

Aus dem Institut für Virologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Institutsleiter: Univ.-Prof. Dr. Jörg Timm

**Charakterisierung
von Hepatitis D Viren Sequenzpolymorphismen
in Assoziation zum HLA-Typ des Wirtes
in einer mongolischen Patientenkohorte**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Anne Alina Klöble
2025

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Jörg Timm

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Verena Keitel-Anselmino

Drittgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Mirko Trilling

Für meinen verstorbenen Großvater

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Magvan, B., Kloeble, A. A., Ptok, J., Hoffmann, D., Habermann, D., Gantumur, A., Paluschinski, M., Enebshi, G., Balz, V., Fischer, J.C., Chimeddorj, B., Walker, A., Timm, J., (2023), **Sequence diversity of hepatitis D virus in Mongolia.** *Frontiers in Medicine, Sec. Infectious Diseases: Pathogenesis and Therapy* (Volumen 10 – 2023, <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1108543>)

Zusammenfassung

Weltweit sind aktuell schätzungsweise 12 Millionen Menschen an einer Hepatitis D Virus (HDV)-Infektion erkrankt. Die Infektion verursacht eine akute und chronische Entzündung des Lebergewebes, assoziiert mit Leberzirrhose und dem hepatozellulären Karzinom. Die Prävalenz variiert stark zwischen den Ländern, wobei die Mongolei die höchste nationale HDV-Prävalenz aufweist. Derzeit zugelassene therapeutische Möglichkeiten sind durch hohe Rückfallraten nach Therapieende begrenzt. Die Evasion vor der HLA-Klasse I-assoziierten Immunantwort ist ein möglicher Grund für die Viruspersistenz. CD8⁺ T-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der HLA-Klasse I-assoziierten Immunantwort gegen chronische Infektionen. Eine Immunevasion durch Selektion von Virusvarianten in Zielepitopen könnte zur Viruspersistenz bei chronischen Infektionen beitragen. Experimentiell konnte bereits eine CD8⁺ T-Zellantwort bei Patienten mit einer HDV-Infektion nachgewiesen werden. Allerdings ist noch wenig über die Selektion viraler Sequenzpolymorphismen in CD8⁺ T-Zellepitopen und das Ausmaß dieser Strategie der Immunevasion bei HDV bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob ein statistisch belegbarer Zusammenhang zwischen viralen Sequenzpolymorphismen und HLA-Klasse I-Molekülen als Zeichen einer kontinuierlichen Anpassung an einen CD8⁺ T-Zelldruck besteht. Hierzu wurden Serumproben einer großen mongolischen Kohorte HDV-positiver Probanden durch eine Kollaboration mit der *Mongolian National University of Medical Sciences* (Ulaanbaatar) am Institut für Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf charakterisiert und sequenziert. Ziel der Arbeit war es, die Sequenzvariabilität von HDV in der Mongolei zu untersuchen und zu prüfen, ob die Selektion von Immunevasionsvarianten in CD8⁺ T-Zellepitopen zur Evolution von HDV beiträgt.

Die Kohorte HepMongolia besteht aus Serumproben (n = 1310) aus ländlichen Regionen der Mongolei und wurde auf Hepatitis B Virus (HBV)- und HDV-Infektionsmarker untersucht. Die kodierende Region des Delta Antigens wurde sequenziert und der HLA-Typ der Probanden bestimmt. Eine Sequenzanalyse mit dem Algorithmus *SeqFeatR* wurde durchgeführt, um Epitope unter Selektionsdruck in Anwesenheit von individuellen HLA-Klasse I-Allelen („HLA-footprints“) zu identifizieren. Bei 432 Hepatitis B Oberflächen-Antigen (HBsAg)-positiven Probanden waren 278 (64,35 %) HDV-Antikörper (anti-HDV) reaktiv. HDV-RNA wurde bei 213 von 278 anti-HDV-positiven (76,62 %) Probanden mit einer medianen HDV-Viruslast von 34 508 Kopien/ml nachgewiesen. Das kleine Delta Antigen wurde bei 157 Proben erfolgreich sequenziert. Phylogenetische Analysen zeigten, dass alle mongolischen Deltavirusisolate dem Genotyp 1 zuzuordnen sind, darunter waren in der Literatur noch nicht vorher beschriebene Subtypen. An zwölf Positionen wurden virale Sequenzpolymorphismen gefunden, die in Anwesenheit von bestimmten HLA-Genotypen signifikant angereichert waren und damit auf HLA-Klasse I-assoziierten Selektionsdruck hinweisen. Für die Mehrheit dieser Positionen wurden überlappende Epitope, die von relevanten HLA-Klasse I-Molekülen präsentiert werden, über HLA-Klasse I-Bindungs-Algorithmen der *Immune Epitope Database (IEDB)* vorhergesagt. Somit wurde gezeigt, dass Probanden mit bestimmten HLA-Klasse I-Allelen an verschiedenen Positionen einen Sequenzpolymorphismus als Hinweis auf eine Evasion vor der adaptiven Immunantwort zeigen.

Ähnlich wie bei anderen chronischen Virusinfektionen scheint HDV eine kontinuierliche Anpassung an HLA-Klasse I-assoziierten Selektionsdruck zu zeigen, die als HLA-footprints in zirkulierenden Isolaten nachweisbar sind. Diese Anpassung scheint die Evolution von HDV zu beeinflussen und zu einer hohen HDV-Sequenzvariabilität zu führen. Die in dieser Arbeit beschriebenen HLA-footprints ergänzen die laufende Erfassung HDV-spezifischer CD8⁺ T-Zellepitope und unterscheiden sich von bisher beschriebenen HLA-footprints einer europäisch-iranischen Kohorte, hinweisend auf einen populationsabhängigen HLA-Klasse I-assoziierten Selektionsdruck. In Folgeuntersuchungen könnten aufgeführte Evasionsmechanismen zur Charakterisierung von HDV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen verwendet werden und zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien, wie prophylaktischer Impfstoffe gegen HDV, beitragen.

Summary

An estimated number of 12 million people worldwide are currently infected with the hepatitis D virus (HDV). The infection causes acute and chronic inflammation of the liver tissue, associated with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The prevalence varies widely between countries, with Mongolia having the highest national prevalence of HDV. Currently approved treatment options are limited by the high rate of relapse at the end of treatment. Immune escape from the HLA class I-associated immune response may be a reason for viral persistence. Antiviral CD8⁺ T cells are a key component of the adaptive immune response against chronic viral infections. Immune escape may contribute to viral persistence in chronically infected patients through selection of viral variants in targeted epitopes. Although CD8⁺ T cell responses against HDV have been detected, little is known about selection of viral sequence polymorphisms and the extent of this immune escape strategy. Statistical associations between viral sequence polymorphisms and HLA class-I molecules are a powerful approach to identify positions under CD8⁺ T cell pressure. Serum samples from a large cohort of HDV-infected patients were characterised and sequenced in collaboration with the Mongolian National University of Medical Sciences (Ulaanbaatar) at the Institute of Virology of the University Hospital Düsseldorf. The aim of the study was to investigate the sequence variability of HDV in Mongolia and to determine whether selection of immune evasion variants in CD8⁺ T cell epitopes contributes to the evolution of HDV.

The HepMongolia, a cohort (n = 1 310) from the rural Mongolian countryside was analyzed for markers of hepatitis B virus (HBV)- and HDV-infection. The complete genomic region coding for the delta antigen was sequenced and the HLA-type was determined. Residues under selection pressure in the presence of individual HLA class-I alleles (“HLA-footprints”) were identified with the sequence analysis algorithm SeqFeatR. Of 432 Hepatitis B surface Antigen (HBsAg)-positive patients, 278 (64.35 %) were anti-HDV antibodies (anti-HDV) positive and HDV-RNA was detected in 213 of 278 (76.62 %) patients with a median HDV viral load of 34 508 copies/ml. The small delta antigen was successfully sequenced from 157 samples. Phylogenetic analysis revealed that all Mongolian HDV isolates belong to HDV genotype 1 with a number of novel so far unassigned subtypes. At twelve positions viral sequence polymorphisms were significantly enriched in the presence of certain HLA-genotypes, indicating HLA class I-associated selection pressure. For the majority of these positions, overlapping epitopes presented by the relevant HLA class-I molecule were predicted in HLA class-I binding prediction algorithms as implemented in the Immune Epitope Database (IEDB). It has been shown that patients with certain HLA class-I alleles have a sequence polymorphism at different positions, indicating escape from the adaptive immune response.

Similar to other chronic viral infections there is strong evidence that HDV continuously adapts to HLA class-I associated selection pressure leaving HLA-footprints in circulating isolates. This adaption seems to influence the evolution of HDV leading to a high HDV-sequence variability. The HLA-footprints identified in this work can support the ongoing mapping of HDV-specific CD8⁺ T cell epitopes and differ from previously described HLA-footprints of a European-Iranian cohort, indicating a population-dependent HLA class I-associated selection pressure. In future studies, the evasion mechanisms described could be used to characterise HDV-specific CD8⁺ T cells and may contribute to the development of new therapeutic strategies, such as prophylactic vaccines against HDV.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------|--|
| <i>ADAR1</i> | <i>Adenosine Desaminase acting on Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure-spezifische Adenosin-Desaminase) |
| ALT | Alanin-Aminotransferase |
| anti-HBc | Antikörper gegen das Hepatitis B Core-Antigen |
| anti-HBs | Antikörper gegen das Hepatitis B Oberflächen-Antigen |
| anti-HDV | Antikörper gegen das Hepatitis D Virus |
| AS | Aminosäure |
| <i>AU/ml</i> | <i>Arbitrary Units per ml</i> (relative Einheit pro ml) |
| bp | Basenpaare |
| <i>ct</i> | <i>cycle threshold</i> (Zyklus-Schwelle) |
| <i>DNA</i> | <i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure) |
| dNTPs | Desoxyribonukleotidtriphosphate |
| <i>DPBS</i> | <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> (Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung) |
| <i>EMA</i> | <i>European Medicine Agency</i> (Europäische Arzneimittel-Agentur) |
| <i>FDR</i> | <i>False Discovery Rate</i> (Falscherkennungsrate) |
| GTR-Modell | <i>Generalised Time Reversible</i> -Modell |
| <i>HAMs</i> | <i>Human leukocyte antigen-associated mutations</i> (Humane Leukozyten Antigen-assoziierte Mutationen) |
| HBsAg | Hepatitis B Oberflächen-Antigen |
| HBV | Hepatitis B Virus |
| HCC | Hepatozelluläres Karzinom |
| HCV | Hepatitis C Virus |
| HDAg | Hepatitis Delta Antigen |
| HDV | Hepatitis D Virus |
| HDV-1 bis 8 | Hepatitis D Virus-Genotypen 1 bis 8 |
| HDV-1a bis 1d bzw. 1e | Hepatitis D Virus-Genotyp 1 Subtypen 1a bis 1d bzw. 1e |
| <i>HIDIT</i> | <i>Hepatitis Delta International Intervention Trial</i> (internationale Interventionsstudie zu Hepatitis Delta) |
| HIV | Humanes Immundefizienz-Virus |
| HLA | Humanes Leukozyten Antigen |
| <i>HPLC</i> | <i>High performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) |

| | |
|-------------------|--|
| <i>HPSF</i> | <i>High purity salt free</i> (hoch reine und salzfreie Aufreinigungsmethode) |
| <i>ICTV</i> | <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> (Internationale Komitee für die Taxonomie von Viren) |
| <i>IEDB</i> | <i>Immune Epitope Database</i> (Datenbank für Immunepitope) |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| <i>IU/ml</i> | <i>International Units per ml</i> (internationale Einheiten pro ml) |
| kb | Kilobasen |
| L-HDAg | <i>Large</i> (großes) Hepatitis Delta Antigen |
| log ₁₀ | Logarithmus zur Basis 10 |
| <i>MHC</i> | <i>Major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex) |
| <i>mIU/ml</i> | <i>mIU/ml</i> (mIU Einheit pro ml) |
| <i>mRNA</i> | <i>messenger Ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure) |
| n | Anzahl |
| <i>NGS</i> | <i>Next Generation Sequencing</i> (Sequenzierung der nächsten Generation) |
| NTCP | Natrium-Taurocholat-Cotransport-Polypeptid |
| <i>PCR</i> | <i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion) |
| PEG-IFN | pegyliertes Interferon |
| pmol | Pikomol |
| PTMs | post-translationale Modifikationen |
| <i>RNA</i> | <i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure) |
| RNase | Ribonuklease |
| RT | Reverse Transkriptase |
| <i>S/CO</i> | <i>signal per cut-off</i> (Signal pro Grenzwert) |
| <i>SARS-CoV-2</i> | <i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2</i> (Schweres-akutes-Atemwegssyndrom-Coronavirus Typ 2) |
| S-HDAg | <i>Small</i> (kleines) Hepatitis Delta Antigen |
| <i>Taq</i> | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TBE | Tris-Borat-Ethylendiamintetraacetat |
| <i>TD</i> | <i>target detected but not quantifiable</i> (detektiertes Ziel nicht quantifizierbar) |
| UKD | Universitätsklinikum Düsseldorf |
| <i>WHO</i> | <i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation) |
| µM | Mikromolar |

Gender-Hinweis

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird in dieser Arbeit das generische Maskulinum verwendet und auf eine geschlechtsneutrale Formulierung verzichtet. Nachfolgende männliche Schreibweisen beziehen sich immer auf alle Geschlechter.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Die Hepatitis D Virus-Infektion | 1 |
| 1.1.1 | Klinischer Verlauf | 1 |
| 1.1.2 | Diagnostik | 2 |
| 1.1.3 | Transmission | 2 |
| 1.2 | Struktur und Aufbau des HDV-Genoms | 3 |
| 1.2.1 | HDV-RNA-Replikation | 4 |
| 1.2.2 | Das Hepatitis Delta Antigen | 5 |
| 1.3 | Globale Verbreitung von HDV | 6 |
| 1.3.1 | HBV-/HDV-Prävalenz | 6 |
| 1.3.2 | HDV-Genotypen 1 bis 8 | 8 |
| 1.4 | Therapie und Prävention | 10 |
| 1.4.1 | Pegyliertes Interferon-alpha als langjährig etablierte Therapie | 10 |
| 1.4.2 | Bulevirtid als zugelassene Therapiealternative | 12 |
| 1.4.3 | Neue Wirkstoffe als potenzielle Therapiealternativen | 14 |
| 1.4.4 | HBV-Impfung als präventive Maßnahme | 16 |
| 1.5 | Virale Anpassungsmechanismen an das Immunsystem | 16 |
| 1.5.1 | Bedeutung und Wirkweise von CD8 ⁺ T-Zellen der adaptiven Immunantwort | 17 |
| 1.5.2 | Bedeutung viraler Sequenzpolymorphismen | 18 |
| 1.5.2.1 | Kontinuierliche Anpassung chronischer Virusinfektionen an einen HLA-Klasse I-assoziierten Selektionsdruck | 19 |
| 1.5.2.2 | HDV-Sequenzpolymorphismen als Zeichen für eine Evasion vor der HLA-Klasse I-assoziierten Immunantwort | 20 |
| 1.6 | Zielsetzung der Arbeit | 21 |
| 2 | Material und Methoden | 22 |
| 2.1 | Material | 22 |
| 2.1.1 | HDV-Serumproben | 22 |
| 2.1.2 | Chemikalien | 23 |
| 2.1.3 | Verwendete Kits | 23 |
| 2.1.4 | Oligonukleotide | 24 |
| 2.1.5 | Plasmid | 24 |
| 2.1.6 | 1st International Standard für HDV-RNA | 24 |
| 2.1.7 | Enzyme | 25 |
| 2.1.8 | Sonstige Materialien | 25 |
| 2.1.9 | Geräte | 26 |
| 2.1.10 | Verwendete Software | 27 |
| 2.2 | Methoden | 28 |
| 2.2.1 | Ethikvotum | 28 |
| 2.2.2 | Molekularbiologische Methoden | 28 |
| 2.2.2.1 | Bestimmung von HBsAg, anti-HBs, anti-HBc und anti-HDV | 28 |
| 2.2.2.2 | RNA-Extraktion aus Serum mittels EZ1 Advanced von Quiagen | 28 |
| 2.2.2.3 | Quantitativer Nachweis von HDV-RNA im Serum in der TaqMan-PCR | 29 |
| 2.2.2.4 | Semi-nested-PCR mit HDV-spezifischen Primern | 31 |
| 2.2.2.5 | Identifizierung amplifizierter DNA-Fragmente | 33 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.2.2.6 | Sequenzierung nach Sanger | 33 |
| 2.2.2.7 | HLA-Diagnostik | 34 |
| 2.2.3 | Analytische Methoden | 35 |
| 2.2.3.1 | Phylogenetische Analyse und Identifizierung von Sequenzpolymorphismen | 35 |
| 2.2.3.2 | Statistische Auswertung mit <i>SeqFeatR</i> | 36 |
| 2.2.3.3 | Identifizierung viraler Sequenzpolymorphismen in <i>MHC-I</i> -Molekül bindenden Peptiden | 36 |
| 3 | Ergebnisse | 37 |
| 3.1 | Hohe HBV/HDV-Prävalenz in der HepMongolia-Kohorte | 37 |
| 3.1.1 | Analyse der HBV- und HDV-Infektionsmarker | 37 |
| 3.1.2 | HDV-RNA Quantifizierung mittels <i>TaqMan-PCR</i> | 38 |
| 3.1.3 | Höchste HDV-Prävalenz in westlich gelegenen mongolischen Regionen innerhalb der HepMongolia-Kohorte | 40 |
| 3.2 | Sequenzanalyse des HDAg | 45 |
| 3.2.1 | Etablierung einer <i>PCR</i> zur Amplifikation der genomischen Region des <i>L</i> -HDAg | 45 |
| 3.2.2 | Amplifikation des <i>L</i> -HDAg von Deltavirusisolaten der mongolischen Kohorte | 48 |
| 3.2.3 | Identifizierung von neuen Subtypen des HDV-Genotyps 1 | 50 |
| 3.3 | Häufigkeitsverteilung der HLA-Klasse I-Allele | 55 |
| 3.4 | Hinweise auf eine Anpassung an HLA-Klasse I-assoziierten Selektionsdruck ... | 58 |
| 3.4.1 | Virale Sequenzpolymorphismen in mongolischen Deltavirusisolaten sind assoziiert mit spezifischen HLA-Klasse I-Allelen | 58 |
| 3.4.2 | HLA- <i>footprints</i> liegen überwiegend in Bereichen mit dem passenden Bindungsmotiv für das relevante HLA-Klasse I-Molekül | 61 |
| 4 | Diskussion | 67 |
| 4.1 | Persistierend hohe HDV-Prävalenz trotz Einführung von HBV-Impfprogrammen | 67 |
| 4.2 | Hohe Sequenzvariabilität des HDV-Genotyps 1 | 69 |
| 4.3 | Mögliche Prägung der molekularen Epidemiologie durch die mongolische Nomadenkultur mit Evidenz lokaler Transmissionsereignisse | 71 |
| 4.4 | HLA-Klasse I-assoziiertes positiver Selektionsdruck beeinflusst die Evolution von HDV | 75 |
| 4.4.1 | Evidenz für positiven Selektionsdruck an elf Positionen im <i>S</i> -HDAg | 75 |
| 4.4.2 | HLA- <i>footprints</i> in flankierenden Regionen als möglicher zusätzlicher Evasionsmechanismus | 80 |
| 4.4.3 | HLA- <i>footprints</i> sparen funktionell wichtige Aminosäure-Positionen des <i>S</i> -HDAg aus | 82 |
| 4.5 | Einfluss der Häufigkeit eines HLA-Allels auf die Häufigkeit viraler Evasionsvarianten | 84 |
| 4.6 | Schlussfolgerungen und Ausblick | 85 |
| 5 | Literatur- und Quellenverzeichnis | 87 |
| 6 | Abbildungsverzeichnis | 97 |
| 7 | Tabellenverzeichnis | 99 |

1 Einleitung

1.1 Die Hepatitis D Virus-Infektion

Das Hepatitis D Virus (HDV) ist das einzige Mitglied der Gattung Deltavirus [1] und löst beim Menschen eine Hepatitis D Infektion, eine akute und chronische Entzündung des Lebergewebes, aus. HDV wurde 1977 erstmals von Rizzetto et al. [2] in Hepatitis B Virus (HBV)-infizierten Patienten mit schweren Leberschäden beschrieben. Das Virus benötigt das Oberflächenprotein von HBV, das Hepatitis B Oberflächen-Antigen (HBsAg), als Hüllprotein um neue infektiöse Viruspartikel (Virione) zu bilden [3]. Darüber hinaus gelangt das Virus über Adhäsion des HbsAg an den Leber-/Gallensäurerezeptor (Natrium-Taurocholat-Cotransport-Polypeptid, NTCP) in die Wirtszelle [4]. Somit ist die Etablierung einer HDV-Infektion nur in HBsAg-positiven Patienten möglich und das Virus ist im Menschen hoch hepatotrop.

Eine chronische HDV-Infektion wird nach Alfaiate et al. [5] oft als die schwerste Form der chronisch viralen Hepatitiden eingestuft. HDV-infizierte Patienten zeigen im Vergleich zu HBV-mono-infizierten Patienten einen aggressiveren klinischen Verlauf mit einer schnelleren Progression und einem dreifach erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Leberzirrhose [5]. Zudem verdreifacht HDV das Risiko ein Hepatozelluläres Karzinom (HCC) zu entwickeln und verdoppelt die Mortalitätsrate in chronisch infizierten HBV-Patienten mit bestehender Leberzirrhose [6]. Eine aktuelle Metaanalyse zeigte, dass von HDV-infizierten Patienten mit Folgeerscheinungen 18 % eine Leberzirrhose und 20 % ein HCC aufwiesen [7].

1.1.1 Klinischer Verlauf

In Abhängigkeit vom Hepatitis-B-Status des Trägers wurden zwei Verlaufsformen beschrieben, die akute und chronische HDV-Infektion. Negro et al. [8] fassten den Verlauf einer akuten HDV-Infektion anschaulich zusammen. Mit einer Inkubationszeit von ein bis zwei Monaten tritt sie bei einer simultanen HBV/HDV-Koinfektion auf. HBV/HDV-Koinfektionen sind meist transient, selbst-limitierend und heilen bei 95 % der Erwachsenen aus. Folglich kommt es bei einer HBV/HDV-Koinfektion ebenso wie bei einer HBV-Monoinfektion in weniger als 5 % der Fälle zu einer Chronifizierung [8]. Yurdaydin et al. [9] beschrieben in einem systematischen Übersichtsartikel, dass der klinische Verlauf von einer milden bis hin zu einer fulminanten Hepatitis mit tödlichem Ausgang variiert. Trotz hoher Ausheilungsraten hatten HBV/HDV-koinfizierte Patienten im Vergleich zu HBV-monoinfizierten Patienten ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer schweren oder fulminanten Hepatitis mit akutem

Leberversagen [9]. Eine HDV-Superinfektion bei einer bereits bestehenden, chronischen HBV-Infektion hingegen hat eine deutlich niedrigere Ausheilungsrate und führt in bis zu 80 % der Fälle zu einer HBV/HDV-Chronifizierung [8].

1.1.2 Diagnostik

Antikörper gegen HDV, anti-HDV, können durch serologische Testungen in HDV-infizierten Patienten detektiert werden. Während einer Primärinfektion steigen anti-HDV Immunglobulin M (IgM) Titer zuerst an, gefolgt vom Anstieg des anti-HDV Immunglobulin G (IgG) Titers, der in Patienten mit einer Koinfektion nach ein paar Monaten meist abnimmt, jedoch in Patienten mit einer progressiven Superinfektion persistiert [10]. Anti-HDV IgM wurde in chronisch HDV-infizierten Patienten detektiert, assoziiert mit der Entwicklung eines progressiven Leberschadens [11], einer histologisch nachweisbaren Entzündungsreaktion und einer Krankheitsaktivität mit erhöhten Leberwerten [12]. Folglich scheinen Antikörper gegen HDV nicht-neutralisierend zu sein und können als diagnostische Marker zum Nachweis einer aktiven bzw. chronischen oder ausgeheilten Infektion genutzt werden. Die Diagnostik von HDV besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Schritten, die im systematischen Übersichtsartikel von Botelho-Souza et al. [13] detailliert beschrieben wurden. Im ersten Schritt erfolgt ein Screening HBsAg-positiver Patienten auf Antikörper gegen das Hepatitis Delta Antigen (anti-HDV IgM und IgG). Bei reaktivem Ergebnis (anti-HDV „positiv“) wird im zweiten Schritt HDV-RNA im Serum untersucht. Bei einer aktiven Infektion ist HDV-RNA im Serum nachweisbar [13]. Alfaiate et al. [5] wiesen in einem systematischen Übersichtsartikel auf Besonderheiten der einzelnen Werte hin. Nach Ausheilung einer HDV-Infektion ist HDV-RNA im Serum nicht nachweisbar („negativ“), anti-HDV IgG kann jedoch persistieren. Außerdem sollte bei Patienten mit akuter HBsAg-positiver Hepatitis zu Infektionsbeginn eine Reevaluation der anti-HDV-Antikörper erfolgen, da anti-HDV-Antikörper in den ersten Tagen der Infektion nicht detektierbar sein können [5].

1.1.3 Transmission

Im Menschen kann HDV die gleichen Übertragungswege wie HBV nutzen, wobei die Übertragung enger an Kontakte zu kontaminiertem Blut gebunden ist. Die Übertragung kann grundsätzlich parenteral, sexuell oder selten vertikal erfolgen [14]. Am häufigsten wird HDV durch Exposition zu infiziertem Blut übertragen [15, 16]. Alfaiate et al. [5] beschrieben, dass die Art der Übertragung je nach Gebiet abhängig von der HDV-Prävalenz ist. Kontakt mit infiziertem Blut scheint der Hauptübertragungsweg in Europa und den Vereinigten Staaten zu sein. Ein großer Risikofaktor ist der intravenöse Drogenkonsum, häufig assoziiert mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) und dem Hepatitis C Virus (HCV). Evidenz für

sowohl homosexuelle als auch heterosexuelle Übertragungswege zeigten Gebiete mit hoher HDV-Prävalenz. Ein intrafamiliärer Übertragungsweg durch einen vermuteten inapparenten Austausch von Körperflüssigkeiten wurde in Populationen mit niedrigem Einkommen nachgewiesen [5]. Ein erhöhtes Risiko einer HBV-/HDV-Koinfektion wurde zudem bei Hämodialyse-Patienten, bei Männern, die Sex mit Männern praktizieren und bei kommerziellen Sexarbeitern beschrieben [16, 17].

Da in dieser Arbeit eine mongolische Kohorte untersucht wurde, werden im Folgenden Studienergebnisse zur Übertragung von HDV in der Mongolei zusammengefasst. HDV wird bei Kindern hauptsächlich durch eine parenterale Exposition im Gesundheitswesen wie Krankenhausaufenthalte und in der Familie übertragen [18, 19]. Baatarkhuu et al. [20] beschrieben im Rahmen einer nationalen Studie eine signifikante Assoziation zwischen anti-HDV-positiven Probanden (Altersspanne von 0 Jahren bis 80 Jahre) und Bluttransfusionen, Zahnbehandlungen, Operationen und Tattoos in der Vorgeschichte. Eine mongolische Studie von Boldbaatar et al. [21] beschrieb eine hohe Prävalenz von HDV- und Syphilis-Koinfektionen in der erwachsenen Bevölkerung von Ulanbaatar. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die sexuelle Übertragung ein häufiger Übertragungsweg von HBV/HDV in der sexuell aktiven mongolischen Bevölkerung ist [21].

1.2 Struktur und Aufbau des HDV-Genoms

HDV besitzt nach aktuellem Kenntnisstand das kleinste Genom aller Viren, die Säugetiere befallen und weist Ähnlichkeiten mit pflanzlichen Viroiden auf [22]. Das Genom besteht aus einer negativ orientierten zirkulären Einzelstrang *RNA* [23] mit einer Länge von ca. 1,7 Kilobasen (kb) [24]. Durch intramolekulare Basenpaarung von mindestens 70 % aller Nukleotide faltet sich das HDV-*RNA*-Genom zu einer stabförmigen Sekundärstruktur (Abb. 1.1). Die intramolekulare Basenpaarung basiert auf einem hohen Guanin- und Cytosin-Gehalt [25].

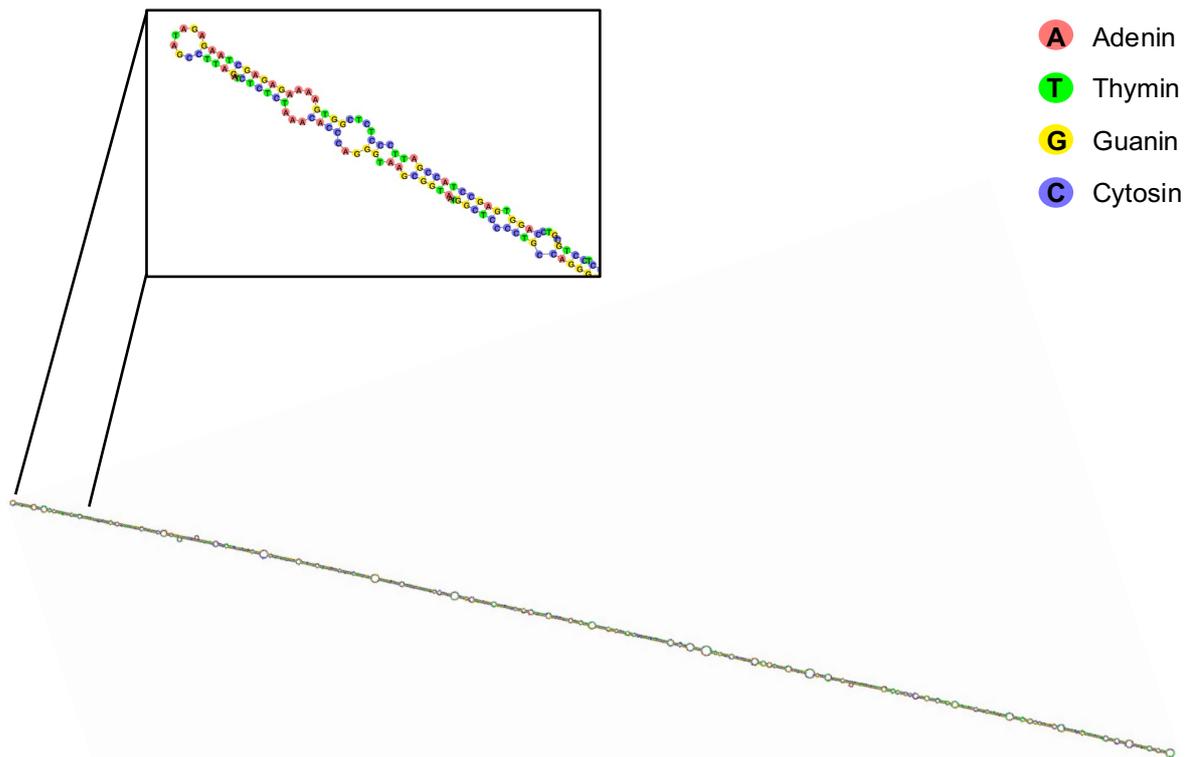


Abb. 1.1: Stabförmige Sekundärstruktur des HDV-RNA-Genoms

Dargestellt ist die stabförmige Sekundärstruktur des HDV-RNA-Genoms einer HDV-Referenzsequenz, öffentlich zugänglich über die *GenBank* (*Accession number* M21012.1 [26]). Die Abbildung wurde mit dem Programm Geneious erstellt. Ein hoher Guanin- und Cytosin-Gehalt führt zu einer intramolekularen Basenpaarung von mindestens 70 % aller Nucleotide.

1.2.1 HDV-RNA-Replikation

Für die Replikation genomischer HDV-RNA existiert Evidenz für die Hypothese eines doppelten zirkulären Mechanismus, ähnlich des vorgeschlagenen Mechanismus für Viroide [27]. Durch Rekrutierung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase der Wirtszelle, hauptsächlich der Polymerase II [28], wird die stabförmige virale RNA als Matrize benutzt, als wäre es eine DNA Matrize [29]. Tseng et al. [27] fassten den Ablauf der RNA-Replikation in einem systematischen Übersichtsartikel zusammen. In der ersten Runde dient die genomische RNA als Matrize zur Erstellung einer multimeren, antigenomischen RNA. Während der Replikation entstehende antigenomische RNA-Monomere werden durch eine intrinsische Ribozym-Aktivität zu Monomeren gleicher Länge zugeschnitten und anschließend zu antigenomischen zirkulären Molekülen (Antigenom) verknüpft. In der zweiten Runde der Replikation dient dann wiederum das Antigenom als Matrize zur Erstellung zirkulärer genomischer RNA [27].

1.2.2 Das Hepatitis Delta Antigen

Während Viroide keine protein-kodierende Kapazität aufzeigen, kodiert HDV-RNA für ein Protein, das Hepatitis Delta Antigen (HDAg) [22]. Der offene Leserahmen für die kodierende Sequenz des HDAg liegt innerhalb des Antigenoms [24, 30], wobei die Translation von einer subgenomischen linearen *messenger RNA (mRNA)* aus 0,8 kb erfolgt [31]. Das HDAg tritt in zwei Isoformen auf, dem kleinen 24 Kilodalton HDAg (*Small-* bzw. *S-HDAg*) und dem großen 27 Kilodalton HDAg (*Large-* bzw. *L-HDAg*) [29]. Alfaiate et al. [5] charakterisierten umfassend die beiden HDAg-Isoformen. Das S-HDAg besteht aus 195 Aminosäuren (AS), wird direkt von der *mRNA* translatiert und tritt als frühere Form in infizierten Zellen auf. Bei der HDV-Replikation ist das S-HDAg erforderlich für die Initiation, Elongation und HDV-RNA-Akkumulation. Das L-HDAg ist 19 bis 20 AS länger, besteht somit aus 214 AS und inhibiert die Synthese des HDV-Genoms und somit die HDV-Replikation. Außerdem ist das Protein erforderlich für die Entstehung neuer Virione [5]. Die Entstehung des L-HDAg erfolgt während der Replikation durch das Enzym *Adenosine Desaminase acting on RNA (ADAR1)*, das die Umwandlung von Adenosin zu Inosin innerhalb des Antigenoms katalysiert, wodurch das *Stop Codons* UAG (Uracil, Adenin, Guanin) des offenen Leserahmens für das S-HDAg ersetzt wird durch Tryptophan UGG (Uracil, Guanin, Guanin) und die Translation bis zum nächsten *Stop Codon* fortschreitet [32].

Ein Virion umhüllt vom HBsAg enthält das HDV-Ribonukleoprotein, zusammengesetzt aus genomischer HDV-RNA und ca. 70 Kopien variabler Menge des S- und L-HDAg [33, 34] (Abb. 1.2). Für die Umhüllung der Virionen sind Prenylationen im C-terminalen Ende des L-HDAg notwendig, die eine Interaktion mit dem HBsAg ermöglichen [35].

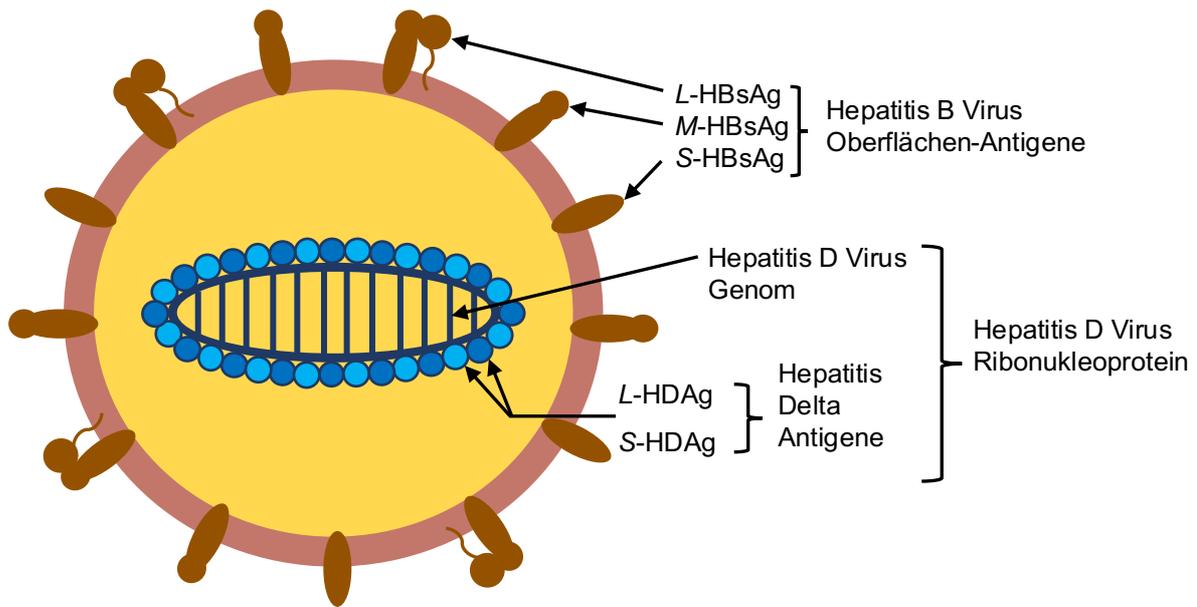


Abb. 1.2: HDV-Virion

Schematische Darstellung eines HDV-Viruspartikels. Ein HDV-Virion ist umhüllt vom Hepatitis B Oberflächen-Antigen (HBsAg) des HBV, bestehend aus drei Formen *Small* (S), *Medium* (M) und *Large* (L). Das HDV-Ribonukleoprotein besteht aus einer zirkulären, negativ orientierten Einzelstrang-Ribonucleic acid (HDV-Genom) assoziiert mit den zwei Formen des Delta Antigens (HDAg), *Large*-HDAg (L-HDAg) und *Small*-HDAg (S-HDAg) (in Anlehnung an Magnius et al. [1]).

1.3 Globale Verbreitung von HDV

1.3.1 HBV-/HDV-Prävalenz

HDV ist global verbreitet, wobei sich Prävalenzen geographisch stark unterscheiden (Abb. 1.3 (A)) [7]. Nach aktuellen Schätzungen zweier Metaanalysen betrug die HDV-Prävalenz weltweit zwischen 0,16 % [7] und 0,98 % [36]. Somit reichen die Schätzungen HDV-Infizierter weltweit von 12 Millionen [7] bis 72 Millionen [36]. Die geschätzte anti-HDV-Prävalenz der HBsAg-positiv Getesteten betrug zwischen 4,5 % [7] und 14,57 % [36]. Die Metaanalyse von Stockdale et al. [7] wurde 2020 in Zusammenarbeit mit der *World Health Organization* (WHO) publiziert [17]. Im Folgenden wird daher auf die Ergebnisse dieser Metaanalyse Bezug genommen. Mit 36,9 % weist die Mongolei die höchste nationale anti-HDV-Prävalenz innerhalb HBsAg-positiv Getesteter auf (Abb. 1.3 (B)). Moldawien sowie Länder in West- und Zentralafrika sind ebenfalls hoch endemische HDV-Regionen mit anti-HDV-Prävalenzen > 10 % [7].

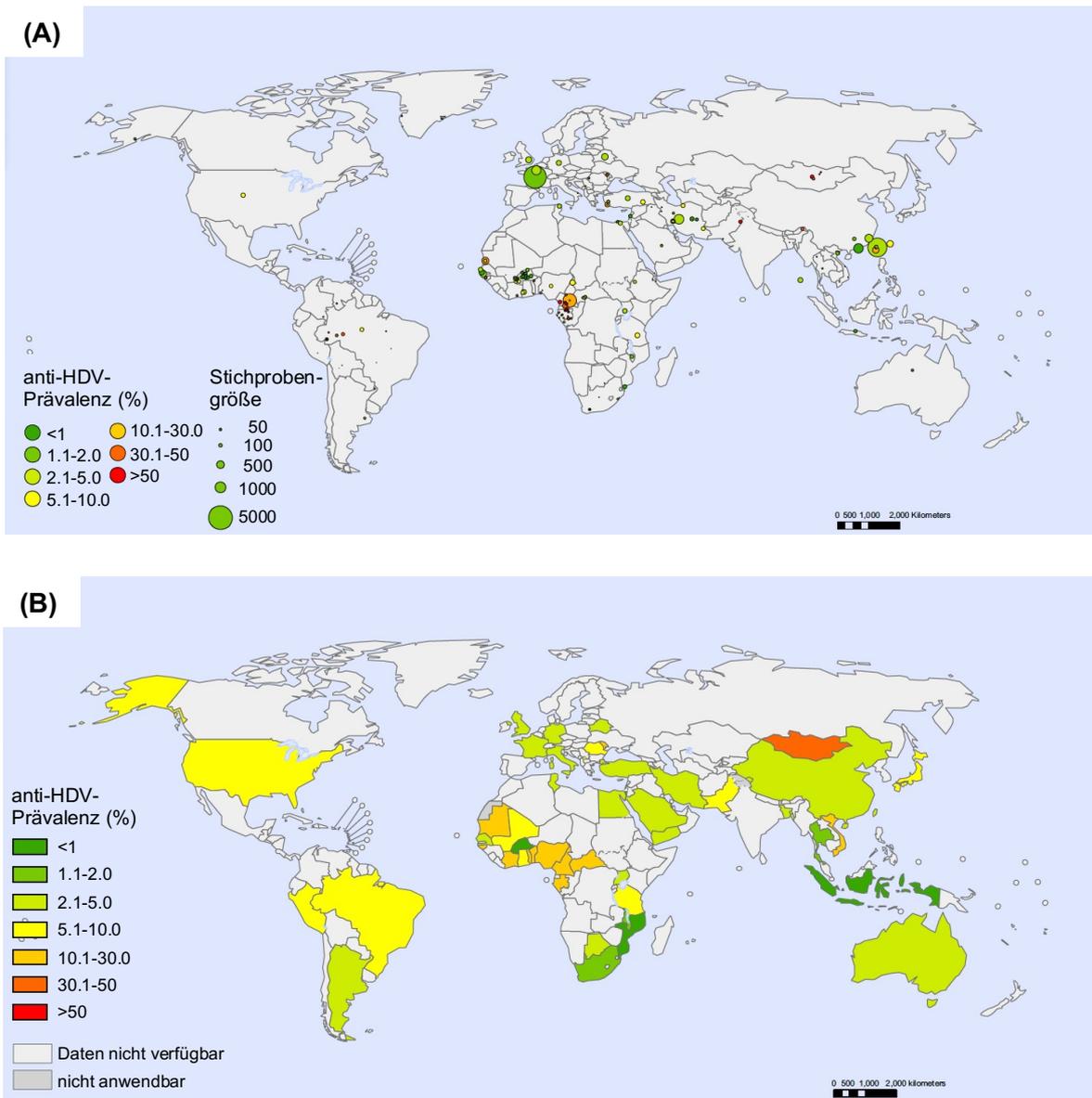


Abb. 1.3: Antikörper gegen das Hepatitis D Virus (anti-HDV)-Prävalenz in Hepatitis B Oberflächen-Antigen (HBsAg)-Trägern

(A) Allgemeinbevölkerung. Jeder Punkt steht für eine Probe, wobei die Punktgröße die Probenanzahl und die Farbe die HDV-Seroprevalenz repräsentiert. **(B)** Schätzungen der anti-HDV-Prävalenz in HBsAg-Trägern der Allgemeinbevölkerung auf Länderebene. Die Farbe repräsentiert die HDV-Seroprevalenz (die Abbildungen (A) und (B) wurden von Stockdale et al. [7] zur Verfügung gestellt und bearbeitet).

