist, wird es bisher nicht routinemäßig für die Diagnostik einer HBV-Infektion verwendet. Jedoch wurde eine Korrelation zwischen der Menge an HBcAg und viraler DNA in der Leber detektiert (Omata et al., 1987). Der spezifische Antikörper gegen das HBcAg ist das anti-HBc, welches als Immunglobulin M (IgM) oder Immunglobulin G (IgG) vorliegen kann. Während ein hoher Titer des anti-HBc-IgM eine akute Infektion anzeigt, deutet ein anti-HBc-IgG-Titer auf eine chronische oder ausgeheilte Infektion hin. Allerdings muss beachtet werden, dass bei einer Exazerbation der chronischen Hepatitis B ebenfalls anti-HBc-IgM nachweisbar sein kann (Banninger et al., 1983; Gerlich et al., 1986), was zu einer falschen Diagnose einer akuten HBV-Infektion führen kann.

1.2.2.4 HBeAg und anti-HBe

Das HBeAg wird während der akuten Phase gebildet und wird als Indikator für die HBV-Replikation und die Infektiosität angesehen. Während Patienten mit spontaner Ausheilung in der Regel nach drei bis vier Monaten der Infektion eine HBeAg-Serokonversion zu anti-HBe durchlaufen, erfolgt die Serokonversion bei einer chronischen Infektion manchmal erst nach mehreren Jahren. Eine Studie von Chen et al. zeigte, dass es eine positive Korrelation zwischen der HBV-DNA-Konzentration und dem semiquantitativen HBeAg-Level gibt (Chen et al., 2017). Bei Patienten nach einer Serokonversion wurde außerdem eine signifikant niedrigere HBV-DNA-Konzentration beobachtet (Rosso di San Secondo et al., 1987). Aufgrund der verringerten viralen Replikation infizieren sich 20 bis 25 % der Neugeborenen *sub partu* bei einer HBeAg-negativen Mutter und sogar nur 10 % bei einer anti-HBe-positiven Mutter. Dagegen liegt die Infektionsrate *sub partu* bei 70 bis 95 %, wenn die Mutter HBeAg positiv ist (Cornberg et al., 2011). Aufgrund des günstigen Einflusses auf den Infektionsverlauf durch Reduktion der Virusreplikation ist die HBeAg-Serokonversion ein wichtiges Therapieziel bei der Behandlung einer HBeAg-positiven Hepatitis B.

1.2.2.5 Transaminasen

Neben den viralen Parametern werden leberspezifische Parameter wie die Alanin-Aminotransferase (ALT) und die Aspartat-Aminotransferase (AST) bei einer HBV-Infektion gemessen. Erhöhte Transaminasen-Spiegel sind Marker für eine Leberentzündung und deuten bei einer chronischen HBV-Infektion auf eine Hepatitis hin. Der normale ALT- und AST-Spiegel bei gesunden Erwachsenen liegt bei 50 IU/l bei Männern und bei 35 IU/l bei Frauen.

1.2.3 Infektionsverlauf

Die Prodromalphase einer akuten Hepatitis ist durch unspezifische Symptome wie Fieber, Übelkeit, Hautausschlag und Arthritis charakterisiert. In mindestens 70 % der Fälle verläuft eine akute Infektion subklinisch oder als anikterische Hepatitis, d. h. ohne Gelbsucht. Bei den restlichen 30 % manifestiert sich eine ikterische Hepatitis, d.h. mit einer Gelbsucht. Während dieser Phase sind ALT und AST deutlich erhöht (bis zu 1.000-2.000 IU/l), wobei die Transaminasen sich in der Regel innerhalb von ein bis vier Monaten dann wieder normalisieren. In 0,5 bis 1 % der Patienten kann die akute Infektion zu einer fulminanten Hepatitis führen. Trotz der Ausheilung einer akuten Hepatitis kann cccDNA in infizierten Hepatozyten persistieren, jedoch wird die Virusreplikation durch das Immunsystem erfolgreich inhibiert (Yotsuyanagi et al., 1998; Gerlich, 2013). Die Progression von einer akuten zu einer chronischen Hepatitis B hängt stark vom Infektionsalter ab (Ganem and Prince, 2004; RKI, 2016; WHO, 2017). Eine chronische Infektion manifestiert sich im Erwachsenenalter nur bei 5 % oder weniger, während eine Infektion im Alter von einem bis fünf Jahren bei 20 bis 50 % der Fälle chronisch verläuft (WHO, 2017; CDC, 2020). Eine perinatale Infektion von einer HBeAg-positiven Mutter resultiert sogar in 90 % der Fälle in einer chronischen HBV-Infektion (Ganem and Prince, 2004; WHO, 2017).

Wird bei einem Patienten sechs Monate nach der Infektion HBsAg und eine HBV-Viruslast im Blut detektiert, hat dieser Patient eine chronische HBV-Infektion, jedoch nicht zwingend eine chronische Hepatitis, die mit einer Inflammation der Leber einhergeht. Patienten mit einer chronischen HBV-Infektion und zirkulierender HBV-DNA haben eine erhöhte Wahrscheinlichkeit sowohl eine Leberzirrhose als auch ein HCC zu entwickeln (Chen et al., 2006b; Iloeje et al., 2006). Eine chronische HBV-Infektion wird aufgrund von HBV-DNA-Konzentration, HBeAg, und ALT-Spiegel im Serum in fünf Phasen differenziert (Abbildung 1.3) (EASL, 2017). Zwischen den Phasen können mehrere Jahre vergehen und nicht jeder Patient durchläuft jede Phase. Die erste Phase wird als die HBeAg-positive chronische HBV-Infektion bezeichnet. Patienten in dieser Phase sind HBeAg-positiv, haben eine hohe virale Replikation, niedrige ALT-Werte und minimale oder keine Inflammation in der Leber. Jedoch wurde in dieser Phase eine erhöhte Häufigkeit an viraler DNA-Integration und klonaler Expansion von Hepatozyten beobachtet, was auf eine Hepatokarzinogenese hinweisen könnte (Mason et al., 2016). Die zweite Phase wird als die HBeAg-positive chronische Hepatitis deklariert. Diese immunreaktive Phase wird assoziiert mit HBeAg-Positivität, einer hohen HBV-DNA-Konzentration und einem hohen oder fluktuierenden ALT-Spiegel. Zusätzlich haben die meisten Patienten eine stark ausgeprägte Leberinflammation und eine beschleunigte Progression der Fibrose (Hoofnagle et al., 2007; McMahon, 2009). Aus dieser Phase können Patienten entweder in die dritte Phase, die HBeAg-negative chronische HBV-Infektion, oder direkt in die vierte Phase, die

HBeAg-negative chronische Hepatitis, übergehen. Die HBeAg-negative chronische HBV-Infektion wird auch als die inaktive „Carrier“-Phase bezeichnet und ist durch die Serokonversion vom HBeAg zu anti-HBe, einer nicht nachweisbaren oder sehr niedrigen HBV-DNA-Konzentration (<2000 IU/ml) und einen normalen ALT-Spiegel charakterisiert. Aufgrund der geringen Leberinflammation haben Patienten in dieser Phase ein niedriges Risiko für Leberzirrhose und HCC. Die meisten Patienten in der HBeAg-negativen chronischen Hepatitis Phase haben eine Substitution in Position W28 des PräCore-Proteins oder in der BCP-Region, sind anti-HBe positiv, haben eine persistierende oder fluktuierende HBV-DNA- und ALT-Konzentration. Eine hepatische Inflammation und die Entwicklung von Fibrose wird mit dieser Phase assoziiert. Die fünfte Phase wird als okkulte HBV-Infektion bezeichnet und zeichnet sich durch die HBsAg-Negativität, mit oder ohne Nachweis von anti-HBs, einer anti-HBc-Positivität und normalen ALT-Spiegel aus. In den meisten Fällen wird nur eine geringe bzw. nicht detektierbare HBV-Viruslast im Serum nachgewiesen, allerdings kann weiterhin cccDNA detektiert werden (EASL, 2017).

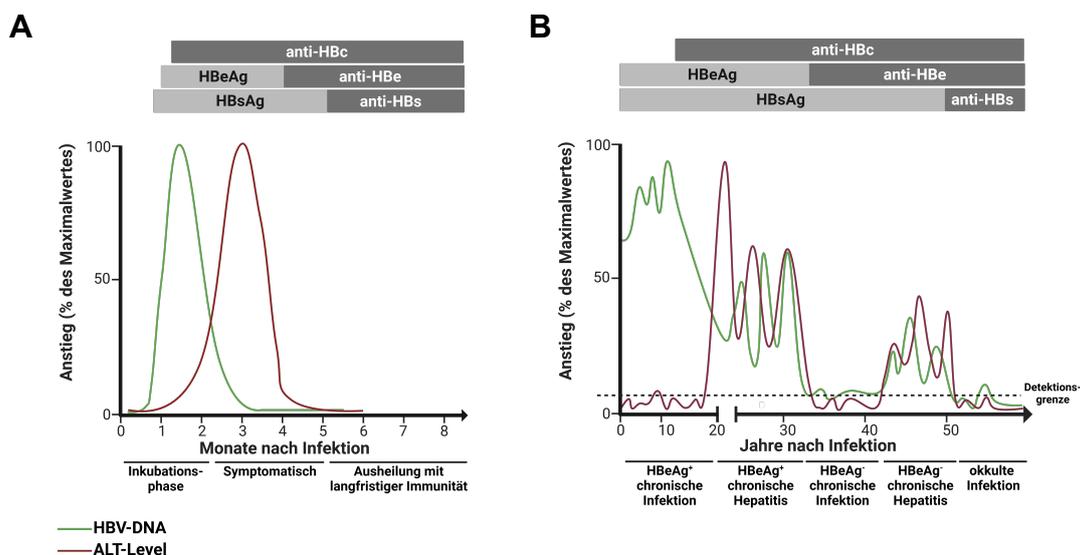


Abbildung 1.3: Immunkinetik einer akuten und chronischen HBV-Infektion

Bei einer akuten HBV-Infektion (**A**) kann schon nach 4 bis 6 Wochen HBV-DNA, HBsAg und HBeAg detektiert werden. Kurz danach beginnt die Produktion von anti-HBc, gefolgt von einer HBV-spezifischen T-Zellantwort und der Produktion von anti-HBs. Somit wird eine Ausheilung der Infektion und lebenslange schützende Immunität erreicht. Bei der chronischen HBV-Infektion (**B**) wird erst Jahre nach der Infektion anti-HBe detektiert. Anhand der Viruslast, dem ALT-Spiegel und dem HBeAg-Status wird eine chronische Infektion in fünf Phasen unterteilt. Die HBeAg-positive chronische Infektion ist charakterisiert durch eine hohe Konzentration an zirkulierender HBV-DNA und einen normalen ALT-Spiegel. Hingegen ist die Viruslast in der HBeAg-positiven chronischen Hepatitis niedriger, jedoch werden hohe oder fluktuierende ALT-Werte detektiert. Diese Phase kann in eine niedrige replikative Phase mit niedrigem ALT-Spiegel übergehen, wobei es zur Serokonversion von HBeAg zu anti-HBe kommt. Die vierte HBeAg-negative chronische Hepatitis Phase wird mit einer hohen viralen Replikation und zusätzlich mit fluktuierenden ALT-Werten assoziiert. In der letzten sogenannten okkulten Phase haben Patienten kein detektierbares HBsAg, mit oder ohne anti-HBs, niedrige ALT- und virale DNA-Konzentration, jedoch kann noch anti-HBc beobachtet werden. Adaptiert nach (Rehermann and Nascimbeni, 2005). Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

Bei der antiviralen Therapie kann das HBsAg als Marker für den Erfolg bzw. Misserfolg der Behandlung verwendet werden. Ist neben der HBV-DNA das HBsAg unter Therapie anhaltend unter der Nachweisgrenze, oder tritt sogar eine Serokonversion zu anti-HBs auf, kann von einer funktionellen Heilung ausgegangen werden. Ist nach Beendigung der Therapie HBsAg zwar nachweisbar, die HBV-DNA-Konzentration allerdings unterhalb der Nachweisgrenze, wird von einer partiellen Ausheilung gesprochen. Bei einer sterilen Ausheilung ist weder HBsAg noch HBV-DNA, einschließlich cccDNA und integrierter HBV-DNA, nachweisbar (Lok et al., 2017). Bei Patienten mit einer spontanen Ausheilung wird ca. fünf Monate nach der Exposition anti-HBs detektiert, welches ein Marker für eine Ausheilung darstellt. Darüber hinaus dient das anti-HBs als Marker für eine erfolgreiche HBV-Impfung, da der Antikörper neutralisierend ist und eine sterile Immunität gegen eine HBV-Infektion verleiht.

1.2.4 Prävention und Therapie

Durch die Einführung einer prophylaktischen Impfung 1982, der generellen Impfpflichtung der WHO von 1992 und der allgemeinen Impfpflichtung für alle Säuglinge der Ständigen Impfkommision (STIKO) des Robert Koch-Instituts von 1995, ist die Prävalenz von HBV-Infektionen weltweit bei Kindern unter fünf Jahren von 1982 bis 2015 von 4,7 % auf 1,3 % gesunken. Durch die Einführung der Säuglingsimpfung in 187 Ländern bis Ende 2017 wurden 84 % der Säuglinge mit drei Dosen des HBV-Impfstoffs immunisiert (WHO, 2017). In Deutschland sind zurzeit monovalente HBV-Impfstoffe, bivalente Kombinationsimpfstoffe gegen das Hepatitis A Virus (HAV) und das HBV und sogar hexavalente Kombinationsimpfstoffe gegen Kinderlähmung, Diphtherie, Tetanus, Keuchhusten, Haemophilus influenzae Typ b und HBV zugelassen. Die prophylaktische Impfung gegen HBV basiert auf einer aktiven Immunisierung mit dem HBsAg. Jedoch gibt es auch noch passive Impfstoffe, die in der Postexpositionsprophylaxe eingesetzt werden. Nachdem zunächst das HBsAg für den Impfstoff aus Plasma von chronisch infizierten Patienten isoliert wurde, werden heutzutage nur noch Impfstoffe verwendet, die rekombinantes HBsAg enthalten, welches in gentechnisch veränderten Hefe- oder Säugetierzellen hergestellt wird (Vitaliti et al., 2013). Nach einer dreimaligen Injektion im Abstand von 0, 1 und 6 Monaten zeigen >98 % der Kinder und Jugendlichen und >95 % der Erwachsenen eine Immunantwort gemessen als Produktion von anti-HBs (Coates et al., 2001). Die meisten Antikörper sind spezifisch für die a-Determinante des HBsAg. Durch die Detektion des anti-HBs-Titers wird der Impferfolg überprüft. Liegt vier bis acht Wochen nach der letzten Impfstoffdosis ein Titer von ≥ 10 IU/l vor, ist von einem langjährigen Schutz vor einer Infektion auszugehen. Für Patienten mit einem Titer < 10 IU/ml (*non responder*) empfiehlt die STIKO bis zu drei weitere Impfdosen und Ermittlung des anti-HBs-Titers nach jeweils vier bis acht Wochen (STIKO, 2019). Nach einer erfolgreichen Immunisierung ist schätzungsweise ein Schutz für 15 bis 20 Jahre gewährleistet (McMahon et al., 2009; Poovorawan et al., 2009). Nur bei Patienten mit humoraler

Immundefizienz und bei Personen mit hohem individuellen Expositionsrisiko wird eine Auffrischungsimpfung nach 10 Jahren empfohlen (STIKO, 2019). Neben den aktiven Impfstoffen existieren passive Impfstoffe, die auf Hepatitis-B-Immunglobuline (HBIG) basieren. Diese werden überwiegend in der Prävention einer perinatalen Transmission in Kombination mit einem aktiven Impfstoff verwendet (Stevens et al., 1985; Cornberg et al., 2011; WHO, 2011).

Obwohl eine wirksame Impfung existiert, treten weltweit immer noch HBV-Infektionen auf. Da die Spontanausheilungsrate bei einer HBV-Infektion sehr hoch ist, gibt es in der akuten Phase zunächst keine Therapieindikation. Ausgenommen sind Patienten mit eingeschränkter Leberfunktion und einer fulminanten Hepatitis. Auch bei einer chronischen HBV-Infektion erhalten nicht alle Patienten eine Therapie. Faktoren wie die virale Replikation, der HBeAg-Status, die Höhe der Transaminasen, der Fibrosestatus sowie der Entzündungsgrad der Leber entscheiden über eine Indikation (Cornberg et al., 2011; EASL, 2017). Die wichtigsten Ziele der Therapie sind laut der EASL (*The European Association for the Study of the Liver*) die Verbesserung des Überlebens und der Lebensqualität, durch die Verhinderung der Progression der Leberzirrhose und des Leberkarzinoms. Um diese Ziele zu erfüllen, empfiehlt die EASL Patienten zu behandeln, die eine HBeAg-positive oder -negative Hepatitis, mit einer HBV-Viruslast >2.000 IU/ml, einem erhöhten ALT-Spiegel oder Zeichen der Leberinflammation, Fibrose oder Zirrhose haben. Unabhängig von dem Grad der Fibrose soll eine Therapie bei Patienten mit einer Viruslast > 20.000 IU/ml und einem um das Zweifache erhöhten ALT-Spiegel initiiert werden. Des Weiteren können HBeAg-positive Patienten mit einem konstanten ALT-Spiegel, jedoch erhöhter Viruslast, die älter als 30 Jahre sind, therapiert werden, unabhängig von der Leberhistologie. Ebenso wie HBeAg-positive und -negative Patienten mit einer Familienanamnese von Zirrhose und HCC (EASL, 2017).

Zurzeit sind zwei pharmakologische Therapieansätze in Deutschland zugelassen, einerseits die Therapie mit Interferon- α (IFN- α), vor allem mit pegyliertem IFN- α (PegIFN- α) und andererseits mit Nukleos(t)id-Analoga (NA). Bei der PegIFN- α -basierten Therapie wird nicht nur die antivirale Wirkung des natürlich vorkommenden Zytokins, sondern auch die immunmodulatorische Funktion zur Stimulation einer Immunantwort zunutze gemacht. Dabei wird das PegIFN- α in einer wöchentlichen Applikation für 48 Wochen verabreicht. Neben der Suppression der viralen Replikation machen ca. 30 % der PegIFN- α behandelten Patienten eine HBeAg-Serokonversion und 3-11 % eine HBsAg-Serokonversion durch (Lau et al., 2005; Cornberg et al., 2011; EASL, 2017). Die Remissionsrate einer PegIFN- α -Therapie liegt bei 20-30 %, jedoch ist die Rate stark von dem ALT-Spiegel, der HBV-Viruslast, dem Alter des Patienten und dem HBV-Genotyp abhängig (Koumbi, 2015; EASL, 2017). Die Remissionsrate einer Behandlung ist bei Genotyp A-infizierten Patienten am besten und am schlechtesten bei Genotyp D-infizierten Patienten (Buster et al., 2008). Weitere Nachteile der PegIFN- α -

Therapie sind die starken Nebenwirkungen wie Müdigkeit, grippeähnliche Symptome, Myelosuppression oder die Exazerbation von Autoimmunerkrankungen (Koumbi, 2015). Darüber hinaus ist eine Interferontherapie kontraindiziert bei einer dekompensierten Zirrhose und einer Schwangerschaft (EASL, 2017).

Im Gegensatz zu der Interferontherapie wird die NA-basierte Therapie als sicher und gut verträglich eingestuft, wobei diese Form der Therapie nur die virale Replikation unterdrückt und nicht die vollständige Eliminierung der cccDNA erreicht (Zoulim, 2012). Zurzeit sind sechs verschiedene NAs in Europa zugelassen. Diese NAs hemmen die virale Polymerase- und Reverse Transkriptaseaktivität, indem sie natürliche Nukleotide nachahmen, die während der viralen Replikation in die neu synthetisierte HBV-DNA eingebaut werden, wodurch es zu einem Kettenabbruch kommt. Dadurch wird einerseits die Reverse Transkription der pgRNA und andererseits die Synthese des positiven Strangs gehemmt (Koumbi, 2015). Ein Schwachpunkt der NA-basierten Therapie ist die Notwendigkeit einer meist lebenslangen Einnahme, die zu Nephrotoxizität und Myopathie führen kann (Fleischer and Lok, 2009) und das Auftreten von Resistenzen, die die Behandlung beeinflussen (EASL, 2017). Des Weiteren ist die HBeAg- und HBsAg-Serokonversionsrate nach einer NA-basierten Therapie niedriger als nach einer Interferontherapie. Nur 20 bis 25 % der HBeAg-positiven Patienten erreichen eine HBeAg-Serokonversion und nur 1 % eine HBsAg-Serokonversion, nach einer einjährigen NA-Therapie (Lampertico and Liaw, 2012; EASL, 2017). Zwölf Monate nach Beendigung einer NA-Therapie liegt die Rezidivrate bei ca. 50 %, verbunden mit dem Risiko, im Rahmen einer Reaktivierung der Inflammation ein Leberversagen zu entwickeln. Daher ist ein Auslassversuch der Therapie sorgfältig abzuwägen. Die Rezidivrate ist bei HBeAg-positiven Patienten niedriger als bei HBeAg-negativen Patienten (Papatheodoridis et al., 2016).

1.2.4.1 Neue therapeutische Ansätze

Ein weiterer Ansatz zur Eradikation von HBV bei Patienten mit einer chronischen Infektion zielt auf die Entwicklung einer therapeutischen Impfung unter Verwendung von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen. Diese Zellen sind von großem Interesse, da sie bei einer HBV-Infektion maßgeblich an der Ausheilung beteiligt sind. Allerdings ist die CD8 T-Zellantwort bei einer chronischen HBV-Infektion beeinträchtigt (Boni et al., 2007; Bengsch et al., 2014). Mögliche Strategien zur Steigerung der HBV-spezifischen T-Zellantwort beziehen sich einerseits auf die funktionelle Wiederherstellung defekter, jedoch noch vorhandener, HBV-spezifischer T-Zellen oder andererseits auf die Aktivierung neuer HBV-spezifischer T-Zellen, z. B. durch Impfung oder adaptiven T-Zell-Transfer. Zur Steigerung der Menge und Funktion HBV-spezifischer T-Zellen wurden in mehreren präklinischen und klinischen Studien therapeutische Impfstoffe basierend auf Adenovirus-Vektoren, modifizierten Vaccinia-Virus Ankara (MVA)-Vektoren und hitzeinaktivierte, rekombinante *Saccharomyces cerevisiae* verwendet (Gaggar et al., 2014; Martin et al., 2015; Backes et al., 2016; Boni et al., 2019b). Des Weiteren befinden sich Peptid-

und DNA-basierte Impfstoffe in klinischen Studien (Godon et al., 2014; Fontaine et al., 2015; Boni et al., 2019a). Da viele Studien noch in frühen Phasen der klinischen Entwicklung sind, ist über die therapeutische Wirksamkeit dieser Impfstoffe wenig bekannt. Jedoch deuten die vorhandenen Ergebnisse darauf hin, dass die Induktion einer virusspezifischen CD8 T-Zell-Reaktion nicht ausreichend ist, um eine signifikante Reduktion von HBsAg oder sogar die Eradikation von HBV zu erreichen. Im Gegensatz dazu scheint ein adaptiver T-Zell-Transfer von HBV-spezifischen T-Zellen zu einer erfolgreichen Kontrolle der Infektion zu führen. So wurde bei HBV-positiven Patienten nach einer Knochenmarktransplantation von Spendern mit einer ausgeheilten HBV-Infektion eine virale Eradikation beobachtet (Ilan et al., 1993; Lau et al., 1997). Ebenfalls führte eine Lebertransplantation von einem HBsAg-positiven Spender in einem Patienten mit ausgeheilter HBV-Infektion zu einer Zunahme der HBV-spezifischen zellulären und humoralen Immunantwort, wodurch die Infektion kontrolliert werden konnte (Loggi et al., 2009).

1.3 Immunpathogenese der HBV-Infektion

HBV aktiviert sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem. Dabei bildet das angeborene Immunsystem eine erste schnelle Reaktion gegen HBV, jedoch wird keine dauerhafte Immunität hergestellt. Das erst Tage später aktivierte adaptive Immunsystem bildet eine HBV-spezifische Immunantwort, wodurch eine HBV-Infektion effektiv bekämpft wird und zusätzlich ein immunologisches Gedächtnis induziert wird. Obwohl HBV keine direkte zytopathische Wirkung hat, wird angenommen, dass die anhaltende Immunreaktion gegen infizierte Hepatozyten zu Leberschäden führt (Chisari and Ferrari, 1995; Maini et al., 2000; Guidotti and Chisari, 2006).

1.3.1 Angeborene Immunantwort auf die HBV-Infektion

Die angeborene Immunantwort bei einer akuten HBV-Infektion ist nicht gut untersucht, da die Verfügbarkeit von *in vivo* und *in vitro* Infektionsmodellen und die Rekrutierung von Patienten in der akuten Phase limitiert ist. Nach einer HBV-Exposition wird das angeborene Immunsystem wahrscheinlich über Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) wie *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs), *RIG-I-like*-Rezeptoren (RLRs) oder Melanom-Differenzierungsantigen 5 (MDA-5), die pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) erkennen, aktiviert (Lu and Liao, 2013; Sato et al., 2015; Zhang and Lu, 2015). Aufgrund dieser Interaktion wird ein antiviraler Status ausgelöst, der durch die Produktion von Typ-I-IFN, das Abtöten von infizierten Zellen durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die Produktion von Zytokinen und Chemokinen und die Reifung und Rekrutierung des adaptiven Immunsystems charakterisiert ist (Akira et al., 2006; Bertoletti and Ferrari, 2012). Zu der Rolle von Typ-I-IFN wie IFN- α und IFN- β bei einer HBV-Infektion gibt es in der Literatur kontroverse Meinungen. In transgenen Mäusen wurde gezeigt, dass IFN- α/β die Virusreplikation in der

Leber hemmen können (McClary et al., 2000; Wieland et al., 2000). Im Gegensatz dazu deuten Experimente an Schimpansen darauf hin, dass in der frühen Infektionsphase während des Eintritts und der Expansion von HBV kein Typ-I-IFN produziert wird und auch keine Expression von Interferon-stimulierten Genen (ISG) stattfindet (Wieland et al., 2004). Auch bei Patienten akuter HBV-Infektion wurde im Vergleich zu gesunden Probanden kein Unterschied in der Typ-I-IFN-Produktion detektiert (Dunn et al., 2009). Diese Daten werden von der Beobachtung untermauert, dass in der Leber von chronischen HBV-Patienten quantitativ nicht mehr IFN oder ISGs exprimiert werden als bei der gesunden Kontrollgruppe (Suslov et al., 2018). Aufgrund dieser Beobachtungen wird HBV als ein „*stealth*“ Virus bezeichnet, welches der angeborenen Immunantwort entkommen kann. Dagegen zeigten *in vitro* Studien, dass eine HBV-Infektion von Hepatozyten mit der Induktion von ISG einhergeht, und daher liegt die Vermutung nahe, dass HBV weniger ein *stealth*“ Virus ist als angenommen (Lucifora et al., 2010; Shlomai et al., 2014). Diese Hypothese wird durch die Beobachtungen von Hösel et al. unterstützt, die gezeigt haben, dass die Expression von Interleukin (IL)-6 zu einer frühen Kontrolle des Virus, einer limitierten Aktivierung der adaptiven Immunantwort und der Verhinderung des Zelltods von infizierten Hepatozyten führt (Hösel et al., 2009). Im Vergleich zur Abwesenheit von pro-inflammatorischen Zytokinen wurden in der akuten Infektion, während des Höhepunkts der HBV-Virämie, das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 in hoher Konzentration detektiert. Dieser Anstieg fiel mit der Hemmung von NK-Zellen zusammen (Dunn et al., 2009). NK-Zellen machen ca. 30-40 % der residenten intrahepatischen Lymphozyten aus und werden antigenunabhängig über Wechselwirkungen zwischen aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren mit ihren Liganden auf infizierten Zellen oder durch Zytokine wie IL-12, IL-15 und IL-18 aktiviert (Norris et al., 1998; Fauriat et al., 2010). Im Kontext einer akuten HBV-Infektion wurde eine Expansion von zirkulierenden NK-Zellen beobachtet (Webster et al., 2000; Fiscaro et al., 2009), jedoch wurde die stärkste Aktivierung und Produktion von IFN- γ erst nach Reduktion der Viruslast ermittelt (Dunn et al., 2009). In einer chronischen Infektion haben NK-Zellen eine verringerte IFN- γ -Produktion (Zhao et al., 2012a), die jedoch über eine Blockade von IL-10 wiederhergestellt werden kann (Peppas et al., 2010). Im Gegensatz dazu scheint die zytotoxische Funktion gegen infizierte Hepatozyten über den Apoptose-induzierenden Liganden (TRAIL) intakt oder sogar erhöht zu sein, was zu einem NK-Zell-vermittelten Leberschaden führt (Dunn et al., 2007; Zhang et al., 2011). Neben den NK-Zellen scheint auch die Funktionalität von antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie Dendritischen Zellen (DC) und Kupffer-Zellen (KC) bei einer chronischen HBV-Infektion eingeschränkt zu sein. Obwohl die Häufigkeit an IFN- α produzierenden pDCs und an Tumornekrosefaktor (TNF)- α produzierenden mDCs in chronischen Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe nicht reduziert ist, wurde eine Beeinträchtigung der IFN- α - bzw. TNF α -Produktion beobachtet (van der Molen et al., 2004; Woltman et al., 2011; Shi et al.,

2012). Während in der akuten Infektion KC proinflammatorische Zytokine wie IL-6, IL-8 und TNF- α produzieren und somit die Abtötung von HBV unterstützen (Hosel et al., 2009), wird im Gegensatz dazu in der chronischen Infektion IL-10 produziert, wodurch die virale Persistenz gefördert wird (Boltjes et al., 2015; Li et al., 2015).

1.3.2 Adaptive Immunantwort auf die HBV-Infektion

Während die Rolle des angeborenen Immunsystems bei einer HBV-Infektion noch kontrovers diskutiert wird, ist es anerkannt, dass das adaptive Immunsystem eine große Rolle bei der Kontrolle der Infektion spielt. Zu den wichtigsten Zellen des adaptiven Immunsystems zählen zytotoxische CD8⁺ T-Zellen, CD4⁺ T-Helferzellen und B-Zellen. Nach 7-10 Wochen, noch bevor die ersten Symptome auftreten, können CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen detektiert werden (Webster et al., 2000). Der Aktivierung der T-Zellen folgte die Aktivierung der humoralen Immunantwort, welche nach 10-12 Wochen detektiert werden kann (Hoofnagle and Di Bisceglie, 1991).

1.3.2.1 Humorale Immunantwort gegen HBV

Die humorale Immunantwort gegen HBV ist notwendig, um eine schützende Immunität aufzubauen, allerdings ist nicht klar, welche Bedeutung sie in der Kontrolle einer chronischen HBV-Infektion einnimmt. Obwohl die B-Zellen anti-HBs, anti-HBe, anti-HBc, sowie Antikörper gegen die Untereinheiten der Polymerase (anti-TP, anti-RT und anti-RNase H) und das HBx-Protein produzieren (Abraham et al., 1989; Rui et al., 1998; Gerlich, 2013), werden zur Diagnostik der klinischen Phase nur anti-HBe, anti-HBc und anti-HBs verwendet. Während anti-HBe und anti-HBc nicht protektiv sind, wird die Produktion von anti-HBs mit der Ausheilung einer akuten Infektion oder einer erfolgreichen Immunisierung assoziiert. In der chronischen Infektion wird kein anti-HBs detektiert, jedoch können 0,5-0,8 % der Patienten in der niedrig replikativen Phase pro Jahr eine Serokonversion durchmachen (McMahon, 2009). Neben der Neutralisation von HBV kann das anti-HBs über eine Blockade des NTCP-Rezeptors und der Heparansulfat-Proteoglykane auf den Hepatozyten die Infektion weiterer Hepatozyten verhindern (Ryu et al., 1997; Shi et al., 2012).

1.3.2.2 Einfluss von CD4⁺ T-Zellen auf eine HBV-Infektion

Die Wichtigkeit von HBV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen wurde in Experimenten mit Schimpansen verdeutlicht. Eine Depletion von CD4 T-Zellen während einer HBV-Virämie hat keinen Einfluss auf den Verlauf einer HBV-Infektion, welche mit einer Ausheilung einhergeht. Hingegen manifestiert sich eine chronische Infektion, wenn CD4 T-Zellen vor einer HBV-Infektion depletiert werden (Thimme et al., 2003; Asabe et al., 2009). Alle HBV-Proteine können eine CD4⁺ T-Zellantwort auslösen (Ferrari et al., 1991; Jung et al., 1991b; Penna et al., 1996; Mizukoshi et al., 2004). Nach spontaner Ausheilung nimmt die Anzahl an Core-spezifischen CD4 T-Zellen ab, jedoch sind sie noch jahrelang nachweisbar (Ferrari et al., 1991; Penna et

al., 1996). Funktionell werden in der akuten Infektion vor allem HBV-spezifische CD4⁺ Th1-Zellen aktiviert, wodurch diese Zytokine wie IFN- γ sezernieren. Somit können CD4⁺ T-Zellen einerseits zur Ausheilung einer HBV-Infektion, andererseits zur Schädigung der Leber beitragen (Penna et al., 1997). Patienten mit einer akuten Infektion haben eine starke und multispezifische CD4 T-Zellantwort, wodurch HBV erfolgreich bekämpft werden kann (Asabe et al., 2009). Im Gegensatz dazu ist bei chronisch infizierten Patienten die CD4 T-Zellantwort schwach und nur auf wenige Epitope fokussiert (Ferrari et al., 1990). Die Rolle von CD4⁺ regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) bei einer chronischen HBV-Infektion ist umstritten. In einigen Publikationen wurde eine erhöhte Häufigkeit an T_{reg}-Zellen in der chronischen Infektion im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe oder einer akuten Infektion beobachtet (Stoop et al., 2005; Xu et al., 2006; Peng et al., 2008). Eine andere Publikation fand keine Unterschiede (Franzese et al., 2005). T_{reg}-Zellen können via IL-10 oder dem Transformierenden Wachstumsfaktor (TGF)- β die Immunantwort direkt oder über Zell-Zell-Kontakt regulieren. Deshalb führt eine Depletion von T_{reg}-Zellen zu einer verbesserten Proliferation und IFN- γ -Produktion von HBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (Franzese et al., 2005; Stoop et al., 2005).

1.3.2.3 Rolle von CD8⁺ T-Zellen in der HBV-Infektion

Während einer natürlichen HBV-Infektion sind HBV-spezifische CD8⁺ T-Zellen für die Pathogenese und Viruseliminierung verantwortlich (Chisari and Ferrari, 1995). Dabei üben sie zytolytische und nicht-zytolytische Effektorfunktionen aus. Über den zytolytischen Mechanismus, welcher durch die Ausschüttung der lytischen Enzyme Perforin und Granzym, sowie die Fas/Fas-Ligand induzierte Apoptose charakterisiert ist, können CD8 T-Zellen direkt infizierte Hepatozyten abtöten (Ando et al., 1994). Allerdings hat die nicht-zytolytische Effektorfunktion, über die Ausschüttung von IFN- γ und TNF- α , einen größeren Einfluss auf die Kontrolle einer HBV-Replikation (Guidotti et al., 1996; Phillips et al., 2010). Damit die CD8 T-Zellen ihre Effektorfunktionen ausüben können, müssen sie zunächst fragmentierte virale Proteine, sogenannte Epitope, erkennen. Diese Epitope werden über einen Komplex mit dem Humanen Leukozyten Antigen (HLA)-Klasse-I-Molekül auf infizierten Zellen den CD8 T-Zellen präsentiert. Dieser Komplex wird über eine endogene Antigenprozessierung im Zytosol von APCs gebildet. Nach dem Eintritt von HBV in die Zelle, werden HBV-Proteine über das Proteasom in kleine Peptidfragmente degradiert. Anschließend werden die Peptidfragmente mit Hilfe des Peptidtransporter-Proteins TAP (*Transporter associated with Antigen Processing*) in das ER transportiert, wo sie mit in der ER-Membran lokalisierten HLA-Molekülen eine Bindung eingehen. Der entstandene stabile Peptid/HLA-Molekül-Komplex verlässt das ER und wird über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert. HLA-Moleküle bestehen aus einer membranständigen schweren α -Kette und einer löslichen leichten β 2-Mikrogloblinkette. Die Peptidbindungsfurche von HLA-Klasse-I-

Molekülen ist durch die Enden der α -Helixen, der α -Kette geschlossen, wodurch Peptide mit einer Länge von 8-14 Aminosäuren eine Bindung eingehen können (Abbildung 1.4A). Typischerweise besitzt ein HLA-Klasse-I-Molekül sechs Bindungstaschen für die Aminosäuren eines Peptids. Davon dienen zwei bis drei als Ankerpositionen, in der Regel für die zweite und letzte Aminosäure des Peptids (Klein and Sato, 2000; Sidney et al., 2008). Durch diese Ankerpositionen können nur Peptide mit einer hohen Bindungsaffinität an ein bestimmtes HLA-Molekül binden. Diese Beschränkung wird als HLA-Restriktion bezeichnet. Jedes Individuum kann bis zu sechs verschiedene HLA-Klasse-I-Allele tragen, jeweils ein HLA-A, HLA-B und HLA-C mütterlicher- und väterlicherseits, wobei einige HLA-Allele häufig gemeinsam vererbt werden, sogenannte HLA-Haplotypen. Da der HLA-Lokus sehr polymorph ist, herrscht eine große Diversität an HLA-Allelen, sodass bis heute 3.629 HLA-A-Allele, 4.752 HLA-B-Allele und 3.347 HLA-C-Allele identifiziert wurden, die funktionelle Proteine codieren (Robinson et al., 2015). Der WHO-Nomenklaturausschuss für Faktoren des HLA-Systems definiert die Nomenklatur von HLA-Allelen, wobei die Buchstaben A, B und C den HLA-Lokus beschreiben. Die ersten beiden Zahlen, wie z.B. bei HLA-A*01:01, beschreiben die Gruppe von Allelen, die das HLA-A*01-Antigen codieren. Die nächsten beiden Ziffern definieren eine Subgruppe des Allels, die auf Aminosäureebene unterschiedlich ist. Aufgrund dieser Variabilität hat jedes Individuum ein eigenes Repertoire an Epitopen, welche eine Bindung mit dem HLA-Allel eingehen können. Wird ein Epitop über ein HLA-Allel an der Oberfläche präsentiert, kann der T-Zell-Rezeptor (TZR) der CD8 T-Zellen diesen Komplex erkennen und geht sowohl mit dem HLA-Allel als auch mit dem Epitop eine Bindung ein (Abbildung 1.4B).

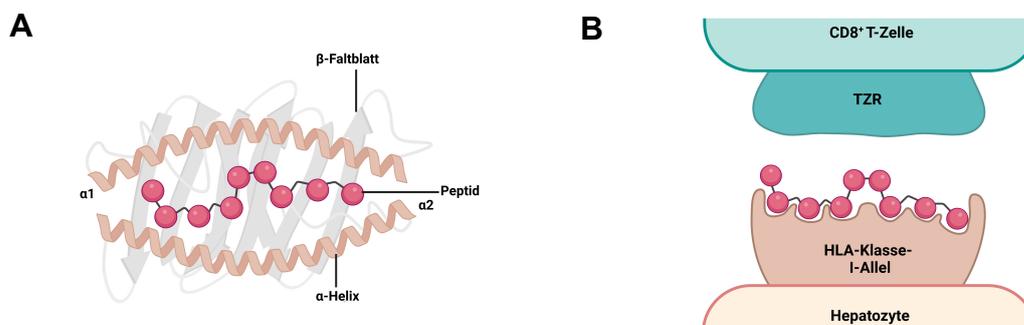


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Antigenpräsentation eines HBV-Peptids über ein HLA-Klasse-I-Allel

Struktur von einem HLA-Klasse-I-Allel mit einem HBV-Peptid (**A**). Die Peptidbindungsgrube von HLA-Klasse-I-Molekülen wird durch zwei α -Helices über einem β -Faltblatt gebildet (Darstellung von oben). Über einen Peptid/HLA-Klasse-I-Allel-Komplex wird ein HBV-Peptid auf der Oberfläche von infizierten Hepatozyten dem T-Zell-Rezeptor (TZR) von CD8⁺ T-Zellen präsentiert (Darstellung von der Seite, **B**). Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt

Die Ausheilung einer akuten HBV-Infektion wird mit einer polyklonalen und multispezifischen HBV CD8 T-Zell Antwort assoziiert (Chisari and Ferrari, 1995). Gegen mehrere Core-, Hüll-, HBx-Protein und Polymerase Epitope wurde eine CD8-spezifische T-Zellantwort bei Patienten mit einer akuten HBV-Infektion detektiert (Penna et al., 1991; Sette et al., 1994; Rehmann

et al., 1995). Nach der vollständigen Ausheilung einer Infektion sinkt die Häufigkeit der HBV-spezifischen T-Zellen ab, bis sie nach 30 Jahren nicht mehr detektierbar ist (Kefalakes et al., 2015b). Im Gegensatz zu einer akuten Infektion wird eine chronische HBV-Infektion mit einer schwachen und weniger breit angelegten T-Zellantwort assoziiert, welche im peripheren Blut kaum nachweisbar ist, vor allem bei Patienten mit hoher Viruslast (Jung et al., 1991a; Penna et al., 1991; Rehmann et al., 1995; Webster et al., 2004). Sowohl Studien mit mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMCs) als auch Studien in der Leber zeigten eine Heterogenität von HBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen gegen das Zielantigen (Gehring et al., 2007; Hoogeveen et al., 2019; Schuch et al., 2019). In der chronischen Infektion sind Core-spezifische CD8⁺ T-Zellen signifikant häufiger vorhanden als Polymerase-spezifische CD8⁺ T-Zellen, wohingegen Hüllprotein-spezifische CD8⁺ T-Zellen kaum nachweisbar sind (Hoogeveen et al., 2019; Schuch et al., 2019). Eine Erklärung für die geringe Häufigkeit an CD8 T-Zellen in der chronischen Infektion könnte ein dysfunktionaler, sogenannter erschöpfter („*exhausted*“) T-Zell-Phänotyp sein. Mehrere Studien konnten zeigen, dass in der chronischen Infektion die Funktionalität wie die Produktion von IFN- γ , IL-2 und die Proliferation von HBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen beeinträchtigt ist (Boni et al., 2007; Das et al., 2008; Kurktschiev et al., 2014). Auch eine mitochondriale Dysfunktion und ein beeinträchtigter Stoffwechsel können zur Entstehung des *exhausted* Phänotyps beitragen (Schurich et al., 2016; Fiscaro et al., 2017). Darüber hinaus haben *exhausted* CD8⁺ T-Zellen eine erhöhte Expression von inhibitorischen Rezeptoren wie PD-1 (*programmed cell death protein 1*), CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) oder TIM-3 (*t-cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing 3*), wodurch die Zellen eine Funktionsstörung haben. Durch Blockade dieser Rezeptoren kann zumindest teilweise das Proliferationspotenzial und die Zytokinproduktion wiederhergestellt werden (Boni et al., 2007; Schurich et al., 2011; Wu et al., 2012).

1.3.2.4 CD8 T-Zell-assoziierter Selektionsdruck

Neben der Induktion eines dysfunktionalen *exhausted* Phänotyps von CD8⁺ T-Zellen können Viren der Immunantwort entgehen, indem Mutationen in wichtigen Zielepitopen selektiert werden, die funktionell zu einer Immunevasion führen und zur Entstehung einer persistierenden Infektion beitragen (Timm and Walker, 2015). Diese Mutationen werden durch die fehlende Korrekturlesefunktion der Polymerase begünstigt und durch den Immundruck von CD8 T-Zellen selektiert. Durch die spezifische Interaktion des HLA/Peptid/TZR-Komplexes können CD8⁺ T-Zellen einen Selektionsdruck auf das Virus ausüben, wodurch es zu *Escape*-Mutationen im Epitop oder in den flankierenden Regionen des Epitops kommt (Allen et al., 2004; Walker et al., 2016). Unterschiedliche molekulare Mechanismen wurden beschrieben, die zum *Escape* führen. Substitutionen in den Ankerpositionen können die Bindung an das HLA-Molekül verhindern, während Mutationen im Zentrum des Epitops die Erkennung durch den TZR stören (Soderholm et al., 2006). Des Weiteren können Mutationen die

Antigenprozessierung beeinflussen (Walker et al., 2016). Viele dieser *Escape*-Mutationen in viralen Epitopen sind reproduzierbar bei Patienten mit relevanten HLA-Klasse-I-Allelen und wurden neben verschiedenen Hepatitisviren wie dem HBV, dem Hepatitis C Virus (HCV), dem Hepatitis D Virus (HDV) und auch im Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) beobachtet (Allen et al., 2004; Timm et al., 2004; Kefalakes et al., 2015a; Kefalakes et al., 2019). Im Kontext einer HBV-Infektion existieren vor allem Studien zum CD8 T-Zell-Selektionsdruck für die Genotypen B und C. In diesen Studien wurden sowohl im Core-Protein als auch in der Polymerase und dem Hüllprotein HLA-Klasse-I-assoziierte Substitutionen beobachtet (Liu et al., 2008; Abbott et al., 2010; Desmond et al., 2012; Zhang et al., 2018). Besonders häufig wurden dabei Substitutionen in der Polymerase beschrieben (Desmond et al., 2012). Für die im europäischen Raum am häufigsten vorkommenden Genotypen A und D gibt es kaum Studien über den CD8 T-Zell-assoziierten Selektionsdruck. Die „*proof of principle*“ Studie von Kefalakes et al. konnte zeigen, dass sich das Core-Protein in Genotyp A und D auf Populationsebene an den HLA-Klasse-I-assoziierten Selektionsdruck von CD8 T-Zellen anpasst (Kefalakes et al., 2015a).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Jährlich sterben fast eine Million Menschen an den Folgen einer HBV-Infektion. Da die zugelassenen Medikamente entweder nur die virale Replikation unterdrücken oder bei nur sehr wenigen Patienten zu einer funktionellen Ausheilung der Infektion führen, müssen andere therapeutische Ansätze entwickelt werden, die eine echte Heilung der chronischen Hepatitis B erlauben. Ein möglicher Ansatz bietet die therapeutische Impfung durch die Aktivierung von HBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen oder andere CD8 T-Zell-basierte Therapieverfahren. Jedoch wird die Entwicklung eines erfolgreichen therapeutischen Impfstoffs durch die genetische Variabilität von HBV erschwert. Diese Variabilität wird durch das Fehlen einer Korrekturlesefunktion der Reversen Transkriptase von HBV begünstigt und führt unter dem immunologischen Druck zur Selektion von Varianten, die zu einer Immunevasion führen. Schon in vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass bei einer chronischen Hepatitis B Substitutionen in Zielantigenen selektiert werden, um der CD8⁺ T-Zell-Antwort zu entkommen. Jedoch ist unklar, welches Ausmaß diese Form der Adaption über das komplette HBV-Genom hat. Daher wurde im Rahmen dieser Dissertation der Einfluss des CD8 T-Zell-Selektionsdrucks auf die Evolution des Hepatitis B Virus umfassend charakterisiert.

2 Materialien und Patienten

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Architect HBeAg	Abbott
Architect HBsAg	Abbott
Anti-Mouse Ig, κ /Negative Control Compensation Particles Set (BD CompBeads)	Becton Dickinson (BD)
BD FACS™ Clean	BD
BD FACS™ Flow	BD
BD FACS™ Shutdown Solution	BD
BD FACS™ Rinse	BD
Biozym LE Agarose	Biozym
Brefeldin A (BFA)	Sigma
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) (25 mg/ml)	Sigma
Cellclean® CL50	Sysmex
Cellpack®	Sysmex
CellTrics® filter 50 μ m	Sysmex
COBAS® AmpliPrep/	Roche
COBAS® TaqMan® HBV Test, v2.0	
Cytometer Setup & Tracking Beads Kit (CST beads)	BD
Biocoll Separating Solution	Biochrome
Dimethylsulfoxid (DMSO) \geq 99.8 %	Roth
DNA-Ladepuffer (6x)	Thermo Fisher Scientific
dNTP Mix (5 μ mol per dNTP)	Bio-Budget Technologies GmbH,
DpnI (20 Units/ml)	NEB
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, 1x (PBS)	Gibco
Ethanol Absolut	Merck
Ethidiumbromid (0,025 %, 250 μ g/ml)	Roth
FastImmune™ CD28/CD49d	BD
GeneRuler 1 kB Plus DNA Standard	Thermo Fisher Scientific
Gibson Assembly Master Mix	NEB
GoTaq® Hot Start Polymerase	Promega
IC Fixation Puffer	Thermo Fisher Scientific
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Thermo Fisher Scientific

Q5 High Fidelity Polymerase	NEB
Nuklease-freies Wasser	Ambion
NEB Puffer 2	NEB
Permeabilisierungspuffer (10x)	Thermo Fisher Scientific
Poly-L-lysine hydrobromide, 30-70 kDa	Sigma
2-Propanol	VWR
Pvull (10 Units/ml)	NEB
Stromatolyser®-WH	Systemex
Tris-Borate-EDTA-Puffer (10x)	Sigma
0.05 % Trypsin-EDTA (1x)	Gibco

2.1.2 Zellkultur-, Bakteriennährmedien und Zusätze

Ampicillin	Roth
Fetales Kälberserum (FBS) superior	Biochrome
Interleukin-2 (IL-2) human	Roche
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 1M	Gibco
Luria-Bertani (LB) Agar (Lennox)	Thermo Fisher Scientific
LB-Medium	Roth
Pen Strep (10,000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin)	Gibco
MEM NEAA (100X)	Gibco
Minimum Essential Medium Non-essential amino acids	
RPMI 1640 (1X) + GlutaMAX™-I	Gibco
SOC-Medium	NEB

2.1.3 Zusammensetzung der Nährmedien für Zell- und Bakterienkulturen

Tabelle 2.1: Zell- und Bakterienkulturmedien und Zusätze

Medium	Zusätze
Einfriermedium	FBS 10 % DMSO
LB-Agar	LB-Flüssigmedium 1,5 % (w/v) Agar
LB-Flüssigmedium	1 % (w/v) Trypton 5 % (w/v) Hefeextrakt 5 % (w/v) NaCl 100 µg/ml Ampicillin

R10 Nährmedium für PBMCs	RPMI 1640 10 % FBS Superior (hitzeinaktiviert, 30 min 56°C) 10 mM HEPES 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
--------------------------	--

2.1.4 Bakterien

Die chemisch kompetenten NEB5-alpha *E. coli*-Zellen wurden kommerziell mit dem Gibson Assembly Cloning Kit von NEB erworben und hatten folgende Eigenschaften *fhuA2 Δ(argF-lacZ) U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*. Bis zur Verwendung der Bakterien wurden diese bei -80 °C gelagert.

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

C-Chip Einweghämocytometer Neubauer	NanoEnTek
Cellstar® Röhrchen, 15 ml, 50 ml (Falconröhrchen)	Greiner
Combitips advanced, 5 ml, 10 ml	Eppendorf
costar® 50 mL Reagenzreservoir	Corning
costar® Stripette, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning
FACS-Röhrchen, 5 ml	Sarstedt
Kryoröhrchen	Greiner
Leucosep™ Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Greiner
MicroAmp® 8-Kappenstreifen	Thermo Fisher Scientific
PCR-Reaktionsgefäßstreifen, 0,2 ml	Eppendorf
Pipettenspitzen, 10 µl, 10/20 µl, 20 µl, 200 µl, 1.000 µl	Starlab
QX 0,2 ml 12-Reaktionsgefäßstreifen	Qiagen
1,5 ml Reaktionsgefäße Eppis safe lock	Sarstedt
2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
Sapphire Mikroplatte, 96-Loch	Greiner
Zellkulturflaschen, 25 cm ²	Corning Incorporated
Zellkulturflaschen, 75 cm ²	Corning Incorporated
Zellkulturflaschen, 175 cm ²	Sarstedt
Zellkulturplatten, 6-Loch	TPP
Zellkulturplatten, 24-Loch	Corning
Zellkulturplatten, 48-Loch	Greiner
Zellkulturplatten, 96-Loch-U-Bodenplatte, steril	VWR

2.1.6 Geräte

Allegra® X-15R Zentrifuge	Beckman Coulter
ARCHITECT i2000SR Immunoassaysystem	Abbott

Axiovert 40 CFL Mikroskop	Zeiss
Biozym® Sprout Minizentrifuge	Biozym
CO ₂ -Inkubator Heraeus BBD 6220	Heraeus
COBAS® AmpliPrep/	Roche
COBAS® TaqMan® System	
Eclipse TS100 Inverted Mikroskop	Nikon
Eismaschine AF 100	Scotsman® Ice Systems
EZ1 Advanced XL	Qiagen
FACS LSRFortessa	Becton Dickinson (BD)
Flüssigstickstofftank MVE HEco Serie 800-190	Jutta Ohst german-cryo GmbH
Gefrierschrank, -20 °C	Bosch
Geldokumentations UV-System	Intas
Gelelektrophorese Kammer Agagel, mini	Biometra
Gelelektrophorese Kammer Agagel, maxi	Biometra
Gelelektrophorese Power Supply EPS301	Biometra
Heraeus Megafuge 40R	Thermo Fisher Scientific
8-Kanal Pipette Research®, 300 µl	Eppendorf
12-Kanal Pipette Research® plus, 30-300 µl	Eppendorf
Kühlschrank, 4 °C	Bosch
Mikrowelle	Sharp
Mr. Frosty™ Cryo 1 °C Einfriergefäß	Nalgene
NanoDrop 2000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific
Pipette Research® plus, 100 – 1.000 µl	Eppendorf
Pipette Research® plus, 20 - 200 µl	Eppendorf
Pipette Research® plus, 10 - 100 µl	Eppendorf
Pipette Research® plus, 2 - 20 µl	Eppendorf
Pipette Research® plus, 0,5 -10 µl	Eppendorf
Pipette Research® plus, 0,1 - 2,5 µl	Eppendorf
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann
QIAxcel Advanced System	Qiagen
Sicherheitswerkbank HeraSafe Laminar Flow	Thermo Fisher Scientific
Thermomixer comfort	Eppendorf
Thermocycler TProfessional TRIO	Biometra
Ultra-Low Temperature Freezer U725-G Innova ® -80 °C	New Brunswick
Vortexer L46	Labinco
Vortexer VV 3	VWR
Wasserbad	Kottermann

XP-300 Zellzählgeräts
Zentrifuge 5415 D

Sysmex
Eppendorf

2.1.7 Kits

Gibson Assembly Cloning Kit	NEB
QIAamp® DNA Blood Mini Kit	Qiagen
QIAxcel DNA Screening Kit	Qiagen
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen
EZ1 Virus Mini Kit v2.0	Qiagen

2.1.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Eurofins Genomics synthetisiert. Die lyophilisierten Primer wurden mit nukelase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 10 pmol/µl eingestellt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2.2: Oligonukleotidesequenzen für PCR

Primer ID	Primersequenz 5' – 3'	Fragment (PCR Runde)	Produktgröße
TS-1585_F_int TS-2419_R	TTCGCTTCACCTCTGCACGT GCGACGCGGNGATTGAGAYCT	Core (1)	835 bp
HBVCoreF TS-2397_R_int	TGTCAACGACCGACCTTGAGG CGTCTGCGAGGYGAGGGAGTTC	Core (2)	717 bp
HBVpol.1_F TS-1793_R	GGAGTGTGGATTCGCACTCC CCAATTTATGCCTACAGCCTC	Polymerase (1)	2713 bp
HBVpol.1_F_int TS-1796_R	AGACCACCAAATGCCCTATC CAATTTATGCCTACAGCCTCCTA	Polymerase (2)	2682 bp
pUC18-TS-1796-F pUC18-Pol-1-F_int-R	TAGGAGGCTGTAGGCATAAATTG GGATCCCCGGGTACCGAGCT GATAGGGGCATTTGGTGGTCTTC TAGAGTCGACCTGCAGGCATGC	Polymerase	2686 bp

Tabelle 2.3: Oligonukleotidesequenzen für Sanger-Sequenzierung

Primer ID	Primersequenz 5' – 3'	Fragment
HBVCoreF	TGTCAACGACCGACCTTGAGG	Core
TS-2397_R_int	CGTCTGCGAGGYGAGGGAGTTC	Core
HBVpol.1_F_int	AGACCACCAAATGCCCTATC	Polymerase
HBVpol.1_R_int	AAACGGACTGAGGCCCACTCC	Polymerase

HBVpol.2_F_int	TGTCCTGGYTYTCGCTGGATG	Polymerase
TS-1796_R	CAATTTATGCCTACAGCCTCCTA	Polymerase

2.1.9 Peptide

Alle verwendeten Peptide wurden kommerziell bei EMC Microselection oder Peptides&Elephants (P&E) erworben. Alle Peptide wurden mit einer Reinheit von > 70 % und freien Säuren am C-Terminus synthetisiert. Die lyophilisierten Peptide wurden mit DMSO in einer Konzentration von 20 mg/ml gelöst und bei -80 °C gelagert. Für die Experimente wurde die Lösung mit RPMI-Medium ohne Zusätze weiter auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2.4: Peptide

Peptid	Sequenz	Protein	Position	HLA-Allel Restriktion	Hersteller
p780	TSRDLVVSY	Core	80-88	HLA-B*15	P&E
p456	YVNTNMGLKFR	Core	88-98	HLA-A*33	P&E
p776	NTNMGLKFR	Core	90-98	HLA-A*33	P&E
p460	RETVIEYLVSF	Core	112-122	HLA-B*15	P&E
p775	TVIEYLVSF	Core	114-122	HLA-A*26	P&E
p454	FGVWIRTPPAYR	Core	122-133	HLA-A*31	P&E
p820	YRPPNAPI	Core	132-139	HLA-B*07	P&E
p819	YRPPNAPIL	Core	132-140	HLA-B*07	P&E
p245	YRPPNAPILS	Core	132-141	HLA-B*07	P&E
p810	RPPNAPILS	Core	133-141	HLA-B*07	P&E
p786	RRRRSQSPR	Core	166-174	HLA-B*27	P&E
p785	RRRSQSPRR	Core	167-175	HLA-B*27	P&E
p784	RRSQSPRRR	Core	168-176	HLA-B*27	P&E
p794	AEDLNLGNL	Polymerase	39-47	HLA-B*40	P&E
p795	EDLNLGNL	Polymerase	40-47	HLA-B*40	P&E
p790	CEQFVGPL	Polymerase	95-101	HLA-B*13	P&E
p789	CEQFVGPLTV	Polymerase	95-102	HLA-B*13	P&E
p788	CEQFVGPLTVN	Polymerase	95-103	HLA-B*13	P&E
p792	ARFYPNVTK	Polymerase	114-122	HLA-B*27	P&E
p801	SPYSWEQEL	Polymerase	172-180	HLA-B*40	P&E
p863	HPTARRPF	Polymerase	238-245	HLA-B*35	EMC
p864	NLASKSASCLY	Polymerase	257-267	HLA-B*35	EMC

p917	LASKSASCLY	Polymerase	258-267	HLA-B*35	EMC
p865	FPCWWLQF	Polymerase	311-318	HLA-B*35	EMC
p866	FPCWWLQFR	Polymerase	311-319	HLA-B*35	EMC
p867	WPDANKVGAGAF	Hüllprotein	41-52	HLA-B*35	EMC
p916	FTPPHGGLL	Hüllprotein	56-64	HLA-B*35	EMC
p868	TPPHGGLL	Hüllprotein	57-64	HLA-B*35	EMC
p869	SPQAQGIL	Hüllprotein	67-74	HLA-B*35	EMC
p915	LPANPPPAS	Hüllprotein	77-85	HLA-B*35	EMC

2.1.10 Antikörper und fluoreszierende Farbstoffe

Alle konjugierten Antikörper wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific bezogen, bei 4 °C gelagert und waren Mouse anti-Human. Tabelle 2.5 gibt die Menge an, die zur Färbung von 1×10^6 Zellen verwendet wurde.

Tabelle 2.5: Verwendete Antikörper und fluoreszierende Farbstoffe für die Durchflusszytometrie

Spezifität	Fluorochrom	Klon	Konzentration [$\mu\text{l}/10^6$ Zellen]
CD3	Peridinin-Chlorophyll-Proteinkomplex (PerCP) Cy5.5	OKT3	1
CD4	Phycoerythrin (PE)	RPA-T4	2
CD8	Allophycocyanin (APC)	RPA-T8	2
IFN- γ	Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)	4S.B3	1
Fixierbarer Viabilitätsfarbstoff	eFluor 780		0,1

2.1.11 Vektoren

Der pUC18-Vektor wurde kommerziell bei NEB erworben (Abbildung 2.1).

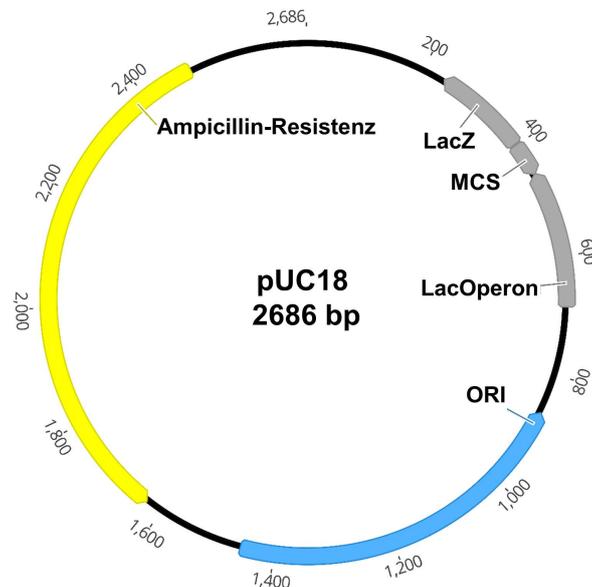


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des pUC18-Vektors

Der pUC18-Vektor verfügt neben dem Replikationsursprung (ORI) und einem Ampicillin-Resistenzgen, eine multiple Klonierungsseite (MCS) innerhalb des lacZ-Gens.

Zur Identifizierung der HBV-Quasispezies wurde das HBV-Polymerase-Fragment in die MCS des pUC18-Vektor kloniert (Abbildung 2.2).

