UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Innere Medizin
I. Medizinische Klinik und Poliklinik

Direktor Prof. Dr. med. Ansgar W. Lohse

Bestimmung der Breite und Spezifität der Hepatitis Delta Virus (HDV)-spezifischen T-Zellantwort

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Johanna Landahl geb. Blöcker
aus Duisburg

Hamburg 2021

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 21.06.2022

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende:	**PD Dr. Susanne Polywka**
Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter:	**Prof. Dr. Julian Schulze zur Wiesch**
Prüfungsausschuss, dritte Gutachterin:	**Prof. Dr. Maura Dandri**

Meinem Ehemann gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1 Artikel 5
2 Darstellung der Publikation 15
2.1 Einleitung 15
2.2 Arbeitshypothese 17
2.3 Material & Methoden 17
2.3.1 Patient*Innen-Kohorte 17
2.3.2 HDV-Peptide 17
2.3.4 ELISpot-Assays 18
2.3.5 Durchflusszytometrie und Intrazellulärfärbung von Interferon-γ 19
2.3.6 HLA-Binding: in silico Prädiktionen und in vitro Assays 19
2.3.7 Statistische Analyse 20
2.4 Ergebnisse 20
2.4.1 Nachweis von HDV-spezifischen T-Zellantworten nach Kurzzeitkultivierung und IL-2-Supplementierung 20
2.4.2 HDV-spezifische T-Zellantwort ist unabhängig von der bestehenden HDV Viruslast der Patient*Innen, korreliert aber mit der bestehenden HBV Viruslast 21
2.4.3 Bestimmung der HLA-Restriktionen ausgewählter HDV-Epitope 22
2.4.4 Bestimmung der minimalen Epitop-Länge der HDV-Peptide 22
2.4.5 Longitudinale ex vivo Messung von HDV-spezifischen T-Zellantworten eines Patienten mit akuter HBV/HDV Superinfektion 22
2.5 Diskussion 23
3 Zusammenfassung 26
4 Summary 27
5 Literaturverzeichnis 28
6 Erklärung des Eigenanteils 31
7 Danksagung 32
8 Lebenslauf 33
9 Eidesstattliche Erklärung 35

1 Artikel

The Journal of Infectious Diseases

MAJOR ARTICLE

Detection of a Broad Range of Low-Level Major Histocompatibility Complex Class II–Restricted, Hepatitis Delta Virus (HDV)–Specific T-Cell Responses Regardless of Clinical Status

Johanna Landahl,[1] Jan Hendrik Bockmann,[1,4] Christoph Scheurich,[1] Christin Ackermann,[1] Verena Matzat,[1] Janna Heide,[1,4] Tungalag Nuurei,[3] Gianluca D'Antonio,[1] Johann von Felden,[1] Alessandro Sette[5], Sven Peine,[2] Ansgar W. Lohse,[1,4] Marc Luetgehetmann,[3,4] Matthias Marget,[2] John Sidney,[5] and Julian Schulze zur Wiesch[1,4]

[1]I. Department of Medicine, Section Infectious Diseases, [2]Department of Transfusion Medicine, and [3]Department of Medical Microbiology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, and [4]German Center for Infection Research Partner Site, Hamburg, Germany; and [5]La Jolla Institute for Allergy and Immunology, California

Background. This study aimed to comprehensively define the breadth and specificity of the hepatitis delta virus (HDV)–specific T-cell response in patients at different stages of chronic coinfection with hepatitis B virus (HBV).

Methods. Following in vitro stimulation with an overlapping set of 21 HDV-specific 20mer peptides and exogenous interleukin 2, HDV-specific CD4$^+$ and CD8$^+$ T-cell responses of 32 HDV-infected patients were analyzed by enzyme-linked immunospot analysis and intracellular cytokine staining for interferon γ production at the single-peptide level. Additionally, HLA-binding studies were performed both in silico and in vitro.

Results. We were able to detect ≥1 T-cell response in >50% our patients. Interestingly, there was no significant difference between the breadth of the response in patients positive and those negative for HDV by PCR. HDV-specific T-cell responses focused on 3 distinct HDV-specific epitopes that were each detected in 12%–21% of patients—2 HLA class II–restricted epitopes (amino acids 11–30 and 41–60) and 1 major histocompatibility complex class I–restricted epitope (amino acids 191–210). In in vitro HLA-binding assays, the 2 CD4$^+$ T-cell specificities (amino acids 11–30 and 41–60) showed promiscuous binding to multiple HLA-DR molecules.