Durch eine sehr hohe nationale anti-HDV-Prävalenz ist auch die Inzidenz von assoziierten Folgeerkrankungen in der Mongolei sehr hoch. Eine nationale Einschätzung von 2017 [37] deutete eine deutlich höhere HDV-Prävalenz als die oben aufgeführte Schätzung der aktuellen Metaanalyse [7] an. Nach dieser Einschätzung wiesen 10,6 % der erwachsenen Population eine HBV-Infektion auf [37]. In einer Folgestudie wurde bei 61 % der HBsAg-positiv Getesteten eine HDV-Infektion nachgewiesen [38]. Auswertungen des nationalen Krebsregisters der Mongolei [39] zeigten, dass HCC-Erkrankungen zwischen 2008 und 2012 die am häufigsten diagnostizierte Krebsform darstellten. Das Risiko einer HCC-Erkrankung war

in der mongolischen Bevölkerung 4 bis zu > 25-fach höher als in China, Amerika oder Russland [39]. Baatarkhuu et al. [20] bestätigten in ihrer 2018 veröffentlichten Arbeit, dass die Mongolei die höchste HCC-Inzidenz weltweit aufwies. In dieser Arbeit waren Malignome die zweithäufigste Todesursache, wobei das HCC der Hauptgrund für einen Malignom-assoziierten Tod darstellte (44 % der Männer, 42 % der Frauen). Dabei waren 80 % der HCC-Patienten mit einer HCV- oder HBV-Infektion und 14,4 % der HCC-Patienten mit einer HCV- und HBV-Infektion assoziiert. Obwohl die Einführung der HBV-Impfung seit 1991 auch in der Mongolei zu einem Rückgang der Inzidenz führte, blieb die HBV-Prävalenz zunächst hoch und HDV-Koinfektionen innerhalb der erwachsenen Population häufig [20].

Mit Einführung der universellen HBV-Impfung in den 1990ern ist die HDV-Prävalenz in industrialisierten Ländern zwar zurückgegangen [40], seit Anfang des 20. Jahrhunderts zeigt sich jedoch in vielen Ländern Europas kein weiterer Rückgang [41]. Coppola et al. [42] beschrieben die Entwicklung der anti-HDV-Prävalenz in Italien. Eine hohe anti-HDV-Prävalenz in chronischen HBsAg Trägern von 24,6 % wurde 1981 durch multizentrische Studien belegt. Bis zum Jahr 2000 wurde ein Rückgang auf 8,3 % beobachtet, in darauffolgenden Jahren ging die Prävalenz jedoch nicht weiter zurück (Stagnation auf 9,7 % bis 12 %) [42]. Zum einen könnten Immigranten aus hoch endemischen HDV-Regionen die Infektion wieder in Länder wie Deutschland, England, Frankreich, Großbritannien und Griechenland eingeführt haben. Zum anderen scheint die Infektion durch ein vermehrtes Risikoverhalten für HDV-Transmissionen wie dem intravenösen Drogenkonsum in Europa ein großes medizinisches Problem darzustellen [41, 42]. Auch in den Vereinigten Staaten scheint die HDV-Prävalenz innerhalb der Risikogruppe von intravenösen Drogenkonsumenten relativ hoch zu sein (HDV-Virämie in 35,6 % der HBsAg-positiven Probanden) [43].

Somit sind nach aktuellen Schätzungen HDV-Infektionen bei HBsAg-positiv Getesteten weltweit relativ häufig und stellen trotz der Einführung von Impfprogrammen gegen HBV ein gesundheitliches Problem sowohl in industrialisierten, niedrigendemischen Gebieten wie Europa als auch in hochendemischen Gebieten wie der Mongolei dar.

1.3.2 HDV-Genotypen 1 bis 8

HDV wird in acht Genotypen klassifiziert (HDV-1 bis 8) [1]. Le Gal et al. [44] bestätigten in ihrer Studie die Einteilung in acht Genotypen, die durch eine intergenotypische Übereinstimmung von bis zu > 85 % definiert sind. Karimzadeh et al. [45] stellten fest, dass HDV-3 die höchste geschätzte intergenotypische Differenz mit durchschnittlich 28,44 % zu den restlichen HDV-Genotypen (1, 2, 4 bis 8) aufweist. Stockdale et al. [7] beschrieben die Verteilung der einzelnen Genotypen weltweit. HDV-1 ist auf der ganzen Welt der weit verbreitetste Genotyp mit der höchsten Prävalenz (89,9 %). Dagegen weisen HDV-2 bis 8 eine

Assoziation zu geographischen Regionen auf. HDV-2 wurde gehäuft in Asien, HDV-3 in Lateinamerika (hauptsächlich im Amazonasbecken), HDV-4 in Japan und China (Taiwan), HDV-5 in West-Afrika und HDV-6 bis 8 in Zentral-Afrika detektiert (Abb. 1.4) [7].

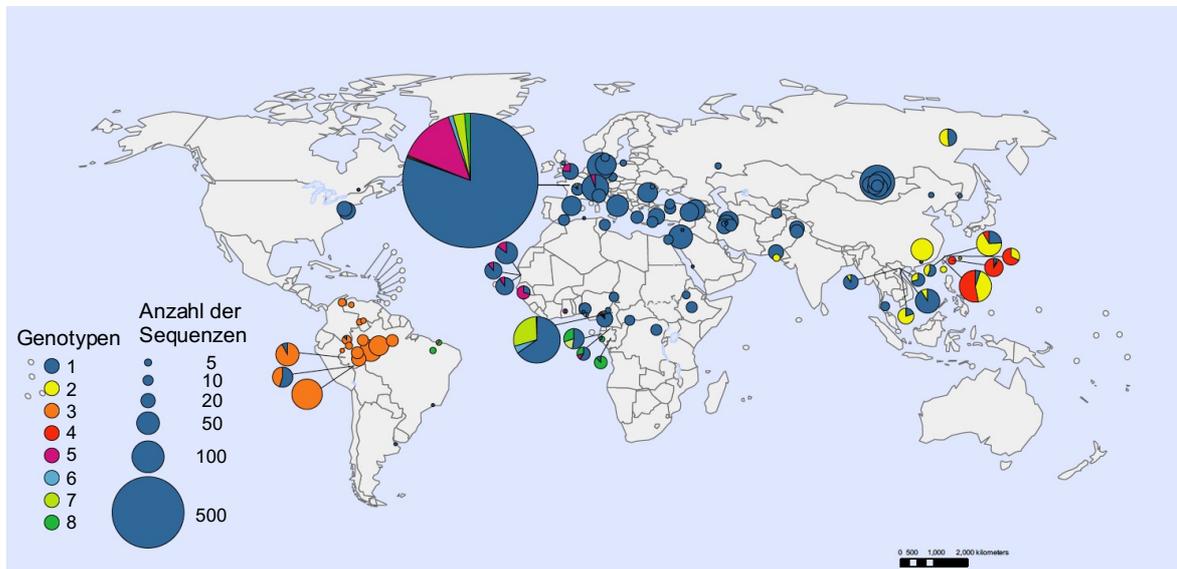


Abb. 1.4: Geographische Verteilung der HDV-Genotypen 1 bis 8

Jeder Kreis steht für eine Probe mit bekanntem HDV-Genotyp. Die Farbe der Kreise definiert den Genotyp. Die Größe des Kreises ist proportional zur Probenanzahl. Die Daten stammen aus öffentlich verfügbaren HDV-Sequenzen hinterlegt in der *GenBank*¹ und der *European Nucleotide Archive Database*² (die Abbildung wurde von Stockdale et al. [7] zur Verfügung gestellt und bearbeitet, ¹<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, ²<http://www.ebi.ac.uk/ena/>).

Salpini et al. [46] fassten zusammen, dass HDV-1 bis 8 den Krankheitsverlauf unterschiedlich beeinflussen. HDV-1 und 3 wurden meist mit schwereren Manifestationen und Auswirkungen der Lebererkrankung assoziiert als HDV-2 und 4. Zu HDV-5 existieren kontroverse Daten. Im Vergleich zu HDV-1 wurde sowohl eine bessere Prognose als auch eine höhere Zirrhoserate beschrieben [46].

Folglich wird nach dem *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)* HDV in acht Genotypen klassifiziert [1], wobei sich sowohl die geographische Verteilung [7] als auch die klinische Manifestation der einzelnen Genotypen stark voneinander unterscheiden [46].

Da das HDV-Genom charakterisiert ist durch eine hohe genetische Variabilität (40 %), wobei HDV-1 die höchste genetische Variabilität (11,3 % bis 13,3 %) aufzeigt, schlugen Le Gal et al. [44] 2017 eine Subklassifikation von HDV-1 in vier Subtypen (HDV-1a bis 1d) mit einer intersubtypischen Differenz von bis zu 16 % vor. Karimzadeh et al. [45] bestätigten 2019 eine Subklassifikation von HDV-1, schlugen jedoch eine Klassifikation in fünf Subtypen (HDV-1a bis 1e) mit einer intersubtypischen Differenz zwischen $\geq 3\%$ und $< 10\%$ vor. Darüber hinaus stellten Karimzadeh et al. fest, dass HDV-1a bis 1e Subtypen bestimmten

geographischen Regionen zugeordnet werden konnten. HDV-1a und 1b kamen in afrikanischen Subsahara-Regionen vor, HDV-1c in Zentral-Asien (China, Vietnam, Japan, Taiwan), HDV-1d in der Türkei und im Iran und HDV-1e in Europa [45].

Durch eine hohe genetische Variabilität des Virus wurden Subtypen für mehrere Genotypen, insbesondere für HDV-1, vorgeschlagen [44, 45]. Dies zeigt auf, dass eine Reevaluation der aktuellen HDV-Klassifikation dringend notwendig ist und eine international gültige Subklassifikation der HDV-Genotypen 1 bis 8 durch das *ICTV* geprüft und eingeführt werden sollte.

1.4 Therapie und Prävention

1.4.1 Pegyliertes Interferon-alpha als langjährig etablierte Therapie

Eine HDV-Infektion ist schwer zu behandeln, da die Therapiemöglichkeiten eingeschränkt sind. Die klinische Leitlinie der *European Association for the study of the Liver* [47] empfiehlt seit 2017 den Einsatz von pegyliertem Interferon (PEG-IFN)- α in der Therapie einer chronischen HDV-Infektion. Nach dieser Leitlinie wird HDV/HBV-koinfizierten Patienten mit kompensierter Lebererkrankung eine Therapiedauer von 48 Wochen empfohlen. Zudem sollte bei HBV-DNA-Detektion eine zusätzliche Therapie mit Nukleos(t)id Analoga (z. B. Adefovir, Tenofovir) in Betracht gezogen werden [47].

Der genaue Wirkmechanismus von Interferon (IFN)- α ist noch nicht vollständig geklärt. Vogt et al. [48] fassten die bisher beschriebenen Wirkmechanismen zusammen. Das Zytokin weist sowohl immunmodulatorische als auch antivirale Effekte auf. IFN- α induziert die Genexpression von Proteinen, die mit dem viralen Lebenszyklus interagieren. Diese Proteine stören den Eintritt in die Wirtszelle und die Hepatitis-B-Protein-Expression durch Interaktion mit der *cccDNA*. Zudem haben sie einen inhibierenden Effekt auf die virale Genexpression, wirken aktivierend auf den Zink-Finger induzierten *RNA*-Zerfall und behindern den Austritt aus der Wirtszelle [48]. Dennoch konnte trotz direkter antiviraler Mechanismen in mehreren *in vitro* Studien keine komplette Blockade der HDV-Replikation durch IFN- α induziert werden [49-51].

Klinische Studien zeigten zwar einen positiven Effekt einer IFN- α -Therapie auf den klinischen Krankheitsverlauf [52, 53], ein virologisches Therapieansprechen, definiert als fehlender Nachweis der HDV-*RNA*, konnte jedoch nur in ca. der Hälfte der Patienten beobachtet werden [53]. Ein anhaltendes Therapieansprechen 24 Wochen nach Therapieende

wurde bei ca. einem Drittel der Patienten festgestellt [53, 54]. Zudem wurde in Langzeitstudien eine hohe Rückfallrate, definiert als HDV-RNA-Nachweis trotz vorübergehender HDV-RNA-Negativität nach Therapieende, beobachtet [55, 56]. Farci et al. [52] beobachteten bei Patienten unter hoch dosierter IFN- α -Therapie (9 Millionen *Units*) ein signifikant längeres Überleben und eine Verbesserung des Aktivitäts- und Fibrosegrads in Leberbiopsien. Dennoch wurde nach Abschluss der Therapie bei allen Patienten HDV-RNA detektiert. Auch war während der Langzeit-Untersuchung HDV-RNA bei den meisten Patienten detektierbar, wobei die Viruslast in der hoch-dosiert behandelten Patientengruppe signifikant abnahm [52]. Bei den „*Hepatitis Delta International Intervention Trials*“ (*HIDIT I* und *II*) wurden Patienten mit PEG-IFN- α allein oder in Kombination mit Adefovir [54] bzw. Tenofovir [53] behandelt. Ein vorübergehendes Therapieansprechen wurde bei 23 % bis 48 % der Patienten beobachtet. In Folgeuntersuchungen 24 Wochen nach Therapieende wurde ein anhaltendes Therapieansprechen bei 23 % bis 31 % der Patienten beobachtet [53, 54]. Trotz abnehmendem Therapieansprechen nach Therapieende konnte ein verbesserter oder stabiler Fibrose-Score im *Trial HIDIT II* nachgewiesen werden [53]. In einer Folgestudie des *Trials HIDIT I* beschrieben Wranke et al. [55] eine signifikante Assoziation zwischen Patienten mit fehlendem Nachweis von HDV-RNA und einem verbesserten klinischen Verlauf. Diese Folgestudie von Wranke et al. und eine weitere Folgestudie zum *Trial HIDIT I* beschrieben jedoch eine Rückfallrate bei bis zu 57 % der Patienten fünf bis zehn Jahre nach Therapieende [55, 56]. Zusätzlich zu einer hohen Rückfallrate nach Therapieende wurden zahlreiche Nebenwirkungen von grippeähnlichen Symptomen bis hin zu Depressionen unter Therapie mit PEG-IFN- α beschrieben und führten teilweise zu Therapieabbrüchen [54, 57]. Während des *Trials HIDIT II* wurde bei 92,5 % der Patienten mindestens eine Nebenwirkung während der Therapie mit PEG-IFN- α vermerkt. Bei 26 % der Patienten wurden schwere Nebenwirkungen wie erhöhte Transaminasen und Thrombozytopenien festgestellt [53].

Auf der einen Seite wurde in klinischen Studien ein positiver Effekt auf den klinischen Verlauf [52, 53, 55] und fibrotische Leberveränderungen [52, 53] nach Therapie mit (PEG-)IFN- α beschrieben. Auf der anderen Seite wurden ein Therapieansprechen 24 Wochen nach Therapieende bei nur ca. einem Drittel der Patienten [53, 54], eine hohe Rückfallrate Jahre nach Therapieende [55, 56] und teilweise schwere Nebenwirkungen [53] beobachtet. Daher ist die Entwicklung alternativer Therapien dringend notwendig, um eine chronische HDV-Infektion erfolgreich zu behandeln.

1.4.2 Bulevirtid als zugelassene Therapiealternative

Bulevirtid stellt gemäß dem Addendum zur S3-Leitlinie „Antivirale Therapie der chronischen Hepatitis-D-Virusinfektion“ vom Juli 2023 der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten [58] eine neue Therapiealternative zu PEG-IFN- α gegen HDV dar. Die *European Medicine Agency (EMA)* [59] hat Bulevirtid im Juli 2020 zunächst nur unter besonderen Bedingungen und zusätzlicher Überwachung für die Dosis von 2 mg einmal täglich zugelassen. Im Juli 2023 erhielt Bulevirtid die vollständige Zulassung [58, 59]. Zielgruppe sind chronisch HDV-infizierte Patienten mit kompensierter Lebererkrankung und HDV-RNA-Nachweis im Blut [16, 59].

Die Wirkweise von Bulevirtid wurde von Turon-Lagot et al. [60] zusammengefasst. Das antivirale Medikament, ein myristoyliertes Peptid, blockiert den Eintritt von HDV in die Wirtszelle. Dieses Peptid bindet wie die preS1-Domäne der N-terminalen (aminoterminalen) Region des HBsAg spezifisch an den NTCP-Rezeptor. Da das HBsAg HDV-Virionen als Hüllprotein dient, können diese nicht mehr über die preS1-Domäne an den Rezeptor binden und in Hepatozyten gelangen [60].

In mehreren klinischen Studien wurde die antivirale Aktivität von Bulevirtid sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit Tenofovir oder Peg-IFN- α untersucht. Lampertico et al. [61] und Degaspero et al. [62] beschrieben ein Therapieansprechen, definiert als fehlender Nachweis der HDV-RNA oder HDV-RNA-Abnahme um ≥ 2 Zehnerlogarithmus (\log_{10})-Stufen, bei über der Hälfte der Patienten. Zudem stellten sie einen positiven Effekt auf die Normalisierung des Leberwertes Alanin-Aminotransferase (ALT) und den Fibrosegrad der Leber fest [61, 62]. Andererseits beschrieben Lampertico et al. [61] auch eine hohe Rückfallrate, definiert als erneuter Anstieg der HDV-RNA nach Therapieende trotz vorübergehendem Therapieansprechen. Nachfolgend werden die von Lampertico et al. [61] zusammengefassten Ergebnisse der Phase II und III Studien beschrieben. Die Phase II Studie MYR 202 zeigte unter einer Kombinationstherapie aus Bulevirtid in verschiedenen Dosierungen (2 mg, 5 mg, 10 mg täglich) und Tenofovir ein dosisabhängiges Therapieansprechen bei 50 % bis 77 % der Patienten nach einer Therapiedauer von 24 Wochen. Eine Normalisierung der ALT-Werte wurde bei 40 % bis 50 % der Patienten festgestellt. Trotz des vorübergehenden Therapieansprechens wurde in einer Nachuntersuchung 24 Wochen nach Therapieende bei 60 % bis 83 % dieser Patienten erneut ein Anstieg der HDV-RNA detektiert. Die Phase II Studie MYR 203 untersuchte das Therapieansprechen und die ALT-Normalisierung unter Monotherapie mit Bulevirtid oder PEG-IFN- α im Vergleich zur Kombinationstherapie mit Bulevirtid und PEG-IFN- α . HDV-RNA war bei 53 % der Patienten

ten unter der Kombinationstherapie von 2 mg Bulevirtid und PEG-IFN- α nach einer Therapiedauer von 48 Wochen nicht detektierbar. Eine Normalisierung der ALT-Werte wurde bei 59 % der Patienten festgestellt. Sowohl ein deutlich niedrigeres Therapieansprechen als auch eine deutlich geringere ALT-Normalisierungsrate wurden bei Patienten unter Monotherapie mit Bulevirtid oder PEG-IFN- α beschrieben. In den klinischen Studien MYR202 und MYR203 wurde Bulevirtid gut vertragen. Die meisten beschriebenen schwachen bzw. moderaten Nebenwirkungen waren Müdigkeit, Übelkeit, Kopfschmerzen und Schwindel, Leuko- und Thrombozytopenie. Während der Therapie wurde als häufigste Nebenwirkung eine dosisabhängige, asymptomatische Erhöhung der Gallensäuren festgestellt. Keine schweren Nebenwirkungen wurden beschrieben und kein Patient brach die Therapie aufgrund von Nebenwirkungen ab. Die Phase II Studie MYR204 zeigte unter der Monotherapie mit Bulevirtid 10 mg bei 72 % der Patienten ein HDV-RNA-Abnahme um $\geq 2 \log_{10}$ -Stufen nach einer Therapiedauer von 96 Wochen. Eine Normalisierung der ALT-Werte wurde bei 64 % der Patienten festgestellt [61]. Eine alleinige Therapie mit Bulevirtid wurde ebenfalls in der noch nicht abgeschlossenen Phase III Langzeitstudie MYR-301 [63] untersucht. Vorläufige Daten zeigten eine HDV-RNA-Abnahme um $\geq 2 \log_{10}$ -Stufen oder einen fehlenden Nachweis von HDV-RNA nach 48 Wochen bei 71 % und 76 % der Patienten unter der Monotherapie mit Bulevirtid 2 mg und 10 mg. Die Normalisierung der ALT-Werte lag bei 51 und 56 % unter der Therapie mit 2 mg und 10 mg Bulevirtid [63].

Degasperi et al. [62] fassten in einem systematischen Übersichtsartikel die Ergebnisse aktueller Studien aus Frankreich, Österreich, Deutschland und Italien zur Wirksamkeit der Monotherapie mit 2 mg Bulevirtid zusammen. In einer multizentrischen französischen Kohorte wurde nach 48 Wochen ein Therapieansprechen von 70 % und eine Normalisierung der ALT-Werte von 61 % beschreiben. In einer österreichischen Studie wurde nach ebenfalls 48 Wochen ein Therapieansprechen von 65 % und eine Normalisierung der ALT-Werte von 90 % festgestellt. In einer multizentrischen deutschen Studie wurde nach 24 Wochen ein Therapieansprechen von 42 % und eine Normalisierung der ALT-Werte von 51 % beschrieben. Bei den untersuchten Patienten verbesserte sich der Fibrosegrad durch die Therapie mit Bulevirtid signifikant. In einer italienischen Studie wurde nach 48 Wochen ein Therapieansprechen von 78 % und eine Normalisierung der ALT-Werte von 83 % festgestellt. Wie in der deutschen Kohorte wurde bei den untersuchten Patienten eine signifikante Abnahme der Lebersteifigkeit beschrieben [62].

Somit scheint das bereits genehmigte Bulevitid [16, 59] eine vielversprechende, gut verträgliche Therapiealternative mit milden bis moderaten Nebenwirkungen [61] zu sein. Bei einem Großteil der Studien zeigten mehr als die Hälfte der Patienten ein Therapieansprechen sowohl unter der Monotherapie mit Bulevirtid als auch unter Kombinationstherapien

mit Tenofovir oder PEG-IFN- α . Neben einer beschriebenen HDV-RNA-Abnahme konnte in klinischen Studien auch eine ALT-Normalisierung und eine Verbesserung des Fibrosegrads festgestellt werden [61, 62]. Andererseits wurde eine hohe Rückfallrate in einer Folgeuntersuchung zur Kombinationstherapie von Bulevirtid und Tenofovir beschrieben [61]. Studien zur Monotherapie mit Bulevirtid zeigten, dass eine längere Therapiedauer (48 Wochen) ein höheres Therapieansprechen und eine höhere Normalisierungsrate der ALT-Werte aufwies als eine kürzere Therapiedauer (24 Wochen) [62]. Weitere Langzeitstudien sind erforderlich, um ideale Dosierungen, die Dauer der Therapie und die Kombination mit anderen verfügbaren Präparaten zu ermitteln.

1.4.3 Neue Wirkstoffe als potenzielle Therapiealternativen

Die Entwicklung antiviraler Wirkstoffe ist eingeschränkt, da HDV nur ein virales Protein exprimiert und auf Enzyme der Wirtszelle angewiesen ist [60]. Deshalb werden aktuell neben Bulevirtid drei weitere Wirkstoffe geprüft, die Proteine der Wirtszelle modellieren. Die klinischen Studien (Phase II und III) dieser Wirkstoffe wurden von Turon-Lagot et al. [60] zusammengefasst und werden nachfolgend beschrieben.

Pegyliertes Interferon- λ wirkt als Immunmodulator ähnlich wie IFN- α . Da der Rezeptor von Interferon- λ im Vergleich zum Rezeptor von IFN- α nicht ubiquitär exprimiert wird, wurden weniger und mildere Nebenwirkungen beschrieben. Deshalb scheint eine PEG-IFN- λ -Monotherapie durch das günstigere Nebenwirkungsspektrum eine gute Therapiealternative zu PEG-IFN- α zu sein, auch wenn eine HDV-RNA Abnahme von mindestens 2 \log_{10} -Stufen nur in 50 % der Patienten beobachtet wurde [60].

Lonafarnib ist ein Farnesyltransferase Inhibitor und blockiert das Entstehen infektiöser Virione. Das L-HDAg wird post-translational von der Farnesyltransferase der Wirtszellen modifiziert. Diese Modifikation bewirkt eine Interaktion des L-HDAg mit HBsAg im endoplasmatischen Retikulum zur Umhüllung der Virione. In vier Phase II Studien (LOWR-HDV-1 bis LOWR-HDV-4) wurde die Wirksamkeit der Zweifachkombination Lonafarnib und Ritonavir untersucht. Ritonavir agiert als Inhibitor des Lonafarnib Metabolismus und erhöht somit den Effekt des Wirkstoffes [60]. In einer Phase IIa Studie [64] wurde die Wirksamkeit der Dreifachkombination Lonafarnib, Ritonavir und PEG-IFN- λ -1a untersucht. Während der 24-wöchigen Therapie wurde bei fast allen Patienten (96 %) eine HDV-RNA-Abnahme größer 2 \log_{10} -Stufen beobachtet. Bei > 50 % der Patienten konnte keine HDV-RNA nachgewiesen werden bzw. HDV-RNA war unter der Quantifizierungsgrenze. Die Dreifachkombination zeigte ein größeres Therapieansprechen als die Zweifachkombination mit milden bis moderaten Nebenwirkungen, häufig den Gastrointestinaltrakt betreffend [64]. Die klinische Phase III Studie D-LIVR [65] untersuchte die Dreifachkombination Lonafarnib, Ritonavir und

PEG-IFN- α -2a. Die Dreifachkombination zeigte mit 19 % ein höheres Therapieansprechen, definiert als HDV-RNA-Abnahme um mehr als 2 log₁₀-Stufen und ALT-Normalisierung, als die Placebo-Gruppe (2 %), die Zweifachkombination mit Lonafarnib und Ritonavir (10 %) oder die Monotherapie mit PEG-IFN- α -2a (10 %) [65]. Auch 24 Wochen später war ein anhaltendes Therapieansprechen in der Gruppe der Dreifachkombination mit 29 % höher als in der Placebo-Gruppe (0 %), der Gruppe der Zweifachkombination (16 %) oder der Gruppe der Monotherapie (15 %). Darüber hinaus wurde in der Gruppe der Dreifachkombination bei 53 % der Patienten eine Verbesserung der inflammatorischen Aktivität ohne Verschlechterung der Fibrose histologisch nachgewiesen [66].

Nukleinsäurepolymere (z. B. REP2139) zeigen eine antivirale Aktivität, wobei der Wirkmechanismus nicht vollständig geklärt ist. Es wird vermutet, dass sie das virale Eindringen in die Wirtszelle und die HBsAg Sekretion hemmen [60]. Turon-Lagot et al. [60] fassten die Ergebnisse einer klinischen Studie zusammen, in der HBV/HDV-koinfizierte Patienten mit REP2139 und PEG-IFN- α -2a behandelt wurden. Trotz schwerer Nebenwirkungen (schwere Thrombozytopenie, hohe ALT- und Aspartat-Aminotransferase-Konzentrationen) war bei 75 % der Patienten am Ende der Therapie keine HDV-RNA nachweisbar. Zwei bis drei Jahre später zeigten diese Patienten weiterhin eine HDV-RNA-Abnahme von 2 log₁₀-Stufen auf, bei 58 % dieser Patienten war keine HDV-RNA nachweisbar und sie zeigten niedrige bis nicht detektierbare HBsAg-Konzentrationen auf [60]. Eine aktuelle Studie [67] bestätigte vermutete Wirkmechanismen. REP2139-Ca hemmte sowohl die HBsAg Produktion als auch die HDV-Replikation [67].

Zusammengefasst werden aktuell drei neue Wirkstoffe in Phase II und III Studien getestet. Das Therapieansprechen einer Monotherapie dieser Stoffe scheint teilweise limitiert und milde bis sehr schwere Nebenwirkungen wurden beschrieben [60]. Daten einer Studie mit Lonafarnib zeigen ein höheres Therapieansprechen der Dreifachkombination (Lonafarnib, Ritonavir, PEG-IFN- α -2a) im Vergleich zur Zweifachkombination (Lonafarnib, Ritonavir) oder Monotherapie (PEG-IFN- α -2a) [66]. Langzeitstudien sind notwendig, um ein anhaltendes Therapieansprechen [66] und eine gegebenenfalls auftretende Rückfallrate zu beurteilen.

1.4.4 HBV-Impfung als präventive Maßnahme

Wie bereits erwähnt, existiert gegen HBV eine wirksame Impfung [68], die auch präventiv gegen eine HDV-Infektion schützen kann. Die WHO empfiehlt seit 1992 die HBV-Impfung als Bestandteil des Impfprogramms in allen Ländern [69]. Seit 1995 empfiehlt auch die Ständigen Impfkommision des Robert-Koch-Instituts die HBV-Impfung als Standardimpfung für alle Säuglinge und Kleinkinder [68, 69]. In der Mongolei wurde die HBV-Impfung 1991 eingeführt, jedoch war die Wirksamkeit des Impfprogramms von Anfang bis Mitte der 1990er Jahre begrenzt. Die begrenzte Wirksamkeit war unter anderem auf das Einfrieren des Impfstoffs im Winter während des Transports in ländliche Gebiete und auf eine niedrige Durchimpfungsrate zurückzuführen [70].

Als Schlussfolgerung zeigen bereits zugelassene oder noch in Phase II und III Studien befindliche Wirkstoffe bisher keine zufriedenstellenden Therapiemöglichkeiten zur Behandlung von HDV. Limitierende Faktoren der langjährig etablierten Therapie mit PEG-IFN- α sind ein niedriges Therapieansprechen [53, 54], schwere Nebenwirkungen [53] und eine hohe Rückfallrate nach Therapieende [55, 56]. Eine Therapiealternative ist Bulevirtid, das im Juli 2023 von der *EMA* zugelassen wurde [16, 59]. Klinische Studien zeigten ein deutlich höheres Therapieansprechen [61, 62] und mildere Nebenwirkungen [61] im Vergleich zur PEG-IFN- α -Monotherapie ohne Bulevirtid. Dennoch wurde in einer Nachuntersuchung eine hohe Rückfallrate festgestellt [61], ähnlich wie bei der PEG-IFN- α -Monotherapie ohne Bulevirtid. Drei weitere neue Wirkstoffe werden aktuell in Phase II und III Studien getestet. Limitierende Faktoren einer Monotherapie sind wie bei PEG-IFN- α ein niedriges Therapieansprechen und das Auftreten von milden bis sehr schweren Nebenwirkungen [60]. Trotz Einführung der HBV-Impfung im Jahr 1991 weist die Mongolei nach wie vor weltweit die höchste nationale anti-HDV-Prävalenz auf [7]. Somit sind sowohl präventive als auch therapeutische Maßnahmen erforderlich, um HBV/HDV-Infektionen weiter zu reduzieren. Neue Therapieoptionen für bereits etablierte, chronische HBV/HDV-Infektion werden dringend benötigt, insbesondere in hochendemischen Ländern wie der Mongolei.

1.5 Virale Anpassungsmechanismen an das Immunsystem

Zur Untersuchung möglicher Anpassungsmechanismen von HDV an das Immunsystem wird im Folgenden die Immunabwehr von Krankheiten beschrieben. Das Immunsystem schützt den menschlichen Organismus vor Krankheitserregern und Toxinen durch verschiedene Effektorzellen und spezifische Moleküle. Die Abwehr von Krankheiten besteht aus zwei Immunantworten und wird im Lehrbuch „Immunologie“ von Murphy und Weaver [71]

ausführlich beschrieben. Die angeborene Immunantwort ist die erste Reaktion zur unspezifischen Beseitigung von pathogenen Erregern. Die adaptive Immunantwort wird erst nach einigen Tagen aktiviert zur spezifischen Beseitigung pathogener Erreger. Sie wird auch erworbene Immunantwort genannt, da sie sich im Laufe des Lebens als Anpassung an eine Infektion mit einem spezifischen Erreger entwickelt [71]. Bei chronischen HDV-Infektionen könnte eine Evasion vor der adaptiven Immunantwort zur Viruspersistenz beitragen. Daher sind die Wirkmechanismen der adaptiven Immunantwort von Interesse.

1.5.1 Bedeutung und Wirkweise von CD8⁺ T-Zellen der adaptiven Immunantwort

Zwei Gruppen von Lymphozyten bilden die Effektorzellen der adaptiven Immunantwort. B-Lymphozyten (B-Zellen) produzieren Antikörper. Dies sind Proteine, die an Antigene binden und dadurch neutralisieren oder für andere Immunzellen markieren (opsonieren). Als Antigene werden alle Substanzen bezeichnet, die vom adaptiven Immunsystem erkannt werden (z. B. Proteine, Glykoproteine und Polysaccharide von Krankheitserregern). Nur ein kleiner Teil der molekularen Struktur eines Antigenmoleküls, die sogenannte Antigen determinante oder Epitop, wird von einem Antigenrezeptor oder Antikörper erkannt. T-Lymphozyten (T-Zellen) werden durch Bindung von Antigenen an ihre Rezeptoren aktiviert. Nach Aktivierung proliferieren und differenzieren T-Zellen zu verschiedenen Typen von T-Effektorlymphozyten. Cytotoxische T-Zellen, auch CD8⁺ T-Zellen genannt, können Antigene auf Zellen, die von intrazellulären Krankheitserregern infiziert sind, als fremd erkennen und daraufhin infizierte Zellen abtöten [71].

Abgebaute Proteine von intrazellulären Krankheitserregern wie Viren werden an der Oberfläche der infizierten Zelle als Peptidepitope durch Bindung an spezielle Glykoproteine, *MHC*-Moleküle, präsentiert. Kodiert werden die Glykoproteine von einer Gruppe hoch polymorpher Gene, die Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, *MHC*) oder beim Menschen Humane Leukozyten Antigen Gene (HLA-Gene) genannt werden. Zwei Arten von *MHC*-Molekülen werden unterschieden, *MHC*-Klasse I und *MHC*-Klasse II. Menschen besitzen drei HLA-Gene, HLA-A, -B, -C, die für *MHC*-Klasse-I-Moleküle codieren. CD8, ein Protein auf der Zelloberfläche von T-Zellen, erkennt eine Region im *MHC*-Klasse-I-Protein. Dadurch können CD8⁺ T-Zellen nur Peptide gebunden an *MHC*-Klasse-I-Molekülen erkennen (Abb. 1.5). Da das *MHC*-Klasse-I-Molekül von fast allen Körperzellen exprimiert wird, spielt es eine zentrale Rolle bei der Abwehr von Virusinfektion [71].

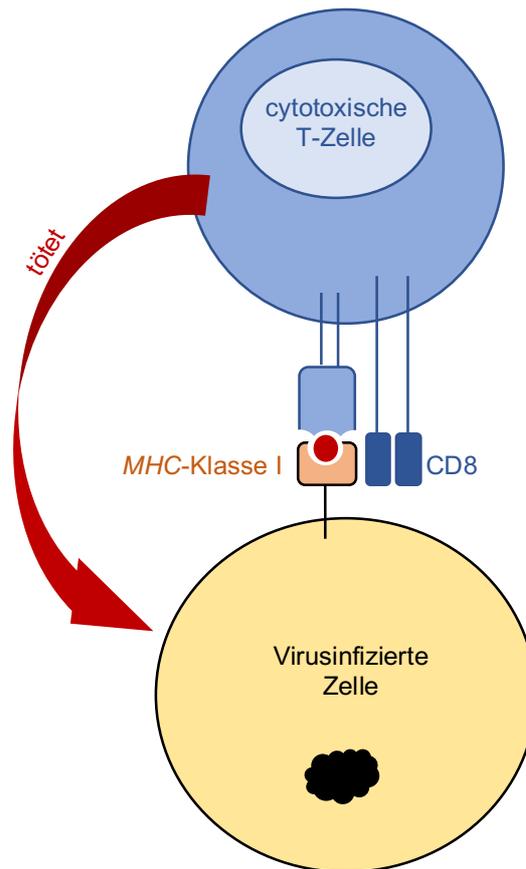


Abb. 1.5: Antigenerkennung von cytotoxischen CD8⁺ T-Zellen

Eine virusinfizierte Zelle präsentiert abgebaute intrazelluläre Proteine (Peptide, roter Kreis) gebunden an *MHC-Klasse-I*-Moleküle (orange) an ihrer Oberfläche. Cytotoxische T-Zellen tragen CD8 (dunkelblau) und erkennen somit Peptide, die an *MHC-Klasse-I*-Moleküle gebunden sind. Nach Erkennung des *MHC-Klasse-I*-Molekül/Peptid-Komplexes tötet die antigenspezifische cytotoxische CD8⁺ T-Zelle die virusinfizierte Zelle ab (in Anlehnung an Murphy et al. (S.37) [71]).

1.5.2 Bedeutung viraler Sequenzpolymorphismen

CD8⁺ T-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der HLA-Klasse I-assoziierten Immunantwort gegen chronische Infektionen. Mutationen in Epitopen, die von *MHC-Klasse-I*-Molekülen präsentiert werden, können durch verschiedene Mechanismen eine CD8⁺ T-Zell-Erkennung stören und zur Immunevasion eines intrazellulären Pathogens führen. Die verschiedenen Mechanismen wurden von Timm et al. [72] zusammengefasst und werden im Folgenden beschrieben. Der häufigste Mechanismus einer Immunevasion von HIV scheinen Mutationen in Ankerregionen von Epitopen zu sein. Diese führen zu einer eingeschränkten Bindung des Epitops zum *MHC-Klasse-I*-Molekül und somit zu einem instabilen *MHC-Klasse-I*/Peptid-Komplex. Einen zweiten möglichen Mechanismus scheinen Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Bindungsstelle des *MHC-Klasse-I*/Peptid-Komplexes für den T-Zell-Rezeptor zu bilden. Zwar wird die Variante des Epitops noch von *MHC-Klasse-I*-Molekülen präsentiert, die Bindung des T-Zell-Rezeptors ist jedoch gestört. Ein dritter Mechanismus könnte

eine virale Evasion durch eingeschränkte Prozessierungen von CD8⁺ T-Zellepitopen begünstigen. Substitutionen innerhalb eines HCV-Epitops wurden beschrieben, die durch Veränderungen des proteosomalen Epitopabbaus zu einer gestörten endogenen Prozessierung führen [72]. Darüber hinaus zeigten mehrere Studien, dass Mutationen in flankierenden Regionen von CD8⁺ T-Zellepitopen die Antigenprozessierung stören und zu einer Immunevasion von HIV [73, 74] und HCV [75-77] führen.

Zusammenfassend scheinen mutierte Pathogene durch verschiedene Mechanismen die CD8⁺ T-Zell-Erkennung zu stören und können dadurch nicht mehr effizient vom adaptiven Immunsystem eliminiert werden. Folglich entsteht eine kontinuierliche Anpassung an einen HLA-Klasse I-assoziierten Selektionsdruck.

1.5.2.1 Kontinuierliche Anpassung chronischer Virusinfektionen an einen HLA-Klasse I-assoziierten Selektionsdruck

Eine kontinuierliche Anpassung an einen HLA-Klasse I-assoziierten Selektionsdruck wurde in chronischen Virusinfektionen mit den drei Pathogenen HBV [78], HCV [76, 79] und HIV [80-82] beschrieben. Erstens wurden Substitutionen in CD8⁺ T-Zellepitopen des HBV *Core* Proteins in chronisch HBV-infizierten Patienten detektiert, die unter Selektionsdruck mit verschiedenen HLA-Klasse I-Allelen assoziiert waren. Als Evidenz für immunevasive Eigenschaften zeigten diese Sequenzvarianten mit Aminosäuresubstitutionen eine geringere Erkennung durch HBV-spezifische CD8⁺ T-Zellen als Prototyp Sequenzen [78]. Zweitens wurde in Patienten mit einer akuten HCV-Infektion eine gestörte CD8⁺ T-Zell-Antwort durch Expression von Sequenzvarianten in einem Zielepitop beschrieben [76]. HCV adaptiert an einen CD8⁺ T-Zell-Druck durch Selektion von Sequenzvarianten und scheint der adaptiven Immunantwort zu entkommen [79]. Drittens konnten autologe T-Zellen virale Sequenzvarianten in HIV-seropositiven Patienten teilweise nicht erkennen [81]. Außerdem wurden Mutationen in HLA-B*27 restriktiven Epitopen detektiert, die mit einer Evasion vor der CD8⁺ T-Zell-Antwort und Progression der Erkrankung zu AIDS assoziiert waren [80].

Als Schlussfolgerung wurde eine kontinuierliche Anpassung an einen HLA-Klasse I-assoziierten Selektionsdruck in Form von viralen Sequenzpolymorphismen in chronischen Virusinfektionen (HBV, HCV, HIV) bereits detektiert. Dabei kann die Evasion vor der adaptiven Immunantwort die Folge einer gestörten Erkennung viraler Sequenzpolymorphismen von CD8⁺ T-Zellen sein.

1.5.2.2 HDV-Sequenzpolymorphismen als Zeichen für eine Evasion vor der HLA-Klasse I-assoziierten Immunantwort

Eine CD8⁺ T-Zell-Antwort scheint auch eine zentrale Rolle bei der HLA-Klasse I-assoziierten Immunantwort gegen HDV zu spielen. In Impfstudien mit Versuchstieren konnte eine CD8⁺ T-Zell-Antwort zwar induziert werden, trotzdem wurde keine ausreichende Verhinderung der HDV-Ausbreitung in chronischen HBV-Trägern beobachtet [83]. Eine kontinuierliche Anpassung an einen HLA-Klasse I-assoziierten Selektionsdruck könnte auch bei HDV wie bei anderen chronischen Virusinfektionen zu einer Evasion vor der adaptiven Immunantwort führen. Um Mutationen in CD8⁺ T-Zellepitopen als Evidenz für eine Immunevasion zu identifizieren, wurde die adaptive Immunantwort in HBV/HDV-infizierten Patienten charakterisiert. Einige Studien haben bereits HDV-spezifische CD8⁺ T-Zellepitope detektiert. Huang et al. [84] beschrieben zwei HLA-A*02 restriktive HDV-spezifische CD8⁺ T-Zellepitope in transgenischen Mäusen und Patienten mit einer chronischen HDV-Infektion ohne aktive Erkrankung. Jedoch konnten diese Epitope nicht in Patienten mit einer chronischen HDV-Infektion und aktiver Replikation detektiert werden [84]. Schirdewahn et al. [85] beschrieben ein verfrühtes Altern und eine gestörte Funktionalität von T-Zellen in HDV-infizierten Patienten als Zeichen einer Immunerschöpfung und Störung der Effizienz von HDV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Karimzadeh et al. [86] identifizierten zwei Substitutionen lokalisiert in zwei überlappenden CD8⁺ T-Zellepitopen in chronisch HDV-infizierten-, HLA-B*27-positiven Patienten. Nach Stimulation mit den identifizierten Peptidvarianten wurde keine Interferon- γ Produktion als Zeichen einer T-Zell-Antwort detektiert. Strukturelle *in silico* Analysen zeigten, dass die beiden Substitutionen strukturelle und elektrostatische Veränderungen in der T-Zell-Bindungsstelle von HDV-spezifischen CD8⁺ T-Zellepitopen auslösen als mögliche Ursache der ausbleibenden T-Zell-Antwort [86]. Eine Folgestudie von Karimzadeh et al. [87] identifizierte fünf Sequenzpolymorphismen assoziiert mit den HLA-Klasse I-Allelen B*15, B*18, B*37 und B*41, die zu vorhergesagten CD8⁺ T-Zell-Bindemotiven korrespondierten. Diese Sequenzpolymorphismen wurden von isolierten CD8⁺ T-Zellen nur partiell erkannt [87].