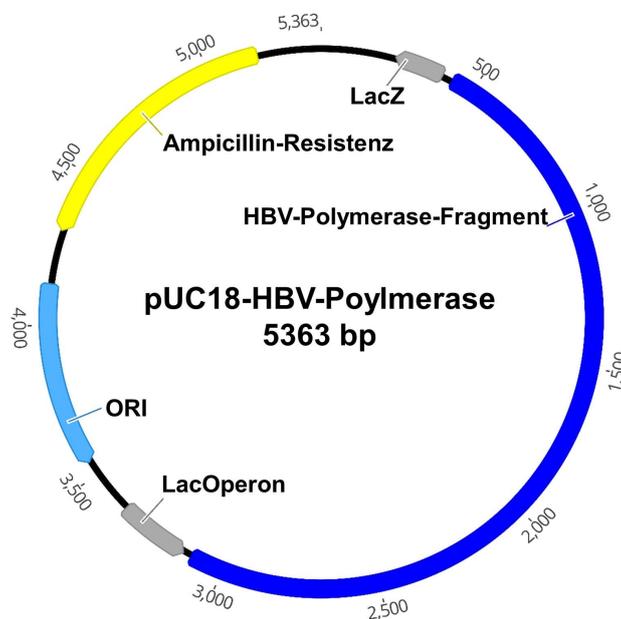


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des pUC18-HBV-Polymerase-Vektors

Mittels Gibson Assembly wurde in die MCS das HBV-Polymerase-Fragment kloniert. Weitere Details sind in Abbildung 2.1 dargestellt.

2.1.12 HBV-Referenzsequenzen

Referenzsequenzen wurden aus der öffentlichen Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) heruntergeladen.

Tabelle 2.6: Referenzsequenzen unterschiedlicher HBV-Subgenotypen

Referenz-ID	Genotyp
FJ692569.1	A1
HE576988.1	A2
AF282917.1	B1
JQ688405.1	B2
GQ358136.1	B3
FJ023632.1	B4
JQ688403.1	C1
JQ688404.1	C2
AF280817.1	D1
GQ477452.1	D2
KM519455.1	D3
HE974372.1	D4
GQ205377.1	D5
HE974380	E

2.1.13 Software und Internetseiten

BioRender	https://app.biorender.com/user/signin
EndNote X9	PDF Tron™ Systems Inc.
Exakter Test auf Unabhängigkeit nach Fisher	https://www.langsrud.com/stat/Fishertest.htm
FlowJo V10.1	Tree Star Inc.
Geneious® 10.2.6	Biomatters Ltd.
GraphPad Prism 5.04	GraphPad Software, Inc.
Immune Epitope Database (IEDB)	https://www.iedb.org
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Shannon-Entropie	https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ENTROPY/entropy_one.html
SeqFeatR	https://seqfeatr.zmb.uni-due.de
SYFPEITHI	http://www.syfpeithi.de/

2.2 Patienten

Blutproben von HBV-infizierten Individuen wurden am Institut für Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf, Institut für Virologie und Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie des Universitätsklinikums Duisburg-Essen gesammelt. Des Weiteren wurden Blutproben freundlicherweise von Kooperationspartnern aufgelistet in Tabelle 2.7 zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2.7: Kooperationspartner

Kooperationspartner	Klinik/ Institut
Verena Keitel	Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf
Hans Bock	
Christoph Neumann-Haefelin	Klinik für Innere Medizin II, Gastroenterologie, Hepatologie, Endokrinologie und Infektiologie des Universitätsklinikums Freiburg,
Anke Kraft	Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie, Medizinische Hochschule Hannover
Markus Cornberg	
Mala Maini	Abteilung für Infektion und Immunität, Institut für Immunität und Transplantation, University College London, Vereinigtes Königreich
Georg Lauer	Abteilung für Gastroenterologie, Massachusetts General Hospital, USA
Julian Schulze zur Wiesch	Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Jacob Nattermann	Medizinische Klinik und Poliklinik I, Universitätsklinikum Bonn

Insgesamt umfasst die Kohorte 544 chronisch HBV-infizierte Patienten. Der Nachweis von HBV-spezifischen Parametern erfolgte in der Diagnostik des Instituts für Virologie am Universitätsklinikum Düsseldorf oder an den einzelnen Standorten.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität (Studennummer 4888) bewilligt.

Eine vollständige Tabelle aller Patientendaten ist im Anhang (Tabelle 6.1) zu finden.

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

Zur Vermeidung von Kontaminationen erfolgten alle Arbeiten mit mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) unter sterilen Bedingungen.

3.1.1 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Die Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) aus EDTA-antikoaguliertem Vollblut von HBV-infizierten Patienten erfolgte über eine Ficoll-basierte Dichtegradientenzentrifugation (Boyum, 1968).

Zur serologischen Detektion HBV-spezifischer Parameter (siehe 3.2.3) und Isolation von viraler DNA (siehe 3.2.4) wurde zunächst aus dem Vollblut Plasma über eine Zentrifugation für 15 min bei 1.455 x g gewonnen und bei -80 °C eingefroren. Zur Isolation von PBMCs wurde 15 ml Biocoll-Trennlösung in ein 50 ml Leucosep™ Zentrifugenröhrchen pipettiert und 1 min bei 1.131 x g zentrifugiert, damit die Trennlösung den Filter passiert. Gleichzeitig wurde das Vollblut im Verhältnis von 1:2 mit PBS verdünnt, um eine bessere Trennung zu erreichen. Anschließend wurden 35 ml Vollblut-PBS-Lösung langsam in das Leucosep™ Zentrifugenröhrchen pipettiert und für 10 min bei 935 x g zentrifugiert. Aufgrund der unterschiedlichen Dichte der im Blut vorkommenden Zelltypen kam es zur Trennung dieser Zelltypen in verschiedenen Schichten. Nach der Zentrifugation waren unterhalb des Filters die Biocoll-aggregierten Erythrozyten und Granulozyten. Aufgrund einer geringeren Dichte konnten Thrombozyten, Lymphozyten und Monozyten die Biocoll-Schicht nicht passieren. Dabei wurden die Lymphozyten und die Monozyten als ein kleiner weißer Ring zwischen Biocoll und Plasmaschicht sichtbar. Dieser PBMC-Ring wurde vorsichtig durch Pipettieren gelöst und die Lösung in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 189 x g wurden die Zellen zweimal mit 50 ml PBS gewaschen, um das restliche Biocoll und die Thrombozyten zu entfernen. Vor dem zweiten Waschschrift wurden 200 µl Zellsuspension zur späteren DNA-Isolation (siehe 3.2.1) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C eingefroren. Die Zellzahl der aufgereinigten PBMCs wurde mittels des Zellzählgeräts Sysmex ermittelt und in hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FBS) resuspendiert. Anschließend wurden 10x10⁶ Zellen in 1 ml FBS mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) eingefroren. Mit Hilfe vom Mr. Frosty™ Cryo Einfriergefäß wurden die Zellen zunächst langsam mit einer ungefähren Abkühlgeschwindigkeit von 1 °C pro Minute bei -80 °C eingefroren, bevor sie in flüssigem Stickstoff zur Langzeitkultivierung konserviert wurden.

3.1.2 Auftauen und Kultivieren von PBMCs

Zum Auftauen der in Stickstoff konservierten PBMCs wurden diese bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und das restliche toxische DMSO durch mehrfaches Waschen mit 10 ml PBS und Zentrifugation bei 526 x g für 5 min entfernt. Anschließend wurde die Zellenzahl mit Hilfe des Zellzählgeräts Sysmex auf 2×10^6 Zellen/ml in R10 Nährmedium eingestellt und die Zellen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 80 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolation von DNA aus PBMCs

Die Isolation von genomischer DNA erfolgte aus PBMCs mit dem *QIAamp® DNA Blood Mini Kit* (Qiagen) gemäß den Anweisungen des Herstellers. Dazu wurden PBMCs (aliquotiert während des zweiten Waschschrilles in 3.1.1) aufgetaut und 20 µl QIAGEN® Protease hinzupipettiert. Nach anschließender Zugabe von 200 µl AL-Puffer wurde die Lösung für 15 s durch Vortexen homogenisiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 56 °C wurden 200 µl Ethanol hinzugegeben und der gesamte Ansatz in eine *QIAamp Mini Spin* Säule überführt. Nach einminütiger Zentrifugation bei 6.000 x g wurde der Durchfluss verworfen, die Säule in ein neues 2 ml Sammelröhrchen überführt und 500 µl Waschpuffer AW 1 auf die Säule pipettiert. Anschließend wurde der Ansatz erneut zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule in ein neues Sammelröhrchen überführt. Um eine verbesserte Reinheit der DNA zu gewährleisten und sicherzustellen, dass Verunreinigungen entfernt wurden, wurde die membrangebundene DNA mit 500 µl eines zweiten Waschpuffers AW2 erneut gewaschen und für 3 min bei 15.800 x g zentrifugiert. Zur Entfernung von überschüssiger Flüssigkeit wurde die Säule in ein neues Sammelröhrchen überführt und erneut bei 15.800 x g für 1 min zentrifugiert. Zur Elution der DNA wurde die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 1 min mit 50 µl nuklease-freiem Wasser inkubiert. Durch eine weitere Zentrifugation für 1 min bei 6.000 x g wurde die DNA eluiert. Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration mit dem NanoDrop 2000 ermittelt.

3.2.2 Typisierung des humanen Leukozyten-Antigens

Genomische DNA von HBV-infizierten Patienten wurde wie in 3.2.1 beschrieben isoliert. Die HLA-Klasse-I-Typisierung mit vierstelliger Auflösung wurde unter Verwendung von Oligonukleotiden (LABType-methodology, beide bereitgestellt von One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, USA), am Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Essen, freundlicherweise von Falko Heinemann durchgeführt (Heinemann, 2009).

3.2.3 Bestimmung von HBV-DNA, HBeAg und HBsAg

Der Nachweis HBV-spezifischer Parameter erfolge in der Diagnostik des Instituts für Virologie am Universitätsklinikum Düsseldorf oder bei Proben von Kooperationspartnern direkt am jeweiligen Standort.

Die Detektion der HBV-DNA erfolgte vollautomatisiert mit dem *COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®* System. Mittels des *COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV Test, v2.0* wurde zunächst am *COBAS® AmpliPrep* Gerät die Nukleinsäure in 700 µl Plasma aufgereinigt und anschließend erfolgte die Detektion der Viruslast über einen *COBAS® TaqMan® Analyzer* unter Verwendung von Hydrolyse-Sonden.

Für die Detektion von HBsAg und HBeAg wurde das *ARCHITECT i2000SR* Immunassaysystem von Abbott verwendet. Das HBeAg wurde qualitativ und das HBsAg quantitativ über einen CMIA detektiert. Für den HBeAg Immunassay wurde der Architect HBeAg Assay und für das HBsAg der Architect HBsAg Assay verwendet.

3.2.4 Extraktion von viraler DNA aus Plasma

Die Extraktion der viralen DNA aus dem Plasma von chronisch HBV-infizierten Patienten erfolgte im vollautomatisierten *EZ1 Advanced XL* von Qiagen. Dazu wurde das eingefrorene Plasma (siehe 3.1.1) bei Raumtemperatur aufgetaut. Aus 200 µl Plasma wurde durch *den EZ1 Advanced XL* unter Verwendung des *EZ1 Virus Mini Kit v2.0* vollautomatisiert Nukleinsäure extrahiert und in 60 µl eluiert. Nach der Extraktion wurde die DNA bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.5 Amplifikation des HBV-Genoms

Zur Analyse der autologen viralen Sequenz von chronisch HBV-infizierten Patienten wurde das komplette HBV-Genom in zwei Fragmenten amplifiziert. Die Amplifikation des HBV-Core- und HBV-Polymerase-Fragments erfolgte mittels zwei aufeinanderfolgenden PCRs, die als *nested-PCR* bezeichnet werden. Beide Fragmente überlappten sich in ca. 100 bp. Das HBV-Core-Fragment wurde mit viraler DNA isoliert aus Plasma (siehe 3.2.4), nach folgendem Pipettierschema amplifiziert:

nuklease-freies Wasser	62,75 µl
5x colorless GoTaq Buffer	20,00 µl
MgCl ₂ , 25 mM	6,00 µl
dNTP mix, 20 mM jedes	1,00 µl
TS-1585_F_int, 10 pmol/µl	2,50 µl
TS-2419_R, 10 pmol/µl	2,50 µl
GoTaq Hot Start Polymerase	0,25 µl
HBV-DNA	5,00 µl
	<hr/>
	100,00 µl

Das resultierende PCR-Produkt diente als Matrize für die zweite *nested*-PCR mit folgendem Pipettierschema:

nuklease-freies Wasser	64,75 µl
5x Green GoTaq Buffer	20,00 µl
MgCl ₂ , 25 mM	6,00 µl
dNTPs, 20 mM jedes	1,00 µl
HBVCoreF, 10 pmol/µl	2,50 µl
TS-2397_R_int, 10 pmol/µl	2,50 µl
GoTaq Hot Start Polymerase	0,25 µl
Produkt aus PCR 1	3,00 µl
	<hr/>
	100,00 µl

Beide HBV-Core-PCRs wurden mit dem angegebenen Amplifikationsprogramm durchgeführt:

Initiale Denaturierung	94 °C	2,0 min	
Denaturierung	94 °C	0,5 min	} x 45 Zyklen
Annealing	57 °C	0,5 min	
Elongation	72 °C	1,0 min	
Finale Elongation	72 °C	10,0 min	

Für die erste PCR des HBV-Polymerase-Fragments wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

nuklease-freies Wasser	64,75 µl
5x Green GoTaq Buffer	20,00 µl
MgCl ₂ , 25 mM	6,00 µl
dNTPs, 20 mM jedes	1,00 µl
HBVpol.1_F, 10 pmol/µl	2,50 µl
TS-1793_R, 10 pmol/µl	2,50 µl
GoTaq Hot Start Polymerase	0,25 µl
Produkt aus PCR 1	3,00 µl
	<hr/>
	100,00 µl

Im Anschluss erfolgte die zweite *nested*-PCR mit dem angegebenen Pipettierschema:

nuklease-freies Wasser	64,75 µl
5x Green GoTaq Buffer	20,00 µl
MgCl ₂ , 25 mM	6,00 µl
dNTPs, 20 mM jedes	1,00 µl
HBVpol.1_F_int, 10 pmol/µl	2,50 µl
TS-1796_R, 10 pmol/µl	2,50 µl
GoTaq Hot Start Polymerase	0,25 µl
Produkt aus PCR 1	3,00 µl
	<hr/>
	100,00 µl

Für die Amplifikation des HBV-Polymerase-Fragments wurde folgendes Amplifikationsprogramm verwendet:

Initiale Denaturierung	94 °C	2,0 min	
Denaturierung	94 °C	0,5 min	} x 45 Zyklen
Annealing	55 °C	0,5 min	
Elongation	72 °C	3,5 min	
Finale Elongation	72 °C	10,0 min	

Die Primer-Kombinationen für alle PCRs sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Zur Überprüfung der Amplifikation des HBV-Core- und HBV-Polymerase-Fragments wurde entweder eine Gelelektrophorese oder eine Kapillarelektrophorese mit Hilfe des *QIAxcel Advanced* Systems durchgeführt. Für die Kapillarelektrophorese wurden 10 µl PCR-Produkt aus der zweiten PCR in 0,2 ml 12-Reaktionsgefäßstreifen pipettiert und die Auftrennung erfolgte mittels des *QIAxcel Advanced* Systems.

Für die Gelelektrophorese wurden 10 µl PCR-Produkt aus der zweiten *nested*-PCR mit 2 µl DNA loading Dye (6x) vermischt und auf einem 1%igen Agarosegel aufgetragen, welches mit 4 Tropfen Ethidiumbromidlösung (0,025 %) versetzt war. Als Größenmarker wurde der GeneRuler 1 kB Plus DNA-Standard verwendet. Die DNA wurde in 1x Tris-Borat-EDTA-Puffer bei 120 V, 400 mA und einer Laufzeit von 30 min aufgetrennt.

3.2.6 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden mit dem *QIAquick® PCR Purification* Kit von Qiagen aufgereinigt. Dazu wurden 40 µl des PCR-Produkts mit 400 µl PB-Bindungspuffer in einer *QIAquick spin* Säule gemischt. Nach einem Zentrifugationsschritt für 30 Sekunden bei 15.800 x g wurde der Durchfluss verworfen und die an die Silica-Membran gebundene DNA mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Der Durchfluss wurde nach einer erneuten Zentrifugation für 30 Sekunden bei 15.800 x g verworfen und das restliche Ethanol im Bindungspuffer mittels einer dritten Zentrifugation für 1 min bei 15.800 x g entfernt. Nachdem die Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt wurde, wurde die gebundene DNA mit 30 µl EB-Puffer für 1 min inkubiert und schließlich über eine Zentrifugation für 1 min bei 15.800 x g eluiert. Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde mit dem NanoDrop 2000 ermittelt.

3.2.7 Sequenzierung des HBV-Genoms

Das HBV-Genom aller Patienten wurde nach der Sanger-Methode sequenziert. Zusätzlich wurde das HBV-Genom von 116 Patienten mit Hilfe einer *Next Generation Sequencing* (NGS) Technologie sequenziert.

Zur Sanger-Sequenzierung der HBV-Core- und HBV-Polymerase-Fragmente wurden einerseits 40 µl PCR-Produkt aus der zweiten *nested*-PCR in eine 96 Loch-Platte pipettiert, und separat 15 µl (100 pmol/µl) der spezifischen Primer für jede der analysierten Regionen mit zur Sequenzierung geschickt. Andererseits wurden 500 ng der aufgereinigten DNA (siehe 3.2.6) mit Nuklease-freiem Wasser in einem Gesamtvolumen von 13 µl gemischt und jeweils 2 µl spezifischer Primer (10 pmol/µl), für jede der analysierten Regionen hinzupipettiert. Die Sequenzierung wurde von der Firma LGC Genomics durchgeführt. Die Primerkombinationen für die Sequenzierung der unterschiedlichen Fragmente sind in Tabelle 2.3 zusammengefasst. Die Analyse der Sequenzierung erfolgte mit dem Programm Geneious 10.2.6.

Die Sequenzierung mittels NGS erfolgte mit der Sequenzierplattform MiSeq2 (Illumina) am Institut für Immunologie und Genetik in Kaiserslautern mit einer äquivalenten Konzentration des Polymerase-Fragments und des Core-Fragments in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Die Identifizierung der HBV-Quasispezies über NGS wurde freundlicherweise von Martin Theissen, Institut für Bioinformatik der Universität Duisburg Essen, durchgeführt.

3.2.8 Klonierung des HBV-Polymerase-Fragments

Zur Identifizierung der HBV-Quasispezies wurde das HBV-Polymerase-Fragment von vier Patienten, DD13-10103, DD13-25522, DD14-30386, HBV-D-18, in den pUC18-Vektor mittels *Gibson Assembly* (NEB) kloniert. Dazu wurden zunächst über eine PCR mit den Primern pUC18-TS-1796-F und pUC18-Pol-1-F_int-R (siehe Tabelle 2.2) homologe Enden für das HBV-Polymerase-Fragment an den pUC18-Vektor angehängt. Die dazu generierten Primer waren am 5'-Ende komplementär zum HBV-Polymerase-Fragment und am 3'-Ende komplementär zum pUC18-Vektor. Die Amplifikation des pUC18-Vektors erfolgte nach folgendem Pipettierprotokoll:

nuklease-freies Wasser	36,0 µl
5X Q5 Puffer	10,0 µl
dNTPs, 20 mM jedes	1,0 µl
pUC18-TS-1796-F, 10 pmol/µl	1,0 µl
pUC18-Pol-1-F_int-R, 10pmol/µl	1,0 µl
pUC18-Vektor	0,5 µl
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0,5 µl
	50,0 µl

Und nach folgendem Amplifikationsprogramm:

Initiale Denaturierung	98°C	2,0 min	
Denaturierung	98°C	0,5 min	} x 35 Zyklen
Annealing	72°C	0,5 min	
Elongation	72°C	1,5 min	
Finale Elongation	72°C	10,0 min	

Nach der Amplifikation wurde der Ansatz für 30 min bei 37 °C mit 20 Units/ml (U/ml) des Restriktionsenzym DpnI (NEB) verdaut. DpnI ist ein methylierungsempfindliches Restriktionsenzym. Somit wurde noch eventuell vorhandene methylierte Ausgangsplasmid-DNA verdaut, um zu verhindern, dass das Ausgangsplasmid in den zweiten Klonierungsschritt gelangt. Zur Überprüfung der PCR-Effizienz wurde eine Agarosegelelektrophorese mit einem 1%igen Agarosegel für 45 min bei 120 V und 400 mA durchgeführt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung des PCR-Produkts mit dem *QIAquick® PCR Purification Kit* (siehe 3.2.6) und die DNA-Konzentrationsbestimmung am NanoDrop 2000. Die HBV-Polymerase-Fragmente der unterschiedlichen Patienten wurden mittels *Gibson Assembly Kit* (NEB) mit dem pUC18-Vektor mit homologen Überhängen verknüpft. Dazu wurden 100 ng HBV-Polymerase-Fragment, 100 ng pUC18-PCR-Produkt, 10 µl Gibson Assembly Mastermix (2x) in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit entmineralisiertem Wasser gemischt und für 2 h bei 50 °C inkubiert. Der *Gibson Assembly* Mastermix enthielt eine 5'-Endonuklease, eine DNA-Polymerase und eine DNA-Ligase. In der Inkubationszeit baute die 5'-Endonuklease die 5'-Enden der DNA-Stränge ab und erzeugte somit 3'-Überhänge, an die die komplementäre Sequenz binden konnte. Nach der Hybridisierung der komplementären Fragmente wurden die Lücken mittels der Polymeraseaktivität aufgefüllt und über die DNA-Ligaseaktivität wurden die Enden des HBV-Polymerase-Fragments und des Vektors kovalent miteinander verknüpft. Das ligierte Plasmid wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.9 Transformation der Plasmide in chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen

Zur Transformation der Plasmide in chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen wurden 50 µl NEB5-alpha kompetente *E. coli*-Zellen (NEB) auf Eis aufgetaut, mit 5 µl des Gibson Assembly Produkts vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die in dieser Zeit an die Bakterienmembran angelagerte DNA gelangte im Anschluss durch Erhitzen auf 42 °C für 30 s in die *E. coli*-Zellen. Über einen Kälteschock für 5 min auf Eis wurde die Membran wieder impermeabel. Zur Regeneration der Bakterien wurden diese mit 450 µl SOC-Medium für 1 h bei 37 °C und 600 rpm in einem Heizblock inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen auf warmen Luria Bertani (LB)-Agarplatten supplementiert mit Ampicillin, 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) und Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) ausgestrichen (siehe 3.2.10).

3.2.10 Blau-Weiß-Selektion

Da die verwendeten NEB5-alpha kompetenten *E. coli*-Zellen eine Deletion im *lacZ*-Gen aufwiesen, eigneten sie sich zur Blau-Weiß-Selektion mit X-Gal. Der verwendete pUC18-Vektor enthielt das für die β-Galactosidase codierende *lacZ*-Gen in der Insertionsstelle (MCS). Nach einer erfolgreichen Insertion des HBV-Polymerase-Fragments in die MCS wurde

das *lacZ*-Gen zerstört, wodurch keine β -Galactosidase mehr exprimiert werden konnte. In Bakterien, die den Vektor ohne Insert erhalten haben, kam es zu einer Komplementation des β -Galactosidase-Defekts durch das intakte *lacZ*-Gen auf dem Vektor. Um die Transkription des *lacZ*-Gens zu induzieren, wurde IPTG zugegeben. Die dabei entstandene β -Galactosidase spaltete das supplementierte X-Gal in Galaktose und den blauen Farbstoff 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol, wodurch die Bakterienkolonien blau wurden. Während Bakterien, die einen Vektor mit Insert erhalten haben, weiß blieben.

Für diese Blau-Weiß-Selektion wurden LB-Agarplatten mit 100 μ g/ml Ampicillin mit 1 M IPTG, 25 mg/ml X-Gal und 100 μ l Wasser supplementiert und für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die transformierten Zellen (siehe 3.2.9) auf die Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden weiße Einzelkolonien ausgewählt und über Nacht in 3 ml LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin bei 37 °C und 700 rpm kultiviert.

3.2.11 Detektion der HBV-Quasispezies in Einzelklonen

Die Detektion der HBV-Quasispezies erfolgte mit den kultivierten Einzelkolonien aus Abschnitt 3.2.10. Dazu wurden die Plasmide mit dem *QIAprep® Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) gemäß den Anweisungen des Herstellers isoliert. Kurz zusammengefasst, wurden 2 ml der Übernachtskultur für 3 min bei 6.800 x g zentrifugiert und das Pellet in 250 μ l Puffer P1 resuspendiert. Anschließend wurden 250 μ l Puffer P2 hinzupipettiert und durch mehrfaches Invertieren gemischt. Nach der Zugabe von 350 μ l Puffer N3 und erneutem mehrfachen Invertieren wurde der Ansatz für 10 min bei 15.800 x g zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 800 μ l entnommen, in eine *QIAprep 2.0 spin* Säule überführt und für 1 min erneut zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchflusses wurde zum Waschen 500 μ l Puffer PB auf die Säule pipettiert und für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und die an die Silica-Membran gebundene DNA mit 750 μ l PE-Puffer durch Zentrifugation gewaschen. Zur Entfernung von überschüssiger Flüssigkeit wurde der Durchfluss verworfen und die Säule für eine weitere Minute zentrifugiert. Für die Elution der DNA wurde die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 1 min mit 100 μ l Puffer EB inkubiert, bevor erneut für 1 min zentrifugiert wurde.

Die Plasmide wurden mittels eines Kontroll-Restriktionsverdau auf die Insertion des HBV-Polymerase-Fragmentes überprüft. Dazu wurden 10 μ l isolierte Plasmid-DNA mit 2 μ l Puffer 2 (NEB), 3 U des Restriktionsenzym PvuII und 7,7 μ l Wasser für 1 h bei 37 °C verdaut. Mit einem 1%igen Agarosegel wurde die Richtigkeit des entsprechenden Bandenmusters kontrolliert. Bei erfolgreicher Insertion wurden 15 μ l des isolierten Plasmids separat mit 2 μ l HBVpol.1_F_int, HBVpol.1_R_int, HBVpol.2_F_int und TS-1796_R, (je 10 pmol/ μ l) (Tabelle 2.3) zum Sequenzieren an die Firma LGC Genomics geschickt. Die Analyse der Sequenzierung erfolgte mit dem Programm Geneious 10.2.6.

3.3 Immunologische Methoden

3.3.1 Expansion von HBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

Zur Identifizierung neuer HBV CD8 T-Zell-Epitope wurden PBMCs von chronisch HBV-infizierten Patienten aufgetaut und die Zellzahl auf 2×10^6 Zellen/ml in R10 Nährmedium eingestellt. Anschließend wurden die Zellen für zehn Tage in Anwesenheit von 25 U/ml rekombinantem Interleukin (IL)-2, 0,1 µg/ml des kostimulatorischen anti-CD28/CD49 sowie 1 µg/ml des entsprechenden Peptids stimuliert und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 80 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach siebentägiger Expansion wurde den Zellen die Hälfte des Ausgangsvolumens R10 Nährmedium mit 25 U/ml IL-2 hinzugegeben und weiter kultiviert.

3.3.2 Identifizierung HBV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen mittels intrazellulärer Zytokinfärbung

Nach zehntägiger *in vitro* Expansion wurde die HBV-spezifische CD8 T-Zellantwort untersucht. Dazu wurden 2×10^5 PBMCs in eine 96-Loch-U-Bodenplatte überführt, einmal mit 100 µl PBS und einmal mit 200 µl PBS gewaschen und jeweils für 5 min bei 526 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen in 100 µl R10 Nährmedium versetzt mit 100 ng/ml Brefeldin A (BFA) resuspendiert und für 4 h mit dem entsprechenden HBV-Peptid (10 µg/ml) restimuliert. Als Negativkontrolle wurden PBMCs ohne HBV-Peptid in 100 µl R10 Nährmedium supplementiert mit BFA inkubiert. Während der vierstündigen Inkubationszeit sollten die T-Zellen, welche das entsprechende Epitop erkennen, aktiviert werden, wodurch es zur Produktion von Zytokinen wie Interferon-γ (IFN-γ) kommt. Das im Medium enthaltene BFA blockiert den Transport von Vesikeln vom rauen ER zum Golgi-Apparat, wobei es zu einer Akkumulation von Zytokinen in der Zelle kommt. Über eine intrazelluläre Zytokinfärbung kann das intrazelluläre IFN-γ nachgewiesen werden. Dazu wurden die Zellen nach der Inkubationszeit mit 100 µl PBS gewaschen und bei 526 x g pelletiert. Im Anschluss wurden die PBMCs mit 100 µl PBS versetzt mit dem Zellviabilitätsfarbstoff eFluor780 (0,1 µl/10⁶ Zellen), für das Anfärben toter Zellen für 10 min bei 4 °C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS erfolgte die T-Zell-spezifische Oberflächenmolekül-Färbung. Dafür wurden die Zellen für 15 min bei 4 °C mit 100 µl PBS versetzt mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern anti-*Cluster of differentiation* anti-CD3-PerCP Cy5.5 (1 µl/10⁶ Zellen), anti-CD4-PE (2 µl/10⁶ Zellen) und anti-CD8-APC (2 µl/10⁶ Zellen) inkubiert. Zur Entfernung überschüssiger Antikörper wurden die PBMCs mit 100 µl PBS gewaschen und anschließend für 15 min bei 4 °C mit 50 µl IC-Fixations-Puffer (Thermo Fisher Scientific) fixiert. Um eine intrazelluläre Zytokinfärbung zu gewährleisten, wurden die PBMCs zweimal mit 200 µl Permeabilisierungspuffer gewaschen. Durch die Permeabilisierung entstanden kleine Löcher in der Zellmembran, wodurch die intrazelluläre Zytokinfärbung ermöglicht wurde. Dazu wurden die Zellen in 100 µl Permeabilisierungspuffer versetzt mit anti-IFN-γ-FITC Antikörper (1µl/10⁶ Zellen) für 20 min

bei 4 °C inkubiert. Zur Entfernung überschüssiger Antikörper wurden die Zellen im Anschluss mit 100 µl PBS gewaschen und für 5 min bei 526 x g zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 100 µl PBS aufgenommen und zur durchflusszytometrischen Analyse am FACS LSRFortessa in FACS-Röhrchen überführt. Die Analyse von IFN- γ ⁺ CD8⁺ T-Lymphozyten erfolgte mit der Software FlowJo, wie in Abbildung 3.1 dargestellt. Dazu wurden zunächst die Lymphozyten mit Hilfe des Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulichts (SSC) nach ihrer Größe und Granularität identifiziert und Dubletten (FSC-A:FSC-H) exkludiert. Durch die Verwendung des Zellviabilitätsfarbstoffs eFlur780 wurden anschließend die vitalen Zellen von den eFlur780⁺ toten Zellen unterschieden. Die Charakterisierung der T-Lymphozyten in der vitalen Zellpopulation wurde über die CD3-Expression definiert. Auf den CD3⁺ T-Zellen wurde im Anschluss die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD4 und CD8 ermittelt und die Population der CD3⁺ CD4⁻ CD8⁺ T-Zellen auf die Expression von IFN- γ untersucht.

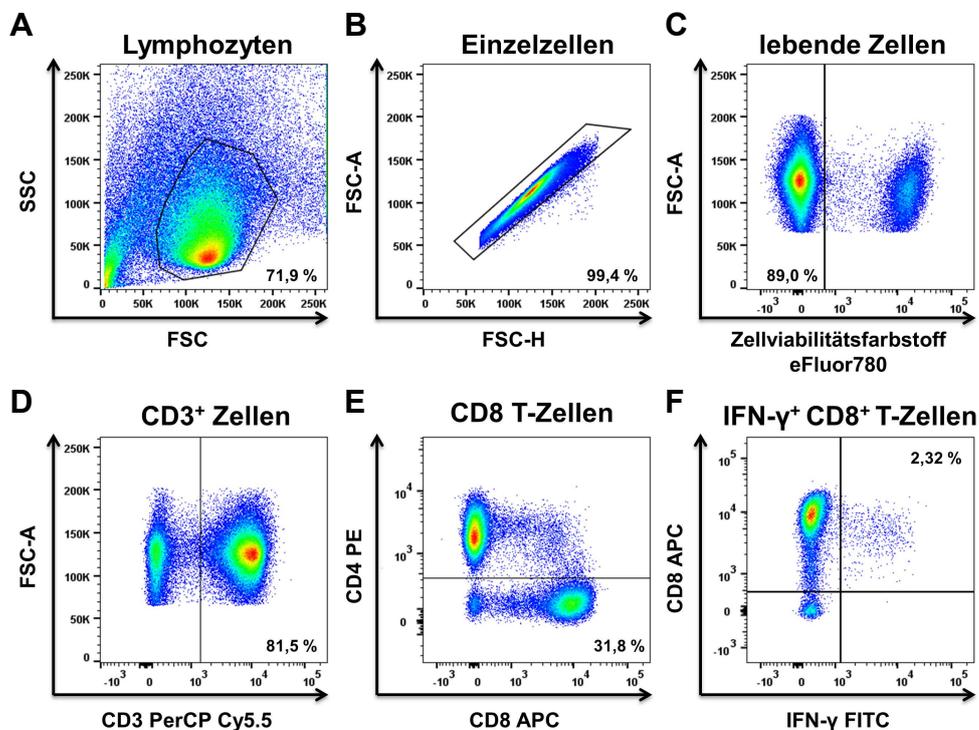


Abbildung 3.1: Identifizierung von IFN- γ ⁺ CD8⁺ T-Zellen

Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel zur Identifizierung von IFN- γ ⁺ CD8⁺ T-Zellen nach 10-tägiger Expansion von PBMCs mit einem entsprechenden HBV-Peptid. Über die Größe und Granularität wurden Lymphozyten zytometrisch detektiert (A) und Einzelzellen von Dubletten getrennt (B). Vitale Zellen wurden mit Hilfe des Zellviabilitätsfarbstoffs eFluor780 ermittelt (C) und anschließend die CD3⁺ T-Lymphozyten (D) auf die Expression von CD4 und CD8 untersucht (E). Im Anschluss wurde die IFN- γ -Produktion aktivierter CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen (F). Für jede ausgewählte Population wurde der prozentuale Anteil an der Gesamtpopulation in dem jeweiligen Feld ermittelt.

3.4 Statistische Analysen

3.4.1 SeqFeatR

Zur Identifizierung HLA-Klasse-I-assoziiertes Polymorphismen über alle HBV-Proteine wurde das *Online-Tool SeqFeatR* (<https://seqfeatr.zmb.uni-due.de/>), entwickelt von Bettina Budeus und Daniel Hoffmann, Institut für Bioinformatik der Universität Duisburg-Essen in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Jörg Timm, verwendet.

Dazu wurde zunächst ein *Alignment* für die Aminosäuresequenzen für jedes HBV-Protein mit der Software Geneious 10.2.6 erstellt. Anschließend erfolgte die Identifizierung HLA-Klasse-I-assoziiertes Polymorphismen mittels *SeqFeatR*. *SeqFeatR* verwendet einen Algorithmus, der für jede *Alignment*-Position und jedes HLA-Klasse-I-Allel eine 2 x 2 Kontingenztabelle mit der Anzahl der auftretenden Kombinationen von HLA-Allelen und Aminosäuren erstellt und über einen Fisher-Exakt-Test eine statistische Signifikanz berechnet (Budeus et al., 2016).

Ein fiktives Beispiel für eine 2 x 2 Kontingenztabelle ist in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: Kontingenztabelle

		Aminosäuresequenz	
		Prototyp	Substitution
HLA-Allel	Vorhanden	3	8
	Nicht Vorhanden	29	1

p<0,0001

Da bei der *SeqFeatR*-Analyse multiple Hypothesen getestet wurden, wurde bei der Signifikanzprüfung zusätzlich zum p-Wert ein Maß für die Falscherkennungsrate (*False Discovery Rate*, FDR) bestimmt (q-Wert).

Als weitere Messzahl zur Identifizierung von HLA-*Footprints* wurde das Quotenverhältnis (Odds-Ratio) berechnet. Damit wurde berechnet, wie stark eine Substitution von einem HLA-Allel abhängig war. Eine Odds-Ratio = 1 zeigt an, dass es keinen Zusammenhang zwischen dem HLA-Allel und der Substitution gibt. Eine Odds-Ratio > 1 zeigt an, dass Patienten mit dem HLA-Allel ein erhöhtes Risiko haben, diese Substitution zu tragen. Bei einer Odds-Ratio < 1 haben Patienten mit diesem HLA-Allel ein vermindertes Risiko, diese Substitution zu tragen.

3.4.2 Identifizierung von möglichen Epitop-Kandidaten

Anhand der von *SeqFeatR* identifizierten HLA-*Footprints* (siehe 3.4.1) wurden die Regionen um den entsprechenden Polymorphismus mittels zwei unterschiedlicher Datenbanken, IEDB (<http://tools.iedb.org/mhci/>) und SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/>), auf mögliche HLA-Klasse-I-Bindungsmotive untersucht. Weitere Informationen über beide Datenbanken

sind in vorangegangenen Arbeiten zu finden (Rammensee et al., 1999; Kim et al., 2012; Nielsen and Andreatta, 2016).

3.4.3 Weitere statistische Analysen

Zur Erstellung des phylogenetischen Baums wurde die Software Geneious 10.2.6 verwendet und mit dem genetischen Distanzmodell von Tamura-Nei analysiert.

Weitere statistische Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism 5.04 oder Microsoft Office Excel 2016 durchgeführt. Alle Daten wurden zunächst auf Normalverteilung untersucht und einem Ausreißertest unterzogen. Zwei Gruppen wurden mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test miteinander verglichen. Drei Gruppen wurden durch eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit einem anschließenden *Post-hoc*-Test mit Bonferroni-Korrektur oder einem Kruskal-Wallis-Test mit einem anschließenden Dunn's Test miteinander verglichen. Zur Berechnung einer Korrelation wurde eine Rangkorrelationsanalyse nach Spearman mit Korrelationskoeffizient (r_s) verwendet.

Die HLA-Haplotypen wurden über einen Fisher-Exakt-Test ermittelt.

Als statistisch signifikant wurden p-Werte $\leq 0,05$ angesehen.

Zur Berechnung der Shannon-Entropie wurde das Online Tool von Los Alamos National Laboratory (https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ENTROPY/entropy_one.html) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung von humanen Leukozyten-Antigen-Klasse-I-assoziierten Polymorphismen in allen HBV-Proteinen

4.1.1 Amplifikation des kompletten HBV-Genoms ist Genotyp-unabhängig und auch bei niedrigen Viruslasten erfolgreich

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass es aufgrund von CD8 T-Zell-Selektionsdruck zu einer Anpassung des HBV-Genoms kommt (Abbott et al., 2010; Desmond et al., 2012; Kefalakes et al., 2015a; Zhang et al., 2018). Da sich diese Studien vor allem auf das Core-Protein beschränkten oder auf die in Asien am häufigsten vorkommenden Genotypen B und C, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von CD8 T-Zell-Selektionsdruck auf die Evolution des kompletten HBV-Genoms untersucht. Um das komplette Genom zu amplifizieren, wurde zunächst das von Günther et al. veröffentlichte PCR-Protokoll angewendet (Gunther et al., 1995). Da dieses jedoch nur bei Viruslasten >170 Mio IU/ml erfolgreich war und auch das modifizierte PCR-Protokoll nach Yang et al. (Yang et al., 2015) nicht ausreichend effizient war, wurde eine Zwei-Fragmenten-Strategie für die Amplifikation des HBV-Genoms etabliert. Dabei wurden mittels *nested*-PCR ein 717 bp großes Core-Fragment und ein 2682 bp großes Polymerase-Fragment amplifiziert. Beide Fragmente überlappten sich an 5'-Ende um 116 bp und am 3'-Ende um 101 bp. Die Amplifikation des kompletten HBV-Genoms war Genotyp-unabhängig und auch bei Viruslasten zwischen 10^1 und 10^9 IU/ml erfolgreich (Abbildung 4.1).

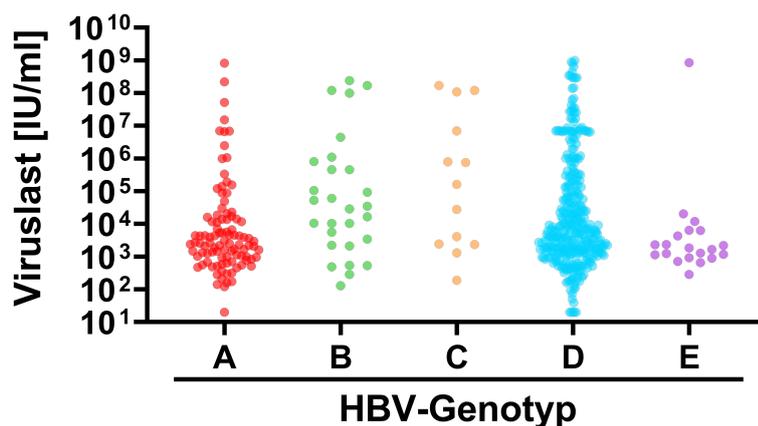


Abbildung 4.1: Genotyp-unabhängige PCR des kompletten HBV-Genoms bei unterschiedlichen Viruslasten

Über die Zwei-Fragmenten-Strategie wurde das komplette HBV-Genom von 544 chronischen HBV-Patienten mit den Genotypen A bis E und mit Viruslasten zwischen 10^1 und 10^9 IU/ml amplifiziert.

4.1.2 Charakterisierung der HBV-Kohorte

Mit Hilfe der etablierten Zwei-Fragmenten-Strategie wurde das komplette HBV-Genom von 544 chronisch HBV-infizierten Patienten, die in Deutschland, London und Boston rekrutiert wurden, amplifiziert und sequenziert. Die wichtigsten klinischen Charakteristika der Patienten wurden in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Charakterisierung von Patienten in der HBV-Kohorte

n	544
Geschlecht n (%)	
weiblich	239 (43,9)
männlich	297 (54,6)
nicht verfügbar	8 (1,5)
Alter (Mittelwert, Reichweite)	
41, 15-83	
Therapie n (%)	
naiv	402 (73,9)
behandelt	88 (16,2)
nicht verfügbar	54 (9,9)
HBV-Viruslast (Mittelwert log IU/ml ± SD)	
4,2 ± 1,6	
qHBsAg (Mittelwert log IU/ml ± SD)	
3,6 ± 0,8	
HBV-Genotyp, n (%)	
A	104 (19,1)
B	27 (5,0)
C	14 (2,6)
D	379 (69,7)
E	20 (3,7)
HBeAg n (%)	
positiv	59 (10,8)
negativ	448 (82,4)
nicht verfügbar	37 (6,8)
ALT (Median U/l, Reichweite)	
35, 6-1854	
AST (Median U/l, Reichweite)	
31, 6-2613	

ALT: Alanin-Aminotransferase, AST: Aspartat-Aminotransferase, SD: Standardabweichung, IU: internationale Einheit, U: Units

Anhand der HBV-Sequenzen aller Patienten wurde ein phylogenetischer Baum erstellt, um die Verteilung der HBV-Genotypen in der Kohorte zu analysieren. Dazu wurden die Sequenzen mit Referenzsequenzen aus der öffentlichen Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) verglichen. Die Erstellung des phylogenetischen Baums erfolgte mit dem Programm Geneious unter Verwendung des genetischen Distanzmodells von Tamura-Nei. Die meisten Patienten waren mit dem Genotyp D (69,7 %) infiziert, die zweitgrößte Gruppe bildeten Patienten infiziert mit Genotyp A (19,1 %). Patienten infiziert mit Genotyp B (5,0 %), C (2,6 %) und E (3,7 %) waren ebenfalls in der

Kohorte inkludiert (Abbildung 4.2). Wie anhand des phylogenetischen Baums ersichtlich wurde, waren in allen Genotypen, ausgenommen Genotyp E, unterschiedliche Subgenotypen vorhanden. Der am häufigsten vorkommende Subgenotyp von Genotyp D in der Kohorte war der Subgenotyp D1, wobei auch die Subgenotypen D2 bis D5 detektiert wurden. Die meisten Genotyp A-infizierten Patienten waren mit dem in Europa am häufigsten verbreiteten Subgenotyp A2 infiziert. Jedoch wurde auch der in Afrika verbreitete Subgenotyp A1 in der HBV-Kohorte detektiert. Ebenso wurden die im asiatischen Raum verbreiteten Subgenotypen von Genotyp B und C identifiziert. Des Weiteren wurde deutlich, dass die Verteilung der unterschiedlichen Subgenotypen nicht abhängig vom Rekrutierungsstandort war. Aufgrund der beobachteten hohen Sequenzvariabilität der unterschiedlichen Genotypen wurden für die weiteren Analysen nur Proben mit Genotyp D verwendet.

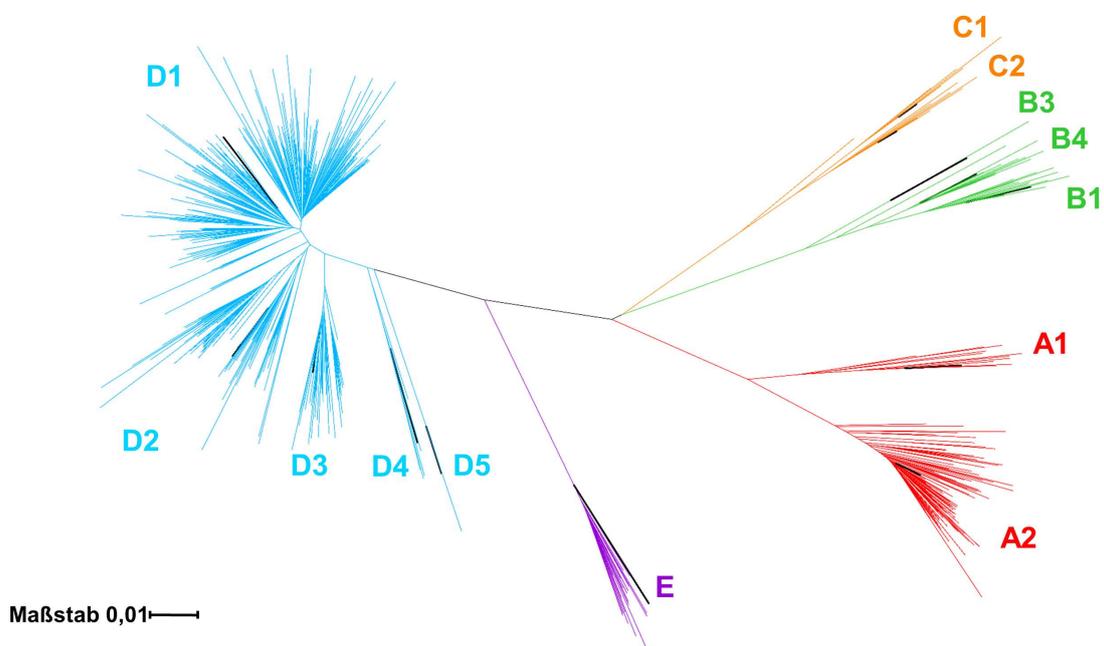


Abbildung 4.2: Verteilung der HBV-Genotypen in der Kohorte

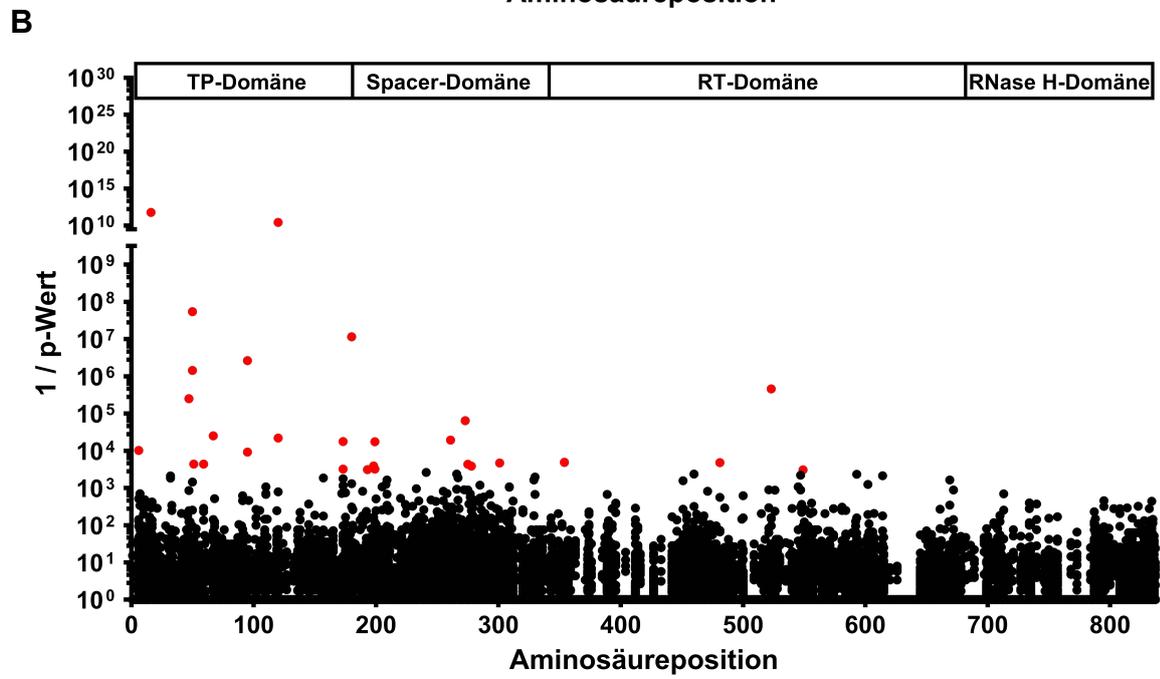
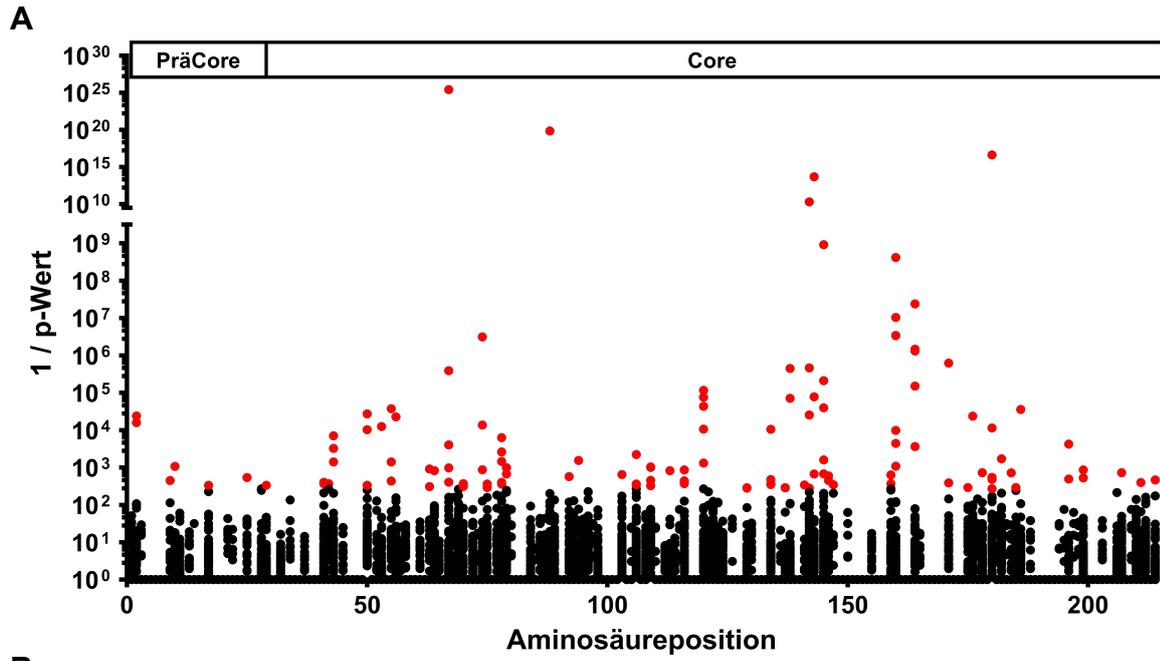
Zur Identifizierung der unterschiedlichen Genotypen bei Patienten in der HBV-Kohorte wurde ein phylogenetischer Baum nach dem genetischen Distanzmodell von Tamura-Nei erstellt. Zur Vergleichbarkeit der Sequenzen wurden Referenzsequenzen aus der NCBI-Datenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) hinzugezogen. Alle in Düsseldorf generierten Sequenzen wurden farbig entsprechend den verschiedenen Genotypen und die Referenzsequenzen in Schwarz dargestellt.

4.1.3 In allen HBV-Proteinen sind HLA-Klasse-I-assoziierte Virussequenzpolymorphismen zu finden

4.1.3.1 HLA-Footprints sind im Core-Protein angereichert

In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, dass der CD8 T-Zell-Selektionsdruck einen Einfluss auf die Evolution von unterschiedlichen Viren wie HCV oder HDV hat (Ruhl et al., 2011; Karimzadeh et al., 2018; Kefalakes et al., 2019). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen,

dass es bei einer chronischen HBV-Infektion zur Selektion von Immunevasionsmutationen durch CD8 T-Zellen kommt (Kefalakes et al., 2015a). Die Studie basierte allerdings ausschließlich auf Analysen der Core-Proteine von 148 chronisch HBV-infizierten Patienten. Somit sollte zunächst untersucht werden, ob es auch zu Sequenzanpassungen durch den CD8 T-Zelldruck in den anderen HBV-Proteinen kommt. Eine Möglichkeit, dies zu analysieren, bieten Assoziationsstudien zwischen der HBV-Sequenz und dem HLA-Klasse-I-Allel des Wirts. Dazu wurde von allen Patienten der HLA-Klasse-I-Genotyp in vierstelliger Auflösung bestimmt und anschließend die HBV-Sequenz mit dem HLA-Genotyp assoziiert. Mit Hilfe des Online-Tools *SeqFeatR* (<https://seqfeatr.zmb.uni-due.de/>) wurde ermittelt, ob Aminosäurepolymorphismen in Gegenwart von bestimmten HLA-Klasse-I-Allelen signifikant häufiger vorhanden waren. Diese Assoziation wird auch als *HLA-Footprint* bezeichnet (Klenerman and McMichael, 2007). Als statistischer Beweis für *HLA-Footprints* wurde ein p-Wert $\leq 0,01$ und ein q-Wert $\leq 0,2$ verwendet. Diese Grenzwerte konnten in vergleichbaren Studien zu HIV und HBV etabliert werden (Carlson, Brumme et al. 2012, Kefalakes, Budeus et al. 2015). Aufgrund des multiplen Testens war die Korrektur des p-Werts bzw. die Bestimmung der FDR (*false discovery rate*) unabdingbar. Zur Identifizierung von *HLA-Footprints* wurde eine Sequenzanalyse für alle vorhandenen HLA-Klasse-I-Allele der 379 Genotyp D-infizierten HBV-Patienten und für alle sieben HBV-Proteine durchgeführt. Um ein Überblick zu erhalten, in wie vielen Aminosäurepositionen *HLA-Footprints* zu finden waren, wurden die von *SeqFeatR* berechneten p-Werte für alle HLA-Klasse-I-Allele, die mindestens fünfmal in der Kohorte vorhanden waren, verwendet (Abbildung 4.3). Da das PräCore-Protein eine proteolytisch verkürzte Form des Core-Proteins ist, welches am N-Terminus um 29 Aminosäuren verlängert ist, wurde für beide Proteine gemeinsam eine *SeqFeatR*-Analyse durchgeführt (Abbildung 4.3A). Anhand der ausgewählten Kriterien für die *Footprints* wurden sieben *Footprints* in der N-terminalen Region des PräCore-Proteins, welches sich nicht mit dem Core-Protein überlappt, detektiert. Dagegen wurden im Core-Protein 69 *HLA-Footprints* identifiziert. Interessanterweise clusterten viele *Footprints* zwischen den Aminosäurepositionen 160 bis 190 des PräCore/Core-Proteins. Obwohl die Polymerase um das Vierfache länger ist, wurden erstaunlicherweise nur 19 *HLA-Footprints* ermittelt (Abbildung 4.3B). Davon waren elf *Footprints* in der TP-Domäne, sechs in der Spacer-Domäne und zwei in der RT-Domäne lokalisiert. Im Hüllprotein wurden zwei *HLA-Footprints* in Position 297 und 356 der kleinen S-Domäne identifiziert (Abbildung 4.3C). Auch im HBx-Protein wurden fünf *HLA-Footprints* beobachtet (Abbildung 4.3D).