Conclusions. This comprehensive characterization of HDV T-cell epitopes provides important information that will facilitate further studies of HDV immunopathogenesis.

Keywords. Hepatitis delta; HDV; CD4$^+$; CD8$^+$; T-cell epitope; HLA binding.

There are about 10 million–15 million people coinfected with hepatitis B virus (HBV) and hepatitis D virus (HDV). HDV infection is associated with severe liver disease, cirrhosis, and liver cancer, and there are only limited treatment options available [1]. The HDV viral genome encodes 2 isotypes of the only antigen, which differ by 16 additional amino acids at the C-terminal end, resulting in the small HDV antigen (S-HDAg; 198 amino acids) and large HDAg (L-HDAg; 214 amino acids) [2, 3]. So far, 8 HDV genotypes have been described, with a mainly endemic distribution, although genotype 1 has been found worldwide; therefore, most immunological T-cell studies, as well as the current one, are using genotype 1 sequence-based peptide sets [4].

While full small HBV surface antigen (HBsAg) seroconversion leads to elimination of HDV viremia, few patients reach spontaneous or interferon alfa treatment–induced resolution of HDV viremia with ongoing HBV viremia [1]. The exact mechanisms that lead to control of HDV viremia have not been fully defined, and detailed immunological studies are mostly lacking.

An early study suggested that the presence of a HDV-specific proliferative CD4$^+$ T-cell response against HDV proteins correlated with the absence of HDV immunoglobulin M (IgM), but HDV viremia was not assessed in detail [5]. A recent large study could also only detect weak HDV-specific T-cell responses against HDV peptide pools. CD8$^+$ T cells of HDV-infected patients showed markers of senescence, and responses could be partially recovered using PD-1 blockade or addition of interleukin 12 [6]. Relatively few studies have comprehensively looked at the HDV-specific T-cell response at the epitope level in patients with differing disease courses, and few HDV

Received 7 May 2018; editorial decision 8 September 2018; accepted 21 September 2018; published online September 23, 2018.

Presented in part: 71, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs-und Stoffwechselkrankheiten, Hamburg, Germany, 21–24 September 2016. Abstract A-814-0004-00623. 46th Annual Meeting of the German Society for Immunology, Hamburg, Germany, 27–30 September 2016; ID 301. 6th European Congress of Virology, Hamburg, Germany, 19–22 October 2016. Abstract A-820-0005-00551.

Correspondence: J. Schulze zur Wiesch, MD, I. Department of Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg, Germany (julianszw@gmail.com).

The Journal of Infectious Diseases® 2019;219:568–77

© The Author(s) 2018. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, e-mail: journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/infdis/jiy549

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/article/219/4/568/5106138 by guest on 03 October 2021

T-cell epitopes have been identified [4–7]. In the current study, we comprehensively assessed the HDV-specific T-cell response at the single-peptide level. We found low-level HDV-specific $CD4^+$ T-cell and $CD8^+$ T-cell responses after short-term culture, regardless of the clinical status.

MATERIAL AND METHODS

Patient Cohort

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 32 HBV/HDV-coinfected patients, 6 HBV-monoinfected patients, and 7 uninfected healthy controls were collected at the University Medical Center Hamburg-Eppendorf and stored in liquid nitrogen (temperature, −196°C). Written informed consent was given by all patients, and the study was approved by the local ethics board of the Ärztekammer Hamburg. HDV coinfection was verified by HDV antibody testing using a competitive enzyme immunoassay (Diasorin, Saluggia, Italy). The HBV load was quantified by the HBV RealStar Assay (Altona Diagnostics, Hamburg, Germany); the HDV RNA load, genotype, and sequence were determined as previously described [8–10]. Additionally, patient samples were tested for HBsAg levels and HBe antigen status, and treatment history was assessed by thorough chart review. Patients were stratified into 2 groups. Group 1 (n = 18) was defined as antibody positive and HDV PCR positive at the time of sampling, and group 2 (13 participants) was defined as antibody (Ab) positive and (repeatedly) HDV PCR negative. We were able to study 1 patient with acute HDV infection. Clinical and immunological patient characteristics are summarized in Table 1.

HDV Peptides

Twenty-one 20mer peptides overlapping by 10 amino acids were synthesized, corresponding to the amino acid sequences of genotype 1 L-HDAg as previously published [4], and were pooled into 2 pools of 10 and 11 peptides. (peptides&elephants, Hennigsdorf, Germany; Table 2). Peptides were then used at a final concentration of 20 µg/mL. Further peptides for truncation experiments were also synthesized.