Aus dem dargestellten Stand des Wissens kann geschlossen werden, dass virus-spezifische CD8⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle in der adaptiven Immunantwort gegen eine HDV-Infektion spielen. Einige Studien haben bereits Sequenzpolymorphismen in HDV-spezifischen CD8⁺ T-Zellepitope detektiert und eine eingeschränkte T-Zell-Antwort beobachtet. Trotzdem ist noch wenig bekannt über die Selektion viraler Sequenzpolymorphismen und das Ausmaß der Immunevasion in Patienten mit einer chronischen HDV-Infektion.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Wie einleitend dargelegt, weist die Mongolei weltweit die höchste HDV-Prävalenz auf, wobei über die molekulare Epidemiologie und ihre Einflussfaktoren noch wenig bekannt ist. Das HDV-Genom ist charakterisiert durch eine hohe genetische Variabilität. Daher wurden Subtypen für mehrere Genotypen, insbesondere für HDV-1, vorgeschlagen. Mögliche Einflussfaktoren der Sequenzvariabilität könnten Anpassungsmechanismen an das adaptive Immunsystem sein. HDV-spezifische CD8⁺ T-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der adaptiven Immunantwort. Eine Selektion viraler Varianten in Zielepitopen in Patienten mit einer chronischen HBV/HDV-Infektion wurde bereits beschrieben und könnte zur Viruspersistenz beitragen und somit die Evolution von HDV beeinflussen.

In dieser Arbeit wird die große mongolische Patientenkohorte HepMongolia auf HBV/HDV-Prävalenz und Sequenzvariabilität von HDV untersucht. Zudem wird geprüft, ob Probanden mit einer chronischen HBV/HDV-Infektion eine kontinuierliche Anpassung an einen HLA-Klasse I-assoziierten Selektionsdruck aufzeigen. Zunächst werden phylogenetische Analysen mit mongolischen HDV-Sequenzen durchgeführt. Dann wird geprüft, ob ein statistischer Zusammenhang zwischen viralen Sequenzpolymorphismen und HLA-Klasse I-Molekülen (*HLA-footprints*) besteht. Dafür werden Serumproben anti-HDV-positiver Probanden charakterisiert, sequenziert, phylogenetische Bäume mit Referenzsequenzen erstellt und die HLA-Klasse I-Allele bestimmt. Danach werden überlappende Epitope für Positionen der *HLA-footprints*, die von relevanten HLA-Klasse I-Molekülen präsentiert werden, über die HLA-Klasse I-Bindungs-Algorithmen der *Immune Epitope Database (IEDB)* vorhergesagt. Ziel ist die molekulare Epidemiologie von HDV in der Mongolei zu charakterisieren und mögliche Einflussfaktoren wie Immunevasionsvarianten zu identifizieren. Somit soll gezeigt werden, dass Probanden mit bestimmten HLA-Typen an verschiedenen Positionen einen Sequenzpolymorphismus als Evidenz für eine Evasion vor der HLA-Klasse I-assoziierten, adaptiven Immunantwort aufzeigen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 HDV-Serumproben

Alle verwendeten HDV-infizierten Serumproben der HepMongolia-Kohorte wurden bei -20 °C eingefroren und gelagert. Die Kohorte wurde durch eine Kollaboration mit dem *Department of Microbiology and Infection Prevention and Control* der *Mongolian National University of Medical Sciences* (Ulaanbaatar) am Institut für Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf (UKD) etabliert und gemeinsam analysiert. Die HepMongolia-Kohorte besteht insgesamt aus einer Anzahl von $n = 1310$ Serumproben mit einer ausreichenden Menge an Serum für die serologische Bestimmung von Infektionsmarkern. Die Proben wurden von unseren mongolischen Kooperationspartnern zwischen 2018 und 2019 gesammelt und stammen aus zwölf Regionen der Mongolei. Diese befinden sich 400 km bis 1400 km westlich der Hauptstadt Ulaanbaatar. Zudem stammen einige Proben aus einem südöstlich gelegenen Verwaltungsbezirk.

Von den Studienteilnehmenden waren 57,10 % ($n = 748$) weiblich, 42,82 % ($n = 561$) männlich. Bei einem Studienteilnehmenden wurde keine Angabe zum Geschlecht gemacht. Bei bis auf vier Probanden wurde eine Angabe zum Alter gemacht. Das mediane Alter der Kohorte lag bei 44 Jahren (Bandbreite 18 bis 86 Jahre).

2.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Chemikalien aufgeführt mit Namen und Herstellerangaben

| Name | Hersteller |
|---|--|
| <i>Nuclease-free water</i> , 2x RT ¹ -PCR-Puffer | Life Technologies Corporation, Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| RNase ² Inhibitor, Murine | New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland |
| Ethanol absolut 2,5 l Emparta ACS | Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland |
| DNA-Ladepuffer (6x) | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Größenmarker <i>Gene Ruler 1 kb³ Plus DNA</i> Standard | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| DPBS ⁴ (1X) | Gibco by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Steriles Wasser 10 ml Polyethylenampulle Ampuwa | Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland |
| LE Agarose | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland |
| Ethidiumbromid 0,025 % | Carl Roth GmbH+Col KG, Karlsruhe, Deutschland |
| TBE ⁵ -Puffer (10x konzentriert) | Sigma-Aldrich Life Science, St. Louis, USA |
| dNTPs ⁶ | Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland |

¹Reversetranskriptase (RT), ²Ribonuklease (RNase), ³Kilobase (kb), ⁴*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)*, ⁵Tris-Borat-Ethylendiamintetraacetat (TBE), ⁶Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs).

2.1.3 Verwendete Kits

Für die *RNA*-Extraktion und Aufreinigung der *Polymerase Chain Reaction (PCR)*-Produkte wurden das EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (48), das QIAquick *PCR Purification Kit* (250) und das QIAamp *Viral RNA Mini Kit* (250) der Firma Qiagen aus Hilden (Deutschland) verwendet.

Für die *Semi-nested-PCR* wurde das SuperScript III Reverse Transcriptase *Kit* von Life Technologies Corporation, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific Inc., aus Waltham (USA) verwendet.

2.1.4 Oligonukleotide

Folgende *Primer* wurden von Eurofins Genomics und der biomers.net GmbH (Ulm, Deutschland) synthetisiert und sind in Tabelle 2 aufgelistet. Lyophilisierte *Primer* wurden in sterilem bzw. Nuklease freiem Wasser mit einer Konzentration von 100 pmol/µl gelöst und bei -20 °C gelagert. Bei der Herstellung nutzt Eurofins Genomics die *High purity salt free (HPSF)* Aufreinigung für Standard *PCR*-Versuche. Die *Primer HDV-1674R, HDV-912F* und *HDV-339R* wurden von Eurofins Genomics mit der *High performance liquid chromatography (HPLC)* aufgereinigt und zusätzlich als optimierte Sequenzier-*Primer* verwendet. Außerdem erfolgte die Sequenzierung mit dem *Primer HDV-1419-Seq-F* von biomers.net GmbH.

Tabelle 2: *Primer der Real-time PCR, Semi-nested-PCR und der Sequenzierung*

| Oligoname ¹ | Oligonukleotidsequenz ² 5' - 3' | Länge [bp ³] |
|------------------------|--|--------------------------|
| HDV-912F | GAGATGCCATGCCGACCCGAAGAG | 24 |
| HDV-891F | AGGTCGGACCGCGAGGAGGT | 20 |
| HDV-1674R | AGAAAAGAGTAAGAGYACTGAGG | 23 |
| HDV-339R | GCTGAAGGGGTCCTCTGGAGGTG | 23 |
| HDV-771R | CGGTCCCCTCGGAATGTTG | 19 |
| HDV-Fwd-1 | TGGACGTKCGTCCTCCT | 17 |
| HDV-Fwd-2 | TGGACGTCTGTCCTCCTT | 18 |
| HDV-Rev | TCTTCGGGTCGGCATGG | 17 |
| Delta-P | ATGCCAGGTCGGAC | 15 |
| HDV-1419-Seq-F | TTCTTTCCGAGAATTCCTTTGA | 22 |

¹Der Zusatz *R* bzw. *Rev* im Oligoname steht für *Reverse*. Der Zusatz *F* bzw. *Fwd* steht für *Forward*.

²Die Oligonukleotidsequenz ist mittels Abkürzungen der Nukleinbasen angegeben, Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C). ³Produktgrößen sind in Basenpaaren (bp) angegeben.

2.1.5 Plasmid

Ein Plasmid mit der Sequenz des HDV-Genoms wurde von Eurofins Genomics bezogen, in sterilem bzw. nukleasefreiem Wasser mit einer Konzentration von 10⁵ Kopien/µl gelöst und bei -20 °C eingefroren.

2.1.6 1st International Standard für HDV-RNA

Der erste internationale HDV-RNA-Standard der *WHO* mit 575 000 *International Units/ml (IU/ml)* für *Nucleic Acid Amplification Techniques-based Assays* stammt vom Paul-Ehrlich-Institut. Der lyophilisierte Standard wurde in 0,5 ml sterilem, nukleasefreiem Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

2.1.7 Enzyme

Alle verwendeten Enzyme sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Enzyme aufgeführt mit Namen und Herstellerangaben

| Name | Hersteller |
|---|---|
| GoTaq ¹ G2 Hot Start Polymerase | Promega Corporation, Fitchburg, USA |
| AgPath-ID One-step RT ² -PCR Kit | Life Technologies Austin, Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA |

¹*Thermus aquaticus*, ²Reverse Transkriptase (RT).

2.1.8 Sonstige Materialien

Alle sonstigen verwendeten Materialien sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Sonstige Materialien aufgeführt mit Namen und Herstellerangaben

| Name | Hersteller |
|--|---|
| <i>Tip One</i> Pipettenspitzen mit Filter 10 µl, 10/20 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl | Starlab International GmbH, Hamburg, Deutschland |
| <i>PCR Tube Strips 0,2 ml</i> | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| <i>MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate (0,1 ml), MicroAmp Optical 8-Cap Strip, MicroAmp Fast Reaction Tubes (8 Tubes/Strip)</i> | Applied biosystems by life technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| <i>SafeSeal micro tube 1,5 ml</i> | Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland |
| 15 ml, 50 ml Cellstar Polypropylen Rührchen | Greiner Bio-One International GmbH Kremsmünster, Österreich |
| 50 ml Reagent Reservoir Polystyrene 5/Bag, 200/Case Sterile | Corning Inc., Corning, USA |

2.1.9 Geräte

Alle verwendeten Geräte sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Verwendete Geräte aufgeführt mit Gerätetyp, Namen und Herstellerangaben

| Gerätetyp | Name | Hersteller |
|---|---|--|
| Extraktionsautomat | EZ1 <i>Advanced XL</i> , EZ1 <i>Advanced</i> | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| <i>Real-Time PCR-System</i> | QuantStudio 5 <i>applied biosystems</i> | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| <i>Thermocycler</i> | Biometra <i>TProfessionalTRIO</i> | Analytik Jena AG, Jena, Deutschland |
| <i>Mastercycler</i> | nexus GSX1 | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Vollautomatisierte Kapillarelektrophorese | QIAxcel <i>Advanced System</i> | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| Spektralphotometer | NanoDrop 2000 | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Minizentrifuge | Sprout | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland |
| Zentrifuge | 5415D, 5427R; Megafuge Heraeus 8R; Allegra X-15R | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland; Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA; Beckman Coulter, Brea, USA |
| Vortex-Schüttler | VV3 | VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Schüttler | <i>Press-to-mix 34524</i> | Snijders Labs, Tilburg, Niederlande |
| Zentrifugen-Vortexmischer-Kombination | PCV-2400 Grant-bio | Grant Instruments, Cambridge, England |
| Kühl-/Heizblock | ThermoStat plus | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Heizblock | <i>AccuBlock Digital Dry Bath</i> | Labnet International Inc., Dachorganisation Corning Inc., Corning, USA |
| Sicherheitswerkbank | Herasafe KS 18 | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| <i>PCR-Chamber</i> | <i>Mink Flex System</i> | Bäro GmbH & Co. KG, Leichlingen, Deutschland |

| | | |
|---|---|---|
| Elektrophorese-Netzgerät | Biometra <i>Power Pack P25T</i> | Analytik Jena AG, Jena, Deutschland |
| Geldokumentationssystem | UV-Transilluminator 302 Nanometer; <i>Gel Dokumentation Molecular Imager Gol Doc XR+</i> | Bachofer GMBH & Co. KG Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, Deutschland; Bio Rad Laboratories Inc., Hercules, USA |
| Wage | <i>Scout Pro</i> 400 g | Ohaus Corporation, Parsippany, USA |
| Pipetten 0,5 - 10 µl, 5 - 20 µl, 20 - 200 µl, 1000 µl | <i>Research Plus</i> | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |

2.1.10 Verwendete Software

Die Analyse und Visualisierung der Viruslastverteilung erfolgte mit der GraphPad Software Prism Version 9.1.1. Die *Real-time PCR*-Ergebnisse wurden mit der *Design & Analysis Software* QuantStudio v1.4.1 (applied biosystems by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) ausgewertet. Die *DNA*-Sequenzen wurden mit der bioinformatischen Software Geneious (Version 10.2.6, Biomatters, Ltd, Wellesley St Auckland, Neuseeland) analysiert. Die grafische Darstellung phylogenetischer Baumanalysen erfolgte mit dem Programm Fig-Tree (Version v1.4.4). Statistisch signifikante Assoziationen zwischen Sequenzpolymorphismen und HLA-Klasse I-Allelen der HepMongolia-Kohorte wurden mit der Software *SeqFeatR* (web-server version 0.3, [88]) identifiziert. Die Bibliografie wurde mit dem Zitierprogramm Endnote X9 (Clarivate Analytics, Philadelphia, USA) erstellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Ethikvotum

Die Ethikkommission des mongolischen Gesundheitsministeriums hat der Durchführung der Studie mit der Studiennummer 2018-79-MEIC nach ethischer und rechtlicher Überprüfung am 05.10.2018 zugestimmt. Daraufhin hat die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität ebenfalls eine ethische und rechtliche Überprüfung veranlasst und am 18.03.2019 der Durchführung der Studie zugestimmt. Die Serumproben stammen aus der HepMongolia-Kohorte mit der Studiennummer 2019-404-KFogU.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Bestimmung von HBsAg, anti-HBs, anti-HBc und anti-HDV

HBV- und HDV-spezifische Parameter der HepMongolia-Proben wurden in der Diagnostik-Abteilung am Institut für Virologie des UKD bestimmt. Für den Nachweis von HBsAg, Antikörper gegen das HBsAg (anti-HBs) und Antikörper gegen das Hepatitis B Core-Antigen (anti-HBc) wurde das *ARCHITECT-SerologieX Immunassaysystem* von Abbott verwendet. Nach Herstellerangaben ist die Probe reaktiv auf das HBsAg bei $\geq 1,0$ S/CO (Signal/cut-off) und nicht-reaktiv auf das HBsAg bei $< 1,0$ S/CO. Bei den Testungen auf anti-HBs sind die Proben bei ≥ 10 mIU/ml reaktiv und bei < 5 mIU/ml nicht-reaktiv. Die Grauzone 5 mIU/ml bis 10 mIU/ml wurde hier als nicht-reaktiv gewertet. Bei Testungen auf anti-HBc sind die Proben bei $\geq 1,0$ S/CO reaktiv und bei $< 0,9$ S/CO nicht-reaktiv. Die Grauzone 0,9 S/CO bis 1,0 S/CO wurde hier ebenfalls als nicht-reaktiv gewertet. Für den Nachweis von anti-HDV wurde das *Liaison XL-Serologie „XL Murex Anti-HDV“* Immunassaysystem von DiaSorin verwendet. Nach Herstellerangaben liegt ein negatives Ergebnis bei Werten $< 1,0$ AU/ml (relative Einheit pro ml), ein positives Ergebnis bei Werten $\geq 1,0$ AU/ml vor. Der Messbereich lag zwischen 0,1 AU/ml und 30,0 AU/ml.

2.2.2.2 RNA-Extraktion aus Serum mittels EZ1 Advanced von Qiagen

Die Extraktion von RNA dient der Trennung von zellulären Bestandteilen und der Verhinderung einer Degradation durch Ribonukleasen (RNasen). Die Extraktion der HDV-RNA erfolgte automatisiert nach Herstellerangaben mit dem *Virus Mini Kit v2.0*, dem EZ1-Extraktionsautomaten (*Advanced XL*) und der *EZ1 Advanced XL Virus Card v2.0*. Aus 200 μ l Serum wurde 60 μ l Virus-RNA, sogenanntes Eluat, isoliert. Wenn weniger als 200 μ l Serum

der Probe vorhanden war, wurde das Serum mit *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (1X)* als Pufferlösung auf 200 µl aufgefüllt und anschließend Virus-RNA extrahiert.

2.2.2.3 Quantitativer Nachweis von HDV-RNA im Serum in der *TaqMan-PCR*

Zur Charakterisierung der HepMongolia-Kohorte wurde HDV-RNA der Proben quantifiziert. Die Quantifizierung der HDV-RNA wurde nach dem hausinternen Protokoll „Nachweis von HDV-RNA (quantitativ) im Serum in der *TaqMan-PCR (in house)*“, erstellt von Jassin Rashidi-Alavijeh und geprüft von Prof. O. Adams (10.07.2012), durchgeführt. Das *TaqMan*-Verfahren basiert auf dem Prinzip der *One-Step Real-Time PCR*. Dabei wird die Nukleinsäure der Zielsequenz amplifiziert (Zyklus 2 und 3, Tabelle 6) und gleichzeitig mithilfe von fluoreszierenden Molekülen die Produktmenge der Amplifikation gemessen. Die HDV-RNA-Zielsequenz wurde durch Zugabe des 2x-Reverse-Transkriptase (RT)-PCR-Puffers in DNA umgeschrieben (Zyklus 1 HOLD, Tabelle 6). Zur anschließenden Amplifikation der DNA-Sequenz wurde die doppelsträngige DNA-Matrize bei 95 °C in ihre Einzelstränge denaturiert (2 Zyklus, Tabelle 6). Nach Abkühlung auf 60 °C lagerten sich spezifische DNA-Primer an das 5'- und 3'-Ende der Matrize an. Durch Anlagerung der Primer elongierte die hitzestabile *Thermus aquaticus (Taq)*-DNA-Polymerase jeweils das 5'- und 3'-Ende der Primer-Oligonukleotidsequenz (3 Zyklus, Tabelle 6). Gleichzeitig lagerten sich bei 60 °C Delta-P Sonden am 3'-Ende an die Matrize an. Delta-P weist das fluoreszierende Molekül Fluorophor am 5'-Ende und das *Quencher*-Molekül am 3'-Ende auf. Durch die 5'-3'- Exonukleaseaktivität der *Taq*-DNA-Polymerase wurde der Fluorophor vom *Quencher*-Molekül abgespalten und die Sonde angeregt. In angeregtem Zustand emittierte die Sonde fluoreszierendes Licht der Wellenlänge 500 Nanometer bis 800 Nanometer, das von optischen Detektoren des *Real-Time PCR-System QuantStudio 5 pro PCR*-Zyklus gemessen wurde.

Folgender Reaktionsansatz pro Probe wurde verwendet (Konzentration in Mikromolar (µM)):

| | |
|---------|---------------------|
| 12,5 µl | 2x-RT-PCR-Puffer |
| 1 µl | Enzym-Mix |
| 1 µl | HDV-Fwd1 [10 µM] |
| 1 µl | HDV-Fwd-2 [10 µM] |
| 1 µl | HDV-Rev [10 µM] |
| 1 µl | Delta-P |
| 2,5 µl | Nuclease-free water |

Zu 20 µl Reaktionsansatz wurde pro Lauf in zweifacher Ausführung 5 µl Eluat einer anti-HDV-positiven Probe der HepMongolia-Kohorte hinzugegeben.

Die Kalibration erfolgte mittels einer separat hergestellten Standardreihe in absteigender Konzentration (S1, S2, S3) aus dem das HDV-Genom enthaltene Plasmid. Zur Erstellung einer Kalibrationskurve wurden die drei Kalibratoren S1, S2 und S3 mit folgender Konzentration pro Lauf mitgeführt:

Standardreihe:

| | |
|----|------------------|
| S1 | 10 000 Kopien/μl |
| S2 | 1 000 Kopien/μl |
| S3 | 100 Kopien/μl |

Zu jeweils 20 μl Reaktionsansatz wurde pro Lauf in jeweils zweifacher Ausführung 5 μl S1, S2 und S3 hinzugegeben. Zur Qualitätskontrolle wurde zu jeweils 20 μl Reaktionsansatz pro Lauf in einfacher Ausführung 5 μl einer Positivkontrolle mit bekannter Delta-Viruslast und 5 μl einer Negativkontrolle aus sterilem Wasser hinzugegeben. Die *TaqMan-PCR* wurde nach folgendem Programm für den quantitativen Nachweis von HDV-RNA im Serum durchgeführt (Tabelle 6).

Programm:

Tabelle 6: *TaqMan-PCR*-Programm zum quantitativen Nachweis von HDV-RNA im Serum

| Zyklus | Temperatur [°C] | Zeit [min:sek] | Wiederholungen |
|----------|-----------------|----------------|----------------|
| 1 HOLD | 45,00 | 10:00 | 1 |
| | 95,00 | 10:00 | 1 |
| 2 Zyklus | 95,00 | 00:15 | 45 |
| 3 Zyklus | 60,00 | 00:45 | 45 |

Die Viruslast der Deltavirusisolate wurde mittels nachfolgend aufgeführter Formeln bestimmt. Zuerst wurde der Verdünnungsfaktor für 1 ml Serum berechnet.

$$V = s \times \frac{1}{12}$$

Der Verdünnungsfaktor V errechnet sich aus der für die Virusextraktion verwendeten Serummenge s (in ml).

Dann wurde die Viruslast aus der zweifachen Probenmessung pro Lauf über nachfolgende Formel bestimmt.

$$VL = ((\text{Quantität 1. Probenmessung} + \text{Quantität 2. Probenmessung}) / 2) \times \frac{1}{V}$$

Die Viruslast VL (in Kopien/ml) errechnet sich aus der Quantität der Probenmessungen und dem Verdünnungsfaktor V.

Innerhalb eines *TaqMan-PCR*-Durchlaufs wurde eine Probe zweifach gemessen. Bei einer *cycle threshold (ct)*-Wert Abweichung kleiner zwei waren die Proben HDV-RNA positiv und die Viruslast konnte bestimmt werden. Bei einer *ct*-Wert Abweichung größer zwei konnte keine Angabe zur genauen Viruslast erfolgen. Diese Proben wurden als *target detected but not quantifiable (TD)* markiert. Beispielsweise wurde die Probe B4 zweifach gemessen mit einer *ct*-Wert Abweichung von 2,29 und daher als *TD* interpretiert.

2.2.2.4 *Semi-nested-PCR* mit HDV-spezifischen *Primern*

Um das L-HDAg zu analysieren, wurden das evaluierte *Nested-PCR*-Protokoll von Karimzadeh et al. [87] für die anti-HDV-positive Proben der HepMongolia-Kohorte optimiert und eine *Semi-nested-PCR* mit HDV-spezifischen *Primern* durchgeführt. Proben mit zuvor bestimmter Viruslast wurden im *Thermocycler TProfessionalTRIO* nach dem optimierten Protokoll amplifiziert.

Im ersten Protokollschritt wurde die HDV-RNA durch eine RT-Reaktion in komplementäre DNA umgeschrieben. Dafür wurde Mix1 mit jeweils 10 µl Eluat versetzt und das Programm *RT-Step1* durchgeführt. Anschließend wurde dem Reaktionsgemisch 7 µl RT-Reaktions-Ansatz beigefügt und das Programm *RT-Step2* durchgeführt.

Mix1-Ansatz pro Probe:

| | |
|------|---|
| 1 µl | <i>HDV-771R</i> [10 µM] |
| 1 µl | Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) |
| 1 µl | <i>Nuclease-free water</i> |

Programm *RT-Step1*:

| | |
|-------|-------|
| 5 min | 65 °C |
| ∞ | 25 °C |

RT-Reaktions-Ansatz pro Probe:

| | |
|------|---------------------------------|
| 4 µl | <i>5x first strand Buffer</i> |
| 1 µl | 0,1 M Dithiothreitol (DTT) |
| 1 µl | RNase Inhibitor |
| 1 µl | <i>Superscript II RT enzyme</i> |

Programm *RT-Step2*:

| | |
|--------|-------|
| 10 min | 25 °C |
| 60 min | 42 °C |
| 30 min | 50 °C |
| 30 min | 55 °C |
| 15 min | 75 °C |
| ∞ | 4 °C |

Im zweiten Protokollschritt wurden die für das *L*-HDAg kodierenden *DNA*-Sequenzen amplifiziert. Dafür wurde mit HDV-spezifischen *Primern* eine *Semi-nested-PCR* mit zwei aufeinanderfolgenden *PCR*-Reaktionen (*PCR1*, *PCR2*) durchgeführt. Zur Qualitätssicherung wurden in beiden *PCR*-Reaktionen eine Negativkontrolle aus 5 µl sterilem Wasser pro Lauf mitgeführt. Die optimale Temperatur für die Anlagerung der HDV-spezifischen *Primer* wurde durch eine Gradienten-*PCR* im *Mastercycler nexus GSX1* ermittelt und das Protokoll daraufhin modifiziert. Dafür wurden 10 µl des RT-Produkts einer Probe mit der Viruslast von 1.398.736 *IU/ml* mit 90 µl sterilem Wasser verdünnt und die folgend gelisteten Schritte der *PCR1* und *PCR2* in jeweils zwölf Reaktionsgefäßen mit einer Temperatur um ca. 1 °C steigend pro Reaktionsgefäß von 60 °C bis 72 °C durchgeführt.

Folgender Reaktionsansatz wurde für die *PCR1* pro Probe verwendet:

| | |
|----------|---|
| 62,75 µl | <i>Nuclease-free water</i> |
| 20 µl | <i>5x colorless GoTaq Buffer</i> |
| 6 µl | MgCl ₂ |
| 1 µl | dNTPs |
| 2,5 µl | <i>HDV-891F</i> [10 µM] |
| 2,5 µl | <i>HDV-339R</i> [10 µM] |
| 0,25 µl | <i>GoTaq Hot Start Polymerase</i> (Promega) |

Dem *PCR1*-Ansatz wurde 5 µl RT-Produkt pro Probe beigefügt und das Programm *PCR1* durchgeführt.

Programm *PCR1*:

| | | |
|--------------|------------------------------------|-------------|
| 2 min | 94 °C (Initialisierung) | } 45 Zyklen |
| 30 sek | 94 °C (Denaturierung) | |
| 30 sek | 64 °C (<i>Primer</i> -Anlagerung) | |
| 1 min 30 sek | 72 °C (Elongation) | |
| 10 min | 72 °C (finale Elongation) | |
| ∞ | 10 °C | |

Folgender Reaktionsansatz wurde für die *PCR2* pro Probe verwendet:

| | |
|----------|---|
| 64,75 µl | <i>Nuclease-free water</i> |
| 20 µl | <i>5x Green GoTaq Buffer</i> |
| 6 µl | MgCl ₂ |
| 1 µl | dNTPs |
| 2,5 µl | <i>HDV-912F</i> [10 µM] |
| 2,5 µl | <i>HDV-339R</i> [10 µM] |
| 0,25 µl | <i>GoTaq Hot Start Polymerase</i> (Promega) |

Nach Abschluss der *PCR1*-Reaktion wurde der *PCR2*-Ansatz mit 3 µl *PCR1*-Produkt versetzt und durchlief das Programm *PCR2*.

Programm PCR2:

| | | |
|--------------|------------------------------------|-------------|
| 2 min | 94 °C (Initialisierung) | } 45 Zyklen |
| 30 sek | 94 °C (Denaturierung) | |
| 30 sek | 66 °C (<i>Primer</i> -Anlagerung) | |
| 1 min 30 sek | 72 °C (Elongation) | |
| 10 min | 72 °C (finale Elongation) | |
| ∞ | 10 °C | |

2.2.2.5 Identifizierung amplifizierter DNA-Fragmente

Als Kontrolle der erfolgreichen Amplifikation des *L*-HDAg der HepMongolia-Proben in der *Semi-nested-PCR*, wurden die amplifizierten *DNA*-Fragmente visuell nachgewiesen. Zum Nachweis erfolgte entweder eine automatisierte, hochauflösende, Kapillarelektrophorese oder eine Agarose-Gelelektrophorese. Beide Verfahren dienen der Auftrennung von Molekülen nach ihrer Größe. Durch das Erzeugen eines elektrischen Feldes wandern kleinere geladene Moleküle schneller als größere. Mit Hilfe des QIAxel *Advanced System* von Qiagen wurden jeweils 10 µl der *PCR1*- und *PCR2*-Produkte isoliert, aufgetrennt und anschließend im Bereich von ca. 1.700 Basenpaaren (bp) nachgewiesen.

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde 0,5 g Agarose in 50 ml 1x Tris-Borate-Ethylen-diamintetraacetat (TBE) Puffer für kleine 1,0 %ige Gele bzw. 1,5 g Agarose in 150 ml 1x TBE für große 1,0 %ige Gele durch Aufkochen vollständig gelöst. Anschließend wurden zwei bis vier Tropfen Ethidiumbromidlösung (0,025 %, Roth) dem Agarosegemisch beige-fügt, um die *DNA* bei Ultraviolettstrahlung mit 280 Nanometer Wellenlänge visuell darzustellen. Das Gemisch wurde in einen Gelschlitten gegossen, nach Aushärtung in eine Elektrophorese Kammer gestellt und mit 1x TBE-Puffer vollständig bedeckt. Jeweils 2 µl Probe wurden mit 0,5 µl *DNA*-Ladepuffer (6x) versetzt und in die einzelnen Geltaschen gegeben. Als Größenmarker wurde der *Gene Ruler 1 kb Plus* verwendet. Bei einer Laufzeit von 60 min, 120 Volt und 400 Milliampere wurde die *DNA* der Proben aufgetrennt. Mit dem *Gel Dokumentation Molecular Imager Gel Doc XR+* konnten die amplifizierten, isolierten *DNA*-Fragmente dokumentiert werden.

2.2.2.6 Sequenzierung nach Sanger

Für die Analyse der *L*-HDAg Basensequenz der HepMongolia-Kohorte erfolgte eine Sequenzierung nach Sanger der *PCR*-Produkte der oben beschriebenen *Semi-nested-PCR*. Die Sequenzierung wurde von der Firma LGC in Berlin und der Firma Eurofins Genomics in Köln durchgeführt. Dafür wurde die *DNA* der *PCR*-Produkte mit dem Quiagen *PCR-Pu-*

rification Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Um eine ausreichende Probenkonzentration für die Sequenzierung zu gewährleisten, wurde diese mittels Spektralphotometer NanoDrop 2000 gemessen.

Folgender Sequenzieransatz wurde an das Unternehmen Eurofins Genomics versendet:

2,0 μl *Primer* [10 μM],
> 300 Nanogramm *DNA*,
auf 17 μl Gesamtvolumen mit sterilem Wasser aufgefüllt.

Folgender Sequenzieransatz wurde an das Unternehmen LGC versendet:

2,0 μl *Primer* [10 μM],
> 500 Nanogramm *DNA*,
auf 15 μl Gesamtvolumen mit sterilem Wasser aufgefüllt.

Für jede *DNA*-Probe wurde anfangs jeweils ein Sequenzieransatz mit dem *forward Primer HDV-912F* und dem *reverse Primer HDV-339R* bzw. *HDV-1674R* verschickt. Um die Sequenzierung zu optimieren, wurden die *Primer HDV-912F* und *HDV-339R* als spezielle Sequenzier-*Primer*, hergestellt mittels *HPLC*-Technik, verwendet. Um die Sequenzierung an die mongolischen Proben anzupassen, wurde der *Primer HDV-1419-Seq-F* aus einer konservierten Region der Konsensussequenz bereits sequenzierter HepMongolia-Kohorten-Proben modelliert.

Alternativ zum Versenden einzelner Proben wurden *96-Well Reaction Plates* mit 2x 30 μl eines *PCR1*- oder *PCR2*-Produkts einer Probe und folgende *Primer*, in separate Reaktionsgefäße verpackt, an LGC verschickt:

1x 12 μl *HDV-912F* [100 pmol/ μl] (*HPLC*-Aufreinigung),
1x 12 μl *HDV-339R* [100 pmol/ μl] (*HPLC*-Aufreinigung) bzw.
HDV-1419F-Seq [100 pmol/ μl].

Zehn Proben wurden aufgrund einer unklaren Nukleotidabfolge nach Sanger-Sequenzierung mittels *Next Generation Sequencing (NGS)* nachsequenziert. Dafür wurde 15 μl *PCR1*- oder *PCR2*-Produkt zum Unternehmen SEQ-IT nach Kaiserslautern versendet.

2.2.2.7 HLA-Diagnostik

Zur Analyse der HepMongolia-Kohorte auf Assoziationen zwischen Sequenzpolymorphismen und HLA-Klasse I-Allelen des Wirtes erfolgte eine HLA-Diagnostik der sequenzierten Proben. Dafür wurde 200 μl Vollblut der HepMongolia-Proben an das Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika des UKD versendet. Die molekulargenetische Bestimmung der HLA-Klasse I-Antigene erfolgte hochauflösend mittels *NGS*.

2.2.3 Analytische Methoden

2.2.3.1 Phylogenetische Analyse und Identifizierung von Sequenzpolymorphismen

Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit dem Programm Geneious visualisiert und anschließend kuratiert. Um eine phylogenetische Analyse durchzuführen und Sequenzpolymorphismen zu identifizieren, wurden die AS-Sequenzen des HDAg in Geneious *align* und eine Konsensussequenz erstellt. Das *Alignment* wurde nach dem Typ *Global alignment with free end gaps* und einer *Cost Matrix* mit 65 % *similarity (5.0/-4.0)* generiert. Um das *Alignment* zu generieren, wurden Längenunterschiede der einzelnen Sequenzen angepasst. Dadurch deckte das *Alignment* nicht mehr das gesamte L-HDAg, jedoch das gesamte S-HDAg (aus 592 Nukleotidstücken) ab. Die Klassifikation der HepMongolia-Sequenzen in HDV-1 bis 8 erfolgte in Geneious durch Erstellung eines *Fast maximum likelihood Trees* nach dem *Generalised Time Reversible-Modell (GTR-Modell)* mit 100 *Rate categories of sites*, basierend auf dem *Konsensus-Alignment* aus HepMongolia-Sequenzen und HDV-1 bis 8 klassifizierten Sequenzen der *GenBank*. In Tabelle 7 sind HDV-1 bis 8 klassifizierten Sequenzen der *GenBank* [26, 89-95] aufgeführt.

Tabelle 7: HDV-Genotyp 1 bis 8 klassifizierte Sequenzen

| HDV-Genotyp | Isolat | Accession number ¹ | PubMed |
|-------------|---------|-------------------------------|---------|
| HDV-1 | - | M21012 | 3367426 |
| HDV-2 | 7/18/83 | X60193 | 1923832 |
| HDV-3 | Peru-1 | L22063 | 8415646 |
| HDV-4 | Tw-2b | AF018077 | 9603325 |
| HDV-5 | dFr-910 | AJ584848 | - |
| HDV-6 | dFr-48 | AJ584847 | - |
| HDV-7 | dFr-45 | AJ584844 | - |
| HDV-8 | dFr-644 | AJ584849 | - |

¹Die Sequenzen der Isolate sind in der *GenBank* unter den aufgeführten *Accession numbers* hinterlegt und auf der Seite des internationalen Komitee für die Taxonomie von Viren aufgelistet [96].

Die Prüfung von evolutionären Beziehungen der HepMongolia-Sequenzen zueinander und zu HDV-1 Subtypen erfolgte durch Erstellung eines *RAxML Tree*. Mittels der öffentlich zugänglichen Plattform *PhyML online execution* von ATGC Montpellier *Bioinformatics* [97] wurde das ideale *RaxML Tree* Modell für die phylogenetische Analyse identifiziert. Danach wurde in Geneious ein *RAxML Tree* nach dem *Nucleotide Model GTR GAMMA 1* [98] mit 100 *bootstrap replicates* basierend auf dem *Konsensus-Alignment* aus HepMongolia-Sequenzen, einer HDV-1 klassifizierten Sequenzen der *GenBank* und von Karimzadeh et

al. [45] als HDV-1 Subtypen 1a bis 1e beschriebenen Sequenzen erstellt. Die Ergebnisse des *Fast maximum likelihood Trees* und des *RAxML Trees* wurden mit dem Programm Fig-Tree visualisiert.

2.2.3.2 Statistische Auswertung mit *SeqFeatR*

Um Anpassungen der Virusisolate an einen HLA-Klasse I-assoziierten Selektionsdruck des Wirtes nachzuweisen, wurden Sequenzpolymorphismen auf statistisch signifikante Assoziationen mit HLA-Klasse I-Allelen der HepMongolia-Sequenzen (*HLA-footprints*) mittels *SeqFeatR Web Server* (<https://seqfeatr.zmb.uni-due.de/>) untersucht. *SeqFeatR* ist ein freizugängliches Programm basierend auf statistischen und grafischen Funktionen des Programms R. Das Programm *SeqFeatR* wurde von Bettina Bedeus und Daniel Hoffmann des Instituts für Bioinformatik der Universität Duisburg-Essen in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Jörg Timm entwickelt [88]. Mit Durchführung exakter Fisher-Tests prüft das Programm über eine 2x2 Kontingenztafel an AS-Positionen mit Kombinationen zur Sequenz des Konsensus-*Alignments* (Sequenzpolymorphismen) die Signifikanz zu HLA-Klasse I-Allelen [88]. Für weitere Analysen der *SeqFeatR* Ergebnisse wurde der Grenzwert $p < 0,05$ festgelegt. Aufgrund von Testungen multipler Hypothesen wurde zusätzlich zum p -Wert die *False Discovery Rate (FDR)* als Maß für die Falscherkennungsrate bestimmt. Als Grenzwert für weitere Analysen der *SeqFeatR* Ergebnisse wurde eine *FDR* von $< 0,2$ festgelegt.

2.2.3.3 Identifizierung viraler Sequenzpolymorphismen in *MHC-I-Molekül bindenden Peptiden*

Zur Detektion von Mutationen in CD8⁺ T-Zellepitopen als Evidenz für eine Evasion der HLA-Klasse I-assoziierten, adaptiven Immunantwort, wurden *HLA-footprints* mit korrespondierenden CD8⁺ T-Zellepitopen abgeglichen. Mögliche CD8⁺ T-Zell-Kandidatenepitope wurden mittels Web-Portal der *IEDB* [99] vorhergesagt. Dabei wurde die Methode *IEDB recommended 2020.09 (NetMHCpan EL 4.1)* verwendet und die Peptide nach *Predicted IC50* sortiert. Anschließend wurden mongolische *HLA-footprint* aufweisende Peptide mit dem höchsten *Score* selektiert. Nach *IEDB*-Angaben korreliert ein hoher *Score* mit einer hohen Affinität des Peptids zum *MHC-I-Molekül* [99].

3 Ergebnisse

Ähnlich wie bei anderen chronischen Virusinfektionen zeigte auch HDV in vorangegangenen Studien eine kontinuierliche Anpassung an einen HLA-Klasse I-assoziierten Selektionsdruck [86, 87]. Die große mongolische Patientenkohorte HepMongolia mit einer hohen HBV/HDV-Prävalenz eröffnete zum einen die Möglichkeit, die molekulare Epidemiologie von HDV in der Mongolei besser zu charakterisieren. Zum anderen wurde untersucht, ob virale Sequenzpolymorphismen im Kontext relevanter HLA-Klasse I-Allelen des Wirts als Evidenz für eine virale Evasion von der HLA-Klasse I-assoziierten, adaptiven Immunantwort vorkommen.

3.1 Hohe HBV/HDV-Prävalenz in der HepMongolia-Kohorte

3.1.1 Analyse der HBV- und HDV-Infektionsmarker

Um die Prävalenz der HBV- und HDV-Infektionen in der HepMongolia-Kohorte zu bestimmen, wurden die vom Institut für Virologie des UKD analysierten HBV- und HDV-Infektionsmarker ausgewertet.

Als Infektionsmarker für eine HBV-Infektion wurde das HBsAg mittels *ARCHITECT-SerologieX Immunassaysystem* „HbsAg qualitativ II“ untersucht. Als Infektionsmarker einer HDV-Co- bzw. Superinfektion wurde anti-HDV mittels *Liaison XL-Serologie* „XL Murex Anti-HDV“ bestimmt. Von den insgesamt 1310 Probanden waren 432 reaktiv auf das HbsAg. Von den HBsAg-reaktiven Proben waren 278 anti-HDV-reaktiv (Abb. 3.1). Somit wurde bei 32,98 % der Probanden eine HBV-Infektion nachgewiesen. Davon waren 64,35 % HDV-co-/superinfiziert.

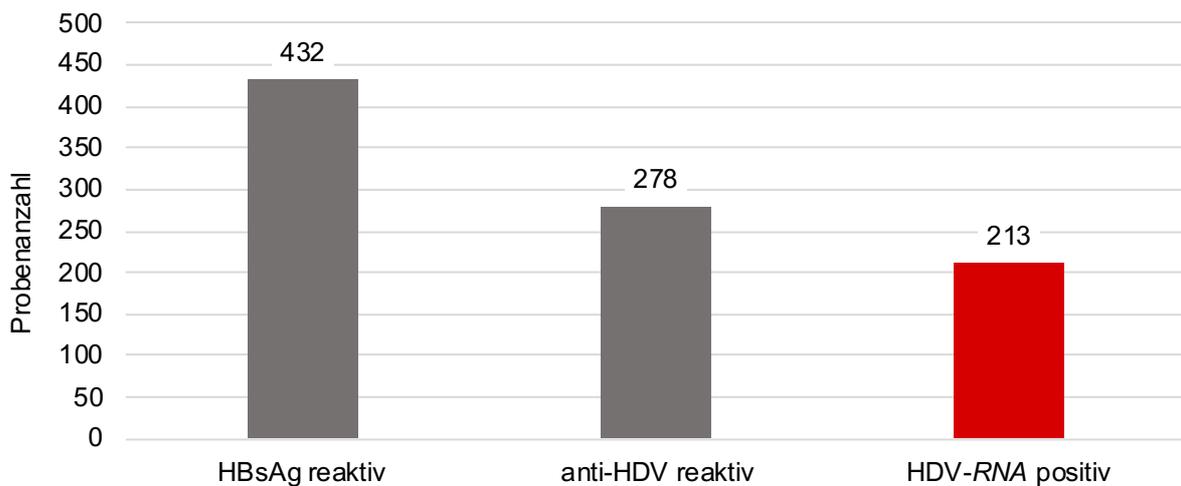


Abb. 3.1: HBV-/HDV-Prävalenz in der HepMongolia-Kohorte

Als HBV- und HDV-Infektionsmarker wurden das Hepatitis B Oberflächen-Antigen (HBsAg), Antikörper gegen das Hepatitis D Virus (anti-HDV), und HDV-RNA am Institut für Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf bestimmt. Im ersten Schritt wurden die Proben der HepMongolia-Kohorte ($n = 1310$) mittels *ARCHITECT*- und *LiaisonXL-Serologie* auf HBsAg- und anti-HDV-Reaktivität (grau) untersucht. Von 432 HBsAg-positiven Proben waren 278 anti-HDV positiv. Im zweiten Schritt wurde HDV-RNA (rot) der HBsAg und anti-HDV-reaktiven Proben mittels *TaqMan-PCR* detektiert. Von den anti-HDV-reaktiven Proben konnte in 213 Proben HDV-RNA detektiert werden. Alle Werte sind in absoluten Zahlen (Probenanzahl) angegeben.