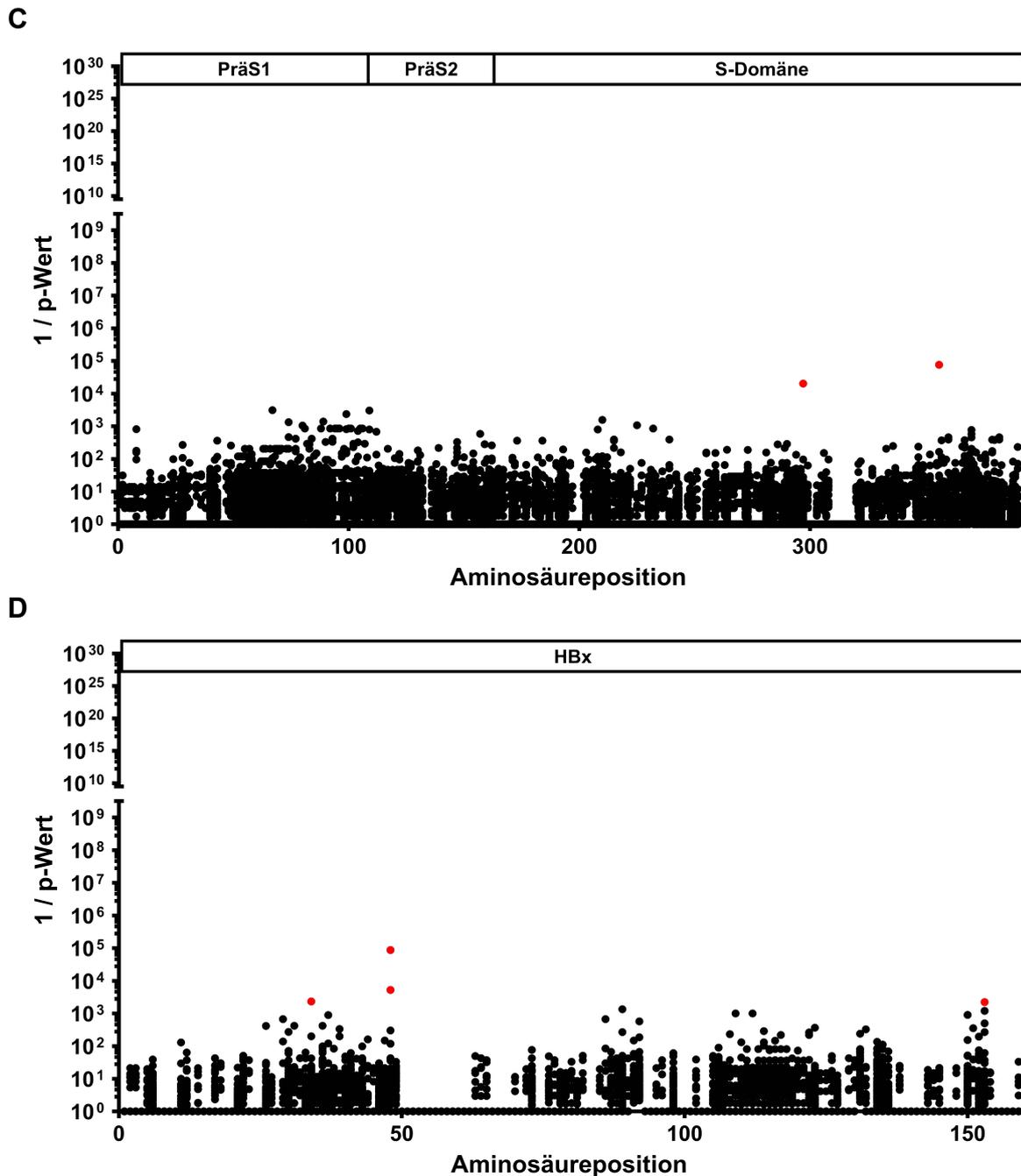


Abbildung 4.3: HLA-Klasse-I-assoziierte Polymorphismen in den HBV-Proteinen

Alle exakten p-Werte für jede Aminosäureposition in dem PräCore/Core-Protein (A), der Polymerase (B), dem Hüllprotein (C) und dem HBx-Protein (D) von Genotyp D Sequenzen wurden berechnet, um Assoziationen zwischen Virussequenzpolymorphismen und dem Vorhandensein von HLA-Klasse-I-Allelen, die mindestens fünfmal in der Kohorte vorhanden waren, zu untersuchen. HLA-Footprints mit einem p-Wert $\leq 0,01$ und einem q-Wert $\leq 0,2$ sind in Rot dargestellt. TP: Terminales Protein, RT: Reverse Transkriptase

Um möglichst viele HLA-Footprints identifizieren zu können, wurden für jedes Protein sowohl eine *SeqFeatR*-Analyse mit vierstelliger als auch mit zweistelliger HLA-Klasse-I-Auflösung durchgeführt. Somit konnten zu den 102 schon bereits identifizierten HLA-Footprints neun weitere HLA-Footprints detektiert werden, die nur bei der Analyse mit der zweistelligen

HLA-Klasse-I-Auflösung signifikant waren. Insbesondere wurden sechs weitere HLA-Footprints in der Polymerase detektiert. Auf Grundlage der definierten Grenzwerte für die p- und q-Werte wurden insgesamt 111 HLA-Footprints identifiziert, 78 im PräCore/Core-Protein, 25 in der Polymerase, 2 im Hüllprotein und 6 im HBx-Protein (Tabelle 4.2)

Tabelle 4.2: Identifizierte HLA-Footprints in den HBV-Proteinen

Protein	AS-Position	HLA-Allel	HLA-Haplotyp	Substitution	p-Wert	q-Wert	Odds-Ratio
PräCore	2	B*14:02	C*08:02 p=1,015E-27	Q2H/R	4,16E-05	6,07E-03	6,0
PräCore	2	C*08:02	B*14:02 p=1,015E-27	Q2H/R	6,31E-05	0,01780	6,9
PräCore	9	A*11:01		I9T	2,22E-03	0,15399	22,4
PräCore	10	A*02:01		I9T	9,36E-04	0,07401	16,4
PräCore	17	A*11:01	B*35:01 p=1,463E-10	V17F	4,41E-03	0,17176	2,8
PräCore	17	B*35:01	A*11:01 p=1,463E-10	V17F	2,99E-03	0,17486	3,1
PräCore	28	A*11:01		W28* #	3,72E-03	0,15502	0,4
Core	14	B*41:01	C*17:01 p=5,876E-06	E14Q	3,08E-04	0,09002	15,3
Core	14	C*17:01	B*41:01 p=5,876E-06	E14Q	1,42E-04	0,08019	18,1
Core	21	A*02:01		S21A/V/T	4,00E-03	0,15591	1,8
Core	21	B*35:03	C*14:02 p=0,029	S21T	3,68E-05	0,02152	3,4
Core	21	C*14:02	B*35:03 p=0,029	S21T	9,76E-05	0,05504	4,4
Core	24	A*02:01		F24Y	7,95E-05	0,01547	6,2
Core	26	A*02:01		S26N/A	2,66E-05	0,01291	20,9
Core	27	A*02:01		V27I	4,42E-05	0,01291	3,1
Core	34	A*33:01/03	B*14:02 p=2,211E-12	A34V	1,09E-03	0,12719	15,3
Core	34	B*14:02	A*33:01/03 p=2,211E-12	A34V	3,22E-03	0,18833	19,2
Core	38	A*01:01	B*08:01 p=3,878E-07	Y38F	3,60E-26	1,83E-23	22,5
Core	38	B*08:01	A*01:01 p=3,878E-07	Y38F	2,56E-06	1,50E-03	4,1
Core	38	A*02:01		Y38F	2,49E-04	0,02424	5,5
Core	40	A*02:01		E40D	3,86E-03	0,15591	2,1
Core	45	A*32:01		P45S	7,28E-05	0,01416	7,1
Core	45	B*41:01	C*17:01 p=5,876E-06	P45H/Q	3,19E-07	1,86E-04	23,4
Core	45	C*17:01	B*41:01 p=5,876E-06	P45H/S	1,15E-03	0,16403	10,4
Core	46	A*11:01		E46D	3,43E-03	0,15399	4,7
Core	48	A*02:01		C48V	5,50E-03	0,17838	12,1
Core	49	B*14:02		S49T	3,84E-04	0,03738	4,4
Core	49	B*35:01		S49T #	6,82E-04	0,07965	0,2
Core	49	C*12:03		S49T	1,59E-04	0,07854	3,8
Core	50	C*12:02/03		P50A/H	6,45E-04	0,07270	6,2

Core	59	A*32:01		I59V	1,38E-20	8,04E-18	114,0
Core	63	B*44		G63M/A	3,52E-05	0,14265	22,4
Core	67	A*02:01		T67N/S	4,56E-03	0,15657	2,0
Core	74	A*24:02		G74A/S/V #	1,55E-03	0,18121	0,4
Core	77	B*14:02		E77Q	3,73E-03	0,19808	3,9
Core	80	A*01:01		T80A/IV	9,90E-04	0,14459	2,5
Core	87	A*33:01/03		S87R	1,16E-03	0,16939	2,5
Core	91	A*33:01/03	B*14:02 p=2,211E-12 und C*08:02 p=6,343E-09	T91N/S	2,31E-05	4,49E-03	19,7
Core	91	B*14:02	A*33:01/03 p=2,211E-12 und C*08:02 p=1,015E-27	T91D	8,65E-06	1,68E-03	5,2
Core	91	C*08:02	A*33:01/03 p=2,211E-12 und B*14:02 p=1,015E-27	T91D	1,32E-05	7,43E-03	1,8
Core	100	C*12:02/03		L100I	2,57E-04	0,04781	8,6
Core	105	A*02:01		I105T	2,71E-03	0,13187	2,1
Core	105	A*24:02		I105V	9,52E-05	0,01853	3,2
Core	109	A*23:01		T109M	1,41E-05	7,33E-03	11,9
Core	109	A*24:02		T109M	2,24E-06	1,31E-03	9,7
Core	112	B*27		R112K	2,81E-05	0,02847	∞
Core	113	B*15:01		E113T	2,15E-06	1,26E-03	9,2
Core	113	B*40:02		E113Q	3,95E-05	0,02309	10,1
Core	113	B*49:01		E113D/Q	4,97E-11	2,90E-08	34,1
Core	114	B*35:01	C*04:01 p=7,393E-23	T114 V/I	2,04E-14	1,19E-11	27,0
Core	114	C*04:01	B*35:01 p=7,393E-23	T114 V/I	1,28E-05	7,24E-03	6,9
Core	116	A*23:01		I116V	2,51E-05	7,33E-03	2,7
Core	116	A*25:01		I116L	4,73E-06	1,85E-03	∞
Core	116	A*26:01		I116L	1,09E-09	6,35E-07	6,9
Core	117	A*11:01	B*35:01 p=1,463E-10	E117Q	2,22E-03	0,15399	22,4
Core	117	B*35:01	A*11:01 p=1,463E-10	E117Q	1,67E-03	0,15074	24,0
Core	130	B*14:02		P130A	1,58E-03	0,11560	1,1
Core	131	A*02:01		A131P #	2,26E-04	0,02424	0,2
Core	131	A*31:01		A131P	2,91E-07	1,70E-04	22,4
Core	131	A*33:01/03	B*14:02 p=2,211E-12 und C*08:02 p=6,343E-09	A131P	2,40E-09	1,40E-06	53,2
Core	131	B*14:02	A*33:01/03 p=2,211E-12 und C*08:02 p=1,015E-27	A131P	2,96E-07	1,73E-04	11,2
Core	131	C*08:02	A*33:01/03 p=2,211E-12 und B*14:02 p=1,015E-27	A131P	1,02E-04	0,01912	7,7
Core	135	B*07:02	HLA-B*07:02 p=2,674E-23	P135Q/V	6,63E-06	3,87E-03	8,2
Core	135	C*07:02	HLA-C*07:02 p=2,674E-23	P135Q/V	4,17E-08	2,35E-05	10,9
Core	135	B*50:01	C*06:02 p=1,436E-17	P135T	6,82E-07	3,98E-04	6,1

Core	135	B*57:01	C*06:02 p=8,703E-17	P135A	2,75E-04	0,16040	5,4
Core	135	C*06:02	B*50:01 p=1,436E-17 und B*57:01 p=8,703E-17	P135T	7,62E-07	4,30E-04	10,0
Core	142	A*68:01		T142M	1,60E-06	9,33E-04	30,5
Core	146	A*11:01		T146I	3,43E-03	0,15399	5,6
Core	147	A*68:01		T147A	4,21E-05	0,01228	5,1
Core	151	A*02:01		R151Q #	1,83E-03	0,10713	0,4
Core	151	A*11:01	B*35:01 p=1,463E-10	R151Q	2,28E-17	1,33E-14	18,1
Core	151	B*35:01	A*11:01 p=1,463E-10	R151Q	8,77E-05	0,01281	4,2
Core	153	A*11:01		G153R	5,87E-04	0,08568	4,5
Core	156	A*11:01		S156F	3,43E-03	0,15399	2,5
Core	157	A*11:01		P157T/S	2,80E-05	5,46E-03	9,1
Core	167	B*27:05		R167P	2,36E-04	0,06882	74,7
Core	170	C*17:01		Q170K	1,16E-03	0,16403	8,0
Polymerase	16	A*11:01		D16N	1,62E-12	3,33E-09	8,6
Polymerase	32	B*27		E32Q	9,17E-06	6,28E-03	36,3
Polymerase	47	C*15:02		L47P	3,99E-06	3,88E-03	7,9
Polymerase	50	B*51:01	C*15:02 p=3,086E-07	S50N	1,83E-08	2,81E-05	13,0
Polymerase	50	C*15:02	B*51:01 p=3,086E-07	S50N	7,00E-07	1,36E-03	13,2
Polymerase	67	A*02:01		T67S	3,99E-05	0,08208	26,2
Polymerase	95	B*13:02		Q95H	3,80E-07	7,81E-04	81,0
Polymerase	120	B*27:05	C*02:02 p=5,365E-06	V120A/G	3,70E-11	7,61E-08	95,4
Polymerase	120	C*02:02	B*27:05 p=5,365E-06	V120A/G	4,56E-05	0,08871	8,2
Polymerase	173	B*35:03	C*12:02/03 p=6,00E-3	P173S	5,69E-05	0,03895	8,2
Polymerase	173	C*12:02/03	B*35:03 p=6,00E-3	P173S	2,62E-04	0,12762	3,3
Polymerase	180	B*35:03		L180I	8,66E-08	1,78E-04	12,9
Polymerase	198	B*07	C*07:02 p=2,068E-22	P198S	9,61E-05	0,07232	9,3
Polymerase	198	C*07:02	B*07 p=2,068E-22	P198S	2,57E-04	0,12517	7,5
Polymerase	199	B*07	C*07:02 p=2,068E-22	P199S	5,69E-05	0,07232	8,1
Polymerase	199	C*07:02	B*07 p=2,068E-22	P199S	5,77E-05	0,11230	17,8
Polymerase	224	B*27		R224K/G	3,37E-04	0,13852	27,8
Polymerase	261	B*15:01		K273T	5,18E-05	0,10639	16,1
Polymerase	273	A*03:01		K273E	1,56E-05	0,03197	4,8
Polymerase	275	C*12:02/03		A275T	1,01E-04	0,06560	6,6
Polymerase	288	B*51	C*15 p=3,086E-07	S288A	2,70E-04	0,18507	7,8
Polymerase	288	C*15	B*51 p=3,086E-07	S288A	3,05E-05	0,01485	17,1
Polymerase	354	B*07:02	C*07:02 p=2,068E-22	R354G	3,74E-04	0,19231	41,3
Polymerase	354	C*07:02	B*07 p=2,068E-22	R354G	2,03E-04	0,12517	24,5
Polymerase	523	C*12:03		I523L	2,19E-06	4,27E-03	10,8
Hüllprotein	297	B*08:01		Y297F	4,93E-05	0,05418	5,1
Hüllprotein	356	A*02:01		S356L #	1,31E-05	0,01440	0,09

HBx	34	A*11:01		L34P	4,28E-04	0,16821	3,2
HBx	48	B*14:02	C*08:02 p=1,015E-27	D48N	1,14E-05	4,49E-03	17,8
HBx	48	C*08:02	B*14:02 p=1,015E-27	D48N	1,90E-04	0,07219	12,9
HBx	150	B*55		A150V	1,67E-04	0,06570	13,8
HBx	153	B*14:02	C*08:02 p=1,015E-27	N153T	4,48E-04	0,07638	21,3
HBx	153	C*08:02	B*14:02 p=1,015E-27	N153T	8,30E-04	0,09149	20,2

AS: Aminosäure, ∞: unendlich, # *Negatop*

Um zu ermitteln, wie stark der Zusammenhang zwischen einer Substitution und dem entsprechenden HLA-Klasse-I-Allel war, wurde zusätzlich die Odds-Ratio für jeden *Footprint* berechnet. In den meisten Positionen wurde eine Odds-Ratio > 1 berechnet. Somit haben Patienten mit dem entsprechenden HLA-Allel eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, eine Substitution in der ermittelten Aminosäureposition zu tragen. Zum Beispiel haben HLA-B*44-positive Patienten ein 22-fach erhöhtes Risiko die G63M/A-Substitution zu tragen als HLA-B*44-negative Patienten. Interessanterweise wurden bei fünf HLA-*Footprints* eine Odds-Ratio < 1 detektiert. Dies deutete darauf hin, dass Patienten mit diesem HLA-Klasse-I-Allel ein vermindertes Risiko haben, diese Substitution zu tragen. Solche negativen Assoziationen werden als *Negatope* bezeichnet (Timm, Li et al. 2007). Im PräCore/Core-Protein wurden fünf HBV-*Negatope* in den Positionen PräCore W28, Core S49, G74, A131 und R151 identifiziert. Das letzte *Negatop* wurde im Hüllprotein an Position S356 detektiert. Bemerkenswerterweise waren drei der *Negatope* HLA-A*02:01 restringiert. Zum Beispiel hatten 3 von 123 HLA-A*02:01-positiven Patienten (2,43 %) eine A131P-Substitution im Core-Protein, hingegen nur 34 der 256 HLA-A*02:01-negativen Patienten (13,28 %) (Abbildung 4.4). Bei den HLA-A*02:01-negativen Patienten lag die Substitution entweder als Einzelsubstitution oder in Kombination mit einer zweiten Substitution an Position P130 vor. *Negatope* in den anderen Positionen waren mit HLA-A*11:01, HLA-A*24:02 und HLA-B*35:01 assoziiert.

Core ₁₂₃₋₁₃₁ Konsensus	G	V	W	I	R	T	P	P	A	n
HLA-A*02:01-positive Patienten	-	-	-	-	-	-	-	-	-	112/123
	-	-	-	-	-	-	-	Q	-	7/123
	-	-	-	-	-	-	-	S	-	1/123
	-	-	-	-	-	-	-	-	P	3/123
HLA-A*02:01-negative Patienten	-	-	-	-	-	-	-	-	-	195/256
	-	-	-	M	-	-	-	-	-	3/256
	-	-	-	-	-	-	-	Q	-	16/256
	-	-	-	-	-	-	-	A	-	1/256
	-	-	-	-	-	-	-	I	-	3/256
	-	-	-	-	-	-	-	L	-	1/256
	-	-	-	-	-	-	-	S	-	1/256
	-	-	-	-	-	-	-	-	G	2/256
	-	-	-	-	-	-	-	-	P	27/256
	-	-	-	-	-	-	-	A	P	4/256
	-	-	-	-	-	-	-	L	P	1/256
	-	-	-	-	-	-	-	Q	P	2/256

Abbildung 4.4: HBV-Negatop in Core₁₂₃₋₁₃₁

Die Variabilität von Core₁₂₃₋₁₃₁ in der autologen Sequenz von HLA-A*02:01-positiven und HLA-A*02:01-negativen Patienten wurde verglichen. Die Position mit einer negativen Assoziation in HLA-A*02:01-positiven Patienten ist in grau unterlegt.

Da vor allem im PräCore/Core-Protein starker HLA-Selektionsdruck beobachtet wurde, wurde die relative Häufigkeit der Positionen unter T-Zell HLA-assoziiertem Selektionsdruck in den einzelnen Proteinen berechnet (Abbildung 6.1). Dabei wurde deutlich, dass 21 % der Positionen im PräCore/Core-Protein unter HLA-assoziiertem Selektionsdruck standen, jedoch nur 0,05 % der Positionen im Hüllprotein. Mit 0,21 % waren vergleichsweise genauso viele Positionen in der Polymerase wie im HBx-Protein (0,25 %) unter Selektionsdruck. Um zu bestätigen, dass die höhere Häufigkeit von HLA-*Footprints* im PräCore/Core-Protein durch den HLA-assoziierten Selektionsdruck und nicht durch eine erhöhte Sequenzdiversität und dadurch bedingte statistische Unschärfe in der *SeqFeatR*-Analyse verursacht wurde, wurde ein *in silico* Fusionsprotein erstellt. Dazu wurden die Aminosäuresequenzen des PräCore/Core-Proteins, der Polymerase, des Hüllproteins und des HBx-Proteins hintereinander gereiht und die *SeqFeatR*-Analyse durchgeführt. Zur Ermittlung der Sequenzdiversität wurde für jede Position die Shannon-Entropie berechnet (Abbildung 4.5). Bei der Analyse des Fusionsproteins wurde deutlich, dass die Häufigkeit der HLA-*Footprints* nicht von der Länge der einzelnen Proteine abhängig war, da auch in dieser Analyse die meisten HLA-*Footprints* im PräCore/Core-Protein detektiert wurden. Ebenfalls spielte die Sequenzdiversität keine Rolle bei der Identifizierung der HLA-*Footprints*. Zwischen den Positionen 461 bis 490 wurde die höchste Sequenzdiversität mit einer Entropie zwischen 0,27 und 0,47 beobachtet, jedoch waren die p-Werte schwach oder nicht signifikant. Obwohl in den Positionen 142 bis 145 auch eine relativ große Sequenzdiversität (Entropie zwischen 0,12 und 0,16) berechnet wurde, wurden HLA-*Footprints* mit p-Werten $<10^{-8}$ in allen drei Positionen detektiert. Im Gegensatz dazu wurde im Bereich um Position 334 eine Shannon-Entropie von 0,05 detektiert, jedoch wurde ein *Footprint* mit einem p-Wert $<10^{-10}$ ermittelt. Ebenfalls wurde in Positionen 1290 bis 1310 eine niedrige Sequenzdiversität (Entropie zwischen 0,02 und 0,05)

ermittelt, allerdings waren die *p*-Werte für *Footprints* schwach oder nicht signifikant. Darüber hinaus wurde deutlich, dass die Sequenzvariabilität unabhängig davon war, ob es in dem Bereich eine Überlappung mit einem anderen OFR gab oder nicht.

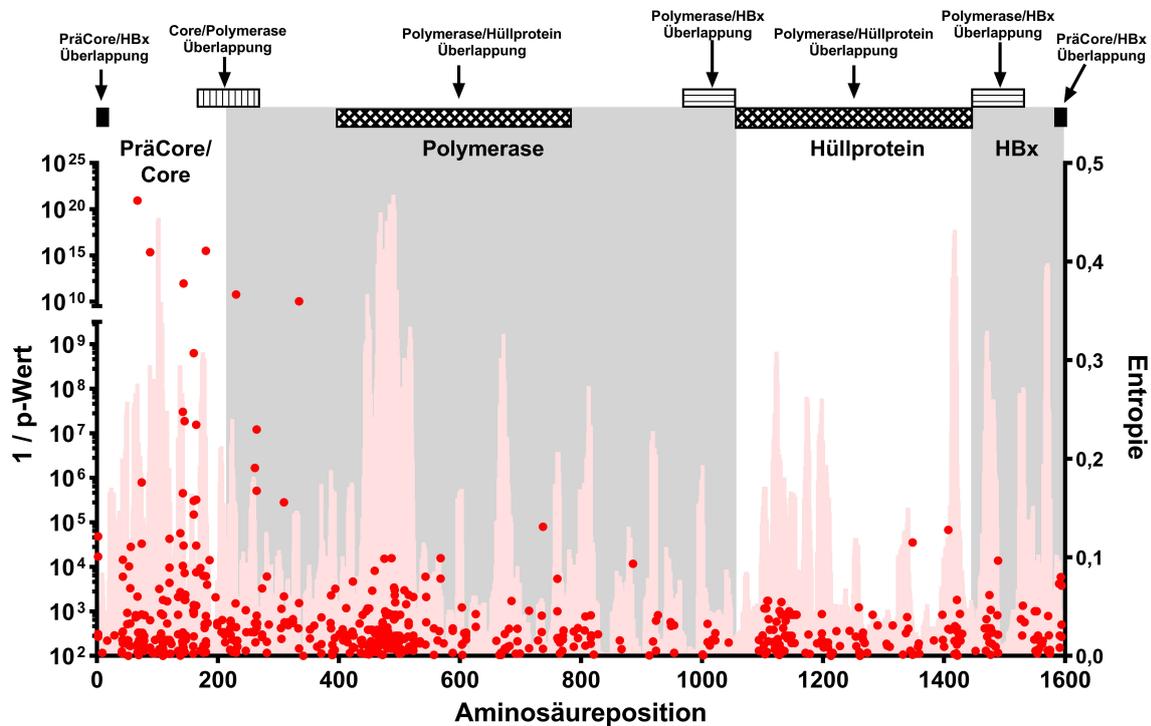


Abbildung 4.5: Analyse des *in silico* Fusionsproteins auf HLA-Footprints und Entropie

Für jede Position des *in silico* Fusionsproteins wurde eine Assoziation zwischen Polymorphismen und dem Vorhandensein von HLA-Klasse-I-Allelen ermittelt (rote Punkte, linke y-Achse). Dargestellt sind alle $1/p$ -Werte > 100 (entspricht einem *p*-Wert von $< 0,01$). Der Einfluss der Sequenzdiversität auf HLA-Footprints wurde mittels Shannon-Entropie unter Verwendung eines *sliding window* von neun Aminosäuren (rosa Balken, rechte y-Achse) dargestellt.

Zusammenfassend wurden über Assoziationsstudien insgesamt 111 HLA-Footprints identifiziert, die vor allem im Core-Protein angereichert waren. Des Weiteren wurden erstmalig HLA-assoziierte Sequenzpolymorphismen in der Polymerase, dem Hüllprotein und dem HBx-Protein nachgewiesen. Ebenfalls wurden zum ersten Mal HBV-Negatope detektiert, wobei auffällig häufig diese mit HLA-A*02:01 restringiert waren. Anhand eines *in silico* Fusionsproteins wurde nachgewiesen, dass die Häufigkeit der Footprints weder von der Sequenzvariabilität noch von der Länge der Proteine abhängig war.

4.1.3.2 Unterschiedliche Gründe für Assoziationen von Sequenzpolymorphismen an einer Position mit multiplen HLA-Allelen

Die in der Assoziationsstudie detektierten 111 HLA-Footprints verteilten sich nur auf 70 Positionen. Davon waren 44 Positionen mit einem einzelnen HLA-Klasse-I-Allel assoziiert, die restlichen 26 waren mit zwei teilweise bis zu fünf verschiedenen Allelen assoziiert (Abbildung 4.6A). Von den 44 Positionen mit einer HLA-Assoziation hatten vier Positionen ein besonderes Merkmal. Die detektierten vier HLA-Footprints wurden in der überlappenden Core- und

Polymerase-Region beobachtet und waren aufgrund derselben Substitution auf Nukleotidebene entstanden (Abbildung 4.6B). An Position R151 des Core-Proteins wurde ein HLA-A*11:01 *Footprint* ermittelt. Patienten, die HLA-A*11:01-positiv waren, hatten signifikant häufiger eine R151Q-Substitution als HLA-A*11:01-negative Patienten (57/87 vs. 28/321, $p=2,28E^{-17}$). Interessanterweise wurde an Position D16 der Polymerase ebenfalls ein HLA-A*11:01-restringierter *Footprint* detektiert. Hierbei war die D16N-Substitution signifikant häufiger in HLA-A*11:01-positiven Patienten angereichert. Bei näherer Betrachtung beider Positionen wurde deutlich, dass beide *Footprints* aufgrund der Substitution G2355A auf Nukleotidebene entstanden waren (Abbildung 4.7). Durch Kefalakes et al. wurde in diesem Bereich ein HLA-A*11-restringiertes Core-Epitop bestätigt (Kefalakes et al., 2015a). Auch die beiden HLA-B*27 *Footprints* an Position R167 des Core-Proteins und an Position E32 der Polymerase waren durch dieselbe Substitution, auf Nukleotidebene, bedingt. Durch die G2397C-Substitution im Core-Protein, auf Nukleotidebene, fand ein Aminosäureaustausch von Arginin nach Prolin (R167P) statt, welcher bei HLA-B*27-positiven Patienten selektiert wurde. Gleichzeitig wurde die Aminosäuresequenz an Position E32 der Polymerase von Glutaminsäure zu Glutamin (E32Q) substituiert (Abbildung 6.2).

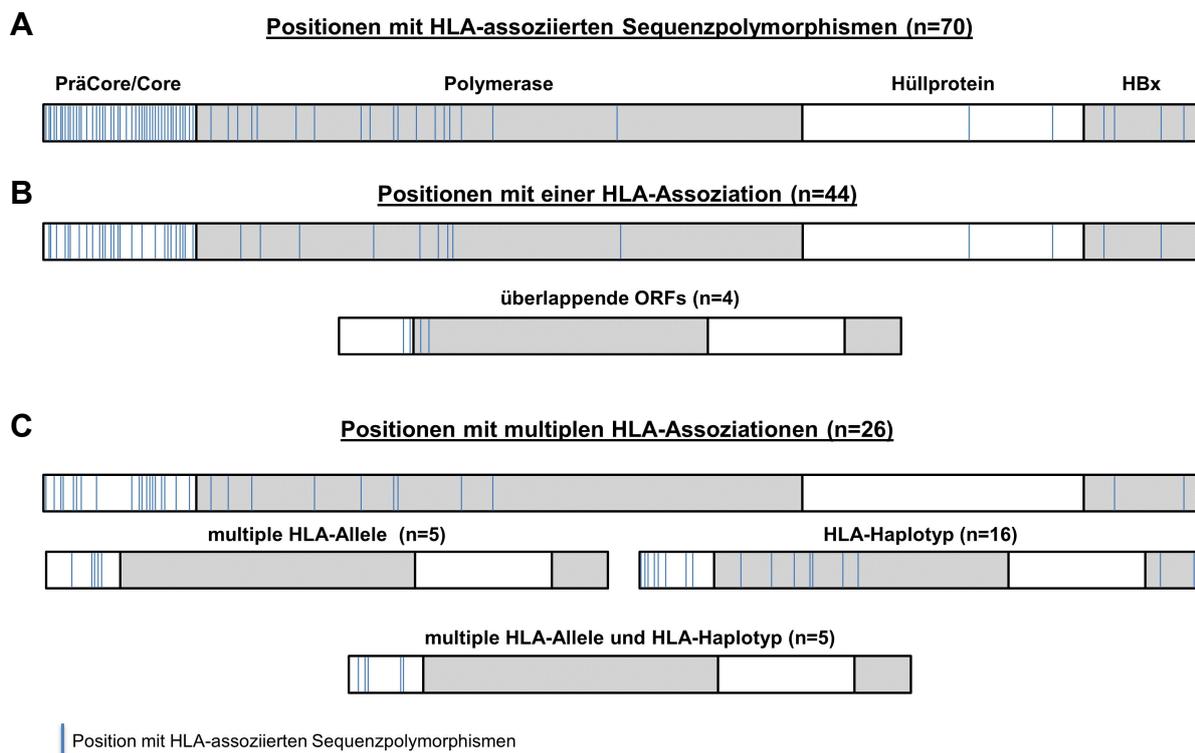


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung der Positionen mit HLA-Klasse-I-assozierten Sequenzpolymorphismen

In 70 Positionen des HBV-Genoms wurden HLA-*Footprints* detektiert (**A**). Davon wurden 44 Positionen mit einem HLA-Klasse-I-Allel assoziiert, wobei vier *Footprints* durch die überlappenden ORFs des Core-Proteins und der Polymerase gekoppelt waren (**B**). In 26 Positionen wurden multiple HLA-Assoziationen aufgrund von multiplen HLA-Allelen und HLA-Haplotypen detektiert (**C**). ORF: offener Leserahmen

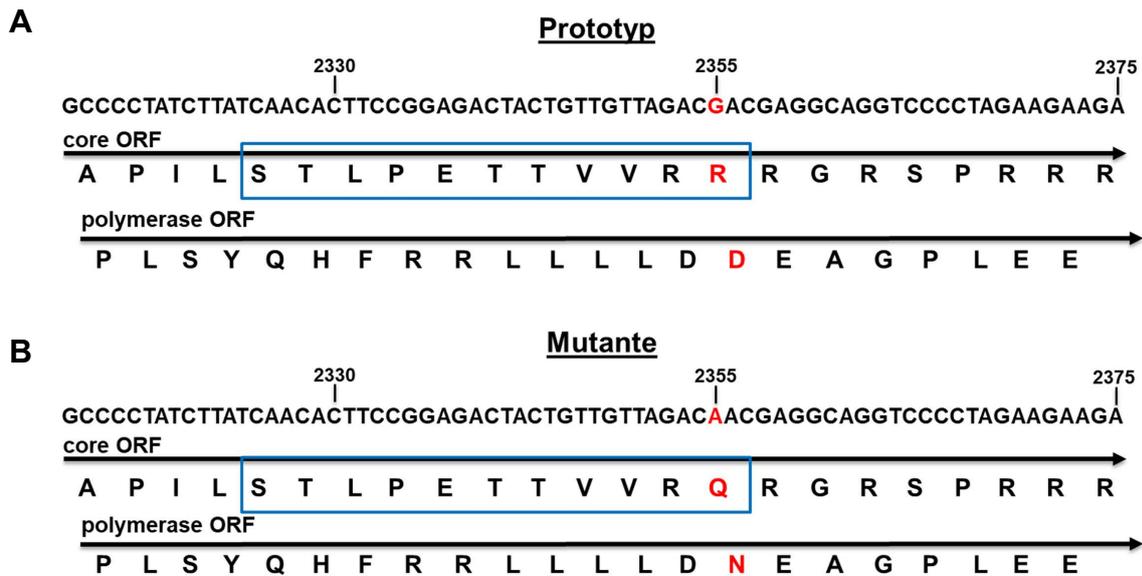


Abbildung 4.7: Einfluss der Substitution G2355A auf die überlappende Region des Core-Proteins und der Polymerase

Die Prototypsequenz auf Nukleotidebene und Aminosäureebene der überlappenden Region des Core-ORFs und des Polymerase-ORFs ist dargestellt (A). Durch die Substitution G2355A auf Nukleotidebene fand in beiden ORFs ein Aminosäureaustausch statt (B). Blau markiert ist das bekannte HLA-A*11-restringierte Core-Epitop. ORF: offener Leserahmen

Bei näherer Betrachtung der Positionen unter multiplen HLA-Assoziationen (Abbildung 4.6C) wurde deutlich, dass es zwei Gründe für Assoziationen von Sequenzpolymorphismen mit multiplen HLA-Allelen gab. Erstens könnten verschiedene HLA-Allele das gleiche Epitop binden und den CD8 T-Zellen präsentieren. Wahrscheinlich war dies der Fall bei fünf Positionen. Zum Beispiel wurde an Position E113 des Core-Proteins eine Häufung von Substitutionen in Assoziation mit HLA-B*15:01, HLA-B*40:02 und HLA-B*49:01 nachgewiesen. In vorangegangenen Studien wurden in Position E113 überlappende HLA-B*40:02- und HLA-B*49:01-restringierte HBV-Epitope identifiziert (Sidney et al., 2003; Kefalakes et al., 2015a). Weiterhin wurde ein HLA-B*15:01-restringiertes Epitop (Core₁₁₂₋₁₂₂) in dieser Dissertation über einen immunologischen Nachweis bestätigt (Abbildung 4.9). Interessanterweise übten die drei Allele unterschiedlichen Druck auf die zweite Position des Epitops aus (Abbildung 4.8). Bei HLA-B*15:01-positiven Patienten wurden die E113T/D-Substitutionen beobachtet, bei HLA-B*40:02-positiven Patienten die E113Q-Substitution und bei HLA-B*49:01-positiven Patienten eine E113Q/D-Substitution. Diese Beobachtung war auch in anderen Positionen reproduzierbar, an denen Assoziationen mit multiplen HLA-Klasse-I-Allelen identifiziert wurden (Tabelle 4.2). Zweitens ist bereits bekannt, dass einige HLA-Allele gekoppelt vererbt werden, sogenannte HLA-Haplotypen. In diesen Fällen kann die Assoziation zwischen einem Sequenzpolymorphismus und einem weiteren HLA-Allel auf die Kopplung mit dem eigentlich immunologisch relevanten HLA-Allel zurückgeführt werden. In 16 Positionen wurden Assoziationen mit mehreren HLA-Allelen detektiert, die am ehesten durch HLA-Haplotypen zu erklären waren (Tabelle 4.2). In diesen Fällen kann nicht immer eindeutig

das immunologisch relevante HLA-Allel festgestellt werden. In fünf Positionen wurden beide Mechanismen der Assoziationen mit multiplen HLA-Allelen als Kombination beobachtet. In Position S21 des Core-Proteins wurde ein HLA-A*02:01- und ein HLA-B*35:03-assoziiierter Selektionsdruck gefunden, beide HLA-Allele können das Epitop präsentieren (Walker et al.). Da HLA-B*35:03 und HLA-C*14:02 Haplotypen sind, wurde an dieser Position zusätzlich auch ein HLA-C*14:02 *Footprint* detektiert.

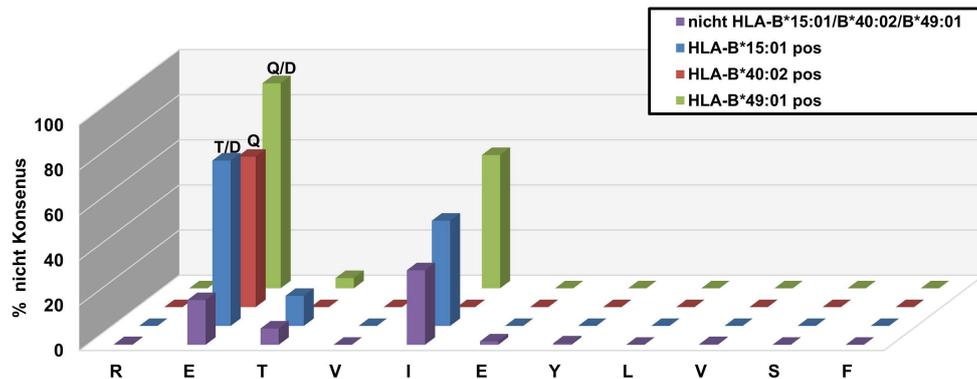


Abbildung 4.8: HLA-Klasse-I-assoziiierter Selektionsdruck auf Core₁₁₂₋₁₂₂

Die relative Häufigkeit von Unterschieden zur Konsensussequenz von Core₁₁₂₋₁₂₂ für jede Position bei HLA-B*15:01-positiven (Blau), B*40:02-positiven (Rot), B*49:01-positiven (Grün) Patienten und Patienten, die keines dieser Allele tragen (Lila), wurde ermittelt.

Im letzten Abschnitt wurde deutlich, dass 70 Positionen in den Proteinen unter Selektionsdruck von einem oder mehreren HLA-Klasse-I-Allelen stehen. Durch die Besonderheit der ORFs des HBV-Genoms wurde eine Kopplung von HLA-*Footprints* in der überlappenden Core- und Polymerase-Region beobachtet. Des Weiteren wurden zwei Gründe für die Detektion von Assoziationen mit multiplen HLA-Allelen identifiziert. Einerseits können multiple HLA-Allele das gleiche Epitop binden und präsentieren und andererseits die gekoppelte Vererbung von HLA-Allelen.

4.1.4 Über statistische Analysen lassen sich potenzielle neue HBV-Epitope identifizieren

In vorhergehenden Arbeiten wurden neue HBV-Epitope über die Verwendung von überlappenden Peptiden von einzelnen Proteinen oder dem kompletten Genom identifiziert (Boni et al., 2007; Zhang et al., 2018). Jedoch wurde in einer ersten „*Proof-of principle*“ Studie gezeigt, dass auch über die Analyse von HBV-*Footprints* neue HBV-Epitope im Core-Protein nachgewiesen werden können (Kefalakes et al., 2015a). Um neue Epitope in allen Proteinen identifizieren zu können, wurde für alle 111 HLA-*Footprints* analysiert, ob in diesem Bereich ein mögliches Bindungsmotiv für das entsprechende HLA-Klasse-I-Allel vorhanden war (Tabelle 4.3). Dazu wurden die Bindungsvorhersage-*Tools* der IEDB- und SYFPEITHI-Datenbank verwendet. Anhand von vorangegangenen Publikationen wurde ein IEDB-Ergebnis von ≤ 1 und ein SYFPEITHI-Ergebnis von ≥ 20 als guter Binder für das entsprechende

HLA-Allel angesehen (Karimzadeh et al., 2018; Akyu et al., 2019; Sankar et al., 2019). Insgesamt konnten den 111 HLA-Footprints 57 vorhergesagte Epitope mit einem IEDB-Ergebnis ≤ 1 und/oder einem SYFPEITHI-Ergebnis ≥ 20 zugeordnet werden. Davon waren bereits 27 in früheren Studien (Sette et al., 1994; Bertoni et al., 1997; Sidney et al., 2003; Depla et al., 2008; Zhang et al., 2013; Tan et al., 2014; Kefalakes et al., 2015a; Kefalakes et al., 2015b; Yamamiya et al., 2018; Zhang et al., 2018; Zheng et al., 2018) und von der Arbeitsgruppe von Christoph Neumann-Haefelin (Universität Freiburg persönliche Kommunikation) zellulär bestätigt.

Um die Existenz neuer Epitope, die unter Selektionsdruck stehen, zu bestätigen, müssen immunologische Untersuchungen durchgeführt werden.

Tabelle 4.3: Vorhergesagte Epitope in Regionen mit HLA-Footprints

Protein	AS-Position	HLA-Allel	IEDB (Ergebnis)	SYFPEITHI (Ergebnis)	zellulär bestätigt
PräCore	2	B*14:02	MQLFHLCL (19)	MQLFHLCL (21)	
PräCore	2	C*08:02	MQLFHLCLI (44)	n.V.	
PräCore	9	A*11:01	LIISCSCPTVQASK (2)	LIISCSCPT (8)	
PräCore	10	A*02:01	LIISCSCPTV (1,55)	LIISCSCPTV (25)	
PräCore	17	A*11:01	CSCPTVQASK (1,23)	CSCPTVQASK (21)	CPTVQASKL [&]
PräCore	17	B*35:01	CPTVQASKL (7,2)	CPTVQASKL (21)	
PräCore	28	A*11:01	n.V.	n.V.	
Core	14	B*41:01	n.V.	KEFGASVELL (13)	
Core	14	C*17:01	ASVELLSFL (0,2)	n.V.	
Core	21	A*02:01	FLPSDFFPSV (0,11)	FLPSDFFPSV (24)	FLPSDFFPSV [\$]
Core	21	B*35:03	LPSDFFPSVRDL (1,8)	n.V.	LPSDFFPSV [\$]
Core	21	C*14:02	FLPSDFFPSVRDL (4,7)	n.V.	
Core	24	A*02:01	FLPSDFFPSV (0,11)	FLPSDFFPSV (24)	FLPSDFFPSV [\$]
Core	26	A*02:01	FLPSDFFPSV (0,11)	FLPSDFFPSV (24)	FLPSDFFPSV [\$]
Core	27	A*02:01	FLPSDFFPSV (0,11)	FLPSDFFPSV (24)	FLPSDFFPSV [\$]
Core	34	A*33:01/03	SVRDLLDTASALYR (0,51)	n.V.	
Core	34	B*14:02	VRDLLDTAS (2,45)	DLLDTASAL (17)	
Core	38	A*01:01	LLDTASALY (0,11)	LLDTASALY (28)	LLDTASALY [\$]
Core	38	B*08:01	TASALYREAL (2,15)	SALYREAL (25)	
Core	38	A*02:01	ALYREALESP (9,15)	ALYREALESP (19)	
Core	40	A*02:01	ALYREALESP (9,15)	ALYREALESP (19)	
Core	45	A*32:01	ALYREALESP (23,5)	n.V.	
Core	45	B*41:01	n.V.	PEHCSPHHTA (22)	LESPEHCSP [\$]
Core	45	C*17:01	ALESPEHC (37)	n.V.	
Core	46	A*11:01	SPEHCSPHHTALR (14)	ALESPEHC (10)	
Core	48	A*02:01	ALESPEHC (27,95)	ALESPEHC (13)	

Core	49	B*14:02	HCS P HHTAL (0,77)	HCS P HHTAL (11)	
Core	49	B*35:01	HCS P HHTAL (3,9)	HCS P HHTAL (12)	
Core	49	C*12:03	HCS P HHTALRQAI (10)	n.V.	
Core	50	C*12:02/03	HCS P HHTAL (1,2)	n.V.	
Core	59	A*32:01	RQA I LCWGELMTL (4,4)	n.V.	
Core	63	B*44	G ELMTLATW (0,12)	G ELMTLATW (23)	GELMTLATW [\$]
Core	67	A*02:01	ILCWGELM T L (0,43)	ILCWGELM T L (28)	VCWGELM N L [\$], ELMTLATWV [\$]
Core	74	A*24:02	TWV G GNLED (13,5)	LATWV G NL (11)	LATWVGS N L [\$]
Core	77	B*14:02	L EDPTSRDL (16,2)	L EDPTSRDL (12)	
Core	80	A*01:01	P TSRDLVSY (1,05)	P TSRDLVSY (21)	
Core	87	A*33:01/03	S YVNTNMGLKFR (0,63)	n.V.	
Core	91	A*33:01/03	N TNMGLKFR (0,63)	n.V.	NTNMGLKFR [#]
Core	91	B*14:02	V S YV N TM (16)	V N TMGLK F (12)	
Core	91	C*08:02	YV N TM G L (3,7)	n.V.	
Core	100	C*12:02/03	M G LKFR Q LL (2,2)	n.V.	
Core	105	A*02:01	LLWF H ISCL (0,5)	LLWF H ISCL (26)	LLWFHISCL [\$]
Core	105	A*24:02	LWF H ISCL T F (0,13)	KFRQLLW F H I (18)	LWFHISCL T F [\$]
Core	109	A*23:01	LWF H ISCL T F (0,12)	n.V.	LWFHISCL T F [\$]
Core	109	A*24:02	LWF H ISCL T F (0,13)	W F HISCL T F (15)	LWFHISCL T F [\$]
Core	112	B*27	G RET V IEYLV S F (0,83)	G RET V IEY L (27)	GRET V IEY L [&]
Core	113	B*15:01	R ET V IEYLV S F (2,1)	CL T F G RET V (13)	RET V IEYLV S F [#]
Core	113	B*40:02	R ET V IEYLV S FG V (0,43)	R ET V IEYLV S (16)	RET V IEYLV S [\$]
Core	113	B*49:01	R ET V IEYLV (0,08)	R ET V IEYLV (20)	RET V IEYLV S [\$]
Core	114	B*35:01	FG R ET V IEY (0,6)	FG R ET V IEY (20)	TVIEYLV S F [&]
Core	114	C*04:01	RET V IEYLV (10,55)	n.V.	
Core	116	A*23:01	TVIEYLV S F (0,66)	n.V.	
Core	116	A*25:01	ET V IEYLV S F (0,04)	n.V.	
Core	116	A*26:01	ET V IEYLV S FG V (0,1)	ET V IEYLV S F (35)	TVIEYLV S F [#], ET V IEYLV S F [&]
Core	117	A*11:01	TVIEYLV S FG V W I R (5,1)	L T F G RET V IE (16)	
Core	117	B*35:01	FGRET V IEY (0,6)	FGRET V IEY (13)	TVIEYLV S F [&]
Core	130	B*14:02	P AYRPP N AP (1)	IR T PP P AYR (13)	
Core	131	A*02:01	YLV S FG V W I R T PP A (0,75)	A YRPP N AP I L (15)	GV W IR T PP A [\$]
Core	131	A*31:01	V S FG V W I R T PP A YR (0,19)	n.V.	
Core	131	A*33:01/03	W I R T PP A YR (0,03)	n.V.	FG W IR T PP A YR [\$]
Core	131	B*14:02	P AYRPP N AP (1)	P AYRPP N AP (4)	
Core	131	C*08:02	A YRPP N AP I L (19)	n.V.	
Core	135	B*07:02	TP P AYRPP N AP I (0,17)	PP N AP I L S T (22)	YRPP N AP I L S [#]
Core	135	C*07:02	YRPP N AP I L (0,11)	n.V.	
Core	135	B*50:01	YRPP N AP I L (18)	PP P AYRPP N A (11)	
Core	135	B*57:01	RT P PAYRPP N AP I (8,8)	RT P PAYRPP N (10)	
Core	135	C*06:02	YRPP N AP I L (0,22)	n.V.	
Core	142	A*68:01	S TL P ETT V VR (1,48)	S TL P ETT V VR (22)	ST L PETT V VR [#], ST L PETT V VR [\$]
Core	146	A*11:01	ST L PETT V VR (0,96)	ST L PETT V VR (28)	ST L PETT V VR [\$]
Core	147	A*68:01	ET T V V RRR R GR (0,51)	ST L PETT V VR (22)	ST L PETT V VR [\$]

Core	151	A*02:01	ILSTLPETT V RR (16)	V V RRRGRSP (7)	
Core	151	A*11:01	STLPETT V RR (1,9)	TLPET T VRR (19)	STLPETT V RR [§]
Core	151	B*35:01	LPETT V RR (7,8)	LPETT V RR (13)	
Core	153	A*11:01	STLPETT V RRR R GR (5,5)	ETT V RRR R GR (19)	
Core	156	A*11:01	TT V RRRGR S PR (8,7)	V V RRRGR S PR (18)	
Core	157	A*11:01	TT V RRRGR S PR (8,7)	V V RRRGR S PR (18)	
Core	167	B*27:05	RRRRSQSPRR (0,3)	RRSQSPRRR (29)	
Core	170	C*17:01	RS Q SPRRRR (16)	n.V.	
Polymerase	16	A*11:01	DEAGPLEEELPR (41)	LLL D EAGPL (10)	GPLEEELPR [&]
Polymerase	32	B*27	PRLADEGLNR (7,65)	PRLADEGLNR (25)	
Polymerase	47	C*15:02	N LNVSIPWTHKV (0,88)	n.V.	
Polymerase	50	B*51:01	S IPWTHKVG N FTGL (3,7)	LG N LN V SI (20)	
Polymerase	50	C*15:02	S IPWTHKV (0,56)	n.V.	
Polymerase	67	A*02:01	GLYS S T V PV (0,1)	GLYS S T V PV (26)	GLYS S T V PV [§]
Polymerase	95	B*13:02	E Q F VG L TV (0,04)	E Q F VG L TV (24)	
Polymerase	120	B*27:05	ARFYP N VTK (0,5)	ARFYP N VTK (28)	ARFYP N VTK [&]
Polymerase	120	C*02:02	RFYP N VTKY (0,94)	n.V.	
Polymerase	173	B*35:03	FCG S PYSWEQEL (0,15)	S PYSWEQEL (20)	SPYSWEQEL [#]
Polymerase	173	C*12:02/03	SASFCG S PY (0,23)	n.V.	
Polymerase	180	B*35:03	FCG S PYSWEQ L (0,15)	SPYSWEQ L (20)	SPYSWEQEL [#]
Polymerase	198	B*07	R PPVGSS L (0,8)	P PPVGSS L Q S (14)	
Polymerase	198	C*07:02	SR P PPVGSS L (0,28)	n.V.	
Polymerase	199	B*07	R PPVGSS L (0,8)	P PPVGSS L Q S (14)	
Polymerase	199	C*07:02	SR P PPVGSS L (0,28)	n.V.	
Polymerase	224	B*27	R R Q QGRSWSIRAGI (0,04)	R R Q QGRSWSI (25)	
Polymerase	261	B*15:01	ASK S ASCLY (0,7)	ASK S ASCLY (12)	
Polymerase	273	A*03:01	CLYQSP V R K (0,12)	CLYQSP V R K (29)	
Polymerase	275	C*12:02/03	A AYPAVSTF (0,02)	n.V.	
Polymerase	288	B*51	YPAVSTFEKHSS S G (21)	S GHAVELHN (11)	
Polymerase	288	C*15	SS S GHAVEL (0,13)	n.V.	
Polymerase	354	B*07	IP R TPARVTGGVF (0,26)	IP R TPARVT (23)	IPRTPARVTGGVF [&]
Polymerase	354	C*07:02	IRIP R TPAR (1)	n.V.	
Polymerase	523	C*12:03	FTSA I CSV (2,4)	n.V.	
Hüllprotein	297	B*08:01	SMYPSCCCT (22)	Y PSCCCTK (6)	
Hüllprotein	356	A*02:01	GLSPTV W LS V (0,54)	GLSPTV W LS V (26)	GLSPTV W LS V , WLSLLVPFV [§]
HBx	34	A*11:01	SG P L G TLSSPSPS (33)	FSG P L G TLSS (15)	
HBx	48	B*14:02	T DHGAHLSL (3,42)	D HGAHLSL (18)	VSTDHGAHL [&]
HBx	48	C*08:02	VST D HGAHL (2,2)	n.V.	
HBx	150	B*55	A PCNFF T SA (0,09)	n.V.	
HBx	153	B*14:02	CAPAP C N F F (4,8)	VCAPAP C N F (7)	
HBx	153	C*08:02	APAP C N F FT (29,5)	n.V.	

AS: Aminosäure, n.V. HLA-Allel nicht Verfügbar, Buchstaben in Rot: Position unter Selektionsdruck §: zelluläre bestätigte Epitope in früheren Studien #: zelluläre bestätigte Epitope in dieser Dissertation, &: zelluläre bestätigte Epitope in der Arbeitsgruppe von Christoph Neumann-Haefelin (persönliche Kommunikation, unpubliziert)

4.1.5 Experimentelle Validierung von neuen CD8-Epitopen

Nachdem in den vorangegangenen Experimenten 30 potenzielle, bisher noch nicht beschriebene, CD8 T-Zell-Epitope identifiziert werden konnten, sollten diese im weiteren Verlauf experimentell bestätigt werden. Da einige potenzielle Kandidaten erst mit der letzten *SeqFeatR*-Analyse identifiziert wurden, konnten nicht alle Kandidaten überprüft werden. Insgesamt wurden 11 Regionen mit HLA-*Footprints* mit Hilfe von 20 synthetisierten Peptiden, die den Kandidat-Epitopen entsprechen, untersucht. Von einigen Regionen wurden mehrere Peptide mit unterschiedlichen Längen synthetisiert, da die verwendeten Algorithmen von IEDB und SYFPEITHI für mehrere Kandidaten gute Bindungsergebnisse ermittelt hatten. Zur Detektion von HBV-spezifischen CD8 T-Zellen wurden PBMCs von Patienten mit einer chronischen HBV-Infektion und dem relevanten HLA-Klasse-I-Allel für zehn Tage mit dem Peptid *in vitro* expandiert. Anschließend wurden die Zellen mit demselben Peptid restimuliert und über eine interzelluläre Zytokinfärbung (ICS) wurden Interferon (IFN)- γ produzierende CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen. Mit Hilfe des ICS wurden in den 11 getesteten Regionen mit HLA-*Footprints* sieben neue Epitope identifiziert (Abbildung 4.9). Somit wurde im Core-Protein ein neues HLA-A*33:01-, HLA-A*26:01-, HLA-B*07:02- und zwei HLA-B*15:01- restringierte Epitope bestätigt (Abbildung 4.9A). In der Polymerase wurde ein HLA-B*40:01- und HLA-B*35:03-restringiertes Epitop identifiziert (Abbildung 4.9B).

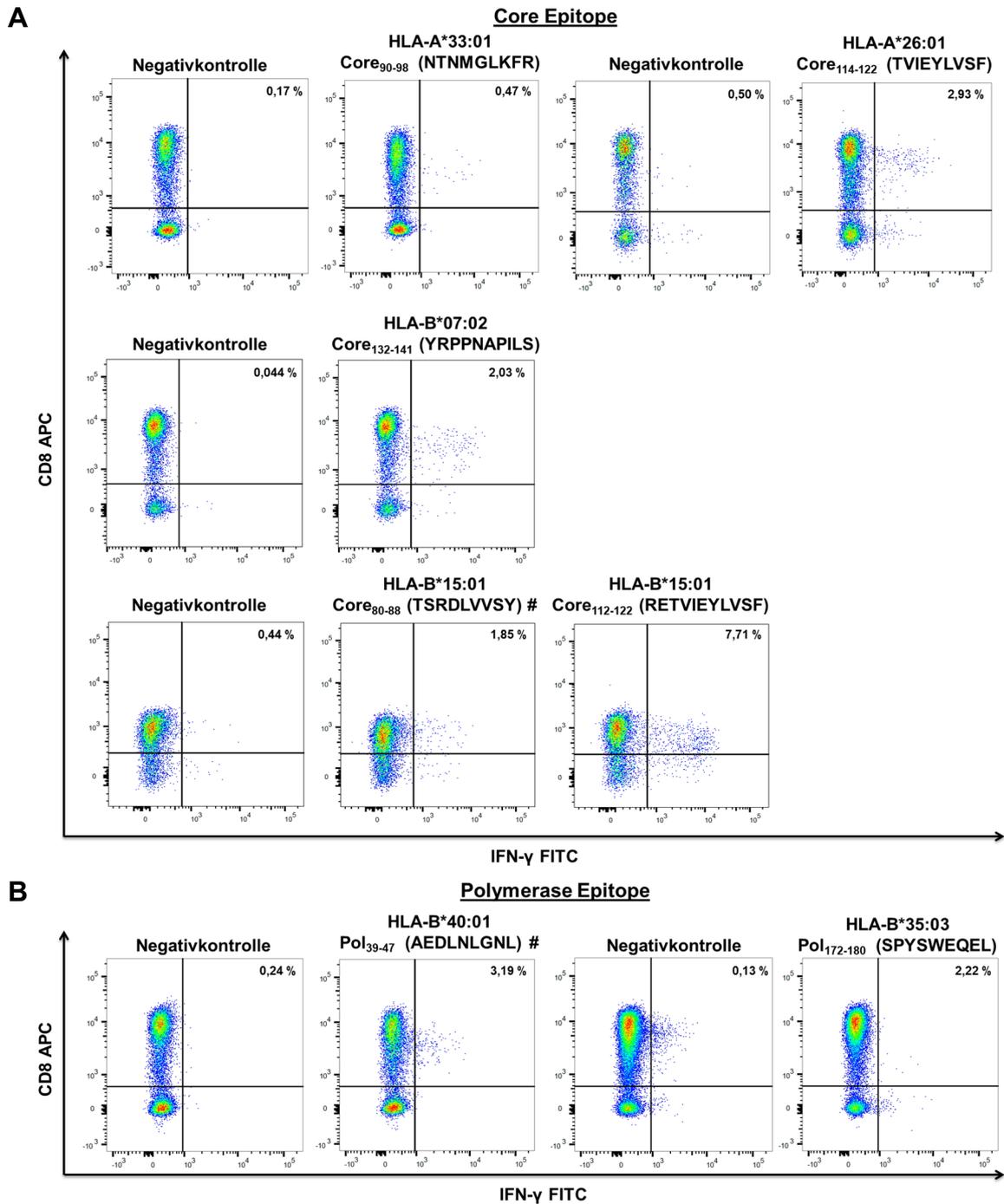


Abbildung 4.9: Identifizierte neue CD8 T-Zell Epitope anhand intrazellulärer Zytokinfärbung

PBMCs von chronisch infizierten HBV-Patienten wurden antigen-spezifisch zum jeweiligen HLA-Klasse-I-Allel *in vitro* expandiert und an Tag zehn mit dem gleichen Peptid restimuliert. Die Detektion von aktivierten CD8⁺ T-Zellen erfolgte mittels intrazellulärer Zytokinfärbung (ICS). Für jedes Experiment wurden expandierte PBMCs ohne das entsprechende Peptid als Negativkontrolle im ICS verwendet. Dargestellt sind neue zellulär bestätigte Core- (A) und Polymerase-Epitope (B). #: bestätigte Epitope, die aufgrund früherer Sequenzanalysen getestet wurden. Pol: Polymerase

Zusammenfassend wurden aufgrund von statistischen Analysen 30 potenzielle neue HBV-Epitope identifiziert, von denen sieben über einen immunologischen Nachweis bestätigt wurden. Fünf der bestätigten Epitope waren im Core-Protein lokalisiert. Erstmals wurde

gezeigt, dass über die Identifizierung von HBV-*Footprints* auch neue Polymerase-Epitope nachgewiesen werden können.

4.2 Zusammenhang zwischen HLA-Klasse-I-assoziiertem Selektionsdruck und virologischen Parametern

4.2.1 Die Anzahl von Substitutionen korreliert mit der HBV-Viruslast

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass in allen Proteinen ein HLA-assoziiertes Selektionsdruck nachweisbar ist. Aus diesem Grund wurde als nächstes geprüft, ob HLA-assoziierte Sequenzpolymorphismen mit der Viruslast korrelieren oder vom HBeAg-Status abhängig sind. Um die Korrelation von Virussequenzpolymorphismen mit der HBV-Viruslast zu untersuchen, wurde bei therapie-naiven Patienten (n=285) die autologe Sanger-Sequenz mit der Konsensussequenz verglichen und die Anzahl der Abweichungen in allen Proteinen (Gesamtsubstitutionen) bestimmt. Die Analyse folgt der Annahme, dass die Konsensussequenz definiert mit der häufigsten Aminosäure in jeder Position des Polyproteins, eine optimierte Funktionalität der codierten Proteine sicherstellt und damit nahe am Maximum der viralen Fitness liegt. Die Anzahl der Abweichungen von der Konsensussequenz wurde einmal für alle Substitutionen berechnet, für alle Substitutionen in Positionen mit HLA-*Footprints* und in Positionen ohne Hinweis auf HLA-*Footprints* (siehe Tabelle 4.3). Die Korrelation mit der HBV-Viruslast wurde mittels Rangkorrelationsanalyse nach Spearman ermittelt (Abbildung 4.10). Bei der Betrachtung der Viruslast und der Anzahl der Gesamtsubstitutionen wurde eine schwache negative Korrelation ($r_s = -0,14$, $p = 0,0283$) detektiert (Abbildung 4.10A). Dieser Zusammenhang wurde stärker, wenn die Viruslast mit der Anzahl von Substitutionen in den 70 Positionen unter HLA-Selektionsdruck korreliert wurde (Abbildung 4.10B). Aufgrund des erhöhten negativen Korrelationskoeffizienten ($r_s = -0,23$) und dem hoch signifikanten p-Wert von $< 0,0001$ wurde deutlich, dass je mehr Substitutionen ein Patient in Positionen unter HLA-Selektionsdruck hatte, desto niedriger war die Viruslast. Als Negativkontrolle wurde die Viruslast mit der Anzahl von Substitutionen in allen Positionen, die nicht unter Selektionsdruck standen, korreliert (Abbildung 4.10C). Da der Korrelationskoeffizient von $-0,10$ näher an der Null und der p-Wert bei $0,0928$ nicht signifikant war, war davon auszugehen, dass an diesen Positionen der Zusammenhang mit der Viruslast weniger eng war.

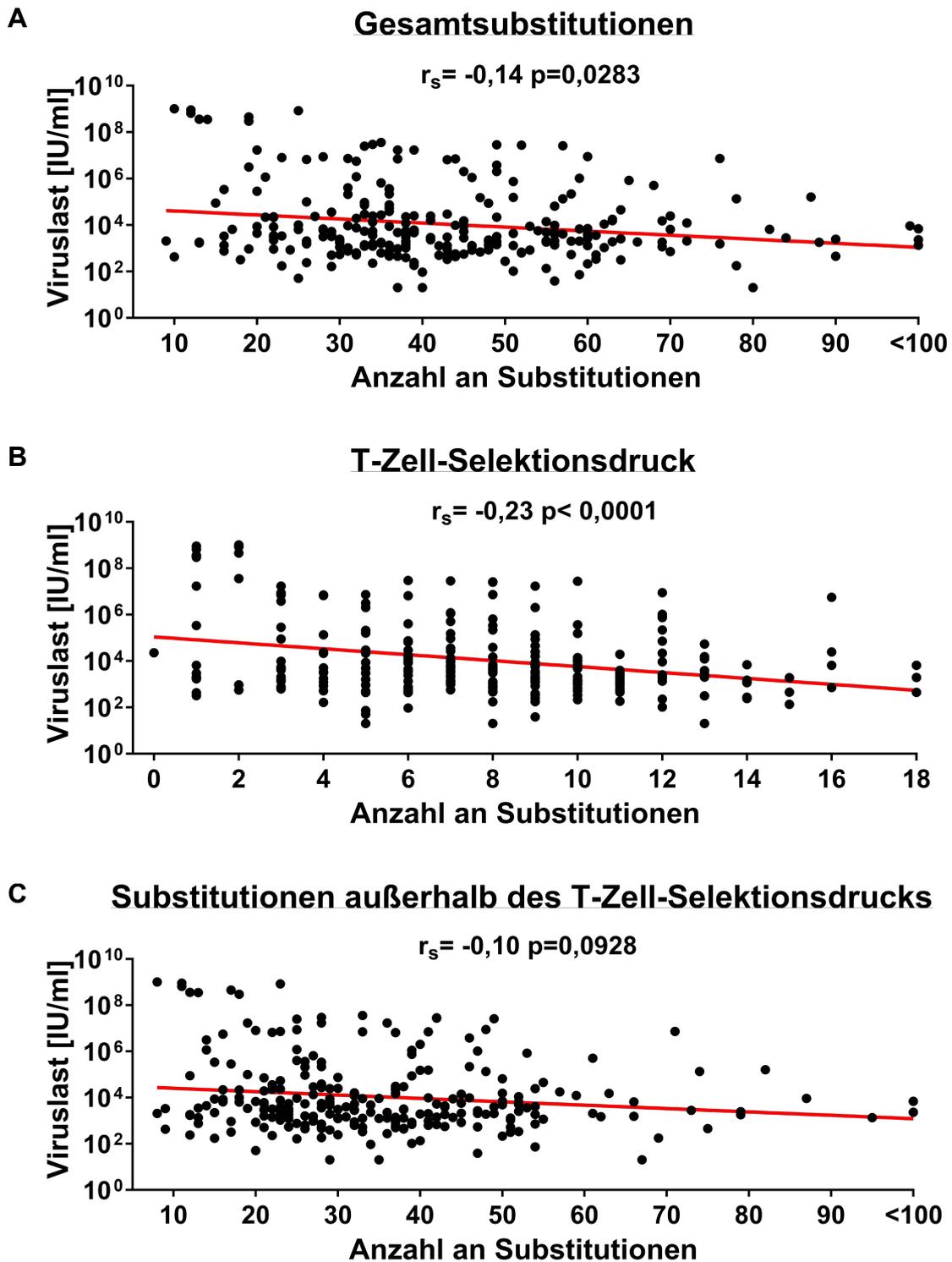


Abbildung 4.10: Korrelation zwischen der Viruslast und der Anzahl der Substitutionen

Der Zusammenhang zwischen der Viruslast und der Anzahl der Substitutionen wurde mittels einer Rangkorrelationsanalyse nach Spearman ermittelt. Dargestellt ist die Viruslast in Abhängigkeit von der Anzahl der Substitutionen (im Vergleich zur Konsensussequenz) in allen Proteinen (A), in den 70 Positionen, mit Hinweis auf HLA-Selektionsdruck (B) und in Positionen, ohne Hinweis auf HLA-Selektionsdruck (C). r_s : Korrelationskoeffizient

4.2.2 HBeAg-positive Patienten haben signifikant erhöhte Viruslasten

Anhand der Korrelationsanalyse lässt sich sagen, dass der HLA-Klasse-I-assoziierte Selektionsdruck einen Einfluss auf die Viruslast hat. Als Nächstes wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen dem HBeAg-Status und dem HLA-assoziierten Selektionsdruck gibt. Eine chronische HBV-Infektion wird aufgrund des HBeAg-Status, der Viruslast und des ALT-Spiegels in fünf verschiedene Phasen eingeteilt. In den Phasen der HBeAg-positiven chronischen HBV-Infektion und der HBeAg-positiven chronischen Hepatitis ist das HBeAg serologisch nachweisbar. Hingegen sind Patienten in den Phasen der HBeAg-negativen chronischen HBV-Infektion, der HBeAg-negativen chronischen Hepatitis und der okkulten HBV-Infektion HBeAg-negativ. Somit haben Patienten in den letzten drei Phasen das HBeAg eliminiert und sind in der Regel zu anti-HBe serokonvertiert. Jedoch haben die meisten Patienten in der HBeAg-negativen chronischen Hepatitis Phase eine Substitution in der PräCore-Region oder Substitutionen im BCP, durch die die Produktion des HBeAg beeinträchtigt ist. Durch Substitutionen (A1762 und G1764) im BCP wird die Expression des HBeAg supprimiert, dagegen kodiert die Substitution G1896A für ein Stoppcodon in Position W28 (W28*) und verhindert die Produktion des HBeAg vollständig (Carman et al., 1989; Buckwold et al., 1996). Interessanterweise gibt es zwischen den HBV-Genotypen Unterschiede, welche Substitution häufiger realisiert wird. Da im Genotyp D überwiegend die W28*-PräCore-Substitution auftritt und die BCP-Substitution eher selten ist, wurde für die weiteren Analysen die W28-Position betrachtet. Um zu analysieren, ob es einen Unterschied zwischen HBeAg-positiven Patienten, HBeAg-negativen Patienten ohne und mit W28*-Substitution gibt, wurde das HBeAg serologisch mittels des ARCHITECT i2000SR Immunassay-Systems detektiert und mit der vorhandenen autologen W28 Sanger-Sequenz korreliert. Insgesamt waren bei 346 der 379 Genotyp D-infizierten Patienten das Ergebnis der serologischen Untersuchung vorhanden, sodass diese Patienten in drei Gruppen eingeteilt werden konnten (Abbildung 4.11). Von den 346 Patienten waren 37 W28/HBeAg-positiv, 43 W28/HBeAg-negativ und 266 W28*/HBeAg-negativ. Somit konnte die Mehrzahl der Genotyp D-infizierten Patienten in der Kohorte das HBeAg nicht mehr exprimieren und waren serologisch HBeAg-negativ.