HLA Typing

High-definition molecular typing of HLA class I and II was performed at the Institute of Transfusion Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, by sequence-specific oligonucleotide–primed polymerase chain reaction (PCR), using the commercial kit SSO LabType (One Lambda, Canoga Park, CA) [11].

Bulk Stimulation of PBMCs

Cryopreserved PBMCs were thawed and cultivated at a concentration of 2×10^6–5×10^6 cells/mL for optimal results in 2 mL of R10 medium (Roswell Park Memorial Institute 1640 medium with 10% fetal calf serum [Sigma Aldrich], 1% HEPES, and 1% penicillin-streptomycin). PBMCs were stimulated with HDV peptide pools 1 or 2 at a final concentration of 20 µg/mL and recombinant interleukin 2 (IL-2; 50 U/mL) [12]. After 10–12 days, cells were assayed for interferon γ (IFN-γ) production by an enzyme-linked immunosorbent (ELISpot) assay and intracellular cytokine staining in response to restimulation with single HDV peptides, as previously described [12].

ELISpot Assay

ELISpot assays were performed as previously described [12–14]. Responses were considered positive if the number of spots was at least twice the number of spots in the negative control; PMA/ionomycin served as a positive control. All positive responses were reconfirmed by an intracellular cytokine assay following stimulation with the corresponding peptide.

Intracellular IFN-γ Staining and Flow Cytometry

Intracellular cytokine staining was performed as previously described [12, 13]. A total of 5×10^5 PBMCs were stimulated with the corresponding HDV peptide at a final concentration of 20 µg/mL before blocking the secretion with 10 µg/mL of brefeldin A (Sigma Aldrich) 1 hour after stimulation. The cells were then incubated at 37°C overnight and stained with the Zombie NIR Fixable Viability kit for live cells, as well as surface Abs anti-CD3, anti-CD4, and anti-CD8 (BioLegend). After fixation and permeabilization (eBioscience), cells were stained with anti–IFN-γ Ab and anti-CD154 Ab (BioLegend). The cells were analyzed on a BD LSR II Fortessa (BD Biosciences).

HLA Binding: In Silico Prediction and In Vitro Binding Assays

The major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II in silico binding predictions were made using the IEDB analysis resource Consensus tool [15–17], combining predictions from ANN [18, 19] and SMM [20]. In vitro binding assays were performed as described earlier [21], using purified HLA-DR molecules and the complete set of peptides.

Statistical Analysis

All flow cytometry data were analyzed using FlowJo, version 10.0.8, software (Treestar, Ashland, OR). Statistical analysis was performed using Prism 6.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA). The Mann-Whitney test or the Kruskal-Wallis test with the Dunn post hoc test were performed for data from all samples, for intergroup comparisons. Spearman correlation was performed for bivariate correlation analyses. All data are expressed as means with standard deviations or with standard errors of mean. P values ≤.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Detection of Multiple Low-Level HDV-Specific T-Cell Responses After In Vitro Cultivation and Supplementation With IL-2

The breadth and specificity of the virus-specific T-cell response has not been characterized comprehensively beyond proliferative responses against whole HDV proteins or peptide pools

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/article/219/4/568/5106138 by guest on 03 October 2021