3.1.2 HDV-RNA Quantifizierung mittels *TaqMan-PCR*

Für die Identifizierung von aktiv replizierenden HDV-Infektionen sowie für die Quantifizierung der HDV-RNA wurde ein internes *TaqMan-PCR*-Protokoll für die HepMongolia-Kohorte validiert. Zur Validierung der internen *TaqMan-PCR* wurde die Reproduzierbarkeit der Quantifizierung geprüft. Dafür wurde die Viruslast der Positivkontrolle (HDV-17408) aus neun *TaqMan-PCR*-Durchläufen analysiert. Die HDV-RNA der Positivkontrolle wurden vor den Durchläufen mittels Extraktionsautomaten *EZ1 Advanced XL* extrahiert. Zusätzlich wurde der erste internationale HDV-RNA-Standard der *WHO* in zwei *TaqMan-PCR*-Durchläufen analysiert. Die HDV-RNA-positive Probe der *WHO* weist eine international festgelegte Viruslast von 575 000 *IU/ml* auf. Die Viruslast der Positivkontrolle betrug in neun *TaqMan-PCR*-Durchläufen zwischen 223 345 Kopien/ml und 475 248 Kopien/ml. Dies entspricht einer Differenz der maximal und minimal gemessenen Viruslast innerhalb der Versuche von 0,33 \log_{10} -Stufen (Abb. 3.2). Die Viruslast des internationalen HDV-RNA-Standards der *WHO* betrug in der ersten Messung 119 482 Kopien/ml und in der zweiten Messung 116 631 Kopien/ml. Dies entspricht einer Differenz von 0,01 \log_{10} -Stufen (Abb. 3.2).

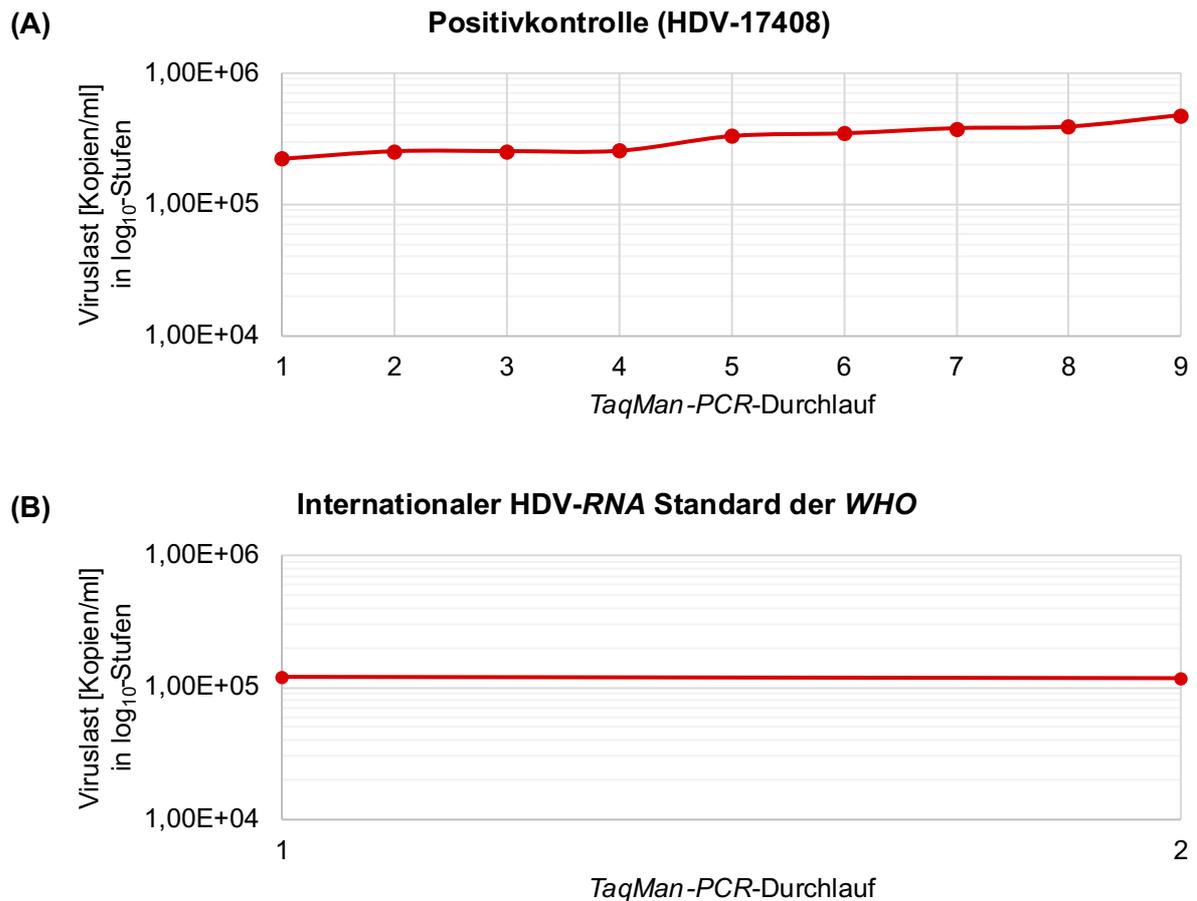


Abb. 3.2: Vergleich der Quantifizierung HDV-RNA-positiver Proben mittels hausinterner *TaqMan-PCR*

Die Viruslast HDV-RNA-positiver Proben wurde nach dem hausinternen *TaqMan-PCR*-Protokoll des Instituts für Virologie (Universitätsklinikum Düsseldorf) bestimmt. Die Messungen wurden mit dem *Real-Time PCR-System* QuantStudio 5 durchgeführt. Die Viruslast ist in wissenschaftlichen Zahlen angegeben (rote Punkte) mit der Einheit Kopien/ml. Die Ordinaten-Skalierung ist in log₁₀-Stufen angegeben. Die *TaqMan-PCR*-Durchläufe sind mit arabischen Ziffern versehen (Abszisse). Die Differenz der gemessenen Viruslasten ist in log₁₀-Stufen als rote Linie markiert. **(A)** Viruslast der Positivkontrolle (HDV-17408) in neun *TaqMan-PCR*-Durchläufen. **(B)** Viruslast des internationalen HDV-RNA-Standards der *World Health Organization (WHO)* in zwei *TaqMan-PCR*-Durchläufen.

Somit wurde sowohl HDV-RNA der Positivkontrolle als auch des internationalen HDV-RNA-Standards der *WHO* mittels hausinterner *TaqMan-PCR* erfolgreich quantifiziert mit einer maximalen Abweichung von weniger als einer log₁₀-Stufe.

Nach Validierung des internen *TaqMan-PCR*-Protokolls für die HepMongolia-Kohorte wurde die Viruslast der anti-HDV-reaktiven Proben bestimmt. In 183 anti-HDV-reaktiven Proben war HDV-RNA nachweisbar und konnte erfolgreich quantifiziert werden. Die mediane Viruslast betrug 34 508 Kopien/ml, mit einer Bandbreite von 3 bis 5 742 588 Kopien/ml (Abb. 3.3).

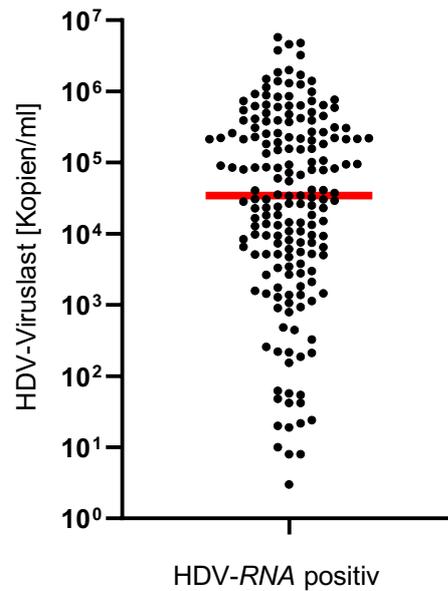


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der Viruslast HDV-RNA-positiver Proben

Bei 183 Antikörper gegen das Hepatitis D Virus (anti-HDV)-reaktiven Proben wurde erfolgreich HDV-RNA mittels hauseigenem *TaqMan-PCR*-Protokoll quantifiziert. Hier dargestellt ist die Verteilung der Viruslast HDV-RNA-positiver Proben (schwarze Punkte) in Kopien pro ml (Kopien/ml). Die Bandbreite betrug 3 bis 5 742 588 Kopien/ml mit einer medianen Viruslast von $3,45 \times 10^4$ Kopien/ml (roter Balken).

Bei weiteren 30 Proben konnte zwar HDV-RNA mittels *TaqMan-PCR* detektiert, jedoch nicht quantifiziert werden (*TD*). Somit waren insgesamt 213 Probanden HDV-RNA positiv, davon wurde bei 85,92 % ($n = 183$) eine Viruslast zwischen 3 Kopien/ml bis 5 742 588 Kopien/ml (Abb. 3.3) und bei weiteren 14,08 % ($n = 30$) konnte zwar HDV-RNA nachgewiesen, jedoch nicht quantifiziert werden (*TD*).

3.1.3 Höchste HDV-Prävalenz in westlich gelegenen mongolischen Regionen innerhalb der HepMongolia-Kohorte

Zunächst wurde zur Charakterisierung der HepMongolia-Kohorte die Herkunft der Proben analysiert. Entsprechend wurden regionale Unterschiede bezüglich der HDV-Infektionsrate in der Mongolei untersucht. Hierfür wurden die mongolischen Proben nach Konstellation der Infektionsmarker und Herkunft klassifiziert. Die Mongolei unterteilt sich in 21 Provinzen, den sogenannten *Aimags*. Diese wiederum untergliedern sich in Verwaltungsbezirke, den sogenannten *Sums*. Die Hauptstadt Ulaanbaatar wird davon separat verwaltet. Die Proben stammen aus der Hauptstadt Ulaanbaatar, der Stadt Erdenet, acht *Sums*, sieben *Aimags* und zwei Provinzzentren. Die Proben der HepMongolia-Kohorte stammen hauptsächlich aus westlichen, nordwestlichen, nördlichen und zentral gelegenen Regionen der Mongolei.

Davon ausgenommen ist Zamin-Uud, ein *Sum* im südöstlich gelegenen *Aimag* Dornogovi (Abb. 3.5.). Die Herkunft der Proben wurde nach Konstellation der Infektionsmarker in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Herkunft der mongolischen Proben der HepMongolia-Kohorte untergliedert in Hepatitis B Oberflächen-Antigen (HBsAg) reaktiv und HDV-RNA positiv

| Name (Art der Herkunft) | Provinz bzw. <i>Aimag</i> | HBsAg reaktiv n ¹ | HDV-RNA positiv n ¹ (% der HBsAg- reaktiven) |
|-------------------------------|--|---------------------------------|---|
| Undur-Ulaan (<i>Sum</i>) | Arkhangai | 13 | 4 (31) |
| Bulgan (<i>Sum</i>) | Khovd | 69 | 37 (54) |
| Darwi (<i>Sum</i>) | Khovd | 46 | 23 (50) |
| Davst (<i>Sum</i>) | Uvs | 51 | 24 (47) |
| Erdenet (Stadt) | Orkhon | 16 | 7 (44) |
| Khovd (Provinzzentrum) | Khovd | 71 | 40 (56) |
| Orkhontuul (<i>Sum</i>) | Selenge | 17 | 7 (41) |
| Tarialan (<i>Sum</i>) | Uvs | 13 | 8 (62) |
| Tsagaannuur (<i>Sum</i>) | Khuvsgul | 18 | 9 (50) |
| Ulaanbaatar (Hauptstadt) | eigenständige Verwaltungseinheit ² | 51 | 19 (37) |
| Ulaangom (Provinzzentrum) | Uvs | 60 | 31 (52) |
| Zamiin-Uud (<i>Sum</i>) | Dornogovi | 7 | 4 (57) |
| | gesamt | 432 | 213 (49) |

¹Die Probenanzahl n ist in absoluten Zahlen angegeben. ²Die Hauptstadt Ulaanbaatar gehört keinem *Aimag* an.

Probenanteile HDV-Infizierter von $\geq 50\%$ innerhalb der HBV-Infizierten zeigten sich in den westlich gelegenen *Sums* Bulgan, Darwi, Tarialan und dem westlich gelegenen Provinzzentrum Khovd, dem nordwestlich gelegenen Provinzzentrum Ulaangom, dem nördlich gelegenen *Sum* Tsagaannuur und dem südöstlich gelegenen *Sum* Zamiin-Uud (Abb. 3.5.).

Anschließend wurde die Verteilung der HBV-Immunität untersucht. Dafür wurde die Herkunft der Proben untersucht, die nicht-reaktiv auf das HBsAg getestet wurden. Es wurde differenziert zwischen geimpften Probanden, Probanden nach durchgemachter HBV-Infektion und Probanden ohne serologisch nachweisbaren HBV-Kontakt. Dafür wurde anti-HBs und anti-HBc mittels *ARCHITECT-SerologieX Immunassaysystem* getestet. Die Gruppe der geimpften Probanden beinhaltete HBsAg nicht-reaktive, anti-HBs-reaktive und anti-HBc-nicht-reaktive Proben. Die Gruppe der Probanden mit durchgemachter HBV-Infektion umfasste HBsAg nicht-reaktive und anti-HBc reaktive Proben. Die Gruppe der Probanden ohne serologisch nachweisbaren HBV-Kontakt beinhaltete Proben, die sowohl auf HBsAg nicht-reaktiv als auch auf anti-HBs und anti-HBc nicht-reaktiv getestet wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Herkunft der mongolischen Hepatitis B Oberflächen-Antigen (HBsAg)-nicht-reaktiven Proben der HepMongolia-Kohorte untergliedert in geimpfte Probanden, Probanden einer durchgemachten HBV-Infektion und Probanden ohne nachweisbaren HBV-Kontakt

| Name (Art der Herkunft) | Provinz bzw. <i>Aimag</i> | HBsAg nicht- reaktiv n ¹ | geimpft ² n ¹ (% der HBsAg- nicht- reaktiven) | durch- gemacht ³ n ¹ (% der HBsAg- nicht- reaktiven) | kein HBV- Kontakt ⁴ n ¹ (% der HBsAg-nicht- reaktiven) |
|-----------------------------|---|--|---|---|--|
| Undur-Ulaan (Sum) | Arkhangai | 94 | 25 (27) | 43 (46) | 26 (28) |
| Bulgan (Sum) | Khovd | 72 | 28 (39) | 30 (42) | 14 (19) |
| Darwi (Sum) | Khovd | 71 | 20 (28) | 29 (41) | 22 (31) |
| Davst (Sum) | Uvs | 82 | 33 (40) | 37 (45) | 12 (15) |
| Erdenet (Stadt) | Orkhon | 112 | 30 (27) | 57 (51) | 25 (22) |
| Khovd (Provinzzentrum) | Khovd | 29 | 8 (28) | 12 (41) | 9 (31) |
| Orkhontuul (Sum) | Selenge | 98 | 25 (26) | 56 (57) | 17 (17) |
| Tarialan (Sum) | Uvs | 13 | 4 (31) | 8 (62) | 1 (8) |
| Tsagaannuur (Sum) | Khuvsgul | 147 | 33 (22) | 42 (29) | 72 (49) |
| Ulaanbaatar (Hauptstadt) | eigenständige Verwaltungs- einheit ⁵ | 21 | 5 (24) | 9 (43) | 7 (33) |

| | | | | | |
|------------------------------|---------------|-----|----------|----------|----------|
| Ulaangom (Provinzzentrum) | Uvs | 130 | 48 (37) | 54 (42) | 28 (22) |
| Zamiin-Uud (Sum) | Dornogovi | 9 | 3 (33) | 6 (67) | 0 (0) |
| | gesamt | 878 | 262 (30) | 383 (44) | 233 (27) |

¹Die Probenanzahl *n* ist in absoluten Zahlen aufgeführt. ²Geimpfte Probanden mit Nachweis von Antikörpern gegen das Hepatitis B Oberflächen-Antigen (anti-HBs reaktiv) ohne Nachweis von Antikörpern gegen das Hepatitis B Core-Antigen (anti-HBc nicht-reaktiv). ³Probanden einer durchgemachten HBV-Infektion (anti-HBc reaktiv). ⁴Probanden ohne nachweisbaren, serologischen HBV-Kontakt (anti-HBs nicht-reaktiv und anti-HBc nicht-reaktiv). ⁵Die Hauptstadt Ulaanbaatar gehört keinem *Aimag* an.

Die Impfrate unter den HbsAg-nicht-reaktiven Probanden der einzelnen Regionen betrug zwischen 22 % und 40 %. Eine Impfrate von > 35 % wiesen die *Sums* Bulgan, Davst und das Provinzzentrum Ulaangom auf. Die Rate der Probanden mit durchgemachter HBV-Infektion unter den HbsAg-nicht-reaktiven Probanden der einzelnen Regionen betrug zwischen 29 % und 67 %. Eine Rate an Probanden mit durchgemachter HBV-Infektion von > 50 % wiesen die Stadt Erdenet, die *Sums* Orkhontuul, Tarialan und Zamiin-Uud auf. Die Rate der Probanden ohne nachweisbaren, serologischen HBV-Kontakt unter den HbsAg-nicht-reaktiven Probanden der einzelnen Regionen betrug zwischen 0 % und 49 %. Eine Rate an Probanden ohne nachweisbaren HBV-Kontakt von > 30 % wiesen die *Sums* Darvi, Tsagaannuur, das Provinzzentrum Khovd und die Hauptstadt Ulaanbaatar auf. Regionen mit einem Probenanteil < 50 % an HBV/HDV-Infizierten waren der zentral gelegene *Sum* Undur-Ulaan, der westlich gelegene *Sum* Davst, der nördlich gelegene *Sum* Orkhontuul und die zentral-nördlich gelegene Stadt Erdenet und die Hauptstadt Ulaanbaatar. Dabei zeigte Davst eine Impfrate von 40 % auf, Erdenet und Orkhontuul eine Rate an Probanden mit durchgemachter HBV-Infektion von > 50 % und Ulaanbaatar eine Rate an Probanden ohne nachweisbaren HBV-Kontakt von > 30 % auf (Abb. 3.4).

Somit wiesen der zentral gelegene *Sum* Undur-Ulaan, der westlich gelegene *Sum* Davst, die zentral-nördlich gelegene Stadt Erdenet, der nördlich gelegenen *Sum* Orkhontuul und die Hauptstadt Ulaanbaatar eine niedrige HBV/HDV-Infektionsrate und eine hohe Rate an geimpften Probanden, an Probanden mit durchgemachter HBV-Infektion oder an Probanden ohne nachweisbaren HBV-Kontakt auf.

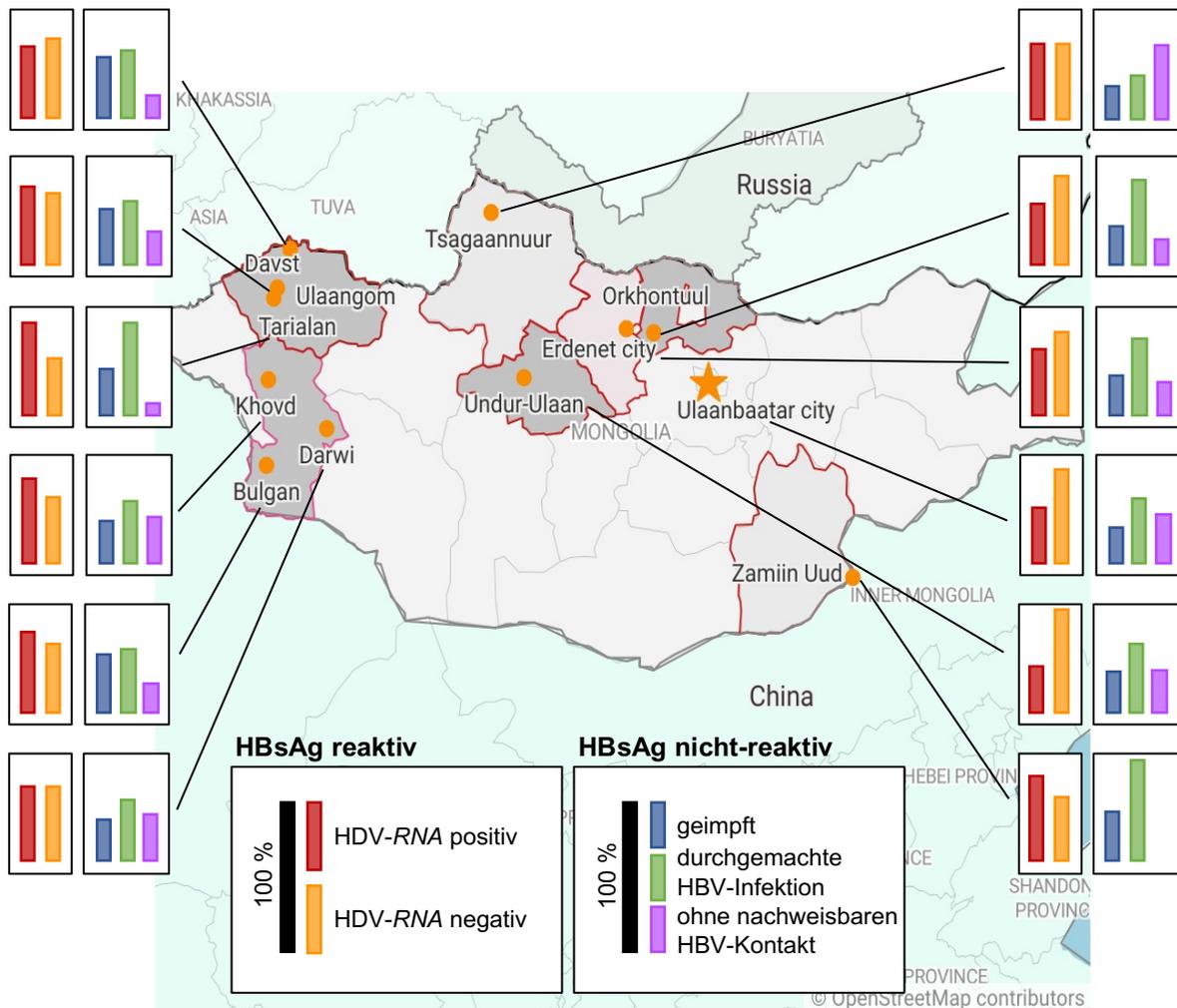


Abb. 3.4: Schematische Darstellung der Prävalenz HDV-RNA-positiver Probanden, HBV-geimpfter Probanden, Probanden mit durchgemachter HBV-Infektion und Probanden ohne nachweisbaren HBV-Kontakt innerhalb der jeweiligen mongolischen Herkunftsregionen

Die Landkarte mongolischer Provinzen wurde von unserem Kooperationspartner Battur Magvan (*Mongolian National University of Medical Sciences, Ulaanbaatar*) mittels Daten der *Open Street Map* generiert und mit *Datawrapper* auf Englisch visualisiert. Zur Darstellung der jeweiligen Prävalenz an HDV-RNA-positiven Probanden (rot), HDV-RNA-negativen Probanden (orange), HBV-geimpften Probanden (blau), Probanden mit durchgemachter HBV-Infektion (grün) und Probanden ohne serologisch nachweisbaren HBV-Kontakt (lila) wurde die Karte modifiziert. Hierfür wurde die jeweilige Prävalenz in Prozent innerhalb der beiden Gruppen Hepatitis B Oberflächen-Antigen (HBsAg)-reaktiven und -nicht-reaktiven Probanden (separate Kästen) im Verhältnis zur Anzahl der Proben aus der jeweiligen Region schematisch als Balkendiagramm am Kartenrand dargestellt. Geimpfte Probanden wiesen die serologische Konstellation HBsAg nicht-reaktiv, Antikörper gegen das Hepatitis B Oberflächen-Antigen (anti-HBs) reaktiv und Antikörper gegen Hepatitis B Core-Antigen (anti-HBc) nicht-reaktiv auf. Probanden mit durchgemachter HBV-Infektion wiesen die serologische Konstellation HBsAg nicht-reaktiv und anti-HBc reaktiv auf. Probanden ohne nachweisbaren HBV-Kontakt wiesen die serologische Konstellation HBsAg nicht-reaktiv, anti-HBs nicht-reaktiv und anti-HBc nicht-reaktiv auf. Die serologischen Marker wurden mittels *ARCHITECT*- und *LiaisonXL*-Serologie und HDV-RNA mittels hausinterner *TaqMan-PCR* bestimmt.

Zusammenfassend zeigte sich die höchste HBV/HDV-Infektionsrate hauptsächlich in westlich gelegenen Regionen der Mongolei. Eine niedrige HBV- und HBV/HDV-Infektionsrate wurde hauptsächlich in zentral-nördlich und nördlich gelegenen Regionen der Mongolei

festgestellt. Gleichzeitig zeigten diese Regionen eine hohe Prävalenz an HBV-geimpften Probanden, an Probanden mit durchgemachter HBV-Infektion oder an Probanden ohne nachweisbaren HBV-Kontakt (Abb. 3.4).

3.2 Sequenzanalyse des HDAg

3.2.1 Etablierung einer *PCR* zur Amplifikation der genomischen Region des *L*-HDAg

Zur Amplifikation des *L*-HDAg wurde eine *Semi-nested-PCR* für die HDV-RNA-positiven Proben der HepMongolia-Kohorte etabliert. Dafür wurde das Protokoll zur Amplifikation von Deltavirusisolaten von Karimzadeh et al. [87] für die Proben der HepMongolia-Kohorte angepasst. Da die Amplifikation des *L*-HDAg in anfänglichen Versuchen mit dem *Primer HDV-1674R* der *PCR2*-Reaktion nicht möglich war, wurde der *Primer HDV-1674R* mit dem *Primer HDV-339R* der *PCR2*-Reaktion ausgetauscht. Somit wurde in einem ersten Schritt das oben genannte Protokoll für die mongolischen Deltavirusisolate angepasst, indem die *Nested-PCR* in eine *Semi-nested-PCR* überführt wurde (Abb. 3.6).

Unter Verwendung des *Primers HDV-1674R* konnten bei drei Proben (B125, B22, B77) mit Viruslasten zwischen 4 692 Kopien/ml und 41 442 Kopien/ml keine *PCR2*-Produkte mittels Kapillarelektrophorese als Bande nachgewiesen werden. Unter Verwendung des *Primers HDV-339R* konnten schließlich bei diesen Proben *PCR2*-Produkte als Banden mittels Kapillarelektrophorese visualisiert werden (Abb. 3.5).

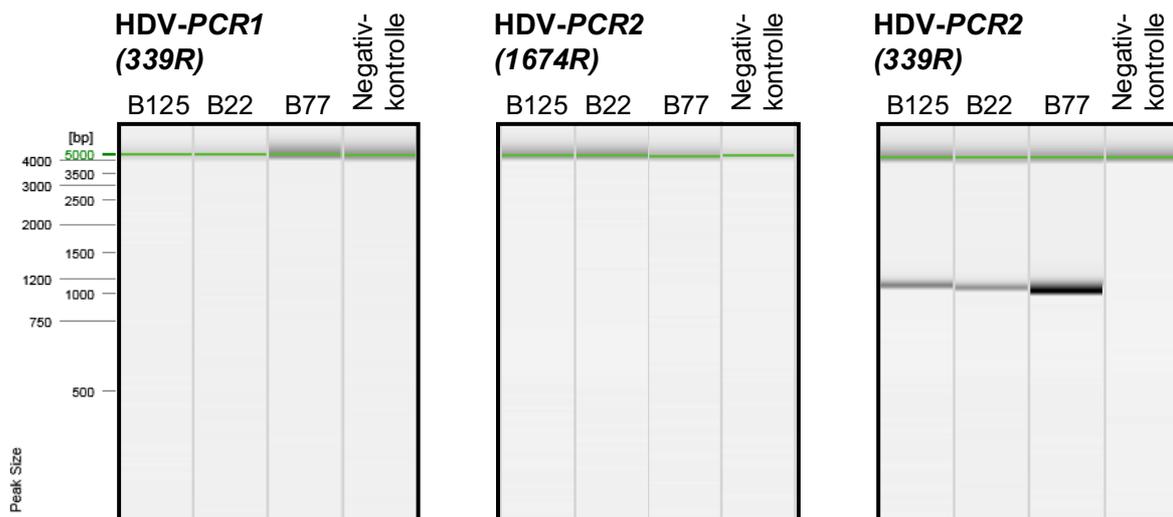


Abb. 3.5: Etablierung der *Semi-nested-PCR* für die HDV-RNA-positiven Proben der HepMongolia-Kohorte

Mit Hilfe des QIAxcel *Advanced System* von Qiagen wurden jeweils 10 μ l DNA der *PCR1*- und *PCR2*-Amplifikationsprodukte der HDV-RNA-positiven Proben B125, B22 und B77 isoliert, aufgetrennt und anschließend im Bereich zwischen 1000 Basenpaaren (bp) und 1200 bp nachgewiesen. Zunächst wurde die *PCR2* nach dem Protokoll von Karimzadeh et al. [87] als *Nested-PCR* mit dem Primer HDV-1674R durchgeführt. Alternativ wurde die *PCR2* als *Semi-nested-PCR* mit dem Primer HDV-339R durchgeführt. Visualisierung der Amplifikationsprodukte des Large-Hepatitis Delta Antigen (L-HDAg) mittels Kapillarelektrophorese bei einer Größe (*Peak Size*) von 1142 bp.

Daher wurde zur Amplifikation der mongolischen Deltavirusisolate die bereits zur Amplifikation von Deltavirusisolaten etablierte *Nested-PCR* von Karimzadeh et al. [87] in eine *Semi-nested-PCR* überführt (Abb. 3.6).

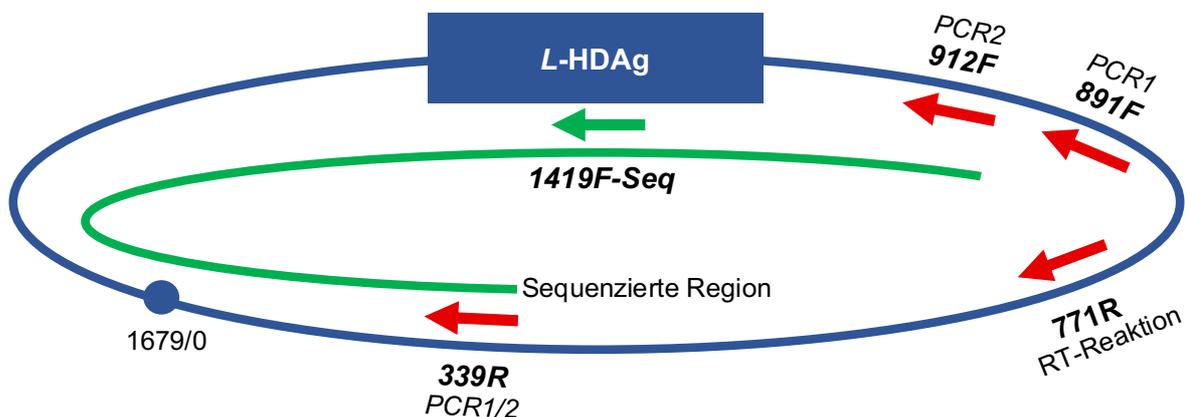


Abb. 3.6: Amplifikation und Sequenzierung des Large-Hepatitis Delta Antigen (L-HDAg)

Schematische Darstellung des HDV-Genoms mit Lokalisation der HDV-spezifischen *Primer* der neu etablierten *Semi-nested-PCR* (rot) und mit Markierung des sequenzierten Genomabschnitts (grün). Das angepasste *Semi-nested-PCR*-Protokoll basiert auf dem *Nested-PCR*-Protokoll von Karimzadeh et al. [87]. Hier wurde der Primer HDV-1674R nicht verwendet. Stattdessen wurde sowohl für die *PCR1* als auch *PCR2* der Primer HDV-339R (rot) verwendet. Für die Sequenzierung des L-HDAg wurden die HDV-spezifischen *Primer* HDV-1419F-Seq (grün) und HDV-912F (rot) verwendet.

In einem zweiten Schritt wurde die optimale Temperatur für die Anlagerung der *Primer* im *PCR1*- und *PCR2*-Programm durch eine Gradienten-*PCR* ermittelt, um das Protokoll für die

mongolischen Deltavirusisolate zu optimieren. Hierfür wurde die Probe B55 mit einer Viruslast von 139 874 Kopien/ml verwendet. Dabei zeigte sich bei der *PCR1* die Bande mit der stärksten Intensität bei einer Temperatur von 64 °C. Bei der *PCR2* zeigte sich die Bande mit der stärksten Intensität bei einer Temperatur von 66 °C (Abb. 3.7).

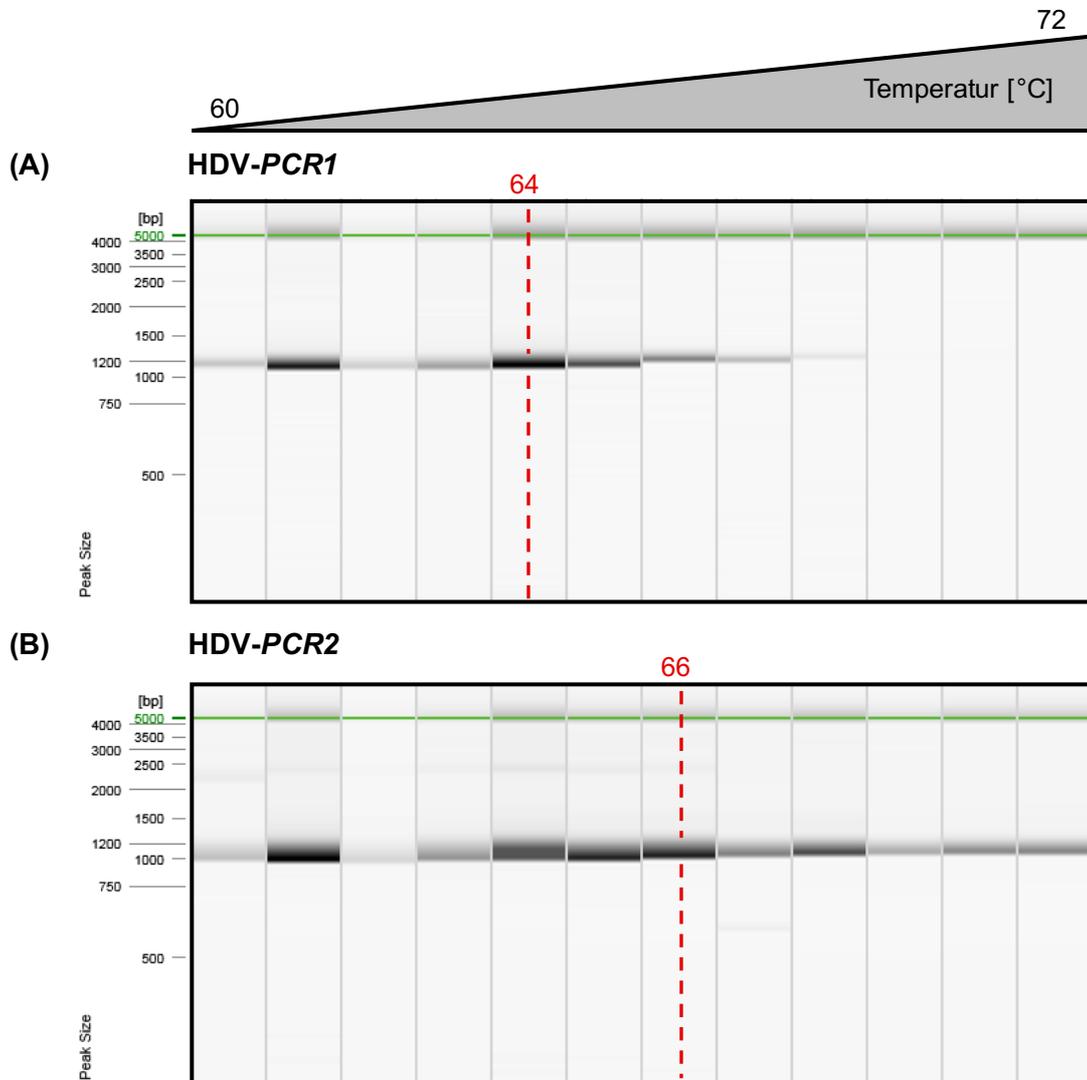


Abb. 3.7: Optimierung der Temperatur für die Anlagerung der HDV-spezifischen *Primer* mittels Gradienten-PCR

Im ersten Schritt wurde die HDV-RNA-positive Probe B55 der HepMongolia-Kohorte mit einer Viruslast von 139 874 Kopien pro ml (Kopien/ml) mittels Gradienten-PCR im Mastercycler nexus GSX1 amplifiziert. Dafür wurden die *PCR1*- und *PCR2*-Reaktionen in jeweils zwölf Reaktionsgefäßen mit einer Temperatur um ca. 1 °C steigend pro Reaktionsgefäß von 60 °C bis 72 °C durchgeführt. Im zweiten Schritt wurden mit Hilfe des QIAxcel *Advanced System* von Qiagen jeweils 10 µl *DNA* der *PCR1*- und *PCR2*-Amplifikationsprodukte der Probe B55 isoliert, aufgetrennt und anschließend im Bereich zwischen 1000 Basenpaaren (bp) und 1200 bp nachgewiesen (Spur 1 bis 12). **(A)** Visualisierung der Amplifikationsprodukte des *Large-Hepatitis Delta Antigen (L-HDAg)* mittels Kapillarelektrophorese bei einer Größe (*Peak Size*) von 1142 bp. *PCR1*-Reaktionen wurden hier mit oben genannten, ansteigenden Temperaturen für die Anlagerung der *Primer HDV-891F* und *HDV-339R* durchgeführt. Rot markiert ist die Temperatur 64 °C mit der stärksten Bandenintensität. **(B)** Visualisierung der Amplifikationsprodukte des *L-HDAg* mittels Kapillarelektrophorese bei einer Größe (*Peak Size*) von 1121 bp. *PCR2*-Reaktionen wurden hier mit oben genannten, ansteigenden Temperaturen für die Anlagerung der *Primer HDV-912F* und *HDV-339R* durchgeführt. Rot markiert ist die Temperatur 66 °C mit der stärksten Bandenintensität.

Die Ergebnisse der Gradienten-PCR zeigten, dass die optimale Temperatur für die Anlage der *Primer* im PCR1-Programm bei 64 °C und im PCR2-Programm bei 66 °C lag. Anhand dieser Ergebnisse wurden die PCR1- und PCR2-Programme angepasst.

3.2.2 Amplifikation des L-HDAg von Deltavirusisolaten der mongolischen Kohorte

Um die RNA-Sequenzen der HepMongolia-Proben auf phylogenetische Abstammung und Sequenzpolymorphismen zu analysieren, wurde das L-HDAg der HDV-RNA-positiven Proben mit dem optimierten Protokoll amplifiziert. HDV-RNA-positive Proben wurden unter angepassten Reaktionsbedingungen mittels *Semi-nested-PCR* amplifiziert. Zur Visualisierung der amplifizierten Deltavirusisolate wurde eine Kapillarelektrophorese (Abb. 3.8) bzw. Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Von 213 HDV-RNA-positiven mongolischen Proben konnten 182 (85,45 %) amplifiziert und das Ergebnis visualisiert werden.

Bei 31 der Proben konnten keine Banden in der Kapillarelektrophorese bzw. Agarose-Gelelektrophorese visualisiert werden. Davon konnte bei 18 Proben zwar HDV-RNA nachgewiesen, jedoch nicht quantifiziert werden (als *TD* klassifiziert). Neun Proben wiesen eine Viruslast < 100 Kopien/ml, zwei Proben wiesen eine Viruslast < 500 Kopien/ml und eine Probe wies eine Viruslast von 643021 Kopien/ml auf. Von einer Probe war die Materialmenge zu gering für die Extraktion und Amplifikation.

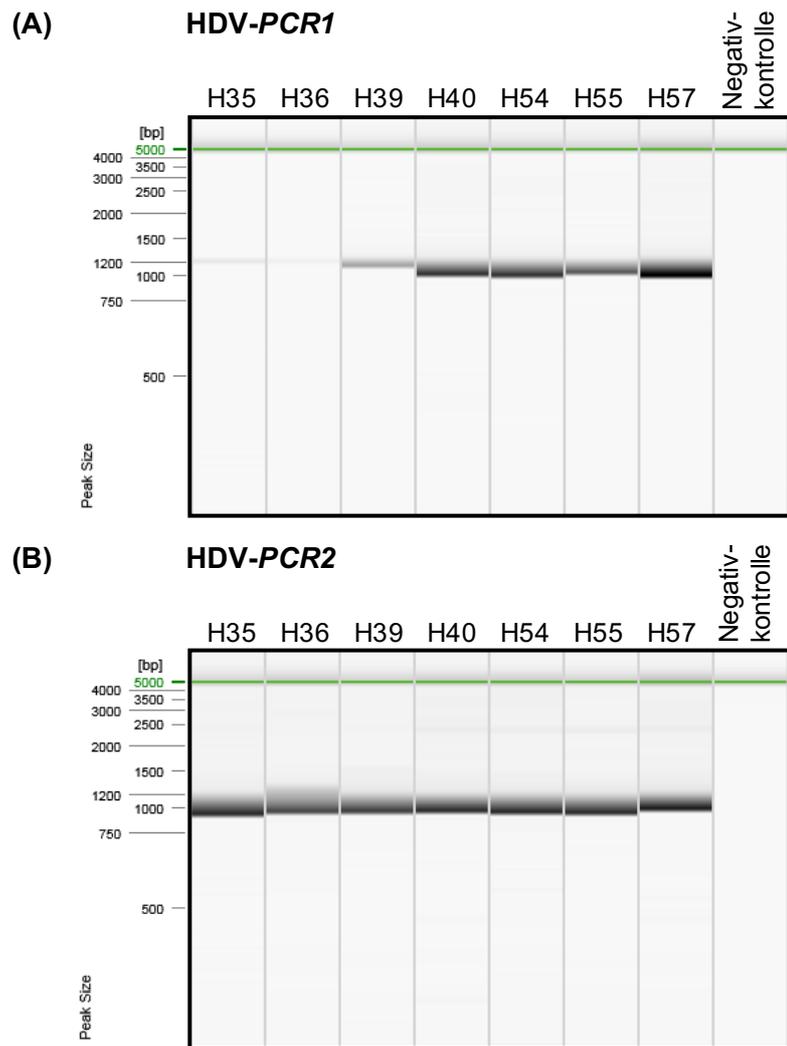


Abb. 3.8: Amplifikation des Large-Hepatitis Delta Antigen (L-HDAg) und Visualisierung der Amplifikationsprodukte mittels Kapillarelektrophorese

Mit Hilfe des QIAxcel *Advanced System* von Qiagen wurden jeweils 10 μ l DNA der PCR1- und PCR2-Amplifikationsprodukte isoliert, aufgetrennt und anschließend im Bereich zwischen 1 000 Basenpaaren (bp) und 1 200 bp nachgewiesen. Das L-HDAg wurde mittels *Semi-nested-PCR* von sieben HDV-RNA-positiven Proben aus Khovd (Spur 1 bis 7) amplifiziert und jeweils eine Spur mit 10 μ l sterilem, RNase freiem Wasser (Spur 8) als Negativkontrolle pro PCR-Lauf befüllt. (A) Visualisierung der PCR1-Amplifikationsprodukte von sieben HDV-RNA-positiven Proben der HepMongolia-Kohorte mittels Kapillarelektrophorese bei einer zu erwartenden Größe (*Peak Size*) von 1 142 bp. (B) Visualisierung der PCR2-Amplifikationsprodukte von sieben HDV-RNA-positiven Proben der HepMongolia-Kohorte mittels Kapillarelektrophorese bei einer zu erwartenden Größe (*Peak Size*) von 1 121 bp.