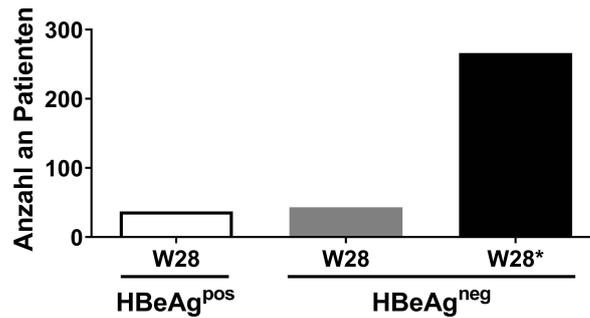


Abbildung 4.11: HBeAg-Status bei Genotyp D-infizierten Patienten

Aufgrund der serologischen Untersuchung und der Sequenz in Position W28 des PräCore-Proteins wurden die Patienten in drei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe bilden die Patienten, die sowohl in der Serologie als auch in der Sequenzanalyse HBeAg-positiv waren (weiß, n=37). In der zweiten Gruppe sind Patienten, die die W28-Prototypsequenz hatten, jedoch serologisch HBeAg-negativ waren (grau, n=43). Die letzte Gruppe besteht aus Patienten, die sowohl serologisch als auch sequenziell HBeAg-negativ waren (schwarz, n=266). pos: positiv, neg: negativ, W: Tryptophan, *: Stoppcodon

In vorangegangenen Publikationen wurde gezeigt, dass HBeAg-positive Patienten eine höhere Viruslast aufweisen im Vergleich zu HBeAg-negativen Patienten (Grandjacques et al., 2000; Werle-Lapostolle et al., 2004). Deshalb wurde analysiert, ob es Unterschiede in der Viruslast zwischen den drei Gruppen gab (Abbildung 4.12). Dazu wurden wiederum nur therapienaive Patienten verwendet (n=241). Die 17 HBeAg-positiven Patienten hatten im Median eine Viruslast von $7,3E^{06}$ IU/ml und somit eine signifikant höhere Viruslast im Vergleich zu den 28 W28/HBeAg-negativen (Median 4.362 IU/ml) und den 196 W28*/HBeAg-negativen Patienten (Median 3.171 IU/ml). Zwar war der Median in den W28/HBeAg-negativen Patienten höher als der Median in W28*/HBeAg-negativen Patienten, jedoch wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen beobachtet.

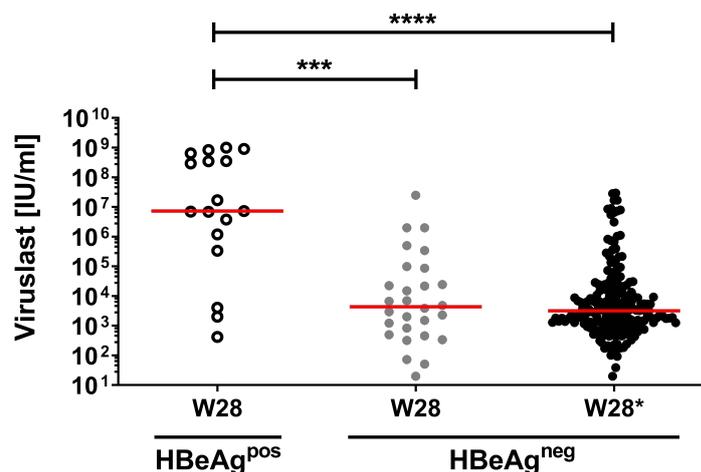


Abbildung 4.12: Höhe der Viruslast in Abhängigkeit vom HBeAg-Status

Die HBV-Viruslast von chronisch HBV-infizierten Patienten mit genetisch (W28) und serologisch positivem HBeAg-Status (weiße Punkte, n=17), mit genetisch (W28) positivem, serologisch negativem HBeAg-Status (graue Punkte, n=28) und genetisch (W28*) und serologisch negativem HBeAg-Status (schwarze Punkte, n=196) wurde miteinander verglichen. Zum Vergleich der Viruslast in den drei Gruppen wurde ein Kruskal-Wallis Test mit einem anschließenden Dunn's multiplen Vergleichstest (***) $p \leq 0,001$ p<, **** $p \leq 0,0001$) durchgeführt und der Median ist dargestellt. pos: positiv, neg: negativ, W:Tryptophan, *:Stoppcodon

4.2.3 Die relative Häufigkeit von Substitutionen in Positionen unter HLA-Selektionsdruck ist in W28*/HBeAg-negativen Patienten signifikant erhöht

Kefalakes et al. zeigten 2015 in einer kleineren Analyse, dass es einen signifikanten Unterschied in der Häufigkeit von HLA-*Footprints* zwischen HBeAg-positiven und HBeAg-negativen Patienten gab (Kefalakes, Budeus et al., 2015). Daher wurde als Nächstes die Häufigkeit von Substitutionen in allen 69 Positionen, die unter HLA-Klasse-I-assoziiertem Selektionsdruck stehen, in den drei unterschiedlichen HBeAg-Gruppen analysiert (Abbildung 4.13). Der W28* HLA-A*11:01-restringierte *Footprint* wurde aus der Analyse exkludiert, da die Einteilung des HBeAg-Status über diese Position erfolgte. Bei W28/HBeAg-positiven Patienten wurden in 56 Positionen keine Substitutionen detektiert. Hingegen wurden Substitutionen in 13 Positionen beobachtet. Allerdings war die relative Häufigkeit von Substitutionen in diesen Positionen unter Selektionsdruck sehr unterschiedlich, z. B. hatten 91,7 % der HLA-A*01:01/HBeAg-positiven Patienten eine Substitution in Position 80 des Core-Proteins, jedoch nur 5 % der HLA-A*01:01/02:01/B*08:01/HBeAg-positiven Patienten eine Substitution in Position 38 des Core-Proteins. Insgesamt hatten W28/HBeAg-positive Patienten signifikant weniger Substitutionen als HBeAg-negative Patienten ($p \leq 0,0001$). Bei den Patienten, die serologisch HBeAg-negativ, jedoch in der Sequenz W28-positiv waren, wurden in 25 Positionen keine Substitutionen detektiert. In den restlichen 44 Positionen wurde eine relative Häufigkeit von Substitutionen zwischen 0,08 und 1 ermittelt. Interessanterweise war die relative Häufigkeit von Substitutionen bei W28/HBeAg-negativen Patienten signifikant niedriger als bei W28*/HBeAg-negativen Patienten ($p \leq 0,05$). Somit wurde ein Unterschied in der relativen Häufigkeit von Substitutionen zwischen HBeAg-negativen Patienten mit der W28*-Substitution und HBeAg-negativen Patienten ohne die W28*-Substitution gefunden. Bemerkenswerterweise wurden in allen 69 Positionen Substitutionen bei W28*/HBeAg-negativen Patienten beobachtet. Somit scheint das Ausmaß des HLA-assoziierten Selektionsdrucks mit dem serologischen Verlust des HBeAg und dann weiter mit dem genetischen Verlust des HBeAg kontinuierlich zuzunehmen.

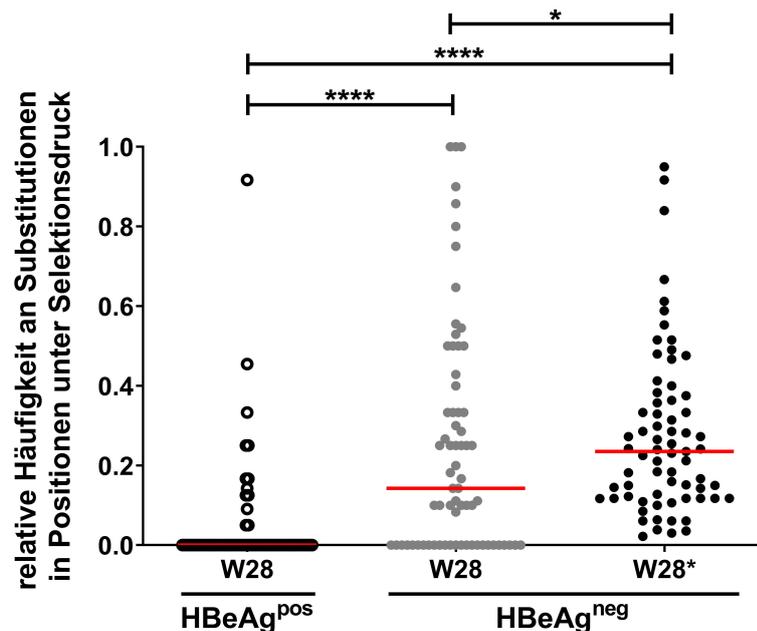


Abbildung 4.13: Abhängigkeit der Substitutionen vom HBeAg-Status

Für 69 Positionen unter HLA-Selektionsdruck wurde die relative Häufigkeit von Substitutionen in Anwesenheit des relevanten HLA-Klasse-I-Allels berechnet und zwischen W28/HBeAg-positiven (weiße Punkte), W28/HBeAg-negativen (graue Punkte) und W28*/HBeAg-negativen Patienten (schwarze Punkte) verglichen. Der Median ist in Rot dargestellt und zum Vergleich der Gruppen wurde ein Kruskal-Wallis Test mit einem anschließenden Dunn's multiplen Vergleichstest (* $p \leq 0,05$, **** $p \leq 0,0001$) verwendet. pos: positiv, neg: negativ, W: Tryptophan, *: Stoppcodon

4.2.4 Einzelne Substitutionen beeinflussen die HBV-Viruslast

Da gezeigt werden konnte, dass es eine negative Korrelation zwischen der Anzahl der Substitutionen in Positionen unter HLA-assoziertem Selektionsdruck und der Viruslast gab, wurde als Nächstes untersucht, ob einzelne Substitutionen identifiziert werden können, die einen besonders starken Einfluss auf die Viruslast haben. Um solche Substitutionen zu finden, wurden mittels *SeqFeatR* Assoziationen zwischen einzelnen Substitutionen in den Proteinen und hohen (>100.000 IU/ml) bzw. niedrigen (<2.000 IU/ml) Viruslasten ermittelt. Als Positivkontrolle wurde die PräCore W28-Position verwendet, da bereits gezeigt wurde, dass Patienten mit der Prototypsequenz eine signifikant höhere Viruslast haben. Interessanterweise wurden, zusätzlich zu der PräCore W28-Position, 24 weitere Positionen detektiert, bei denen eine Assoziation mit einer hohen bzw. niedrigen Viruslast ermittelt wurde (Tabelle 4.4). Allerdings waren nicht alle Positionen unter HLA-assoziertem Selektionsdruck.

Tabelle 4.4: Einfluss von Substitutionen auf die virale Fitness

Protein	Position	Konsensus	Substitution	p-Wert	virale Replikation	HLA-Footprint
Core	12	T	S	0,0003	-	Nein
Core	21	S	V/T/Q/P/N/H/G/E/A	0,024	-	Ja
Core	40	E	D/Q	0,050	-	Ja
Core	66	M	I/L	0,015	-	Nein
Core	67	T	K/N/S	0,001	-	Ja

Core	80	T	I	0,003	+	Ja
Core	83	D	E	0,023	-	Nein
Core	105	I	T	0,007	-	Ja
Core	113	E	Q/D/T	0,023	-	Ja
Core	153	G	C	0,001	+	Ja
Core	177	Q	P/K	0,028	-	Nein
Polymerase	67	T	S/N	0,003	-	Ja
Polymerase	256	T	P/N/A	0,031	+	Nein
Polymerase	265	C	Y/S/G	0,016	+	Nein
Polymerase	374	A	T/S/E	0,020	+	Nein
Polymerase	551	Q	H/W/T	0,001	-	Nein
Polymerase	571	L	I	0,017	-	Nein
Hüllprotein	75	Q	T/H	0,0039	+	Nein
Hüllprotein	130	F	V/S/L	0,0047	+	Nein
Hüllprotein	160	P	L	0,0453	+	Nein
Hüllprotein	255	I	T	0,0362	-	Nein
Hüllprotein	367	S	T/R/N/G	0,0003	-	Nein
Hüllprotein	369	Y	S/N/F/C	0,024	-	Nein
Hüllprotein	370	S	T/R/P/N	0,0357	-	Nein

* Stoppcodon; + erhöhte virale Replikation, - viraler Fitnessverlust, über einen Mann-Whitney-U-Test wurden zwei Gruppen miteinander verglichen

In 16 Positionen wurde eine Assoziation der Substitution mit einer verminderten Viruslast beobachtet, wie zum Beispiel in Position T67 des Core-Proteins. Patienten mit einer T67K/N/S-Substitution hatten eine signifikant niedrigere Viruslast ($p=0,001$) im Vergleich zu Patienten mit der T67-Prototypsequenz (Abbildung 4.14A). Bei acht Positionen wurden Substitutionen mit einer erhöhten Viruslast assoziiert. Als repräsentatives Beispiel wurde die Substitution F130V/S/L im HBsAg (Hüllprotein) ausgewählt. Patienten mit der F130-Prototypsequenz im Hüllprotein hatten im Median eine Viruslast von 22.430 IU/ml, während der Median der Viruslast bei 654.250 IU/ml bei Patienten mit der F130V/S/L-Substitution lag. Somit hatten Patienten mit einer F130V/S/L-Substitution eine signifikante Erhöhung der Viruslast (Abbildung 4.14B). Im vorangegangenen Experiment wurde gezeigt, dass HBeAg-positive Patienten eine höhere Viruslast aufweisen als HBeAg-negative Patienten. Deshalb wurde ebenfalls der Einfluss des HBeAg-Status auf die Core T67K/N/S- und Hüllprotein F130V/S/L-Substitution untersucht (Abbildung 4.14C und D). Dabei wurde deutlich, dass HBeAg-positive Patienten sowohl in Position T67 im Core-Protein als auch in Position F130 im HBsAg nur zwei Substitutionen hatten. Bei 20 W28/HBeAg-negativen Patienten wurde die Prototypsequenz detektiert und bei 8 Patienten die Substitution Core T67K/N/S. Tendenziell hatten W28/HBeAg-negative Patienten mit der Substitution in der autologen Sequenz eine niedrigere Viruslast (Median 1.758 IU/ml) als Patienten mit der Prototypsequenz (Median 10.852 IU/ml) (Abbildung 4.14C). Der Einfluss der HBsAg F130V/S/L-Substitution wurde tendenziell bei beiden HBeAg-negativen Gruppen sichtbar (Abbildung 4.14D). Der Median der

Viruslast der 27 W28/HBeAg-negativen Patienten mit der Prototypsequenz lag bei 2.288 IU/ml und bei den 3 Patienten mit der Substitution bei 200.000 IU/ml. In der W28*/HBeAg-negativen Gruppe wurde ein Median von 2.955 IU/ml bei den Patienten mit der Prototypsequenz beobachtet, hingegen hatten Patienten mit der Substitution im Median eine Viruslast von 7.567 IU/ml.

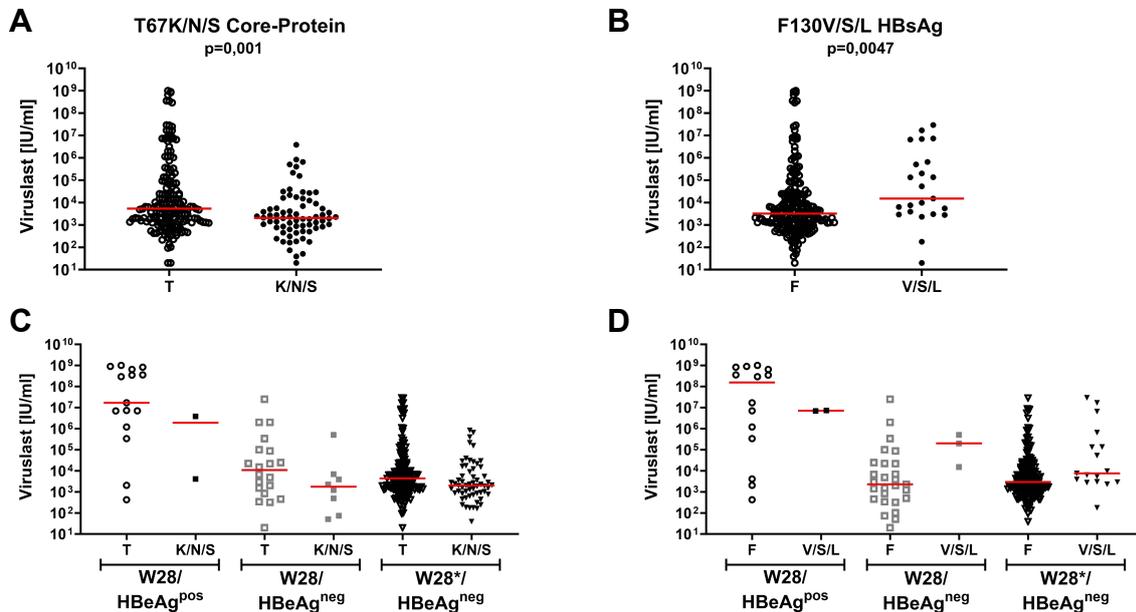


Abbildung 4.14: Einfluss der Substitutionen T67K/N/S im Core-Protein und F130V/S/L im HBsAg auf die Viruslast

Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel für eine Substitution, die mit einer niedrigen Viruslast assoziiert wurde, T67K/N/S im Core-Protein (A) und eine Substitution, die mit einer hohen Viruslast assoziiert wurde, F130V/S/L im HBsAg (B). Zusätzlich wurde der Zusammenhang zwischen diesen Substitutionen und der Viruslast bei HBeAg-positiven und HBeAg-negativen Patienten, mit der W28-Prototypsequenz oder der W28*-Substitution, ermittelt (C und D). Beide Analysen wurden für therapie-naive Patienten (n=244) durchgeführt. Über einen Mann-Whitney-U-Test wurden zwei Gruppen miteinander verglichen und der Median ist dargestellt. pos: positiv, neg: negativ, W: Tryptophan, *: Stoppcodon

Weil HBV bei Patienten als Quasispezies vorliegt, wurde als nächstes die Quasispezies mit Hilfe von *Next Generation Sequencing* (NGS) betrachtet. Dies ermöglicht die Analyse der Variabilität an Position W28, um die Bedeutung von W28 bei HBeAg-positiven und HBeAg-negativen Patienten besser verstehen zu können (Abbildung 4.15). Von den 76 Patienten, die mit Genotyp D infiziert waren und von denen NGS-Daten generiert wurden, waren sechs Patienten HBeAg-positiv und alle kodierten zu 100 % den Prototyp W28 in der Quasispezies. Interessanterweise hatten 6 der 70 HBeAg-negativen Patienten zu 100 % die W28 Quasispezies, obwohl in der Serologie kein HBeAg detektiert wurde. Bei 9 Patienten wurde zusätzlich zum Prototyp W28 noch das Stoppcodon W28* in unterschiedlichen Häufigkeiten beobachtet. Dabei lag die Spannweite der W28*-Quasispezies zwischen 2,7 und 96 %. Bei 55 weiteren HBeAg-negativen Patienten wurden in der Quasispezies keine Viren mit der Prototypsequenz detektiert, diese Patienten hatten zu 100 % die W28*-Quasispezies.

Aufgrund dieser Daten scheint daher das Ereignis des serologischen HBeAg-Verlusts vor der Selektion der W28*-Substitution zu liegen.

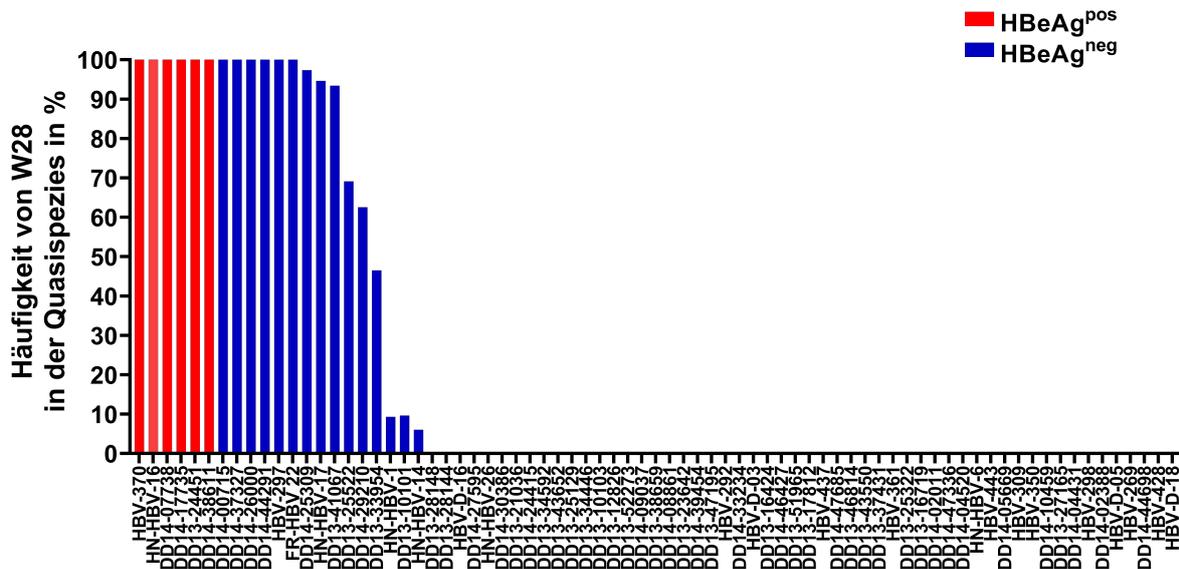


Abbildung 4.15: Häufigkeit von W28 in der Quasispezies

Die Position W28 des PräCore-Proteins wurde mittels NGS näher betrachtet. Dazu wurde die Häufigkeit von W28 in der HBV-Quasispezies von 76 chronisch Genotyp D-infizierten HBV-Patienten, die entweder HBeAg-positiv (Rot, n=6) oder HBeAg-negativ (Blau, n=70) waren, ermittelt. Quasispezies mit einer Häufigkeit < 1 % wurden aus der Analyse ausgeschlossen. pos: positiv, neg: negativ

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sowohl der HLA-Klasse-I-assoziierte Selektionsdruck als auch der HBeAg-Status einen Einfluss auf die virale Replikation hatten. Je mehr HLA-assoziierte Substitutionen ein Patient hatte, desto niedriger war die Viruslast. Auch einzelne Substitutionen konnten mit einer differenziellen Viruslast assoziiert werden. Einerseits wurde durch einige Substitutionen die Viruslast signifikant reduziert, andererseits führten einige Substitutionen zu einer verbesserten viralen Replikation. Patienten, die eine HBeAg-Serokonversion durchgemacht haben, hatten ebenfalls eine signifikant reduzierte Viruslast. Interessanterweise wurde kein Unterschied in der Viruslast detektiert bei HBeAg-negativen Patienten, die an Position W28 die Prototypsequenz oder die W28*-Substitution hatten. Die W28*-Substitution nimmt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Hepatitis B und in der evolutionären Entwicklung von HBV ein. Auf der einen Seite scheint der Verlust des HBeAg mit einem verstärkten HLA-Klasse-I-assoziierten Selektionsdruck zusammenzuhängen, wobei in der Sequenz scheinbar der serologische Verlust des HBeAg vor dem genetischen Verlust des HBeAg durch die Selektion eines Stoppcodons liegt.

4.3 In Regionen mit Deletionen im HBV-Genom sind CD8 T-Zell Epitope lokalisiert

4.3.1 Durch Klonierung von PCR-Produkten lassen sich Varianten in der HBV-Quasispezies mit Deletionen detektieren

Aufgrund der hohen Substitutionsrate bei HBV werden nicht nur einzelne virale Substitutionen, sondern auch Deletionsmutanten im überlappenden ORF der Polymerase und des Hüllproteins beobachtet (Zhang et al., 2012; Kuhnhenh et al., 2018). Bei der Analyse der Sanger-Sequenzen aller Patienten wurden in der HBV-Kohorte ebenfalls *in-frame* Deletionen beobachtet. Insgesamt hatten 35 der 79 Genotyp D-infizierten Patienten (9 %) eine Deletion im überlappenden ORF der Polymerase und des Hüllproteins. Die Deletionen verteilten sich auf zwei Hotspots, ein Hotspot am Ende der PräS1-Domäne und ein Hotspot am Anfang der PräS2-Domäne des Hüllproteins. Beide Domänen überlappen sich mit der Spacer-Domäne der Polymerase (Abbildung 4.16). Ebenfalls wurde deutlich, dass die Deletionen in beiden Regionen unterschiedliche Größen hatten. Die Deletionen in der PräS1-Domäne waren durchschnittlich 28 Aminosäuren (Spannbreite 11 bis 43 Aminosäuren) lang und die Deletionen in der PräS2-Domäne durchschnittlich 6 Aminosäuren (Spannbreite 1 bis 8 Aminosäuren) lang. Mit einer Ausnahme wurde bei allen Patienten die Deletion entweder in der PräS1-Domäne oder der PräS2-Domäne detektiert. Bei einem Patienten wurde eine Deletion beobachtet, die in der PräS1-Domäne anfang und in der PräS2-Domäne aufhörte. Bei drei Patienten war das Methionin der PräS2-Domäne deletiert.

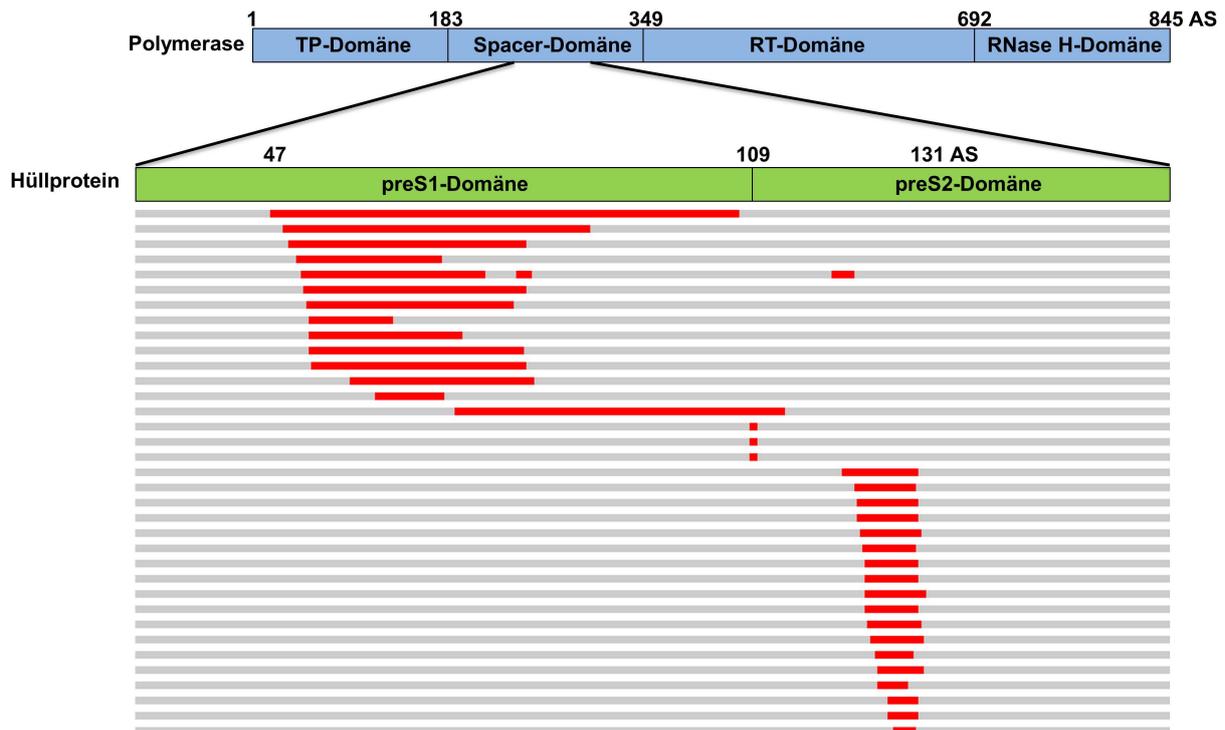


Abbildung 4.16: Identifizierte Deletionen im HBV-Genom

Bei 35 der 379 chronisch Genotyp D-infizierten HBV-Patienten wurden Deletionen (in Rot) in der autologen HBV-Sequenz detektiert. Diese Deletionen lagen in der Spacer-Domäne der Polymerase im überlappenden ORF der PräS1- und PräS2-Domäne des Hüllproteins. AS: Aminosäure, TP: Terminales Protein, RT: Reverse Transkriptase

Da HBV bei Patienten als Quasispezies vorliegt und die autologe Sanger-Sequenz wahrscheinlich nur die häufigste Variante der Quasispezies widerspiegelt, wurde die Quasispezies in der Region mit Deletionen bei einzelnen Patienten analysiert. Die traditionelle Methode für diese Analyse ist das Klonieren und Sequenzieren einzelner PCR-Produkte. Dazu wurde das amplifizierte HBV-Polymerase-Fragment von vier Patienten, zwei Patienten mit Deletionen (DD13-10103, DD14-30386) und zwei Patienten ohne Deletionen (DD13-25522, HBV-D-18), in den pUC18-Vektor mittels *Gibson Assembly* (NEB) kloniert. Anschließend wurden die Plasmide in *E. coli*-Zellen transformiert und von jedem Patienten zehn einzelne Klone mittels Sanger-Sequenzierung analysiert. Alle zehn Klone von DD13-10103 und DD14-30386 hatten dieselbe Deletion, die schon in der autologen Sanger-Sequenz detektiert wurde (Abbildung 6.3A und B). Interessanterweise wiesen zwei Klone von Patient DD13-25522 Deletionen in der PräS1-Domäne auf (Abbildung 4.17A) und von Patient HBV-D-18 hatte ein Klon eine Deletion in der PräS2-Domäne, die in der autologen Sanger-Sequenz nicht sichtbar war (Abbildung 4.17B).

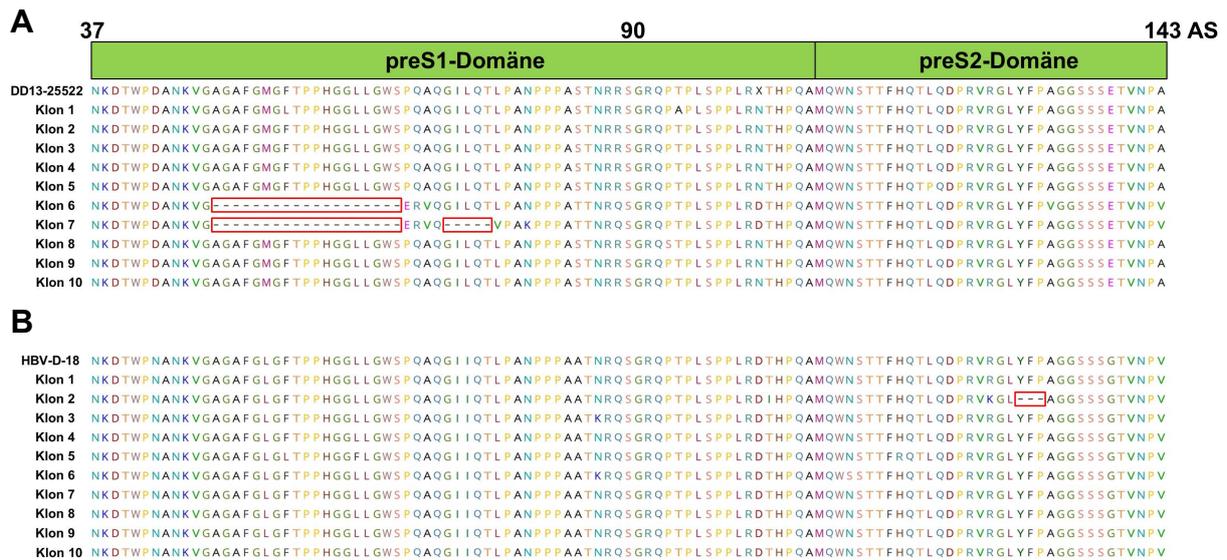


Abbildung 4.17: Klonale Detektion von Deletionen in der HBV-Quasispezies

Das HBV-Polymerase-Fragment von DD13-25522 (A) und HBV-D-18 (B) wurden über *Gibson Assembly* in den pUC18-Vektor kloniert und in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen transformiert. Von jedem Patienten wurde die Plasmid-DNA von zehn Einzelkolonien isoliert und über Sanger-Sequenzierung analysiert. Als Referenzsequenz wurde die autologe Sanger-Sequenz der einzelnen Patienten verwendet. Dargestellt sind die Aminosäurepositionen (AS) 37 bis 143 des Hüllproteins. Deletionen sind in Rot markiert.

Anhand der klonalen Analyse wurde deutlich, dass Patienten, deren HBV-Sequenz nach der Sanger-Sequenzierung keine Deletionen aufwies, trotzdem Deletionen in der Quasispezies haben könnten. Um dies genauer zu analysieren, wurde das komplette HBV-Genom von 116 Patienten mittels NGS betrachtet. Diese Analyse bestätigte die Ergebnisse der Analyse der klonierten PCR-Fragmente, da in dieser Analyse bei 18 von 116 Patienten innerhalb der Quasispezies Deletionen in der PräS1- und PräS2-Domäne detektiert wurden (Abbildung 6.4). Des Weiteren wurden vereinzelt Deletionen im Core-Protein und im HBx-Protein detektiert.

4.3.2 HLA-A*24 und HLA B*35 als Risikoallele für Deletionen

Die im letzten Abschnitt ermittelten Deletionen werden in vorangegangenen Publikationen mit einer bereits fortgeschrittenen Lebererkrankung und einem HCC assoziiert (Abe et al., 2009; Yeung et al., 2011). Obwohl schon gezeigt wurde, dass in der PräS1- und PräS2-Domäne in Regionen mit Deletionen CD4 T-Zell- und B-Zell-Epitope zu finden sind (Ferrari et al., 1992; Maeng et al., 2000; Chen et al., 2006a), existieren keine Studien darüber, ob funktionelle CD8 T-Zell-Epitope in diesen Regionen liegen. Des Weiteren wurde noch nicht untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen Deletionen und HLA-Klasse-I-assoziiertem Selektionsdruck gibt. Daher wurde analysiert, ob Deletionen mit einem bestimmten HLA-Klasse-I-Allel assoziiert waren. Interessanterweise waren Deletionen in HLA-A*24- und HLA-B*35-positiven Patienten signifikant angereichert (Abbildung 4.18A und B). Noch deutlicher wurde diese Assoziation bei Patienten, die beide Allele trugen: 25 % der

HLA-A*24/B*35-positiven Patienten hatten eine Deletion, jedoch nur 6 % der Patienten, die keines der beiden Allele trugen (Abbildung 4.18C).

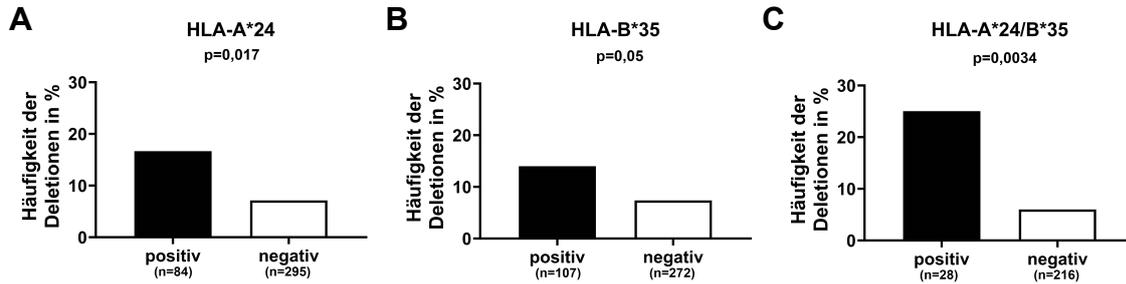


Abbildung 4.18: Assoziation zwischen Deletionen und HLA-A*24 und HLA-B*35

Die relative Häufigkeit von Deletionen in der autologen Sequenz von HLA-A*24-positiven und HLA-A*24-negativen (A) sowie HLA-B*35-positiven und HLA-B*35-negativen Patienten (B) wurde verglichen. Die Häufigkeit der Deletionen in der viralen Sequenz von HLA-A*24/B*35-positiven Patienten und Patienten, die keines der beiden Allele tragen, ist dargestellt (C). P-Werte wurden über einen Fisher-Exakt-Test berechnet.

Da ein Zusammenhang zwischen Deletionen und HLA-Klasse-I-Allelen detektiert wurde, wurde untersucht, ob Deletionen in bestimmten Positionen mit einem HLA-Allel assoziiert waren. Dazu wurden mit Hilfe von *SeqFeatR* eine gezielte Analyse für die Polymerase und das Hüllprotein durchgeführt. Mit Hilfe dieser *SeqFeatR*-Analyse wurden zusätzlich zu HLA-A*24 und HLA-B*35 weitere sechs Allele identifiziert, die mit den Deletionen assoziiert waren (unkorrigierter p-Wert <0,05; Abbildung 4.19). Insgesamt wurden acht HLA-Typen identifiziert, die mit einer Deletion assoziiert waren. Die stärkste Assoziation wurde in Position 81 bis 107 des Hüllproteins ermittelt. Hier waren Deletionen mit HLA-B*15 assoziiert, mit dem niedrigsten p-Wert von 0,006 für alle Positionen, da in diesem Bereich 2 von 29 HLA-B*15-positiven Patienten eine Deletion hatten, jedoch 0 von 348 HLA-B*15-negativen Patienten. Eine Deletion in Position 52 bis 61 wurde mit HLA-A*23 assoziiert (p=0,009). Diese Assoziation überlappte sich jedoch mit einer HLA-A*68-assoziierten Deletion (p=0,009), die in Position 52 bis 71 beobachtet wurde. An Position 121 wurde eine zweite Deletion mit HLA-A*68 assoziiert, ebenfalls mit einem p-Wert von 0,009. In Position 74 bis 80 wurde eine HLA-B*35-restringierte Deletion beobachtet, mit dem besten p-Wert von 0,02 an Position 80. Zwischen Aminosäure 119 und 131 wurden zusätzlich zu der HLA-A*68-assoziierten Deletion vier weitere Deletionen assoziiert mit HLA-B*55 (Position 119-120, p=0,037), HLA-B*27 (Position 123, p=0,015), HLA-B*50 (Position 124-125 p=0,03) und HLA-A*24 (Position 129-131, p=0,036) detektiert. Jedoch muss beachtet werden, dass bei einigen dieser Assoziationen die Zahl der Individuen mit dem entsprechenden HLA-Allel (HLA-B*15, HLA-B*27 und HLA B*55) gering war und die p-Werte nicht für multiples Testen korrigiert waren, sodass es ein Risiko für falsch-positive Assoziationen gibt.

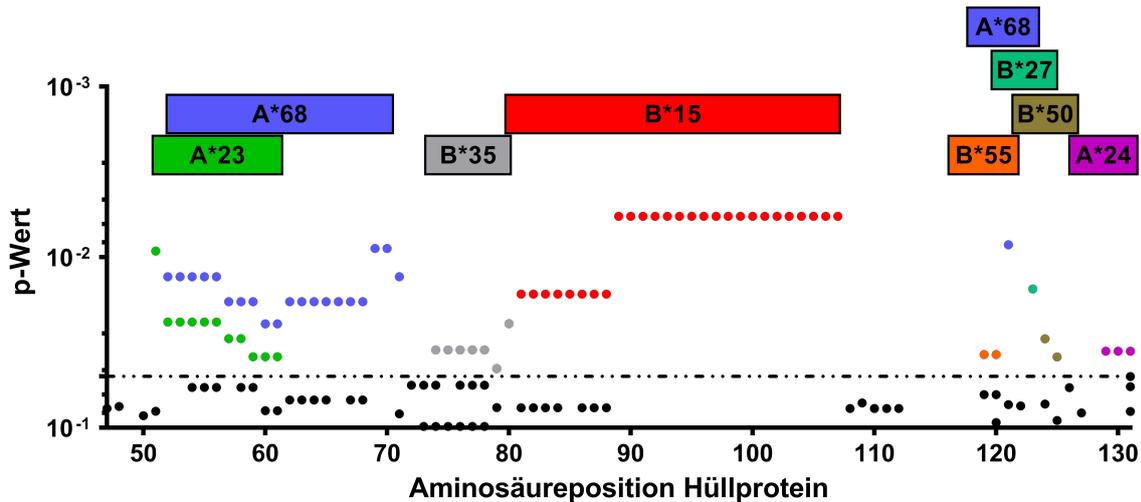


Abbildung 4.19: Deletionen im Hüllprotein assoziiert mit bestimmten HLA-Allelen

Um den Zusammenhang von bestimmten Deletionen und HLA-Allelen detektieren zu können, wurden die deletierten Positionen mit einem X ersetzt und eine *SeqFeatR*-Analyse durchgeführt. Dargestellt sind alle von *SeqFeatR* kalkulierten p-Werte für die Deletionen im Bereich zwischen Aminosäure 47 und 131 des Hüllproteins. Ermittelte p-Werte kleiner als der Grenzwert $p=0,05$ sind farbig markiert, mit den dazu assoziierten HLA-Allelen.

Mit Hilfe der statistischen Analysen ergeben sich Hinweise, dass Deletionen in HLA-A*24- und HLA-B*35-positiven Patienten angereichert waren. Darüber hinaus wurden mögliche Assoziationen von Deletionen mit HLA-A*23, HLA-A*68, HLA-B*15, HLA-B*55, HLA-B*27 und HLA-B*50 gefunden. Aufgrund dieser Beobachtungen erscheint es möglich, dass Deletionen unter dem Druck von CD8 T-Zellen selektiert werden.

4.3.3 Bestätigung von CD8-Epitopen in Regionen mit Deletionen

Um die Hinweise auf CD8 T-Zell-assoziierten Selektionsdruck aus der statistischen Analyse weiter zu untersuchen, wurde funktionell überprüft, ob in den deletierten Bereichen CD8-Epitope zu finden sind. Da die allgemeine Analyse von Deletionen gezeigt hatte, dass Deletionen mit HLA-B*35 assoziiert waren und die spezifische *SeqFeatR*-Analyse ebenfalls eine HLA-B*35 restringierte Deletion detektiert hatte, wurde zunächst untersucht, ob mögliche Bindungsmotive für HLA-B*35 in den Regionen mit Deletionen zu finden waren. Insgesamt wurden drei mögliche Polymerase-Epitope und vier Hüllprotein-Epitope mit guten HLA-B*35-Bindungsmotiven ermittelt (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5: Vorgeschlagene HLA-B*35-restringierte Epitope in Deletionen

Protein	Position	IEDB (Ergebnis)
Polymerase	238-245	HPTARRPF (0,43)
Polymerase	258-267	LASKSASCLY (1,79)
Polymerase	311-318	FPCWWLQF (0,17)
Hüllprotein	41-52	WPDANKVGAGAF (0,66)
Hüllprotein	56-64	TPPHGGLL (2,5)
Hüllprotein	67-74	SPQAQGIL (0,85)
Hüllprotein	77-85	LPANPPPAS (1,7)

Anhand dieser Daten wurden sieben Peptide synthetisiert und an PBMCs von HLA-B*35-positiven Patienten getestet. Über eine zehntägige peptid-spezifische Expansion der PBMCs und anschließender Restimulation mit demselben Peptid wurde untersucht, ob antigen-spezifische CD8 T-Zellen für diese Peptide nachgewiesen werden können. Von den sieben getesteten Peptiden wurde eine IFN- γ ⁺CD8⁺ T-Zellantwort gegen die Polymerase-Epitope Pol₂₅₈₋₂₆₇ LASKSASCLY und Pol₃₁₁₋₃₁₈ FPCWWLQF ermittelt (Abbildung 4.20). Darüber hinaus wurden in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Christoph Neumann-Häfelin von der Universität Freiburg ein weiteres Polymerase-Epitop, Pol₂₃₈₋₂₄₅ HPTARRPF, und zwei Hüllprotein-Epitope, Hüll₄₁₋₅₂ WPDANKVGAGAF und Hüll₅₆₋₆₄ TPPHGGLL, als HLA-B*35-restringierte Epitope bestätigt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde deutlich, dass in Regionen mit Deletionen HLA-B*35-restringierte funktionelle CD8 T-Zell-Epitope lokalisiert sind.

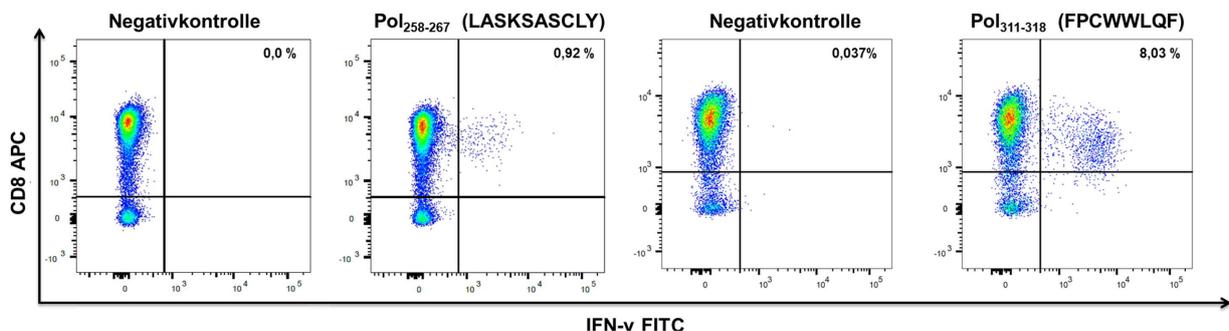


Abbildung 4.20: HLA-B*35-restringierte Epitope in Regionen mit Deletionen

Spezifische CD8⁺ T-Zellen von HLA-B*35-positiven Patienten wurden für 10 Tage mit den Polymerase-Epitopen Pol₂₅₈₋₂₆₇ LASKSASCLY und Pol₃₁₁₋₃₁₈ FPCWWLQF expandiert und anschließend restimuliert. Der Nachweis von IFN- γ ⁺CD8⁺ T-Zellen erfolgte mit Hilfe eines ICS. Für jedes Experiment wurden expandierte PBMCs ohne das entsprechende Peptid als Negativkontrolle beim ICS verwendet.

Zusammenfassend wurden drei Epitope in der Polymerase und zwei im Hüllprotein im immunologischen Nachweis als HLA-B*35-restringierte Epitope bestätigt. Zusammen mit dem Hinweis auf eine Assoziation der Deletionen mit HLA-B*35 in der *SeqFeatR*-Analyse ergibt sich damit ein starker Hinweis darauf, dass HLA-B*35-assoziiertes Selektionsdruck zur Entstehung von Deletionen beiträgt.

5 Diskussion

5.1 HLA-Klasse-I-assoziiertes Selektionsdruck hat einen Einfluss auf die Evolution von HBV

5.1.1 Mit Hilfe der *SeqFeatR*-Analyse können multiple Positionen unter Selektionsdruck in HBV-Proteinen identifiziert werden

Durch die in den letzten Jahren veröffentlichten Studien wurde die Bedeutung des CD8 T-Zell-Selektionsdrucks auf die Evolution von verschiedenen Hepatitis-Viren wie HCV, HBV und HDV immer deutlicher. Unter anderem wurde postuliert, dass aufgrund von CD8 T-Zell-assoziiertem Selektionsdruck in der chronischen Infektion *Escape*-Mutationen selektiert werden. Die dabei durchgeführten Studien von Desmond et al. und Abbott et al. lieferten jedoch nur statistische Hinweise für den CD8 T-Zell-*Escape* (Abbott et al., 2010; Desmond et al., 2012). Erst durch die Publikation von Kefalakes et al. 2015 wurde schlüssig dargestellt, dass HBV auf Populationsebene unter HLA-Klasse-I-assoziiertem Selektionsdruck in CD8 T-Zell-Epitopen steht, wenn die relevanten HLA-Klasse-I-Allele präsentiert werden. Ebenfalls wurde gezeigt, dass aufgrund dieser Substitution HBV der CD8 T-Zell-Immunantwort entkommen kann (Kefalakes et al., 2015a). Da diese Analyse nur für das Core-Protein durchgeführt wurde, wurde die Analyse in dieser Dissertation für alle sieben HBV-Proteine erweitert und zusätzlich eine größere Anzahl an Probanden in die Studie inkludiert. Somit wurde eine detaillierte Analyse über den Zusammenhang von CD8 T-Zell-assoziiertem Selektionsdruck und der evolutionären Entwicklung von HBV erstellt. Dies war möglich durch die Etablierung einer Zwei-Fragmenten-Strategie für die Amplifikation des kompletten HBV-Genoms, welche Genotyp-unabhängig und auch bei niedrigen Viruslasten erfolgreich war. Anhand der erstellten phylogenetischen Analyse wurde einerseits deutlich, dass Isolate mit Genotypen A und D am häufigsten in der Kohorte vorhanden waren, was der typischen Verteilung der Genotypen in Europa entspricht (Deterding et al., 2008; Kuhnhenh et al., 2018). Andererseits wurde eine breite genetische Diversität zwischen den unterschiedlichen Genotypen und auch innerhalb eines Genotyps sowie der Subgenotypen sichtbar. Diese Unterschiede können die statistische Analyse zur Identifizierung von HLA-Klasse-I-assoziierten Polymorphismen mittels *SeqFeatR* verfälschen, wenn bestimmte genotyp-spezifische Sequenzpolymorphismen mit HLA-Allelen assoziiert werden, die typisch sind für die Population, in denen der Genotyp endemisch ist, die aber nicht zur Selektion beigetragen haben. Um dies zu umgehen, wurde eine *SeqFeatR*-Analyse gesondert für die Genotypen durchgeführt. Jedoch war dies für die Genotypen A (n=104), B (n=27), C (n=14) und E (n=20) nicht möglich, da der statistischen Auswertung aufgrund der wenigen Isolate in der Kohorte die ausreichende Aussagekraft fehlte. Somit

wurde die Sequenzvariabilität von HBV unter dem Einfluss der CD8 T-Zellantwort auf Populationsebene für den in der Kohorte am häufigsten vorkommenden Genotypen D (n=379) untersucht. Über eine *SeqFeatR*-Analyse und unter Verwendung eines Cut-offs für den p-Wert $\leq 0,01$ und für den q-Wert $\leq 0,2$, basierend auf Analysen aus vorangegangenen Studien zu HIV und HBV (Carlson et al., 2012a; Kefalakes et al., 2015a), wurden insgesamt 111 HLA-*Footprints* in den HBV-Proteinen identifiziert. Davon waren mehr als zwei Drittel im PräCore/Core-Protein (n=78) anzufinden, die restlichen verteilten sich auf die Polymerase (n=25), das HBx-Protein (n=6) und das Hüllprotein (n=2). Interessanterweise deckt sich dieses Ergebnis nicht mit den Beobachtungen in der Studie von Desmond et al., wo in der Polymerase die meisten Assoziationen zwischen Polymorphismen und HLA-Allelen detektiert wurden (Desmond et al., 2012). Der größte Unterschied zwischen beiden Studien ist der untersuchte Genotyp. Desmond und Kollegen untersuchten den HLA-Klasse-I-assoziierten Selektionsdruck in den asiatischen Raum am häufigsten vorkommenden Genotypen B und C. In der hiesigen Studie wurde der HLA-assoziierte Selektionsdruck in Genotyp D betrachtet. Außerdem spielt die HLA-Allel-Verteilung in Europa und Asien eine große Rolle. Während Desmond drei HLA-A*02:07-assoziierte *Footprints* detektieren konnte, weil ca. 45 % der chinesischen Population dieses Allel tragen (Krausa and Browning, 1996), wurde in dieser Studie kein HLA-A*02:07-assoziiertes *Footprint* identifiziert, weil in dieser Kohorte keine Genotyp D-infizierten HLA-A*02:07-positiven Patienten vorhanden waren. Des Weiteren können die verschiedenen verwendeten *Tools* zur Identifizierung der *Footprints* und der festgelegte Cut-off für p-Werte, zu den unterschiedlichen Ergebnissen beigetragen haben. Der prädominante Selektionsdruck auf dem PräCore/Core-Protein wurde durch die Analyse des *in silico* Fusionsproteins validiert, da ebenfalls bei dieser Analyse, wo die unterschiedlichen Längen der Proteine und die Sequenzvariabilität keine Rollen spielen, die meisten *Footprints* im PräCore/Core-Protein detektiert wurden. Im Einklang dazu steht die Analyse der relativen Häufigkeit der Positionen unter Selektionsdruck. Dabei wurde deutlich, dass jede fünfte Aminosäure im PräCore/Core-Protein unter Selektionsdruck stand, hingegen im Hüllprotein nur jede 195. Position. Interessanterweise war der T-Zell-assoziierte Selektionsdruck auf der Polymerase dem auf dem HBx-Protein sehr ähnlich.

Von den 70 Positionen mit statistischem Hinweis auf Selektionsdruck standen 63 % der Positionen unter Selektionsdruck von nur einem HLA-Klasse-I-Allel. In den restlichen Positionen waren Virussequenzpolymorphismen mit multiplen HLA-Allelen assoziiert. Ein wichtiger Aspekt, der bei der Entstehung von HLA-*Footprints* beachtet werden sollte, ist der Genomaufbau von HBV mit den überlappenden ORFs. Von den 25 detektierten Polymerase HLA-*Footprints* überlappten sich fünf mit dem Core-ORF (Aminosäureposition 1-50) und 13 mit dem S-ORF (Aminosäureposition 182-571), jedoch sind diese HLA-*Footprints*, bis auf zwei Ausnahmen, synonyme (stille) Substitutionen in dem jeweils anderen ORF. Die zwei

Ausnahmen bilden nicht-synonyme Substitutionen, die sowohl in dem Core-Protein als auch in der Polymerase detektiert wurden und mit HLA-A*11:01 bzw. HLA-B*27 assoziiert waren. Aufgrund des erbrachten Nachweises, dass der *Footprint* an Position R151 des Core-Proteins innerhalb eines HLA-A*11-restringierten Epitops liegt und zum CD8 T-Zell-*Escape* führt (Kefalakes et al., 2015a), ist davon auszugehen, dass der HLA-A*11:01-assoziierte *Footprint* an Position D16 der Polymerase nur wegen des Selektionsdrucks auf dem Core-Epitop zustande gekommen ist. Für die beiden HLA-B*27-assoziierten *Footprints* an Position R167 des Core-Proteins und an Position E32 der Polymerase wurden für beide Proteine gute Bindungsmotive für HLA-B*27 vorhergesagt. Daher ist es in diesem Fall nicht eindeutig, ob der Selektionsdruck auf dem Core-Protein oder der Polymerase liegt. Erst weiterführende immunologische Experimente würden Aufschluss darüber geben.

Für die Detektion von multiplen Assoziationen in einer Position mittels *SeqFeatR* waren unterschiedliche Gründe verantwortlich. In 16 von 26 Positionen wurden multiple Assoziationen aufgrund von HLA-Klasse-I *Linkage Disequilibrium* detektiert. Da *SeqFeatR* solche HLA-Haplotypen nicht erkennt, wurden für Substitutionen in einer Position mehrere HLA-Allele assoziiert, obwohl wahrscheinlich auf diesen Positionen nur von einem HLA-Klasse-I-Allel Selektionsdruck ausgeübt wurde. Solche falsch-positiven Ergebnisse können durch Algorithmen verhindert werden, die HLA-Haplotypen berücksichtigen (Carlson et al., 2008) und werden aktuell in Kooperation mit Daniel Hoffmann von der Universität Duisburg-Essen in die Analyse integriert. Über die Berechnung der Odds-Ratio oder die Ermittlung von möglichen Bindungsmotiven für das relevante HLA-Klasse-I-Allel lässt sich in vielen Fällen weiter eingrenzen, welches HLA-Allel für den Selektionsdruck verantwortlich ist. Dieses kann anschließend mit einem immunologischen Nachweis validiert werden. In weiteren Positionen wurden multiple Assoziationen detektiert, obwohl diese HLA-Klasse-I-Allele nicht gemeinsam als Haplotyp vererbt werden. Als repräsentatives Beispiel ist hierbei die Position E113 des Core-Proteins zu nennen, da an dieser Position ein HLA-B*15:01, ein HLA-B*40:02 und ein HLA-B*49:01-assoziiertes HLA-*Footprint* nachgewiesen wurde. Dabei wurde je nach HLA-Allel eine andere Aminosäure selektiert. Durch die Substitution von Glutaminsäure nach Glutamin bei HLA-B*40:02- und HLA-B*15:01-positiven Patienten und durch die Substitution nach Threonin bei HLA-B*49:01-positiven Patienten wurde die elektrische Ladung von positiv nach polar in diesem Bereich des Epitops verändert. Hingegen führt die zweite beobachtete Substitution nach Asparaginsäure bei HLA-B*15:01- und HLA-B*49:01-positiven Patienten zu keiner Änderung der Ladung, da beide Aminosäuren positiv geladen sind. Innerhalb dieser Arbeit und in vorangegangenen Publikationen (Sidney et al., 2003; Kefalakes et al., 2015a) wurde gezeigt, dass alle drei Allele das Epitop Core₁₁₂₋₁₂₂ (RETVIEYLVSF) den CD8 T-Zellen präsentieren können und somit eine CD8 T-Zell-Antwort auslösen. Hervorzuheben ist, dass die Substitutionen an Position 2 des Epitops detektiert wurden, welche in der Regel als

Ankerposition für das Peptid fungiert (Klein and Sato, 2000; Sidney et al., 2008). Substitutionen in dieser Position stören die Bindungsaffinität des Peptids an das HLA-Klasse-I-Molekül, wodurch der Peptid/HLA-Molekül-Komplex instabil wird und somit nicht an der Zelloberfläche von Hepatozyten präsentiert wird. Somit kann keine CD8 T-Zellaktivierung stattfinden. Die statistischen Daten legen nahe, dass es sich bei diesen Mutationen um *Escape*-Mutationen handelt. Jedoch wurde bis jetzt nur gezeigt, dass die E113Q/D-Substitution eine *Escape*-Mutation ist, wenn sie über HLA-B*49 präsentiert wird (Kefalakes et al., 2015a). Ob die E113T/D- und die E113Q-Substitutionen *Escape*-Mutationen bei HLA-B*15:01- bzw. HLA-B*40:02-positiven Patienten sind, muss durch immunologische Methoden nachgewiesen werden. Das *Escape*-Mutationensmechanismen in Abhängigkeit von dem präsentierenden HLA-Klasse-I-Allel unterschiedlich sind, wurde schon bei dem HLA-A*02- und HLA-B*35-restringierten Core₁₈₋₂₇ Epitop für HBV (Walker et al.), sowie für HIV und HCV beschrieben (Carlson et al., 2012b; Xia et al., 2019).

Eine weitere Besonderheit, die über die *SeqFeatR*-Analyse und die Berechnung der Odds-Ratio ermittelt wurde, sind HBV-*Negatope*. Diese *Negatope* entstehen möglicherweise durch Selektion von *Escape*-Mutationen durch häufige HLA-Klasse-I-Allele, die auch in Abwesenheit von Selektionsdruck stabil sind und übertragen werden können, wodurch die Mutationen stark verbreitet werden und irgendwann sogar die Majorität aller zirkulierenden Isolate in der Population die Variante trägt (Moore et al., 2002; Leslie et al., 2005). Insgesamt wurden sechs *Negatope* identifiziert, wobei drei davon mit HLA-A*02:01 assoziiert waren. Dies ist nicht überraschend, da in Deutschland 28,9 % der Bevölkerung HLA-A*02:01-positiv sind (Schmidt et al., 2009) und in Studien zu HIV und HCV ebenfalls HLA-A*02-assozierte *Negatope* detektiert wurden (Moore et al., 2002; Timm et al., 2007). Die drei weiteren ermittelten *Negatope* waren mit HLA-A*11:01, HLA-A*24:02, und HLA-B*35:01 assoziiert, alles HLA-Klasse-I-Allele, die in der deutschen Population mit 5 bis 8% vertreten sind (Schmidt et al., 2009). Welchen Einfluss diese *Negatope* auf die HBV-spezifische CD8 T-Zellantwort haben, sollten in weiteren Experimenten adressiert werden. Allerdings deuten Studien zu HIV-Infektionen darauf hin, dass *Negatope* eine schlechte CD8 T-Zellantwort auslösen (Boutwell et al., 2013), wenn die bereits adaptierte Virussequenz auf einen Wirt mit dem relevanten HLA-Allel übertragen wird.