Table 1. Clinical, Virological, and Immunological Characteristics of Patients

Patient Group	Age, y/Sex	HDV Load, IU/mL	HBV Load, IU/mL	HBsAg Level, IU/L	HBeAg Status	ALT, U/L	Time of First Diagnosis	Genotype	Fibrosis Score	HDV T-Cell Responses, No.	History of IFN Treatment	History of Nucleos(t)ide Analog Therapy[a]
HDV Ab Pos, detectable HDV load												
P1	42/F	5980	<12	2327	Neg	62	5 y ago	1	4	4	Y	Y
P2	47/F	5180	650	7607	Neg	244	1 y ago	1	3.5	0	Y[b]	Y
P3	32/M	190 000	160	11 511	Pos	86	8 y ago	1	1.5	0	Y	Y
P4	41/M	180 000	2600	12 698	Neg	223	Unknown	ND	3.5	0	Y	Y[c]
P5	52/M	162 000	600	16 352	Neg	182	20 y ago	5	4	3	Y	Y
P6	35/M	570 000	<LLoD	17 924	ND	94	9 y ago	ND	4	3	Y[b]	Y
P7	56/M	29 000	380	9494	Neg	98	3 y ago	ND	4	0	Y	Y
P8	43/M	2 200 000	80	7817	Pos	58	24 y ago	1	0	0	Y	Y
P9	41/M	96 300	90	9816	Pos	70	16 y ago	1	1	1	Y[b]	Y
P10	42/M	89 200	30	9671	Neg	180	9 y ago	1	1.5	2	Y	Y
P11	42/M	364	30	2090	Neg	57	4 y ago	1	1.5	3	Y	Y
P12	49/F	850 000	80	10 736	Neg	89	Unknown	1	4	3	Y	Y
P13	32/M	<1000	<12	836	Neg	59	17 y ago	ND	4	3	Y	Y
P14	56/F	77 300	110	14 102	Neg	44	6 y ago	ND	4	0	N	Y
P15	27/F	210 000	220	23 252	Neg	60	2 mo ago	ND	4	0	N	N
P16	36/M	1400	200	20 804	Neg	67	12 y ago	ND	1	0	N	Y[c]
P17	71/F	86 000	20	6375	Neg	156	4 y ago	ND	4	2	N	Y
P18	36/F	8400	150	7782	Neg	68	Unknown	ND	4	0	N	N
HDV Ab Pos, undetectable HDV load												
N1	43/F	Neg	60 000	<0.5	Neg	34	5 mo ago	ND	0	1	N	N
N2	45/F	<LLoD	800 000 000	24 603	Neg	110	4 mo ago	ND	1.5	0	N	Y[c]
N3	42/M	<LLoD	<LLoD	Neg	Neg	201	1 mo ago	ND	0	5	N	N
N4	53/F	<LLoD	<LLoD	169	Neg	24	29 y ago	ND	4	2	N	Y
N5	36/F	<LLoD	630	7599	Neg	20	2 y ago	ND	0	0	N	N
N6	62/M	<LLoD	2450	770	Neg	34	3 y ago	ND	1	0	N	N
N7	64/M	<LLoD	<LLoD	2008	Neg	19	Unknown	ND	4	2	N	Y
N8	33/M	<LLoD	21 000	2156	Neg	23	At time of sampling	ND	1	0	N	N
N9	54/M	<LLoD	<LLoD	10	Neg	21	Unknown	ND	ND	1	N	Y
N10	48/F	<LLoD	54 000	477	Neg	21	Unknown	ND	ND	0	N	N
N11	58/M	<LLoD	70	95.48	Neg	30	13 y ago	ND	2	1	Y	Y
N12	38/M	<LLoD	190	615	Neg	37	17 y ago	ND	3	1	Y	N
N13	57/M	<LLoD	<LLoD	1.36	ND	52	24 y ago	ND	4	0	Y	Y
Acute HDV superinfection												
A1	39/M	100 000	36 000	5591	Neg	1848	At time of sampling	ND	1	1	N	Y

Abbreviations: Ab, antibody; ALT, alanine transaminase; F, female; HBeAg, hepatitis B virus e antigen; HBsAg, hepatitis B virus surface antigen; HBV, hepatitis B virus; HDV, hepatitis delta virus; IFN, interferon; LLoD, lower limit of detection; M, male; N, no; ND, no data; Neg, negative; Pos, positive; Y, yes.

[a]Either currently or in the past.

[b]Treatment <2 years ago.

[c]Start of treatment.

[4–6, 22]. To assess the HDV-specific T-cell response on an epitope level, we first looked at the ex vivo IFN-γ production by PBMCs, from select patients with chronic HDV infection, in response to single peptides of an overlapping 20mer HDV genotype 1–specific peptide set covering the entire L-HDAg (Table 2). With the exception of 1 patient with acute HDV infection (see below), we did not detect significant T-cell responses in the ex vivo ELISpot assay (data not shown). These results are in line with results of earlier studies that also only showed low-level responses by HBV/HDV-infected patients [4–6].

In a next step, we performed a comprehensive assessment of the HDV-specific T-cell response after cultivation for 10–12 days with HDV peptides and IL-2 in a cohort of 32 patients with HDV infection and different disease courses. Clinical and immunological characteristics of patients are summarized in Table 1. Technically, we divided our peptide set into 2 pools (Table 2) and started 2 parallel cell cultures per patient, stimulating them with either pool [23]. After HDV-specific in vitro cultivation for 10–12 days, an HDV-specific single peptide ELISpot assay was performed. Positive responses were confirmed by restimulation with single HDV-specific peptides and intracellular cytokine

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/article/219/4/568/5106138 by guest on 03 October 2021