Insgesamt konnten 85,45 % der mongolischen HDV-RNA-positiven Proben erfolgreich für die Sequenzierung amplifiziert werden. Die Proben, die nicht erfolgreich amplifiziert werden konnten, hatten alle eine nicht zu bestimmende (*TD*) oder sehr niedrige Viruslast mit der Ausnahme einer Probe, die trotz hoher Viruslast und dreimaliger Durchführung der *Semi-nested-PCR* nicht amplifiziert werden konnte.

3.2.3 Identifizierung von neuen Subtypen des HDV-Genotyps 1

Um die HDV-Genotypen der mongolischen Deltavirusisolate zu bestimmen, wurden phylogenetische Analysen mit Referenzsequenzen der Genotypen HDV-1 bis 8 aus der *GenBank* durchgeführt. Dafür wurden die HDV-RNA-positiven Proben mit Nachweis eines Amplifikationsprodukts sequenziert. Insgesamt 157 qualitativ hochwertige Sequenzen der HepMongolia-Kohorte deckten das S-HDAg ab und konnten auf eine einheitliche Sequenzlänge von 592 Nukleotidstücken zugeschnitten werden. Mit Hilfe der Software Genious wurden diese Proben zusammen mit den Referenzsequenzen der Genotypen HDV-1 bis 8 und weiteren Sequenzen, die von Karimzadeh et al. [45] als HDV-1 Subtypen 1a bis 1e klassifiziert wurden, *align*t. Anschließend wurde ein phylogenetischer Baum mittels RaxML unter Verwendung eines *GTR*-Modells als *Fast maximum likelihood Tree* errechnet. Wie in Abb. 3.9 zu sehen ist, wiesen die gesamten mongolischen Sequenzen und die HDV-1 Subtyp 1a bis 1e klassifizierten Sequenzen die kleinste genetische Distanz zur HDV-1 Sequenz (*Accession Number Gen Bank* M21012.1, [26]) auf. Somit konnten alle Sequenzen der HepMongolia-Kohorte dem Genotyp 1 zugeordnet werden.

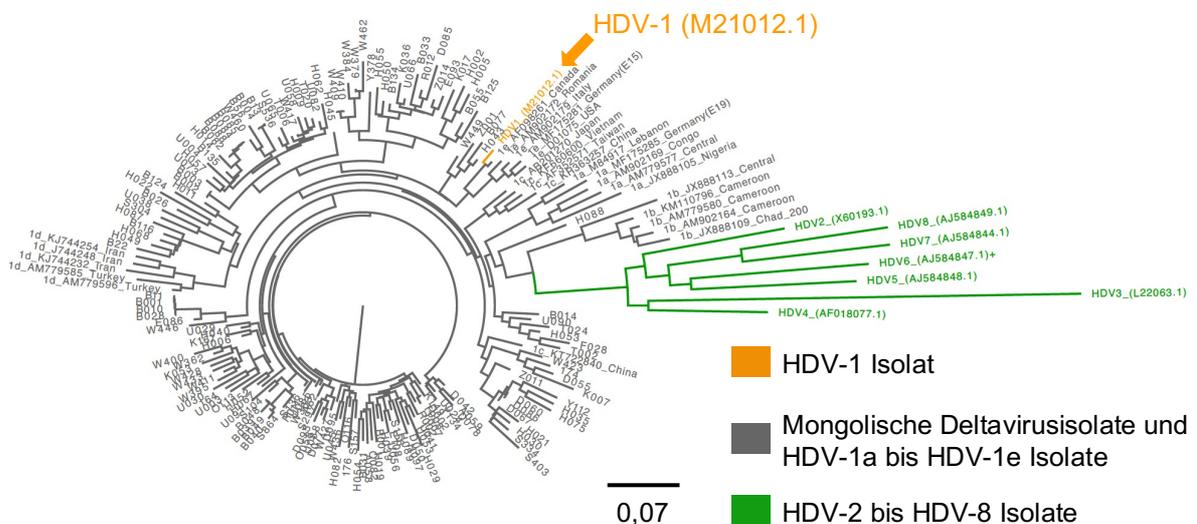


Abb. 3.9: Phylogenetischer Baum basierend auf einer Distanzanalyse zur Klassifikation der mongolischen Deltavirusisolate in HDV-Genotypen 1 bis 8 (HDV-1 bis 8)

Die phylogenetische Analyse (*Fast maximum likelihood Tree*) basiert auf 157 mongolischen Sequenzen des *Small-Hepatitis Delta Antigen* sowie weiteren als HDV-1 bis 8 klassifizierten Sequenzen der *Gen Bank* [26, 89-95] (*Accession number* in Klammern) und von Karimzadeh et al. [45] als HDV-1 Subtypen 1a bis 1e klassifizierten Sequenzen. Mongolische Virusisolate (grau) und HDV-1 Subtypen 1a bis 1e klassifizierten Virusisolate (orange) haben die kleinste genetische Distanz zur HDV-1 Sequenz (orange) im Vergleich zu den Sequenzen von HDV-2 bis HDV-8 (grün). Die Legende gibt den Maßstab der genetischen Distanz (0,07) in Substitutionen pro Nukleotidposition (*Substitutions per site*) an.

Da mongolische Deltavirusisolate eine hohe genetische Variabilität aufwiesen, wurden weiterführende phylogenetische Analysen mit von Karimzadeh et al. [45] beschriebenen HDV-1 Subtypen 1a bis 1e durchgeführt. Dazu wurden die Sequenzen mittels Geneious visualisiert und eine Konsensussequenz erstellt. Um das ideale Modell des *RAxML Trees* für die phylogenetische Analyse zu identifizieren, wurde die Konsensussequenz mittels der öffentlich zugänglichen Plattform *PhyML online execution* von ATGC Montpellier *Bioinformatics* geprüft [97]. Die Analyse ergab eine ideale Berechnung des *RAxML Tree* nach dem *Nucleotide Model GTR+G+I* [100]. Daraufhin wurde ein *RAxML Tree* nach dem *Nucleotide Model GTR GAMMA I* [98] konstruiert und geprüft, ob einzelne *Clades* möglicherweise als neue HDV-1 Subtypen einzuordnen sind. Zur Validierung wurden 100 *bootstrap replicates* aus den 157 HepMongolia-Sequenzen und aus 25 HDV-1 Subtyp 1a bis 1e klassifizierten Sequenzen (jeweils fünf Sequenzen pro Subtyp) von Karimzadeh et al. [45] berechnet. Die phylogenetische Analyse des *RAxML Tree* zeigte, dass mongolische Deltavirusisolate drei *Clades* 1-I bis 1-III mit einem *bootstrap*-Wert von ≥ 84 bildeten (Abb. 3.10). Folglich formierten sich die *Clades* 1-I bis 1-III mit einer Wahrscheinlichkeit von ≥ 84 % in der berechneten Konfiguration. Außerdem formierte sich nach der phylogenetischen Analyse eine große Anzahl an Proben zusammen, die wie in Abb. 3.10 rechts oben zu sehen einen scheinbaren vierten „*Clade 1-IV*“ bildeten. Dabei zeigte die Formation einen *bootstrap*-Wert von 61 auf. Somit formierten sich die Proben mit einer Wahrscheinlichkeit von 61 % in der berechneten Konfiguration.

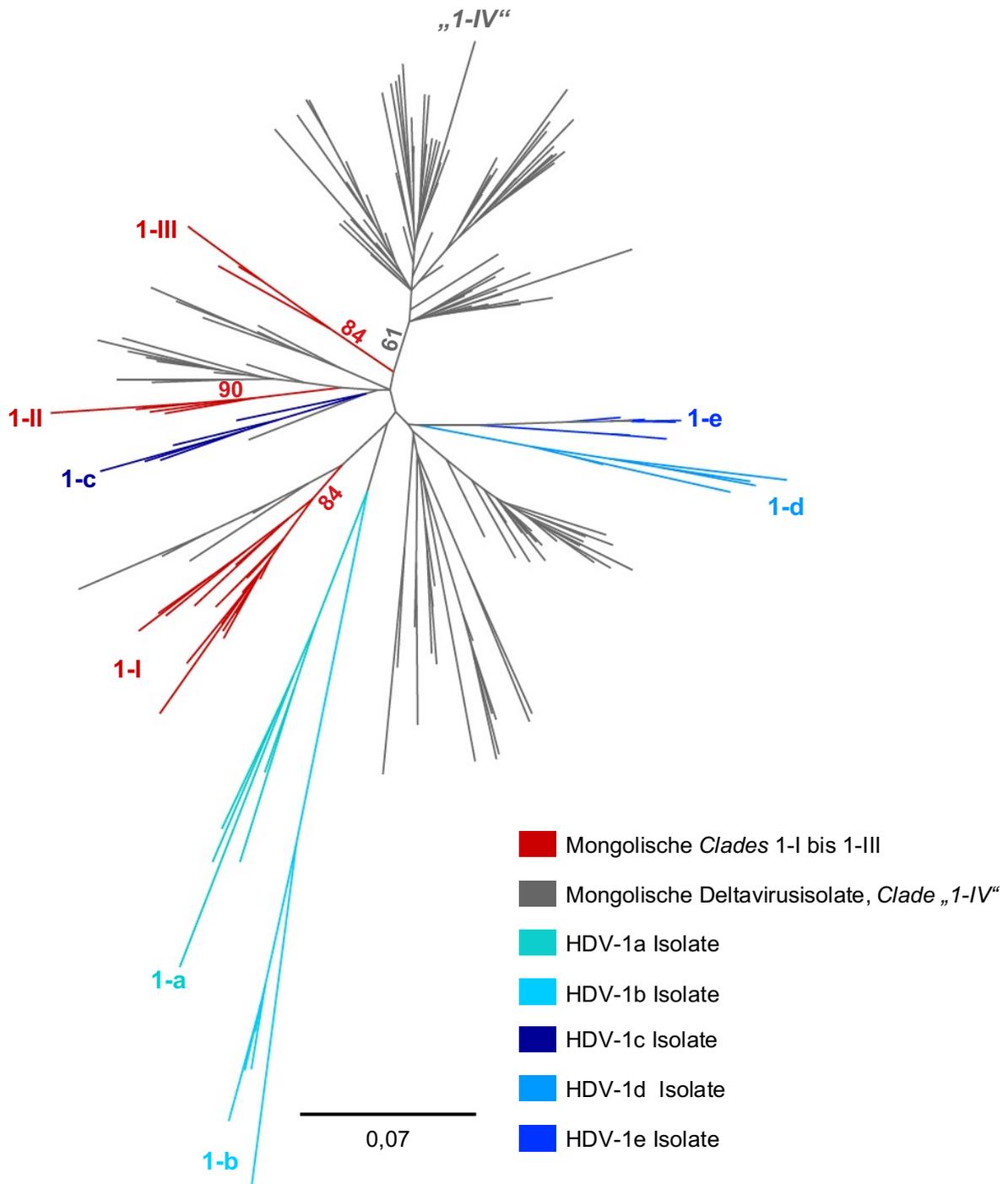


Abb. 3.10: Phylogenetischer Baum basierend auf einer Distanzanalyse zur Klassifikation der mongolische Deltavirusisolate in HDV-Genotyp 1 Subtypen

Phylogenetische Analyse mittels Erstellung eines *RAXML Tree* basierend auf 157 mongolischen Sequenzen des *Small-Hepatitis Delta Antigen*s, einer als HDV-1 klassifizierten Sequenz der *GenBank* [26] (*Accession number* M21012.1, blau) und 25 Sequenzen der Studie von Karimzadeh et al. [45]. Die Virusisolate dieser Studie repräsentieren die HDV-1 Subtypen 1a bis 1e (blau) und stammen aus Amerika, Europa, dem Nahen Osten, Ostasien und Afrika. Mongolische Deltavirusisolate (grau) bildeten drei *Clades* 1-I bis 1-III (rot) mit *bootstrap*-Werten ≥ 84 (rot). Für einen scheinbar vierten *Clade* „1-IV“ (grau) mongolischer Deltavirusisolate wurde ein *bootstrap*-Wert < 84 berechnet. Die Legende gibt den Maßstab der genetischen Distanz (0,07) in Substitutionen pro Nukleotidposition (*Substitutions per site*) an.

Durch phylogenetische Analysen konnten in der HepMongolia-Kohorte drei neue HDV-1 Subtypen identifiziert werden mit einer hohen Konfigurationswahrscheinlichkeit von $\geq 84\%$. Ein scheinbar vierter *Clade* wies eine geringe Konfigurationswahrscheinlichkeit von 61% auf und wurde somit nicht eindeutig als neuer HDV-1 Subtyp interpretiert.

Karimzadeh et al. [45] beschrieben eine Zuordnung der Subtypen HDV-1a bis 1e zu verschiedenen geographischen Regionen. Um zu prüfen, ob die *Clades* 1-I bis 1-III ebenfalls eine Assoziation zu spezifischen Regionen aufweisen, wurde die Herkunft der Proben analysiert. Wie in Tabelle 10 zu sehen, konnten die *Clades* 1-I bis 1-III keinen spezifischen mongolischen Regionen zugeordnet werden. Beispielsweise waren Proben aus dem *Sum* Tsagaannuur sowohl in *Clade* 1-I als auch *Clade* 1-II vertreten. Proben aus dem *Sum* Bulgan waren sowohl in *Clade* 1-I als auch *Clade* 1-III vertreten. Somit überschneidet sich die Probenherkunft der *Clades* 1-I bis 1-III.

Tabelle 10: Herkunft der *Clades* 1-I bis 1-III formierenden Proben potenzieller neuer HDV-Genotyp 1 Subtypen

| Clade | bootstrap-Wert ¹ | Herkunft (n ²) |
|-------|-----------------------------|----------------------------|
| 1-I | 84 | Bulgan (4) |
| | | Tsagaannuur (2) |
| | | Zamiin-Uud (1) |
| | | Erdenet (1) |
| | | Darwi (2) |
| | | Ulaangom (1) |
| | | Khovd (4) |
| 1-II | 90 | Tsagaannuur (1) |
| | | Darwi (1) |
| | | Ulaanbaatar (1) |
| | | Davst (1) |
| 1-III | 84 | Davst (1) |
| | | Erdenet (1) |
| | | Bulgan (4) |

¹Die Wurzel-*bootstrap*-Werte der *Clades* 1-I bis 1-III sind in absoluten Zahlen von insgesamt 100 *bootstrap replicates* angegeben. Diese wurden in Geneious durch Erstellung eines *RAXML Tree* basierend auf 157 mongolischen Sequenzen des *Small-Hepatitis Delta Antigen*s, einer HDV-1 klassifizierten Sequenz der *GenBank* [26] (*Accession number* M21012.1, blau) und 25 Sequenzen der Studie von Karimzadeh et al. [45] berechnet. ²Die Probenanzahl (n) ist jeweils in absoluten Werten in Klammern hinter dem Namen der Region angegeben.

Zusammengefasst war innerhalb eines *Clades* die Herkunft der Proben sehr heterogen. Demzufolge konnten die drei neuen, potenziellen HDV-1 Subtypen (*Clade* 1-I bis 1-III) keiner spezifischen geographischen Region innerhalb der Mongolei zugeordnet werden.

Die oben beschriebenen HDV-Clades 1-I bis 1-III zeigen die genetische Variabilität des HDV-Genotyps 1 auf. Die Publikationen von Le Gal et al. [44] und Karimzadeh et al. [45] beschrieben die hohe genetische Variabilität innerhalb der bekannten HDV-Genotypen 1 bis 8. Bisher existiert jedoch keine international gültige Subklassifikation dieser Genotypen. Daher wurde die intrasubtypische Übereinstimmung und intersubtypische Variabilität der potenziellen HDV-1-I bis 1-III Subtypen berechnet als Definitionsmerkmale einer möglichen Klassifikation in Subtypen. Dafür wurde die genetische Übereinstimmung der Nukleotidsequenzen innerhalb eines HDV-1 Subtyps und der HDV-1 Subtypen zueinander bestimmt. Entsprechend wurden paarweise arithmetische Mittelwerte von den HDV-1 Subtypen 1a bis 1e und den drei potenziellen Subtypen 1-I bis 1-III berechnet. HDV-1a wies die kleinste intrasubtypische Übereinstimmung mit 91,81 % und HDV-1-III die größte intrasubtypische Übereinstimmung mit 97,09 % auf. Die intersubtypische Variabilität von HDV-1a bis 1e und HDV-1-I bis HDV-1-III betrug zwischen 9,37 % und 15,27 %. Die intersubtypische Variabilität von HDV-1-I bis HDV-1-II betrug zwischen 10,02 % und 10,27 % (Tabelle 11).

Tabelle 11: Genetische Variabilität innerhalb des HDV-Genotyps 1

| Sub-typen ¹ | HDV-1a | HDV-1b | HDV-1c | HDV-1d | HDV-1e | HDV-1-I | HDV-1-II | HDV-1-III |
|------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|----------|-----------|
| HDV-1a | 91,81 | 14,50 | 12,33 | 11,84 | 12,92 | 13,00 | 13,27 | 13,03 |
| HDV-1b | 85,50 | 94,10 | 14,06 | 14,15 | 14,87 | 15,02 | 14,96 | 15,27 |
| HDV-1c | 87,67 | 85,94 | 93,58 | 9,95 | 9,77 | 11,27 | 9,37 | 9,79 |
| HDV-1d | 88,16 | 85,85 | 90,05 | 93,54 | 10,23 | 10,97 | 10,95 | 12,02 |
| HDV-1e | 87,08 | 85,13 | 90,23 | 89,77 | 95,34 | 11,46 | 10,66 | 11,02 |
| HDV-1-I | 87,00 | 84,98 | 88,73 | 89,04 | 88,54 | 93,31 | 10,27 | 10,06 |
| HDV-1-II | 86,73 | 85,04 | 90,63 | 89,05 | 89,34 | 89,73 | 94,21 | 10,02 |
| HDV-1-III | 86,97 | 84,73 | 90,21 | 87,98 | 88,98 | 89,94 | 89,98 | 97,09 |

¹Intrasubtypische Übereinstimmung (dunkelorange), intersubtypische Übereinstimmung (orange) und intersubtypische Variabilität (hellorange) der HDV-1 Subtypen 1a bis 1e und der potenziellen HDV-1 Subtypen 1-I bis 1-III wurden paarweise berechnet. In der Tabelle sind arithmetische Mittelwerte in Prozent angegeben.

Insgesamt konnten durch phylogenetische Analysen von 157 mongolischen Deltavirusisolaten drei potenzielle neue HDV-1 Subtypen (1-I bis 1-III) identifiziert werden mit einer intrasubtypischen Übereinstimmung von $\leq 97,09$ % und einer intersubtypischen Variabilität von $\leq 10,27$ %.

HDV-Genotypen 1 bis 8 weisen eine große intragenotypische Variabilität auf. Daher beschrieb Karimzadeh et al. [45] eine Einteilung in Subtypen mit einer intersubtypischen Differenz von ≥ 3 % bis < 10 %. Eine ähnliche intersubtypische Variabilität wiesen die drei vor-

her noch nicht beschriebenen Subtypen HDV-1-I bis 1-III auf. Die intrasubtypische Übereinstimmung und intersubtypische Variabilität der potenziellen HDV-1-I bis 1-III Subtypen wurde berechnet als Definitionsmerkmale einer möglichen Klassifikation in Subtypen.

3.3 Häufigkeitsverteilung der HLA-Klasse I-Allele

Über die Häufigkeitsverteilung der HLA-Klasse I-Allele in der Mongolei wurden bisher nur wenige Daten veröffentlicht. Zur Erweiterung der Datenlage wurden HLA-Klasse I-Allelfrequenzen in der HepMongolia-Kohorte berechnet und mit Daten der *Allele Frequency Net Database* verglichen. Dazu wurden HLA-Klasse I-Antigene aus Vollblut molekulargenetisch mittels NGS am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika des UKD bestimmt. Die Allelfrequenzen wurden aus der totalen Kopienzahl der Allele in der Kohorte berechnet (Allele/2x Anzahl der Probanden). Die Allelfrequenzen sind wie in der *Allele Frequency Net Database* [101] in Dezimalzahlen angegeben, um einen Vergleich mit den Daten aus der Mongolei durchzuführen. Die Analyse der *Allele Frequency Net Database* repräsentiert die durch bisher durchgeführte Studien bekannte Verteilung von HLA-Klasse I-Allelen in der Mongolei. Von insgesamt 132 mongolischen Deltavirusisolaten konnten HLA-Klasse I-Antigene erfolgreich bestimmt werden. Die HLA-A-Allelfrequenzen der HepMongolia-Kohorte sind in Abb. 3.11 und die HLA-B-Allelfrequenzen der HepMongilai-Kohorte in Abb. 3.12 dargestellt. HLA B*49 und HLA B*67 wurden in der HepMongolia-Kohorte nur bei jeweils einem Probanden nachgewiesen und wurden aufgrund der geringen Anzahl und dadurch bedingten fehlenden Aussagekraft nicht in der Allelfrequenz-Analyse berücksichtigt. Daher sind HLA B*49 und HLA B*67 in Abb. 3.11 und Abb. 3.12 nicht aufgeführt. Zudem wurden HLA-Klasse I-Allelfrequenzen aus den sieben mongolischen Populationen „Buryat“ [102], „Khalkha“ [103], „Khalkha pop2“ [104], „Oold“ [105], „Tarialan Khoton“ [106], „Tsaatan“ [107], „Ulaanbaatar Khalkha“ [108] der *Allele Frequency Net Database* [101] analysiert. Die Ergebnisse der Analyse sind ebenfalls in den oben genannten Abbildungen (Abb. 3.11, Abb. 3.12) dargestellt. Verteilungsunterschiede der HLA-A-Allelfrequenzen von > 10 % wurden bei HLA-A*02-positiven Probanden im Vergleich zu den Populationen „Buryat“, „Tarialan Khoton“ und „Ulaanbaatar Khalkha“ festgestellt (Abb. 3.11). Verteilungsunterschiede der HLA-B-Allelfrequenzen von > 10 % wurden bei HLA-B*38-positiven Probanden im Vergleich zu der Population „Tarialan Khoton“, bei HLA-B*40-positiven Probanden im Vergleich zu der Population „Khalkha pop2“ und bei HLA-B*58-positiven Probanden im Vergleich zu der Population „Tsaatan“ festgestellt (Abb. 3.12).

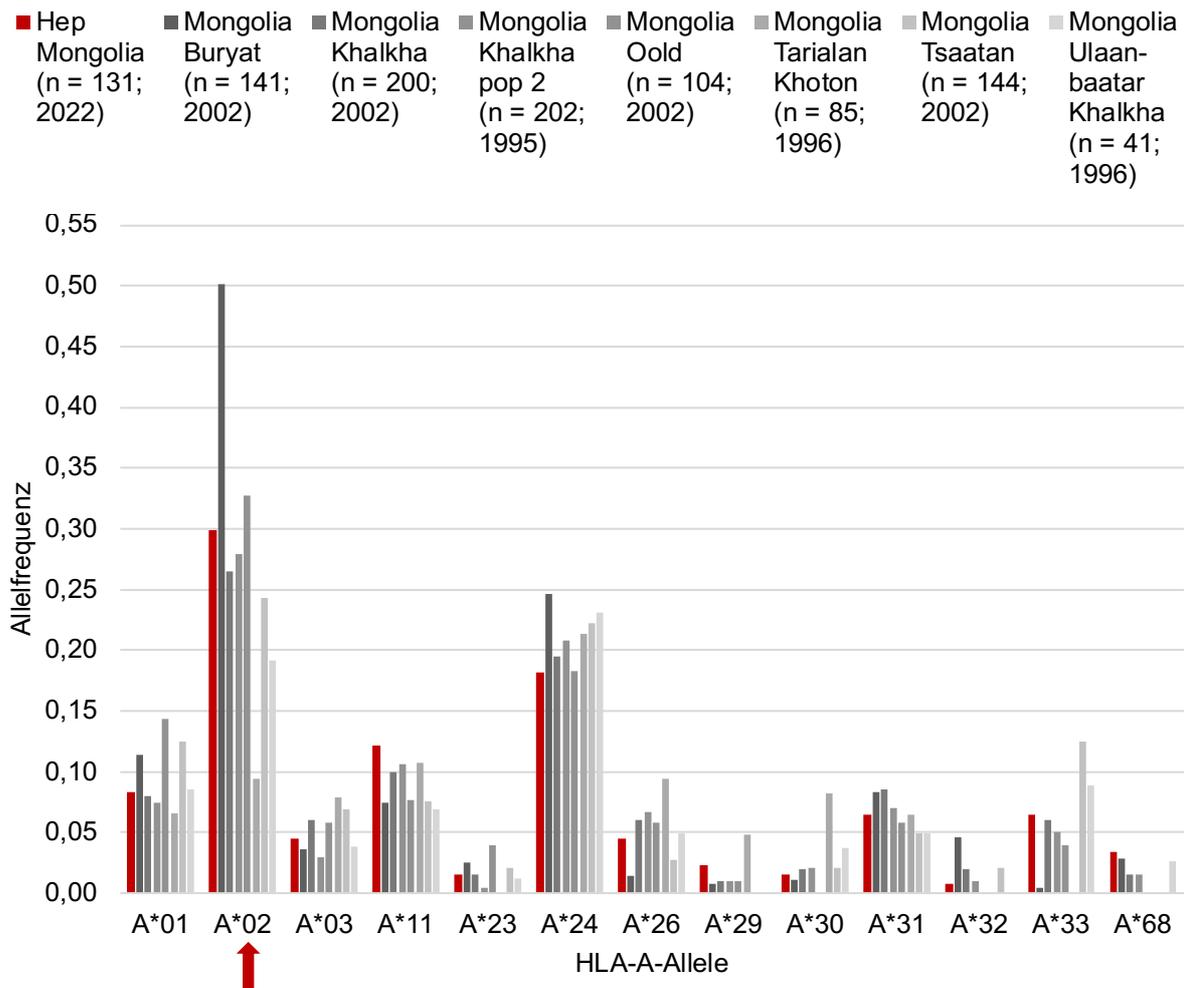


Abb. 3.11: HLA-A-Allelfrequenzen der HepMongolia Kohorte und sieben mongolischer Populationen *der Allele Frequency Net Database*

Die HLA-A-Allelfrequenzen aus sieben mongolischen Populationen [102-108], aufgeführt in der *Allele Frequency Net Database* [101], repräsentieren die bekannte Verteilung von HLA-A-Allelen in der Mongolei (grau). Die HLA-A-Allele von 132 HepMongolia-Sequenzen wurden am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika des Universitätsklinikums Düsseldorf mittels *Next Generation Sequencing* bestimmt und die Frequenz der einzelnen HLA-Klasse I-Allele (rot) berechnet. Alle aufgeführten Allelfrequenzen sind in Dezimalzahlen angegeben und berechnet aus der totalen Kopienzahl der Allele in der Population ($\text{Allele}/2 \times \text{Anzahl der Probanden}$). Mit rotem Pfeil wurden HLA-A-Allele mit einem Verteilungsunterschied von $> 10\%$ zur HepMongolia-Kohorte markiert.

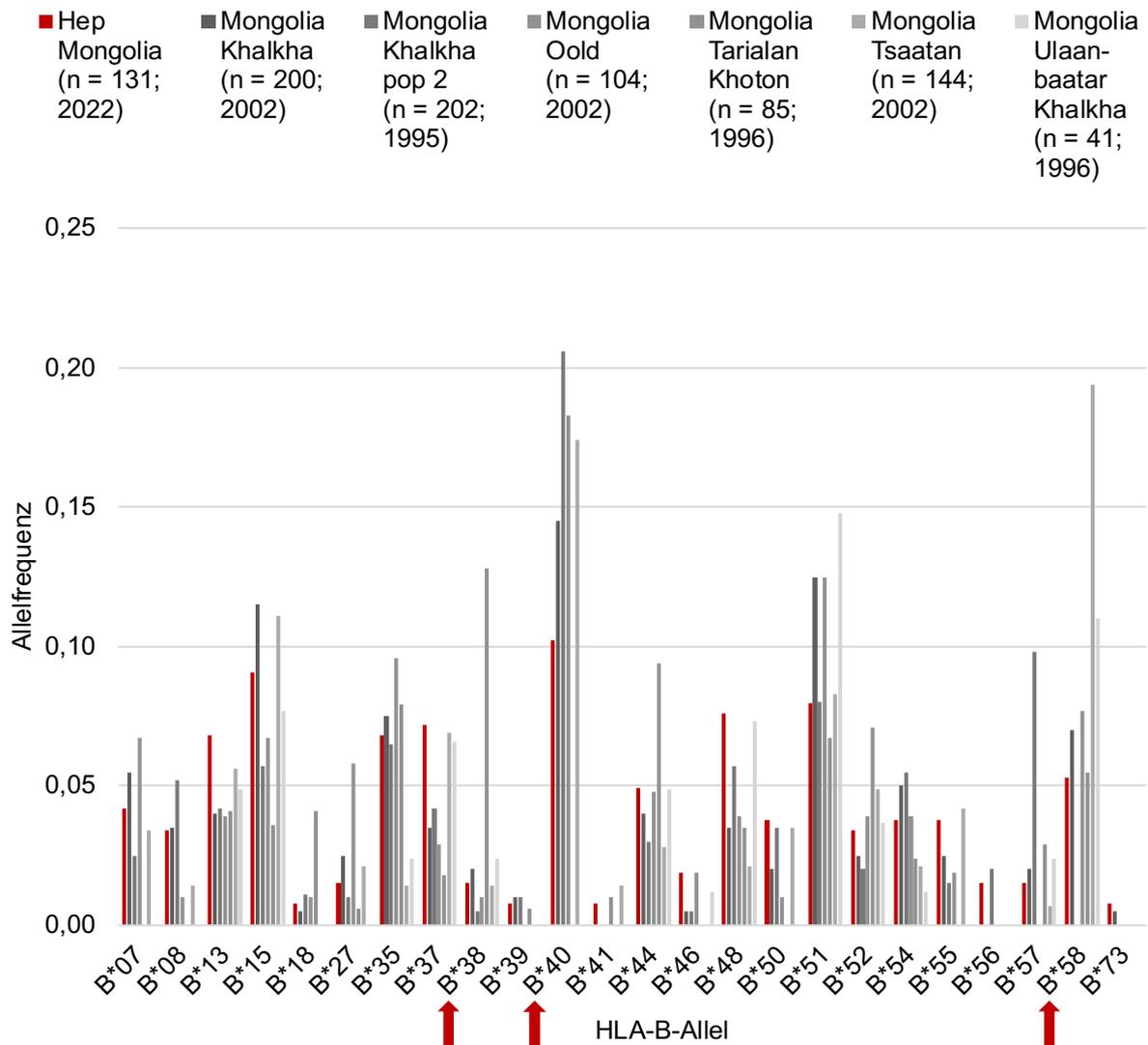


Abb. 3.12: HLA-B-Allelfrequenzen der HepMongolia Kohorte und sieben mongolischer Populationen der *Allele Frequency Net Database*

Die HLA-B-Allelfrequenzen aus sieben mongolischen Populationen [102-108], aufgeführt in der *Allele Frequency Net Database* [101], repräsentieren die bekannte Verteilung von HLA-B-Allelen in der Mongolei (grau). Die HLA-A-Allele von 132 HepMongolia-Sequenzen wurden am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika des Universitätsklinikums Düsseldorf mittels *Next Generation Sequencing* bestimmt und die Frequenz der einzelnen HLA-Klasse I-Allele (rot) berechnet. Alle aufgeführten Allelfrequenzen sind in Dezimalzahlen angegeben und berechnet aus der totalen Kopienzahl der Allele in der Population ($\text{Allele}/2 \times \text{Anzahl der Probanden}$). Mit rotem Pfeil wurden HLA-B-Allele mit einem Verteilungsunterschied von $> 10\%$ zur HepMongolia-Kohorte markiert.

Die meisten HLA-Allelfrequenzen der HepMongolia-Kohorte zeigen Verteilungsunterschiede von $< 10\%$ zu den HLA-Allelfrequenzen der bereits veröffentlichten mongolischen Daten aus der *Allele Frequency Net Database* auf. Somit bestätigen die Häufigkeitsverteilungen der HLA-Klasse I-Allele der HepMongolia-Kohorte bereits bekannte mongolische Häufigkeitsverteilungen und erweitern die Datenlage zu HLA-Klasse I-Allelfrequenzen in der Mongolei.

3.4 Hinweise auf eine Anpassung an HLA-Klasse I-assoziierten Selektionsdruck

3.4.1 Virale Sequenzpolymorphismen in mongolischen Deltavirusisolaten sind assoziiert mit spezifischen HLA-Klasse I-Allelen

Vergangene Studien beobachteten, dass der HLA-Klasse I-assoziierte Selektionsdruck einen Einfluss auf die Evolution von HDV hat [86, 109]. Bisher ist jedoch wenig über die Selektion viraler Sequenzpolymorphismen und das Ausmaß der Immunevasion bekannt. Daher wurde der HLA-Klasse I-assoziierten Selektionsdruck viraler Sequenzpolymorphismen in der HepMongolia-Kohorte analysiert. Dafür wurden virale Sequenzpolymorphismen des S-HDAg auf statistisch signifikante Assoziationen mit HLA-Klasse I-Allelen untersucht. Mit Hilfe von Geneious wurden die nach Sanger sequenzierten mongolischen Deltavirusisolate visualisiert und kuratiert. HLA-Klasse I-Antigene wurden mittels NGS bestimmt. Von insgesamt 132 mongolischen Deltavirusisolaten lagen sowohl Sequenzen des S-HDAg als auch HLA-Klasse I-Antigene vor. Um HLA-*footprints* zu identifizieren, wurde eine Analyse mit dem Algorithmus *SeqFeatR* durchgeführt. Der Begriff HLA-*footprints* bezeichnet Sequenzpolymorphismen, die in Präsenz von bestimmten HLA-Klasse I-Allelen signifikant häufiger vorkommen [110]. Als Grenzwert der statistischen Analysen wurde ein p -Wert $\leq 0,05$ festgelegt. Zusätzlich zum p -Wert wurde die *FDR* zur Korrektur multipler Testungen bestimmt und ein Grenzwert von $\leq 0,2$ festgelegt. Diese Grenzwerte wurden in ähnlichen Studien zu HIV [111] und HBV etabliert [78] und in unserer Arbeitsgruppe für Auswertungen einer vergleichbaren Studie zu HBV bereits erfolgreich angewendet [112]. Die *SeqFeatR*-Analyse detektierte zwölf HLA-*footprints* innerhalb des S-HDAg. Die Hälfte (sechs von zwölf) der signifikanten Sequenzpolymorphismen waren assoziiert mit HLA-A-Allelen, die andere Hälfte (sechs von zwölf) mit HLA-B-Allelen (Tabelle 12).

Tabelle 12: Signifikante Assoziation viraler Sequenzpolymorphismen mit HLA-Klasse I-Allelen

| Nummer | HLA-Allel | AS ¹ -Position | Sequenz-Polymorphismus ² | p-Wert ³ | FDR ⁴ |
|--------|-------------------|---------------------------|-------------------------------------|---------------------|------------------|
| 1 | B*37 ⁵ | 101 | D101 E , E/D | 2,59E-09 | 1,46E-06 |
| 2 | A*33 | 83 | S83 A , T, P/S, A/S, S/F | 3,23E-05 | 6,08E-03 |
| 3 | A*33 | 15 | E15 D , Q | 1,56E-05 | 6,08E-03 |
| 4 | B*54 | 49 | P49 L , S, P/L | 8,97E-05 | 5,07E-02 |
| 5 | A*68 | 81 | V81 I | 1,16E-04 | 6,55E-02 |
| 6 | A*33 | 16 | V16 I , A, T | 5,87E-04 | 8,29E-02 |
| 7 | B*37 | 100 | Q100 E | 4,83E-04 | 9,10E-02 |
| 8 | B*48 | 25 | K25 R | 1,93E-04 | 1,09E-01 |
| 9 | A*02 | 15 | E15 D | 3,54E-04 | 1,31E-01 |
| 10 | B*48 | 128 | E128 E/G | 6,97E-04 | 1,31E-01 |
| 11 | B*48 | 8 | K8 R | 1,35E-03 | 1,91E-01 |
| 12 | A*30 | 102 | H102 H/Y, H/P | 6,94E-04 | 1,96E-01 |

¹Aminosäure, ²unter Sequenzpolymorphismus sind Aminosäuren (AS) in international gültigen Symbolen (Buchstaben) angegeben. AS-Ambiguitäten (Mehrdeutigkeit der DNA-Sequenz) sind mit Schrägstrich dargestellt. In dieser Arbeit am häufigsten vorkommende Aminosäuresubstitutionen sind fett gedruckt. ³p-Wert (Grenzwert $\leq 0,05$), ⁴False Discovery Rate (Grenzwert $< 0,2$), p-Werte und FDR sind als wissenschaftliche Zahl aufgeführt. ⁵Vorher beschrieben von Karimzadeh et al. [87].

Die oben beschriebenen Sequenzpolymorphismen zeigten eine signifikante Assoziation zu sieben verschiedenen HLA-Klasse I-Allelen. Dabei zeigten die HLA-Klasse I-Allele A*33, B*37 und B*48 eine signifikante Assoziation zu mehr als einem Sequenzpolymorphismus auf (Abb. 3.13).

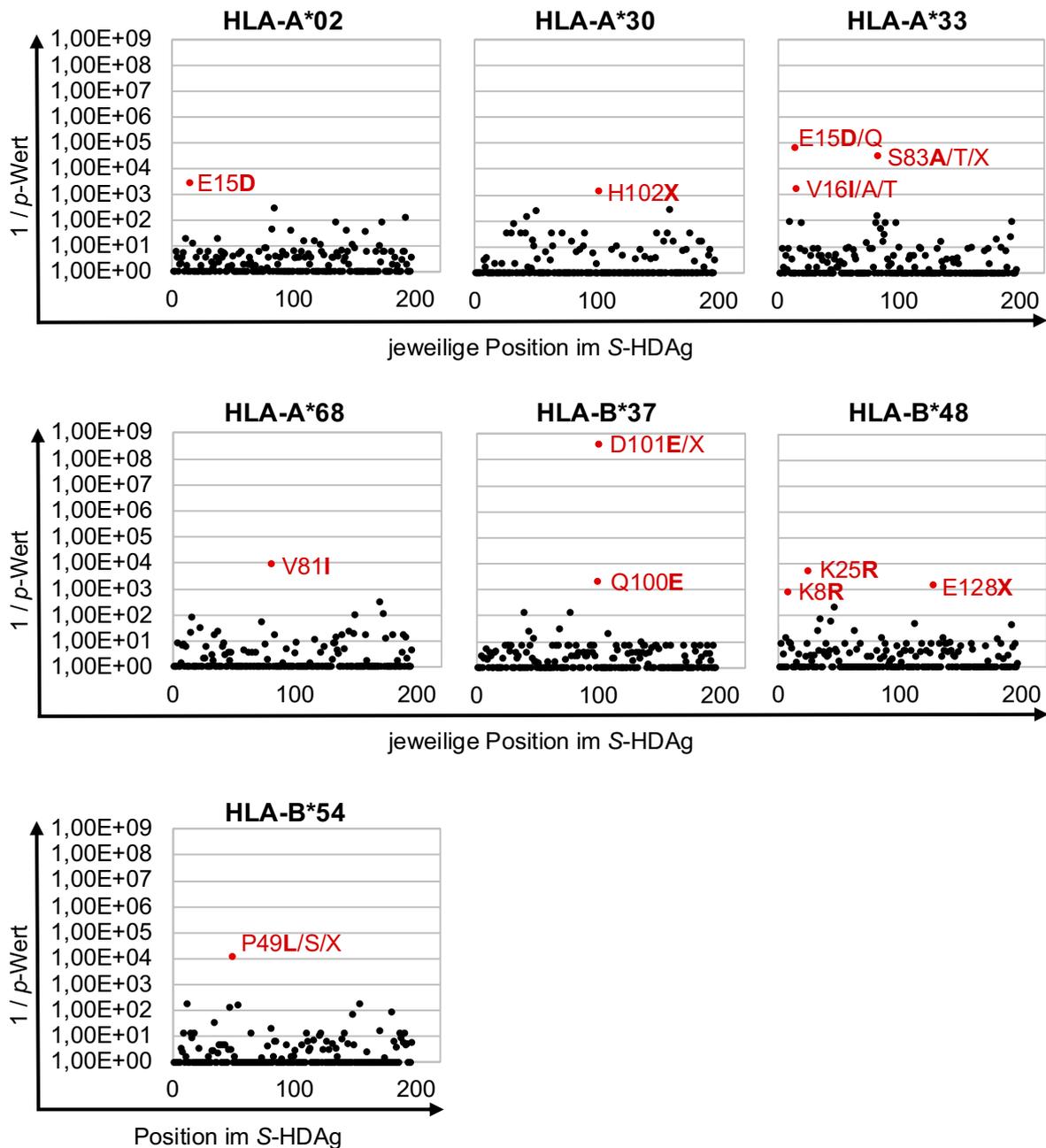


Abb. 3.13: Signifikante Assoziationen zwölf viraler Sequenzpolymorphismen innerhalb des *Small-Hepatitis Delta Antigen* (S-HDAg) mit HLA-Klasse I-Allelen

HLA-Klasse I-Allele von 132 mongolischen Sequenzen des S-HDAg wurden analysiert. Dafür wurden HLA-Klasse I-Antigene molekulargenetisch am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika des Universitätsklinikums Düsseldorf mittels *Next Generation Sequencing* bestimmt. Anschließend wurde eine Analyse mit dem Algorithmus *SeqFeatR* durchgeführt. Der p -Wert $\leq 0,05$ (rot) wurde als statistisch signifikanter Grenzwert festgelegt. Dargestellt sind alle $1/p$ -Werte (Ordinate), angegeben in wissenschaftlichen Zahlen. Auf der Abszisse ist die jeweilige Position im S-HDAg angegeben. Die Analyse basiert auf einem Konsensus-*Alignment* (Konsensussequenz) generiert aus 132 HepMongolia-Sequenzen mit dem Programm Geneious. Virale Sequenzpolymorphismen sind mit Abkürzung der Aminosäure (AS) in international gültigen Symbolen (Buchstaben) der Konsensussequenz, der Position im S-HDAg und Abkürzung der AS abweichend von der Konsensussequenz (rot) dargestellt. X steht für AS-Ambiguitäten (Mehrdeutigkeit der DNA-Sequenz). Signifikante Assoziationen zwölf viraler Sequenzpolymorphismen mit HLA-Allelen (rot).