5.1.2 Die CD8⁺ T-Zell-Immundominanz beeinflusst den Selektionsdruck auf dem PräCore/Core-Protein

Anhand der vorliegenden statistischen *SeqFeatR*-Analyse stellt sich die Frage, warum das Core-Protein unter stärkerem Selektionsdruck steht als die anderen Proteine? Mehrere *ex vivo* Studien konnten zeigen, dass sowohl in der akuten als auch in der chronischen Infektion eine CD8⁺ T-Zell-Heterogenität gegenüber den unterschiedlichen Proteinen existiert. Während in der akuten Phase eine T-Zellantwort gegen das Core-Protein, das Hüllprotein und der

Polymerase detektiert wurde, wurde in der chronischen Phase nur eine Antwort gegen das Core-Protein und die Polymerase beobachtet. Dabei waren Core-spezifische CD8⁺ T-Zellen häufiger vorhanden als Polymerase-spezifische CD8⁺ T-Zellen (Hoogeveen et al., 2019; Schuch et al., 2019). Ebenfalls gibt es phänotypische und funktionelle Unterschiede zwischen den Protein-spezifischen T-Zellen. So ist die Expression von TOX (*thymocyte selection-associated high mobility group box protein*), Eomes (Eomesodermin) und KLRG1 (*killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1*) signifikant höher in Polymerase-spezifischen CD8⁺ T-Zellen als in Core-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (Schuch et al., 2019; Heim et al., 2020). Diese drei Marker werden mit einem *exhausted* Phänotyp assoziiert (Bengsch et al., 2010; Paley et al., 2012; Khan et al., 2019), der wahrscheinlich zum reduzierten evolutionären Selektionsdruck auf der Polymerase beiträgt. Interessanterweise wurde sowohl in der akuten als auch in der chronischen Phase auf Core-spezifischen CD8⁺ T-Zellen eine erhöhte Expression des Erschöpfungsmarkers PD-1 beobachtet (Hoogeveen et al., 2019; Schuch et al., 2019). Dieser Phänotyp ist wahrscheinlich von Vorteil, da erstens die Expression von PD-1 die T-Zellen vor Überstimulation und übermäßiger Proliferation schützt (Odorizzi et al., 2015) und zweitens eine erhöhte Expression mit Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen assoziiert wird (Sauce et al., 2007; Legat et al., 2013). Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass Core-spezifische CD8⁺ T-Zellen mehr IFN- γ und CD107a sekretieren als Polymerase-spezifische CD8⁺ T-Zellen, was mit einer signifikant besseren Expansionskapazität der Core-spezifischen T-Zellen einhergeht (Hoogeveen et al., 2019; Schuch et al., 2019). Dieser Phänotyp und die damit assoziierte bessere Funktionalität sind wahrscheinlich dafür verantwortlich, dass Core-spezifische T-Zellen mit einer Kontrolle der Infektion assoziiert werden und Polymerase- und Hüllprotein-spezifische T-Zellen nicht (Webster et al., 2004). Hervorzuheben ist, dass die Daten von Schuch et al. und Hoogeveen et al. auf Experimente mit PBMCs und nicht auf Leberexperimente aufbauen. Da HBV-spezifische T-Zellen in der Leber angereichert sind und sich phänotypisch von den HBV-spezifischen T-Zellen aus dem peripheren Blut unterscheiden (Fiscaro et al., 2010), könnten Studien in der Leber dazu beitragen die HBV-spezifische CD8⁺ T-Zell-Heterogenität besser zu verstehen und somit weitere Informationen liefern, warum auf dem Core-Protein ein höherer Selektionsdruck herrscht als auf den anderen Proteinen. Des Weiteren konzentrierten sich diese Studien auf Core- und Polymerase-spezifische CD8 T-Zellen, phänotypische und funktionelle Analysen zu Hüllprotein-spezifischen T-Zellen konnten aufgrund der niedrigen Häufigkeiten im peripheren Blut nicht durchgeführt werden und HBx-spezifische T-Zellen wurden nicht untersucht.

Eine weitere Erklärung für den unterschiedlichen Selektionsdruck könnten Unterschiede in der produzierten Antigenmenge sein, die die T-Zellantwort beeinflussen (Gehring et al., 2007). Während in einem Virion die Polymerase und das HBx-Protein nur einmalig vorliegen, sind in

dem Viruspartikel 90 bis 120 Core-Protein-Dimere enthalten (Crowther et al., 1994). Somit können auch viel mehr Core-Epitope den CD8 T-Zellen präsentiert werden als Polymerase- und HBx-Epitope, wodurch möglicherweise die Immundominanz dieses Proteins und ein stärkerer Selektionsdruck entstehen. Dieser Grund gilt jedoch auch für das Hüllprotein, welches als SVPs sogar bis zu 10.000-fach häufiger sezerniert werden als Virionen (Ganem and Prince, 2004). Trotzdem wurde auf dem Hüllprotein der niedrigste Selektionsdruck detektiert. Hierfür könnte die Besonderheit der überlappenden Leserahmen von Bedeutung sein, wodurch Polymorphismen in überlappenden Regionen eingeschränkt sind. Eine Substitution in einem Gen könnte in einem anderen Gen zu einer nicht-synonymen Substitution führen. Somit kann eine Substitution für ein Protein von Vorteil sein, z. B. um der CD8 T-Zellantwort zu entkommen, jedoch das andere Protein nachteilig verändern. Folglich haben überlappende Regionen weniger Substitutionen als nicht-überlappende Regionen (Mizokami et al., 1997). Die beiden detektierten HLA-*Footprints* im Hüllprotein sind synonyme Substitutionen in der RT-Domäne der Polymerase. Da diese Domäne essenziell für die Replikation von HBV ist, ist es für das Virus von Vorteil, dass diese HLA-*Footprints* keinen Einfluss auf den Polymerase-ORF haben, da sonst die Replikation gestört werden könnte. Somit wird deutlich, dass HBV in der Lage ist, eine Balance zu schaffen zwischen dem Selektieren von CD8 T-Zell *Escape*-Mutationen in einem Protein, welche jedoch keine Auswirkungen auf ein anderes Protein haben. Gegen die Hypothese, dass der unterschiedliche CD8 T-Zell-Selektionsdruck allein mit der Antigenmenge zusammenhängt, spricht die Beobachtung, dass obwohl mehr Core- als Polymerase-Proteine produziert werden, die Core-spezifischen CD8 T-Zellen eher einen Gedächtnis-ähnlichen Phänotyp aufweisen als Polymerase-spezifische CD8 T-Zellen (Schuch et al., 2019), was auf eine kontinuierliche Antigenstimulation der Polymerase-spezifischen T-Zellen im Vergleich zu Core-spezifischen hindeutet. Der Mechanismus, der für den unterschiedlichen Selektionsdruck auf den einzelnen Proteinen verantwortlich ist, ist somit weiterhin unklar.

5.1.3 HLA-*Footprints* ermöglichen die Identifizierung von neuen Core- und Polymerase-spezifischen CD8 T-Zell-Epitopen

Um das Ausmaß von CD8 T-Zell-assoziiertem Selektionsdruck weitgehend zu charakterisieren, müssen zunächst T-Zell-Epitope identifiziert werden. Eine der am häufigsten verwendeten Methoden dafür ist die *in vitro* Stimulation von PBMCs mit überlappenden Peptiden, entweder vom gesamten Genom oder einzelnen Peptiden (Lauer et al., 2002; Boni et al., 2007; Zhang et al., 2018; Kefalakes et al., 2019). Jedoch sind mit dieser Methode sehr hohe Kosten für die Synthese von Peptiden verbunden, z. B. müssen 315 Peptide synthetisiert werden, um das komplette HBV-Genom mit 15-mer langen, überlappenden Peptiden abzudecken (Boni et al., 2007). Des Weiteren muss beim Nachweis einer CD8 T-Zell-Antwort gegen ein 15-mer Peptid in der Folge eine Feinkartierung erfolgen, da HLA-Klasse-I-Epitope

in der Regel 8-14 Aminosäuren lang sind. Über die Identifizierung von HLA-*Footprints* mit anschließender *in silico* Epitop-Bindungsvorhersage lassen sich ebenfalls neue CD8 T-Zell-Epitope identifizieren (Kefalakes et al., 2015a; Karimzadeh et al., 2019). Vor allem der in dieser Studie verwendete Vorhersagealgorithmus von IEDB, der auf einer Konsensus-Methode basiert (Kim et al., 2012), eignet sich hervorragend zur Identifizierung von CD8 T-Zell-restringierten Epitopen (Moutaftsi et al., 2006). Bei der Verwendung des IEDB-Bindungsvorhersage-Tools muss jedoch beachtet werden, dass neue publizierte Daten zu HLA-Motiven oder T-Zell-Epitopen in die IEDB-Datenbank einfließen und die IEDB-Datenbank wöchentlich aktualisiert wird (Trolle et al., 2015). Somit können ermittelte IEDB-Ergebnisse je nach Zeitpunkt der Analyse variieren. Um eine detaillierte Bindungsvorhersage für jeden HLA-*Footprint* machen zu können, wurde ein zweites Epitop-Bindungsvorhersage-Tool von SYFPEITHI, welches auf publizierten MHC-Liganden und Peptid-Motiven basiert (Rammensee et al., 1999), verwendet. Mit diesen beiden Tools wurden in den 111 HLA-*Footprints* 57 potenziell immunogene Epitope mit einem IEDB-Ergebnis ≤ 1 und/oder einem SYFPEITHI-Ergebnis ≥ 20 identifiziert, wobei davon 27 Epitope schon durch experimentelle Assays funktionell als CD8 T-Zell-Epitope bestätigt waren. Von den restlichen 30 potenziell neuen CD8 T-Zell-Epitopen wurden sieben Epitope über einen immunologischen Nachweis mittels PBMCs von chronisch infizierten HBV-Patienten bestätigt. Dabei handelt es sich um fünf Core- und zwei Polymerase-spezifische CD8 T-Zell-Epitope. Die restlichen 23 bisher unbestätigten Epitope müssen weiter durch experimentelle Untersuchungen validiert werden. Die Validierung von Polymerase- und Hüllprotein-Epitopen wird durch eine geringere Häufigkeit von Polymerase- und Hüllprotein-spezifischen CD8 T-Zellen im Vergleich zu Core-spezifischen CD8 T-Zellen in der chronischen Infektion erschwert (Rehermann et al., 1995; Schuch et al., 2019). Da in der akuten Infektion die CD8 T-Zellantwort gegen alle Proteine gerichtet ist (Ferrari et al., 1991; Sette et al., 1994; Rehermann et al., 1995), eignen sich PBMCs von Patienten mit einer akuten HBV-Infektion besser zur Bestätigung der Immunogenität von Polymerase-, Hüllprotein- und HBx-Protein-Epitopen als PBMCs von Patienten mit einer chronischen Infektion. Auch PBMCs von spontan ausgeheilten Patienten können verwendet werden, allerdings muss beachtet werden, dass die Häufigkeit von HBV-spezifischen CD8 T-Zellen absinkt, bis sie nach 30 Jahren nicht mehr detektierbar ist (Kefalakes et al., 2015b). Darüber hinaus bedeutet eine gute *in silico* Bindungsvorhersage durch beide Tools nicht zwingend, dass die Immunogenität eines Epitops nachgewiesen werden kann (Schulte et al., 2011; Lubke et al., 2020), was auf mögliche Fehlprognosen dieser Tools hindeuten könnte. Die größte Limitation, um über HLA-assoziierten Selektionsdruck neue Epitope zu identifizieren, wird am Beispiel des Hüllproteins deutlich. Aufgrund des schwachen Selektionsdrucks wurden im Hüllprotein nur zwei HLA-Klasse-I-assoziierte Polymorphismen detektiert, wobei um die Position Y297 kein potenziell immunogenes Epitop

von beiden Epitop-Bindungsvorhersage-Tools identifiziert wurde und für die Position S356 schon ein HLA-A*02-restringiertes Epitop bestätigt ist (Sette et al., 1994). Somit wurden für das Hüllprotein keine neuen Epitope identifiziert. Schließlich muss beachtet werden, dass durch den Einsatz eines Virussequenz-basierten Ansatzes zur Identifizierung neuer Epitope nur solche gefunden werden können, bei denen es einen Hinweis auf die Selektion von *Escape*-Mutationen gibt. Das gilt nicht für alle Epitope, sodass ein Teil der Epitope nicht durch einen Virussequenz-basierten Ansatz gefunden werden kann. Diese lassen sich nur durch die Verwendung von überlappenden Peptiden identifizieren, sodass beide Ansätze sich gut ergänzen. Obwohl sieben neue HBV-Epitope identifiziert wurden, lag der Fokus dieser Dissertation nicht darauf, die gefundenen Substitutionen in diesen Epitopen funktionell auf *Escape*-Mechanismen zu analysieren. Dies ist jedoch perspektivisch notwendig, um den Einfluss der CD8 T-Zellantwort auf Populationsebene weiter charakterisieren zu können.

Zusammenfassend wurde über die *SeqFeatR*-Analyse ein CD8 T-Zell-Selektionsdruck vorwiegend auf dem PräCore/Core Protein detektiert, wobei auf dem Hüllprotein kaum Selektionsdruck zu beobachten war. Durch die überlappenden ORFs wurden in dem Core-Protein und der Polymerase jeweils HLA-*Footprints* detektiert, die aufgrund derselben Substitution auf Nukleotidebene entstanden sind. Des Weiteren waren Substitutionen in mehreren Positionen assoziiert mit einem Selektionsdruck von unterschiedlichen HLA-Klasse-I-Allelen. Außerdem wurden HBV-Negatope detektiert. Durch Verwendung von Bindungsvorhersage-Tools wurden neue potenzielle HLA-Klasse-I-Epitope identifiziert, die unter CD8 T-Zell-Selektionsdruck standen. Davon wurden sieben neue Epitope über einen immunologischen Nachweis bestätigt.

5.2 HBeAg-Serokonversion ist assoziiert mit einer Verminderung der viralen Replikation und einer Zunahme des CD8 T-Zell-Selektionsdrucks

5.2.1 CD8 T-Zell-assoziiertes Selektionsdruck korreliert negativ mit der HBV-Viruslast

Escape-Mutationen tragen nicht nur dazu bei, der CD8 T-Zellantwort zu entkommen, sondern sie können auch einen Einfluss auf virologische Parameter haben. Dies wurde schon in zahlreichen Studien, vor allem zu HIV und HCV, beobachtet (Martinez-Picado et al., 2006; Goepfert et al., 2008; Ruhl et al., 2012). Diese Studien befassten sich jedoch überwiegend mit den Auswirkungen von einzelnen Mutationen auf die virale Replikation. Hingegen wurde in dieser Studie eine globale Untersuchung über das komplette HBV-Genom durchgeführt. Der dabei detektierte HLA-Klasse-I-assoziierte Selektionsdruck hatte einen Einfluss auf die virale

Replikation. Es wurde eine negative Korrelation der Viruslast sowohl mit der Anzahl der Gesamtsubstitutionen als auch mit der Anzahl der Substitutionen in den Positionen unter Selektionsdruck beobachtet. Jedoch ist davon auszugehen, dass dieser Effekt überwiegend dem Selektionsdruck auf den 70 Positionen unter HLA-Selektionsdruck zuzuschreiben ist, da kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Viruslast und der Anzahl von Substitutionen in Positionen ohne Selektionsdruck ermittelt wurde. Dass die Anzahl von Substitutionen mit der HBV-Viruslast korreliert, wurde bis jetzt noch nicht gezeigt. In der Studie von Desmond und Kollegen wurde keine Korrelation zwischen dem *Adaptionsscore*, definiert als das Vorhandensein des relevanten HLA-Allels und dem Polymorphismus, und der Viruslast in Genotyp B- und C-infizierten Patienten detektiert (Desmond et al., 2012). Die Ergebnisse dieser beiden Studien lassen sich nur bedingt miteinander vergleichen, da erstens unterschiedliche Genotypen betrachtet wurden, zweitens die HLA-Klasse-I-Allel-Häufigkeit in Europa und Asien unterschiedlich ist und drittens verschiedene *Tools* zur Ermittlung von HLA-*Footprints* verwendet wurden. Jedoch steht die detektierte negative Korrelation im Einklang mit einer Studie zu HIV, bei der gezeigt werden konnte, dass je mehr HLA-Klasse-I-assoziierte Substitutionen im Gag-Protein ein Patient hat, desto niedriger ist die Viruslast (Goepfert et al., 2008). Dabei muss betont werden, dass die korrelative Betrachtung keine genaue Aussage dazu erlaubt, ob eine hohe Zahl von Substitutionen die Virusfitness beeinträchtigt oder ob viele Substitutionen Ausdruck einer besonders starken Immunantwort sind und die reduzierte Viruslast das Ergebnis der Immunkontrolle ist.

Nicht nur die Anzahl von Substitutionen in den 70 Positionen unter Selektionsdruck korreliert negativ mit der Viruslast, auch Substitutionen in einzelnen Positionen können mit einer erhöhten oder reduzierten Viruslast assoziiert sein. Insgesamt wurden 16 Positionen detektiert, die mit einer reduzierten Viruslast assoziiert waren. Als repräsentatives Beispiel wurde die Core T67K/N/S-Substitution ausgewählt. Diese Position liegt innerhalb eines HLA-A*02:01-restringierten Epitops (Core₆₄₋₇₂ ELMTLATWV) (Liu et al., 2012), jedoch wurde für dieses Epitop noch kein *Escape*-Mechanismus detektiert. Für diese einzelnen Substitutionen könnte man nun Replikationsexperimente durchführen, in denen der Einfluss auf die virale Fitness untersucht wird. Dass *Escape*-Mutationen mit einer reduzierten viralen Fitness einhergehen können und somit für die Kontrolle der viralen Replikation von Vorteil sind, wurde schon für andere Viren wie HCV, HIV oder Influenza beschrieben (Berkhoff et al., 2006; Martinez-Picado et al., 2006; Salloum et al., 2008; Ruhl et al., 2012).

Trotz der reduzierten Viruslast können jedoch auch *Escape*-Mutationen übertragen werden (Goulder et al., 2001; Allen et al., 2004). Im Falle von Fitnesskosten der Substitution ist davon auszugehen, dass diese unter negativem Selektionsdruck steht und bei Übertragung auf einen

nicht HLA-übereinstimmenden Empfänger würde die *Escape*-Mutation wieder zur Wildtyp-Sequenz revertieren (Leslie et al., 2004; Timm et al., 2004). Des Weiteren können Viren den Fitnessverlust durch kompensatorische Mechanismen entgegenwirken. Zum Beispiel werden zusätzliche Substitutionen einerseits in der Epitop-flankierenden Region (Brockman et al., 2007; Ruhl et al., 2012) andererseits direkt in CD8 T-Zell-Epitopen (Fitzmaurice et al., 2011) selektiert, die die virale Fitness wiederherstellen können. Für HBV wurden noch keine kompensatorischen Mechanismen beschrieben. Dies ist jedoch ein wichtiger Aspekt, der weiterer Untersuchungen bedarf. Dazu könnten zunächst die detektierten acht Substitutionen, die die virale Fitness fördern, betrachtet werden. *Escape*-Mutationen, die die virale Fitness fördern, könnten mit einem Verlust der Immunkontrolle einhergehen und somit das Fortschreiten der Krankheit beschleunigen (Goulder et al., 1997; Kelleher et al., 2001). Als ein Beispiel für HBV ist hierbei das HLA-A*02:01-restringierte Core₁₂₃₋₁₃₁- (GVWIRTPPA) Epitop zu nennen. Die Substitution P130T wird nicht nur mit einer signifikant erhöhten Viruslast in HLA-A*02:01-positiven Patienten assoziiert, sondern auch mit einer schweren Hepatitis und der Progression der Krankheit (Zhang et al., 2018). Außerdem wurde schon gezeigt, dass Substitutionen in anderen immundominanten Core CD8 T-Zell-Epitopen mit Fibrose und Leberzirrhose assoziiert sind (Mohamadkhani et al., 2009; Lyoo et al., 2011). Solche Assoziationsstudien waren in dieser Dissertation nicht möglich, da die Daten bezüglich des Krankheitsverlaufs nicht vorhanden waren. Eine weitere Limitation dieser Studie ist, dass bei allen Patienten die Sequenz der Infektionsquelle unbekannt ist. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige detektierte Substitutionen von Anfang an da waren und sich nicht aufgrund des Immundrucks entwickelt haben.

Interessanterweise wurden nicht bei allen Substitutionen, die einen Einfluss auf die virale Fitness hatten, auch ein HLA-*Footprint* ermittelt. Dies könnte darauf hindeuten, dass einige Substitutionen unabhängig vom CD8 T-Zell-Selektionsdruck entstanden sind. Das beste Beispiel dafür ist die Substitution Core T12S mit einer Signifikanz von $p=0.0003$. Obwohl diese Substitution innerhalb eines HLA-A*02:06-restringierten Epitops liegt, gibt es keinen Unterschied in der CD8 T-Zellantwort gegenüber der T12-Variante und der S12-Variante (Tan et al., 2014). Daher könnte eine mögliche Erklärung für diese Substitution die Adaption von HBV an den CD4 T-Zell-Selektionsdruck sein, welcher sowohl bei HIV (Erdmann et al., 2015) als auch bei HCV (Lucas et al., 2018) nachgewiesen wurde. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass Core T12 innerhalb eines immunogenen CD4 T-Zell-Epitops liegt, welches Kreuzreaktivität gegenüber mehreren HLA-Klasse-II-Allelen aufweist (Ferrari et al., 1991), wodurch es zum Selektionsdruck von mehreren Allelen kommen kann. Außerdem wurde schon für das immundominante CD4 T-Zell-Epitop Core₅₀₋₆₉ nachgewiesen, dass Substitutionen innerhalb des Epitops die CD4 T-Zellantwort inhibieren können (Torre et al., 2004). Ob diese Hypothese zutreffend ist, müsste sowohl über Assoziationsstudien zwischen

der HBV-Sequenz und dem HLA-Klasse-II-Allel des Wirts als auch über immunologische Nachweise zum Einfluss dieser Substitution auf die CD4 T-Zellantwort erbracht werden. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass auch NK-Zell-assoziiertes Selektionsdruck zur Selektion von Substitutionen führen kann (Alter et al., 2011). Somit könnten Substitutionen ohne Hinweis auf einen CD8 T-Zell-assoziierten Selektionsdruck durch die Adaption an den CD4 T-Zell- oder NK-Zell-assoziierten Selektionsdruck entstanden sein.

5.2.2 HBeAg-Status beeinflusst nicht nur die Viruslast, sondern auch den CD8 T-Zell-Selektionsdruck

Ein wichtiger Aspekt, der in dieser Arbeit analysiert wurde, war der Einfluss des HBeAg-Status einerseits auf die virale Fitness und andererseits auf den CD8 T-Zell-Selektionsdruck. Die Prävalenz von HBeAg-negativen Patienten mit einer Genotyp D-Infektion lag dabei bei 89,3 % und entspricht den aus der Literatur angegebenen Werten von 64-90 % für Europa (Knoll et al., 1999; Rizzetto et al., 2000; Brunetto et al., 2009; Moussa et al., 2016). Von den 309 HBeAg-negativen Patienten hatten 266 die W28*-Substitution, was einer Prävalenz von 86 % entspricht. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der Großteil der Patienten zum Zeitpunkt der Analyse in der HBeAg-negativen chronischen Hepatitis Phase waren. Die Analyse des Einflusses des HBeAg-Status auf die Viruslast bestätigte vorangegangene Studien, bei denen gezeigt worden ist, dass HBeAg-positive Patienten eine signifikant höhere Viruslast haben im Vergleich zu HBeAg-negativen Patienten (Grandjacques et al., 2000; Werle-Lapostolle et al., 2004). Allerdings wurde kein signifikanter Unterschied in der Viruslast zwischen W28/HBeAg- und W28*/HBeAg-negativen Patienten detektiert. Somit wird deutlich, dass nach der HBeAg-Serokonversion die Viruslast reduziert wird. Es macht jedoch keinen weiteren Unterschied, ob die Serokonversion durch anti-HBe oder die W28*-Substitution im PräCore-Protein erfolgt. Interessanterweise wurde bei der Betrachtung der PräCore W28-Position mittels NGS deutlich, dass am ehesten die Serokonversion von HBeAg zu anti-HBe in der Abfolge vor der Selektion der W28*-Substitution liegt, bis sie schließlich in der Quasispezies dominiert. Somit spielt die Serokonversion für die Virusevolution eine wichtige Rolle. Zur Charakterisierung der genauen Sequenz und Kinetik der Ereignisse werden longitudinale Daten von Patienten in der Phase der HBeAg-Serokonversion benötigt, die leider nicht einfach zu finden sind.

Ein Grund für die Reduktion der Viruslast nach der HBeAg-Serokonversion ist wahrscheinlich die Zunahme des CD8 T-Zell-assoziierten Selektionsdrucks, welcher schon in der Studie von Kefalakes et al. beobachtet wurde (Kefalakes et al., 2015a) und in dieser Dissertation bestätigt werden konnte. Anders als bei der vorangegangenen Studie wurde in der hiesigen Studie zusätzlich die HBeAg-negative Patienten in W28/HBeAg- und W28*/HBeAg-negative Patienten unterteilt. Dadurch wurde deutlich, dass W28*/HBeAg-negative Patienten eine signifikant erhöhte relative Häufigkeit von Substitutionen in Positionen unter CD8

T-Zell-assoziiertem Selektionsdruck haben, als W28/HBeAg-negativen Patienten. Daher liegt die Vermutung nahe, dass W28*/HBeAg-negative Patienten auch eine stärkere HBV-spezifische CD8 T-Zellantwort haben könnten als W28/HBeAg-negativen Patienten. Zur weiteren Charakterisierung der HBV-spezifischen CD8 T-Zellantwort sollte dieser Aspekt in zukünftigen Studien berücksichtigt werden. Da die Expression von HBeAg einerseits über die PräCore W28-Position und andererseits über Mutationen in der BCP-Region gesteuert wird, wäre es interessant zu untersuchen, welchen Einfluss Substitutionen im BCP auf den CD8 T-Zell-assoziierten Selektionsdruck haben. Vermutlich würde der Selektionsdruck dem von W28/HBeAg-negativen Patienten ähneln, weil die BCP-Substitutionen die Expression von HBeAg reduziert und nicht komplett verhindert. Aufgrund der hohen Häufigkeit von BCP-Substitutionen und gleichzeitiger niedriger Häufigkeit von W28*-Substitutionen (Kuhnhen et al., 2018) eignet sich Genotyp A gut für diese Untersuchung.

5.2.3 Das HBeAg modelliert die Immunantwort zur Erhaltung der Immuntoleranz

Basierend auf den Ergebnissen zum Einfluss des HBeAg auf die Viruslast und den CD8 T-Zell-Selektionsdruck in dieser Arbeit und anderen Publikationen scheint die Funktion des HBeAg die Immunmodulation zur Erhaltung der Immuntoleranz zu sein (Milich, 2019). Daher stellt sich die Frage, wie modelliert das HBeAg die CD8 T-Zellantwort? Einerseits nutzt das HBV das HBeAg zur Regulation des angeborenen Immunsystems, indem es z. B. die IL-18 vermittelte IFN- γ -Produktion von NK-Zellen inhibiert (Jegaskanda et al., 2014) und die Expression von TLR2 auf Hepatozyten, Kupferzellen und Monozyten reduziert, wodurch die TNF- α Expression durch CD4⁺ Th1-Zellen eingeschränkt wird (Sieling et al., 2003; Riordan et al., 2006; Visvanathan et al., 2007). Andererseits kann das Vorhandensein von HBeAg zu einem Ungleichgewicht der CD4⁺ Th1/Th2-Zellantwort führen, wobei die Antwort in Richtung der CD4 Th2-Zellantwort verschoben wird (Milich et al., 1998). Des Weiteren wird eine erhöhte Akkumulation von T_{reg}-Zellen bei HBeAg-positiven Patienten beobachtet (TrehanPati et al., 2011) und eine erhöhte Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 (Dimitropoulou et al., 2013). IL-10 wird nicht nur von T_{reg}-Zellen produziert, sondern auch unter anderem von CD4⁺Th2-Zellen, B-Zellen und Kupfer-Zellen (O'Garra et al., 1992; Xu et al., 2014). Das produzierte IL-10 inhibiert nicht nur die Synthese von Zytokinen durch CD4⁺Th1-Zellen (Fiorentino et al., 1989; Mosmann and Moore, 1991), sondern auch die HBV-spezifische CD8 T-Zellantwort (Li et al., 2015). Allerdings kann über eine Blockade von IL-10 die CD8 T-Zellantwort wiederhergestellt werden (Das et al., 2012). Die Inhibition der CD8 T-Zellantwort wird wahrscheinlich durch die IL-10 vermittelte Reduktion von HLA-Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche vermittelt (Yue et al., 1997). Immunhistologische Studien konnten zeigen, dass in der HBeAg-positiven Phase weniger HLA-Klasse-I-Moleküle, jedoch nicht HLA-Klasse-II-Moleküle, auf der Oberfläche von Hepatozyten exprimiert werden im Vergleich zu Hepatozyten

in der HBeAg-negativen Phase (Montano et al., 1982; Pignatelli et al., 1986; Chu et al., 1988). Interessanterweise korreliert die HBeAg-Serokonversion zu anti-HBe mit einer hohen Konzentration von IL-10 und IL-12 im Serum (Wu et al., 2010). Das hauptsächlich von APCs sezernierte pro-inflammatorische IL-12 wird als Marker für eine HBeAg-Serokonversion angesehen, da der Konzentrationspeak entweder vor oder gleichzeitig mit der Serokonversion einhergeht (Rossol et al., 1997). Das IL-12 kann viele Mechanismen induzieren, einerseits wird die Th2-Antwort in Richtung der Th1-Antwort verschoben (Milich et al., 1995; Trinchieri, 1995). Andererseits führt eine Behandlung mit IL-12 zu einer Reduktion der T_{reg}-Zellen (Zhao et al., 2012b) und erhöht die Produktion von IFN- γ durch HBV-spezifische CD8 T-Zellen (Schurich et al., 2013). Bemerkenswerterweise haben HBV-spezifische CD8 T-Zellen bei HBeAg-negativen und -positiven Patienten unterschiedliche Phänotypen. Untersuchungen von HBV_{core169}-spezifischen T-Zellen zeigten, dass CD8 T-Zellen bei HBeAg-positiven Patienten eher einen terminal differenzierten Effektor-Phänotyp (CD57⁺CD45RA⁺CCR7⁻) und bei HBeAg-negativen Patienten eher einen Gedächtnis-T-Zell-Phänotyp (CD27⁺CD127⁺CD45RO⁺) aufweisen (Cheng et al., 2019). Die Differenzierung der T-Zellen zu einem Gedächtnis-Phänotyp lässt sich wahrscheinlich mit der in dieser Arbeit beobachteten Reduktion der Viruslast und somit durch das Fehlen einer kontinuierlichen Antigenstimulation erklären. Anhand der inhibitorischen Mechanismen in der HBeAg-positiven Phase ist es nicht verwunderlich, dass bei HBeAg-positiven Patienten nur bedingt eine HBV-spezifische CD8 T-Zellantwort detektiert wird (Maini et al., 2000; Bengsch et al., 2014; Ferrando-Martinez et al., 2019), wodurch der fehlende CD8 T-Zell-Selektionsdruck zu erklären wäre.

Zusammenfassend bestätigen die Daten die immunmodulierende Funktion des HBeAg in der chronischen HBV-Infektion. Während die HBeAg-positive Phase durch eine Immuntoleranz gekennzeichnet ist, charakterisiert durch eine hohe virale Replikation und der Abwesenheit des CD8 T-Zell-assoziierten Selektionsdrucks, führt die HBeAg-Serokonversion zu einer Reduktion der viralen Replikation. Des Weiteren nimmt der CD8 T-Zell-assoziierte Selektionsdruck bei HBeAg-negativen Patienten zu, wobei der Selektionsdruck bei HBeAg-negativen Patienten mit einer W28*-Substitution am höchsten ist. Somit wird deutlich, dass, um der CD8 T-Zell-Antwort zu entkommen, HBV CD8 T-Zell *Escape*-Mutationen selektiert werden, jedoch diese Selektion wahrscheinlich mit dem Verlust der viralen Fitness einhergeht (Abbildung 5.1).

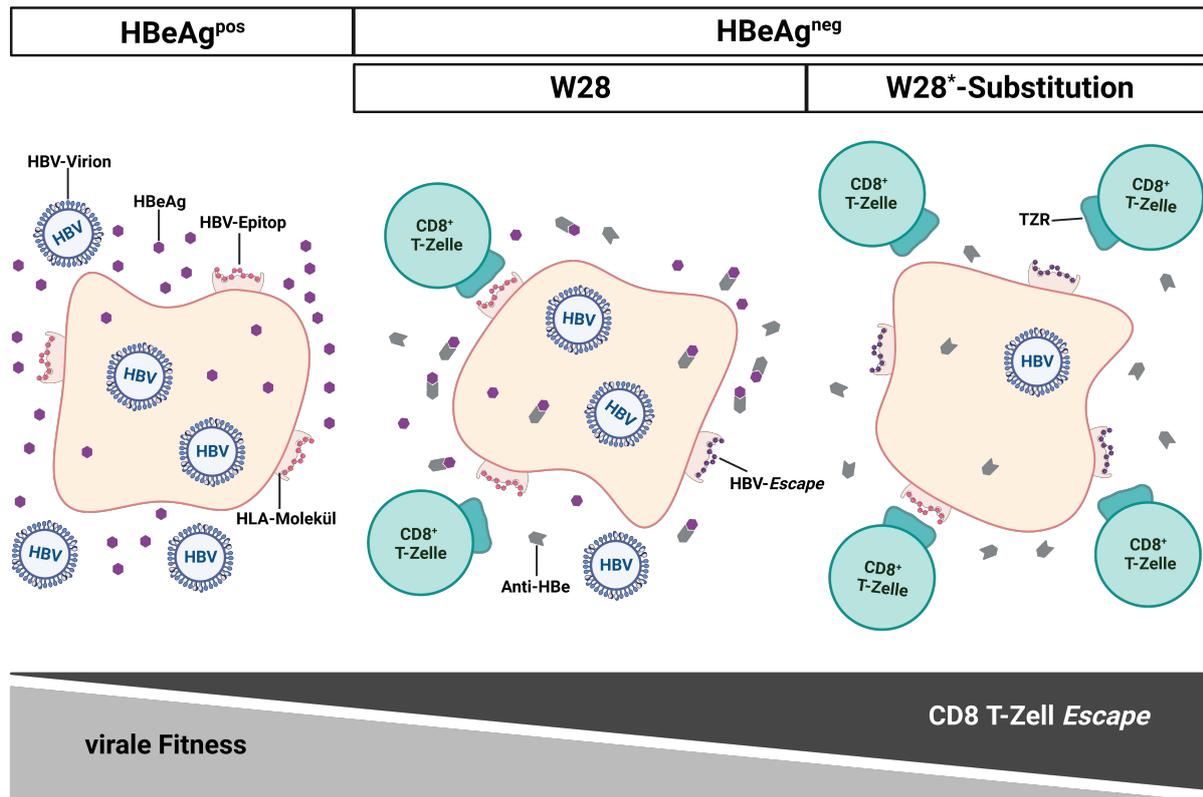


Abbildung 5.1: Grafische Zusammenfassung

Eine HBeAg-positive chronische HBV-Infektion ist mit einer hohen viralen Replikation und einem niedrigen CD8 T-Zell-Selektionsdruck assoziiert. Durch die HBeAg-Serokonversion wird die Viruslast sowohl bei W28/HBeAg-negativen Patienten als auch bei W28⁺/HBeAg-negativen Patienten reduziert. Dies geht mit der Zunahme des CD8 T-Zell-assoziierten Selektionsdrucks bei HBeAg-negativen Patienten einher, wobei W28⁺/HBeAg-negativen Patienten einen höheren Selektionsdruck haben als W28/HBeAg-negativen Patienten. Dies wiederum führt zur Selektion von CD8 T-Zell *Escape*-Mutationen, die mit einem viralen Fitnessverlust assoziiert sind.

5.3 Sind Deletionen ein weiterer *Escape*-Mechanismus?

Durch den reproduzierbaren CD8 T-Zell-Selektionsdruck werden Substitutionen innerhalb des HBV-Genoms selektiert, jedoch kann das Fehlen einer Korrekturaktivität der Polymerase ebenfalls zur Entstehung von Substitutionen beitragen. Durch das Vorhandensein von langen *in-frame* Deletionen wird allerdings deutlich, dass auch andere Mechanismen, wie Wechsel der DNA-Matrize bei der Reversen Transkription, Spleißen von pgRNA, Topoisomerase Spaltung oder Ligation der DNA (Burda et al., 2001; Francois et al., 2001), die Evolution von HBV beeinflussen können. Im Einklang mit vorangegangenen Studien wurden in dieser Dissertation über PCR-basierende Sequenzanalysen Deletionen im überlappenden ORF der Polymerase und des Hüllproteins detektiert. Darüber hinaus wurde durch Sequenzanalysen von klonierten HBV-Polymerase-Fragmenten von vier repräsentativen Patienten deutlich, dass auch bei Patienten, die in der autologen Sequenz keine Deletionen aufwiesen, innerhalb der Quasispezies Viren mit Deletionen vorhanden sind. Da bei den klonalen Experimenten jeweils nur 10 Klone der Quasispezies untersucht wurden, wurde eine NGS-Analyse bei 116 Isolaten

nachgeholt. Mit NGS wurden bei 18 Patienten Deletionen innerhalb der Quasispezies detektiert, was einer relativen Häufigkeit von 15,5 % entspricht. Durch die Detektion von Deletionen stellt sich die Frage, warum HBV Deletionen im Genom zulässt? Obwohl zahlreiche Studien gezeigt haben, dass in der PräS1- und PräS2-Domäne sowohl B-Zell- als auch T-Zell-Epitope vorkommen (Milich et al., 1990a; Ferrari et al., 1992; Maeng et al., 2000; Chen et al., 2006a), kann bis heute nur darüber spekuliert werden, ob Deletionen Evasionsmechanismen sind, um der B-Zell- und T-Zell-Immunantwort zu entkommen. In einer Studie zu WHV, welches eine Nukleotid-Homologie von 62-70 % zu HBV aufweist (Galibert et al., 1982) und Ähnlichkeiten in der Genomorganisation und der Replikationsstrategie hat (Menne and Cote, 2007), wurden Deletionen im Core-Protein nur in Murmeltieren detektiert, die eine starke PBMC-Proliferationsreaktion hatten (Taffon et al., 2015). Durch die Tatsache, dass bei HBeAg-negativen Patienten Deletionen in der PräS2-Domäne signifikant häufiger auftreten als bei HBeAg-positiven Patienten (Mun et al., 2008) und der CD8 T-Zell-Selektionsdruck mit der HBeAg-negativen Phase assoziiert ist, lässt sich die Hypothese aufstellen, dass der CD8 T-Zell-assozierte Selektionsdruck zur Entstehung von Deletionen im HBV-Genom beitragen könnte. Interessanterweise wurden in dieser Arbeit Deletionen mit HLA-A*24 und HLA-B*35 assoziiert, wobei die Assoziation noch signifikanter war bei HLA-A*24/B*35-positiven Patienten. HLA-B*35 wird vor allem mit einer schnellen Progression von einer HIV-Infektion zu AIDS (*acquired immune deficiency syndrome*) assoziiert (Carrington et al., 1999). Die Kontrolle einer HIV-1-Infektion durch YF9-spezifische CD8⁺ T-Zellen bei HLA-B*35:01-positiven Patienten wird allerdings durch eine HLA-A*24:02-assozierte *Escape*-Mutation im Nef-Protein negativ beeinträchtigt (Murakoshi et al., 2018). Daher wäre es von Interesse zu analysieren, ob HLA-A*24- bzw. B*35-assozierte Deletionen einen Einfluss auf die durch das jeweils andere HLA-Allel vermittelte CD8 T-Zellantwort haben.

Mittels der durchgeführten *SeqFeatR*-Analyse wurde deutlich, dass HLA-B*35-assozierte Deletionen eher in der PräS1-Domäne zu finden sind, während HLA-A*24-assozierte Deletionen in der PräS2-Domäne detektiert werden. Da Deletionen in der PräS1-Domäne mit Leberzirrhose assoziiert sind und Deletionen in der PräS2-Domäne mit HCC (Li et al., 2016), wäre es interessant zu untersuchen, ob HLA-B*35 bzw. HLA-A*24 die Progression der chronischen HBV-Infektion beeinflussen. Neben HLA-A*24 und HLA-B*35 wurden sechs weitere HLA-Klasse-I-Allele mit einer Deletion assoziiert. Jedoch stellt die geringe Anzahl an Patienten mit einer Deletion und dem relevanten HLA-Allel eine Limitation dieser Studie dar, wodurch falsch-positive Ergebnisse detektiert werden könnten. Vor allem in der PräS2-Domäne wurden überlappende HLA-Klasse-I-assozierte Deletionen beobachtet. Dies lässt darauf schließen, dass diese Region unter multiplem Selektionsdruck durch verschiedene HLA-Allele steht.

Durch die Identifizierung von HLA-B*35-restringierten Epitopen innerhalb der Region mit Deletionen wird die Arbeitshypothese untermauert. Allerdings muss beachtet werden, dass die CD8⁺ T-Zellantwort gegen die HLA-B*35-restringierten Epitope bei Patienten ohne Deletion detektiert wurde. Da mit NGS gezeigt wurde, dass die Häufigkeit der Viren mit einer Deletion innerhalb einer Quasispezies, bis auf einzelne Ausnahmen, bei unter 25 % liegt und somit nur die Minorität der Viren eine Deletion hat, ist davon auszugehen, dass Patienten mit einer Deletion im HBV-Genom trotzdem eine CD8⁺ T-Zellantwort gegen ein Epitop innerhalb der Deletion haben müssten. Zur Charakterisierung des Einflusses von Deletionen auf die CD8 T-Zellantwort sollte die HBV-spezifische T-Zellantwort bei diesen Patienten näher analysiert werden. Bemerkenswerterweise wurde mittels eines ICS eine CD8⁺ T-Zellantwort sowohl gegen zwei Hüllprotein-Epitope als auch gegen drei Polymerase-Epitope detektiert. Obwohl die Spacer-Domäne nicht essenziell für die Funktion der Polymerase ist (Radziwill et al., 1990), gibt es eine CD8 T-Zellantwort gegen diese Region. Auf Basis dieser Daten scheint es eine Assoziation zwischen dem CD8 T-Zell-Selektionsdruck und dem Vorhandensein von Deletionen zu geben.

6 Anhang

Tabelle 6.1: Patienten in der HBV-Kohorte

ID	Geschlecht	Alter	HLA-Allele	Viruslast [IU/ml]	Genotyp	HBsAg [IU/ml]	HBeAg Serologie	HBeAg Sequenz	ALT [U/L]	AST [U/L]	Therapie
BN-275	m	32	A*24:07 A*26:01 B*35:05 B*58:01 C*04:01 C*07:02	1,0E+08	B	n.v.	n.v.	neg	371	n.v.	nein
BN-302	m	37	A*11:01 A*26:01 B*08:01 B*35:01 C*04:01 C*07:02	2,7E+07	D	n.v.	n.v.	pos	63	54	nein
BN-327	m	48	A*01:01 A*68:01 B*08:01 B*52:01 C*07:02 C*12:02	553	D	n.v.	n.v.	neg	22	14	nein
BN-548	w	34	A*24:02 A*30:02 B*18:01 B*53:01 C*04:01 C*05:01	6,6E+06	D	n.v.	n.v.	neg	207	93	nein
BOS-14-145	m	52	A*02:07 A*24:02 B*46:01 B*51:01 C*01:02 C*14:02	191	C	n.v.	neg	pos	25	n.v.	nein
BOS-14-170	m	34	A*02:07 A*29:01 B*07:05 B*40:06 C*08:01 C*15:05	493	B	n.v.	neg	neg	46	n.v.	nein
BOS-15-071	m	38	A*02:01 B*07:02 B*15:16 C*07:02 C*14:02	121	A	n.v.	neg	pos	27	n.v.	nein
BOS-16-048	w	46	A*02:03 A*02:07 B*46:01 C*01:02	535	B	n.v.	neg	neg	29	n.v.	nein
BOS-16-052	w	33	A*02:01 A*03:01 B*07:02 B*27:02 C*02:02 C*07:02	434	D	n.v.	n.v.	neg	17	n.v.	nein
BOS-17-036	m	44	A*02:06 A*11:01 B*27:05 B*35:01 C*01:02 C*04:01	2440	C	n.v.	neg	neg	16	n.v.	nein
BOS-17-043	n.v.	n.v.	A*02:03 A*11:01 B*40:01 B*46:01 C*01:02 C*04:01	549	B	n.v.	n.v.	neg	n.v.	n.v.	nein

BOS-17-058	w	62	A*02:01 B*14:02 B*45:01 C*06:02 C*08:02	449	D	n.v.	neg	neg	11	n.v.	nein
DD13-10101	w	33	A*02:01 B*44:02 B*53:01 C*04:01 C*05:01	20989	D	14935	neg	neg	17	22	Tenofovir
DD13-10103	m	45	A*24:02 A*29:01/02 B*44:03 B*50:02 C*06:02 C*16:01	6,7E+06	D	5651	neg	neg	123	52	Tenofovir
DD13-12200	m	57	A*02:01 A*33:01/03 B*15:02 B*58:01 C*03:02 C*08:01	34741	B	759	neg	neg	n.v.	n.v.	k.A.
DD13-12421	m	43	A*68:01 B*51:01 C*14:02	38286	D	9100	neg	neg	31	28	Tenofovir
DD13-12826	m	39	A*24:02 A*68:01 B*50:01 B*51:01 C*06:02 C*14:02	3491	D	476	neg	neg	17	21	k.A.
DD13-13048	m	34	A*03:01 A*68:01 B*35:03 B*44:02 C*04:01 C*07:04	2219	A	4378	neg	pos	65	36	nein
DD13-13137	w	41	A*02:01 A*68:01 B*15:01 B*18:01 C*02:02 C*07:01	3911	D	5307	neg	neg	13	19	nein
DD13-13441	m	23	A*02:01 B*07:02 B*44:02 C*05:01 C*07:02	4424	A	17599	neg	pos	32	28	nein
DD13-14953	m	77	A*02:01 A*32:01 B*13:02 B*56:01 C*01:02 C*06:02	3082	A	3844	neg	pos	21	30	k.A.
DD13-15239	m	37	A*01:01 A*03:01 B*08:01 B*18:01 C*07:01 C*12:03	504807	D	7275	neg	pos	192	88	nein
DD13-16003	m	82	A*02:01 A*24:02 B*44:02/05 C*02:02 C*05:01	7,0E+06	A	825	pos	pos	180	169	Tenofovir
DD13-16424	m	31	A*02:01 A*11:01 B*15:01 B*27:05 C*02:02 C*03:03	3903	D	5379	neg	neg	56	158	Tenofovir
DD13-16719	m	34	A*24:02 A*26:01 B*51:01 B*55:02 C*01:02 C*14:02	283578	D	2565	neg	neg	103	54	nein
DD13-17812	m	45	A*01:01 A*02:01 B*14:01 B*44:02 C*05:01 C*08:02	1058	D	11031	neg	neg	27	22	nein
DD13-20363	m	34	A*24:02 A*26:01 B*14:02 B*27:05	20363	E	2532	neg	neg	18	27	k.A.

			C*02:02 C*08:02									
DD13-21036	w	29	A*02:01 A*68:01 B*40:01 B*49:01 C*03:04 C*07:01	1938	D	638	neg	neg	18	18	nein	
DD13-21834	w	40	A*24:02 C*03:03 C*04:01	1407	D	34826	neg	neg	14	20	nein	
DD13-23642	w	34	A*02:01 A*03:01 B*37:01 B*52:01 C*06:02 C*12:02	3187	D	1325	neg	neg	16	17	nein	
DD13-24451	w	20	A*01:01 A*03:01 B*18:01 B*40:06 C*12:03 C*15:02	7,0E+06	D	124925	pos	pos	28	28	Tenofovir	
DD13-24717	w	50	A*02:01 A*24:02 B*08:01 B*51:01 C*07:02 C*15:02	1843	E	14150	neg	neg	26	26	Telbivudin	
DD13-25129	w	37	A*01:01 A*66:01 B*40:04/06 B*52:01 C*12:02 C*15:02	6404	D	15251	neg	neg	31	29	k.A.	
DD13-25322	w	39	A*01:01 A*26:01 B*07:02 B*44:02 C*03:03 C*07:02	28734	D	28734	neg	neg	20	21	nein	
DD13-25522	m	69	A*02:01 A*11:01 B*18:01 B*35:01 C*04:01 C*07:01	1237	D	331	neg	neg	15	24	k.A.	
DD13-26215	m	32	A*11:01 A*68:01 B*35:03 B*56:01 C*01:02 C*04:01	1886	A	32995	neg	pos	42	30	nein	
DD13-26878	m	83	A*02:01 A*29:01/02 B*15:03 B*44:02 C*05:01 C*16:01	7,0E+06	D	15459	neg	neg	377	511	Tenofovir	
DD13-27165	w	51	A*03:02 A*69:01 B*18:01 B*55:01 C*01:02 C*12:03	5945	D	3431	neg	neg	15	16	k.A.	
DD13-28144	w	41	A*03:01 B*35:01 C*04:01	20746	D	707	neg	neg	19	22	k.A.	
DD13-28148	w	58	A*01:01 B*07:02 B*13:02 C*06:02 C*07:02	1350	D	621	neg	neg	16	28	nein	
DD13-29024	w	27	A*03:01 A*31:01 B*07:02 B*15:18 C*07:01 C*07:04	7,0E+06	D	61895	pos	pos	16	22	Tenofovir	
DD13-29689	m	24	A*02:01 A*24:02 B*35:03 B*51:01 C*04:01 C*16:02	273601	D	18775	neg	pos	41	23	k.A.	
DD13-32252	w	45	A*24:02	1310	C	2224	neg	neg	16	20	nein	

			B*40:01 B*58:01 C*03:02 C*15:02								
DD13-33954	w	63	A*01:01 A*11:01 B*35:03 B*40:06 C*12:03 C*15:02	1743	D	465	neg	neg	17	29	k.A.
DD13-34446	m	41	A*02:01 A*24:02 B*15:01 B*44:02 C*03:03 C*16:04	1342	D	3232	neg	neg	21	22	nein
DD13-34592	m	48	A*32:01 A*33:01/03 B*51:01 C*12:03 C*15:02	2230	D	n.v.	neg	neg	49	52	Tenofovir
DD13-35864	w	21	A*24:02 A*30:01 B*13:02 B*51:01 C*06:02 C*15:02	5314	A	6280	neg	pos	14	17	nein
DD13-36947	w	25	A*02:06/10 B*39:01 B*40:01 C*03:04 C*07:02	7,0E+06	C	20996	pos	pos	52	40	Tenofovir
DD13-37431	m	35	A*01:01 A*02:01 B*41:01 B*50:01 C*06:02 C*17:01	1613	D	10156	neg	neg	52	34	nein
DD13-38079	m	59	A*01:01 A*33:01/03 B*14:02 B*51:01 C*08:02 C*12:03	1480	A	11828	neg	pos	38	28	Entecavir
DD13-38659	w	37	A*01:01 A*30:04 B*38:01 B*45:01 C*12:03 C*16:01	5585	D	957	neg	neg	16	20	nein
DD13-40532	m	33	A*01:01 A*33:01/03 B*08:01 B*14:02 C*07:01 C*08:02	3620	A	31425	neg	pos	n.v.	n.v.	k.A.
DD13-41067	m	33	A*01:01 A*26:01 B*07:02 C*07:02	24543	D	2532	neg	pos	41	33	nein
DD13-43550	m	46	A*02:04 A*03:01 B*15:01 B*51:01 C*03:03 C*15:02	19399	D	1313	neg	neg	28	25	nein
DD13-43603	m	42	A*23:01 A*24:02 B*51:01 C*15:02	2770	D	4039	neg	neg	9	23	nein
DD13-43652	m	47	A*02:01 A*26:01 B*07:02 B*44:02 C*07:04 C*12:03	1828	D	91	neg	neg	38	39	nein
DD13-46666	w	54	A*02:01 A*31:01 B*27:05 B*57:01 C*02:02 C*06:02	337411	A	6070	neg	neg	14	15	k.A.
DD13-46752	w	35	A*01:01 A*02:01 B*08:01 B*39:01	5442	A	22966	neg	pos	17	20	nein

			C*07:01 C*07:02									
DD13-46814	w	38	A*02:01 A*24:03 B*13:02 B*18:01 C*06:02 C*07:01	25011	D	5496	neg	neg	11	15	nein	
DD13-47195	m	47	A*24:02 A*68:01 B*35:03 B*51:07 C*12:03 C*14:02	2090	D	718	neg	neg	36	28	nein	
DD13-47248	m	67	A*02:01 A*23:01 B*18:01 B*44:03 C*04:01 C*07:01	7,0E+06	D	2	n.v.	neg	21	31	Tenofovir	
DD13-47252	m	36	A*11:01 A*29:01/02 B*07:02 B*55:02 C*07:02 C*15:05	10371	B	1188	neg	pos	51	36	Tenofovir	
DD13-48928	m	19	A*26:01 A*34:02 B*18:01 B*78:01 C*02:02 C*16:01	1,1E+06	A	1002	neg	pos	375	200	Tenofovir	
DD13-51718	m	30	B*08:01 B*18:01 C*07:02 C*12:03	163488	C	5388	neg	neg	61	38	nein	
DD13-51965	m	43	A*03:02 A*33:01/03 B*14:02 B*51:01 C*08:02 C*14:02	3588	D	3730	neg	neg	23	22	nein	
DD13-52273	m	35	A*01:01 B*41:01 B*51:01 C*15:04 C*17:01	6,7E+06	D	9950	neg	neg	171	107	Tenofovir	
DD13-52274	w	38	A*11:01 A*30:01 B*15:01 B*46:01 C*01:02	759363	C	3739	neg	neg	96	61	Tenofovir	
DD14-00489	w	25	A*02:01 A*31:01 B*07:02 B*39:01 C*07:02 C*12:03	2103	A	27124	neg	pos	22	33	nein	
DD14-00715	w	34	A*01:01 A*11:01 B*08:01 B*18:01 C*07:01 C*12:03	2008	D	258	neg	pos	14	21	nein	
DD14-02011	m	46	A*11:01 A*31:01 B*15:08 B*35:01 C*01:02 C*04:01	1792	D	18547	neg	neg	34	26	nein	
DD14-02388	m	53	A*02:06 A*30:01 B*50:01 B*51:01 C*06:02 C*15:02	7,0E+06	D	11369	neg	neg	203	132	Tenofovir	
DD14-03366	w	60	A*24:02 A*31:01 B*27:05 B*50:01 C*02:02 C*06:02	1613	A	15772	n.v.	pos	6	14	nein	
DD14-03799	m	39	A*02:01 A*29:01/02 B*44:03 B*51:01	1,3E+06	D	19302	neg	neg	45	41	k.A.	

			C*07:02 B*16:01									
DD14-04431	m	28	A*03:02 A*33:01/03 B*14:02 B*44:03 C*04:01 C*08:02	1263	D	212	neg	neg	39	26	k.A.	
DD14-04520	m	48	A*03:01 B*15:17 B*51:01 C*07:01 C*15:02	276317	D	9727	neg	neg	60	40	Tenofovir	
DD14-05669	m	42	A*02:01 A*23:01 B*39:01 B*49:01 C*07:01 C*12:03	1829	D	6669	neg	neg	18	18	nein	
DD14-06133	m	18	A*03:01 A*68:01 B*44:03 B*57:01 C*04:01 C*06:02	7,0E+06	D	124925	pos	pos	54	31	k.A.	
DD14-07213	w	33	A*02:01 A*29:01/02 B*07:02 B*57:01 C*06:02 C*15:02	13863	A	29523	neg	pos	28	25	nein	
DD14-07738	m	65	A*23:01 A*26:01 B*38:01 B*44:03 C*04:01 C*12:03	1,0E+06	D	2849	pos	pos	49	37	Tenofovir	
DD14-08465	m	43	A*33:01/03 A*36:01 B*14:02 B*53:01 C*04:01 C*08:02	20745	A	32323	neg	pos	64	40	Tenofovir	
DD14-08861	w	48	A*02:01 A*30:01 B*38:01 B*56:01 C*01:02 C*12:03	3712	D	301	neg	neg	30	25	Tenofovir	
DD14-08901	w	35	A*30:02 A*66:01 B*58:01 B*58:02 C*06:02 C*07:01	7157	A	6294	neg	pos	27	36	k.A.	
DD14-09037	m	49	A*02:01 B*07:02 B*35:01 C*03:03 C*15:02	17544	D	1666	neg	neg	30	25	nein	
DD14-10459	w	52	A*30:01 A*68:01 B*38:01 B*55:01 C*01:02 C*12:03	38402	D	2618	neg	neg	31	31	k.A.	
DD14-10631	m	43	A*02:01 A*11:01 B*15:01 B*58:01 C*03:02 C*04:01	16659	B	51	neg	neg	38	28	nein	
DD14-12508	w	19	A*01:01 B*40:04/06 B*40:06 C*15:02	4417	D	19652	neg	neg	21	18	nein	
DD14-17735	m	18	A*02:01 A*03:01 B*13:02 B*35:01 C*04:01 C*06:02	7,0E+06	D	75546	pos	pos	206	88	nein	
DD14-19862	m	31	A*02:02 A*03:01 B*41:01 B*58:01	1326	A	11029	neg	pos	44	25	nein	

			C*07:01 C*17:01									
DD14-21563	m	60	A*02:01 A*32:01 B*40:02 B*51:01 C*02:02 C*15:02	141	A	1255	neg	neg	23	19	Lamivudin	
DD14-22150	w	36	A*03:01 A*68:01 B*27:05 B*44:02 C*01:02 C*05:01	2054	D	3823	n.v.	pos	23	22	nein	
DD14-23700	w	61	A*02:06 A*33:01/03 B*15:07 B*58:01 C*03:02 C*03:03	2356	C	2951	neg	neg	31	29	nein	
DD14-24415	m	24	A*02 A*26:01 B*08:01 B*51:08 C*07:02 C*16:02	461	D	10891	neg	neg	51	32	nein	
DD14-24926	m	48	A*01:01 A*32:01 B*52:01 B*55:01 C*01:02 C*12:02	1677	D	2068	neg	neg	34	26	k.A.	
DD14-25309	w	32	A*24:02 B*27:07 B*35:02 C*04:01 C*15:02	1227	D	3218	neg	pos	19	18	nein	
DD14-26000	w	51	A*24:02 A*29:01/02 B*08:01 B*51:01 C*07:02 C*15:05	3424	D	3896	neg	pos	24	17	k.A.	
DD14-27059	w	59	A*24:02 B*51:01 B*52:01 C*12:02 C*15:02	53188	B	1109	neg	neg	47	44	k.A.	
DD14-27595	m	38	A*02:01 A*23:01 B*41:01 B*50:01 C*06:02 C*07:01	275	D	4648	neg	neg	29	24	nein	
DD14-28904	m	23	A*02:01 A*31:01 B*18:01 B*40:02 C*01:02 C*07:01	2,5E+06	A	44926	pos	pos	15	18	k.A.	
DD14-29210	m	46	A*11:01 A*24:03 B*07:02 B*35:02 C*04:01 C*07:02	5,5E+06	D	19059	neg	neg	35	29	nein	
DD14-29795	w	55	A*02:01 A*24:02 B*37:01 B*41:02 C*06:02 C*17:01	367	A	26732	neg	pos	17	18	k.A.	
DD14-29856	m	33	A*29:01/02 A*30:01 B*42:01 B*81:01 C*17:01 C*18:01	4605	A	236	neg	pos	33	40	k.A.	
DD14-30386	m	43	A*23:01 A*68:01 B*40:06 B*49:01 C*07:01 C*15:02	7654	D	10060	neg	neg	43	25	Tenofovir	
DD14-31726	w	56	A*02:01 A*03:01 B*15:01 B*35:03	557	A	3230	neg	pos	27	32	nein	

			C*03:04 C*04:01									
DD14-33234	m	25	A*26:01 B*08:01 B*35:03 C*04:01 C*07:02	1705	D	8597	neg	neg	64	36	nein	
DD14-33480	w	53	A*02:01 A*23:01 B*18:01 B*44:03 C*04:01 C*05:01	1464	A	12368	neg	pos	27	25	nein	
DD14-34338	w	42	A*02:01 A*03:01 B*15:01 B*44:02 C*03:04 C*05:01	2651	A	32248	neg	pos	21	22	k.A.	
DD14-37327	m	56	A*02:05 A*11:01 B*35:01 B*50:01 C*04:01 C*06:02	839	D	233	neg	pos	27	23	nein	
DD14-38611	m	27	A*32:01 A*68:01 B*15:18 B*38:01 C*07:04 C*12:03	7,0E+06	D	124925	pos	pos	196	98	Tenofovir	
DD14-38975	w	52	A*24:02 A*33:01/03 B*53:01 C*04:01	6406	E	623	neg	neg	23	27	nein	
DD14-39454	w	30	A*29:01/02 A*34:02 B*53:01 C*04:01	1804	D	1411	neg	neg	21	15	nein	
DD14-39459	w	64	A*03:01 A*29:01:02 B*07:02 B*44:03 C*07:02 C*16:01	210	A	2234	neg	neg	26	23	k.A.	
DD14-42523	m	42	A*01:01 A*02:01 B*08:01 B*38:01 C*07:01 C*12:03	774	A	2645	neg	pos	33	27	k.A.	
DD14-43944	w	49	A*03:01 A*66:01 B*35:01 B*41:02 C*04:01 C*17:01	14115	D	2002	neg	neg	24	25	nein	
DD14-44291	m	38	A*02:01 B*18:01 B*51:01 C*07:01 C*14:02	73	D	8937	neg	pos	n.v.	n.v.	nein	
DD14-44698	w	39	A*02:01 A*03:01 B*35:01 B*44:02 C*04:01 C*05:01	2249	D	3003	neg	neg	21	29	nein	
DD14-46427	m	56	A*02:01 B*15:01 B*40:02 C*03:04	162	D	400	neg	neg	43	29	nein	
DD14-47336	w	51	A*01:01 A*24:02 B*08:01 B*49:01 C*07:01 C*07:02	10350	D	841	neg	neg	22	19	k.A.	
DD14-47337	m	38	A*03:01 A*24:02 B*15:01 B*35:01 C*04:01 C*07:01	188	D	46546	pos	pos	43	46	Tenofovir	
DD14-47685	m	38	A*02:01 A*32:01 B*35:03	57994	D	2939	neg	neg	33	22	k.A.	