Table 2. Sequence of Hepatitis Delta Virus Antigen

20mer Peptide	Amino Acid Position	Amino Acid Sequence
Pool 1		
Dp0	1–20	MSRSESKKNRGGREEILEQW
Dp1	11–30	GGREEILEQWVNGRKKLEEL
Dp2	21–40	VNGRKKLEELERDLRKIKKK
Dp3	31–50	ERDLRKIKKKIKKLEDENPW
Dp4	41–60	IKKLEDENPWLGNIKGILGK
Dp5	51–70	LGNIKGILGKKDKDGEGAPP
Dp6	61–80	KDKDGEGAPPAKRARTDQME
Dp7	71–90	AKRARTDQMEIDSGPRKRPL
Dp8	81–100	IDSGPRKRPLRGGFSDKERQ
Dp9	91–110	RGGFSDKERQDHRRRKALEN
Pool 2		
Dp10	101–120	DHRRRKALENKRKQLAGGGK
Dp11	111–130	KRKQLAGGGKSLSKEEEEEL
Dp12	121–140	SLSKEEEEELKRLTEEDERR
Dp13	131–150	KRLTEEDERRERRVAGPQVG
Dp14	141–160	ERRVAGPQVGGVNPLEGGSR
Dp15	151–170	GVNPLEGGSRGAPGGGFVPS
Dp16	161–180	GAPGGGFVPSMQGVPESPFT
Dp17	171–190	MQGVPESPFTRHGEGLGVRG
Dp18	181–200	RHGEGLGVRGGQGFPWDILF
Dp19	191–210	GQGFPWDILFPSDPPFSPQS
Dp20	195–214	PWDILFPSDPPFSPQSCRPQ

staining for IFN-γ production and CD154 surface upregulation after stimulation. We gated the CD8$^+$ T-cell responses for expression of CD8$^+$ and IFN-γ, whereas HDV-specific CD4$^+$ T-cell results were displayed as IFN-γ/CD154 double positive, to more specifically exclude bystander activation [24]. Positive responses were defined as CD4$^+$ T-cell and CD8$^+$ T-cell percentages of at least 0.02% within the respective gate [12, 13, 25]. Exemplary intracellular cytokine staining results are displayed in Figure 1A. With this sensitive in vitro assay approach, we were able to detect low-level responses in a majority of our HDV-infected patients (17 of 32 [53%]) but not in HBV-monoinfected patients or healthy controls (data not shown). Overall, 17 of 21 HDV 20mer peptides were recognized by at least 1 patient.

Patients recognized on average 1.2 peptides (range, 0–5 peptides), with a mean of 0.75 CD4$^+$ T-cell responses (range, 0–5 responses) and a mean of 0.44 CD8$^+$ T-cell responses (range, 0–4 response) per patient. An overview of the CD4$^+$ and CD8$^+$ T-cell response distribution pattern among the different peptides is depicted in Figure 1B; for the individual patient-specific HDV peptide response pattern, see Figure 2.

Breadth of the HDV-Specific T-Cell Response Correlates With HBV Viremia but Not HDV Viremia

Previous studies have described a correlation of patient response rates and disease activity [5]. Still, when comparing our results with disease parameters, such as the presence/absence of HDV viremia or the HDV load (Figure 3A) or the level of transaminases (data not shown), we were not able to see a significant correlation between the number of T-cell responses and clinical outcomes (neither for CD4$^+$ nor CD8$^+$ T-cell responses; data not shown). When comparing the size of the in vitro response in terms of the percentage of responding T cells between different patient groups, we could not see a correlation between HDV PCR status and the size of the response of either CD4$^+$ T cells (Figure 3B) or CD8$^+$ T cells (Figure 3C). The median percentage of IFN-γ/CD154 double-positive cells in the CD4$^+$ T-cell population among HDV Ab–positive, HDV PCR–negative patients was 0.043%, whereas the percentage of double-positive cells in the CD4$^+$ T cell population of PCR-negative patients was 0.053% (P = not significant). We also did not see a difference between the responses detected in patients with spontaneous versus treatment-induced HDV PCR negativity (data not shown). However, there was a negative correlation between the HBV load (but not with the HBsAg levels or HBeAg status; data not shown) and the number of detectable HDV-specific T-cell responses (Figure 3D).

Interestingly, many of those responses were detected in HDV PCR–positive patients with a history of interferon alfa therapy (and transient viral control; Supplementary Figure 1). A possible hypothesis could be the proliferation of virus-specific CD8$^+$ T cells in active disease and the presence of HDV antigen after transient viral control or, alternatively, the priming of new CD8$^+$ T-cell responses after the rebound [7]. Still, overall there was no clear correlation of the strength and breadth of the HDV-specific T-cell response and the clinical course of HDV infection or the control of HDV viremia. These findings are in line with results from Grabowski et al [4].