Folglich wurde eine statistisch signifikante Assoziation zwischen viralen Sequenzpolymorphismen und HLA-Klasse I-Allelen an zwölf Positionen und mit sieben verschiedenen Allelen identifiziert.

3.4.2 HLA-*footprints* liegen überwiegend in Bereichen mit dem passenden Bindungsmotiv für das relevante HLA-Klasse I-Molekül

In vorhergehenden Arbeiten wurden HLA-*footprints* in Deltavirusisolaten beschrieben, die bevorzugt in vorhergesagten CD8⁺ T-Zellepitopen lokalisiert waren [86, 87]. Daher wurde als Nächstes geprüft, ob auch hier die identifizierten HLA-*footprints* der HepMongolia-Kohorte bevorzugt in Bereichen liegen, die ein Bindungsmotiv für das relevante HLA Klasse I-Molekül enthalten. Dafür wurde über das Web Portal der *IEDB* [99] *in silico* für HLA-*footprint* aufweisende Positionen geprüft, ob entsprechende Bindungsmotive für das relevante HLA Klasse I-Molekül vorliegen, die als mögliche Kandidatenepitope in Frage kommen. Dazu wurde aus 132 mongolischen, das S-HDAg abdeckenden Sequenzen, eine Konsensussequenz generiert. Die Konsensussequenz und die sieben HLA-Klasse I-Allele HLA-A*02, A*30, A*33, A*68, B*37, B*48 und B*54 wurden mittels *IEDB recommended 2020.09 (NetMHCpan EL 4.1)*-Methode ausgewertet zur Vorhersage von Peptiden, die an MHC-Klasse-I-Molekülen binden. Die Peptide wurden nach *Predicted IC50* sortiert. HLA-*footprint* aufweisende Peptide mit der höchsten Affinität zum MHC-Klasse-I-Molekül (höchster *Score*) wurden ausgewählt. Basierend auf vorangegangenen Publikationen [113, 114] und einer vergleichbaren Studie unserer Arbeitsgruppe zu HBV [112] wurde ein *IEDB*-Ergebnis von ≤ 1 als hohe Affinität von Peptid und entsprechendem HLA-Molekül eingestuft.

Für die zwölf HLA-*footprints* konnten insgesamt elf Peptide als mögliche CD8⁺ T-Zell-Kandidatenepitope vorhergesagt werden mit einem *IEDB-Score* von $\leq 0,8$ und $\geq 0,002$ (Tabelle 13).

Tabelle 13: Virale Sequenzpolymorphismen assoziiert mit HLA-Klasse I-Allelen und lokalisiert in Peptiden, die an MHC-Klasse-I-Molekülen binden

| Nummer | HLA-Allel | Sequenz-Polymorphismus ¹ | IEDB ² | AS ³ -Bereich | Score ⁴ |
|--------|-------------------|-------------------------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------|
| 1 | B*37 ⁵ | D101 E , E/D | Q D HRRRKAL | 100 - 108 | 0,129878 |
| 2 | A*33 | S83 A , T, P/S, A/S, S/F | EV D S G PRKR | 80 - 88 | 0,556409 |
| 3 | A*33 | E15 D , Q | E VLEQWVNGR | 15 - 24 | 0,644931 |
| 4 | B*54 | P49 L , S, P/L | ng ⁶ | ng ⁶ | ng ⁶ |
| 5 | A*68 | V81 I | E VDSGPRKR | 80 - 88 | 0,842877 |
| 6 | A*33 | V16 I , A, T | E VLEQWVNGR | 15 - 24 | 0,644931 |
| 7 | B*37 | Q100 E | Q DHRRRKAL | 100 - 108 | 0,129878 |
| 8 | B*48 | K25 R | K KLEELERDL | 25 - 34 | 0,023465 |
| 9 | A*02 | E15 D | GR E E V LEQW | 12 - 20 | 0,002356 |
| 10 | B*48 | E128 E/G | RE E E E ELKRL | 124 - 133 | 0,018859 |
| 11 | B*48 | K8 R | K KNRGGREEVL | 7 - 17 | 0,016605 |
| 12 | A*30 | H102 H/Y, H/P | R Q D H RRRK | 99 - 106 | 0,061858 |

¹Unter Sequenzpolymorphismus sind Aminosäuren (AS) in international gültigen Symbolen (Buchstaben) angegeben. Am häufigsten vorkommende AS sind fett gedruckt. AS-Ambiguitäten (Mehrdeutigkeit der DNA-Sequenz) sind mit Schrägstrich dargestellt. ²Immune Epitope Database, unter IEDB sind Positionen der viralen Sequenzpolymorphismen unterstrichen und fett gedruckt. ³Aminosäure, ⁴die IEDB [99] gibt für jedes Peptid (CD8⁺ T-Zellepitop) einen Score zwischen null und eins an. Je höher der Score, desto höher ist die Affinität des Peptids und entsprechenden HLA-Molekül. ⁵Vorher beschrieben von Karimzadeh et al. [87], ⁶nicht gefunden (IEDB ohne Vorhersage eines korrelierenden Peptids).

Die stärkste Assoziation wurde an Position 101 des S-HDAg bei HLA-B*37-positiven HDV-infizierten Probanden mit einem p -Wert von $2,59 \times 10^{-9}$ und einer FDR von $1,46 \times 10^{-6}$ identifiziert. Diese Assoziation wurde bereits von Karimzadeh et al. [87] beschrieben. Dabei wiesen 66,67 % der HLA-B*37-positiven HDV-infizierten Probanden die AS-Substitution Asparaginsäure (D) zu Glutaminsäure (E) an dieser Position auf. Bei einem von 18 HLA-B*37-positiven HDV-infizierten Probanden wurde eine Mehrdeutigkeit der DNA-Sequenz und somit der AS (AS-Ambiguität) festgestellt. Die AS-Ambiguität umfasst die Aminosäuren Asparaginsäure (D) und Glutaminsäure (E) und wurde hier als Substitution und somit als Glutaminsäure (E) gewertet. Zudem wiesen HLA-B*37-positive HDV-infizierte Probanden im gleichen Peptid an Position 100 einen statistisch signifikanten Sequenzpolymorphismus mit einem p -Wert von $4,83 \times 10^{-4}$ und einer FDR von $9,10 \times 10^{-1}$ auf. Bei 44,44 % der HLA-B*37-positiven HDV-infizierten Probanden wurde die Substitution der AS Glutamin (Q) zu Glutaminsäure (E) nachgewiesen (Abb. 3.14).

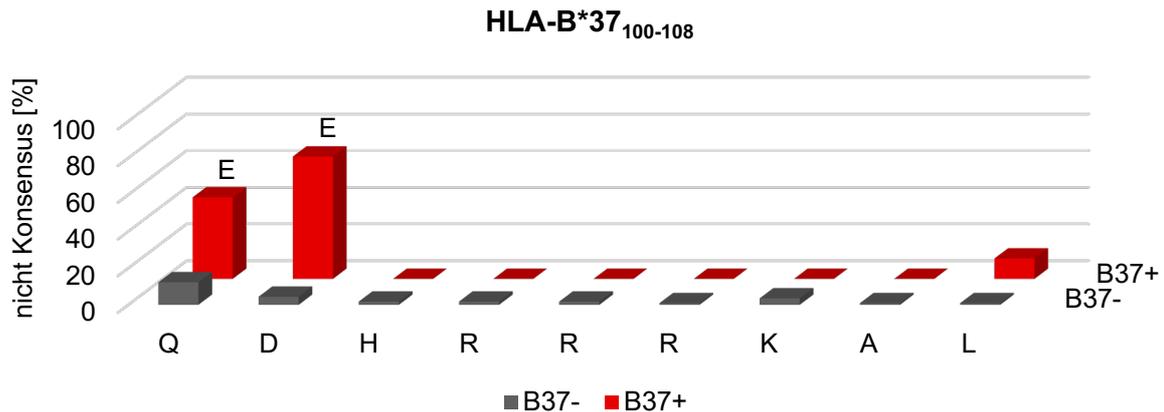


Abb. 3.14: Häufigkeit viraler Sequenzpolymorphismen in einem an *MHC*-Klasse-I-Moleküle bindenden Peptid HLA-B*37-positiver Probanden

Mit dem Algorithmus *SeqFeatR* wurden signifikante Assoziationen viraler Sequenzpolymorphismen in 132 HepMongolia-Sequenzen mit bekannten HLA-Klasse I-Allelen (*HLA-footprints*) analysiert. Die Analyse basiert auf einer Konsensussequenz der 132 HepMongolia-Sequenzen erstellt mit dem Programm Geneious. Mittels *Immune Epitope Database (IEDB)* [99] wurden *HLA-footprint* aufweisende Peptide, die an *MHC*-Klasse-I-Moleküle binden, vorhergesagt. Die Aminosäure (AS)-Sequenzen des Peptids ist hier in international gültigen AS-Symbolen (Buchstaben) auf der Abszisse aufgeführt. Vorhergesagtes Peptid ist innerhalb des S-Hepatitis Delta Antigen (S-HDAg) lokalisiert. Die Analyse ergab, dass HLA-B*37-positive Probanden (rot) im Vergleich zu HLA-B*37-negativen Probanden (grau) signifikante Sequenzpolymorphismen an den Positionen 100 und 101 aufweisen. Der Anteil der nicht der Konsensussequenz entsprechenden Proben (nicht Konsensus) ist hier in Prozent angegeben. Das Peptid erstreckt sich von Position 100 bis 108. An den Positionen 100 und 101 sind oberhalb der Balken zusätzlich die viralen Sequenzpolymorphismen (AS-Substitutionen) HLA-B*37-positiver Probanden angegeben.

Bisher nicht zuvor identifizierte *HLA-footprints* mit einer ebenfalls hohen statistischen Signifikanz werden im Folgenden beispielhaft anhand der HLA-Klasse I-Allele A*33 und B*68 beschrieben. Bei HLA-A*33-positiven HDV-infizierten Probanden wurden statistisch signifikante Assoziationen zu zwei Sequenzpolymorphismen nachgewiesen. Diese waren innerhalb des Peptids mit der AS-Abfolge EVLEQWVNGR (Position 15 bis 24 des S-HDAg) lokalisiert. Für den Sequenzpolymorphismus E15D/Q wurde ein p -Wert von $1,56 \times 10^{-5}$ und eine FDR von $6,08 \times 10^{-3}$ berechnet. Dabei zeigten 53,33 % der HLA-A*33-positiven HDV-infizierten Probanden eine AS-Substitution an Position 15 des S-HDAg auf. Am häufigsten war die AS-Substitution Glutaminsäure (E) zu Asparginsäure (D) (Abb. 3.15). Für den Sequenzpolymorphismus V16I/A/T wurde ein p -Wert von $5,87 \times 10^{-4}$ und eine FDR von $8,29 \times 10^{-2}$ berechnet. Dabei zeigten 60,00 % der HLA-A*33-positiven HDV-infizierten Probanden eine AS-Substitution an Position 16 des S-HDAg auf. Am häufigsten war die AS-Substitution Valin (V) zu Isoleucin (I) (Abb. 3.15).

HLA-B*68-positive HDV-infizierte Probanden zeigten eine statistisch signifikante Assoziation zum Sequenzpolymorphismen V81I. Dieser war innerhalb des Peptids mit der AS-Abfolge EVDSGPRKR (Position 80 bis 88 des S-HDAg) lokalisiert. Die statistische Berechnung ergab einen p -Wert von $1,16 \times 10^{-4}$ und eine FDR von $6,55 \times 10^{-2}$. Dabei zeigten

87,50 % der HLA-A*68-positiven HDV-infizierten Probanden die Substitution der AS Valin (V) zu Isoleucin (I) an Position 81 des S-HDAg auf (Abb. 3.15).

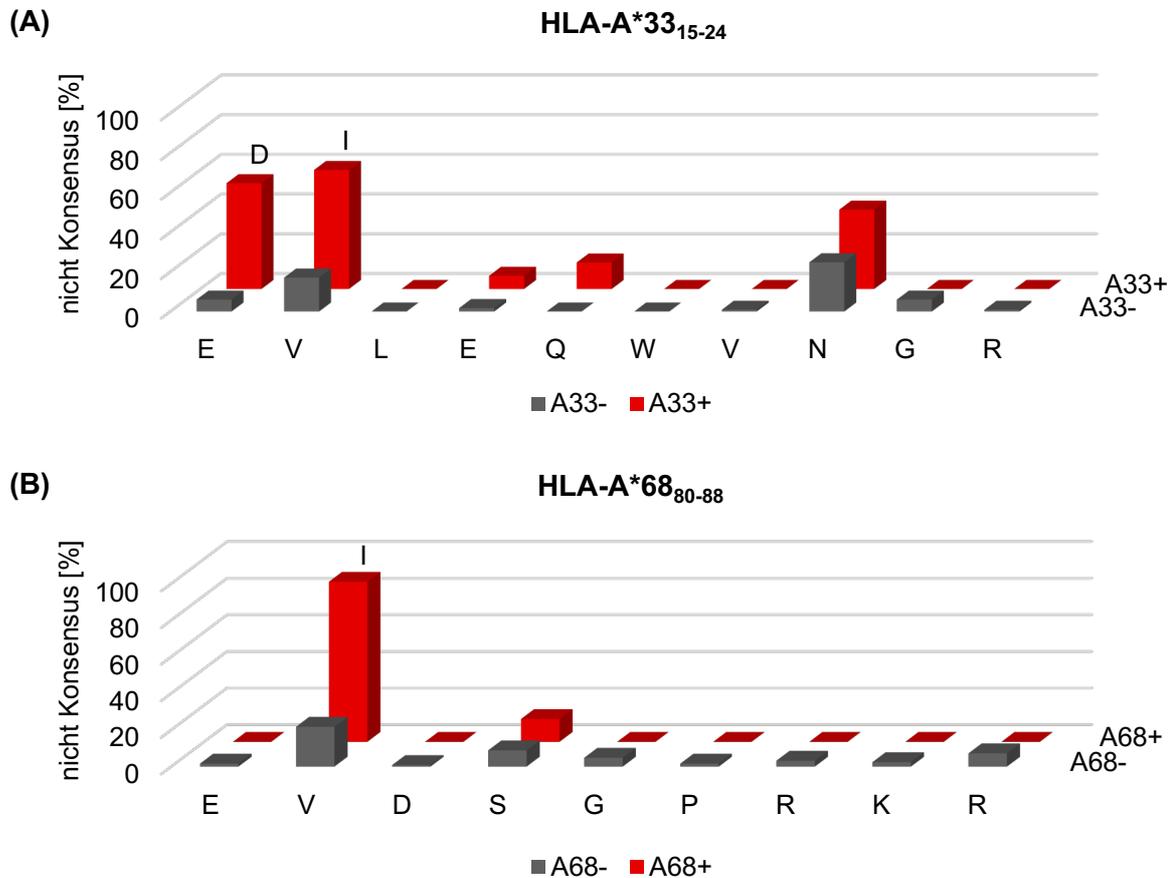


Abb. 3.15: Signifikante virale Sequenzpolymorphismen in zwei an MHC-Klasse-I-Moleküle bindenden Peptide HLA-A*33- und A*68-positiver Probanden

Mit dem Algorithmus *SeqFeatR* wurden signifikante Assoziationen viraler Sequenzpolymorphismen von 132 HepMongolia-Sequenzen mit bekannten HLA-Klasse I-Allelen (*HLA-footprints*) analysiert. Die Analyse basiert auf einer Konsensussequenz der 132 HepMongolia-Sequenzen erstellt mit dem Programm Geneious. Der Anteil der nicht der Konsensussequenz entsprechenden Proben (nicht Konsensus) ist hier in Prozent angegeben. Mittels *Immune Epitope Database (IEDB)* [99] wurden *HLA-footprint* aufweisende Peptide, die an MHC-Klasse-I-Moleküle binden, vorhergesagt. Die Aminosäure (AS)-Sequenzen der Peptide sind hier in international gültigen AS-Symbolen (Buchstaben) auf der Abszisse aufgeführt. Vorhergesagte Peptide sind innerhalb des *Small-Hepatitis Delta Antigen (S-HDAg)* lokalisiert. **(A)** HLA-A*33-positive Probanden (rot) weisen im Vergleich zu HLA-A*33-negativen Probanden (grau) signifikante Sequenzpolymorphismen an den Positionen 15 und 16 auf. Diese liegen innerhalb des sich von Position 15 bis 24 erstreckenden Peptids. An den Positionen 15 und 16 sind oberhalb der Balken zusätzlich die häufigsten viralen Sequenzpolymorphismen (AS-Substitutionen) HLA-A*33-positiver Probanden angegeben. **(B)** HLA-A*68-positive Probanden (rot) weisen im Vergleich zu HLA-A*68-negativen Probanden (grau) einen signifikanten Sequenzpolymorphismus an Position 81 auf. Dieser liegt innerhalb des sich von Position 80 bis 88 erstreckenden Peptids. An Position 81 ist oberhalb des Balkens zusätzlich der virale Sequenzpolymorphismus (AS-Substitution) HLA-B*68-positiver Probanden angegeben.

Elf von zwölf HLA-*footprint* aufweisende Positionen lagen innerhalb von Peptiden, die an MHC-Klasse-I-Moleküle binden. Einer dieser HLA-*footprints* wurde bereits in einer vorherigen Studie beschrieben [87]. Somit finden sich HLA-*footprints* an elf Positionen als Evidenz für eine virale Evasion von der HLA-Klasse I-spezifischen Immunantwort, von denen zehn auf mögliche neue, bisher noch nicht experimentell bestätigte, CD8⁺ T-Zellepitope hinweisen (Tabelle 13).

Oben beschriebene HLA-*footprint* aufweisende Peptide waren innerhalb der ersten zwei Drittel des S-HDAg lokalisiert (von Position acht bis 128), kein HLA-*footprint* war im letzten Drittel des S-HDAg lokalisiert. Somit sparen sie den C-Terminus des HDAg aus (Abb. 3.16).

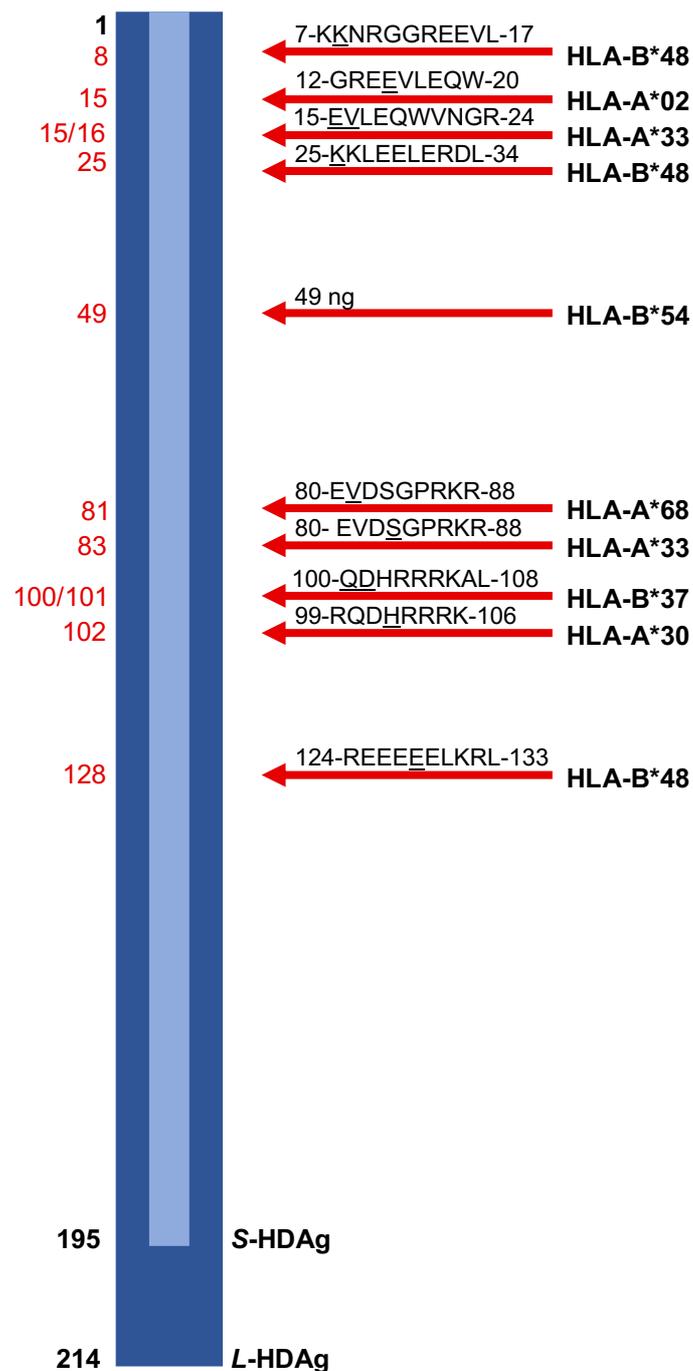


Abb. 3.16: Virale Sequenzpolymorphismen sparen das hintere Drittel des Small-Hepatitis Delta Antigen (S-HDAg) aus

Verteilung identifizierter HLA-footprints im Hepatitis Delta Antigen (HDAg). Das HDAg ist in das Large-HDAg (L-HDAg, dunkelblau) und Small-HDAg (S-HDAg, hellblau) aufgeteilt ist. Peptide, die an MHC-Klasse-I-Moleküle binden, wurden mittels *Immune Epitope Database (IEDB)* [99] vorhergesagt. Mit rotem Pfeil markiert sind HLA-footprints, die innerhalb dieser Peptide lokalisiert sind. Die Aminosäure (AS-)sequenz der vorhergesagten Peptide ist über dem zugehörigen Pfeil hier in international gültigen AS-Symbolen (Buchstaben) aufgeführt. Unterstrichen sind die Positionen der Sequenzpolymorphismen. „ng“ steht für nicht gefunden, da die *IEDB* kein Peptid für das HLA-B*54-Allel vorhersagen konnte.

4 Diskussion

Die kontinuierliche Anpassung chronischer Virusinfektionen an einen HLA-Klasse I-assoziierten Selektionsdruck wurde bereits für HIV [80-82], HCV und HBV [72, 78, 112, 115] beschrieben. Eine virale Evasion vor der adaptiven Immunantwort durch Selektion von Deltavirus-Sequenzpolymorphismen in CD8⁺ T-Zellepitopen könnte ebenfalls zu einer viralen Persistenz führen. HLA-Klasse I-assoziierte Deltavirus-Sequenzpolymorphismen wurden sowohl in einer internationalen, kollaborativen Patientenkohorte [86, 87] identifiziert als auch funktionell in Zielepitopen der CD8⁺ T-Zell-Antworten [86, 87, 109, 116] charakterisiert. In zwei zu dieser Arbeit vergleichbaren Studien von Karimzadeh et al. aus dem Jahr 2018 [86] und 2019 [87] wurden bereits 21 HLA-*footprints* für HDV identifiziert. Davon wurden fünf korrespondierende CD8⁺ T-Zellepitope durch die Erkennung von peptid-stimulierten CD8⁺ T-Zelllinien experimentell bestätigt [87]. Um das Ausmaß der Evasion vor dem adaptiven Immunsystem weiterführend zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit Deltavirus-Sequenzpolymorphismen in Assoziation zum HLA-Typ des Wirtes in einer mongolischen Patientenkohorte (n = 1310) charakterisiert. Die Analysen dieser Arbeit zeigten, dass ein HLA-Klasse I-Selektionsdruck zur Verbreitung von Deltavirus-Sequenzpolymorphismen in der Mongolei führt. Zehn noch nicht zuvor beschriebene HLA-*footprints* stärken die Evidenz für eine Evasion vor der HLA-Klasse I-spezifischen Immunantwort.

4.1 Persistierend hohe HDV-Prävalenz trotz Einführung von HBV-Impfprogrammen

Die Mongolei weist eine hohe HBV- und HDV-Prävalenz auf. Nationale Studien beschrieben eine HBsAg-Prävalenz von 10 % [117] bis 10,6 % [37]. Die HDV-Prävalenz von zuvor HBsAg-positiv Getesteter betrug in mehreren mongolischen Studien zwischen 36,9 % und 61 % [7, 19, 38]. Die Stichprobengröße der bisher durchgeführten Studien war mit < 500 Probanden gering [7]. Aus diesem Grund wurde für die Analysen dieser Arbeit eine große mongolische Patientenkohorte mit 1310 Probanden etabliert. In der HepMongolia-Kohorte betrug die HBsAg-Prävalenz 32,98 %. Davon wurden 64,35 % anti-HDV positiv getestet. Im Vergleich zu früheren Studien über die mongolische Allgemeinbevölkerung wurde in der HepMongolia-Kohorte eine höhere Prävalenz sowohl an HBsAg-positiv Getesteter als auch an HBV/HDV Co-Infektionen festgestellt. Eine mögliche Erklärung ist die Art der Probenrekrutierung der HepMongolia-Kohorte, da überwiegend Serumproben von Probanden mit selbst-berichteten Lebererkrankungen gesammelt wurden [118]. Bei 76,62 % der

anti-HDV-positiven Probanden konnte HDV-RNA detektiert werden. Vergleichbare Ergebnisse mit einer HDV-RNA-Detektionsrate von 65,6 % [119] und 74,4 % [120] wurden in Studien mit Hepatitis-Hochrisikogruppen beschrieben.

Trotz Einführung der HBV-Impfprogramme 1991 [70] persistieren HBV-/HDV-Infektionen in der jüngeren Bevölkerung der Mongolei. Edstam et al. [121] beobachteten 2002 inkomplette HBV-Impfserien häufiger bei Kindern aus ländlichen Regionen als bei Kindern aus urbanen Regionen. Interessanterweise war die HBsAg-Prävalenz der Kinder aus dem *Aimag* Bayanhongor mit 40 % unerwartet hoch trotz implementierter HBV-Impfprogrammen. Darüber hinaus berichteten Edstam et al. von einer nicht publizierte Studie (Dahgwahdorj et al., 1999), die im *Aimag* Umnugovi eine HBsAg-Prävalenz von 16 % bei Kindern im Alter zwischen null und acht Jahren feststellte [121]. Tsatsralt-Od et al. [19] beschrieben 2007, dass trotz einer hohen HBV-Impfrate von 88,7 % bei 9,8 % der getesteten Kinder im Alter von 0,3 Jahren bis 15 Jahren HBsAg und oder HBV-DNA nachgewiesen wurde. Von den Kindern mit persistierender HBV-Infektion zeigten 20 % eine HDV-Infektion auf. Die Altersgruppe der 11- bis 15-Jährigen wies mit 29,5 % den höchsten Anteil an nicht HBV-Immunierten im Vergleich zu den jüngeren Altersgruppen (4 Monate bis 10 Jahre) auf [19]. Übereinstimmend mit den Beobachtungen von Edstam et al. [121] und Tsatsralt-Od et al. [19] zeigte sich in der HepMongolia-Kohorte eine niedrige HBV-Durchimpfungsrate und eine hohe HBV-/HDV-Infektionsrate, auch bei jungen mongolischen Probanden. Die Proben der HepMongolia-Kohorte stammen hauptsächlich aus ländlichen mongolischen Regionen mit einer Rate an geimpften Probanden von 30 % innerhalb der HbsAg-nicht-reaktiv Getesteten. Eine höhere Rate von 44 % zeigte die serologische Konstellation einer durchgemachten HBV-Infektion und eine niedrigere Rate von 27 % zeigte keinen serologisch nachweisbaren HBV-Kontakt. Das mediane Alter der anti-HDV-positiven Probanden betrug 46 Jahre mit einer Bandbreite von 21 bis 86 Jahren. Davon wiesen 26,62 % der anti-HDV-positiven Probanden ein Alter unter 40 Jahren auf. Somit scheinen HBV-/HDV-Infektionen in der jüngeren Bevölkerung der Mongolei zu persistieren mit einer unzureichenden Durchimpfungsrate. Mögliche Gründe für eine unzureichende Durchimpfungsrate, insbesondere in ländlichen Regionen, beschrieben Edstam et al. [121] unter Bezugnahme auf einen WHO-Bericht von 1999. Aufgrund fehlender Infrastruktur, großer Entfernungen, mangelnder Kommunikation, ökonomischer Unterschiede und geringer Bevölkerungsdichte ist der Zugang der ländlichen, mongolischen Bevölkerung zu medizinischer Versorgung eingeschränkt [121]. Zudem beschrieb die WHO in einem Bericht von Dezember 2019 [122], dass trotz vielfältiger Veränderungen im Gesundheitssystem immer noch viele Menschen in der Mongolei nicht die medizinische Versorgung erhalten, die sie benötigen. Daher scheinen Gründe für eine inkomplette Impfserie in ländlichen Regionen eine nach wie vor unzureichend ausgebaute

Infrastruktur zu sein, wodurch die Impfung nicht bei den Kindern bzw. zuständigen Gesundheitsinstitutionen ankommen kann. Erschwerend kommt die Nomadenkultur hinzu, bei der ein Ortswechsel dazu führen kann, dass die Impfsérie eines Kindes unterbrochen wird. Die Ergebnisse der HepMongolia-Kohorte zeigen, dass trotz vielfältiger Veränderungen im Gesundheitssystem die HBV-Durchimpfungsrate weiterhin niedrig und die HBV-/HDV-Infektionsrate persistierend hoch ist.

4.2 Hohe Sequenzvariabilität des HDV-Genotyps 1

HCV, ein RNA-Virus mit einer hohen genetischen Diversität wie HDV, wird in acht Genotypen und mehr als 100 Subtypen eingeteilt. HCV-Subtypen unterscheiden sich in ihrer Nukleotidsequenz zwischen 20 % und 25 %. Isolate eines Subtyps können sich in bis zu 10 % unterscheiden [123]. Vergleichbar unterscheiden sich die vorgeschlagenen Subtypen von Karimzadeh et al. [45], HDV-1a bis 1e, und die potenziellen HDV-Subtypen der HepMongolia-Kohorte, *Clade* 1-I bis 1-III, in ihrer Nukleotidsequenz zwischen > 9 % und < 16 %.

Zur Untersuchung der Sequenzvariabilität von HDV in der Mongolei wurden 182 Proben erfolgreich mittels *Semi-nested-PCR* amplifiziert. Bei 31 Proben konnten in der Kapillarelektrophorese bzw. Agarose-Gelelektrophorese keine Amplifikationsprodukte nachgewiesen werden, meist aufgrund einer niedrigen Viruslast oder zu wenig Material für die Extraktion und Amplifikation der Virusisolate. Von insgesamt 157 Sequenzen konnte das S-HDAg erfolgreich sequenziert werden. Bei den restlichen Proben mit nachweisbaren HDV-RNA-Amplifikationsprodukten war die Sequenzierung unvollständig. In den meisten Fällen war der Grund dafür, wie bereits oben beschrieben, eine zu geringe Viruslast in der Probe [118].

Die phylogenetische Analyse ergab eine Zuordnung der gesamten mongolischen Deltavirusisolate zum HDV-Genotyp 1. Studien, in denen HDV-Genotypen in der Mongolei bestimmt wurden, bestätigen dieses Ergebnis [7, 19, 117, 120, 124, 125]. International gültige Definitionskriterien für HDV-Subtypen wurden bisher nicht festgelegt. Da das HDV-Genom, insbesondere HDV-1, eine hohe genetische Diversität aufweist, schlugen Le Gal et al. [44] 2017 eine Subklassifikation von HDV-1 in 4 Subtypen (HDV-1a bis 1d) mit einer intersubtypischen Differenz zwischen 14,6 % und 16 % vor. Eine Folgestudie von Karimzadeh et al. [45] schlug 2019 ebenfalls eine mögliche Subklassifikation von HDV-1 vor und veröffentlichte Referenzsequenzen für fünf potenzielle HDV-1 Subtypen (HDV-1a bis 1e) mit einer intersubtypischen Differenz von ≥ 3 % und < 10 %. Um Deltavirusisolate der HepMongolia-Kohorte ebenfalls in potenzielle Subtypen zu klassifizieren, wurden phylogenetische Analysen mit oben aufgeführten HDV-1a bis 1e klassifizierten Referenzsequenzen von Karim-

zadeh et al. [45] durchgeführt. Die Deltavirusisolate der HepMongolia-Kohorte konnten keinem der HDV-1a bis 1e klassifizierten Subtypen zugeordnet werden. Eine Ausnahme bildet die Sequenz B14 aus dem *Sum Bulgan*, die zum Subtyp HDV-1c zugeordnet werden konnte. Isolate des Subtyps HDV-1c stammen aus Zentral-Asien wie China, Vietnam, Japan und Taiwan [45]. Das Dorf Bulgan liegt in der Provinz Khovd nahe der Grenze zu China. Die geographische Nähe könnte eine Erklärung für die Zuordnung zu HDV-1c sein (Abb. 4.1). Unklar ist jedoch, warum die restlichen Sequenzen aus Bulgan sich über den gesamten Baum verteilen und nicht ebenfalls HDV-1c zugeordnet werden konnten. Weitere Herkunftsinformationen der Probe B14 wie beispielsweise eine mögliche Immigration aus China liegen leider nicht vor.

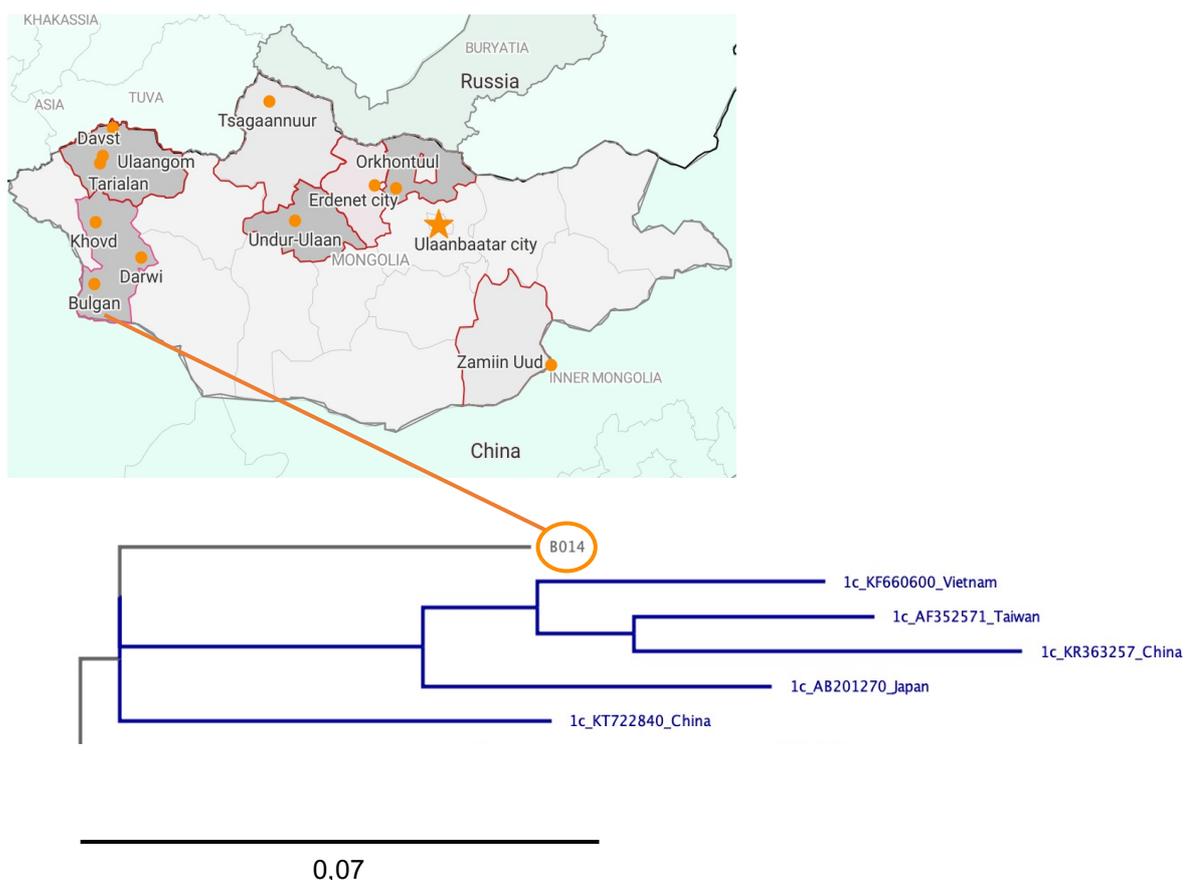


Abb. 4.1: Herkunft der Proben der HepMongolia-Kohorte mit phylogenetischem Baumausschnitt des *Clusters* für den HDV-Subtyp 1c

Die Landkarte mongolischer Provinzen wurde von unserem Kooperationspartner Battur Magvan (*Mongolian National University of Medical Sciences, Ulaanbaatar*) mittels Daten der *Open Street Map* generiert und mit *Datawrapper* auf Englisch visualisiert. Die Herkunftsregionen der Proben der HepMongolia-Kohorte sind rot umrandet und mit orangem Punkt bzw. Stern markiert. Der phylogenetische Baumausschnitt stammt aus der Distanzanalyse zur Klassifikation mongolischer Deltavirusisolate in HDV-Genotyp 1 (HDV-1) Subtypen. Zu diesem Zweck wurde ein *RAxML Tree* basierend auf 157 das *Small-Hepatitis Delta Antigen* abdeckenden mongolischen Deltavirusisolaten, einer HDV-1 klassifizierten Sequenz der *GenBank* [26] (*Accession number* M21012.1, blau) und 25 Sequenzen der Studie von Karimzadeh et al. [45] erstellt. Dargestellt sind Virusisolate des HDV-1 Subtyps 1c (blau) mit Herkunftsangabe. Die mongolische Probe B14 der HepMongolia-Kohorte aus dem Dorf Bulgan (grau) bildet ein *Cluster* mit den HDV-1c Subtypen. Die Legende gibt den Maßstab der genetischen Distanz (0,07) in Substitutionen pro Nukleotidposition (*Substitutions per site*) an.

Zwar ergaben die phylogenetischen Analysen keine Zuordnung zu bereits beschriebenen HDV-1 Subtypen, jedoch konnten drei *Cluster* (*Clade* 1-I bis 1-III) als potenzielle neue Subtypen mit einem *bootstrap*-Wert von ≥ 84 , d.h. einer Konfigurationswahrscheinlichkeit von ≥ 84 %, identifiziert werden. Als Definitionsmerkmal zur Subklassifikation wurde die intersubtypische Differenz berechnet. Für die *Clades* 1-I bis 1-III wurde eine intersubtypische Differenz von $\leq 10,27$ % berechnet, ähnlich der von Karimzadeh et al. [45] für HDV-1 vorgeschlagenen intersubtypischen Differenz.

4.3 Mögliche Prägung der molekularen Epidemiologie durch die mongolische Nomadenkultur mit Evidenz lokaler Transmissionereignisse

Um die molekulare Epidemiologie von HDV in der Mongolei zu untersuchen, wurden phylogenetische Analysen der Deltavirussequenzen in der HepMongolia-Kohorte durchgeführt. Assoziationen von Subtypen zu geographischen Regionen wurden sowohl für HCV [123] als auch für HDV [44, 45] beschrieben. Karimzadeh et al. [45] beschrieben, dass in afrikanischen Subsahara-Regionen hauptsächlich HDV-1a und 1b Subtypen vorkamen, in Zentral-Asien (China, Vietnam, Japan, Taiwan) wurde HDV-1c, in der Türkei und im Iran HDV-1d und in Europa HDV-1e detektiert. In der HepMongolia-Kohorte wurde eine Zuordnung der *Clades* 1-I bis 1-III zu spezifischen, mongolischen Regionen nicht beobachtet. Die Proben eines *Clades* stammten aus verschiedenen mongolischen Regionen. Deltavirussequenzen aus einer Region wie beispielsweise Bulgan waren sowohl im *Clade* 1-I als auch im *Clade* 1-III vertreten. Somit war die Herkunft der potenziellen neuen Subtypen sehr heterogen. Diese Ergebnisse spiegeln die Nomadenkultur und die damit verbundene hohe traditionelle Mobilität in der Mongolei wider. Die Proben aus der HepMongolia-Kohorte stammen hauptsächlich aus ländlichen Regionen. Vor allem in ländlichen, mongolischen Regionen haben Menschen keinen festen Wohnsitz und bleiben nur für kurze Zeit an einem Ort. Der genaue Zeitpunkt von Einführung und Verbreitung von HDV in der Mongolei ist nicht bekannt. Die Einteilung von HDV in *Clades* könnte den Gründereffekt der Einführung und die Verbreitung in der Mongolei erklären. Um die molekulare Epidemiologie von HDV bezüglich des Gründereffekts und der Verbreitung in der Mongolei genauer zu untersuchen, sind jedoch weitere Studien mit größeren Datenbanken erforderlich [118].

Auch wenn keine Evidenz für eine regionale *Clade*-Bildung festgestellt werden konnte, ergaben die phylogenetischen Analysen Evidenz lokaler Übertragungsereignisse in der HepMongolia-Kohorte [118]. Fünf Gruppen von zwei bis drei Deltavirusisolaten aus derselben Herkunftsregion mit jeweils sehr geringer genetischer Distanz zueinander wurden identifiziert. Proben drei dieser Gruppen stammten aus dem *Sum* Bulgan (B2, B3 / B1, B10, B28 / B84, B85), Proben einer Gruppe stammten aus dem *Sum* Darwi (D60, D86) und Proben einer weiteren Gruppe stammten aus dem *Sum* Davst (W9, W10) (Abb. 4.2). Folglich stammten die Proben einer Gruppe aus demselben Dorf. Nahe beieinander liegende Nummern verdeutlichen einen zeitlich und örtlich geringen Abstand der Probenrekutierung beispielsweise innerhalb einer Familie oder eines Haushalts. Somit deuten die fünf Gruppen auf eine direkte oder gemeinsame Übertragung hin. Leider liegen für die HepMongolia-Kohorte keine Informationen zu Kontaktnetzwerken oder möglichen Risikofaktoren einer Übertragung vor [118].