			B*44:03 C*04:01 C*07:04								
DD14-48008	w	30	A*24:02 A*26:01 B*13:01 B*55:01 C*03:03 C*06:02	142677	A	31666	n.v.	pos	24	20	k.A.
DD14-48299	m	46	A*24:02 B*35:03 C*012:03	7,0E+06	D	10209	neg	neg	474	191	Tenofovir
DD16-26548	m	26	A*02:01 A*69:01 B*35:02 B*49:01 C*04:01 C*07:01	154465	D	11704	neg	neg	63	32	nein
DD16-46019	m	24	A*24:02 A*30:01 B*35:01 B*35:03 C*04:01 C*07:02	904	D	n.v.	neg	neg	83	40	Entecavir
DD16-53956	w	54	A*02:01 A*24:05 B*35:03 B*40:02 C*02:02 C*04:01	1587	D	666	neg	neg	34	42	nein
DD16-54204	m	45	A*23:01 A*26:01 B*08:01 B*49:01 C*07:01 C*07:02	472	D	461	neg	neg	83	39	Tenofovir
DD17-12626	w	53	A*03:01 A*26:01 B*39:01 B*44:03 C*07:01 C*12:03	176	D	106	neg	pos	n.v.	n.v.	k.A.
DD17-12885	w	45	A*01:01 A*02:01 B*08:01 B*40:01 C*03:04 C*07:01	704	A	3372	neg	neg	n.v.	n.v.	k.A.
DD17-13796	w	42	A*01:01 A*25:01 B*44:03 C*04:01 C*16:01	16451	D	1499	neg	neg	n.v.	n.v.	k.A.
DD17-16189	w	29	A*02:01 A*24:02 B*40:01 B*48:01 C*07:02 C*08:01	3465	B	4293	pos	pos	n.v.	n.v.	k.A.
DD17-19935	m	31	A*11:01 A*23:01 B*44:03 B*55:01 C*01:02 C*04:01	639	A	n.v.	neg	pos	26	21	nein
DD17-23917	w	22	A*24:02 A*26:01 B*35:03 B*41:02 C*04:01 C*17:03	4770	D	5519	neg	neg	34	29	nein
DD17-25191	w	35	A*24:02 A*30:01 B*13:02 B*48:01 C*06:02 C*08:01	53273	D	n.v.	neg	neg	29	27	nein
DD17-26080	w	49	A*01:01 A*03:01 B*08:01 B*35:03 C*04:01 C*07:01	6500	D	208	neg	neg	22	20	nein
DD17-27255	w	50	A*02:01 A*03:01 B*07:02 C*07:02	3215	D	4947	neg	neg	26	24	nein

DD17-27256	m	61	A*24:02 A*68:02 B*27:05 B*44:05 C*02:02	15310	D	34	neg	neg	209	96	nein
DD17-27471	m	54	A*34:02 A*32:01 B*07:05 B*52:01 C*07:02 C*12:02	526	D	414	neg	neg	68	154	k.A.
DD17-28285	w	40	A*01:01 A*31:01 B*35:02 B*40:01 C*03:04 C*06:02	160	A	27350	neg	pos	28	25	nein
DD17-28325	W	51	A*03:01 A*24:02 B*08:01 B*50:01 C*02:02 C*07:02	173	A	298	neg	neg	28	24	nein
DD17-31542	m	43	A*34:02 B*14:02 B*51:01 C*08:02 C*16:01	902	E	1868	neg	pos	20	28	nein
DD17-31944	m	47	A*03:01 A*31:01 B*07:02 B*48:01 C*07:02 C*08:01	102	D	33	neg	neg	35	23	nein
DD17-32015	w	44	A*23:01 A*30:02 B*08:01 B*53:01 C*06:02 C*07:02	6303	E	36258	neg	neg	85	49	nein
HBV-D-03	w	20	A*02:01 A*24:02 B*51:01 B*52:01 C*12:02 C*16:02	93	D	n.v.	neg	neg	14	17	nein
HBV-D-04	w	41	A*25:01 A*68:01 B*18:01 B*44:02 C*07:04 C*12:03	317	A	5503	neg	pos	14	19	k.A.
HBV-D-05	m	58	A*02:05 A*11:01 B*35:01 B*50:01 C*04:01 C*06:02	459	D	187	neg	pos	35	27	nein
HBV-D-08	m	45	A*02:01 B*39:06 B*51:01 C*07:02 C*15:02	474	A	20365	neg	neg	40	44	nein
HBV-D-11	w	40	A*01:01 B*08:01 C*07:01	2190	A	n.v.	neg	pos	32	25	k.A.
HBV-D-15	w	40	A*03:01 A*29:01/02 B*39:01 B*44:03 C*12:03 C*16:01	20	A	5771	neg	pos	25	23	k.A.
HBV-D-16	m	51	A*68:02 B*53:01 C*04:01	39	D	402	neg	neg	20	19	nein
HBV-D-18	w	35	A*02:01 A*24:02 B*27:05 B*44:02 C*02:02 C*07:04	1918	D	3114	neg	neg	18	23	k.A.
HBV-D-20	w	54	A*03:01 B*07:02 B*44:02 C*05:01 C*07:02	4421	A	26846	neg	pos	20	32	k.A.

FR-HBV-001	m	68	A*02 A*03 B*37 B*38	6,9E+06	A	6703	neg	pos	98	143	nein
FR-HBV-002	w	41	A*01:01 A*25:01 B*08:01 B*18:01 C*07:01 C*12:03	505	D	n.v.	neg	neg	19	21	nein
FR-HBV-007	w	38	A*02:05 A*24:02 B*49:01 B*50:01 C*06:02 C*07:01	3,1E+06	D	6597	neg	neg	294	162	nein
FR-HBV-013	m	61	A*02:01 B*08:01 B*51:01 C*07:02 C*16:02	400	D	7072	neg	neg	52	52	Lamivudin
FR-HBV-015	w	25	A*02:01 B*07:02 B*35:01 C*04:01 C*07:02	1274	D	6506,61	neg	neg	53	47	nein
FR-HBV-016	m	27	A*02:01 A*24:02 B*39:01 B*51:01 C*12:03 C*15:02	498	D	6050	neg	pos	70	39	nein
FR-HBV-017	w	47	A*01:01 A*02:01 B*13:02 B*35:01 C*04:01 C*06:02	490	A	4822	neg	pos	16	21	nein
FR-HBV-020	w	49	A*02:07 A*11:02 B*13:01 C*03:04	460000	B	1443	neg	neg	56	50	nein
FR-HBV-022	w	33	A*01:01 B*14:02 B*35:01 C*04:01 C*08:02	2,5E+07	D	6496	neg	pos	220	201	nein
FR-HBV-023	w	32	A*03:01 A*11:01 B*18:05 B*35:01 C*04:01 C*12:03	135	D	846	neg	neg	82	33	nein
FR-HBV-024	w	42	A*24:02 A*33:03 B*40:01 B*52:01 C*03:04 C*12:02	4135	C	6212	neg	neg	22	24	nein
FR-HBV-027	m	26	A*11:01 A*66:01 B*35:01 B*41:02 C*04:01 C*17:03	1257	D	2793	neg	neg	36	32	nein
FR-HBV-028	m	45	A*01:01 A*26:01 B*08:01 B*35:01 C*04:01 C*07:01	284	A	3447	neg	pos	52	38	nein
FR-HBV-030	w	19	A*30:02 A*33:03 B*15:10 B*35:01 C*03:04 C*04:01	1257	E	3352	neg	neg	55	42	k.A.
FR-HBV-031	m	47	A*02:05 A*25:01 B*08:01 B*50:01	2539	A	7398	neg	pos	52	36	nein
FR-HBV-032	m	49	A*29:01 A*68:01 B*07:05 B*51:01	1290	D	6498	neg	neg	29	29	nein
FR-HBV-033	w	51	A*01:01 A*02:01 B*40:02 B*57:01	761	D	6829	neg	neg	35	31	nein

			C*02:02 C*06:02									
FR-HBV-035	m	26	A*33:03 A*68:02 B*42:01 B*53:01	2308	E	4964	neg	neg	37	40	nein	
FR-HBV-037	m	53	A*02:01 A*66:01 B*07:02 B*41:02 C*07:02 C*17:01	961	A	6288	neg	pos	29	28	nein	
FR-HBV-039	m	58	A*01:01 A*02:01 B*08:01 B*52:01	566	A	6069	neg	pos	28	27	nein	
FR-HBV-040	m	59	A*01:01 A*24:02 B*08:01 C*07:01	515	A	6683	neg	pos	25	34	nein	
FR-HBV-041	m	51	A*30:01 A*36:01 B*35:01 C*04:01 C*07:18	724	E	5068	neg	neg	32	54	nein	
FR-HBV-042	m	38	A*02:01 A*02:35 B*07:02 B*44:27 C*07:02 C*07:04	845	A	7092	neg	neg	50	60	nein	
FR-HBV-047	m	45	A*01:01 A*24:02 B*13:02 B*57:01 C*06:02 C*07:01	339	D	4922	neg	pos	24	28	nein	
FR-HBV-052	w	22	A*11:01 A*40:02 B*46:01 C*01:02 C*04:01	130	B	5178	neg	neg	40	33	nein	
FR-HBV-054	m	37	A*02:01 A*30:01 B*13:02 B*39:01 C*06:02 C*12:03	2,2E+08	A	2700	pos	pos	79	n.v.	nein	
FR-HBV-059	m	52	A*26:01 A*68:01 B*13:01 B*15:18	105786	B	2864	neg	neg	44	44	nein	
FR-HBV-065	m	46	A*02:01 A*03:01 B*18:01 B*49:01	2,0E+06	D	5615	neg	pos	98	61	nein	
FR-HBV-075	m	56	A*02:01 B*44:03 B*57:01 C*04:01 C*06:02	11236	A	6557	neg	pos	31	36	nein	
FR-HBV-081	m	46	A*02:01 A*11:01 B*18:03 B*40:01 C*03:04 C*07:01	938	A	4327	n.v.	pos	56	35	nein	
FR-HBV-091	m	54	A*24:02 A*29:02 B*27:05 B*44:03	1139	A	7316	neg	pos	73	43	nein	
FR-HBV-092	w	35	A*24:02 A*31:01 B*35:03 B*39:01 C*04:01 C*12:03	460	A	56645	neg	pos	32	n.v.	k.A.	
FR-HBV-094	w	57	A*01:01 A*33:01 B*08:01 B*14:02 C*07:01 C*08:02	1,0E+06	A	6327	neg	pos	64	71	nein	
FR-HBV-096	m	33	A*02:02 A*23:01 B*45:01 B*58:01	2207	E	5110	neg	neg	63	40	nein	

			C*06:02 C*07:01								
FR-HBV-097	m	61	A*24:02 A*29:02 B*35:01 B*44:03	300	A	6856	neg	pos	43	48	nein
FR-HBV-100	m	24	A*34:02 A*68:01 B*35:01 B*41:03	1680	E	5450	neg	neg	26	35	nein
FR-HBV-101	m	58	A*02:01 A*66:01 B*27:02 B*41:02	135519	D	3088	neg	neg	151	n.v.	nein
FR-HBV-102	m	53	A*01:01 A*02:01 B*08:01 B*27:05	1,0E+06	D	n.v.	neg	pos	50	42	Tenofovir
FR-HBV-103	m	19	A*30 A*28 B*12 B*27	20	D	n.v.	neg	pos	21	6	nein
FR-HBV-104	m	37	A*03:01 B*27:02 B*41:01	1361	D	n.v.	neg	neg	70	38	Roferon-A
FR-HBV-105	m	28	A*03:01 A*68:02 B*27:02 B*38:01	54475	D	n.v.	neg	pos	96	41	Lamivudin
FR-HBV-108	m	40	A*01:01 A*02:05 B*27:03 B*57:01 C*02:02 C*06:02	2,6E+07	D	3465	n.v.	neg	28	64	nein
FR-HBV-109	m	41	A*01:01 A*02:05 B*27:05 B*57:01 C*02:02 C*06:02	1155	D	n.v.	n.v.	neg	9	15	nein
FR-HBV-110	m	46	A*02:01 B*27:05 B*38:01	47384	D	n.v.	neg	neg	96	41	Tenofovir
FR-HBV-112	m	68	A*24:02 A*26:01 B*08:01 B*27:05 C*01:02 C*07:01	3,0E+08	D	974	n.v.	neg	1854	2613	Tenofovir
FR-HBV-114	m	33	A*02:01 A*68:01 B*18:01 B*27:02	n.v.	D	n.v.	n.v.	neg	n.v.	85	Entecavir
FR-HBV-116	w	51	A*02:01 B*07:02 B*15:01 C*03:03 C*07:02	7,0E+06	D	n.v.	pos	pos	55	77	nein
FR-HBV-117	m	47	A*02:01 A*03:01 B*35:03 B*51:01	6.1E+07	D	n.v.	neg	neg	226	80	Telbivudin
FR-HBV-118	w	36	A*02:01 A*24:02 B*08:01 B*18:01 C*07:01	1748	D	n.v.	neg	neg	12	23	nein
FR-HBV-119	w	15	A*24:02 A*32:01 B*18:01 B*40:02 C*02:02 C*07:01	3796	D	n.v.	neg	neg	34	25	nein
FR-HBV-120	w	38	A*02:01 A*11:01 B*35:01 B*40:01	1285	D	n.v.	neg	neg	11	18	nein
FR-HBV-121	w	47	A*02:01 A*31:01 B*51:01	10936	D	n.v.	neg	neg	34	27	nein
FR-HBV-122	w	58	A*02:01 A*24:02 B*57:01 B*58:01 C*03:02 C*06:02	23323	D	n.v.	neg	neg	54	40	nein
FR-HBV-123	w	28	A*29:01 A*33:03	n.v.	D	n.v.	n.v.	neg	n.v.	n.v.	k.A.

			B*35:02 B*58:01 C*03:02 C*04:01									
FR-HBV-124	m	26	A*11:01 A*24:02 B*18:01 B*37:01 C*06:02 C*12:03	740000	D	n.v.	neg	neg	114	33	nein	
FR-HBV-125	w	56	A*24:02 A*66:01 B*41:02 B*51:01 C*15:02 C*17:01	29625	D	n.v.	neg	neg	44	29	nein	
FR-HBV-126	w	40	A*02:01 A*32:01 B*08:01 B*35:03 C*04:01 C*07:01	311	D	n.v.	neg	neg	18	20	nein	
FR-HBV-127	m	39	A*30:02 A*68:01 B*18:01 B*40:01 C*03:04 C*05:01	8,9E+06	D	n.v.	neg	neg	146	86	nein	
FR-HBV-128	m	21	A*02:01 A*30:01 B*08:01 B*50:01 C*06:02 C*07:01	9,0E+08	D	393	pos	pos	60	43	nein	
FR-HBV-129	m	43	A*02:01 A*03:01 B*18:01 B*49:01	86995	D	n.v.	neg	pos	47	47	nein	
FR-HBV-131	m	49	A*03:01 A*24:02 B*14:02 B*35:02 C*04:01 C*08:02	64714	D	n.v.	neg	neg	59	36	Lamivudin	
FR-HBV-132	m	30	A*03:01 A*33:03 B*07:02 B*35:01	134344	D	n.v.	pos	pos	65	54	Adefovir	
FR-HBV-133	w	44	A*02:01 A*24:02 B*15:01 B*18:01	654250	D	n.v.	neg	neg	59	39	nein	
FR-HBV-134	m	37	A*25:01 A*32:01 B*18:01 B*57:01	3101	D	n.v.	neg	neg	46	29	nein	
FR-HBV-136	w	39	A*03:01 A*11:01 B*35:01 B*37:01	8,6E+06	D	n.v.	neg	neg	513	175	nein	
FR-HBV-137	w	42	A*02:01 A*23:01 B*07:02 B*44:03 C*04:01 C*15:05	2974	D	n.v.	neg	pos	91	n.v.	nein	
FR-HBV-138	m	29	A*01:01 A*11:01 B*35:01 B*35:02 C*04:01	1,2E+06	D	n.v.	pos	pos	82	32	nein	
FR-HBV-139	m		A*01:01 A*24:02 B*08:01 B*27:02 C*02:02 C*07:01	n.v.	D	n.v.	n.v.	pos	n.v.	n.v.	k.A.	
FR-HBV-140	w	47	A*02:05 A*03:01 B*44:03 B*50:01 C*04:01 C*06:02	21616	D	n.v.	neg	neg	50	39	nein	
FR-HBV-141	m	30	A*01:01 A*03:01 B*37:01 B*51:01	4853	D	n.v.	neg	pos	53	36	nein	

			C*06:02 C*14:02									
FR-HBV-142	m	39	A*02:01 A*33:01 B*14:02 B*18:01 C*07:01 C*08:02	6,7E+06	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.		k.A.
FR-HBV-143	m	71	A*02:01 A*32:01 B*40:02 B*51:01	8,3E+08	D	n.v.	pos	pos	172	146		nein
FR-HBV-145	m	52	A*02:01 B*35:01 B*52:01	20	D	n.v.	n.v.	neg	77	32		nein
FR-HBV-146	w	23	A*01:01 A*30:04 B*35:08 B*51:01 C*04:01 C*14:02	4081	D	n.v.	pos	pos	15	18		nein
FR-HBV-148	w	59	A*02:01 A*03:01 B*44:03 B*44:05 C*02:02 C*04:01	2092	D	n.v.	neg	neg	24	n.v.		nein
FR-HBV-150	w	38	A*26:01 A*31:01 B*07:02 B*51:01 C*07:02 C*14:02	1918	D	n.v.	neg	neg	52	35		nein
FR-HBV-151	w	31	A*01:01 A*11:01 B*18:01 B*35:02	21727	D	n.v.	neg	pos	41	37		nein
FR-HBV-153	m	45	A*02 B*27	1923	D	n.v.	neg	neg	15	22		nein
FR-HBV-156	w	35	A*01:01 A*24:02 B*08:01 B*15:01 C*03:03 C*07:01	432	D	n.v.	neg	neg	n.v.	15		nein
FR-HBV-157	w	51	A*02:01 A*33:01 B*14:02 B*35:03 C*08:02 C*12:03	401339	D	n.v.	neg	neg	736	n.v.		nein
FR-HBV-158	w	54	A*03:01 A*24:02 B*35:01	24553	D	n.v.	neg	neg	19	n.v.		nein
FR-HBV-159	m	28	A*01:01 A*02:01 B*07:02 B*57:01 C*06:02 C*07:02	12251	D	n.v.	neg	neg	19	30		nein
FR-HBV-160	m	37	A*01:01 A*02:01 B*40:06 C*15:02	1782	D	n.v.	pos	pos	66	43		Tenofovir
FR-HBV-161	m	42	A*01:01 A*66:01 B*41:02 B*57:01 C*06:02 C*17:01	1339	D	40787	neg	neg	56	55		nein
FR-HBV-162	w	26	A*03:01 A*31:01 B*35:01 B*57:01 C*04:01 C*06:02	976	D	250	neg	neg	23	n.v.		nein
FR-HBV-163	w	27	A*01:01 A*02:01 B*35:03 B*38:01 C*04:01 C*12:03	534	D	n.v.	neg	neg	18	20		nein
FR-HBV-164	w	46	A*03:01 A*11:01 B*18:01 B*40:06	11979	D	n.v.	n.v.	pos	55	39		nein

			C*12:03 C*15:02									
FR-HBV-165	w	40	A*01:01 A*02:01 B*40:06 B*41:01 C*07:01 C*15:02	828919	D	n.v.	neg	neg	87	61	nein	
FR-HBV-167	m	26	A*24:02 A*30:01 B*13:02 B*51:01	1,1E+06	D	n.v.	n.v.	neg	55	33	nein	
FR-HBV-169	m	18	A*01:01 A*23:01 B*08:01 B*50:01 C*06:02 C*07:01	2,8E+07	D	2372	neg	neg	255	102	nein	
FR-HBV-170	m	32	A*01:01 A*11:01 B*08:01 C*07:01	3,6E+08	D	46622	pos	pos	63	42	nein	
FR-HBV-172	m	56	A*03:01 A*03:02 B*44:02 B*51:01 C*12:03 C*14:02	2071	D	n.v.	neg	neg	85	49	nein	
FR-HBV-173	m	37	A*02:02 A*23:01 B*41:01 B*57:03 C*07:01 C*17:01	6843	D	n.v.	neg	neg	41	28	nein	
FR-HBV-174	w	21	A*30:01 B*41:01 C*17:01	62138	D	n.v.	neg	pos	57	60	Entecavir	
FR-HBV-175	w	38	A*24:02 A*26:01 B*27:02 B*27:05 C*01:02 C*02:02	304380	D	n.v.	pos	pos	99	45	Tenofovir	
FR-HBV-177	w	31	A*03:01 A*32:01 B*13:02 B*40:02 C*02:02 C*06:02	685	D	n.v.	n.v.	neg	101	130	nein	
FR-HBV-178	w	32	A*02:01 A*25:01 B*14:02 B*18:01 C*07:01 C*08:02	15176	D	n.v.	neg	neg	29	20	nein	
FR-HBV-179	m	22	A*02:01 A*24:02 B*35:01 B*44:05 C*02:02 C*12:03	8190	D	n.v.	neg	neg	86	61	Tenofovir	
FR-HBV-180	m	32	A*03:02 A*11:01 B*35:01 B*41:02 C*04:01 C*17:01	2399	D	n.v.	neg	neg	27	20	Telbivudin	
FR-HBV-181	w	17	A*02:01 A*11:01 B*07:02 B*44:05 C*02:02 C*07:02	851	D	n.v.	neg	neg	20	24	nein	
FR-HBV-182	m	38	A*11:01 A*31:01 B*35:03 B*52:01 C*04:01 C*12:02	4,5E+08	D	n.v.	n.v.	pos	725	230	nein	
FR-HBV-186	m	27	A*01:01 B*41:01 B*58:01 C*03:02 C*17:01	4690	D	n.v.	neg	neg	98	64	nein	
FR-HBV-187	w	44	A*24:02 B*35:02 C*04:01	3774	D	n.v.	neg	neg	32	36	Tenofovir	

FR-HBV-188	w	30	A*02:01 A*24:02 B*07:02 B*44:03 C*04:01 C*07:02	13524	D	n.v.	neg	neg	20	26	nein
FR-HBV-190	w	47	A*01:01 A*02:01 B*44:02 B*52:01	628	D	518	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
FR-HBV-192	m	41	A*01:01 A*24:02 B*55 B*57:01	2548	D	n.v.	neg	neg	21	23	nein
FR-HBV-193	w	57	A*03:01 A*68:01 B*27:02 B*57:01 C*02:02 C*06:02	44880	D	n.v.	neg	neg	36	24	nein
FR-HBV-195	m	31	A*01:01 A*02:01 B*35:03 B*51:01 C*04:01 C*14:02	35590	D	n.v.	neg	neg	207	71	Telbivudin
FR-HBV-196	m	35	A*02:05 A*68:02 B*13:01 B*39:10	5308	D	n.v.	neg	neg	34	n.v.	nein
FR-HBV-197	m	31	A*02:01 A*32:01 B*39:01 B*51:01 C*12:03 C*15:13	20	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
FR-HBV-199	m	49	A*02:01 A*26:01 B*38:01 B*51:01	9742	D	n.v.	neg	neg	83	n.v.	nein
FR-HBV-200	m	24	A*11:01 A*68:01 B*35:01 B*35:03 C*04:01	75952	D	n.v.	pos	pos	58	30	Tenofovir
FR-HBV-201	w	59	A*24:02 A*33:01 B*14:02 B*49:01	3871	D	1474	neg	pos	30	28	nein
FR-HBV-203	m	29	A*01:01 A*03:02 B*15:18 B*51:01 C*07:04 C*14:02	4,3E+06	D	n.v.	n.v.	neg	67	36	Tenofovir
FR-HBV-204	w	47	A*02:01 B*18:01 B*44:02 C*05:01 C*07:01	2425	D	n.v.	neg	neg	n.v.	31	nein
FR-HBV-205	m	44	A*29:01 A*32:01 B*35:02 B*35:08 C*04:01	216093	D	n.v.	neg	neg	50	39	nein
FR-HBV-206	w	24	A*11:01 A*26:01 B*51:01 B*52:01 C*12:02 C*16:02	5728	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
FR-HBV-207	m	33	A*24:02 A*32:01 B*35:01 B*44:02 C*04:01 C*05:01	1,1E+06	D	n.v.	neg	neg	296	80	nein
FR-HBV-208	w	49	A*02:01 A*26:01 B*13:02 B*38:01 C*06:02 C*12:03	925	D	n.v.	neg	neg	18	22	nein
FR-HBV-209	w	23	A*01:01 A*03:01 B*08:01 B*51:01	2048	D	n.v.	neg	neg	49	35	Peginterferon α

			C*07:01 C*15:04									
FR-HBV-210	w	32	A*02:01 A*32:04 B*35:01 B*40:01 C*03:04 C*04:01	2,8E+06	D	n.v.	pos	pos	18	31	Peginterferon α	
FR-HBV-216	w	32	A*03:01 A*25:01 B*07:02 B*57:01 C*06:02 C*07:02	24545	D	n.v.	neg	neg	23	n.v.	nein	
FR-HBV-217	m	52	A*01:01 A*02:01 B*07:02 B*18:01	2,9E+07	D	18577	neg	neg	140	65	nein	
FR-HBV-218	m	65	A*02:01 A*25:01 B*14:02 B*35:03 C*08:02 C*12:03	7,3E+06	D	n.v.	pos	pos	64	90	nein	
FR-HBV-219	w	35	A*03:01 A*24:02 B*18:01 B*52:01 C*07:01 C*12:02	150000	D	n.v.	n.v.	pos	34	37	nein	
FR-HBV-220	m	61	A*01:01 A*26:01 B*08:01 B*38:01 C*07:01 C*12:03	9236	D	n.v.	neg	neg	52	37	nein	
FR-HBV-224	w	38	A*02:01 B*15:17 B*57:01 C*06:02 C*07:01	930	D	n.v.	neg	neg	20	n.v.	nein	
FR-HBV-225	w	21	A*11:01 A*26:01 B*35:01 C*04:01	5321	D	n.v.	pos	pos	23	28	Tenofovir	
FR-HBV-228	w	51	A*02:01 A*23:01 B*44:03 B*51:01 C*04:01 C*15:02	741	D	n.v.	neg	neg	104	56	Tenofovir	
FR-HBV-231	w	27	A*11:01 A*33:03 B*35:01 C*04:01	2199	D	n.v.	neg	neg	19	18	nein	
FR-HBV-232	m	47	A*01:01 B*08:01 C*07:01	116	D	n.v.	neg	neg	64	66	Peginterferon α	
FR-HBV-233	m	46	A*01:01 A*33:01 B*08:01 B*14:02 C*07:01 C*08:02	6,9E+07	D	n.v.	neg	neg	1605	1705	Lamivudin	
FR-HBV-234	m	35	A*03:02 A*23:01 B*49:01 B*51:01 C*07:01 C*14:02	210036	D	n.v.	neg	neg	43	n.v.	nein	
FR-HBV-235	m	51	A*11:01 A*23:01 B*13:02 B*35:01 C*04:01 C*06:02	93325	D	n.v.	neg	neg	39	26	nein	
FR-HBV-236	w	31	A*02:01 B*51:01 B*58:01 C*03:02 C*14:02	628	D	n.v.	neg	neg	19	20	nein	
FR-HBV-237	w	57	A*30:02 A*32:01 B*35:01 B*49:01 C*04:01 C*07:01	957	D	n.v.	neg	neg	21	n.v.	nein	

FR-HBV-238	m	23	A*02:01 A*24:02 B*07:02 B*18:01	1,5E+08	D	n.v.	pos	pos	324.3	127	Telbivudin
FR-HBV-239	m	40	A*01:01 A*66:01 B*08:01 B*41:02 C*07:01 C*17:01	1811	D	n.v.	neg	neg	95	47	Lamivudin
FR-HBV-242	w	47	A*24:02 A*32:01 B*35:03 B*35:08 C*04:01 C*12:03	8299	D	n.v.	neg	neg	20	28	nein
FR-HBV-243	m	44	A*11:01 A*68:01 B*18:01 B*40:01	393	D	n.v.	n.v.	neg	64	44	nein
FR-HBV-244	m	27	A*01:01 A*32:01 B*08:01	6956	D	n.v.	neg	pos	39	31	nein
FR-HBV-248	w	25	A*01:01 B*40:06 C*15:02	9812	D	n.v.	pos	pos	39	30	Tenofovir
FR-HBV-249	m	53	A*03:01 A*24:02 B*15:01 B*27:05 C*01:02 C*03:03	14766	D	n.v.	neg	neg	28	22	nein
FR-HBV-250	w	18	A*24:02 A*32:01 B*44:02 B*51:01 C*05:01 C*15:04	3388	D	n.v.	neg	neg	27	20	nein
FR-HBV-252	m	41	A*30:02 A*68:01 B*18:01 B*27:05 C*02:02 C*05:01	214	D	n.v.	neg	neg	30	24	nein
FR-HBV-253	m	19	A*01:01 A*30:01 B*13:02 B*57:01 C*06:02	6,5E+08	D	n.v.	pos	pos	41	28	nein
FR-HBV-254	w	27	A*01:01 A*30:01 B*42:01 B*53:01 C*04:01 C*17:01	26942	D	n.v.	neg	neg	59	50	nein
FR-HBV-255	m	51	A*01:01 A*02:01 B*39:01 B*57:01 C*06:02 C*12:03	6526	D	n.v.	neg	neg	14	14	nein
HBV-134	w	39	A*24:02 B*14:02 B*51:01 C*08:02 C*15:05	n.v.	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-135	m	33	A*23:01 B*51:01 C*15:02	n.v.	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-136	w	36	A*02:06 A*68:01 B*08:01 B*55:01	n.v.	D	n.v.	n.v.	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-137	m	28	A*24:02 A*74:03 B*15:17 B*40:02 C*07:01 C*15:02	424	D	31389	pos	pos	93	41	nein
HBV-140	m	46	A*01:01 A*02:01 B*08:01 B*56:01	n.v.	A	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-143	w	51	A*03:01 A*30:02 B*07:02 B*08:01	n.v.	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein

			C*07:01 C*07:02									
HBV-146	m	40	A*03:02 A*32:01 B*49:01 B*50:01 C*06:02 C*07:01	n.v.	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein	
HBV-149	m	50	A*26:01 A*33:01 B*14:02 B*49:01 C*07:01 C*08:02	674	D	2404	neg	neg	35	21	nein	
HBV-150	m	53	A*02:05 A*33:01 B*35:01 B*58:01	n.v.	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein	
HBV-151	m	42	A*02:06 A*11:01 B*08:01 B*51:08 C*07:01 C*16:02	1509	A	453	neg	pos	29	18	nein	
HBV-153	w	23	A*02:05 A*33:01 B*49:01 B*51:01 C*07:01 C*15:02	6027	D	4695	neg	neg	25	15	nein	
HBV-157	w	32	A*03:01 B*13:02 B*35:08	n.v.	D	n.v.	neg	pos	n.v.	n.v.	nein	
HBV-158	w	42	A*02:01 A*26:01 B*07:02 C*07:02	3326	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein	
HBV-159	m	31	A*01:01 A*26:01 B*35:01 B*37:01	2036	D	49667	pos	pos	36	27	nein	
HBV-160	w	52	A*11:01 A*25:01 B*18:01 B*56:01 C*01:02 C*12:03	2,0E+06	D	n.v.	neg	pos	n.v.	n.v.	nein	
HBV-162	w	23	A*23:01 B*35:01 B*45:01 C*06:02 C*08:02	16210	A	n.v.	neg	pos	n.v.	n.v.	nein	
HBV-163	m	49	A*01:01 B*27:03 B*57:01 C*02:02 C*06:02	n.v.	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein	
HBV-164	w	65	A*01:01 A*33:01 B*13:02 B*14:02 C*06:02 C*08:02	n.v.	D	n.v.	neg	pos	n.v.	n.v.	nein	
HBV-165	m	31	A*03:01 A*66:01 B*35:03 B*41:02 C*04:01 C*17:03	n.v.	A	n.v.	neg	pos	n.v.	n.v.	nein	
HBV-169	m	44	A*01:01 A*02:01 B*44:02 B*57:01	n.v.	A	n.v.	neg	pos	n.v.	n.v.	nein	
HBV-170	m	37	A*02:01 A*11:01 B*52:01 B*57:01 C*06:02 C*12:02	n.v.	D	n.v.	n.v.	pos	n.v.	n.v.	nein	
HBV-172	m	34	A*01:01 A*02:01 B*49:01 B*51:01	1528	D	1613	neg	pos	23	14	nein	
HBV-173	w	32	A*03:01 A*23:01 B*35:01 B*50:01	n.v.	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein	

HBV-174	w	36	A*24:02 A*68:01 B*27:02 B*40:01 C*02:02 C*03:04	9330	D	467	neg	neg	26	13	nein
HBV-176	m	72	A*24:02 B*35:02 B*51:01 C*04:01 C*14:02	n.v.	D	n.v.	n.v.	pos	n.v.	n.v.	nein
HBV-181	m	35	A*02:01 A*29:01 B*45:01 B*51:01 C*01:02 C*06:02	n.v.	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-182	m	31	A*01:01 A*25:01 B*08:01 B*15:18 C*07:01 C*07:04	n.v.	D	n.v.	neg	pos	n.v.	n.v.	nein
HBV-183	w	44	A*02:01 A*68:01 B*18:01 B*44:02	188860	D	3486	neg	neg	112	50	Tenofovir
HBV-184	w	25	A*23:01 A*24:02 B*07:02 B*49:01 C*07:01 C*07:02	n.v.	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-185	m	22	A*01:01 A*29:01 B*15:17 B*58:01 C*02:02 C*07:01	n.v.	D	n.v.	neg	pos	n.v.	n.v.	nein
HBV-186	m	46	A*01:01 A*02:01 B*08:01 B*27:03	n.v.	A	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-187	m	33	A*26:02 A*33:01 B*14:02 B*51:01 C*07:01 C*14:02	7,3E+06	D	14318	neg	neg	152	70	nein
HBV-189	m	31	A*11:01 B*18:01 B*51:01 C*01:02 C*08:02	336900	D	37402	pos	pos	34	25	nein
HBV-190	m	33	A*01:01 A*02:01 B*37:01 B*51:01 C*06:02 C*14:02	n.v.	A	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-191	w	30	A*01:03 A*03:01 B*07:02 B*73:01 C*07:02 C*15:04/05/06	n.v.	D	n.v.	neg	pos	n.v.	n.v.	nein
HBV-192	m	57	A*01:01 A*02:01 B*08:01 B*15:01 C*03:04 C*07:01	4564	A	2640	neg	neg	30	24	nein
HBV-197	w	33	A*02:01 A*2901/02 B*18:01 B*44:03 C*07:01 C*16:01	38950	D	901	neg	neg	37	23	nein
HBV-198	w	41	A*02:01 A*68:01 B*41:01 B*51:01	n.v.	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-199	m	52	A*02:02 A*03:01 B*18:01 B*41:01	n.v.	D	n.v.	n.v.	neg	n.v.	n.v.	nein

			C*12:03 C*17:03									
HBV-200	m	68	A*03:01 B*07:02 C*07:02	n.v.	A	n.v.	neg	pos	n.v.	n.v.	nein	
HBV-205	w	23	A*02:05 A*31:01 B*44:05 B*50:01 C*02:02 C*06:02	174	D	3507	neg	neg	39	24	nein	
HBV-206	m	20	A*11:01 B*44:02 B*52:01 C*12:02 C*16:04	1.0E+09	D	318400	pos	pos	62	24	nein	
HBV-207	m	40	A*02:01 A*03:01 B*07:02 B*35:03	n.v.	D	n.v.	neg	pos	n.v.	n.v.	Tenofovir	
HBV-208	m	40	A*03:01 A*68:01 B*08:01 B*57:01 C*07:01 C*07:02	n.v.	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein	
HBV-210	m	20	A*29:01/02 A*66:01 B*41:02 B*44:03 C*16:01 C*17:03	320	D	21503	neg	pos	69	39	nein	
HBV-211	m	50	A*02:01 A*25:01 B*18:01 B*51:01 C*12:03 C*15:02	1221	D	2814	neg	neg	29	25	nein	
HBV-212	m	66	A*23:01 B*44:02 B*50:01 C*05:01 C*06:02	7,8E+06	D	2097	neg	neg	135	142	Entecavir	
HBV-215	m	48	A*02:01 A*03:01 B*15:01 C*03:03 C*03:04	1070	A	793	neg	pos	31	20	nein	
HBV-221	w	37	A*24:02 A*26:01 B*27:07 B*39:01 C*12:03 C*15:02	1445	D	1427	neg	neg	15	9	nein	
HBV-230	m	58	A*02:01 B*18:01 B*44:02	177	D	6313	neg	neg	15	12	nein	
HBV-231	m	42	A*03:01 A*32:01 B*35:01 B*35:08	n.v.	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	k.A.	
HBV-232	m	50	A*02:01 A*24:02 B*40:02 B*49:01 C*03:04 C*07:01	n.v.	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein	
HBV-235	w	49	A*11:01 A*33:01 B*14:02 B*40:01	n.v.	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein	
HBV-237	w	32	A*23:01 A*24:02 B*41:01 B*58:01 C*03:02 C*17:03	378	D	4311	neg	neg	28	25	Tenofovir	
HBV-238	m	35	A*02:01 A*24:02 B*51:01 B*55:01	455	D	2053	neg	neg	19	17	nein	
HBV-240	m	35	A*11:01 A*66:01 B*35:01 B*41:02	n.v.	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein	
HBV-241	m	43	A*29:01/02 A*33:01	987600	D	10343	neg	neg	550	183	nein	

			B*50:01 B*51:01 C*02:02 C*06:02								
HBV-242	m	29	A*02:04/07 A*03:01 B*41:01 B*57:01 C*07:01 C*17:03	885	D	8716	neg	neg	37	27	nein
HBV-245	m	48	A*03:01 A*31:01 B*35:03 B*51:01 C*04:01 C*15:02	3537	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-246	w	51	A*26:01 A*34:01 B*15:21 B*55:02 C*04:03 C*14:02	5,2E+07	A	1044	neg	pos	23	23	nein
HBV-247	w	46	A*02:01 A*03:01 B*07:02 B*13:02	6,7E+06	A	26121	neg	pos	567	739	nein
HBV-248	w	61	A*01:01 A*29:01/02 B*08:01 B*44:03 C*07:01 C*16:01	2288	D	n.v.	neg	pos	n.v.	n.v.	nein
HBV-251	m	38	A*01:01 A*02:04 B*15:17 B*55:01 C*01:02 C*07:01	364400	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-253	w	35	A*02:01 A*26:01 B*15:01 B*51:01 C*03:03 C*07:01	5218	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-255	m	59	A*01:01 A*24:02 B*08:01 B*35:02 C*04:01 C*07:01	1,0E+06	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-256	w	37	A*01:01 A*02:05 B*15:17 B*50:01 C*06:02 C*07:01	8948	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-257	m	44	A*01:01 B*44:03 B*45:01 C*07:02 C*16:01	121300	A	n.v.	neg	pos	n.v.	n.v.	nein
HBV-258	m	30	A*01:01 A*02:01 B*37:01 B*51:01 C*06:02 C*16:02	1,7E+07	D	n.v.	pos	pos	n.v.	n.v.	nein
HBV-259	w	59	A*23:01 A*24:02 B*18:01 B*49:01 C*07:01	161100	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-261	m	37	A*03:01 A*68:01 B*07:02 B*35:02 C*04:01 C*07:02	2451	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-262	w	39	A*01:01 B*41:01 C*17:03	3606	D	313	neg	neg	14	16	nein
HBV-268	m	39	A*02:01 A*30:01 B*13:02 B*51:07 C*06:02 C*14:02	1866	D	118	neg	neg	51	21	nein

HBV-269	w	48	A*11:01 A*24:02 B*15:01 B*35:01 C*04:01	1397	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-271	w	56	A*02:01 A*03:01 B*07:02 B*40:02	1685	A	10055	neg	neg	26	19	nein
HBV-272	m	42	A*02:01 A*03:01 B*35:03 B*46:01 C*01:02 C*04:01	1,7E+07	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-273	w	60	A*02:01 B*44:02 B*52:01 C*05:01 C*12:02	4333	A	n.v.	neg	pos	n.v.	n.v.	nein
HBV-274	w	37	A*01:01 A*11:01 B*35:08 B*52:01 C*04:01 C*12:02	5381	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-276	w	30	A*02:01 A*03:01 B*44:02 B*55:01	1527	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-277	m	53	A*02:01 A*29:01/02 B*35:01 B*50:01	30530	A	n.v.	neg	pos	n.v.	n.v.	nein
HBV-278	w	51	A*02:01 A*31:01 B*35:01 B*51:01	49750	A	n.v.	neg	pos	n.v.	n.v.	nein
HBV-280	w	65	A*26:01 A*31:01 B*38:01 B*51:01 C*12:03 C*14:02	14090	D	n.v.	pos	pos	n.v.	n.v.	Entecavir
HBV-281	m	47	A*02:01 A*11:01 B*51:01 C*04:01 C*16:02	6684	D	n.v.	neg	pos	n.v.	n.v.	nein
HBV-286	w	54	A*01:01 A*02:01 B*15:01 B*51:01 C*03:04 C*15:02	1424	D	13201	neg	neg	18	24	nein
HBV-290	m	37	A*02:01 A*30:01 B*13:02 B*51:07 C*06:02 C*14:02	4330	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-292	m	33	A*02:06 A*26:01 B*35:03 B*38:01 C*12:03 C*14:02	3005	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-293	w	43	A*02:01 A*68:01 B*15:01 B*44:02 C*03:04 C*05:01	443	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-294	w	49	A*33:01 A*68:01 B*35:01 B*58:01 C*03:02 C*04:01	1041	A	n.v.	neg	pos	n.v.	n.v.	nein
HBV-297	w	28	A*11:01 A*30:02 B*08:01 B*35:03 C*04:01 C*07:01	99410	D	n.v.	neg	pos	n.v.	n.v.	nein
HBV-298	m	48	A*02:01	217700	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein

			B*35:01 B*35:03 C*04:01								
HBV-299	m	60	A*32:01 A*68:01 B*35:01 B*55:01 C*03:04 C*04:01	2308	D	2286	neg	neg	21	25	nein
HBV-300	w	62	A*02:03 A*03:02 B*38:02 B*51:01 C*07:02 C*15:02	87840	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-302	m	47	A*01:01 B*38:02 B*57:01 C*06:02 C*07:02	10170	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-303	w	40	A*02:05 A*02:17 B*50:01 B*51:01 C*06:02 C*15:02	1112	D	2513	neg	neg	16	12	nein
HBV-304	w	28	A*66:01 A*69:01 B*18:01 B*41:02 C*12:03 C*17:03	8832	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-309	m	27	A*24:02 A*30:01 B*13:02 B*35:08 C*04:01 C*06:02	1487	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-312	w	64	A*01:01 A*02:01 B*07:02 B*08:01 C*07:01 C*07:02	835	D	43	neg	neg	15	14	nein
HBV-313	m	61	A*11:01 A*30:04 B*15:02 B*44:03 C*07:01 C*08:01	n.v.	D	n.v.	n.v.	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-314	w	30	A*02:01 A*24:02 B*41:01 B*44:02 C*05:01 C*16:04	596	A	n.v.	neg	pos	n.v.	n.v.	nein
HBV-315	w	31	A*24:02 B*18:01 B*52:01 C*05:01 C*16:04	22430	D	n.v.	neg	pos	n.v.	n.v.	nein
HBV-318	w	29	A*24:02 A*30:02 B*53:01 B*54:01 C*01:02 C*04:01	21330	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-319	w	42	A*26:01 A*66:01 B*41:02 B*49:01 C*07:01 C*17:03	5368	D	3384	neg	neg	15	16	nein
HBV-320	m	54	A*02:01 A*24:02 B*35:01 B*40:01 C*03:04 C*04:01	8738	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-321	m	48	A*26:01 A*31:01 B*35:02 B*35:03 C*04:01	1,7E+07	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein
HBV-334	w	50	A*03:01 A*32:01 B*44:02	992	A	5259	neg	pos	21	21	nein

			B*44:03 C*02:02 C*05:01									
HBV-336	m	56	A*02:01 A*03:02 B*35:03 B*44:02 C*12:03 C*16:04	133400	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein	
HBV-339	w	54	A*24:02 B*07:02 B*35:02 C*04:01 C*07:02	4367	A	n.v.	neg	pos	n.v.	n.v.	nein	
HBV-341	m	52	A*11:01 A*33:01 B*35:03 B*50:01 C*06:02 C*12:03	1833	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein	
HBV-346	m	60	A*02:01 A*24:02 B*18:01 B*27:03 C*18:01 C*27:03	7567	D	6559	neg	neg	32	12	nein	
HBV-347	w	49	A*23:01 B*49:01 C*07:01	715	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein	
HBV-348	m	28	A*02:01 A*02:05 B*50:01 B*57:01 C*06:02	1700	A	3346	neg	neg	24	24	nein	
HBV-349	m	34	A*02:01 A*33:01 B*13:02 B*14:02 C*06:02 C*08:02	6529	D	9518	neg	neg	67	28	nein	
HBV-350	m	35	A*02:06 A*24:02 B*35:08 B*55:01 C*01:02 C*04:01	3920	D	770	neg	neg	26	35	nein	
HBV-351	w	37	A*26:01 A*33:01 B*14:02 B*44:03 C*08:02 C*14:03	241	D	2925	neg	neg	24	22	nein	
HBV-353	w	36	A*01:01 B*08:01 C*07:01	157400	A	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein	
HBV-357	w	43	A*01:01 A*25:01 B*08:01 B*35:02 C*04:01 C*07:01	332	D	1597	neg	neg	14	13	nein	
HBV-358	w	68	A*11:01 A*30:01 B*13:02 B*35:01 C*04:01 C*06:02	5489	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein	
HBV-359	m	47	A*02:01 B*51:01 B*57:01 C*02:02 C*06:02	1,5E+07	A	n.v.	neg	pos	n.v.	n.v.	nein	
HBV-360	m	40	A*24:02 A*30:01 B*35:02 B*42:01 C*04:01 C*17:01/03	753	D	728	neg	neg	25	21	nein	
HBV-361	m	30	A*01:01 A*24:02 B*27:02 B*35:01 C*02:02 C*04:01	532	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein	
HBV-362	m	53	A*01:01 A*29:01/02 B*07:05	22760	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein	

			B*49:01 C*07:01 C*15:05									
HBV-363	m	39	A*02:06 A*26:01 B*35:03 B*38:01 C*12:03 C*14:02	2928	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.		nein
HBV-364	m	52	A*11:01 A*68:01 B*51:01 B*52:01 C*12:02 C*16:02	15020	D	n.v.	neg	pos	n.v.	n.v.		nein
HBV-368	m	47	A*02:01 A*68:02 B*40:02 B*53:01 C*04:01 C*15:02	1629	A	n.v.	neg	pos	n.v.	n.v.		nein
HBV-369	w	28	A*02:01 A*29:01/02 B*08:01 B*51:01 C*07:01 C*16:02	73580	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.		nein
HBV-370	w	24	A*24:02 A*32:01 B*35:03 B*51:01 C*04:01 C*14:02	1,7E+07	D	17722	pos	pos	21	22		Entecavir
HBV-375	w	64	A*03:01 A*31:01 B*15:18 B*51:01 C*01:02 C*08:01	512	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.		nein
HBV-377	m	56	A*01:01 A*03:01 B*08:01 B*35:01 C*04:01 C*07:01	683	A	n.v.	neg	pos	n.v.	n.v.		nein
HBV-379	w	47	A*01:01 A*31:01 B*51:01 B*58:01 C*03:02 C*15:02/03	51	D	27537	neg	pos	90	33		nein
HBV-385	w	43	A*03:01 A*24:02 B*18:01 B*35:03 C*04:01 C*12:03	9251	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.		nein
HBV-389	m	53	A*01:01 A*24:02 B*50:01 B*57:01 C*06:02	64490	D	8204	neg	neg	41	44		nein
HBV-393	m	47	A*01:01 A*32:01 B*35:01 B*51:01 C*01:02 C*04:01	184	D	2	neg	neg	104	80		nein
HBV-396	m	32	A*24:02 B*07:05 C*15:05	573	D	3676	neg	neg	26	21		nein
HBV-400	m	47	A*02:01 A*26:01 B*27:03 B*35:01 C*02:02 C*04:01	228	D	87	neg	neg	25	18		nein
HBV-401	m	56	A*02:01 A*68:01 B*13:01 B*51:01 C*06:02	3,8E+06	D	7479	pos	pos	49	33		nein
HBV-403	m	44	A*11:01 A*32:01 B*13:02 B*44:02	517	A	23693	neg	pos	29	28		nein

			C*06:02 C*07:04									
HBV-404	w	43	A*02:01 A*03:02 B*35:03 B*44:02 C*12:03 C*16:04	16090	D	n.v.	neg	neg	n.v.	n.v.	nein	
HBV-416	w	19	A*01:01 A*29:01/02 B*50:01 B*55:01 C*06:02	3,5E+08	D	188200	pos	pos	41	25	nein	
HBV-428	m	46	A*11:01 A*26:01 B*35:01 B*38:01 C*04:01 C*12:03	3154	D	6271	neg	neg	38	21	nein	
HBV-437	m	21	A*03:01 A*11:01 B*35:01 B*35:08 C*04:01	1402	D	25	neg	neg	19	15	nein	
HBV-441	m	66	A*23:01 A*24:02 B*35:08 B*50:01 C*04:01 C*06:02	2562	A	982	neg	neg	25	30	nein	
HBV-443	m	44	A*03:02 A*11:01 B*27:03 B*35:03 C*02:02 C*04:01	3200	D	541	neg	neg	27	24	k.A.	
HH-HBV-02	m	56	A*02:01 A*26:01 B*46:01 B*58:01 C*01:02 C*03:02	4,5E+06	B	n.v.	n.v.	neg	n.v.	n.v.	k.A.	
HH-HBV-04	m	62	A*24:02 A*74:01 B*15:02 C*08:01	1.1E+06	B	n.v.	n.v.	neg	n.v.	n.v.	k.A.	
HH-HBV-07	w	33	A*02:01 A*24:02 B*18:01 C*05:01 C*07:01	44000	D	n.v.	n.v.	neg	n.v.	n.v.	k.A.	
HN-HBV-01	m	50	A*01:01 B*35:03 B*40:06 C*12:03 C*15:02	413000	D	n.v.	neg	neg	80	70	Peginterferon α	
HN-HBV-03	m	35	A*11:01 A*26:01 B*35:08 B*56:01 C*01:02 C*07:02	3,6E+07	D	9336	n.v.	neg	48	31	nein	
HN-HBV-04	m	29	A*01:01 A*11:01 B*08:01 B*44:02 C*05:01 C*07:01	194789	A	6962	neg	pos	48	32	nein	
HN-HBV-06	m	47	A*11:01 A*24:02 B*51:01 C*15:02	72000	D	2023	neg	neg	60	37	nein	
HN-HBV-08	w	42	A*26:01 A*33:01/03 B*35:01 B*58:01 C*03:02 C*04:01	5588	B	129	neg	neg	24	27	Peginterferon α	
HN-HBV-09	w	26	A*11:01 B*40:01 B*46:01 C*01:02 C*15:02	10490	B	483	pos	pos	28	32	Peginterferon α	
HN-HBV-10	m	22	A*03:01 A*11:01 B*08:01 B*56:01	3806	D	494	neg	pos	57	38	Peginterferon α	

			C*01:02 C*07:01									
HN-HBV-14	m	30	A*01:01 A*33:01/03 B*57:01 B*58:01 C*03:02 C*06:02	6,5E+06	D	7304	neg	neg	37	38	nein	
HN-HBV-15	w	22	A*02:06 A*33:01/03 B*15:02 B*58:01 C*03:02 C*08:01	1,7E+08	B	17006	pos	pos	26	32	Peginterferon α	
HN-HBV-16	m	37	A*11:01 A*23:01 B*18:01 B*44:03 C*04:01 C*07:01	3,6E+07	D	38966	pos	pos	93	67	Peginterferon α	
HN-HBV-17	n.v.	n.v.	A*01:01 B*08:01 C*07:01	3,9E+06	D	15905	neg	pos	128	52	Tenofovir	
HN-HBV-18	n.v.	n.v.	A*01:01 A*02:01 B*07:02 B*57:01 C*06:02 C*07:02	1,4E+08	D	25195	pos	pos	253	132	Peginterferon α	
HN-HBV-19	w	47	A*24:02 A*33:01 B*38:02 B*44:03 C*07:01 C*07:02	93320	B	556	neg	neg	52	41	Peginterferon α	
HN-HBV-20	n.v.	n.v.	A*01:01 A*03:01 B*07:02 B*14:02 C*07:02 C*08:02	7550	D	9934	neg	pos	85	56	Peginterferon α	
HN-HBV-21	n.v.	n.v.	A*01:01 A*32:01 B*14:02 B*57:01 C*06:02 C*08:02	4,3E+07	D	7883	neg	neg	266	150	Peginterferon α	
HN-HBV-22	m	44	A*02:01 A*03:01 B*07:02 B*45:01 C*06:02 C*07:02	1,2E+08	B	4434	neg	pos	296	116	Peginterferon α	
HN-HBV-25	w	41	A*24:07 A*24:10 B*15:25 B*38:02 C*04:03 C*07:02	1,1E+08	C	5034	pos	pos	49	38	Peginterferon α	
HN-HBV-26	m	36	A*03:01 A*11:01 B*18:01 B*35:01 C*04:01 C*12:03	103776	D	2049	neg	neg	51	46	k,A,	
HN-HBV-27	w	19	A*01:01 A*03:01 B*08:01 B*44:03 C*04:01 C*07:01	317100	D	17560	n.v.	neg	91	49	Peginterferon α	
HN-HBV-28	w	28	A*01:01 A*32:01 B*08:01 C*07:01	2955	A	25227	neg	neg	57	32	Peginterferon α	
HN-HBV-31	n.v.	n.v.	A*29:01/02 A*68:01 B*18:01 B*44:03 C*07:01 C*16:01	6713	D	965	neg	neg	76	26	nein	
HN-HBV-32	w	40	A*26:01 A*30:01 B*13:02 B*46:01 C*01:02 C*06:02	1,7E+08	C	22714	pos	pos	43	33	Peginterferon α	

HN-HBV-34	w	22	A*01:01 A*24:02 B*40:06 B*44:02 C*05:01 C*15:02	1,4E+07	D	37531	pos	pos	46	27	k.A.
HN-HBV-36	m	51	A*11:01 A*68:01 B*50:01 B*51:01 C*02:02 C*06:02	30900	D	68	neg	neg	38	33	nein
HN-HBV-37	m	40	A*02:01 A*23:01 B*44:03 B*49:01 C*07:01 C*08:02	8,5E+08	E	113556	pos	pos	50	50	Tenofovir
HN-HBV-38	m	62	A*01:01 A*03:01 B*15:01 B*57:01 C*06:02 C*07:02	11700	A	23377	neg	pos	47	27	nein
HN-HBV-39	w	38	A*11:01 A*29:01/02 B*35:01 B*44:03 C*04:01 C*16:01	155800	D	129	pos	pos	33	24	Entecavir
HN-HBV-40	w	50	A*02:01 A*03:01 B*15:01 B*40:02 C*02:02 C*03:03	3,0E+08	D	14826	neg	neg	221	111	Tenofovir
HN-HBV-41	m	44	A*02:01 A*02:06 B*07:02 B*08:01 C*07:01 C*07:02	88553	A	117956	neg	pos	65	35	nein
HN-HBV-43	m	43	A*02:05/08 A*30:02 B*18:01 B*50:01 C*05:01 C*06:02	88800	A	8147	pos	pos	74	105	nein
HN-HBV-45	m	61	A*01:01 A*03:01 B*51:01 B*57:01 C*06:02 C*15:02	3,0E+08	D	1398	neg	neg	259	234	Tenofovir
HN-HBV-47	w	47	A*01:01 B*08:01 C*07:01	8907	D	588	n.v.	neg	19	11	nein
HN-HBV-49	m	26	A*02:04/17 B*51:01 C*15:02	2,9E+08	D	4848	pos	pos	129	51	nein
HN-HBV-50	w	33	A*11:01 A*31:01 B*35:01 B*37:01 C*04:01 C*06:02	340000	D	1880	neg	pos	47	30	nein
HN-HBV-51	w	35	A*02:01 A*11:01 B*35:01 B*44:02 C*04:01 C*05:01	8,0E+06	D	8428	neg	neg	80	73	nein
HN-HBV-56	m	44	A*02:01 B*44:02 B*51:01 C*07:04 C*14:02	23000	A	13965	n.v.	pos	52	39	Peginterferon α
HN-HBV-57	m	26	A*11:01 A*11:04 B*15:02 B*46:01 C*01:02 C*08:01	1,2E+08	C	14754	pos	pos	277	118	Peginterferon α
HN-HBV-58	w	50	A*33:01/03 A*34:01 B*38:02 B*40:02	18800	A	573	neg	pos	83	51	nein

			C*07:02 C*15:02									
HN-HBV-60	w	61	A*24:02 A*33:01/03 B*54:01 B*58:01 C*01:02 C*03:02	794000	C	2224	n.v.	pos	47	65	nein	
HN-HBV-62	w	60	A*01:01 A*11:01 B*07:05 B*50:01 C*06:02 C*07:02	5660	A	5278	neg	pos	29	26	nein	
HN-HBV-65	w	32	A*02:01 A*26:01 B*13:02 B*50:01 C*06:02	2710	A	28203	neg	pos	n.v.	n.v.	k.A.	
HN-HBV-69	m	35	A*11:01 B*15:02 B*56:01 C*01:02 C*08:01	2260	B	6332	neg	pos	115	45	Peginterferon α	
HN-HBV-70	n.v.	n.v.	A*03:01 A*32:01 B*07:02 B*08:01 C*07:02	8,3E+08	A	225019	pos	pos	n.v.	n.v.	k.A.	
HN-HBV-74	m	48	A*02:01 A*32:01 B*44:03 B*51:01 C*04:01 C*16:02	850	D	572	n.v.	neg	22	n.v.	nein	
HN-HBV-76	m	39	A*11:01 A*24:02 B*18:01 B*35:01 C*04:01 C*07:01	2000	D	n.v.	neg	neg	66	37	nein	
HN-HBV-78	m	k.A.	A*01:01 A*33:01/03 B*56:02 B*57:01 C*01:02 C*06:02	2147	B	974	neg	neg	38	33	Peginterferon α	
HN-HBV-82	m	56	A*24:03 A*33:01/03 B*14:02 B*50:01 C*06:02 C*08:02	1953	D	1129	neg	neg	148	47	nein	
HN-HBV-83	w	52	A*02:01 A*03:01 B*15:01 C*03:03	2040	D	283	n.v.	neg	16	n.v.	nein	
HN-HBV-85,2	w	46	A*03:01 B*07:05 C*07:02	14142	A	13716	neg	pos	32	33	nein	
LDN-HBV-01	m	38	A*02:01 A*23:01 B*49:01 B*52:01 C*07:01 C*12:02	1072	D	n.v.	neg	neg	28	n.v.	nein	
LDN-HBV-02	m	35	A*11:01 A*31:01 B*15:27 B*51:02 C*04:01 C*15:02	10651	B	n.v.	neg	neg	52	n.v.	nein	
LDN-HBV-03	w	29	A*30:01 A*74:04/03 B*15:03 B*45:01 C*02:02 C*16:01	1281	E	n.v.	n.v.	neg	18	n.v.	nein	
LDN-HBV-04	m	38	A*24:02 A*31:01 B*35:01 B*39:01 C*04:01 C*12:03	9550	D	n.v.	neg	neg	37	n.v.	k.A.	
LDN-HBV-05	n.v.	n.v.	A*11:01 B*15:02 B*15:25	28000	C	n.v.	n.v.	pos	n.v.	n.v.	nein	

			C*04:03 C*08:01								
LDN-HBV-06	m	63	A*11:01 A*24:02 B*39:06 B*40:01 C*03:04 C*07:02	1257	A	n.v.	neg	pos	26	n.v.	nein
LDN-HBV-07	w	49	A*01:03 A*66:01 B*07:02 B*41:02 C*07:02 C*17:01	2288	A	n.v.	neg	pos	23	n.v.	nein
LDN-HBV-08	m	36	A*02:02 A*23:01 B*15:03 B*58:02 C*02:02 C*06:02	289	E	n.v.	neg	neg	40	n.v.	nein
LDN-HBV-09	w	55	A*24:02 A*25:01 B*08:01 B*18:01 C*07:01	1397	A	n.v.	neg	pos	27	n.v.	nein
LDN-HBV-10	m	54	A*02:01 A*02:05/08 B*44:29 B*50:01 C*05:01 C*06:02	5030	D	n.v.	neg	neg	31	n.v.	nein
LDN-HBV-12	m	n.v.	A*03:01 A*30:01 B*13:02 B*35:03 C*04:01 C*06:02	2000	D	n.v.	n.v.	neg	n.v.	n.v.	nein
LDN-HBV-14	w	46	A*23:01 A*33:01 B*15:10 B*44:03 C*03:03 C*03:04	6642	A	n.v.	neg	pos	21	n.v.	nein
LDN-HBV-15	m	37	A*02:01 A*11:01 B*15:11 B*56:02 C*01:02 C*03:03	288	B	870	n.v.	neg	37	n.v.	nein
LDN-HBV-16	w	43	A*11:01 A*32:01 B*35:01 B*55:01 C*01:02 C*04:01	1295	D	n.v.	neg	neg	22	n.v.	nein
LDN-HBV-17	m	36	A*02:06 A*11:01 B*15:02 B*40:06 C*08:01	2,4E+08	B	n.v.	pos	pos	46	n.v.	nein
LDN-HBV-18	m	66	A*02:11 A*33:01/03 B*40:06 B*44:03 C*04:01 C*07:01	242	D	n.v.	neg	neg	24	n.v.	nein
LDN-HBV-19	w	30	A*01:01 A*11:01 B*44:03 B*57:01 C*04:01 C*06:02	3934	A	n.v.	neg	pos	14	n.v.	nein
LDN-HBV-20	m	49	A*24:02 B*35:03 B*35:06 C*12:02 C*12:03	5217	D	807	neg	neg	38	n.v.	nein
LDN-HBV-21	w	29	A*03:01 A*26:01 B*42:01 B*57:03 C*07:01 C*17:01	661	E	250	neg	neg	15	n.v.	nein
LDN-HBV-22	m	52	A*02:01 A*32:01 B*07:02 B*35:08	721	D	166	neg	neg	21	n.v.	nein

			C*04:01 C*07:02								
LDN-HBV-24	w	n.v.	A*02:01 A*11:01 B*46:01 B*58:01 C*01:02 C*03:02	459529	B	n.v.	neg	neg	27	n.v.	nein
LDN-HBV-25	w	31	A*02:01 A*11:01 B*39:01 B*55:01 C*03:03 C*12:03	2138	D	5610	neg	neg	46	n.v.	nein
LDN-HBV-26	w	37	A*03:01 A*31:01 B*35:06 B*40:01 C*03:04 C*04:01	977	A	30859	neg	pos	21	n.v.	nein
LDN-HBV-28	w	31	A*30:02 A*34:02 B*13:02 B*53:01 C*04:01 C*08:04	1175	E	n.v.	neg	neg	28	n.v.	nein
LDN-HBV-29	m	38	A*02:06/10 A*11:01 B*37:01 B*57:01 C*06:02	6166	D	n.v.	neg	neg	23	n.v.	nein
LDN-HBV-30	w	51	A*01:01 A*03:01 B*44:01 B*57:02 C*04:01 C*07:01	12023	E	n.v.	neg	neg	32	n.v.	nein
LDN-HBV-31	m	34	A*33:01/03 A*74:01 B*15:03 B*15:16 C*02:02 C*14:02	1148	E	18758	neg	neg	38	n.v.	nein
LDN-HBV-32	m	29	A*02:01 A*30:04 B*40:01 B*51:01 C*03:04 C*16:01	11749	A	n.v.	neg	neg	48	n.v.	nein
LDN-HBV-35	w	30	A*02:02 A*30:01 B*07:02 B*41:02 C*07:02 C*17:01	933	E	n.v.	neg	neg	17	n.v.	nein
LDN-HBV-36	m	35	A*23:01 A*31:01 B*07:02 B*35:03 C*04:01 C*07:02	513	D	250	neg	neg	24	n.v.	nein
LDN-HBV-38	w	39	A*03:01 A*24:02 B*41:02 B*51:01 C*04:01 C*15:02	631	D	n.v.	neg	neg	65	n.v.	nein
LDN-HBV-39	m	33	A*02:01 A*11:01 B*35:03 B*51:01 C*04:01 C*14:02	513	D	n.v.	neg	neg	31	n.v.	nein
LDN-HBV-40	m	37	A*02:01 A*03:01 B*07:02 C*07:02	14125	A	n.v.	neg	pos	40	n.v.	nein
LDN-HBV-41	w	36	A*02:01 A*11:01 B*15:02 B*46:01 C*01:02 C*08:01	60256	B	n.v.	neg	neg	14	n.v.	nein
LDN-HBV-42	w	29	A*02:01 A*66:01 B*15:01 B*51:01	1023	D	n.v.	neg	neg	20	n.v.	nein

			C*03:03 C*07:01								
LDN-HBV-43	w	29	A*24:02 A*25:01 B*44:02 B*51:01 C*07:04 C*12:03	9772	D	58050	neg	neg	34	n.v.	nein
LDN-HBV-44	w	73	A*11:01 A*33:01/03 B*38:02 B*58:01 C*03:02 C*07:02	815499	B	3317	neg	neg	89	n.v.	nein
LDN-HBV-45	m	28	A*01:01 A*03:01 B*52:01 B*57:01 C*06:02 C*12:02	1549	D	n.v.	neg	neg	125	n.v.	nein
LDN-HBV-46	w	41	A*02:01 A*11:01 B*14:01 B*15:02 C*03:03 C*08:02	3981	A	n.v.	neg	neg	34	n.v.	nein
LDN-HBV-47	w	61	A*01:01 A*03:01 B*07:02 B*57:01 C*06:02 C*07:02	1380	D	n.v.	neg	neg	27	n.v.	nein
LDN-HBV-49	m	44	A*33:01/03 A*68:01 B*27:05 C*02:02	1307	D	n.v.	n.v.	neg	24	n.v.	nein
LDN-HBV-50	w	30	A*01:01 A*03:01 B*38:01 B*44:03 C*04:01 C*12:03	4365	A	n.v.	neg	pos	27	n.v.	nein
LDN-HBV-51	w	34	A*03:01 A*11:01 B*52:01 B*56:01 C*01:02 C*12:02	2142	A	n.v.	neg	neg	36	n.v.	nein
LDN-HBV-52	w	44	A*33:01/03 B*58:01 C*03:02	29134	B	n.v.	neg	neg	25	n.v.	nein
LDN-HBV-53	w	51	A*23:01 A*26:01 B*08:01 B*35:01 C*03:04 C*07:02	2364	E	n.v.	neg	neg	32	n.v.	nein
LDN-HBV-56	m	28	A*24:02 A*33:01/03 B*40:06 B*58:01 C*03:02 C*12:02	2673	D	n.v.	neg	neg	17	n.v.	nein
LDN-HBV-57	m	43	A*02:01 A*68:01 B*51:01 C*06:02 C*07:04	6381	D	n.v.	neg	neg	48	n.v.	nein
LDN-HBV-61	m	33	A*02:01 A*26:01 B*38:01 B*44:02 C*07:04 C*12:03	1183	D	n.v.	neg	neg	68	n.v.	nein
LDN-HBV-63	w	43	A*11:01 A*33:01/03 B*35:03 B*56:01 C*01:02 C*07:01	2407	A	n.v.	neg	pos	24	n.v.	nein
LDN-HBV-64	m	30	A*31:01 A*34:02 B*07:05 B*14:02 C*08:02 C*15:05/06	35631	D	2178	neg	neg	49	n.v.	nein

LDN-HBV-65	w	37	A*03:01 A*11:01 B*07:02 B*44:02 C*05:01 C*07:02	17378	A	n.v.	neg	pos	26	n.v.	nein
LDN-HBV-68	m	46	A*23:01 A*33:01 B*35:01 B*40:01 C*03:03 C*03:04	4349	E	n.v.	neg	neg	26	n.v.	nein
LDN-HBV-71	m	n.v.	A*29:01/02 A*30:01 B*44:03 B*50:01 C*06:02 C*16:01	2809	D	n.v.	neg	neg	18	n.v.	nein

m: männlich, w: weiblich, n.v.: nicht verfügbar, k.A.: keine Angaben, pos: positiv, neg: negativ

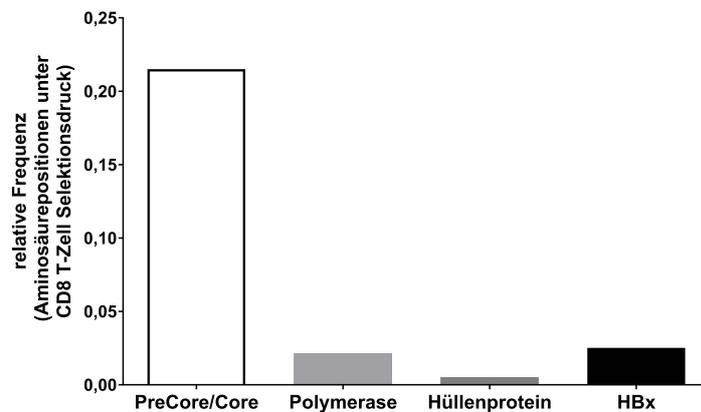


Abbildung 6.1: Relative Häufigkeit von Positionen unter Selektionsdruck in unterschiedlichen Proteinen

Die relative Häufigkeit von Aminosäure-Positionen, die unter Selektionsdruck waren, wurde berechnet für das PräCore/Core-Protein, die Polymerase, das Hüllprotein und das HBx-Protein.