HLA Restriction of HDV Epitopes Inferred From Predicted and Measured MHC Binding Capacity

A total of 47% of the responses were focused on 3 peptide specificities that were each recognized by >10% of patients: amino acids 11–30, 41–60, and 191–210 (Figure 1B). The epitope composed of amino acids 191–210 was recognized by HDV-specific CD8$^+$ T cells, while the other 2 peptides were MHC class II restricted and recognized by HDV-specific CD4$^+$ T cells.

Previous studies involving the S-HDAg have suggested the presence of CD8$^+$ T-cell epitopes in the C-terminal region (amino acids 77–195) [26]. In agreement with these studies, the CD8$^+$ T-cell responses in the current study have mainly been focused on the C-terminus of the L-HDAg (amino acids 181–214; Figure 1B). To our knowledge, the actual HLA restricting allele has yet to be defined for any epitope in the C-terminal region [7]. In the present case, because we were working with a peptide length (20 amino acids) not ideal for MHC class I–binding experiments, to provide preliminary characterization of HLA restriction we performed in silico binding predictions for the peptides that triggered CD8$^+$ T-cell responses [27], as described in Materials and Methods, with the HLA-A and HLA-B alleles expressed in the respective responding patients (Supplementary Figure 2).

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/article/219/4/568/5106138 by guest on 03 October 2021

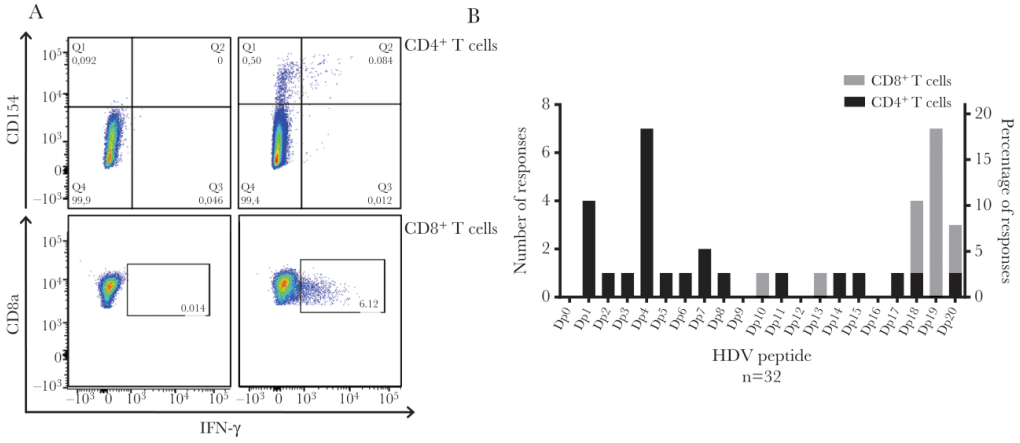

Figure 1. Intracellular cytokine staining (ICS) for interferon γ (IFN-γ) and CD154 expression by CD4+ and CD8+ T cells after stimulation with single hepatitis delta virus (HDV) peptides. *A*, Exemplary ICS dot blot of HDV-specific T-cell responses. The top 2 blots are gated for CD4+ T cells, with a negative control (left) and a positive peptide response against the HDV peptide composed of amino acids 51–70 (right) in patient N11. The bottom 2 blots are gated for CD8+ T cells, with a negative control (left) and a positive HDV peptide response against the peptide comprising amino acids 131–150 (right) in patient N3. *B*, Overview of the relative location of HDV T-cell responses detected by ≥1 patient against ≥1 of the 21 single HDV peptides. HDV-specific CD4+ T-cell responses are depicted in black, and HDV-specific CD8+ T-cell responses are shown in gray.