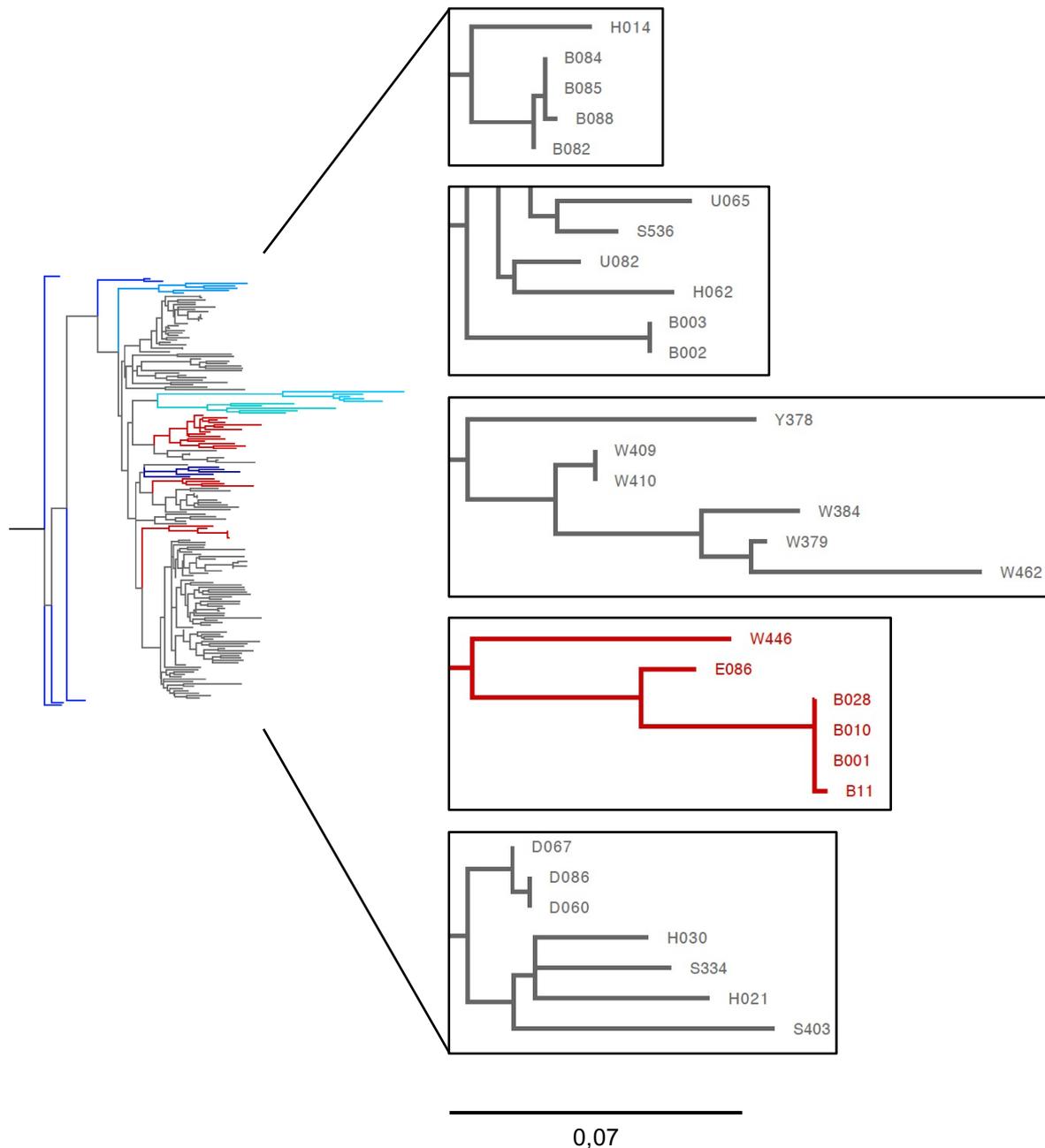


Abb. 4.2: Phylogenetischer Baum der HepMongolia-Sequenzen zur Darstellung lokaler Übertragungsereignisse

Die phylogenetischen Baumausschnitte stammen aus der Distanzanalyse zur Klassifikation mongolischer Deltavirusisolate in HDV-Genotyp 1 (HDV-1) Subtypen. Zu diesem Zweck wurde ein *RAxML Tree* basierend auf 157 das *Small-Hepatitis Delta Antigen* abdeckenden mongolischen Deltavirusisolaten, einer HDV-1 klassifizierten Sequenz der *GenBank* [26] (*Accession number* M21012.1, blau) und 25 Sequenzen der Studie von Karimzadeh et al. [45] erstellt. Die Virusisolate dieser Studie repräsentieren die HDV-1 Subtypen 1a bis 1e (blau) und stammen aus Amerika, Europa, dem Nahen Osten, Ostasien und Afrika. Mongolische Deltavirusisolate (grau) bildeten drei *Clades* 1-I bis 1-III (rot) mit *bootstrap*-Werten ≥ 84 (rot). Die Legende gibt den Maßstab der genetischen Distanz (0,07) in Substitutionen pro Nukleotidposition (*Substitutions per site*) an. Dargestellt sind eine Übersicht des *RAxML Tree* (links) und fünf Gruppen von zwei bis drei Deltavirusisolaten aus derselben Herkunftsregion mit jeweils sehr geringer genetischer Distanz zueinander (rechts).

Jedoch scheinen Sequenzanalysen von Deltavirusisolaten durch Identifizierung möglicher, lokaler Übertragungsereignisse zu einem besseren epidemiologischen Verständnis von HDV-Infektionen in der Mongolei beizutragen [118]. In ähnlicher Weise ermöglichten Sequenzanalysen des RNA-Virus SARS-CoV-2 ein besseres epidemiologisches Verständnis der COVID-19-Infektionen während der sich weltweit entwickelnden Pandemie im Jahr 2020. Walker et al. konnten durch SARS-CoV-2-Sequenzanalysen die Verbreitung von COVID-19-Infektionen in der nordrhein-westfälischen Gemeinde Gangelt im Kreis Heinsberg [126] und in der Landeshauptstadt Düsseldorf [126, 127] charakterisieren. Entsprechend könnten auch Deltavirus-Sequenzanalysen zu einem besseren epidemiologischen Verständnis von HDV-Infektionen beitragen.

Darüber hinaus könnte die Inzidenz von HDV-Infektionen in der Mongolei durch Analyse lokaler Übertragungsereignisse berechnet werden, wenn Informationen über den zeitlichen Kontext vorliegen. Smith et al. [128] beschrieben eine Methode, die über Nutzung von zeitlichen Sequenzdaten und Berechnung evolutionärer Signale SARS-CoV-2 Inzidenzen rekonstruiert. Diese Methode könnte auch für Deltavirussequenzen genutzt werden, um die Inzidenz von HDV-Infektionen in der Mongolei zu rekonstruieren und mutmaßliche Übertragungen in einen zeitlichen Kontext zu setzen. Ein limitierender Faktor könnte der chronische Verlauf von HDV-Infektionen sein. Chronische Hepatitis-Virusinfektionen wie HBV-, HDV- oder HCV-Infektionen mit einer Dauer von Wochen bis Jahren ermöglichen eine Anpassung des Virus an den Wirtsorganismus vor erneuten Übertragungen. Folglich entsteht ein sehr heterogenes Signal, das keine Verbindung von viraler Evolution und der Anzahl an Infektionen herstellen könnte [128]. Da SARS-CoV-2 [129] im Vergleich zu HDV eine relativ kurze Zeit für eine mögliche Anpassung an den Wirt aufzeigt, bevor das Virus weiter übertragen wird, könnte die Methode von Smith et al. [128] für Inzidenzberechnungen chronischer HDV-Infektionen fehlerbehaftet sein.

Deltavirus-Sequenzanalysen der HepMongolia-Kohorte verdeutlichen, dass HDV in der Mongolei in den letzten Jahren immer noch lokal übertragen wurde. Wie bei SARS-CoV-2 könnten Untersuchungen lokaler Übertragungsereignisse zu einem besseren epidemiologischen Verständnis der HDV-Infektionen in der Mongolei beitragen. Darüber hinaus könnte die Inzidenz von HDV-Infektionen in der Mongolei durch zeitliche Einordnung der lokalen Übertragungsereignisse berechnet werden [118].

4.4 HLA-Klasse I-assoziiertes positives Selektionsdruck beeinflusst die Evolution von HDV

4.4.1 Evidenz für positiven Selektionsdruck an elf Positionen im S-HDAg

Verschiedene Selektionsmechanismen prägen die Evolution der Viren. Nach dem Konzept der Quasispezies sind Virusinfektionen durch die Produktion einer Vielzahl eng verwandter, aber genetisch verschiedener Viruspartikel geprägt. Die virale Quasispezies bietet damit ein Reservoir von immer neuen Varianten, die bei Änderungen der Replikationsbedingungen möglicherweise vorteilhaft sein können [130]. Unter Selektionsdruck akkumulieren die am besten angepassten Varianten in der Quasispezies und sichern so das Überleben und die Vermehrung der Viren [72]. In früheren Studien wurden bereits Mutationen in HDV-spezifischen CD8⁺ T-Zellepitopen identifiziert [131]. Selektierte Mutationen in Zielepitopen der CD8⁺ T-Zellantwort können zu einer eingeschränkten Bindung des Epitops an das MHC-Klasse-I-Molekül und damit zu einer beeinträchtigten Epitop-Präsentation führen. Außerdem können selektierte Mutationen die Bindungsstelle des MHC-Klasse-I/Peptid-Komplexes verändern und dadurch die Bindung des T-Zell-Rezeptors stören. Auf diese Weise werden Virusvarianten von der HLA-Klasse I-spezifischen Immunantwort und somit dem adaptiven Immunsystem nicht mehr oder nur noch teilweise erkannt und akkumulieren im Wirt [72] als Zeichen der positiven Selektion.

Die Erfassung HDV-spezifischer CD8⁺ T-Zellepitope hat erst vor wenigen Jahren begonnen [87, 109, 118, 131, 132] und das gesamte Repertoire der Zielepitope des adaptiven Immunsystems im L-HDAg in Abhängigkeit vom HLA-Typ des Wirts ist noch unzureichend definiert. Darüber hinaus ist noch wenig bekannt über die Selektion viraler Deltavirus-Sequenzpolymorphismen und das Ausmaß der Immunevasion. Um das Ausmaß der Evasion von HDV vor dem adaptiven Immunsystem weiterführend zu charakterisieren, wurden Deltavirus-Sequenzpolymorphismen in Assoziation zum HLA-Typ des Wirts identifiziert. Mit Hilfe der *SeqFeatR*-Analyse konnten zwölf HLA-*footprints* im S-HDAg der mongolischen Deltavirusisolate identifiziert werden. Für elf der zwölf HLA-*footprints* wurden Peptide, die an MHC-Klasse-I-Moleküle binden, *in silico* über das Web Portal der IEDB [99] vorhergesagt. Zwei der identifizierten HLA-*footprints* mit Evidenz für eine Evasion der HLA-Klasse I-spezifischen Immunantwort waren in einem bereits vorher beschriebenen CD8⁺ T-Zellepitop einer europäisch-iranischen Kohorte lokalisiert [87, 118, 133]. Die Assoziation des

HLA-B*37 Allels mit dem Sequenzpolymorphismus Asparginsäure (D) zu Glutaminsäure (E) an der Stelle 101 des HDAg wurde bereits von Karimzadeh et al. [87] beschrieben und durch die Analyse dieser Arbeit bestätigt. Darüber hinaus wiesen Karimzadeh et al. [87] experimentell die Erkennung des Epitops von Epitop-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach. Das mutierte Peptid wurde von isolierten CD8⁺ T-Zellen nur teilweise kreuzerkannt. Somit scheint HDV durch den oben beschriebenen Sequenzpolymorphismus der Detektion von CD8⁺ T-Zellen zu entkommen [87].

Kefalakes et al. [109] beschrieben die Bindung von HDV-spezifischen CD8⁺ T-Zellepitopen an verschiedene HLA-Klasse I-Moleküle. Zwei der *SeqFeatR*-Ergebnisse der HepMongolia-Kohorte bestätigen diese Beobachtung. Zum einen wurde durch die *SeqFeatR*-Analyse die Assoziation von HLA-B*54-positiven HDV-infizierten Probanden mit dem Sequenzpolymorphismus Prolin (P) zu Leucin (L) bzw. Serin (S) an Position 49 des HDAg identifiziert. Karimzadeh et al. [87] beschrieben den gleichen Sequenzpolymorphismus (P49L/S), jedoch assoziiert mit HLA-A*30-positiven HDV-infizierten Probanden. Zum anderen identifizierte die *SeqFeatR*-Analyse der HepMongolia-Sequenzen zwei Sequenzpolymorphismen, assoziiert mit HLA-A*33 und HLA-A*68-positiven HDV-infizierten Probanden, die im selben vorhergesagten Peptid (AS-Position 80 bis 88 des HDAg) lokalisiert waren. Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse, dass die Bindung von Peptiden an verschiedene *MHC*-Klasse-I-Moleküle möglich ist. Normalerweise ist dieser Effekt hauptsächlich bei CD4⁺ Epitopen zu beobachten [131]. Kefalakes et al. [109] schlussfolgerten daher, dass HDV aufgrund seines kleinen Genoms und des Vorhandenseins von nur einem offenen Leserahmen die Bindung von CD8⁺ T-Zellepitopen an verschiedene *MHC*-Klasse-I-Moleküle ermöglichen könnte, indem das Immunsystem auf eine relativ kurze Virussequenz trainiert wird.

In dieser Arbeit wurden HLA-*footprints*, auch HLA-assoziierte Mutationen (*HAMs*) genannt, durch die *SeqFeatR*-Analyse identifiziert. Habermann et al. [133] beschrieben 2022 den *HAMdetector*, eine weiterentwickelte Methode (*Bayesian* Regressions-Modell) zur Detektion von *HAMs*. Dieses Modell berücksichtigt im Gegensatz zu *SeqFeatR* zusätzlich das Wissen über die Wirkstärke, die mögliche gemeinsame phylogenetische Vorgeschichte viraler Sequenzen und die korrelierte Vererbung von HLA-Allelen [133]. Um die mit *SeqFeatR* generierten Daten der HepMongolia-Kohorte zu reevaluieren und mögliche falsch-positive sowie falsch-negative Ergebnisse zu identifizieren, wurden die mongolischen Deltavirussequenzen mit dem weiterentwickelten *HAMdetector* im Jahr 2023 erneut analysiert und in der Fachzeitschrift „Frontiers in Medicine“ veröffentlicht. Für die *HAMdetector*-Analyse der HepMongolia-Kohorte wurde die A-posteriori-Wahrscheinlichkeit von > 0,8 als Grenzwert

verwendet [118]. Die Reevaluation bestätigte acht HLA-*footprints*, die durch die *SeqFeatR*-Analyse identifiziert worden waren (Tabelle 14).

Tabelle 14: Liste der HLA-assoziierten Mutationen (*HLA-associated Mutations, HAMS*) innerhalb des Hepatitis Delta Antigens (HDAg) der HepMongolia-Kohorte und vorher identifizierten *HAMS* beschrieben von Habermann et al.

| HepMongolia | | | | | | | Habermann et al. ¹ | |
|----------------------------|-----------|----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| <i>HAMdetector</i> | | | | SeqFeatR | | <i>IEDB</i> ² | <i>HAMdetector</i> | |
| A-post.-Wahr. ³ | HLA-Allel | AS-Pos. ⁴ | Seq.pol. ⁵ | Seq.pol. ⁵ | p-Wert ⁶ | CD8 ⁺ T-Zellepitop | Seq.pol. ⁵ | A-post.-Wahr. ³ |
| 1 | B*37 | 101 | E | D101E/X | 2,59E-09 | 100-QD <u>H</u> RRRRKAL-109 | Q101E ⁷ | 0,96 |
| 0,98075 | A*68 | 81 | I | V81I | 1,16E-04 | 80-EV <u>D</u> SGPRKR-88 | V81I | 0,97 |
| 0,968 | A*33 | 15 | D | E15D/Q | 1,56E-05 | 15-E <u>V</u> LEQWVNGR-24 | - | - |
| 0,9435 | B*51 | 182 | H | - | - | - | - | - |
| 0,942 | A*33 | 83 | A | S83A/T/X | 3,23E-05 | 80-EVD <u>S</u> GPRKR-88 | - | - |
| 0,93275 | B*48 | 25 | R | K25R | 1,93E-04 | 25-EVD <u>S</u> GPRKR-34 | - | - |
| 0,92775 | C*07 | 149 | T | - | - | - | - | - |
| 0,9265 | B*37 | 100 | E | Q100E ⁷ | 4,83E-04 | 100-Q <u>D</u> HRRRKAL-108 | - | - |
| 0,9155 | B*40 | 116 | T | - | - | - | - | - |
| 0,912 | A*01 | 100 | E | - | - | - | - | - |
| 0,9105 | A*33 | 9 | K | - | - | - | - | - |
| 0,88575 | B*54 | 81 | I | - | - | - | - | - |
| 0,8855 | A*33 | 16 | I | V16I/A/T | 5,87E-04 | 15-E <u>V</u> LEQWVNGR-24 | - | - |
| 0,86975 | B*54 | 49 | L | P49L/S/X | 8,97E-05 | ng ⁸ | - | - |
| 0,86925 | A*33 | 81 | I | - | - | - | - | - |
| 0,869 | C*07 | 8 | K | - | - | - | - | - |
| 0,86875 | B*50 | 116 | N | - | - | - | - | - |
| 0,8565 | B*48 | 112 | K | - | - | - | - | - |
| 0,85475 | A*33 | 97 | E | - | - | - | - | - |
| 0,854 | B*58 | 191 | G ⁹ | - | - | - | - | - |
| 0,852 | B*08 | 113 | N | - | - | - | K113N | 0,96 |
| 0,847 | C*04 | 132 | K | - | - | - | - | - |
| 0,846 | B*13 | 32 | K | - | - | - | - | - |
| 0,84075 | C*04 | 170 | D | - | - | - | - | - |
| 0,8405 | A*33 | 83 | T | - | - | - | - | - |
| 0,83675 | B*58 | 81 | I | - | - | - | - | - |
| 0,8365 | C*07 | 37 | T | - | - | - | - | - |
| 0,83475 | A*33 | 88 | K | - | - | - | - | - |
| 0,83375 | B*27 | 139 | G | - | - | - | - | - |

| | | | | | | | | |
|---------|------|-----|---|---|---|---|---------------------|------|
| 0,83225 | B*54 | 198 | L | - | - | - | - | - |
| 0,82975 | B*15 | 170 | D | - | - | - | S170N ¹⁰ | 0,99 |
| 0,82775 | A*31 | 34 | T | - | - | - | - | - |
| 0,82625 | B*13 | 151 | D | - | - | - | - | - |
| 0,825 | C*07 | 112 | K | - | - | - | - | - |
| 0,82475 | A*33 | 19 | E | - | - | - | - | - |
| 0,8245 | B*51 | 34 | V | - | - | - | - | - |
| 0,8235 | B*51 | 85 | S | - | - | - | - | - |
| 0,822 | B*51 | 88 | G | - | - | - | - | - |
| 0,82125 | A*03 | 37 | T | - | - | - | - | - |
| 0,82125 | B*40 | 109 | Q | - | - | - | - | - |
| 0,82025 | A*68 | 172 | R | - | - | - | - | - |
| 0,816 | B*08 | 116 | R | - | - | - | - | - |
| 0,80875 | B*13 | 81 | V | - | - | - | - | - |
| 0,808 | B*54 | 148 | S | - | - | - | - | - |
| 0,80725 | B*40 | 32 | R | - | - | - | - | - |

¹Habermann et al. [133] beschrieb *HAMs* innerhalb des HDAg detektiert mittels *HAMdetector*, ²*Immune Epitope Database*, unter *IEDB* sind Positionen der viralen Sequenzpolymorphismen unterstrichen und fett gedruckt, ³A-posteriori-Wahrscheinlichkeit (Grenzwert > 0,8), ⁴Aminosäure (AS)-Position innerhalb des HDAg, ⁵Sequenzpolymorphismus, AS-Angabe in international gültigen Symbolen (Buchstaben), X steht für AS-Ambiguitäten (Mehrdeutigkeit der DNA-Sequenz), ⁶p-Wert (Grenzwert ≤ 0,05), ⁷von Karimzadeh et al. [87] in experimentellen Studien bestätigte *HAMs* innerhalb des CD8⁺ T-Zellepitops QDHRRRKAL (Position 100-108 des HDAg), ⁸nicht gefunden (*IEDB* ohne Vorhersage eines korrelierenden Peptids), ⁹von Kefalakes et al. [109] in experimentellen Studien bestätigtes *HAM* innerhalb des CD8⁺ T-Zellepitops RGSQGFPW (Position 189-196 des HDAg), ¹⁰von Karimzadeh et al. [87] in experimentellen Studien bestätigtes *HAM* innerhalb des CD8⁺ T-Zellepitops SMQGVPESPF (Position 170-179 des HDAg). Rot hinterlegt sind in vergangenen Studien bestätigte CD8⁺ T-Zellepitope.

Die durch die *SeqFeatR*-Analyse identifizierte Assoziation von HLA-A*02-positiven HDV-infizierten Probanden mit dem Sequenzpolymorphismus Glutaminsäure (E) zu Asparginsäure (D) an Position 15 des HDAg im vorhergesagten Peptid an AS-Position zwölf bis 20 des HDAg lag unterhalb des Grenzwertes der durchgeführten Reevaluation mittels *HAMdetector*. Die *SeqFeatR*-Analyse identifizierte jedoch denselben Sequenzpolymorphismus, der mit HLA-A*33-positiven HDV-infizierten Probanden assoziiert und in einem überlappenden, vorhergesagten Peptid lokalisiert war (AS-Positionen 15 bis 24 des HDAg). Dieser HLA-*footprint* lag in der durchgeführten Reevaluation des *HAMdetectors* oberhalb des Grenzwertes [118]. Wenn HLA-A*33-positiv HDV-infizierte Probanden mit dem Sequenzpolymorphismus E15D assoziiert sind, um dem adaptiven Immunsystem zu entgehen, und eine Korrelation bei der Vererbung mit dem HLA-A*02-Allel besteht, kann mittels *SeqFeatR*-Analyse eine Assoziation von E15D mit HLA-A*02-positiven HDV-infizierten Probanden nachgewiesen werden, auch wenn es sich nicht um eine virale Evasionsmutation des HLA-Allels handelt. Da der *HAMdetector* korrelierende Vererbungen von HLA-Allelen

bei der Detektion von *HAMs* berücksichtigt [133], könnte bei Reevaluation der HepMongolia-Daten nur die Evasionsmutation von HLA-A*33 oberhalb des Grenzwertes gelegen haben. Eine eindeutige Unterscheidung ist jedoch erst mittels experimenteller, zellulärer CD8⁺ T-Zell Daten möglich.

Für die Assoziation des Sequenzpolymorphismus Prolin (P) zu Leucin (L) an Position 49 des S-HDAg mit HLA-B*54-positiven HDV-infizierten Probanden konnte in dieser Arbeit mittels *IEDB* kein HLA-*footprint* überspannendes Peptid vorhergesagt werden. Auch Karimzadeh et al. [87] konnten für einen identifizierten HLA-*footprint* kein korrelierendes Peptid vorhersagen und vermuteten, dass der Sequenzpolymorphismus aufgrund anderer Mutationsmechanismen wie Wechselwirkungen zwischen dem Bw4-Motiv und den Immunoglobulin-ähnlichen Rezeptoren der Killerzellen entstanden sei. Im Gegensatz zur *SeqFeatR*-Analyse mit anschließender *in silico IEDB*-Vorhersage konnte die *HAMdetector*-Analyse ein korrelierendes Epitop für den oben beschriebenen HLA-*footprint* vorhersagen [118]. Die Datenbank der *IEDB* wird wöchentlich durch neu publizierte Ergebnisse ergänzt [134]. Eine mögliche Erklärung ist die zeitversetzte Durchführung der *SeqFeatR*-Analyse mit anschließender *IEDB in silico* Vorhersage und die *HAMdetector*-Analyse (2020 vs. 2023). Der HLA-*footprint* scheint daher, wie die anderen elft identifizierten HLA-*footprints* der HepMongolia-Kohorte, durch HLA-Klasse I-assoziierten Selektionsdruck entstanden zu sein.

Als Schlussfolgerung ist über den HLA-Klasse I-assoziierten Selektionsdruck von HDV und das Ausmaß der Evasion vor dem adaptiven Immunsystem noch wenig bekannt. Die Erfassung HDV-spezifischer CD8⁺ T-Zellepitope und Identifizierung von Deltavirus-Sequenzpolymorphismen in diesen Zielepitopen hat erst begonnen und wurde bisher hauptsächlich in einer europäisch-iranischen Kohorte [87] analysiert. Daher wurde in dieser Arbeit eine große Patientenkohorte aus der Mongolei analysiert. Insgesamt wurden mit der weiterentwickelten *HAMdetector*-Analyse 45 HLA-*footprints* identifiziert (Tabelle 14). Ein Großteil der in dieser Arbeit beschriebenen HLA-*footprints*, die mit der *SeqFeatR*-Analyse detektiert wurden, konnte mit der *HAMdetector*-Analyse bestätigt werden [118]. Einige Sequenzpolymorphismen unter HLA-Klasse I-assoziiertem Selektionsdruck waren in vorher beschriebenen oder überlappenden CD8⁺ T-Zellepitopen lokalisiert [87, 118, 133]. Die meisten HLA-*footprints* wurden jedoch neu identifiziert [118] und nicht in der vergleichbaren Studie von Karimzadeh et al. [87] mit Sequenzen aus Europa und dem Iran detektiert (Tabelle 14). In dieser Studie konnten die Epitop-Kandidaten nicht experimentell bestätigt werden, da die dafür notwendige Isolation und Lagerung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut unter anderem aufgrund fehlender Infrastruktur nicht möglich war. Um die Evasion vor dem adaptiven Immunsystem durch oben beschriebene HLA-*footprints* zu bestätigen, sollten

funktionelle Studien mit peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in Zellkulturen durchgeführt werden. Insgesamt wurde die Erfassung HDV-spezifischer CD8⁺ T-Zellepitope durch die Kandidatenepitope dieser Arbeit ergänzt und Regionen unter möglichem HLA-Klasse I-assoziiertem Selektionsdruck identifiziert [118].

4.4.2 HLA-*footprints* in flankierenden Regionen als möglicher zusätzlicher Evasionsmechanismus

Nicht nur Mutationen innerhalb von CD8⁺ T-Zellepitopen können zu einer viralen Evasion vor dem adaptiven Immunsystem führen. Auch Mutationen in flankierenden Regionen von CD8⁺ T-Zellepitopen können durch Störung der proteasomalen Antigenprozessierung zu einer Evasion vor dem adaptiven Immunsystem führen [72]. Dieser Mechanismus wurde in Studien zu HCV [75-77] und HIV [73, 74] beschrieben. Karimzadeh et al. [87] detektierten sechs HLA-*footprints* in flankierenden Regionen von 15 AS vor und nach vorhergesagten HDV-spezifischen CD8⁺ T-Zellepitopen. Nachfolgende *in silico* Analysen der *IEDB* unter Verwendung des Antigen-Prozessierungs-Algorithmuses sagten keinen Effekt auf die Antigenprozessierung voraus. Ein Vergleich mit HLA-*footprints* in flankierenden Regionen von HCV- und HIV-spezifischen CD8⁺ T-Zellepitopen ergab ebenfalls keinen vorhergesagten Effekt auf die Antigenprozessierung, auch wenn die Störung bereits in funktionellen Studien bestätigt wurde. Daher führten Karimzadeh et al. funktionelle Studien durch und konnten einen der sechs HLA-*footprints* (Sequenzpolymorphismus R139K assoziiert mit HLA-B*41-positiven Studienteilnehmenden) in einer flankierenden Region eines CD8⁺ T-Zellepitops (Position 140 bis 149 des HDAg) bestätigen [87]. Um eine mögliche Störung der Antigenprozessierung durch HLA-Klasse I-assoziierten Selektionsdruck in HDV in der HepMongolia-Kohorte weiterführend zu untersuchen, wurden *MHC*-Klasse-I-Molekül bindende Peptide, die HLA-*footprints* in flankierenden Regionen von 15 AS-Positionen vor und 15 AS-Positionen nach diesen Peptiden aufwiesen, *in silico* über die *IEDB* [99] vorhergesagt. *MHC*-Klasse-I-Molekül bindende Peptide mit flankierenden Mutationen wurden selektiert, die einen höheren *Score* in der *IEDB* aufwiesen als korrelierende HLA-*footprint* abdeckende Peptide. Drei flankierende Mutationen mit signifikanten Assoziationen zu HLA-A*02-, HLA-A*30- und HLA-B*48-positiven HDV-infizierten Probanden wurden identifiziert und sind in Tabelle 15 aufgelistet. Zwei der drei flankierenden Mutationen waren hinter dem vorhergesagten Peptid lokalisiert (HLA-A*30, HLA-B*48). Eine der drei flankierenden Mutationen war vor dem vorhergesagten Peptid lokalisiert (HLA-A*02) (Tabelle 15).

Tabelle 15: Virale Sequenzpolymorphismen assoziiert mit HLA-Klasse I-Allelen und lokalisiert in flankierenden Regionen von MHC-Klasse-I-Molekül bindenden Peptiden

| Nummer | HLA-Allel | HLA-footprint Position | IEDB ¹ | AS ² -Bereich | Score ³ | Score-Vergleich ⁴ (Peptidregion) |
|--------|-----------|------------------------|-------------------|--------------------------|--------------------|---|
| 1 | A*02 | E15D | WVNGRKKLEEL | 20 - 30 | 0,007739 | 0,002356 (12 - 20) |
| 2 | A*30 | H102H/Y, H/P | RPLRGGFTDK | 88 - 97 | 0,303757 | 0,061858 (99 - 106) |
| 3 | B*48 | E128E/G | KQLSAGGKNL | 113 - 122 | 0,164253 | 0,018859 (124 - 133) |

¹Immune Epitope Database (IEDB), unter IEDB ist die Aminosäure (AS)-Sequenz des vorhergesagten MHC-Klasse-I-Molekül bindenden Peptids in international gültigen AS-Symbolen (Buchstaben) angegeben, ²Aminosäure (AS). ³Die IEDB [99] gibt für jedes Peptid (CD8⁺ T-Zellepitop) einen Score zwischen null und eins an. Je höher der Score, desto höher ist die Affinität des Peptids und entsprechenden HLA-Molekül. ⁴Peptid-Score korrelierender HLA-footprint abdeckender Peptide. In Klammern ist die Peptidregion innerhalb des Hepatitis Delta Antigens angegeben.

Folglich könnte ein möglicher zusätzlicher Evasionsmechanismus von HDV in der HepMongolia-Kohorte die Bildung flankierender Mutationen sein, um dem adaptiven Immunsystem zu entgehen. Um eine Störung der Antigenprozessierung durch HLA-footprints in flankierenden Regionen dieser drei CD8⁺ T-Zell-Kandidatenepitope der HepMongolia-Kohorte zu bestätigen, sind funktionelle Studien erforderlich.

4.4.3 HLA-*footprints* sparen funktionell wichtige Aminosäure-Positionen des S-HDAg aus

Die in dieser Arbeit identifizierten HLA-*footprints* waren innerhalb der ersten zwei Drittel des S-HDAg lokalisiert mit Aussparung von sieben AS der N-terminalen Region und 65 AS der C-terminalen Region des S-HDAg. Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit beschrieben Karimzadeh et al. [87] ebenfalls eine Aussparung der N- und C-terminalen Region des S-HDAg. In diesen ausgesparten Regionen des S-HDAg sind post-translationale Modifikationen (PTMs) lokalisiert. PTMs sind von entscheidender Bedeutung für wichtige Funktionen des HDAg [131]. Lai et al. [135] und Chen et al. [136] beschrieben, dass die Phosphorylierung von Serin an Position 177 die subzelluläre Lokalisation des HDAg und die RNA-Replikation beeinflusst. Diese PTM von Serin an Position 177 des S-HDAg ist in der HLA-*footprint*-freien C-terminalen Region der HepMongolia-Sequenzen lokalisiert. Weitere PTMs, die als funktionell wichtig für das HDAg beschrieben wurden, sind die Phosphorylierung von Serin-2 und -123, die Methylierung von Arginin-13 und Acetylierung von Lysin-72 [131]. Auch an diesen AS-Positionen wurden keine HLA-*footprints* durch die *SeqFeatR*-Analyse (Abb. 4.3) und *HAMdetector*-Analyse [118] identifiziert. Shirvani-Dastgerdi et al. [137] beobachteten, dass PTM-Lokalisationen und Sequenzfolgen mit Ribozymaktivität der genomischen und antigenomischen HDV-RNA konserviert und Mutationen als Zeichen positiver Selektion in diesen Regionen eher nicht lokalisiert sind. Ebenfalls die für die HDV-Replikation wichtige AS-Position Leucin-115 [138] zeigte in der zuvor genannten Studie von Shirvani-Dastgerdi et al. [137] keine Sequenzpolymorphismen auf.

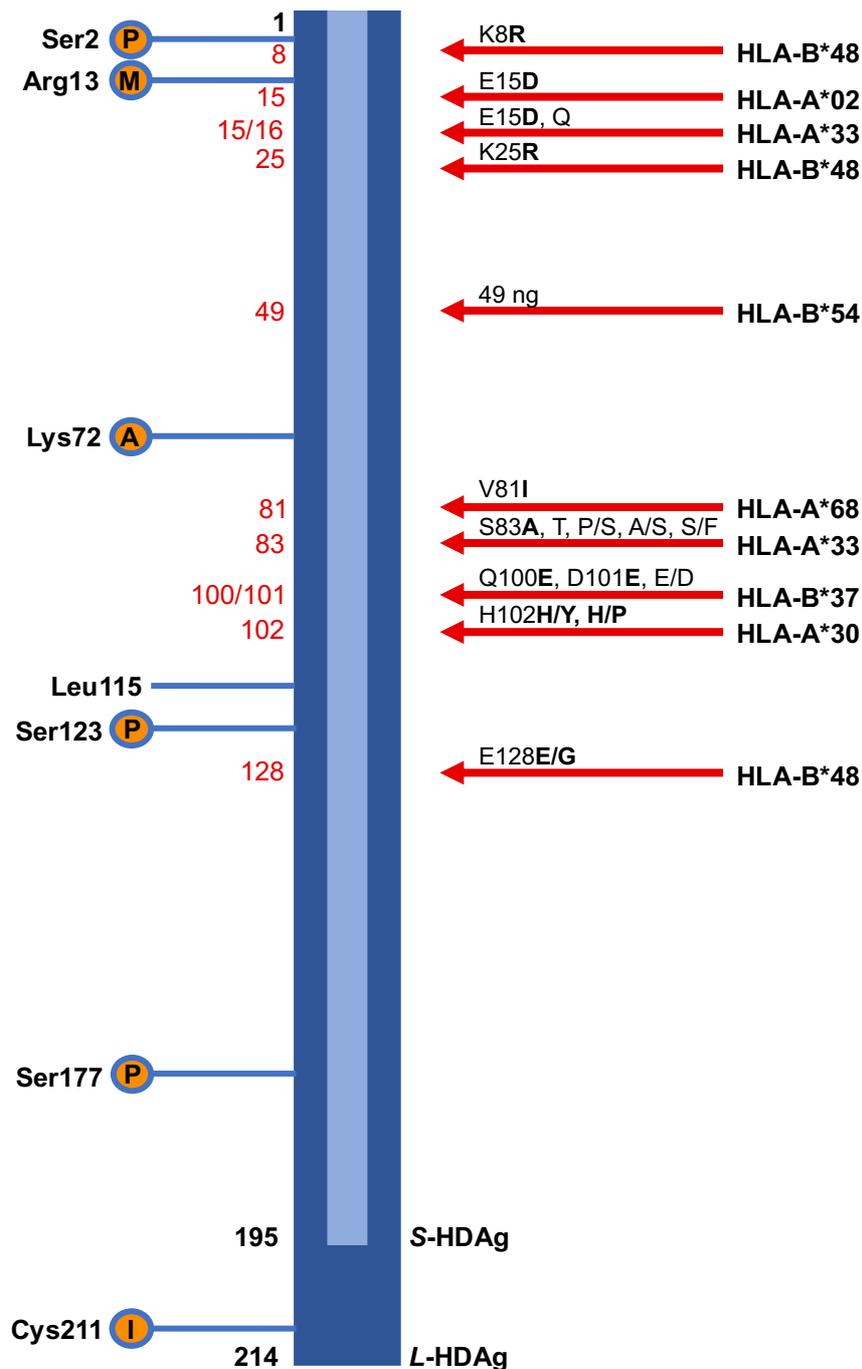


Abb. 4.3: HLA-footprints sparen funktionell wichtige Aminosäure (AS)-Positionen des Small-Hepatitis Delta Antigen (S-HDAg) aus

Verteilung identifizierter HLA-footprints im Hepatitis Delta Antigen (HDAg). Das HDAg ist in das Large-HDAg (L-HDAg, dunkelblau) und Small-HDAg (S-HDAg, hellblau) aufgeteilt. Mit rotem Pfeil markiert sind HLA-footprints, die innerhalb von vorhergesagt MHC-I-Molekül bindenden Peptiden lokalisiert sind. Diese Peptide wurden mittels *Immune Epitope Database (IEDB)* [99] vorhergesagt. Der jeweilige HLA-footprint ist über dem zugehörigen Pfeil in international gültigen AS-Symbolen (Buchstaben) aufgeführt. AS-Ambiguitäten (Mehrdeutigkeit der DNA-Sequenz) sind mit Schrägstrich dargestellt. Fett gedruckt sind die am häufigsten vorkommenden Substitutionen. „ng“ steht für nicht gefunden, da die *IEDB* kein Peptid für das HLA-B*54-Allel vorhersagen konnte. Links sind post-translationale Modifikationen, d.h. Phosphorylierungen (P), Methylierungen (M), Acetylierungen (A) und Isoprenylierung (I) in orangenen Kreisen dargestellt. Daneben steht jeweils die post-translationale modifizierte AS in international gültigen AS-Symbolen (drei Buchstaben). Ebenfalls links markiert ist die für die HDV-Replikation wichtige AS Leucin an der Stelle 115.

Folglich waren funktionell wichtige AS-Positionen des S-HDAg sowohl in früheren Studien [87, 137] als auch in der HepMongolia-Kohorte konserviert und zeigten keine Mutationen auf. HLA-*footprints* scheinen funktionell wichtige AS-Positionen des S-HDAg auszusparen, um beispielsweise die HDV-Replikation nicht negativ zu beeinflussen.

4.5 Einfluss der Häufigkeit eines HLA-Allels auf die Häufigkeit viraler Evasionsvarianten

Die Häufigkeit eines HLA-Allels scheint die Häufigkeit viraler Evasionsvarianten in der Bevölkerung zu beeinflussen. Virale Evasionsvarianten HIV- [139] und HCV- [140] positiver Probanden wurden beschrieben, die keine in den Studienpopulationen häufig vorkommenden HLA-Allele aufwiesen. Moore et al. [139] identifizierten eine Assoziation von HIV-1-Sequenzpolymorphismen mit HLA-A*02-negativen Probanden. HLA-A*02 war das am häufigsten vorkommende HLA-A-Allel in der Kohorte. Folglich zeigten HLA-A*02-positive Probanden eine signifikant geringere Abweichung von der Konsensussequenz als HLA-A*02-negative Probanden. [141]. Gaudieri et al. [140] beschrieben eine Assoziation eines HCV-Sequenzpolymorphismus mit HLA-A*01-negativen Probanden. HLA-A*01 war in der Kohorte ein relativ häufig vorkommendes HLA-A-Allel [140]. Die in HIV- und HCV-infizierten Probanden beschriebenen negativen Assoziationen könnten auf eine virale Anpassung der Konsensussequenz an die CD8⁺ T-Zellantwort hindeuten, die wiederum von den häufigsten HLA-Allelen der Wirtspopulation beeinflusst wird [139, 140]. Entsprechend dieser Beobachtungen beschrieben Karimzadeh et al. [87] Deltavirus-Sequenzpolymorphismen, die mit selten vorkommenden HLA-Klasse I-Allelen assoziiert waren. In dieser Studie zeigten häufig vorkommende HLA-Klasse I-Allele keine signifikante Assoziation zu Sequenzpolymorphismen auf [87]. Um den Einfluss der Häufigkeit von HLA-Allelen auf die Häufigkeit von Evasionsvarianten in der Mongolei zu untersuchen, wurden HLA-Klasse I-Allelfrequenzen von sieben mongolischen Populationen [102-108] aus der *Allele Frequency Net Database* [101] als Referenzwerte für die Verteilung der HLA-A- und HLA-B-Allelen verwendet. Im Folgenden werden zwei in der Mongolei selten vorkommende HLA-Allele beispielhaft näher beschrieben. Bei HLA-A*68-positiven HDV-infizierten Probanden wurde eine statistisch signifikante Assoziation zu dem Sequenzpolymorphismus V81I nachgewiesen. Die Allelfrequenz von HLA-A*68 betrug 0,034 in der HepMongolia-Kohorte und maximal 0,029 in den sieben mongolischen Referenzpopulationen. Bei HLA-B*37-positiven HDV-infizierten Probanden wurden statistisch signifikante Assoziationen zu den zwei Sequenzpolymorphismen Q100E und D101E nachgewiesen. Die Allelfrequenz von HLA-B*37 betrug 0,072 in der HepMongolia-Kohorte und maximal 0,069 in den sieben mongolischen Referenzpopulationen. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Karimzadeh et

al. [87] waren die oben beschriebene Deltavirus-Sequenzpolymorphismen signifikant mit in der Mongolei selten vorkommenden HLA-Allelen assoziiert (Allelfrequenzen $\leq 0,1$).

Zusammengefasst wurden Evasionsvarianten für HIV [139], HCV [140] und HDV [87] beschrieben, die mit selten vorkommenden HLA-Allelen assoziiert waren. Auch in dieser Arbeit waren einige der Deltavirus-Sequenzpolymorphismen mit in der Mongolei selten vorkommenden HLA-Allelen assoziiert. Somit scheint die Häufigkeit eines HLA-Allels die Häufigkeit viraler Evasionsvarianten in der Bevölkerung zu beeinflussen. Um eine virale Adaption auf Populationsebene in der Mongolei nachzuweisen, sind Daten aus weiteren Patientenkohorten erforderlich.

4.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Sequenzvariabilität von HDV in der Mongolei untersucht und geprüft, ob Probanden mit chronischer HBV/HDV-Infektion eine kontinuierliche Anpassung an einen HLA-Klasse I-assoziierten Selektionsdruck zeigen. Zu diesem Zweck wurde durch Analysen einer großen mongolischen Patientenkohorte ein umfangreicher Datensatz von mongolischen Deltavirussequenzen generiert [118].

Serumproben dieser Kohorte, der HepMongolia-Kohorte, wurden auf HBV- und HDV-Infektionsmarker untersucht und die HDV-Prävalenz bestimmt. Trotz der Einführung von HBV-Impfprogrammen in der Mongolei [70] war die HBV-Durchimpfungsrate innerhalb der HBsAg-nicht-reaktiven Probanden niedrig und die Prävalenz von HBV/HDV in der mongolischen Patientenkohorte hoch, auch unter jungen Probanden. Herkunfts-Analysen der HepMongolia-Proben ergaben die höchste Prävalenz in westlich gelegenen mongolischen Regionen. Mit Hilfe phylogenetischer Analysen konnten lokale Transmissionsereignisse von HDV identifiziert werden. Sowohl die hohe Prävalenz als auch die anhaltende lokale Übertragung von HDV zeigen, dass HDV-Infektionen nach wie vor ein großes Gesundheitsproblem in der mongolischen Bevölkerung darstellen.

In Übereinstimmung mit früheren Studien [7, 19, 117, 120, 124, 125] kam der HDV-Genotyp 1 in der HepMongolia-Kohorte am häufigsten vor. Phylogenetische Analysen zeigten eine hohe Sequenzvariabilität mit Bildung von drei *Clustern* (*Clade* I bis III) in der mongolischen Patientenkohorte. Eine mögliche Einteilung des HDV-Genotyps 1 in Subtypen wurde in früheren Studien vorgeschlagen [44, 45] und eine Assoziation der Subtypen mit verschiedenen Ländern beschrieben [45]. Die *Clades* 1-I bis 1-III der HepMongolia-Kohorte könnten potenzielle bisher unentdeckte Subtypen darstellen. Jedoch wurde eine Assoziation der potenziellen Subtypen zu spezifischen mongolischen Regionen nicht beobachtet, möglicherweise basierend auf dem traditionellen Nomadentum der Mongolei [118].