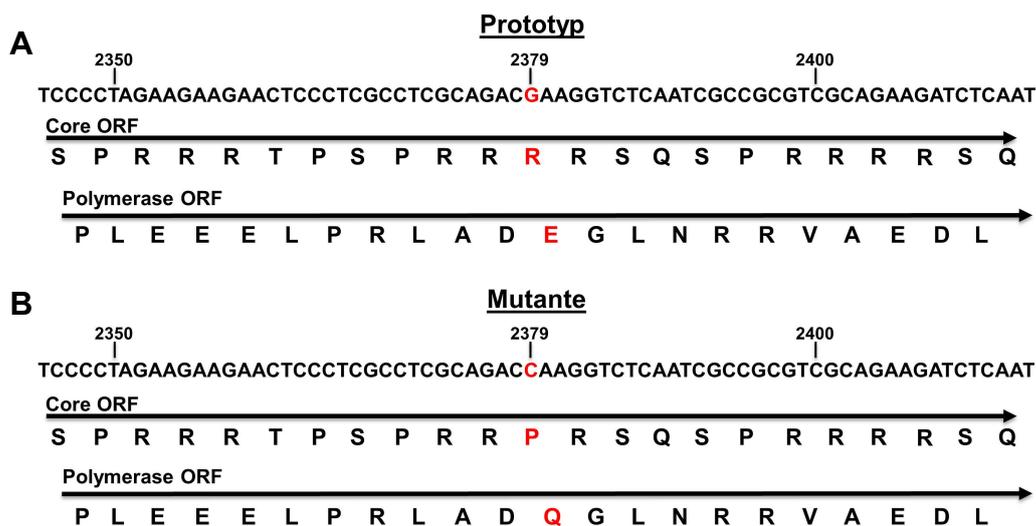


Abbildung 6.2: Einfluss der Substitution G2379C auf die überlappende Region des Core-Proteins und der Polymerase

Die Prototypsequenz auf Nukleotidebene und Aminosäureebene der überlappenden Region des Core-ORFs und des Polymerase-ORFs ist dargestellt (A). Durch die Substitution G2379C auf Nukleotidebene fand in beiden ORF ein Aminosäureaustausch statt (B). ORF: offener Leserahmen

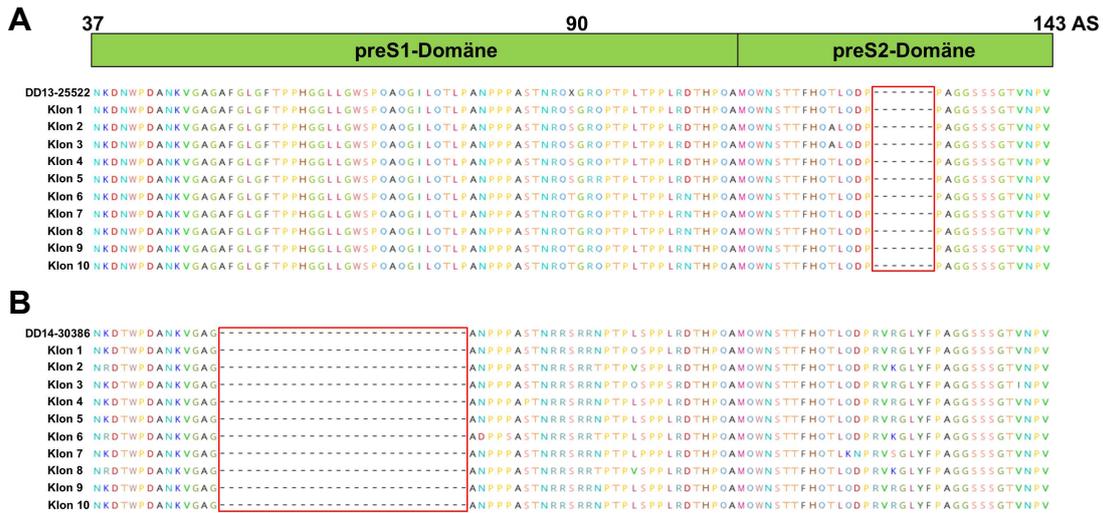


Abbildung 6.3: Detektion von Deletionen innerhalb der HBV-Quasispezies mittels klonaler Analyse von PCR-Fragmenten bei Patienten mit Deletionen in der autologen Sanger-Sequenz

Das HBV-Polymerase-Fragment von DD13-10103 (A) und DD14-30386 (B) wurden über *Gibson Assembly* in den pUC18-Vektor kloniert und in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen transformiert. Von jedem Patienten wurde die Plasmid-DNA von zehn Einzelklonen isoliert und über Sanger-Sequenzierung analysiert. Als Referenzsequenz wurde die autologe Sanger-Sequenz der einzelnen Patienten verwendet. Dargestellt sind die Aminosäurepositionen (AS) 37 bis 143 des Hüllproteins. Deletionen sind in Rot markiert.

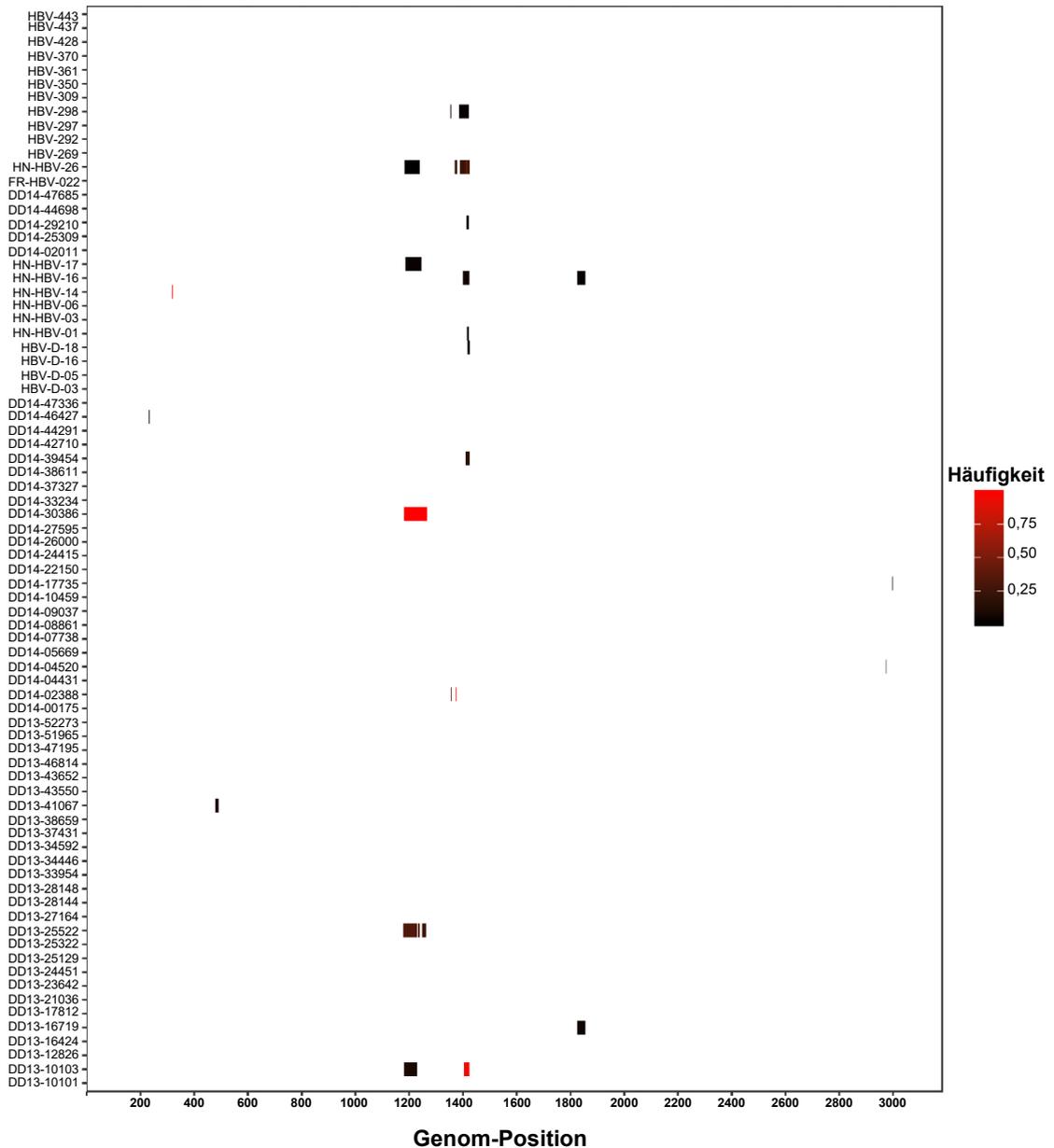


Abbildung 6.4: Detektion von Deletionen innerhalb einer Quasispezies mittels NGS

Die Häufigkeit von Deletionen innerhalb der Quasispezies von 116 Patienten wurde mittels NGS detektiert. Für jedes *Alignment* wurde die vorhandene autologe Sanger-Sequenz als Referenzsequenz verwendet, deren Startpunkt das Startcodon des PräCore/Core-ORF ist. Die Sequenztiefe eines Fragments lag bei ca. 10.000 *Reads*. Diese Abbildung wurde freundlicherweise von Martin Theissen, Institut für Bioinformatik der Universität Duisburg Essen, zur Verfügung gestellt. NGS: Next Generation Sequencing, ORF: offener Leserahmen

7 Literaturverzeichnis

- Abbott, W.G., Tsai, P., Leung, E., Trevarton, A., Ofanoa, M., Hornell, J., et al. (2010). Associations between HLA class I alleles and escape mutations in the hepatitis B virus core gene in New Zealand-resident Tongans. *J Virol* 84(1), 621-629. doi: 10.1128/JVI.01471-09.
- Abe, K., Thung, S.N., Wu, H.C., Tran, T.T., Le Hoang, P., Truong, K.D., et al. (2009). Pre-S2 deletion mutants of hepatitis B virus could have an important role in hepatocarcinogenesis in Asian children. *Cancer Sci* 100(12), 2249-2254. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01309.x.
- Abraham, R., Doerr, H.W., Braun, W., Stemler, M., Will, H., Hess, G., et al. (1989). Antibodies to hepatitis B virus x-protein in sera of patients with acute and chronic active hepatitis. *Med Microbiol Immunol* 178(4), 187-197. doi: 10.1007/bf00202552.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124(4), 783-801. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015.
- Akya, A., Farasat, A., Ghadiri, K., and Rostamian, M. (2019). Identification of HLA-I restricted epitopes in six vaccine candidates of *Leishmania tropica* using immunoinformatics and molecular dynamics simulation approaches. *Infect Genet Evol* 75, 103953. doi: 10.1016/j.meegid.2019.103953.
- Allen, T.M., Altfeld, M., Yu, X.G., O'Sullivan, K.M., Lichterfeld, M., Le Gall, S., et al. (2004). Selection, transmission, and reversion of an antigen-processing cytotoxic T-lymphocyte escape mutation in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 78(13), 7069-7078. doi: 10.1128/JVI.78.13.7069-7078.2004.
- Almeida, J.D., Rubenstein, D., and Stott, E.J. (1971). New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. *Lancet* 2(7736), 1225-1227. doi: 10.1016/s0140-6736(71)90543-5.
- Alter, G., Heckerman, D., Schneidewind, A., Fadda, L., Kadie, C.M., Carlson, J.M., et al. (2011). HIV-1 adaptation to NK-cell-mediated immune pressure. *Nature* 476(7358), 96-100. doi: 10.1038/nature10237.
- Ando, K., Guidotti, L.G., Wirth, S., Ishikawa, T., Missale, G., Moriyama, T., et al. (1994). Class I-restricted cytotoxic T lymphocytes are directly cytopathic for their target cells in vivo. *J Immunol* 152(7), 3245-3253.
- Anonymous (1947). Homologous serum hepatitis. *Lancet* 2, pp. 691-692.
- Asabe, S., Wieland, S.F., Chattopadhyay, P.K., Roederer, M., Engle, R.E., Purcell, R.H., et al. (2009). The size of the viral inoculum contributes to the outcome of hepatitis B virus infection. *J Virol* 83(19), 9652-9662. doi: 10.1128/JVI.00867-09.
- Backes, S., Jager, C., Dembek, C.J., Kosinska, A.D., Bauer, T., Stephan, A.S., et al. (2016). Protein-prime/modified vaccinia virus Ankara vector-boost vaccination overcomes tolerance in high-antigenemic HBV-transgenic mice. *Vaccine* 34(7), 923-932. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.12.060.
- Banninger, P., Altorfer, J., Frosner, G.G., Pirovino, M., Gudat, F., Bianchi, L., et al. (1983). Prevalence and significance of anti-HBc IgM (radioimmunoassay) in acute and chronic hepatitis B and in blood donors. *Hepatology* 3(3), 337-342. doi: 10.1002/hep.1840030310.
- Bartenschlager, R., and Schaller, H. (1988). The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription. *EMBO J* 7(13), 4185-4192.

- Beck, J., and Nassal, M. (2007). Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* 13(1), 48-64. doi: 10.3748/wjg.v13.i1.48.
- Belloni, L., Pollicino, T., De Nicola, F., Guerrieri, F., Raffa, G., Fanciulli, M., et al. (2009). Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(47), 19975-19979. doi: 10.1073/pnas.0908365106.
- Bensch, B., Martin, B., and Thimme, R. (2014). Restoration of HBV-specific CD8+ T cell function by PD-1 blockade in inactive carrier patients is linked to T cell differentiation. *J Hepatol* 61(6), 1212-1219. doi: 10.1016/j.jhep.2014.07.005.
- Bensch, B., Seigel, B., Ruhl, M., Timm, J., Kuntz, M., Blum, H.E., et al. (2010). Coexpression of PD-1, 2B4, CD160 and KLRG1 on exhausted HCV-specific CD8+ T cells is linked to antigen recognition and T cell differentiation. *PLoS Pathog* 6(6), e1000947. doi: 10.1371/journal.ppat.1000947.
- Berkhoff, E.G., de Wit, E., Geelhoed-Mieras, M.M., Boon, A.C., Symons, J., Fouchier, R.A., et al. (2006). Fitness costs limit escape from cytotoxic T lymphocytes by influenza A viruses. *Vaccine* 24(44-46), 6594-6596. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.05.051.
- Bertoletti, A., and Ferrari, C. (2012). Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection. *Gut* 61(12), 1754-1764. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301073.
- Bertoni, R., Sidney, J., Fowler, P., Chesnut, R.W., Chisari, F.V., and Sette, A. (1997). Human histocompatibility leukocyte antigen-binding supermotifs predict broadly cross-reactive cytotoxic T lymphocyte responses in patients with acute hepatitis. *J Clin Invest* 100(3), 503-513. doi: 10.1172/JCI119559.
- Bhatnagar, P.K., Papas, E., Blum, H.E., Milich, D.R., Nitecki, D., Karels, M.J., et al. (1982). Immune response to synthetic peptide analogues of hepatitis B surface antigen specific for the a determinant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(14), 4400-4404. doi: 10.1073/pnas.79.14.4400.
- Birnbaum, F., and Nassal, M. (1990). Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core protein. *J Virol* 64(7), 3319-3330.
- Blumberg, B.S., Alter, H.J., and Visnich, S. (1965). A "New" Antigen in Leukemia Sera. *JAMA* 191, 541-546. doi: 10.1001/jama.1965.03080070025007.
- Blumberg, B.S., Gerstley, B.J., Hungerford, D.A., London, W.T., and Sutnick, A.I. (1967). A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med* 66(5), 924-931. doi: 10.7326/0003-4819-66-5-924.
- Boltjes, A., van Montfoort, N., Biesta, P.J., Op den Brouw, M.L., Kwekkeboom, J., van der Laan, L.J., et al. (2015). Kupffer cells interact with hepatitis B surface antigen in vivo and in vitro, leading to proinflammatory cytokine production and natural killer cell function. *J Infect Dis* 211(8), 1268-1278. doi: 10.1093/infdis/jiu599.
- Boni, C., Barili, V., Acerbi, G., Rossi, M., Vecchi, A., Laccabue, D., et al. (2019a). HBV Immune-Therapy: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. *Int J Mol Sci* 20(11). doi: 10.3390/ijms20112754.
- Boni, C., Fiscaro, P., Valdatta, C., Amadei, B., Di Vincenzo, P., Giuberti, T., et al. (2007). Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J Virol* 81(8), 4215-4225. doi: 10.1128/JVI.02844-06.
- Boni, C., Janssen, H.L.A., Rossi, M., Yoon, S.K., Vecchi, A., Barili, V., et al. (2019b). Combined GS-4774 and Tenofovir Therapy Can Improve HBV-Specific T-Cell Responses in Patients With Chronic Hepatitis. *Gastroenterology* 157(1), 227-241 e227. doi: 10.1053/j.gastro.2019.03.044.

- Bouchard, M.J., and Schneider, R.J. (2004). The enigmatic X gene of hepatitis B virus. *J Virol* 78(23), 12725-12734. doi: 10.1128/JVI.78.23.12725-12734.2004.
- Bouchard, M.J., Wang, L.H., and Schneider, R.J. (2001). Calcium signaling by HBx protein in hepatitis B virus DNA replication. *Science* 294(5550), 2376-2378. doi: 10.1126/science.294.5550.2376.
- Boutwell, C.L., Carlson, J.M., Lin, T.H., Seese, A., Power, K.A., Peng, J., et al. (2013). Frequent and variable cytotoxic-T-lymphocyte escape-associated fitness costs in the human immunodeficiency virus type 1 subtype B Gag proteins. *J Virol* 87(7), 3952-3965. doi: 10.1128/JVI.03233-12.
- Boyum, A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97, 77-89.
- Brockman, M.A., Schneidewind, A., Lahaie, M., Schmidt, A., Miura, T., Desouza, I., et al. (2007). Escape and compensation from early HLA-B57-mediated cytotoxic T-lymphocyte pressure on human immunodeficiency virus type 1 Gag alter capsid interactions with cyclophilin A. *J Virol* 81(22), 12608-12618. doi: 10.1128/JVI.01369-07.
- Brunetto, M.R., Moriconi, F., Bonino, F., Lau, G.K., Farci, P., Yurdaydin, C., et al. (2009). Hepatitis B virus surface antigen levels: a guide to sustained response to peginterferon alfa-2a in HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 49(4), 1141-1150. doi: 10.1002/hep.22760.
- Bruss, V., and Gerlich, W.H. (1988). Formation of transmembraneous hepatitis B e-antigen by cotranslational in vitro processing of the viral precore protein. *Virology* 163(2), 268-275. doi: 10.1016/0042-6822(88)90266-8.
- Buckwold, V.E., Xu, Z., Chen, M., Yen, T.S., and Ou, J.H. (1996). Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *J Virol* 70(9), 5845-5851.
- Budeus, B., Timm, J., and Hoffmann, D. (2016). SeqFeatR for the Discovery of Feature-Sequence Associations. *PLoS One* 11(1), e0146409. doi: 10.1371/journal.pone.0146409.
- Burda, M.R., Gunther, S., Dandri, M., Will, H., and Petersen, J. (2001). Structural and functional heterogeneity of naturally occurring hepatitis B virus variants. *Antiviral Res* 52(2), 125-138. doi: 10.1016/s0166-3542(01)00177-2.
- Buster, E.H., Flink, H.J., Cakaloglu, Y., Simon, K., Trojan, J., Tabak, F., et al. (2008). Sustained HBeAg and HBsAg loss after long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with peginterferon alpha-2b. *Gastroenterology* 135(2), 459-467. doi: 10.1053/j.gastro.2008.05.031.
- Carlson, J.M., Brumme, C.J., Martin, E., Listgarten, J., Brockman, M.A., Le, A.Q., et al. (2012a). Correlates of protective cellular immunity revealed by analysis of population-level immune escape pathways in HIV-1. *J Virol* 86(24), 13202-13216. doi: 10.1128/JVI.01998-12.
- Carlson, J.M., Brumme, Z.L., Rousseau, C.M., Brumme, C.J., Matthews, P., Kadie, C., et al. (2008). Phylogenetic dependency networks: inferring patterns of CTL escape and codon covariation in HIV-1 Gag. *PLoS Comput Biol* 4(11), e1000225. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000225.
- Carlson, J.M., Listgarten, J., Pfeifer, N., Tan, V., Kadie, C., Walker, B.D., et al. (2012b). Widespread impact of HLA restriction on immune control and escape pathways of HIV-1. *J Virol* 86(9), 5230-5243. doi: 10.1128/JVI.06728-11.

- Carman, W.F., Jacyna, M.R., Hadziyannis, S., Karayiannis, P., McGarvey, M.J., Makris, A., et al. (1989). Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 2(8663), 588-591. doi: 10.1016/s0140-6736(89)90713-7.
- Carman, W.F., Van Deursen, F.J., Mimms, L.T., Hardie, D., Coppola, R., Decker, R., et al. (1997). The prevalence of surface antigen variants of hepatitis B virus in Papua New Guinea, South Africa, and Sardinia. *Hepatology* 26(6), 1658-1666. doi: 10.1002/hep.510260640.
- Carman, W.F., Zanetti, A.R., Karayiannis, P., Waters, J., Manzillo, G., Tanzi, E., et al. (1990). Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 336(8711), 325-329. doi: 10.1016/0140-6736(90)91874-a.
- Carrington, M., Nelson, G.W., Martin, M.P., Kissner, T., Vlahov, D., Goedert, J.J., et al. (1999). HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science* 283(5408), 1748-1752. doi: 10.1126/science.283.5408.1748.
- CDC (2020). *Viral Hepatitis* [Online]. Centers for Disease Control and Prevention. Available: <https://www.cdc.gov/hepatitis/hbv/index.htm> [Accessed 28 July 2020].
- Chang, C., Enders, G., Sprengel, R., Peters, N., Varmus, H.E., and Ganem, D. (1987). Expression of the precore region of an avian hepatitis B virus is not required for viral replication. *J Virol* 61(10), 3322-3325.
- Chen, B.F., Liu, C.J., Jow, G.M., Chen, P.J., Kao, J.H., and Chen, D.S. (2006a). High prevalence and mapping of pre-S deletion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases. *Gastroenterology* 130(4), 1153-1168. doi: 10.1053/j.gastro.2006.01.011.
- Chen, C.J., Yang, H.I., Su, J., Jen, C.L., You, S.L., Lu, S.N., et al. (2006b). Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 295(1), 65-73. doi: 10.1001/jama.295.1.65.
- Chen, H.S., Kew, M.C., Hornbuckle, W.E., Tennant, B.C., Cote, P.J., Gerin, J.L., et al. (1992). The precore gene of the woodchuck hepatitis virus genome is not essential for viral replication in the natural host. *J Virol* 66(9), 5682-5684.
- Chen, M., Sallberg, M., Hughes, J., Jones, J., Guidotti, L.G., Chisari, F.V., et al. (2005). Immune tolerance split between hepatitis B virus precore and core proteins. *J Virol* 79(5), 3016-3027. doi: 10.1128/JVI.79.5.3016-3027.2005.
- Chen, M.T., Billaud, J.N., Sallberg, M., Guidotti, L.G., Chisari, F.V., Jones, J., et al. (2004). A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(41), 14913-14918. doi: 10.1073/pnas.0406282101.
- Chen, P., Xie, Q., Lu, X., Yu, C., Xu, K., Ruan, B., et al. (2017). Serum HBeAg and HBV DNA levels are not always proportional and only high levels of HBeAg most likely correlate with high levels of HBV DNA: A community-based study. *Medicine (Baltimore)* 96(33), e7766. doi: 10.1097/MD.0000000000007766.
- Cheng, Y., Zhu, Y.O., Becht, E., Aw, P., Chen, J., Poidinger, M., et al. (2019). Multifactorial heterogeneity of virus-specific T cells and association with the progression of human chronic hepatitis B infection. *Sci Immunol* 4(32). doi: 10.1126/sciimmunol.aau6905.
- Chisari, F.V., and Ferrari, C. (1995). Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 13, 29-60. doi: 10.1146/annurev.iy.13.040195.000333.
- Chu, C.M., Shyu, W.C., Kuo, R.W., and Liaw, Y.F. (1988). HLA class I antigen display on hepatocyte membrane in chronic hepatitis B virus infection: its role in the pathogenesis of chronic type B hepatitis. *Hepatology* 8(3), 712-717. doi: 10.1002/hep.1840080358.

- Coates, T., Wilson, R., Patrick, G., Andre, F., and Watson, V. (2001). Hepatitis B vaccines: assessment of the seroprotective efficacy of two recombinant DNA vaccines. *Clin Ther* 23(3), 392-403. doi: 10.1016/s0149-2918(01)80044-8.
- Coleman, P.F. (2006). Detecting hepatitis B surface antigen mutants. *Emerg Infect Dis* 12(2), 198-203. doi: 10.3201/eid1203.050038.
- Cornberg, M., Protzer, U., Petersen, J., Wedemeyer, H., Berg, T., Jilg, W., et al. (2011). [Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis B virus infection - the German guideline]. *Z Gastroenterol* 49(7), 871-930. doi: 10.1055/s-0031-1273462.
- Crowther, R.A., Kiselev, N.A., Bottcher, B., Berriman, J.A., Borisova, G.P., Ose, V., et al. (1994). Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* 77(6), 943-950. doi: 10.1016/0092-8674(94)90142-2.
- Dandri, M., Schirmacher, P., and Rogler, C.E. (1996). Woodchuck hepatitis virus X protein is present in chronically infected woodchuck liver and woodchuck hepatocellular carcinomas which are permissive for viral replication. *J Virol* 70(8), 5246-5254.
- Dane, D.S., Cameron, C.H., and Briggs, M. (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1(7649), 695-698. doi: 10.1016/s0140-6736(70)90926-8.
- Das, A., Ellis, G., Pallant, C., Lopes, A.R., Khanna, P., Peppas, D., et al. (2012). IL-10-producing regulatory B cells in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol* 189(8), 3925-3935. doi: 10.4049/jimmunol.1103139.
- Das, A., Hoare, M., Davies, N., Lopes, A.R., Dunn, C., Kennedy, P.T., et al. (2008). Functional skewing of the global CD8 T cell population in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 205(9), 2111-2124. doi: 10.1084/jem.20072076.
- Decorsiere, A., Mueller, H., van Breugel, P.C., Abdul, F., Gerossier, L., Beran, R.K., et al. (2016). Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. *Nature* 531(7594), 386-389. doi: 10.1038/nature17170.
- Deguchi, M., Yamashita, N., Kagita, M., Asari, S., Iwatani, Y., Tsuchida, T., et al. (2004). Quantitation of hepatitis B surface antigen by an automated chemiluminescent microparticle immunoassay. *J Virol Methods* 115(2), 217-222. doi: 10.1016/j.jviromet.2003.10.002.
- Depla, E., Van der Aa, A., Livingston, B.D., Crimi, C., Allosery, K., De Brabandere, V., et al. (2008). Rational design of a multiepitope vaccine encoding T-lymphocyte epitopes for treatment of chronic hepatitis B virus infections. *J Virol* 82(1), 435-450. doi: 10.1128/JVI.01505-07.
- Desmond, C.P., Gaudieri, S., James, I.R., Pfafferott, K., Chopra, A., Lau, G.K., et al. (2012). Viral adaptation to host immune responses occurs in chronic hepatitis B virus (HBV) infection, and adaptation is greatest in HBV e antigen-negative disease. *J Virol* 86(2), 1181-1192. doi: 10.1128/JVI.05308-11.
- Deterding, K., Constantinescu, I., Nedelcu, F.D., Gervain, J., Nemecek, V., Srtuncky, O., et al. (2008). Prevalence of HBV genotypes in Central and Eastern Europe. *J Med Virol* 80(10), 1707-1711. doi: 10.1002/jmv.21294.
- Dimitropoulou, D., Karakantza, M., Theodorou, G.L., Leonidou, L., Assimakopoulos, S.F., Mouzaki, A., et al. (2013). Serum cytokine profile in patients with hepatitis B e antigen-negative chronic active hepatitis B and inactive hepatitis B virus carriers. *World J Gastrointest Pathophysiol* 4(1), 24-27. doi: 10.4291/wjgp.v4.i1.24.
- Drexler, J.F., Geipel, A., Konig, A., Corman, V.M., van Riel, D., Leijten, L.M., et al. (2013). Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(40), 16151-16156. doi: 10.1073/pnas.1308049110.

- Dudareva, S., Kremer, K., Harder, T., and Zimmermann, R. (2019). Virushepatitis B und D im Jahr 2018. *Epid Bull* 29, 261-270.
- Dunn, C., Brunetto, M., Reynolds, G., Christophides, T., Kennedy, P.T., Lampertico, P., et al. (2007). Cytokines induced during chronic hepatitis B virus infection promote a pathway for NK cell-mediated liver damage. *J Exp Med* 204(3), 667-680. doi: 10.1084/jem.20061287.
- Dunn, C., Peppas, D., Khanna, P., Nebbia, G., Jones, M., Brendish, N., et al. (2009). Temporal analysis of early immune responses in patients with acute hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 137(4), 1289-1300. doi: 10.1053/j.gastro.2009.06.054.
- EASL (2017). EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 67(2), 370-398. doi: 10.1016/j.jhep.2017.03.021.
- Erdmann, N., Du, V.Y., Carlson, J., Schaefer, M., Jureka, A., Sterrett, S., et al. (2015). HLA Class-II Associated HIV Polymorphisms Predict Escape from CD4+ T Cell Responses. *PLoS Pathog* 11(8), e1005111. doi: 10.1371/journal.ppat.1005111.
- Fauriat, C., Long, E.O., Ljunggren, H.G., and Bryceson, Y.T. (2010). Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 115(11), 2167-2176. doi: 10.1182/blood-2009-08-238469.
- Feitelson, M.A., and Lee, J. (2007). Hepatitis B virus integration, fragile sites, and hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett* 252(2), 157-170. doi: 10.1016/j.canlet.2006.11.010.
- Fernholz, D., Galle, P.R., Stemler, M., Brunetto, M., Bonino, F., and Will, H. (1993). Infectious hepatitis B virus variant defective in pre-S2 protein expression in a chronic carrier. *Virology* 194(1), 137-148. doi: 10.1006/viro.1993.1243.
- Ferrando-Martinez, S., Huang, K., Bennett, A.S., Sterba, P., Yu, L., Suzich, J.A., et al. (2019). HBeAg seroconversion is associated with a more effective PD-L1 blockade during chronic hepatitis B infection. *JHEP Rep* 1(3), 170-178. doi: 10.1016/j.jhepr.2019.06.001.
- Ferrari, C., Bertoletti, A., Penna, A., Cavalli, A., Valli, A., Missale, G., et al. (1991). Identification of immunodominant T cell epitopes of the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Clin Invest* 88(1), 214-222. doi: 10.1172/JCI115280.
- Ferrari, C., Cavalli, A., Penna, A., Valli, A., Bertoletti, A., Pedretti, G., et al. (1992). Fine specificity of the human T-cell response to the hepatitis B virus preS1 antigen. *Gastroenterology* 103(1), 255-263. doi: 10.1016/0016-5085(92)91121-j.
- Ferrari, C., Penna, A., Bertoletti, A., Valli, A., Antoni, A.D., Giuberti, T., et al. (1990). Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol* 145(10), 3442-3449.
- Fiorentino, D.F., Bond, M.W., and Mosmann, T.R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170(6), 2081-2095. doi: 10.1084/jem.170.6.2081.
- Fisicaro, P., Barili, V., Montanini, B., Acerbi, G., Ferracin, M., Guerrieri, F., et al. (2017). Targeting mitochondrial dysfunction can restore antiviral activity of exhausted HBV-specific CD8 T cells in chronic hepatitis B. *Nat Med* 23(3), 327-336. doi: 10.1038/nm.4275.
- Fisicaro, P., Valdatta, C., Boni, C., Massari, M., Mori, C., Zerbini, A., et al. (2009). Early kinetics of innate and adaptive immune responses during hepatitis B virus infection. *Gut* 58(7), 974-982. doi: 10.1136/gut.2008.163600.
- Fisicaro, P., Valdatta, C., Massari, M., Loggi, E., Biasini, E., Sacchelli, L., et al. (2010). Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1

- pathway in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 138(2), 682-693, 693 e681-684. doi: 10.1053/j.gastro.2009.09.052.
- Fitzmaurice, K., Petrovic, D., Ramamurthy, N., Simmons, R., Merani, S., Gaudieri, S., et al. (2011). Molecular footprints reveal the impact of the protective HLA-A*03 allele in hepatitis C virus infection. *Gut* 60(11), 1563-1571. doi: 10.1136/gut.2010.228403.
- Fleischer, R.D., and Lok, A.S. (2009). Myopathy and neuropathy associated with nucleos(t)ide analog therapy for hepatitis B. *J Hepatol* 51(4), 787-791. doi: 10.1016/j.jhep.2009.06.011.
- Fontaine, H., Kahi, S., Chazallon, C., Bourguine, M., Varaut, A., Buffet, C., et al. (2015). Anti-HBV DNA vaccination does not prevent relapse after discontinuation of analogues in the treatment of chronic hepatitis B: a randomised trial--ANRS HB02 VAC-ADN. *Gut* 64(1), 139-147. doi: 10.1136/gutjnl-2013-305707.
- Francois, G., Kew, M., Van Damme, P., Mphahlele, M.J., and Meheus, A. (2001). Mutant hepatitis B viruses: a matter of academic interest only or a problem with far-reaching implications? *Vaccine* 19(28-29), 3799-3815. doi: 10.1016/s0264-410x(01)00108-6.
- Franzese, O., Kennedy, P.T., Gehring, A.J., Gotto, J., Williams, R., Maini, M.K., et al. (2005). Modulation of the CD8+ T-cell response by CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection. *J Virol* 79(6), 3322-3328. doi: 10.1128/JVI.79.6.3322-3328.2005.
- Gaggar, A., Coeshott, C., Apelian, D., Rodell, T., Armstrong, B.R., Shen, G., et al. (2014). Safety, tolerability and immunogenicity of GS-4774, a hepatitis B virus-specific therapeutic vaccine, in healthy subjects: a randomized study. *Vaccine* 32(39), 4925-4931. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.07.027.
- Galibert, F., Chen, T.N., and Mandart, E. (1982). Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome: comparison with the hepatitis B virus sequence. *J Virol* 41(1), 51-65. doi: 10.1128/JVI.41.1.51-65.1982.
- Ganem, D., and Prince, A.M. (2004). Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 350(11), 1118-1129. doi: 10.1056/NEJMra031087.
- Gehring, A.J., Sun, D., Kennedy, P.T., Nolte-'t Hoen, E., Lim, S.G., Wasser, S., et al. (2007). The level of viral antigen presented by hepatocytes influences CD8 T-cell function. *J Virol* 81(6), 2940-2949. doi: 10.1128/JVI.02415-06.
- Gerlich, W.H. (2013). Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. *Virology* 453(2), 239. doi: 10.1016/j.virus.2013.07.002.
- Gerlich, W.H., and Robinson, W.S. (1980). Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* 21(3), 801-809. doi: 10.1016/0092-8674(80)90443-2.
- Gerlich, W.H., Uy, A., Lambrecht, F., and Thomssen, R. (1986). Cutoff levels of immunoglobulin M antibody against viral core antigen for differentiation of acute, chronic, and past hepatitis B virus infections. *J Clin Microbiol* 24(2), 288-293.
- Glebe, D., and Bremer, C.M. (2013). The molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis* 33(2), 103-112. doi: 10.1055/s-0033-1345717.
- Godon, O., Fontaine, H., Kahi, S., Meritet, J.F., Scott-Algara, D., Pol, S., et al. (2014). Immunological and antiviral responses after therapeutic DNA immunization in chronic hepatitis B patients efficiently treated by analogues. *Mol Ther* 22(3), 675-684. doi: 10.1038/mt.2013.274.
- Goepfert, P.A., Lumm, W., Farmer, P., Matthews, P., Prendergast, A., Carlson, J.M., et al. (2008). Transmission of HIV-1 Gag immune escape mutations is associated with reduced viral load in linked recipients. *J Exp Med* 205(5), 1009-1017. doi: 10.1084/jem.20072457.

- Goulder, P.J., Brander, C., Tang, Y., Tremblay, C., Colbert, R.A., Addo, M.M., et al. (2001). Evolution and transmission of stable CTL escape mutations in HIV infection. *Nature* 412(6844), 334-338. doi: 10.1038/35085576.
- Goulder, P.J., Phillips, R.E., Colbert, R.A., McAdam, S., Ogg, G., Nowak, M.A., et al. (1997). Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat Med* 3(2), 212-217. doi: 10.1038/nm0297-212.
- Grandjacques, C., Pradat, P., Stuyver, L., Chevallier, M., Chevallier, P., Pichoud, C., et al. (2000). Rapid detection of genotypes and mutations in the pre-core promoter and the pre-core region of hepatitis B virus genome: correlation with viral persistence and disease severity. *J Hepatol* 33(3), 430-439. doi: 10.1016/s0168-8278(00)80279-2.
- Grethe, S., Heckel, J.O., Rietschel, W., and Hufert, F.T. (2000). Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates. *J Virol* 74(11), 5377-5381. doi: 10.1128/jvi.74.11.5377-5381.2000.
- Guidotti, L.G., and Chisari, F.V. (2006). Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol* 1, 23-61. doi: 10.1146/annurev.pathol.1.110304.100230.
- Guidotti, L.G., Ishikawa, T., Hobbs, M.V., Matzke, B., Schreiber, R., and Chisari, F.V. (1996). Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 4(1), 25-36. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80295-2.
- Gunther, S., Li, B.C., Miska, S., Kruger, D.H., Meisel, H., and Will, H. (1995). A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J Virol* 69(9), 5437-5444.
- Heermann, K.H., Goldmann, U., Schwartz, W., Seyffarth, T., Baumgarten, H., and Gerlich, W.H. (1984). Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol* 52(2), 396-402.
- Heim, K., Binder, B., Sagar, Wieland, D., Hensel, N., Llewellyn-Lacey, S., et al. (2020). TOX defines the degree of CD8+ T cell dysfunction in distinct phases of chronic HBV infection. *Gut*. doi: 10.1136/gutjnl-2020-322404.
- Heinemann, F.M. (2009). HLA Genotyping and Antibody Characterization Using the Luminex Multiplex Technology. *Transfus Med Hemother* 36(4), 273-278. doi: 10.1159/000228834.
- Hofstraat, S.H.I., Falla, A.M., Duffell, E.F., Hahne, S.J.M., Amato-Gauci, A.J., Veldhuijzen, I.K., et al. (2017). Current prevalence of chronic hepatitis B and C virus infection in the general population, blood donors and pregnant women in the EU/EEA: a systematic review. *Epidemiol Infect* 145(14), 2873-2885. doi: 10.1017/S0950268817001947.
- Hoofnagle, J.H., and Di Bisceglie, A.M. (1991). Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis. *Semin Liver Dis* 11(2), 73-83. doi: 10.1055/s-2008-1040426.
- Hoofnagle, J.H., Doo, E., Liang, T.J., Fleischer, R., and Lok, A.S. (2007). Management of hepatitis B: summary of a clinical research workshop. *Hepatology* 45(4), 1056-1075. doi: 10.1002/hep.21627.
- Hoogeveen, R.C., Robidoux, M.P., Schwarz, T., Heydmann, L., Cheney, J.A., Kvistad, D., et al. (2019). Phenotype and function of HBV-specific T cells is determined by the targeted epitope in addition to the stage of infection. *Gut* 68(5), 893-904. doi: 10.1136/gutjnl-2018-316644.
- Hosel, M., Quasdorff, M., Wiegmann, K., Webb, D., Zedler, U., Broxtermann, M., et al. (2009). Not interferon, but interleukin-6 controls early gene expression in hepatitis B virus infection. *Hepatology* 50(6), 1773-1782. doi: 10.1002/hep.23226.

- Hsu, H.Y., Chang, M.H., Hsieh, K.H., Lee, C.Y., Lin, H.H., Hwang, L.H., et al. (1992). Cellular immune response to HBcAg in mother-to-infant transmission of hepatitis B virus. *Hepatology* 15(5), 770-776. doi: 10.1002/hep.1840150505.
- Hsu, H.Y., Chang, M.H., Ni, Y.H., Lin, H.H., Wang, S.M., and Chen, D.S. (1997). Surface gene mutants of hepatitis B virus in infants who develop acute or chronic infections despite immunoprophylaxis. *Hepatology* 26(3), 786-791. doi: 10.1002/hep.510260336.
- Ilan, Y., Nagler, A., Adler, R., Naparstek, E., Or, R., Slavin, S., et al. (1993). Adoptive transfer of immunity to hepatitis B virus after T cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Hepatology* 18(2), 246-252.
- Iloeje, U.H., Yang, H.I., Su, J., Jen, C.L., You, S.L., Chen, C.J., et al. (2006). Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology* 130(3), 678-686. doi: 10.1053/j.gastro.2005.11.016.
- Jegaskanda, S., Ahn, S.H., Skinner, N., Thompson, A.J., Ngyuen, T., Holmes, J., et al. (2014). Downregulation of interleukin-18-mediated cell signaling and interferon gamma expression by the hepatitis B virus e antigen. *J Virol* 88(18), 10412-10420. doi: 10.1128/JVI.00111-14.
- Jiang, B., Himmelsbach, K., Ren, H., Boller, K., and Hildt, E. (2015). Subviral Hepatitis B Virus Filaments, like Infectious Viral Particles, Are Released via Multivesicular Bodies. *J Virol* 90(7), 3330-3341. doi: 10.1128/JVI.03109-15.
- Jung, M.C., Spengler, U., Schraut, W., Hoffmann, R., Zchoval, R., Eisenburg, J., et al. (1991a). Hepatitis B virus antigen-specific T-cell activation in patients with acute and chronic hepatitis B. *J Hepatol* 13(3), 310-317. doi: 10.1016/0168-8278(91)90074-I.
- Jung, M.C., Stemler, M., Weimer, T., Spengler, U., Dohrmann, J., Hoffmann, R., et al. (1991b). Immune response of peripheral blood mononuclear cells to HBx-antigen of hepatitis B virus. *Hepatology* 13(4), 637-643.
- Kao, J.H., Chen, P.J., Lai, M.Y., and Chen, D.S. (2003). Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroenterology* 124(2), 327-334. doi: 10.1053/gast.2003.50053.
- Kaplan, P.M., Greenman, R.L., Gerin, J.L., Purcell, R.H., and Robinson, W.S. (1973). DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J Virol* 12(5), 995-1005.
- Karimzadeh, H., Kiraithe, M.M., Kosinska, A.D., Glaser, M., Fiedler, M., Oberhardt, V., et al. (2018). Amino Acid Substitutions within HLA-B*27-Restricted T Cell Epitopes Prevent Recognition by Hepatitis Delta Virus-Specific CD8(+) T Cells. *J Virol* 92(13). doi: 10.1128/JVI.01891-17.
- Karimzadeh, H., Kiraithe, M.M., Oberhardt, V., Salimi Alizei, E., Bockmann, J., Schulze Zur Wiesch, J., et al. (2019). Mutations in Hepatitis D Virus Allow It to Escape Detection by CD8(+) T Cells and Evolve at the Population Level. *Gastroenterology* 156(6), 1820-1833. doi: 10.1053/j.gastro.2019.02.003.
- Kefalakes, H., Budeus, B., Walker, A., Jochum, C., Hilgard, G., Heinold, A., et al. (2015a). Adaptation of the hepatitis B virus core protein to CD8(+) T-cell selection pressure. *Hepatology* 62(1), 47-56. doi: 10.1002/hep.27771.
- Kefalakes, H., Jochum, C., Hilgard, G., Kahraman, A., Bohrer, A.M., El Hindy, N., et al. (2015b). Decades after recovery from hepatitis B and HBsAg clearance the CD8+ T cell response against HBV core is nearly undetectable. *J Hepatol* 63(1), 13-19. doi: 10.1016/j.jhep.2015.01.030.
- Kefalakes, H., Koh, C., Sidney, J., Amanakis, G., Sette, A., Heller, T., et al. (2019). Hepatitis D Virus-Specific CD8(+) T Cells Have a Memory-Like Phenotype Associated With Viral Immune Escape in Patients With Chronic Hepatitis D Virus Infection. *Gastroenterology* 156(6), 1805-1819 e1809. doi: 10.1053/j.gastro.2019.01.035.

- Kelleher, A.D., Long, C., Holmes, E.C., Allen, R.L., Wilson, J., Conlon, C., et al. (2001). Clustered mutations in HIV-1 gag are consistently required for escape from HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 193(3), 375-386. doi: 10.1084/jem.193.3.375.
- Khan, O., Giles, J.R., McDonald, S., Manne, S., Ngiow, S.F., Patel, K.P., et al. (2019). TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8(+) T cell exhaustion. *Nature* 571(7764), 211-218. doi: 10.1038/s41586-019-1325-x.
- Kim, C.M., Koike, K., Saito, I., Miyamura, T., and Jay, G. (1991). HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 351(6324), 317-320. doi: 10.1038/351317a0.
- Kim, Y., Ponomarenko, J., Zhu, Z., Tamang, D., Wang, P., Greenbaum, J., et al. (2012). Immune epitope database analysis resource. *Nucleic Acids Res* 40(Web Server issue), W525-530. doi: 10.1093/nar/gks438.
- Klein, J., and Sato, A. (2000). The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 343(10), 702-709. doi: 10.1056/NEJM200009073431006.
- Klenerman, P., and McMichael, A. (2007). AIDS/HIV. Finding footprints among the trees. *Science* 315(5818), 1505-1507. doi: 10.1126/science.1140768.
- Knoll, A., Rohrhofer, A., Kochanowski, B., Wurm, E.M., and Jilg, W. (1999). Prevalence of precore mutants in anti-HBe-positive hepatitis B virus carriers in Germany. *J Med Virol* 59(1), 14-18.
- Koumbi, L. (2015). Current and future antiviral drug therapies of hepatitis B chronic infection. *World J Hepatol* 7(8), 1030-1040. doi: 10.4254/wjh.v7.i8.1030.
- Kramvis, A. (2014). Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. *Intervirol* 57(3-4), 141-150. doi: 10.1159/000360947.
- Kramvis, A., Kostaki, E.G., Hatzakis, A., and Paraskevis, D. (2018). Immunomodulatory Function of HBeAg Related to Short-Sighted Evolution, Transmissibility, and Clinical Manifestation of Hepatitis B Virus. *Front Microbiol* 9, 2521. doi: 10.3389/fmicb.2018.02521.
- Krausa, P., and Browning, M.J. (1996). HLA-A2 polymorphism and immune functions. *Eur J Immunogenet* 23(4), 261-274. doi: 10.1111/j.1744-313x.1996.tb00122.x.
- Kuhnhenh, L., Jiang, B., Kubesch, A., Vermehren, J., Knop, V., Susser, S., et al. (2018). Impact of HBV genotype and mutations on HBV DNA and qHBsAg levels in patients with HBeAg-negative chronic HBV infection. *Aliment Pharmacol Ther* 47(11), 1523-1535. doi: 10.1111/apt.14636.
- Kurktschiev, P.D., Raziourrouh, B., Schraut, W., Backmund, M., Wachtler, M., Wendtner, C.M., et al. (2014). Dysfunctional CD8+ T cells in hepatitis B and C are characterized by a lack of antigen-specific T-bet induction. *J Exp Med* 211(10), 2047-2059. doi: 10.1084/jem.20131333.
- Lambert, C., Doring, T., and Prange, R. (2007). Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin. *J Virol* 81(17), 9050-9060. doi: 10.1128/JVI.00479-07.
- Lamontagne, R.J., Bagga, S., and Bouchard, M.J. (2016). Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis. *Hepatoma Res* 2, 163-186. doi: 10.20517/2394-5079.2016.05.
- Lampertico, P., and Liaw, Y.F. (2012). New perspectives in the therapy of chronic hepatitis B. *Gut* 61 Suppl 1, i18-24. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302085.
- Landers, T.A., Greenberg, H.B., and Robinson, W.S. (1977). Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction. *J Virol* 23(2), 368-376.

- Lanford, R.E., Chavez, D., Brasky, K.M., Burns, R.B., 3rd, and Rico-Hesse, R. (1998). Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(10), 5757-5761. doi: 10.1073/pnas.95.10.5757.
- Lau, G.K., Lok, A.S., Liang, R.H., Lai, C.L., Chiu, E.K., Lau, Y.L., et al. (1997). Clearance of hepatitis B surface antigen after bone marrow transplantation: role of adoptive immunity transfer. *Hepatology* 25(6), 1497-1501. doi: 10.1002/hep.510250631.
- Lau, G.K., Piratvisuth, T., Luo, K.X., Marcellin, P., Thongsawat, S., Cooksley, G., et al. (2005). Peginterferon Alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 352(26), 2682-2695. doi: 10.1056/NEJMoa043470.
- Lauer, G.M., Ouchi, K., Chung, R.T., Nguyen, T.N., Day, C.L., Purkis, D.R., et al. (2002). Comprehensive analysis of CD8(+)-T-cell responses against hepatitis C virus reveals multiple unpredicted specificities. *J Virol* 76(12), 6104-6113. doi: 10.1128/jvi.76.12.6104-6113.2002.
- Legat, A., Speiser, D.E., Pircher, H., Zehn, D., and Fuertes Marraco, S.A. (2013). Inhibitory Receptor Expression Depends More Dominantly on Differentiation and Activation than "Exhaustion" of Human CD8 T Cells. *Front Immunol* 4, 455. doi: 10.3389/fimmu.2013.00455.
- Leslie, A., Kavanagh, D., Honeyborne, I., Pfafferott, K., Edwards, C., Pillay, T., et al. (2005). Transmission and accumulation of CTL escape variants drive negative associations between HIV polymorphisms and HLA. *J Exp Med* 201(6), 891-902. doi: 10.1084/jem.20041455.
- Leslie, A.J., Pfafferott, K.J., Chetty, P., Draenert, R., Addo, M.M., Feeney, M., et al. (2004). HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat Med* 10(3), 282-289. doi: 10.1038/nm992.
- Lewellyn, E.B., and Loeb, D.D. (2011a). The arginine clusters of the carboxy-terminal domain of the core protein of hepatitis B virus make pleiotropic contributions to genome replication. *J Virol* 85(3), 1298-1309. doi: 10.1128/JVI.01957-10.
- Lewellyn, E.B., and Loeb, D.D. (2011b). Serine phosphoacceptor sites within the core protein of hepatitis B virus contribute to genome replication pleiotropically. *PLoS One* 6(2), e17202. doi: 10.1371/journal.pone.0017202.
- Li, M., Sun, R., Xu, L., Yin, W., Chen, Y., Zheng, X., et al. (2015). Kupffer Cells Support Hepatitis B Virus-Mediated CD8+ T Cell Exhaustion via Hepatitis B Core Antigen-TLR2 Interactions in Mice. *J Immunol* 195(7), 3100-3109. doi: 10.4049/jimmunol.1500839.
- Li, X., Qin, Y., Liu, Y., Li, F., Liao, H., Lu, S., et al. (2016). PreS deletion profiles of hepatitis B virus (HBV) are associated with clinical presentations of chronic HBV infection. *J Clin Virol* 82, 27-32. doi: 10.1016/j.jcv.2016.06.018.
- Liu, H.G., Fan, Z.P., Chen, W.W., Yang, H.Y., Liu, Q.F., Zhang, H., et al. (2008). A mutant HBs antigen (HBsAg)183-191 epitope elicits specific cytotoxic T lymphocytes in acute hepatitis B patients. *Clin Exp Immunol* 151(3), 441-447. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03570.x.
- Liu, K., Luckenbaugh, L., Ning, X., Xi, J., and Hu, J. (2018). Multiple roles of core protein linker in hepatitis B virus replication. *PLoS Pathog* 14(5), e1007085. doi: 10.1371/journal.ppat.1007085.
- Liu, Q., Zheng, Y., Yu, Y., Tan, Q., and Huang, X. (2012). Identification of HLA-A*0201-restricted CD8+ T-cell epitope C(6)(4)(-)(7)(2) from hepatitis B virus core protein. *Int Immunopharmacol* 13(2), 141-147. doi: 10.1016/j.intimp.2012.03.018.
- Loggi, E., Bihl, F., Chisholm, J.V., 3rd, Biselli, M., Bontadini, A., Vitale, G., et al. (2009). Anti-HBs re-seroconversion after liver transplantation in a patient with past HBV infection

- receiving a HBsAg positive graft. *J Hepatol* 50(3), 625-630. doi: 10.1016/j.jhep.2008.08.026.
- Lok, A.S., Zoulim, F., Dusheiko, G., and Ghany, M.G. (2017). Hepatitis B cure: From discovery to regulatory approval. *Hepatology* 66(4), 1296-1313. doi: 10.1002/hep.29323.
- Lu, H.L., and Liao, F. (2013). Melanoma differentiation-associated gene 5 senses hepatitis B virus and activates innate immune signaling to suppress virus replication. *J Immunol* 191(6), 3264-3276. doi: 10.4049/jimmunol.1300512.
- Lubke, M., Spalt, S., Kowalewski, D.J., Zimmermann, C., Bauersfeld, L., Nelde, A., et al. (2020). Identification of HCMV-derived T cell epitopes in seropositive individuals through viral deletion models. *J Exp Med* 217(3). doi: 10.1084/jem.20191164.
- Lucas, M., Deshpande, P., James, I., Rauch, A., Pfafferott, K., Gaylard, E., et al. (2018). Evidence of CD4(+) T cell-mediated immune pressure on the Hepatitis C virus genome. *Sci Rep* 8(1), 7224. doi: 10.1038/s41598-018-25559-6.
- Lucifora, J., Durantel, D., Testoni, B., Hantz, O., Levrero, M., and Zoulim, F. (2010). Control of hepatitis B virus replication by innate response of HepaRG cells. *Hepatology* 51(1), 63-72. doi: 10.1002/hep.23230.
- Lürmann, A. (1885). Eine Icterusepidemie. *Ber Klin Wochenschr.*, pp. 20–23.
- Lyoo, K.S., Hong, S.W., Song, M.J., Hur, W., Choi, J.E., Piao, L.S., et al. (2011). Subgenotype and genetic variability in the precore/core regions of hepatitis B virus in Korean patients with chronic liver disease. *Intervirology* 54(6), 333-338. doi: 10.1159/000321359.
- MacCallum, F.O. (1972). 1971 International Symposium on Viral Hepatitis. Historical perspectives. *Can Med Assoc J* 106, Suppl:423-426.
- Maeng, C.Y., Ryu, C.J., Gripon, P., Guguen-Guillouzo, C., and Hong, H.J. (2000). Fine mapping of virus-neutralizing epitopes on hepatitis B virus PreS1. *Virology* 270(1), 9-16. doi: 10.1006/viro.2000.0250.
- Maini, M.K., Boni, C., Lee, C.K., Larrubia, J.R., Reignat, S., Ogg, G.S., et al. (2000). The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 191(8), 1269-1280. doi: 10.1084/jem.191.8.1269.
- Marion, P.L., Oshiro, L.S., Regnery, D.C., Scullard, G.H., and Robinson, W.S. (1980). A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(5), 2941-2945. doi: 10.1073/pnas.77.5.2941.
- Martin, P., Dubois, C., Jacquier, E., Dion, S., Mancini-Bourgine, M., Godon, O., et al. (2015). TG1050, an immunotherapeutic to treat chronic hepatitis B, induces robust T cells and exerts an antiviral effect in HBV-persistent mice. *Gut* 64(12), 1961-1971. doi: 10.1136/gutjnl-2014-308041.
- Martinez-Picado, J., Prado, J.G., Fry, E.E., Pfafferott, K., Leslie, A., Chetty, S., et al. (2006). Fitness cost of escape mutations in p24 Gag in association with control of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 80(7), 3617-3623. doi: 10.1128/JVI.80.7.3617-3623.2006.
- Mason, W.S., Burrell, C.J., Casey, J., Gerlich, W.H., Howard, C.R., Kann, M., et al. (2005). Will H Hepadnaviridae. in: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds). *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* . Amsterdam: Elsevier.
- Mason, W.S., Gill, U.S., Litwin, S., Zhou, Y., Peri, S., Pop, O., et al. (2016). HBV DNA Integration and Clonal Hepatocyte Expansion in Chronic Hepatitis B Patients Considered Immune Tolerant. *Gastroenterology* 151(5), 986-998 e984. doi: 10.1053/j.gastro.2016.07.012.