Subject	HLA Class I alleles			HLA Class II alleles			S-HDAg																		L-HDAg	
	HLA-A	HLA-B	HLA-C	DRB1	DQA1	DQB1	Dp0	Dp1	Dp2	Dp3	Dp4	Dp5	Dp6	Dp7	Dp8	Dp9	Dp10	Dp11	Dp12	Dp13	Dp14	Dp15	Dp16	Dp17	Dp18	Dp19	Dp20
P1	*01:01P, *25:01P	*18:01P, *57:01P	*06:02P, *12:03P	*14:04, *15:01	*01:04, *01:02	*05:03P, *06:02P																					
P2	*01:01P, *24:02P	*35:08, *44:05	*02:02P, *04:01P	*07:01P	*02:01	*02:02, *03:03P																					
P3	*29:02P, *68:02	*15:10, *47:02	*03:04P, *07:01P	*08:04, *13:03	*02:01, *05	*02:02, *03:01P																					
P4	*01:01P, *26:01P	*08:01P, *55:01	*03:03P, *07:01P	*01:01P, *03:01	*01:01, *05	*02:01, *05:01P																					
P5	*02:02P, *03:01P	*53:01P	*04:01P	*08:04, *11:02	*04:01, *05	*03:01P, *03:19																					
P6	*02:01P, *24:02P	*51:01P, *58:01P	*02:02P, *03:02P	*11:01P	*05	*03:01P																					
P7	*24:02P	*27:02, *44:02P	*02:02P, *16:04	*11:04, *13:01P	*01:03, *05	*03:01P, *06:03P																					
P8	*02:05P, *24:02P	*27:02, *50:01P	*06:02P, *12:03P	*07:01P	*02:01	*02:02																					
P9	*02:01P, *24:02P	*15:01P, *51:01P	*03:03P, *14:02P	*04:01, *07:01P		*03:02P, *03:03P																					
P10	*24:02P	*07:05P, *51:01P	*14:02P, *15:05P	*03:01, *13:03	*05	*02:01, *03:01P																					
P11	*01:01P, *02:17	*35:01P, *57:03	*04:01P, *07:01P	*08:01, *15:01		*04:02P, *06:02P																					
P12	*02:06P, *24:14	*35:01P, *54:01P	*01:02P, *04:01P	*04:05, *14:01P		*04:01P, *05:03P																					
P13	*03:02, *32:01P	*35:01P, *51:08	*04:01P, *16:02	*01:01P, *10:01	*01:01, *01:05	*03:01P																					
P14																											
P15	*01:01P, *32:01P	*38:01, *44:05	*02:02P, *12:03P	*01:01, *04:03	*01:01, *03	*03:05P, *05:01P																					
P16		*14:02P, *15:01P	*07:04P, *08:02P	*04:01, *07:01P	*02:01, *03	*02:02, *03:02P																					
P17	*02:01P, *29:01	*07:05P, *51:08	*15:05P, *16:02	*10:01, *16:02	*01:01, *01:02	*05:01P, *05:02P																					
P18	*02:01P, *25:01P	*18:01P	*12:03P	*13:01P, *15:01	*01:02, *01:03	*06:02P, *06:03P																					
N1	*11:01P, *31:01P	*40:06, *51:01P	*15:02P, *16:02P	*11:04, *15:02	*01:03, *05	*03:01P, *06:01P																					
N2	*03:01P, *31:01P	*35:01P, *51:01P	*04:01P, *15:02P	*14:01P	*01:04	*05:03P																					
N3	*02:02P, *03:01P	*15:01P, *41:01	*03:04P, *17:01P	*04:05, *10:01		*02:02, *05:01P																					
N4	*03:01P, *32:01P	*07:02P, *38:01P	*07:02P, *12:03P	*11:04, *13:03	*05	*03:01P																					
N5	*02:01P, *33:03P	*08:01P, *51:01P	*07:02P, *16:01P	*01:02, *03:01	*01:01, *05	*02:01, *05:01P																					
N6	*30:02P, *33:03P	*53:01P, *57:03	*04:01P, *07:01P	*07:01P, *08:04	*02:01, *06:01	*02:02, *03:19																					
N7	*68:01P, *69:01	*35:03P, *51:01P	*04:01P, *15:02P	*13:01P, *14:01P	*01:01, *01:03	*05:03P, *06:03P																					
N8	*02:01P, *03:01P	*18:03, *35:03P	*04:01P, *07:01P	*04:03, *11:04	*03, *05	*03:01P, *03:02P																					
N9	*24:02P, *68:02	*40:02P, *41:02	*02:02P, *17:03	*11:01P, *13:03	*05	*03:01P																					
N10	*24:02P	*44:02P, *51:01P	*15:06, *16:04	*11:04, *13:03	*05	*03:01P																					
N11	*24:02P, *26:01P	*38:01, *55:01P	*01:02P, *12:03P	*15:02, *16:01	*01:02, *01:03	*05:02P, *06:01P																					
N12	*03:01P, *68:02	*35:01P, *53:01P	*04:01P, *06:02P	*11:02, *13:04	*05	*03:01P																					
N13	*02:01P, *30:02P	*51:01P, *53:01P	*04:01P, *07:27	*03:01, *16:02	*01:02, *05	*02:01, *05:02P																					
A1	*02:01P, *03:01P	*07:02P, *51:05	*04:01P, *07:02P	*11:01P, *15:02	*01:03, *05	*03:01P, *06:01P																					

Figure 2. Overview of HLA type and corresponding peptide response in ICS.