Zusätzlich zur Sequenzierung wurden HLA-Klasse I-Allele der mongolischen, HDV-positiven Serumproben bestimmt, auf eine statistische Korrelation zwischen viralen Sequenzpolymorphismen und HLA-Klasse I-Molekülen (HLA-*footprints*) untersucht und überlappende Kandidatenepitope für Positionen der HLA-*footprints in silico* vorhergesagt. In dieser Arbeit wurden zehn bisher nicht beschriebene Deltavirus-Sequenzpolymorphismen in vorhergesagten MHC-Klasse-I-Molekül bindenden Peptiden entdeckt und damit Regionen unter möglichem HLA-Klasse I-assoziiertem Selektionsdruck identifiziert. In der HepMongolia-Kohorte wurden nicht nur HLA-*footprints* innerhalb von vorhergesagten MHC-Klasse-I-Molekül bindenden Peptiden entdeckt, sondern auch drei Mutationen in flankierenden Regionen von vorhergesagten Peptiden identifiziert. Wie in früheren Studien zu HIV [73, 74], HCV [75-77] und HDV [87] beschrieben, könnten Mutationen in flankierenden Regionen von CD8⁺ T-Zellepitopen durch Störung der Antigenprozessierung einen weiteren Evasionsmechanismus darstellen. Mutationen der mongolischen Deltavirussequenzen sparten funktionell wichtige AS-Positionen des S-HDAg aus (z. B. PTM-Positionen), möglicherweise um eine Störung der HDV-Replikation und damit eine Einschränkung der viralen Fitness zu vermeiden. Die Assoziation von Deltavirus-Sequenzpolymorphismen mit in der Mongolei überwiegend selten vorkommenden HLA-Klasse I-Allelen bestätigt die bereits bei HIV [139], HCV [140] und HDV [87] beobachtete negative Assoziation von Evasionsvarianten und häufig vorkommenden HLA-Allelen. Der Nachweis unterschiedlicher HLA-*footprints* in verschiedenen Populationen (Mongolei vs. Europa und Iran) zeigt, dass sich Viren durch einen populationsabhängigen HLA-Klasse I-assoziierten Selektionsdruck je nach HLA-Profil der Population unterschiedlich anpassen [118]. Auch wenn die hier identifizierten HLA-*footprints* bisher noch nicht in funktionellen Studien bestätigt wurden, so können die Ergebnisse dieser Arbeit und die Erweiterung mittels *HAMdetector*-Analyse [118] die laufende Erfassung HDV-spezifischer CD8⁺ T-Zellepitope vervollständigen und das Ausmaß der Evasion vor dem adaptiven Immunsystem weiterführend charakterisieren. Zukünftige Forschungsprojekte könnten oben aufgeführte Evasionsmechanismen in funktionellen Studien bestätigen, um neue Therapien wie prophylaktische Impfstoffe gegen HDV zu entwickeln.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Magnius, L., et al., *ICTV Virus Taxonomy Profile: Deltavirus*. J Gen Virol, 2018. **99**(12): p. 1565-1566. doi: 10.1099/jgv.0.001150.
2. Rizzetto, M., et al., *Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers*. Gut, 1977. **18**(12): p. 997-1003. doi: 10.1136/gut.18.12.997.
3. Sureau, C., B. Guerra, and R.E. Lanford, *Role of the large hepatitis B virus envelope protein in infectivity of the hepatitis delta virion*. J Virol, 1993. **67**(1): p. 366-372. doi: 10.1128/jvi.67.1.366-372.1993.
4. Yan, H., et al., *Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus*. Elife, 2012. **3**: p. e00049. doi: 10.7554/eLife.00049.
5. Alfaiate, D., P. Deny, and D. Durantel, *Hepatitis delta virus: From biological and medical aspects to current and investigational therapeutic options*. Antiviral Res, 2015. **122**: p. 112-129. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.08.009.
6. Fattovich, G., et al., *Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep)*. Gut, 2000. **46**(3): p. 420-426. doi: 10.1136/gut.46.3.420.
7. Stockdale, A.J., et al., *The global prevalence of hepatitis D virus infection: Systematic review and meta-analysis*. J Hepatol, 2020. **73**(3): p. 523-532. doi: 10.1016/j.jhep.2020.04.008.
8. Negro, F., *Hepatitis D virus coinfection and superinfection*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014. **4**(11): p. a021550. doi: 10.1101/cshperspect.a021550.
9. Yurdaydin, C., et al., *Natural history and treatment of chronic delta hepatitis*. J Viral Hepat, 2010. **17**(11): p. 749-756. doi: 10.1111/j.1365-2893.2010.01353.x.
10. Rizzetto, M., *Hepatitis D: clinical features and therapy*. Dig Dis, 2010. **28**(1): p. 139-143. doi: 10.1159/000282077.
11. Rizzetto, M., et al., *Incidence and significance of antibodies to delta antigen in hepatitis B virus infection*. Lancet, 1979. **2**(8150): p. 986-990. doi: 10.1016/s0140-6736(79)92561-3.
12. Wranke, A., et al., *Anti-HDV IgM as a marker of disease activity in hepatitis delta*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e101002. doi: 10.1371/journal.pone.0101002.
13. Botelho-Souza, L.F., et al., *Hepatitis delta: virological and clinical aspects*. Virol J, 2017. **14**(1): p. 177. doi: 10.1186/s12985-017-0845-y.
14. Torre, P., et al., *Viral hepatitis: Milestones, unresolved issues, and future goals*. World J Gastroenterol, 2021. **27**(28): p. 4603-4638. doi: 10.3748/wjg.v27.i28.4603.
15. World Health Organization, *Global hepatitis report 2017*. 2017, Geneva: World Health Organization. p. 5.

16. Niro, G.A., et al., *Hepatitis delta virus: From infection to new therapeutic strategies*. World J Gastroenterol, 2021. **27**(24): p. 3530-3542. doi: 10.3748/wjg.v27.i24.3530.
17. World Health Organization. *Hepatitis d*. 2022, june 24 [accessed 2022-10-19]; URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-d>.
18. Davaalkham, D., et al., *Hepatitis delta virus infection in mongolia: analyses of geographic distribution, risk factors, and disease severity*. Am J Trop Med Hyg, 2006. **75**(2): p. 365-369. doi: 10.4269/ajtmh.2006.75.365.
19. Tsatsralt-Od, B., et al., *Prevalence of hepatitis B, C, and delta virus infections among children in Mongolia: progress in childhood immunization*. J Med Virol, 2007. **79**(8): p. 1064-1074. doi: 10.1002/jmv.20867.
20. Baatarkhuu, O., et al., *Epidemiology, Genotype Distribution, Prognosis, Control, and Management of Viral Hepatitis B, C, D, and Hepatocellular Carcinoma in Mongolia*. Euroasian journal of hepato-gastroenterology, 2018. **8**(1): p. 57-62. doi: 10.5005/jp-journals-10018-1260.
21. Boldbaatar, D., et al., *SAT-161-Prevalence of HBV and syphilis co-infection in Ulaanbaatar population, Mongolia*. Journal of Hepatology, 2019. **70**(1, Supplement): p. e700. doi: [https://doi.org/10.1016/S0618-8278\(19\)31396-9](https://doi.org/10.1016/S0618-8278(19)31396-9).
22. Flores, R., S. Ruiz-Ruiz, and P. Serra, *Viroids and hepatitis delta virus*. Semin Liver Dis, 2012. **32**(3): p. 201-210. doi: 10.1055/s-0032-1323624.
23. Kos, A., et al., *The hepatitis delta (delta) virus possesses a circular RNA*. Nature, 1986. **323**(6088): p. 558-560. doi: 10.1038/323558a0.
24. Wang, K.S., et al., *Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome*. Nature, 1986. **323**(6088): p. 508-514. doi: 10.1038/323508a0.
25. Kuo, M.Y., et al., *Molecular cloning of hepatitis delta virus RNA from an infected woodchuck liver: sequence, structure, and applications*. J Virol, 1988. **62**(6): p. 1855-1861. doi: 10.1128/jvi.62.6.1855-1861.1988.
26. Kuo, M.Y., Goldberg, J., Coates, L., Mason, W., Gerin, J. and Taylor, J. *Hepatitis delta virus RNA, complete genome (M21012.1)*. 1988 [accessed 2020-11-20]; URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/M21012>.
27. Tseng, C.H. and M.M. Lai, *Hepatitis delta virus RNA replication*. Viruses, 2009. **1**(3): p. 818-831. doi: 10.3390/v1030818.
28. Chang, J., et al., *Transcription of hepatitis delta virus RNA by RNA polymerase II*. J Virol, 2008. **82**(3): p. 1118-1127. doi: 10.1128/jvi.01758-07.
29. Rizzetto, M., *The adventure of delta*. Liver International, 2016. **36**: p. 135-140. doi: 10.1111/liv.13018.
30. Makino, S., et al., *Molecular cloning and sequencing of a human hepatitis delta (delta) virus RNA*. Nature, 1987. **329**(6137): p. 343-346. doi: 10.1038/329343a0.
31. Lo, K., et al., *Characterization of mRNA for hepatitis delta antigen: exclusion of the full-length antigenomic RNA as an mRNA*. Virology, 1998. **250**(1): p. 94-105. doi: 10.1006/viro.1998.9364.

32. Polson, A.G., B.L. Bass, and J.L. Casey, *RNA editing of hepatitis delta virus antigenome by dsRNA-adenosine deaminase*. *Nature*, 1996. **380**(6573): p. 454-456. doi: 10.1038/380454a0.
33. Gudima, S., et al., *Parameters of human hepatitis delta virus genome replication: the quantity, quality, and intracellular distribution of viral proteins and RNA*. *J Virol*, 2002. **76**(8): p. 3709-3719. doi: 10.1128/jvi.76.8.3709-3719.2002.
34. Gudima, S., et al., *Assembly of hepatitis delta virus: particle characterization, including the ability to infect primary human hepatocytes*. *J Virol*, 2007. **81**(7): p. 3608-3617. doi: 10.1128/jvi.02277-06.
35. Hwang, S.B. and M.M. Lai, *Isoprenylation mediates direct protein-protein interactions between hepatitis large delta antigen and hepatitis B virus surface antigen*. *J Virol*, 1993. **67**(12): p. 7659-7662. doi: 10.1128/jvi.67.12.7659-7662.1993.
36. Chen, H.Y., et al., *Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis*. *Gut*, 2019. **68**(3): p. 512-521. doi: 10.1136/gutjnl-2018-316601.
37. Dashtseren, B., et al., *Endemic prevalence of hepatitis B and C in Mongolia: A nationwide survey amongst Mongolian adults*. *J Viral Hepat*, 2017. **24**(9): p. 759-767. doi: 10.1111/jvh.12697.
38. Chen, X., et al., *A novel quantitative microarray antibody capture assay identifies an extremely high hepatitis delta virus prevalence among hepatitis B virus-infected mongolians*. *Hepatology*, 2017. **66**(6): p. 1739-1749. doi: 10.1002/hep.28957.
39. Chimed, T., et al., *Cancer incidence and cancer control in Mongolia: Results from the National Cancer Registry 2008-12*. *Int J Cancer*, 2017. **140**(2): p. 302-309. doi: 10.1002/ijc.30463.
40. Rizzetto, M. and A. Ciancio, *Epidemiology of hepatitis D*. *Semin Liver Dis*, 2012. **32**(3): p. 211-219. doi: 10.1055/s-0032-1323626.
41. Rizzetto, M., *Hepatitis D Virus: Introduction and Epidemiology*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2015. **5**(7): p. a021576. doi: 10.1101/cshperspect.a021576.
42. Coppola, N., et al., *HDV infection in immigrant populations*. *J Med Virol*, 2019. **91**(12): p. 2049-2058. doi: 10.1002/jmv.25570.
43. Mahale, P., et al., *Hepatitis D Viremia Among Injection Drug Users in San Francisco*. *J Infect Dis*, 2018. **217**(12): p. 1902-1906. doi: 10.1093/infdis/jiy157.
44. Le Gal, F., et al., *Genetic diversity and worldwide distribution of the deltavirus genus: A study of 2,152 clinical strains*. *Hepatology*, 2017. **66**(6): p. 1826-1841. doi: 10.1002/hep.29574.
45. Karimzadeh, H., et al., *Genetic diversity of hepatitis D virus genotype-1 in Europe allows classification into subtypes*. *J Viral Hepat*, 2019. **26**(7): p. 900-910. doi: 10.1111/jvh.13086.
46. Salpini, R., et al., *Novel concepts on mechanisms underlying Hepatitis Delta virus persistence and related pathogenesis*. *J Viral Hepat*, 2022: p. 1038-1047. doi: 10.1111/jvh.13755.

47. Liver, E.A.f.t.S.o.t., *EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection*. J Hepatol, 2017. **67**(2): p. 370-398. doi: 10.1016/j.jhep.2017.03.021.
48. Vogt, A., et al., *Medical Advances in Hepatitis D Therapy: Molecular Targets*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(18). doi: 10.3390/ijms231810817.
49. Zhang, Z., et al., *Hepatitis D virus replication is sensed by MDA5 and induces IFN- β / λ responses in hepatocytes*. J Hepatol, 2018. **69**(1): p. 25-35. doi: 10.1016/j.jhep.2018.02.021.
50. Lempp, F.A. and S. Urban, *Hepatitis Delta Virus: Replication Strategy and Upcoming Therapeutic Options for a Neglected Human Pathogen*. Viruses, 2017. **9**(7). doi: 10.3390/v9070172.
51. McNair, A.N., et al., *Hepatitis delta virus replication in vitro is not affected by interferon-alpha or -gamma despite intact cellular responses to interferon and dsRNA*. J Gen Virol, 1994. **75 (Pt 6)**: p. 1371-1378. doi: 10.1099/0022-1317-75-6-1371.
52. Farci, P., et al., *Long-term benefit of interferon alpha therapy of chronic hepatitis D: regression of advanced hepatic fibrosis*. Gastroenterology, 2004. **126**(7): p. 1740-1749. doi: 10.1053/j.gastro.2004.03.017.
53. Wedemeyer, H., et al., *Peginterferon alfa-2a plus tenofovir disoproxil fumarate for hepatitis D (HIDIT-II): a randomised, placebo controlled, phase 2 trial*. Lancet Infect Dis, 2019. **19**(3): p. 275-286. doi: 10.1016/s1473-3099(18)30663-7.
54. Wedemeyer, H., et al., *Peginterferon plus adefovir versus either drug alone for hepatitis delta*. N Engl J Med, 2011. **364**(4): p. 322-331. doi: 10.1056/NEJMoa0912696.
55. Wranke, A., et al., *Ten-year follow-up of a randomized controlled clinical trial in chronic hepatitis delta*. J Viral Hepat, 2020. **27**(12): p. 1359-1368. doi: 10.1111/jvh.13366.
56. Heidrich, B., et al., *Late HDV RNA relapse after peginterferon alpha-based therapy of chronic hepatitis delta*. Hepatology, 2014. **60**(1): p. 87-97. doi: 10.1002/hep.27102.
57. Niro, G.A., et al., *Pegylated interferon alpha-2b as monotherapy or in combination with ribavirin in chronic hepatitis delta*. Hepatology, 2006. **44**(3): p. 713-720. doi: 10.1002/hep.21296.
58. Sandmann, L., et al., *Addendum „Antivirale Therapie der chronischen Hepatitis-D-Virusinfektion“ zur S3-Leitlinie „Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-B-Virusinfektion“ der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS)*. Z Gastroenterol, 2023. **61**(12): p. 1635-1653. doi: 10.1055/a-2181-3046.
59. European Medicines Agency. *Hepcludex*. 2023, september 28 [accessed 2024-05-03]; URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/hepcludex>.
60. Turon-Lagot, V., et al., *Targeting the Host for New Therapeutic Perspectives in Hepatitis D*. Journal of clinical medicine, 2020. **9**(1): p. 222. doi: 10.3390/jcm9010222.

61. Lampertico, P., D. Roulot, and H. Wedemeyer, *Bulevirtide with or without pegIFN α for patients with compensated chronic hepatitis delta: From clinical trials to real-world studies*. J Hepatol, 2022. **77**(5): p. 1422-1430. doi: 10.1016/j.jhep.2022.06.010.
62. Degasperi, E., M.P. Anolli, and P. Lampertico, *Bulevirtide-based treatment strategies for chronic hepatitis delta: A review*. J Viral Hepat, 2023. **30 Suppl 1**: p. 26-32. doi: 10.1111/jvh.13811.
63. Wedemeyer, H., et al., *A Phase 3, Randomized Trial of Bulevirtide in Chronic Hepatitis D*. N Engl J Med, 2023. **389**(1): p. 22-32. doi: 10.1056/NEJMoa2213429.
64. Koh, C., et al., *A Phase 2 Study of Peginterferon Lambda, Lonafarnib and Ritonavir for 24 Weeks: End-of-Treatment Results from the LIFT HDV Study*. Journal of Hepatology, 2020. **73**: p. S130. doi: 10.1016/S0168-8278(20)30774-1.
65. Etzion, O., et al., *GS-012 - Week 48 results of the phase 3 D-LIVR study, a randomized double-blind, placebo-controlled trial evaluating the safety and efficacy of Lonafarnib-boosted with Ritonavir with or without Peginterferon Alfa in patients with chronic hepatitis delta*. Journal of Hepatology, 2023. **78**: p. S10. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(23\)00451-8](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(23)00451-8).
66. Buti, M., et al., *Management of chronic HBV-HDV patients chronic HBV-HDV infection: A review on new management options*. United European Gastroenterol J, 2024. **12**(2): p. 210-218. doi: 10.1002/ueg2.12494.
67. Shekhtman, L., et al., *Modelling hepatitis D virus RNA and HBsAg dynamics during nucleic acid polymer monotherapy suggest rapid turnover of HBsAg*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 7837. doi: 10.1038/s41598-020-64122-0.
68. Cornberg, M., et al., *S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-B-Virusinfektion – (AWMF-Register-Nr. 021-11) Z Gastroenterol*, 2021. **59**(7): p. 691-776. doi: 10.1055/a-1498-2512.
69. Robert Koch Institut. *Schutzimpfung gegen Hepatitis B*. 2022, june 06 [accessed 2024-05-02]; URL: https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Impfen/HepatitisB/FAQ-Liste_HepB_Impfen.html.
70. World Health Organization. Regional Office for the Western, P., *Viral hepatitis in Mongolia: situation and response 2015*. 2016, Manila: WHO Regional Office for the Western Pacific. p. 18.
71. Murphy, K., *Janeway Immunologie*. 9. Aufl. 2018 ed, ed. K. Murphy and C. Weaver. 2018, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. p. 4, 16-19, 36, 37, 206, 210, 294, 295.
72. Timm, J. and C.M. Walker, *Mutational escape of CD8+ T cell epitopes: implications for prevention and therapy of persistent hepatitis virus infections*. Med Microbiol Immunol, 2015. **204**(1): p. 29-38. doi: 10.1007/s00430-014-0372-z.
73. Allen, T.M., et al., *Selection, transmission, and reversion of an antigen-processing cytotoxic T-lymphocyte escape mutation in human immunodeficiency virus type 1 infection*. J Virol, 2004. **78**(13): p. 7069-78. doi: 10.1128/JVI.78.13.7069-7078.2004.

74. Milicic, A., et al., *CD8+ T cell epitope-flanking mutations disrupt proteasomal processing of HIV-1 Nef*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4618-4626. doi: 10.4049/jimmunol.175.7.4618.
75. Seifert, U., et al., *Hepatitis C virus mutation affects proteasomal epitope processing*. J Clin Invest, 2004. **114**(2): p. 250-259. doi: 10.1172/jci20985.
76. Timm, J., et al., *CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection*. J Exp Med, 2004. **200**(12): p. 1593-1604. doi: 10.1084/jem.20041006.
77. Walker, A., et al., *Distinct Escape Pathway by Hepatitis C Virus Genotype 1a from a Dominant CD8+ T Cell Response by Selection of Altered Epitope Processing*. J Virol, 2016. **90**(1): p. 33-42. doi: 10.1128/jvi.01993-15.
78. Kefalakes, H., et al., *Adaptation of the hepatitis B virus core protein to CD8 T-cell selection pressure*. Hepatology, 2015: p. 47-56. doi: 10.1002/hep.27771.
79. Tester, I., et al., *Immune evasion versus recovery after acute hepatitis C virus infection from a shared source*. J Exp Med, 2005. **201**(11): p. 1725-1731. doi: 10.1084/jem.20042284.
80. Goulder, P.J.R., et al., *Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS*. Nature Medicine, 1997. **3**(2): p. 212-217. doi: 10.1038/nm0297-212.
81. Phillips, R.E., et al., *Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition*. Nature, 1991. **354**(6353): p. 453-459. doi: 10.1038/354453a0.
82. Collins, D.R., G.D. Gaiha, and B.D. Walker, *CD8(+) T cells in HIV control, cure and prevention*. Nat Rev Immunol, 2020. **20**(8): p. 471-482. doi: 10.1038/s41577-020-0274-9.
83. Roggendorf, M., *Perspectives for a vaccine against hepatitis delta virus*. Semin Liver Dis, 2012. **32**(3): p. 256-261. doi: 10.1055/s-0032-1323631.
84. Huang, Y.H., et al., *Identification of novel HLA-A*0201-restricted CD8+ T-cell epitopes on hepatitis delta virus*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 10): p. 3089-3098. doi: 10.1099/vir.0.80183-0.
85. Schirdewahn, T., et al., *The Third Signal Cytokine Interleukin 12 Rather Than Immune Checkpoint Inhibitors Contributes to the Functional Restoration of Hepatitis D Virus-Specific T Cells*. J Infect Dis, 2017. **215**(1): p. 139-149. doi: 10.1093/infdis/jiw514.
86. Karimzadeh, H., et al., *Amino Acid Substitutions within HLA-B*27-Restricted T Cell Epitopes Prevent Recognition by Hepatitis Delta Virus-Specific CD8(+) T Cells*. J Virol, 2018. **92**(13): p. e01891-17. doi: 10.1128/JVI.01891-17.
87. Karimzadeh, H., et al., *Mutations in Hepatitis D Virus Allow It to Escape Detection by CD8(+) T Cells and Evolve at the Population Level*. Gastroenterology, 2019. **156**(6): p. 1820-1833. doi: 10.1053/j.gastro.2019.02.003.
88. Budeus, B., J. Timm, and D. Hoffmann, *SeqFeatR for the Discovery of Feature-Sequence Associations*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0146409. doi: 10.1371/journal.pone.0146409.

89. Imazeki, F., Omata, M. and Ohto, M. *Hepatitis Delta Virus HDVJS (X60193.1)*. 1991 [accessed 2020-11-20]; URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X60193>.
90. Casey, J.L., Brown, T.L., Colan, E.J., Wignall, F.S. and Gerin, J.L. *Hepatitis delta virus antigen gene, complete cds, and autocleavage/ligation sites (L22063.1)*. 1993 [accessed 2020-11-20]; URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/L22063>.
91. Wu, J.C., Chiang, T.Y. and Sheen, I.J. *Hepatitis D virus TW-2b (Taiwan isolate) delta antigen gene, complete cds (AF018077.1)*. 1998 [accessed 2020-11-20].
92. Radjef, N., Gordien, E., Ivaniushina, V., Gault, E., Anais, P., Drugan, T., Trinchet, J.C., Roulot, D., Tamby, M., Milinkovitch, M.C. and Deny, P. *Hepatitis D virus mRNA for Large HD antigen (LHD gene), strain dFr-910 (AJ584848.1)*. 2003 [accessed 2020-11-20]; URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AJ584848>.
93. Radjef, N., Gordien, E., Ivaniushina, V., Gault, E., Anais, P., Drugan, T., Trinchet, J.C., Roulot, D., Tamby, M., Milinkovitch, M.C. and Deny, P. *Hepatitis D virus mRNA for Large HD antigen (LHD gene), strain dFr-48 (AJ584847.1)*. 2003 [accessed 2020-11-20]; URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AJ584847>.
94. Radjef, N., Gordien, E., Ivaniushina, V., Gault, E., Anais, P., Drugan, T., Trinchet, J.C., Roulot, D., Tamby, M., Milinkovitch, M.C. and Deny, P. *Hepatitis D virus mRNA for small HD antigen (sHD gene), strain dFr-45 (AJ584844.1)*. 2003 [accessed 2020-11-20]; URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AJ584844>.
95. Radjef, N., Gordien, E., Ivaniushina, V., Gault, E., Anais, P., Drugan, T., Trinchet, J.C., Roulot, D., Tamby, M., Milinkovitch, M.C. and Deny, P. *Hepatitis D virus mRNA for small HD antigen (sHD gene), strain dFr-644 (AJ584849.1)*. 2003 [accessed 2020-11-20]; URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AJ584849>.
96. Magnius, L., et al. *Deltavirus*. 2018 [accessed 2020-11-24]; URL: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/w/deltavirus.
97. Guindon S., D.J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. *PhyML 3.0: new algorithms, methods and utilities*. [PhyML online execution] 2010 [accessed 2020-12-08]; URL: <http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>.
98. Stamatakis, A., *RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies*. Bioinformatics, 2014. **30**(9): p. 1312-1313. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033.
99. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. *Immune Epitope Database & Tools*. 2020 [accessed 2020-10-22]; URL: <http://www.iedb.org>.
100. Guindon, S., et al., *New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0*. Syst Biol, 2010. **59**(3): p. 307-321. doi: 10.1093/sysbio/syq010.
101. Gonzalez-Galarza, F.F., et al., *Allele frequency net database (AFND) 2020 update: gold-standard data classification, open access genotype data and new query tools*. Nucleic Acids Res, 2020. **48**(D1): p. D783-D788. doi: 10.1093/nar/gkz1029.
102. Tokunaga, K. *Mongolia Buryat*. 2006 [accessed 2020-10-16]; URL: http://www.allelefrequencies.net/hla6006a.asp?hla_population=2031.

103. Machulla, H. *Mongolia Khalkha*. 2003 [accessed 2020-10-16]; URL: http://www.allele frequencies.net/hla6006a.asp?hla_population=1426.
104. Tsuji, K. *Mongolia Khalkha pop 2*. 1997 [accessed 2020-10-16]; URL: http://www.allele frequencies.net/hla6006a.asp?hla_population=1917.
105. Machulla, H. *Mongolia Oold*. 2003 [accessed 2020-10-16]; URL: http://www.allele frequencies.net/hla6006a.asp?hla_population=1427.
106. Munkhbat, B. *Mongolia Tarialan Khoton*. 1997 [accessed 2020-10-16]; URL: http://www.allele frequencies.net/hla6006a.asp?hla_population=1833.
107. Machulla, H. *Mongolia Tsaatan*. 2003 [accessed 2020-10-16]; URL: http://www.allele frequencies.net/hla6006a.asp?hla_population=1428.
108. Munkhbat, B. *Mongolia Ulaanbaatar Khalkha*. 1997 [accessed 2020-10-16]; URL: http://www.allele frequencies.net/hla6006a.asp?hla_population=1834.
109. Kefalakes, H., et al., *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*, 2019. **156**(6): p. 1805-1819 e9. doi: 10.1053/j.gastro.2019.01.035.
110. Klenerman, P. and A. McMichael, *AIDS/HIV. Finding footprints among the trees*. *Science*, 2007. **315**(5818): p. 1505-7. doi: 10.1126/science.1140768.
111. Carlson, J.M., et al., *Correlates of protective cellular immunity revealed by analysis of population-level immune escape pathways in HIV-1*. *J Virol*, 2012. **86**(24): p. 13202-13216. doi: 10.1128/jvi.01998-12.
112. Schwartz, T., *Analyse der Sequenzvariabilität des Hepatitis B Virus unter dem Einfluss der CD8 T-Zellantwort auf Populationsebene*, in *Institut für Virologie 2022*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. p. 169.
113. Akya, A., et al., *Identification of HLA-I restricted epitopes in six vaccine candidates of Leishmania tropica using immunoinformatics and molecular dynamics simulation approaches*. *Infect Genet Evol*, 2019. **75**: p. 103953. doi: 10.1016/j.meegid.2019.103953.
114. Sankar, S., et al., *Identification of B- and T-cell epitopes on HtrA protein of Orientia tsutsugamushi*. *J Cell Biochem*, 2019. **120**(4): p. 5869-5879. doi: 10.1002/jcb.27872.
115. Salimi Alizei, E., et al., *Mutational escape from cellular immunity in viral hepatitis: variations on a theme*. *Curr Opin Virol*, 2021. **50**: p. 110-118. doi: 10.1016/j.coviro.2021.08.002.
116. Oberhardt, V., et al., *Adaptive Immune Responses, Immune Escape and Immune-Mediated Pathogenesis during HDV Infection*. *Viruses*, 2022. **14**(2). doi: 10.3390/v14020198.
117. Takahashi, M., et al., *High prevalence of antibodies to hepatitis A and E viruses and viremia of hepatitis B, C, and D viruses among apparently healthy populations in Mongolia*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004. **11**(2): p. 392-398. doi: 10.1128/cdli.11.2.392-398.2004.

118. Magvan, B., et al., *Sequence diversity of hepatitis D virus in Mongolia*. Front Med (Lausanne), 2023. **10**: p. 1108543. doi: 10.3389/fmed.2023.1108543.
119. Chang, S.Y., et al., *Molecular epidemiology of hepatitis D virus infection among injecting drug users with and without human immunodeficiency virus infection in Taiwan*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(3): p. 1083-1089. doi: 10.1128/jcm.01154-10.
120. Oyunsuren, T., et al., *High frequency of hepatocellular carcinoma in Mongolia; association with mono-, or co-infection with hepatitis C, B, and delta viruses*. J Med Virol, 2006. **78**(12): p. 1688-1695. doi: 10.1002/jmv.20755.
121. Edstam, J.S., et al., *Comparison of hepatitis B vaccine coverage and effectiveness among urban and rural Mongolian 2-year-olds*. Prev Med, 2002. **34**(2): p. 207-214. doi: 10.1006/pmed.2001.0972.
122. World Health Organization. *Mongolia: Progress towards Universal Health Coverage through strengthening primary health care*. 2019, december 19 [accessed 2023-05-20]; URL: <https://www.who.int/westernpacific/news-room/feature-stories/item/mongolia-progress-towards-universal-health-coverage-through-strengthening-primary-health-care>.
123. Martinez, M.A. and S. Franco, *Therapy Implications of Hepatitis C Virus Genetic Diversity*. Viruses, 2020. **13**(1). doi: 10.3390/v13010041.
124. Tsatsralt-Od, B., et al., *High prevalence of dual or triple infection of hepatitis B, C, and delta viruses among patients with chronic liver disease in Mongolia*. J Med Virol, 2005. **77**(4): p. 491-499. doi: 10.1002/jmv.20482.
125. Tsatsralt-Od, B., et al., *High prevalence of hepatitis B, C and delta virus infections among blood donors in Mongolia*. Arch Virol, 2005. **150**(12): p. 2513-2528. doi: 10.1007/s00705-005-0590-1.
126. Walker, A., et al., *Genetic structure of SARS-CoV-2 reflects clonal superspreading and multiple independent introduction events, North-Rhine Westphalia, Germany, February and March 2020*. Euro Surveill, 2020. **25**(22). doi: 10.2807/1560-7917.Es.2020.25.22.2000746.
127. Walker, A., et al., *Characterization of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection Clusters Based on Integrated Genomic Surveillance, Outbreak Analysis and Contact Tracing in an Urban Setting*. Clin Infect Dis, 2022. **74**(6): p. 1039-1046. doi: 10.1093/cid/ciab588.
128. Smith, M.R., et al., *Rapid incidence estimation from SARS-CoV-2 genomes reveals decreased case detection in Europe during summer 2020*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 6009. doi: 10.1038/s41467-021-26267-y.
129. Robert Koch Institut. *Epidemiologischer Steckbrief zu SARS-CoV-2 und COVID-19*. 2021, november 26 [accessed 2023-03-16]; URL: https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Steckbrief.html?nn=13490888#doc13776792bodyText2.
130. Tobler, K., M. Ackermann, and C. Fraefel, *Allgemeine Virologie*. 2021, Stuttgart, Deutschland: Haupt. p. 29, 30, 197, 198.
131. Kohsar, M., et al., *Human hepatitis D virus-specific T cell epitopes*. JHEP Rep, 2021. **3**(4): p. 100294. doi: 10.1016/j.jhepr.2021.100294.

132. Kefalakes, H., et al., *Liver-Resident Bystander CD8(+) T Cells Contribute to Liver Disease Pathogenesis in Chronic Hepatitis D Virus Infection*. *Gastroenterology*, 2021. **161**(5): p. 1567-1583.e9. doi: 10.1053/j.gastro.2021.07.027.
133. Habermann, D., et al., *HAMdetector: a Bayesian regression model that integrates information to detect HLA-associated mutations*. *Bioinformatics*, 2022. **38**(9): p. 2428-2436. doi: 10.1093/bioinformatics/btac134.
134. Trolle, T., et al., *Automated benchmarking of peptide-MHC class I binding predictions*. *Bioinformatics*, 2015. **31**(13): p. 2174-2181. doi: 10.1093/bioinformatics/btv123.
135. Lai, M.M., *RNA replication without RNA-dependent RNA polymerase: surprises from hepatitis delta virus*. *J Virol*, 2005. **79**(13): p. 7951-7958. doi: 10.1128/jvi.79.13.7951-7958.2005.
136. Chen, Y.S., et al., *ERK1/2-mediated phosphorylation of small hepatitis delta antigen at serine 177 enhances hepatitis delta virus antigenomic RNA replication*. *J Virol*, 2008. **82**(19): p. 9345-58. doi: 10.1128/jvi.00656-08.
137. Shirvani-Dastgerdi, E., et al., *Comprehensive analysis of mutations in the hepatitis delta virus genome based on full-length sequencing in a nationwide cohort study and evolutionary pattern during disease progression*. *Clin Microbiol Infect*, 2015. **21**(5): p. 510.e11-510e23. doi: 10.1016/j.cmi.2014.12.008.
138. Chang, M.F., et al., *Functional domains of delta antigens and viral RNA required for RNA packaging of hepatitis delta virus*. *J Virol*, 1995. **69**(4): p. 2508-2514. doi: 10.1128/jvi.69.4.2508-2514.1995.
139. Moore, C.B., et al., *Evidence of HIV-1 adaptation to HLA-restricted immune responses at a population level*. *Science*, 2002. **296**(5572): p. 1439-1443. doi: 10.1126/science.1069660.
140. Gaudieri, S., et al., *Evidence of viral adaptation to HLA class I-restricted immune pressure in chronic hepatitis C virus infection*. *J Virol*, 2006. **80**(22): p. 11094-11104. doi: 10.1128/jvi.00912-06.
141. Moore, C.B., et al., *Evidence of HIV-1 adaptation to HLA-restricted immune responses at a population level*. *Science*, 2002. **296**(5572): p. 1439-43. doi: 10.1126/science.1069660.

6 Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------------|---|----|
| Abb. 1.1: | Stabförmige Sekundärstruktur des HDV-RNA-Genoms | 4 |
| Abb. 1.2: | HDV-Virion | 6 |
| Abb. 1.3: | Antikörper gegen das Hepatitis D Virus (anti-HDV)-Prävalenz in Hepatitis B Oberflächen-Antigen (HBsAg)-Trägern | 7 |
| Abb. 1.4: | Geographische Verteilung der HDV-Genotypen 1 bis 8 | 9 |
| Abb. 1.5: | Antigenerkennung von cytotoxischen CD8 ⁺ T-Zellen | 18 |
| Abb. 3.1: | HBV-/HDV-Prävalenz in der HepMongolia-Kohorte | 38 |
| Abb. 3.2: | Vergleich der Quantifizierung HDV-RNA-positiver Proben mittels hausinterner <i>TaqMan-PCR</i> | 39 |
| Abb. 3.3: | Schematische Darstellung der Viruslast HDV-RNA-positiver Proben | 40 |
| Abb. 3.4: | Schematische Darstellung der Prävalenz HDV-RNA-positiver Probanden, HBV-geimpfter Probanden, Probanden mit durchgemachter HBV-Infektion und Probanden ohne nachweisbaren HBV-Kontakt innerhalb der jeweiligen mongolischen Herkunftsregionen | 44 |
| Abb. 3.5: | Etablierung der <i>Semi-nested-PCR</i> für die HDV-RNA-positiven Proben der HepMongolia-Kohorte | 46 |
| Abb. 3.6: | Amplifikation und Sequenzierung des <i>Large-Hepatitis Delta Antigen (L-HDAg)</i> | 46 |
| Abb. 3.7: | Optimierung der Temperatur für die Anlagerung der HDV-spezifischen <i>Primer</i> mittels <i>Gradienten-PCR</i> | 47 |
| Abb. 3.8: | Amplifikation des <i>Large-Hepatitis Delta Antigen (L-HDAg)</i> und Visualisierung der Amplifikationsprodukte mittels Kapillarelektrophorese | 49 |
| Abb. 3.9: | Phylogenetischer Baum basierend auf einer Distanzanalyse zur Klassifikation der mongolischen Deltavirusisolate in HDV-Genotypen 1 bis 8 (HDV-1 bis 8) | 50 |
| Abb. 3.10: | Phylogenetischer Baum basierend auf einer Distanzanalyse zur Klassifikation der mongolische Deltavirusisolate in HDV-Genotyp 1 Subtypen | 52 |
| Abb. 3.11: | HLA-A-Allelfrequenzen der HepMongolia Kohorte und sieben mongolischer Populationen der <i>Allele Frequency Net Database</i> | 56 |
| Abb. 3.12: | HLA-B-Allelfrequenzen der HepMongolia Kohorte und sieben mongolischer Populationen der <i>Allele Frequency Net Database</i> | 57 |
| Abb. 3.13: | Signifikante Assoziationen zwölf viraler Sequenzpolymorphismen innerhalb des <i>Small-Hepatitis Delta Antigen (S-HDAg)</i> mit HLA-Klasse I-Allelen | 60 |

| | |
|--|----|
| Abb. 3.14: Häufigkeit viraler Sequenzpolymorphismen in einem an <i>MHC</i> -Klasse-I-Moleküle bindenden Peptid HLA-B*37-positiver Probanden ... | 63 |
| Abb. 3.15: Signifikante virale Sequenzpolymorphismen in zwei an <i>MHC</i> -Klasse-I-Moleküle bindenden Peptide HLA-A*33- und A*68-positiver Probanden | 64 |
| Abb. 3.16: Virale Sequenzpolymorphismen sparen das hintere Drittel des <i>Small</i> -Hepatitis Delta Antigen (S-HDAg) aus | 66 |
| Abb. 4.1: Herkunft der Proben der HepMongolia-Kohorte mit phylogenetischem Baumausschnitt des <i>Clusters</i> für den HDV-Subtyp 1c | 70 |
| Abb. 4.2: Phylogenetischer Baum der HepMongolia-Sequenzen zur Darstellung lokaler Übertragungseignisse | 73 |
| Abb. 4.3: HLA- <i>footprints</i> sparen funktionell wichtige Aminosäure (AS)-Positionen des <i>Small</i> -Hepatitis Delta Antigen (S-HDAg) aus | 83 |

7 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Chemikalien aufgeführt mit Namen und Herstellerangaben | 23 |
| Tabelle 2: <i>Primer</i> der <i>Real-time PCR</i> , <i>Semi-nested-PCR</i> und der Sequenzierung | 24 |
| Tabelle 3: Enzyme aufgeführt mit Namen und Herstellerangaben | 25 |
| Tabelle 4: Sonstige Materialien aufgeführt mit Namen und Herstellerangaben | 25 |
| Tabelle 5: Verwendete Geräte aufgeführt mit Gerätetyp, Namen und Herstellerangaben | 26 |
| Tabelle 6: <i>TaqMan-PCR</i> -Programm zum quantitativen Nachweis von HDV-RNA im Serum | 30 |
| Tabelle 7: HDV-Genotyp 1 bis 8 klassifizierte Sequenzen | 35 |
| Tabelle 8: Herkunft der mongolischen Proben der HepMongolia-Kohorte untergliedert in Hepatitis B Oberflächen-Antigen (HBsAg) reaktiv und HDV-RNA positiv ... | 41 |
| Tabelle 9: Herkunft der mongolischen Hepatitis B Oberflächen-Antigen (HBsAg)-nicht-reaktiven Proben der HepMongolia-Kohorte untergliedert in geimpfte Probanden, Probanden einer durchgemachten HBV-Infektion und Probanden ohne nachweisbaren HBV-Kontakt | 42 |
| Tabelle 10: Herkunft der <i>Clades</i> 1-I bis 1-III formierenden Proben potenzieller neuer HDV-Genotyp 1 Subtypen | 53 |
| Tabelle 11: Genetische Variabilität innerhalb des HDV-Genotyps 1 | 54 |
| Tabelle 12: Signifikante Assoziation viraler Sequenzpolymorphismen mit HLA-Klasse I-Allelen | 59 |
| Tabelle 13: Virale Sequenzpolymorphismen assoziiert mit HLA-Klasse I-Allelen und lokalisiert in Peptiden, die an <i>MHC</i> -Klasse-I-Molekülen binden | 62 |
| Tabelle 14: Liste der HLA-assoziierten Mutationen (<i>HLA-associated Mutations</i> , <i>HAMs</i>) innerhalb des Hepatitis Delta Antigens (HDAg) der HepMongolia-Kohorte und vorher identifizierten <i>HAMs</i> beschrieben von Habermann et al. | 77 |
| Tabelle 15: Virale Sequenzpolymorphismen assoziiert mit HLA-Klasse I-Allelen und lokalisiert in flankierenden Regionen von <i>MHC</i> -Klasse-I-Molekül bindenden Peptiden | 81 |

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Jörg Timm für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Möglichkeit an diesem spannenden Projekt mitzuarbeiten, während meiner Zeit im Labor viel Neues zu lernen, die Unterstützung und die aufbauenden Worte vor meiner Posterpräsentation.

Ebenso danke ich meiner Zweitbetreuerin Prof. Dr. med. Verena Keitel-Anselmino für die langjährige, hilfsbereite Projektbegleitung.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Dr. Andreas Walker bedanken für die ansteckende Projektbegeisterung, die ausgezeichnete Betreuung, die vielen Erklärungen, Ratschläge, Diskussionen und Ermutigungen, die mir stets weitergeholfen haben.

Ein großer Dank gilt der Zusammenarbeit mit dem *Department of Microbiology and Infection Prevention and Control* der *Mongolian National University of Medical Sciences* (Ulaanbaatar), besonders Battur Mavgan, Davaadorj Batchuluun, Gerelmaa Enebish, Anuujin Gantumur und Battogtokh Chimeddorj. Ohne die gemeinsame Arbeit und den regen Austausch wäre dieses Projekt nicht zustande gekommen. Besonders hat mich gefreut, dass dieser Austausch nicht nur virtuell, sondern auch persönlich möglich war.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe, insbesondere Tatjana Schwarz, Eugen Bäcker und Alexandra Graupner für das angenehme Arbeitsklima, die Hilfsbereitschaft und die Geduld mit mir.

Für die ausgezeichnete Zusammenarbeit bezüglich der HLA-Typisierung danke ich Johannes C. Fischer.

Meinen Eltern, meinem Freund und meinen zwei engsten Studienfreundinnen danke ich für ihre Begleitung während der gesamten Dissertation. Ihr habt mich ermutigt und hattet immer ein offenes Ohr. Euer Zuspruch hat es mir ermöglicht, diese Arbeit erfolgreich abzuschließen. Zum Schluss gilt mein Dank meiner Tante für die Durchsicht dieser Arbeit.