- Mason, W.S., Seal, G., and Summers, J. (1980). Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol* 36(3), 829-836.
- Mauss, S., Berg, T., Rockstroh, J., Sarrazin, C., and Wedemeyer, H. (2018). *HEPATOLOGY A clinical textbook*.
- McClary, H., Koch, R., Chisari, F.V., and Guidotti, L.G. (2000). Relative sensitivity of hepatitis B virus and other hepatotropic viruses to the antiviral effects of cytokines. *J Virol* 74(5), 2255-2264. doi: 10.1128/jvi.74.5.2255-2264.2000.
- McMahon, B.J. (2009). The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 49(5 Suppl), S45-55. doi: 10.1002/hep.22898.
- McMahon, B.J., Dentinger, C.M., Bruden, D., Zanis, C., Peters, H., Hurlburt, D., et al. (2009). Antibody levels and protection after hepatitis B vaccine: results of a 22-year follow-up study and response to a booster dose. *J Infect Dis* 200(9), 1390-1396. doi: 10.1086/606119.
- Menne, S., and Cote, P.J. (2007). The woodchuck as an animal model for pathogenesis and therapy of chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 13(1), 104-124. doi: 10.3748/wjg.v13.i1.104.
- Milich, D.R. (2019). Is the function of the HBeAg really unknown? *Hum Vaccin Immunother* 15(9), 2187-2191. doi: 10.1080/21645515.2019.1607132.
- Milich, D.R., Chen, M.K., Hughes, J.L., and Jones, J.E. (1998). The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence. *J Immunol* 160(4), 2013-2021.
- Milich, D.R., Hughes, J.L., McLachlan, A., Langley, K.E., Thornton, G.B., and Jones, J.E. (1990a). Importance of subtype in the immune response to the pre-S(2) region of the hepatitis B surface antigen. I. T cell fine specificity. *J Immunol* 144(9), 3535-3543.
- Milich, D.R., Jones, J.E., Hughes, J.L., Price, J., Raney, A.K., and McLachlan, A. (1990b). Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(17), 6599-6603. doi: 10.1073/pnas.87.17.6599.
- Milich, D.R., Wolf, S.F., Hughes, J.L., and Jones, J.E. (1995). Interleukin 12 suppresses autoantibody production by reversing helper T-cell phenotype in hepatitis B e antigen transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(15), 6847-6851. doi: 10.1073/pnas.92.15.6847.
- Mizokami, M., Orito, E., Ohba, K., Ikeo, K., Lau, J.Y., and Gojobori, T. (1997). Constrained evolution with respect to gene overlap of hepatitis B virus. *J Mol Evol* 44 Suppl 1, S83-90. doi: 10.1007/pl00000061.
- Mizukoshi, E., Sidney, J., Livingston, B., Ghany, M., Hoofnagle, J.H., Sette, A., et al. (2004). Cellular immune responses to the hepatitis B virus polymerase. *J Immunol* 173(9), 5863-5871. doi: 10.4049/jimmunol.173.9.5863.
- Mohamadkhani, A., Jazii, F.R., Poustchi, H., Nouraein, O., Abbasi, S., Sotoudeh, M., et al. (2009). The role of mutations in core protein of hepatitis B virus in liver fibrosis. *Virology* 496, 209. doi: 10.1016/j.virol.2008.12.009.
- Montano, L., Miescher, G.C., Goodall, A.H., Wiedmann, K.H., Janossy, G., and Thomas, H.C. (1982). Hepatitis B virus and HLA antigen display in the liver during chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2(5), 557-561. doi: 10.1002/hep.1840020508.
- Moore, C.B., John, M., James, I.R., Christiansen, F.T., Witt, C.S., and Mallal, S.A. (2002). Evidence of HIV-1 adaptation to HLA-restricted immune responses at a population level. *Science* 296(5572), 1439-1443. doi: 10.1126/science.1069660.
- Morikawa, K., Suda, G., and Sakamoto, N. (2016). Viral life cycle of hepatitis B virus: Host factors and druggable targets. *Hepatol Res* 46(9), 871-877. doi: 10.1111/hepr.12650.

- Mosmann, T.R., and Moore, K.W. (1991). The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol Today* 12(3), A49-53. doi: 10.1016/S0167-5699(05)80015-5.
- Moussa, S., Brah, S., Parola, P., Gerolami, R., Gamberre, M., Boubli, L., et al. (2016). Epidemiological, clinical, virological features of hepatitis B newly diagnosed in 2011 in Marseille University hospitals, southeastern France. *J Med Virol* 88(5), 828-836. doi: 10.1002/jmv.24398.
- Moutaftsi, M., Peters, B., Pasquetto, V., Tschärke, D.C., Sidney, J., Bui, H.H., et al. (2006). A consensus epitope prediction approach identifies the breadth of murine T(CD8+)-cell responses to vaccinia virus. *Nat Biotechnol* 24(7), 817-819. doi: 10.1038/nbt1215.
- Mun, H.S., Lee, S.A., Jee, Y., Kim, H., Park, J.H., Song, B.C., et al. (2008). The prevalence of hepatitis B virus preS deletions occurring naturally in Korean patients infected chronically with genotype C. *J Med Virol* 80(7), 1189-1194. doi: 10.1002/jmv.21208.
- Murakoshi, H., Koyanagi, M., Akahoshi, T., Chikata, T., Kuse, N., Gatanaga, H., et al. (2018). Impact of a single HLA-A*24:02-associated escape mutation on the detrimental effect of HLA-B*35:01 in HIV-1 control. *EBioMedicine* 36, 103-112. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.09.022.
- Nassal, M. (1992). The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J Virol* 66(7), 4107-4116.
- Nielsen, M., and Andreatta, M. (2016). NetMHCpan-3.0; improved prediction of binding to MHC class I molecules integrating information from multiple receptor and peptide length datasets. *Genome Med* 8(1), 33. doi: 10.1186/s13073-016-0288-x.
- Norris, S., Collins, C., Doherty, D.G., Smith, F., McEntee, G., Traynor, O., et al. (1998). Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. *J Hepatol* 28(1), 84-90. doi: 10.1016/s0168-8278(98)80206-7.
- Nowak, M.A., Bonhoeffer, S., Hill, A.M., Boehme, R., Thomas, H.C., and McDade, H. (1996). Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(9), 4398-4402. doi: 10.1073/pnas.93.9.4398.
- O'Garra, A., Chang, R., Go, N., Hastings, R., Haughton, G., and Howard, M. (1992). Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur J Immunol* 22(3), 711-717. doi: 10.1002/eji.1830220314.
- Odorizzi, P.M., Pauken, K.E., Paley, M.A., Sharpe, A., and Wherry, E.J. (2015). Genetic absence of PD-1 promotes accumulation of terminally differentiated exhausted CD8+ T cells. *J Exp Med* 212(7), 1125-1137. doi: 10.1084/jem.20142237.
- Okamoto, H., Tsuda, F., Sakugawa, H., Sastrosoewignjo, R.I., Imai, M., Miyakawa, Y., et al. (1988). Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 69 (Pt 10), 2575-2583. doi: 10.1099/0022-1317-69-10-2575.
- Omata, M., Yokosuka, O., Imazeki, F., Ito, Y., Mori, J., Uchiyama, K., et al. (1987). Correlation of hepatitis B virus DNA and antigens in the liver. A study in chronic liver disease. *Gastroenterology* 92(1), 192-196. doi: 10.1016/0016-5085(87)90858-4.
- Ou, J.H., Laub, O., and Rutter, W.J. (1986). Hepatitis B virus gene function: the precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of the e antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(6), 1578-1582. doi: 10.1073/pnas.83.6.1578.
- Paley, M.A., Kroy, D.C., Odorizzi, P.M., Johnnidis, J.B., Dolfi, D.V., Barnett, B.E., et al. (2012). Progenitor and terminal subsets of CD8+ T cells cooperate to contain chronic viral infection. *Science* 338(6111), 1220-1225. doi: 10.1126/science.1229620.

- Papatheodoridis, G., Vlachogiannakos, I., Cholongitas, E., Wursthorn, K., Thomadakis, C., Touloumi, G., et al. (2016). Discontinuation of oral antivirals in chronic hepatitis B: A systematic review. *Hepatology* 63(5), 1481-1492. doi: 10.1002/hep.28438.
- Park, S.G., Kim, Y., Park, E., Ryu, H.M., and Jung, G. (2003). Fidelity of hepatitis B virus polymerase. *Eur J Biochem* 270(14), 2929-2936. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03650.x.
- Peng, G., Li, S., Wu, W., Sun, Z., Chen, Y., and Chen, Z. (2008). Circulating CD4+ CD25+ regulatory T cells correlate with chronic hepatitis B infection. *Immunology* 123(1), 57-65. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02691.x.
- Penna, A., Artini, M., Cavalli, A., Levrero, M., Bertolotti, A., Pilli, M., et al. (1996). Long-lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B. *J Clin Invest* 98(5), 1185-1194. doi: 10.1172/JCI118902.
- Penna, A., Chisari, F.V., Bertolotti, A., Missale, G., Fowler, P., Giuberti, T., et al. (1991). Cytotoxic T lymphocytes recognize an HLA-A2-restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Exp Med* 174(6), 1565-1570. doi: 10.1084/jem.174.6.1565.
- Penna, A., Del Prete, G., Cavalli, A., Bertolotti, A., D'Elia, M.M., Sorrentino, R., et al. (1997). Predominant T-helper 1 cytokine profile of hepatitis B virus nucleocapsid-specific T cells in acute self-limited hepatitis B. *Hepatology* 25(4), 1022-1027. doi: 10.1002/hep.510250438.
- Peppas, D., Micco, L., Javadi, A., Kennedy, P.T., Schurich, A., Dunn, C., et al. (2010). Blockade of immunosuppressive cytokines restores NK cell antiviral function in chronic hepatitis B virus infection. *PLoS Pathog* 6(12), e1001227. doi: 10.1371/journal.ppat.1001227.
- Perlman, D.H., Berg, E.A., O'Connor, P. B., Costello, C.E., and Hu, J. (2005). Reverse transcription-associated dephosphorylation of hepadnavirus nucleocapsids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(25), 9020-9025. doi: 10.1073/pnas.0502138102.
- Perz, J.F., Armstrong, G.L., Farrington, L.A., Hutin, Y.J., and Bell, B.P. (2006). The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 45(4), 529-538. doi: 10.1016/j.jhep.2006.05.013.
- Phillips, S., Chokshi, S., Riva, A., Evans, A., Williams, R., and Naoumov, N.V. (2010). CD8(+) T cell control of hepatitis B virus replication: direct comparison between cytolytic and noncytolytic functions. *J Immunol* 184(1), 287-295. doi: 10.4049/jimmunol.0902761.
- Pignatelli, M., Waters, J., Brown, D., Lever, A., Iwarson, S., Schaff, Z., et al. (1986). HLA class I antigens on the hepatocyte membrane during recovery from acute hepatitis B virus infection and during interferon therapy in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 6(3), 349-353. doi: 10.1002/hep.1840060303.
- Poovorawan, Y., Chongsrisawat, V., Theamboonlers, A., Srinivasa, K., Hutagalung, Y., Bock, H.L., et al. (2009). Long-term benefit of hepatitis B vaccination among children in Thailand with transient hepatitis B virus infection who were born to hepatitis B surface antigen-positive mothers. *J Infect Dis* 200(1), 33-38. doi: 10.1086/599331.
- Pult, I., Netter, H.J., Bruns, M., Prassolov, A., Sirma, H., Hohenberg, H., et al. (2001). Identification and analysis of a new hepadnavirus in white storks. *Virology* 289(1), 114-128. doi: 10.1006/viro.2001.1115.
- Radziwill, G., Tucker, W., and Schaller, H. (1990). Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J Virol* 64(2), 613-620.
- Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N.P., Bachor, O.A., and Stevanovic, S. (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50(3-4), 213-219. doi: 10.1007/s002510050595.

- Rehermann, B., Fowler, P., Sidney, J., Person, J., Redeker, A., Brown, M., et al. (1995). The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. *J Exp Med* 181(3), 1047-1058. doi: 10.1084/jem.181.3.1047.
- Rehermann, B., and Nascimbeni, M. (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 5(3), 215-229. doi: 10.1038/nri1573.
- Riordan, S.M., Skinner, N., Kurtovic, J., Locarnini, S., and Visvanathan, K. (2006). Reduced expression of toll-like receptor 2 on peripheral monocytes in patients with chronic hepatitis B. *Clin Vaccine Immunol* 13(8), 972-974. doi: 10.1128/CVI.00396-05.
- Rizzetto, M., Volpes, R., and Smedile, A. (2000). Response of pre-core mutant chronic hepatitis B infection to lamivudine. *J Med Virol* 61(3), 398-402.
- RKI (2016). *Hepatitis B und D RKI-Ratgeber* [Online]. Robert Koch Institut. Available: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_HepatitisB.html;jsessionid=5610AA532F98DFAF8356767772D0D439.2_cid363#doc2390050bodyText4 [Accessed 20.05.2016].
- Robinson, J., Halliwell, J.A., Hayhurst, J.D., Flicek, P., Parham, P., and Marsh, S.G. (2015). The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Res* 43(Database issue), D423-431. doi: 10.1093/nar/gku1161.
- Robinson, W.S. (1980). Genetic variation among hepatitis B and related viruses. *Ann N Y Acad Sci* 354, 371-378. doi: 10.1111/j.1749-6632.1980.tb27978.x.
- Robinson, W.S., Clayton, D.A., and Greenman, R.L. (1974). DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J Virol* 14(2), 384-391.
- Rosso di San Secondo, V.E., Lugaro, G., Tedesco, F., Bernasconi, G., and Sirchia, G. (1987). Inhibitory effects of dialyzed leukocyte extract on DNA and RNA synthesis. *Basic Appl Histochem* 31(3), 325-330.
- Rossol, S., Marinos, G., Carucci, P., Singer, M.V., Williams, R., and Naoumov, N.V. (1997). Interleukin-12 induction of Th1 cytokines is important for viral clearance in chronic hepatitis B. *J Clin Invest* 99(12), 3025-3033. doi: 10.1172/JCI119498.
- Ruhl, M., Chhatwal, P., Strathmann, H., Kuntzen, T., Bankwitz, D., Skibbe, K., et al. (2012). Escape from a dominant HLA-B*15-restricted CD8+ T cell response against hepatitis C virus requires compensatory mutations outside the epitope. *J Virol* 86(2), 991-1000. doi: 10.1128/JVI.05603-11.
- Ruhl, M., Knuschke, T., Schewior, K., Glavinic, L., Neumann-Haefelin, C., Chang, D.I., et al. (2011). CD8+ T-cell response promotes evolution of hepatitis C virus nonstructural proteins. *Gastroenterology* 140(7), 2064-2073. doi: 10.1053/j.gastro.2011.02.060.
- Rui, L.X., Park, Y.M., Choi, J.Y., Kim, B.S., and Jung, G. (1998). Detection of antibodies against DNA polymerase of hepatitis B virus in HBsAg-positive sera using ELISA. *Korean J Intern Med* 13(2), 95-98. doi: 10.3904/kjim.1998.13.2.95.
- Ryu, C.J., Gripon, P., Park, H.R., Park, S.S., Kim, Y.K., Guguen-Guillouzo, C., et al. (1997). In vitro neutralization of hepatitis B virus by monoclonal antibodies against the viral surface antigen. *J Med Virol* 52(2), 226-233. doi: 10.1002/(sici)1096-9071(199706)52:2<226::aid-jmv18>3.0.co;2-i.
- Salloum, S., Oniangue-Ndza, C., Neumann-Haefelin, C., Hudson, L., Giugliano, S., aus dem Siepen, M., et al. (2008). Escape from HLA-B*08-restricted CD8 T cells by hepatitis C virus is associated with fitness costs. *J Virol* 82(23), 11803-11812. doi: 10.1128/JVI.00997-08.
- Sankar, S., Saravanan, N., Rajendiran, P., Ramamurthy, M., Nandagopal, B., and Sridharan, G. (2019). Identification of B- and T-cell epitopes on HtrA protein of *Orientia tsutsugamushi*. *J Cell Biochem* 120(4), 5869-5879. doi: 10.1002/jcb.27872.

- Sato, S., Li, K., Kameyama, T., Hayashi, T., Ishida, Y., Murakami, S., et al. (2015). The RNA sensor RIG-I dually functions as an innate sensor and direct antiviral factor for hepatitis B virus. *Immunity* 42(1), 123-132. doi: 10.1016/j.immuni.2014.12.016.
- Sauce, D., Almeida, J.R., Larsen, M., Haro, L., Autran, B., Freeman, G.J., et al. (2007). PD-1 expression on human CD8 T cells depends on both state of differentiation and activation status. *AIDS* 21(15), 2005-2013. doi: 10.1097/QAD.0b013e3282eee548.
- Schmidt, A.H., Baier, D., Solloch, U.V., Stahr, A., Cereb, N., Wassmuth, R., et al. (2009). Estimation of high-resolution HLA-A, -B, -C, -DRB1 allele and haplotype frequencies based on 8862 German stem cell donors and implications for strategic donor registry planning. *Hum Immunol* 70(11), 895-902. doi: 10.1016/j.humimm.2009.08.006.
- Schuch, A., Salimi Alizei, E., Heim, K., Wieland, D., Kiraithe, M.M., Kemming, J., et al. (2019). Phenotypic and functional differences of HBV core-specific versus HBV polymerase-specific CD8+ T cells in chronically HBV-infected patients with low viral load. *Gut* 68(5), 905-915. doi: 10.1136/gutjnl-2018-316641.
- Schulte, I., Hitziger, T., Giugliano, S., Timm, J., Gold, H., Heinemann, F.M., et al. (2011). Characterization of CD8+ T-cell response in acute and resolved hepatitis A virus infection. *J Hepatol* 54(2), 201-208. doi: 10.1016/j.jhep.2010.07.010.
- Schurich, A., Khanna, P., Lopes, A.R., Han, K.J., Peppas, D., Micco, L., et al. (2011). Role of the coinhibitory receptor cytotoxic T lymphocyte antigen-4 on apoptosis-prone CD8 T cells in persistent hepatitis B virus infection. *Hepatology* 53(5), 1494-1503. doi: 10.1002/hep.24249.
- Schurich, A., Pallett, L.J., Jajbhay, D., Wijngaarden, J., Otano, I., Gill, U.S., et al. (2016). Distinct Metabolic Requirements of Exhausted and Functional Virus-Specific CD8 T Cells in the Same Host. *Cell Rep* 16(5), 1243-1252. doi: 10.1016/j.celrep.2016.06.078.
- Schurich, A., Pallett, L.J., Lubowiecki, M., Singh, H.D., Gill, U.S., Kennedy, P.T., et al. (2013). The third signal cytokine IL-12 rescues the anti-viral function of exhausted HBV-specific CD8 T cells. *PLoS Pathog* 9(3), e1003208. doi: 10.1371/journal.ppat.1003208.
- Sette, A., Vitiello, A., Rehman, B., Fowler, P., Nayarsina, R., Kast, W.M., et al. (1994). The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. *J Immunol* 153(12), 5586-5592.
- Shi, B., Ren, G., Hu, Y., Wang, S., Zhang, Z., and Yuan, Z. (2012). HBsAg inhibits IFN- α production in plasmacytoid dendritic cells through TNF- α and IL-10 induction in monocytes. *PLoS One* 7(9), e44900. doi: 10.1371/journal.pone.0044900.
- Shlomai, A., Schwartz, R.E., Ramanan, V., Bhatta, A., de Jong, Y.P., Bhatia, S.N., et al. (2014). Modeling host interactions with hepatitis B virus using primary and induced pluripotent stem cell-derived hepatocellular systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(33), 12193-12198. doi: 10.1073/pnas.1412631111.
- Sidney, J., Assarsson, E., Moore, C., Ngo, S., Pinilla, C., Sette, A., et al. (2008). Quantitative peptide binding motifs for 19 human and mouse MHC class I molecules derived using positional scanning combinatorial peptide libraries. *Immunome Res* 4, 2. doi: 10.1186/1745-7580-4-2.
- Sidney, J., Southwood, S., Paschetto, V., and Sette, A. (2003). Simultaneous prediction of binding capacity for multiple molecules of the HLA B44 supertype. *J Immunol* 171(11), 5964-5974. doi: 10.4049/jimmunol.171.11.5964.
- Sieling, P.A., Chung, W., Duong, B.T., Godowski, P.J., and Modlin, R.L. (2003). Toll-like receptor 2 ligands as adjuvants for human Th1 responses. *J Immunol* 170(1), 194-200. doi: 10.4049/jimmunol.170.1.194.

- Soderholm, J., Ahlen, G., Kaul, A., Frelin, L., Alheim, M., Barnfield, C., et al. (2006). Relation between viral fitness and immune escape within the hepatitis C virus protease. *Gut* 55(2), 266-274. doi: 10.1136/gut.2005.072231.
- Sperle, I., Steffen, G., Leendertz, S.A., Sarma, N., Beermann, S., Thamm, R., et al. (2020). Prevalence of Hepatitis B, C, and D in Germany: Results From a Scoping Review. *Front Public Health* 8, 424. doi: 10.3389/fpubh.2020.00424.
- Sprengel, R., Kaleta, E.F., and Will, H. (1988). Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J Virol* 62(10), 3832-3839.
- Standing, D.N., Ou, J.H., Masiarz, F.R., and Rutter, W.J. (1988). A signal peptide encoded within the precore region of hepatitis B virus directs the secretion of a heterogeneous population of e antigens in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(22), 8405-8409. doi: 10.1073/pnas.85.22.8405.
- Stevens, C.E., Toy, P.T., Tong, M.J., Taylor, P.E., Vyas, G.N., Nair, P.V., et al. (1985). Perinatal hepatitis B virus transmission in the United States. Prevention by passive-active immunization. *JAMA* 253(12), 1740-1745.
- STIKO (2019). Ständige Impfkommision: Empfehlungen der Ständigen Impfkommision (STIKO) am Robert Koch-Institut. *Epid Bull* 34, 313-364. doi: 10.25646/6233.5.
- Stoop, J.N., van der Molen, R.G., Baan, C.C., van der Laan, L.J., Kuipers, E.J., Kusters, J.G., et al. (2005). Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 41(4), 771-778. doi: 10.1002/hep.20649.
- Summers, J., and Mason, W.S. (2004). Residual integrated viral DNA after hepadnavirus clearance by nucleoside analog therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(2), 638-640. doi: 10.1073/pnas.0307422100.
- Summers, J., Smolec, J.M., and Snyder, R. (1978). A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(9), 4533-4537. doi: 10.1073/pnas.75.9.4533.
- Suslov, A., Boldanova, T., Wang, X., Wieland, S., and Heim, M.H. (2018). Hepatitis B Virus Does Not Interfere With Innate Immune Responses in the Human Liver. *Gastroenterology* 154(6), 1778-1790. doi: 10.1053/j.gastro.2018.01.034.
- Taffon, S., Kondili, L.A., Giuseppetti, R., Ciccaglione, A.R., Pulimanti, B., Attili, A.F., et al. (2015). Woodchuck hepatitis virus core gene deletions and proliferative responses of peripheral blood mononuclear cells stimulated by an immunodominant epitope: a viral immune escape in the woodchuck model of chronic hepatitis B? *Arch Virol* 160(4), 1065-1073. doi: 10.1007/s00705-015-2346-x.
- Tan, A.T., Sodsai, P., Chia, A., Moreau, E., Chng, M.H., Tham, C.Y., et al. (2014). Immunoprevalence and immunodominance of HLA-Cw*0801-restricted T cell response targeting the hepatitis B virus envelope transmembrane region. *J Virol* 88(2), 1332-1341. doi: 10.1128/JVI.02600-13.
- Testut, P., Renard, C.A., Terradillos, O., Vitvitski-Trepo, L., Tekai, F., Degott, C., et al. (1996). A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska. *J Virol* 70(7), 4210-4219.
- Thimme, R., Wieland, S., Steiger, C., Ghayeb, J., Reimann, K.A., Purcell, R.H., et al. (2003). CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol* 77(1), 68-76. doi: 10.1128/jvi.77.1.68-76.2003.
- Timm, J., Lauer, G.M., Kavanagh, D.G., Sheridan, I., Kim, A.Y., Lucas, M., et al. (2004). CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. *J Exp Med* 200(12), 1593-1604. doi: 10.1084/jem.20041006.

- Timm, J., Li, B., Daniels, M.G., Bhattacharya, T., Reyor, L.L., Allgaier, R., et al. (2007). Human leukocyte antigen-associated sequence polymorphisms in hepatitis C virus reveal reproducible immune responses and constraints on viral evolution. *Hepatology* 46(2), 339-349. doi: 10.1002/hep.21702.
- Timm, J., and Walker, C.M. (2015). Mutational escape of CD8+ T cell epitopes: implications for prevention and therapy of persistent hepatitis virus infections. *Med Microbiol Immunol* 204(1), 29-38. doi: 10.1007/s00430-014-0372-z.
- Torre, F., Cramp, M., Owsianka, A., Dornan, E., Marsden, H., Carman, W., et al. (2004). Direct evidence that naturally occurring mutations within hepatitis B core epitope alter CD4+ T-cell reactivity. *J Med Virol* 72(3), 370-376. doi: 10.1002/jmv.20016.
- TrehanPati, N., Kotillil, S., Hissar, S.S., Shrivastava, S., Khanam, A., Sukriti, S., et al. (2011). Circulating Tregs correlate with viral load reduction in chronic HBV-treated patients with tenofovir disoproxil fumarate. *J Clin Immunol* 31(3), 509-520. doi: 10.1007/s10875-011-9509-7.
- Trinchieri, G. (1995). Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 13, 251-276. doi: 10.1146/annurev.iy.13.040195.001343.
- Trolle, T., Metushi, I.G., Greenbaum, J.A., Kim, Y., Sidney, J., Lund, O., et al. (2015). Automated benchmarking of peptide-MHC class I binding predictions. *Bioinformatics* 31(13), 2174-2181. doi: 10.1093/bioinformatics/btv123.
- van der Molen, R.G., Sprengers, D., Binda, R.S., de Jong, E.C., Niesters, H.G., Kusters, J.G., et al. (2004). Functional impairment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 40(3), 738-746. doi: 10.1002/hep.20366.
- Vaudin, M., Wolstenholme, A.J., Tsiquaye, K.N., Zuckerman, A.J., and Harrison, T.J. (1988). The complete nucleotide sequence of the genome of a hepatitis B virus isolated from a naturally infected chimpanzee. *J Gen Virol* 69 (Pt 6), 1383-1389. doi: 10.1099/0022-1317-69-6-1383.
- Visvanathan, K., Skinner, N.A., Thompson, A.J., Riordan, S.M., Sozzi, V., Edwards, R., et al. (2007). Regulation of Toll-like receptor-2 expression in chronic hepatitis B by the precore protein. *Hepatology* 45(1), 102-110. doi: 10.1002/hep.21482.
- Vitaliti, G., Pratico, A.D., Cimino, C., Di Dio, G., Lionetti, E., La Rosa, M., et al. (2013). Hepatitis B vaccine in celiac disease: yesterday, today and tomorrow. *World J Gastroenterol* 19(6), 838-845. doi: 10.3748/wjg.v19.i6.838.
- Walker, A., Schwarz, T., Brinkmann, J., Wisskirchen, K., Menne, C., Salimi Alize, E., et al. "High-resolution analysis of the CD8 T cell immune response against the HBV core 18-27 region and the selected immune escape pathways ". University Hospital Düsseldorf, Heinrich-Heine University Düsseldorf.).
- Walker, A., Skibbe, K., Steinmann, E., Pfaender, S., Kuntzen, T., Megger, D.A., et al. (2016). Distinct Escape Pathway by Hepatitis C Virus Genotype 1a from a Dominant CD8+ T Cell Response by Selection of Altered Epitope Processing. *J Virol* 90(1), 33-42. doi: 10.1128/JVI.01993-15.
- Warren, K.S., Heeney, J.L., Swan, R.A., Heriyanto, and Verschoor, E.J. (1999). A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (*Pongo pygmaeus*). *J Virol* 73(9), 7860-7865.
- Watanabe, T., Sorensen, E.M., Naito, A., Schott, M., Kim, S., and Ahlquist, P. (2007). Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(24), 10205-10210. doi: 10.1073/pnas.0704000104.
- Webster, G.J., Reignat, S., Brown, D., Ogg, G.S., Jones, L., Seneviratne, S.L., et al. (2004). Longitudinal analysis of CD8+ T cells specific for structural and nonstructural hepatitis

- B virus proteins in patients with chronic hepatitis B: implications for immunotherapy. *J Virol* 78(11), 5707-5719. doi: 10.1128/JVI.78.11.5707-5719.2004.
- Webster, G.J., Reignat, S., Maini, M.K., Whalley, S.A., Ogg, G.S., King, A., et al. (2000). Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology* 32(5), 1117-1124. doi: 10.1053/jhep.2000.19324.
- Werle-Lapostolle, B., Bowden, S., Locarnini, S., Wursthorn, K., Petersen, J., Lau, G., et al. (2004). Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* 126(7), 1750-1758. doi: 10.1053/j.gastro.2004.03.018.
- WHO (2011). *The Immunological Basis for Immunization Series Module 22: Hepatitis B* [Online]. World Health Organization, Department of Immunization, Vaccines and Biologicals Available: <https://www.who.int/publications/i/item/who-immunological-basis-for-immunization-series-module-22-hepatitis-b> [Accessed 02 August 2011].
- WHO (2017). *Global hepatitis report, 2017* [Online]. World Health Organization. Available: <http://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/> [Accessed 2017/08/24].
- WHO (2021). *Fact Sheet Hepatitis B* [Online]. World Health Organization. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b> [Accessed 27 July 2021].
- Wieland, S., Thimme, R., Purcell, R.H., and Chisari, F.V. (2004). Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(17), 6669-6674. doi: 10.1073/pnas.0401771101.
- Wieland, S.F., Guidotti, L.G., and Chisari, F.V. (2000). Intrahepatic induction of alpha/beta interferon eliminates viral RNA-containing capsids in hepatitis B virus transgenic mice. *J Virol* 74(9), 4165-4173. doi: 10.1128/jvi.74.9.4165-4173.2000.
- Woltman, A.M., Op den Brouw, M.L., Biesta, P.J., Shi, C.C., and Janssen, H.L. (2011). Hepatitis B virus lacks immune activating capacity, but actively inhibits plasmacytoid dendritic cell function. *PLoS One* 6(1), e15324. doi: 10.1371/journal.pone.0015324.
- Wu, J.F., Wu, T.C., Chen, C.H., Ni, Y.H., Chen, H.L., Hsu, H.Y., et al. (2010). Serum levels of interleukin-10 and interleukin-12 predict early, spontaneous hepatitis B virus e antigen seroconversion. *Gastroenterology* 138(1), 165-172 e161-163. doi: 10.1053/j.gastro.2009.09.018.
- Wu, W., Shi, Y., Li, S., Zhang, Y., Liu, Y., Wu, Y., et al. (2012). Blockade of Tim-3 signaling restores the virus-specific CD8(+) T-cell response in patients with chronic hepatitis B. *Eur J Immunol* 42(5), 1180-1191. doi: 10.1002/eji.201141852.
- Xia, Y., Pan, W., Ke, X., Skibbe, K., Walker, A., Hoffmann, D., et al. (2019). Differential escape of HCV from CD8(+) T cell selection pressure between China and Germany depends on the presenting HLA class I molecule. *J Viral Hepat* 26(1), 73-82. doi: 10.1111/jvh.13011.
- Xu, D., Fu, J., Jin, L., Zhang, H., Zhou, C., Zou, Z., et al. (2006). Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B. *J Immunol* 177(1), 739-747. doi: 10.4049/jimmunol.177.1.739.
- Xu, L., Yin, W., Sun, R., Wei, H., and Tian, Z. (2014). Kupffer cell-derived IL-10 plays a key role in maintaining humoral immune tolerance in hepatitis B virus-persistent mice. *Hepatology* 59(2), 443-452. doi: 10.1002/hep.26668.
- Yamamiya, D., Mizukoshi, E., Kaji, K., Terashima, T., Kitahara, M., Yamashita, T., et al. (2018). Immune responses of human T lymphocytes to novel hepatitis B virus-derived peptides. *PLoS One* 13(6), e0198264. doi: 10.1371/journal.pone.0198264.

- Yan, H., Yang, Y., Zhang, L., Tang, G., Wang, Y., Xue, G., et al. (2015). Characterization of the genotype and integration patterns of hepatitis B virus in early- and late-onset hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 61(6), 1821-1831. doi: 10.1002/hep.27722.
- Yan, H., Zhong, G., Xu, G., He, W., Jing, Z., Gao, Z., et al. (2012). Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* 3. doi: 10.7554/eLife.00049.
- Yang, H.I., Yeh, S.H., Chen, P.J., Iloeje, U.H., Jen, C.L., Su, J., et al. (2008). Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 100(16), 1134-1143. doi: 10.1093/jnci/djn243.
- Yang, Z.T., Huang, S.Y., Chen, L., Liu, F., Cai, X.H., Guo, Y.F., et al. (2015). Characterization of Full-Length Genomes of Hepatitis B Virus Quasispecies in Sera of Patients at Different Phases of Infection. *J Clin Microbiol* 53(7), 2203-2214. doi: 10.1128/JCM.00068-15.
- Yeung, P., Wong, D.K., Lai, C.L., Fung, J., Seto, W.K., and Yuen, M.F. (2011). Association of hepatitis B virus pre-S deletions with the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B. *J Infect Dis* 203(5), 646-654. doi: 10.1093/infdis/jiq096.
- Yotsuyanagi, H., Yasuda, K., Iino, S., Moriya, K., Shintani, Y., Fujie, H., et al. (1998). Persistent viremia after recovery from self-limited acute hepatitis B. *Hepatology* 27(5), 1377-1382. doi: 10.1002/hep.510270526.
- Yu, X., and Mertz, J.E. (1996). Promoters for synthesis of the pre-C and pregenomic mRNAs of human hepatitis B virus are genetically distinct and differentially regulated. *J Virol* 70(12), 8719-8726.
- Yue, F.Y., Dummer, R., Geertsens, R., Hofbauer, G., Laine, E., Manolio, S., et al. (1997). Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *Int J Cancer* 71(4), 630-637. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19970516)71:4<630::aid-ijc20>3.0.co;2-e.
- Yuh, C.H., Chang, Y.L., and Ting, L.P. (1992). Transcriptional regulation of precore and pregenomic RNAs of hepatitis B virus. *J Virol* 66(7), 4073-4084.
- Zhang, D., Dong, P., Zhang, K., Deng, L., Bach, C., Chen, W., et al. (2012). Whole genome HBV deletion profiles and the accumulation of preS deletion mutant during antiviral treatment. *BMC Microbiol* 12, 307. doi: 10.1186/1471-2180-12-307.
- Zhang, E., and Lu, M. (2015). Toll-like receptor (TLR)-mediated innate immune responses in the control of hepatitis B virus (HBV) infection. *Med Microbiol Immunol* 204(1), 11-20. doi: 10.1007/s00430-014-0370-1.
- Zhang, Y., Ren, Y., Wu, Y., Zhao, B., Qiu, L., Li, X., et al. (2013). The L60V variation in hepatitis B virus core protein elicits new epitope-specific cytotoxic T lymphocytes and enhances viral replication. *J Virol* 87(14), 8075-8084. doi: 10.1128/JVI.00577-13.
- Zhang, Y., Wu, Y., Deng, M., Xu, D., Li, X., Xu, Z., et al. (2018). CD8(+) T-Cell Response-Associated Evolution of Hepatitis B Virus Core Protein and Disease Progress. *J Virol* 92(17). doi: 10.1128/JVI.02120-17.
- Zhang, Z., Protzer, U., Hu, Z., Jacob, J., and Liang, T.J. (2004). Inhibition of cellular proteasome activities enhances hepatitis B virus replication in an HBX-dependent manner. *J Virol* 78(9), 4566-4572. doi: 10.1128/jvi.78.9.4566-4572.2004.
- Zhang, Z., Zhang, S., Zou, Z., Shi, J., Zhao, J., Fan, R., et al. (2011). Hypercytolytic activity of hepatic natural killer cells correlates with liver injury in chronic hepatitis B patients. *Hepatology* 53(1), 73-85. doi: 10.1002/hep.23977.
- Zhao, J., Li, Y., Jin, L., Zhang, S., Fan, R., Sun, Y., et al. (2012a). Natural killer cells are characterized by the concomitantly increased interferon-gamma and cytotoxicity in

- acute resolved hepatitis B patients. *PLoS One* 7(11), e49135. doi: 10.1371/journal.pone.0049135.
- Zhao, J., Zhao, J., and Perlman, S. (2012b). Differential effects of IL-12 on Tregs and non-Treg T cells: roles of IFN-gamma, IL-2 and IL-2R. *PLoS One* 7(9), e46241. doi: 10.1371/journal.pone.0046241.
- Zheng, J., Ou, Z., Lin, X., Wang, L., Liu, Y., Jin, S., et al. (2018). Analysis of epitope-based vaccine candidates against the E antigen of the hepatitis B virus based on the B genotype sequence: An in silico and in vitro approach. *Cell Immunol* 329, 56-65. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.04.015.
- Zoulim, F. (2012). Are novel combination therapies needed for chronic hepatitis B? *Antiviral Res* 96(2), 256-259. doi: 10.1016/j.antiviral.2012.09.006.
- Zoulim, F., and Seeger, C. (1994). Reverse transcription in hepatitis B viruses is primed by a tyrosine residue of the polymerase. *J Virol* 68(1), 6-13.

8 Abkürzungsverzeichnis

a-Determinante	Hauptantigendeterminante
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
ALT	Alanin-Aminotransferase
anti-HBc	Antikörper gegen das Hepatitis B Core-Antigen
anti-HBe	Antikörper gegen das Hepatitis B e-Antigen
anti-HBs	Antikörper gegen das Hepatitis B Hüllprotein-Antigen
APC	antigenpräsentierenden Zellen
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
ASHV	arktisches Eichhörnchen Hepatitis B Virus (engl. <i>Artic Squirrel Hepatitis Virus</i>)
AST	Aspartat-Aminotransferase
AuAg	<i>Australia Antigen</i>
BCP	basaler Core-Promotor
BFA	Brefeldin A
bp	Basenpaar
cccDNA	kovalent geschlossene zirkuläre Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>covalently closed circular DNA</i>)
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
ChHBV	Schimpansen Hepatitis B Virus (engl. <i>Chimpanzee Hepatitis B Virus</i>)
CMIA	Chemilumineszenz Mikropartikel Immunoassays
CTD	C-terminale Dömane
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DC	Dendritischen Zellen
DHBV	Enten Hepatitis B Virus (engl. <i>Duck Hepatitis B Virus</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
d. h.	das heißt
dsDNA	doppelsträngige lineare Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EASL	<i>The European Association for the Study of the Liver</i>
ECDC	Europäischen Zentrums für Prävention und Kontrolle von Krankheiten
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	Englisch
Eomes	Eomesodermin
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>
EU/EWR	Europäischen Union und des Europäischen Wirtschaftsraums
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FBS	Fetales Kälberserum
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht

g	Gravitationskonstante
GoHBV	Gorilla Hepatitis B Virus
GSHV	Eichhörnchen Hepatitis B Virus (engl. <i>Ground Squirrel Hepatitis Virus</i>)
h	Stunde
HAV	Hepatitis A Virus
HBcAg	Hepatitis B Core-Antigen
HBeAg	Hepatitis B e-Antigen
HBIG	Hepatitis-B-Immunglobulin
HBsAg	Hepatitis B Hüllprotein-Antigen
HBV	Hepatitis B Virus
HBx	Hepatitis X Protein
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HDV	Hepatitis D Virus
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HHBV	Graureiher Hepatitis B Virus (engl. <i>Heron Hepatitis B Virus</i>)
HIV	Humanem Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
ICS	intrazellulärer Zytokinfärbung
IEDB	<i>Immune Epitope Database</i>
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ISG	Interferon-stimulierte Gene
IU	international Einheit (engl. <i>Internatinal Unit</i>)
k.A.	keine Anhaben
kB	Kilobasen
KC	Kupffer-Zellen
KLRG1	<i>killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1</i>
LB	Luria-Bertani
LHB oder PräS1	großes Hepatitis B Hüllprotein (engl. <i>large Hepatitis B surface protein</i>)
m	männlich
MCS	multiple Klonierungsseite
MDA-5	Melanom-Differenzierungsantigen 5
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHB oder PräS2	mittleres Hepatitis B Hüllprotein (engl. <i>middle Hepatitis B surface protein</i>)
min	Minute
Mio	Million
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MVA	modifiziertes Vaccinia-Virus Ankara
MVBs	<i>multivesicular bodies</i>
n.V.	nicht Verfügbar
NA	Nukleos(t)id-Analoga
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>

neg	negativ
ng	Nanogramm
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NTCP	<i>Natriumtaurocholat Kotransportpolypeptid (engl. sodium-taurocholate co-transporting polypeptide)</i>
NTD	N-terminale Domäne
ORF	offener Leserahmen
ORI	Replikationsursprung
OuHBV	Orang Utan Hepatitis B Virus (engl. <i>Orangutan hepatitis B Virus</i>)
P&E	Peptides&Elephants
PAMP	pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PE	Phycoerythrin
PegIFN- α	pegyliertes IFN- α
Pen Strep	Penicillin Streptomycin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Proteinkomplex
pgRNA	prägenomischen Ribonukleinsäure
pmol	picomol
pos	positiv
PRR	Mustererkennungsrezeptoren
rcDNA	relaxierte zirkuläre Desoxyribonukleinsäure
RLR	<i>RIG-I-like</i> -Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
RNase H	Ribonuklease H
rpm	Umdrehungen pro Minute
r_s	Korrelationskoeffizient nach Spearman
RT	reverse Transkriptase
SD	Standardabweichung
SHB	kleines Hepatitis B Hüllprotein (engl. <i>small Hepatitis B surface protein</i>)
SSC	Seitwärtsstreulichts
STHBV	Storchen Hepatitis B Virus (engl. <i>Stork Hepatitis B Virus</i>)
STIKO	Ständigen Impfkommision
SVP	subvirale Partikel
TAP	<i>Transporter associated with Antigen Processing</i>
Th1	T-Helferzellen Typ 1
Th2	T-Helferzellen Typ 2
TIM-3	<i>t-cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing 3</i>
TLR	<i>Toll-like</i> -Rezeptor
TM	Transmenbran-Domäne
TNF	Tumornekrosefaktor
TOX	<i>thymocyte selection-associated high mobility group box protein</i>
TP	terminales Protein
TRAIL	Apoptose-induzierenden Liganden
T _{reg}	regulatorische T-Zellen

TZR	T-Zell-Rezeptor
w	weiblich
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WHV	Waldmurmeltier Hepatitis B Virus (engl. <i>Woodchuck Hepatitis Virus</i>)
WMHBV	Wollaffen Hepatitis B Virus (engl. <i>Woolly Monkey Hepatitis B Virus</i>)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
μ l	Mikroliter

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Struktur und des Replikationszyklus von HBV	4
Abbildung 1.2: HBV-Genotyp Verteilung.....	8
Abbildung 1.3: Immunkinetik einer akuten und chronischen HBV-Infektion.....	12
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Antigenpräsentation eines HBV-Peptids über ein HLA-Klasse-I-Allel	20
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des pUC18-Vektors.....	30
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des pUC18-HBV-Polymerase-Vektors	30
Abbildung 3.1: Identifizierung von IFN- γ ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen	42
Abbildung 4.1: Genotyp-unabhängige PCR des kompletten HBV-Genoms bei unterschiedlichen Viruslasten	45
Abbildung 4.2: Verteilung der HBV-Genotypen in der Kohorte.....	47
Abbildung 4.3: HLA-Klasse-I-assoziierte Polymorphismen in den HBV-Proteinen	50
Abbildung 4.4: HBV- <i>Negatop</i> in Core ₁₂₃₋₁₃₁	55
Abbildung 4.5: Analyse des <i>in silico</i> Fusionsproteins auf HLA- <i>Footprints</i> und Entropie	56
Abbildung 4.6: Schematische Darstellung der Positionen mit HLA-Klasse-I-assoziierten Sequenzpolymorphismen	57
Abbildung 4.7: Einfluss der Substitution G2355A auf die überlappende Region des Core-Proteins und der Polymerase.....	58
Abbildung 4.8: HLA-Klasse-I-assoziiertes Selektionsdruck auf Core ₁₁₂₋₁₂₂	59
Abbildung 4.9: Identifizierte neue CD8 T-Zell Epitope anhand intrazellulärer Zytokinfärbung	64
Abbildung 4.10: Korrelation zwischen der Viruslast und der Anzahl der Substitutionen	66
Abbildung 4.11: HBeAg-Status bei Genotyp D-infizierten Patienten	68
Abbildung 4.12: Höhe der Viruslast in Abhängigkeit vom HBeAg-Status	68
Abbildung 4.13: Abhängigkeit der Substitutionen vom HBeAg-Status.....	70
Abbildung 4.14: Einfluss der Substitutionen T67K/N/S im Core-Protein und F130V/S/L im HBsAg auf die Viruslast.....	72
Abbildung 4.15: Häufigkeit von W28 in der Quasispezies.....	73
Abbildung 4.16: Identifizierte Deletionen im HBV-Genom.....	75
Abbildung 4.17: Klonale Detektion von Deletionen in der HBV-Quasispezies.....	76
Abbildung 4.18: Assoziation zwischen Deletionen und HLA-A*24 und HLA-B*35.....	77
Abbildung 4.19: Deletionen im Hüllprotein assoziiert mit bestimmten HLA-Allelen.....	78
Abbildung 4.20: HLA-B*35-restringierte Epitope in Regionen mit Deletionen.....	79
Abbildung 5.1: Grafische Zusammenfassung	93

Abbildung 6.1: Relative Häufigkeit von Positionen unter Selektionsdruck in unterschiedlichen Proteinen.....	130
Abbildung 6.2: Einfluss der Substitution G2379C auf die überlappende Region des Core-Proteins und der Polymerase.....	130
Abbildung 6.3: Detektion von Deletionen innerhalb der HBV-Quasispezies mittels klonaler Analyse von PCR-Fragmenten bei Patienten mit Deletionen in der autologen Sanger-Sequenz	131
Abbildung 6.4: Detektion von Deletionen innerhalb einer Quasispezies mittels NGS.....	132

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Zell- und Bakterienkulturmedien und Zusätze	24
Tabelle 2.2: Oligonukleotidesequenzen für PCR	27
Tabelle 2.3: Oligonukleotidesequenzen für Sanger-Sequenzierung.....	27
Tabelle 2.4: Peptide	28
Tabelle 2.5: Verwendete Antikörper und fluoreszierende Farbstoffe für die Durchflusszytometrie	29
Tabelle 2.6: Referenzsequenzen unterschiedlicher HBV-Subgenotypen	31
Tabelle 2.7: Kooperationspartner	32
Tabelle 3.1: Kontingenztafel	43
Tabelle 4.1: Charakterisierung von Patienten in der HBV-Kohorte	46
Tabelle 4.2: Identifizierte HLA- <i>Footprints</i> in den HBV-Proteinen.....	51
Tabelle 4.3: Vorhergesagte Epitope in Regionen mit HLA- <i>Footprints</i>	60
Tabelle 4.4: Einfluss von Substitutionen auf die virale Fitness.....	70
Tabelle 4.5: Vorgeschlagene HLA-B*35-restringierte Epitope in Deletionen	79
Tabelle 6.1: Patienten in der HBV-Kohorte	96

11 Curriculum Vitae

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aufgrund
des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aufgrund
des Datenschutzes nicht enthalten.

12 Publikationen

12.1 Dissertationsbezogene Publikationen

- Walker A, **Schwarz T**, Brinkmann T, Wisskirchen K, Menne C, Salimi Alizei E, Kefalakes H, Theissen M, Hoffmann D, Schulze zur Wiesch J, Maini M, Cornberg M, Kraft A, Keitel V, Bock HH, Horn PA, Thimme R, Wedemeyer H, Heinemann FM, Neuman-Haefelin C, Protzer U, Timm J. Immune escape pathways from the HBV core18-27 CD8 T cell response are driven by individual HLA class I alleles. **In Vorbereitung**
- Hoogeveen RC, Robidoux MP, **Schwarz T**, Heydmann L, Cheney JA, Kvistad D, Aneja J, Melgaço JG, Fernandes CA, Chung RT, Boonstra A, Kim AY, Baumert TF, Timm J, Lewis-Ximenez LL, Tonnerre P, Lauer GM. Phenotype and function of HBV-specific T cells is determined by the targeted epitope in addition to the stage of infection. *Gut*. 2019 May;68(5):893-904. doi: 10.1136/gutjnl-2018-316644
- Anastasiou OE, Widera M, Westhaus S, Timmer L, Korth J, Gerken G, Canbay A, Todt D, Steinmann E, Schwarz T, Timm J, Verheyen J, Ciesek S. Clinical Outcome and Viral Genome Variability of Hepatitis B Virus-Induced Acute Liver Failure. *Hepatology*. 2019 Mar;69(3):993-1003. doi: 10.1002/hep.30279

12.2 Weitere Publikationen

- **Schwarz T[#]**, Otto C[#], Jones TC, Pache F, Schindler P, Niederschweiberer M, Schmidt FA, Drosten C, Corman VM, Ruprecht K. Preserved T cell responses to SARS-CoV-2 in anti-CD20 treated multiple sclerosis. **In Begutachtung**
- Arumahandi de Silva AN, Frommert LM, Albach FN, Klotsche J, Scholz V, Jeworowski LM, **Schwarz T**, ten Hagen A, Zernicke J, Corman VM, Drosten C, Burmester GR, Biesen. Pausing methotrexate improves immunogenicity of COVID-19 vaccination in patients with rheumatic diseases. **In Begutachtung**
- Reincke SM, Yuan M, Kornau HC, Corman VM, van Hoof S, Sánchez-Sendin E, Ramberger M, Yu W, Tien H, Schmidt ML, **Schwarz T**, Jeworowski LM, Brandl SE, Foverskov-Rasmussen H, Homeyer MA, Stöffler S, Barner M, Kunkel, Huo S, Horler J, von Wardenburg N, Kroidl I, Eser TM, Wieser A, Geldmacher C, Hoelscher M, Gänzer H, Weiss G, Schmitz D, Drosten C, Prüss H, Wilson IA, Kreye J. SARS-CoV-2 Beta variant infection elicits potent lineage-specific and cross-reactive antibodies. **In Begutachtung**
- Meyer-Arndt L[#], **Schwarz T[#]**, Loyal L, Henze L, Kruse B, Dingeldey M, Gürcan K, Uyar-Aydin Z, Müller MA, Drosten C, Sawitzki B, Paul F, Sander LE, Demuth I, Lauster R, Giesecke-Thiel C, Braun J, Corman VM, Thiel A. Serum but not mucosal antibody responses are associated with pre-existing SARS-CoV-2 spike cross-reactive CD4+ T

cells following BNT162b2 vaccination in the elderly. *The Journal of Immunology*.
Akzeptiert

- Tober-Lau P[#], **Schwarz T[#]**, Vanshylla K[#], Hillus D[#], Gruell H; EICOV/COVIM Study Group, Suttorp N, Landgraf I, Kappert K, Seybold J, Drosten C, Klein F, Kurth F, Sander LE, Corman VM. Long-term immunogenicity of BNT162b2 vaccination in older people and younger health-care workers. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2021 Nov;9(11):e104-e105. doi: 10.1016/S2213-2600(21)00456-2
- Hillus D[#], **Schwarz T[#]**, Tober-Lau P, Vanshylla K, Hastor H, Thibeault C, Jentzsch S, Helbig ET, Lippert LJ, Tscheak P, Schmidt ML, Riege J, Solarek A, von Kalle C, Dang-Heine C, Gruell H, Kopankiewicz P, Suttorp N, Drosten C, Bias H, Seybold J; EICOV/COVIM Study Group, Klein F, Kurth F, Corman VM, Sander LE. Safety, reactogenicity, and immunogenicity of homologous and heterologous prime-boost immunisation with ChAdOx1 nCoV-19 and BNT162b2: a prospective cohort study. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2021 Nov;9(11):1255-1265. doi: 10.1016/S2213-2600(21)00357-X
- Loyal L, Braun J[#], Henze L[#], Kruse B[#], Dingeldey M[#], Reimer U[#], Kern F[#], **Schwarz T[#]**, Mangold M, Unger C, Dörfler F, Kadler S, Rosowski J, Gürcan K, Uyar-Aydin Z, Frensch M, Kurth F, Schnatbaum K, Eckey M, Hippenstiel S, Hocke A, Müller MA, Sawitzki B, Miltenyi S, Paul F, Mall MA, Wenschuh H, Voigt S, Drosten C, Lauster R, Lachman N, Sander LE, Corman VM, Röhmel J, Meyer-Arndt L, Thiel A, Giesecke-Thiel C. Cross-reactive CD4 + T cells enhance SARS-CoV-2 immune responses upon infection and vaccination. *Science*. 2021 Oct 8;374(6564):eabh1823. doi: 10.1126/science.abh1823
- Mühlemann B, Thibeault C, Hillus D, Helbig ET, Lippert LJ, Tober-Lau P, **Schwarz T**, Müller MA; Pa-COVID-19 collaborative study group, Witzenrath M, Suttorp N, Sander LE, Drosten C, Jones TC, Corman VM, Kurth F. Impact of dexamethasone on SARS-CoV-2 concentration kinetics and antibody response in hospitalized COVID-19 patients: results from a prospective observational study. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021 Oct;27(10):1520.e7-1520.e10. doi: 10.1016/j.cmi.2021.06.008
- Tober-Lau P[#], **Schwarz T[#]**, Hillus D, Spieckermann J, Helbig ET, Lippert LJ, Thibeault C, Koch W, Bergfeld L, Niemeyer D, Mühlemann B, Conrad C, Kasper S, Münn F, Kunitz F, Jones TC, Suttorp N, Drosten C, Sander LE, Kurth F, Corman VM. Outbreak of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage after Vaccination in Long-Term Care Facility, Germany, February-March 2021. *Emerging Infectious Diseases*. 2021 Aug;27(8):2169-2173. doi: 10.3201/eid2708.210887
- **Schwarz T[#]**, Tober-Lau P[#], Hillus D, Helbig ET, Lippert LJ, Thibeault C, Koch W, Landgraf I, Michel J, Bergfeld L, Niemeyer D, Mühlemann B, Conrad C, Dang-Heine C, Kasper S, Münn F, Kappert K, Nitsche A, Tauber R, Schmidt S, Kopankiewicz P, Bias H, Seybold J, von Kalle C, Jones TC, Suttorp N, Drosten C, Sander LE, Corman VM, Kurth F. Delayed Antibody and T-Cell Response to BNT162b2 Vaccination in the Elderly, Germany. *Emerging Infectious Diseases*. 2021 Aug;27(8):2174-2178. doi: 10.3201/eid2708.211145

- Steiner S, **Schwarz T**, Corman VM, Sotzny F, Bauer S, Drosten C, Volk HD, Scheibenbogen C, Hanitsch LG. Reactive T Cells in Convalescent COVID-19 Patients With Negative SARS-CoV-2 Antibody Serology. *Frontiers in Immunology*. 2021 Jul 12;12:687449. doi: 10.3389/fimmu.2021.687449
- Schrezenmeier E, Bergfeld L, Hillus D, Lippert JD, Weber U, Tober-Lau P, Landgraf I, **Schwarz T**, Kappert K, Stefanski AL, Sattler A, Kotsch K, Dörner T, Sander LE, Budde K, Halleck F, Kurth F, Corman VM, Choi M. Immunogenicity of COVID-19 Tozinameran Vaccination in Patients on Chronic Dialysis. *Frontiers in Immunology*. 2021 Jun 30;12:690698. doi: 10.3389/fimmu.2021.690698
- Jahrsdörfer B, Groß R, Seidel A, Wettstein L, Ludwig C, Schwarz T, Körper S, Rojewski M, Lotfi R, Weinstock C, Seifried E, Corman VM, Drosten C, Münch J, Schrezenmeier H. Characterization of the SARS-CoV-2 Neutralization Potential of COVID-19-Convalescent Donors. *The Journal of Immunology*. 2021 Jun 1;206(11):2614-2622. doi: 10.4049/jimmunol.2100036
- Körper S, Jahrsdörfer B, Corman VM, Pilch J, Wuchter P, Blasczyk R, Müller R, Tonn T, Bakchoul T, Schäfer R, Juhl D, **Schwarz T**, Gödecke N, Burkhardt T, Schmidt M, Appl T, Eichler H, Klüter H, Drosten C, Seifried E, Schrezenmeier H. Donors for SARS-CoV-2 Convalescent Plasma for a Controlled Clinical Trial: Donor Characteristics, Content and Time Course of SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2021 May;48(3):137-147. doi: 10.1159/000515610
- **Schwarz T**[#], Heiss K[#], Mahendran Y, Casilag F, Kurth F, Sander LE, Wendtner CM, Hoehstetter MA, Müller MA, Sekul R, Drosten C, Stadler V, Corman VM. SARS-CoV-2 Proteome-Wide Analysis Revealed Significant Epitope Signatures in COVID-19 Patients. *Frontiers in Immunology*. 2021 Mar 23;12:629185. doi: 10.3389/fimmu.2021.629185
- Jahrsdörfer B, Kroschel J, Ludwig C, Corman VM, **Schwarz T**, Körper S, Rojewski M, Lotfi R, Weinstock C, Drosten C, Seifried E, Stamminger T, Groß HJ, Schrezenmeier H. Independent Side-by-Side Validation and Comparison of 4 Serological Platforms for SARS-CoV-2 Antibody Testing. *The Journal of Infectious Diseases*. 2021 Mar 3;223(5):796-801. doi: 10.1093/infdis/jiaa656
- von Rhein C, Scholz T, Henss L, Kronstein-Wiedemann R, **Schwarz T**, Rodionov RN, Corman VM, Tonn T, Schnierle BS. Comparison of potency assays to assess SARS-CoV-2 neutralizing antibody capacity in COVID-19 convalescent plasma. *Journal of Virological Methods*. 2021 Feb;288:114031. doi: 10.1016/j.jviromet.2020.114031
- Schlickeiser S[#], **Schwarz T**[#], Steiner S, Wittke K, Al Beshar N, Meyer O, Kalus U, Pruß A, Kurth F, Zoller T, Witzernath M, Sander LE, Müller MA, Scheibenbogen C, Volk HD, Drosten C, Corman VM, Hanitsch LG. Disease Severity, Fever, Age, and Sex Correlate With SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Responses. *Frontiers in Immunology*. 2021 Jan 29;11:628971. doi: 10.3389/fimmu.2020.62897
- Steiner S, Sotzny F, Bauer S, Na IK, Schmueck-Henneresse M, Corman VM, **Schwarz T**, Drosten C, Wending DJ, Behrends U, Volk HD, Scheibenbogen C, Hanitsch LG.

HCoV- and SARS-CoV-2 Cross-Reactive T Cells in COVID Patients. *Frontiers in Immunology*. 2020 Dec 23;11:607918. doi: 10.3389/fimmu.2020.607918

- Kreye J, Reincke SM, Kornau HC, Sánchez-Sendin E, Corman VM, Liu H, Yuan M, Wu NC, Zhu X, Lee CD, Trimpert J, Höltje M, Dietert K, Stöffler L, von Wardenburg N, van Hoof S, Homeyer MA, Hoffmann J, Abdelgawad A, Gruber AD, Bertzbach LD, Vladimirova D, Li LY, Barthel PC, Skriener K, Hocke AC, Hippenstiel S, Witzernath M, Suttrop N, Kurth F, Franke C, Endres M, Schmitz D, Jeworowski LM, Richter A, Schmidt ML, **Schwarz T**, Müller MA, Drosten C, Wendisch D, Sander LE, Osterrieder N, Wilson IA, Prüss H. A Therapeutic Non-self-reactive SARS-CoV-2 Antibody Protects from Lung Pathology in a COVID-19 Hamster Model. *Cell*. 2020 Nov 12;183(4):1058-1069.e19. doi: 10.1016/j.cell.2020.09.049
- Choi M, Bachmann F, Naik MG, Duettmann W, Duerr M, Zukunft B, **Schwarz T**, Corman VM, Liefeldt L, Budde K, Halleck F. Low Seroprevalence of SARS-CoV-2 Antibodies during Systematic Antibody Screening and Serum Responses in Patients after COVID-19 in a German Transplant Center. *Journal of Clinical Medicine*. 2020 Oct 23;9(11):3401. doi: 10.3390/jcm9113401
- Francois S, Peng J, **Schwarz T**, Duppach J, Gibbert K, Dittmer U, Kraft A. NK cells improve control of friend virus infection in mice persistently infected with murine cytomegalovirus. *Retrovirology*. 2013 Jun 5;10:58. doi: 10.1186/1742-4690-10-58

gleichwertiger Anteil

13 Danksagung

Als allererstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Jörg Timm bedanken für die Möglichkeit, an diesem spannenden Projekt arbeiten zu können. Ich schätze deine kontinuierliche Unterstützung während dieser Jahre sehr. Danke, dass du stets bereitwillig für Nachfragen und Diskussionen zur Verfügung gestanden hast. Deine Ratschläge und Anregungen haben mir während meiner Forschung und dem Schreiben dieser Dissertation sehr geholfen.

Ebenso bedanke ich mich bei meinem Zweitbetreuer Herrn Prof. Dr. Johannes Hegemann für seine kritischen Fragen und Anregungen während meiner Promotionszeit.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Andreas Walker für die vielen Tipps, die ich von ihm bekommen habe, bedanken. Außerdem danke ich dir für die zahlreichen Ermutigungen, wenn im Labor oder beim Schreiben nicht alles so geklappt hat, wie ich es gerne gehabt hätte.

Bei Tina Senff und Janine Brinkmann möchte ich mich für eure Freundschaft bedanken. Aus Arbeitskolleginnen wurden Freundinnen und diese Freundschaft möchte ich nie wieder missen. Ihr habt immer ein offenes Ohr für mich gehabt und mich von Anfang bis zum Abschluss mit Rat und Tat unermüdlich unterstützt.

Außerdem möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in meiner Promotionszeit im Laboralltag begleitet haben: Christine Cosmovici, Christopher Menne, Wiebke Moskorz, Ralf Grutza, Ramona Grothmann, Alexandra Graupner, Eugen Bäcker, Albert Zimmermann, Anja Voges, Nadine Lübke, Livia Schmidt, Lisa Müller, Lara Walotka, Philipp Ostermann, Johannes Ptok, Frank Hillebrand und Björn Wefers. Ich danke euch für die entspannte, produktive und unterhaltsame Arbeitsatmosphäre, für die Harry-Potter-, Bier- und Pizza-Abende und natürlich für die unvergesslichen Sommer- und Weihnachtspartys.

Ein großer Dank gebührt der „besten Mannschaft der Welt“, auch 1. Damen des SV Heißen genannt. Ihr wart immer der Ausgleich, den ich in der Promotionszeit gebraucht habe. Auch nach einem stressigen Tag im Labor wollte ich den Tag beim Handballtraining mit euch ausklingen lassen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie für ihr volles Vertrauen und ihre Liebe bedanken. Danke für den starken Zusammenhalt und die Unterstützung in den letzten Jahren. Ihr wart immer für mich da, daher möchte ich diese Arbeit meiner Familie widmen.

14 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Darüber hinaus ist die Dissertation keiner anderen Fakultät vorgelegt worden, noch hat es einen weiteren erfolglosen oder erfolgreichen Promotionsversuch gegeben.

Düsseldorf, den 21.12.2021

Tatjana Schwarz