For the epitope composed of amino acids 191–210, the in silico predictions suggested the presence of a one or more nested epitopes with the capacity to bind the HLA-B07 supertype alleles B*35:01/*51:01/*53:01 (Supplementary Figure 2). These predictions are in line with our intracellular cytokine staining results, since all 7 patients (P5, P6, P9, P11, P12, P13, and N1) who responded to the epitope composed of amino acids 191–210 expressed one of these HLA molecules.

In terms of HDV-specific CD4+ T-cell epitopes, T-cell responses to the epitope comprising amino acids 50–65 have been previously described as DRB1*10:01/DRB1*11:01 restricted [5]. The peptide composed of amino acids 41–60 was recognized by patients P5, P10, P17, N3, N7, N9 and A1, with P17, N3, N9, and A1 expressing either one of the aforementioned HLA-DR molecules. However, the multitude of different HLA class II molecules in the set of responding patients suggests that the peptide epitope composed of amino acids 41–60 is somewhat of a promiscuous binder, an observation supported by in silico binding predictions that showed high (half maximal inhibitory concentration [IC_{50}], <1000 nM) to intermediate (IC_{50}, 1000–5000 nM) affinity of the peptide to 12 different HLA class II molecules (data not shown).

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/article/219/4/568/5106138 by guest on 03 October 2021

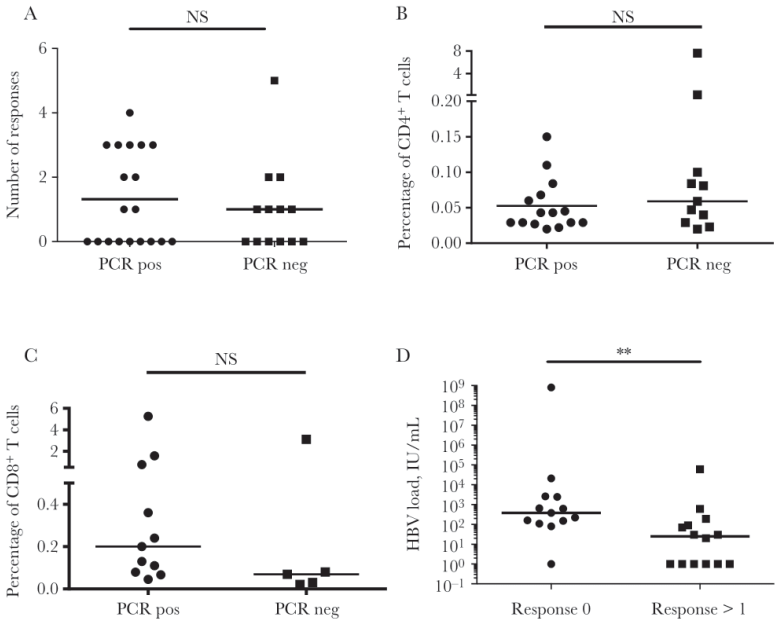

Figure 3. Breadth and strength of the hepatitis delta virus (HDV)–specific T-cell response in correlation with the clinical status. *A*, The number of HDV-specific T-cell responses among HDV antibody (Ab)–positive, HDV PCR–positive patients versus HDV Ab–, HDV PCR–negative patients. *B*, The strength of the HDV-specific T-cell responses detected by intracellular cytokine staining (ICS) in HDV Ab–positive, HDV PCR–positive patients versus HDV Ab–positive, HDV PCR–negative patients. *C*, The strength of the HDV-specific T-cell responses detected by ICS in HDV Ab–positive, HDV PCR–positive patients versus HDV Ab–positive, HDV PCR–negative patients. *D*, Hepatitis B virus (HBV) load for HDV-coinfected patients with or without HDV-specific T-cell responses detected by ICS. Neg, negative; NS, not significant; pos, positive.

In addition to the binding predictions, we also performed in vitro binding assays for the complete peptide set against 8 frequent HLA-DRB1 molecules (Supplementary Figure 3). Here, as previously, we defined binding as an affinity of ≥1000 nM, a threshold previously found to be associated with the vast majority of HLA class II epitopes for their restricting molecule [28–30]. Using these measured affinities and considering the alleles expressed in the corresponding responding patients, we identified the most likely HLA class II restricting molecule for each peptide, where possible (Supplementary Figure 4). As shown in Supplementary Figure 4, the experimentally determined binding confirmed the likelihood of a DRB*10:01/*11:01 restriction of the HDV peptide comprising amino acids 41–60 that was previously described for an overlapping epitope [5]; the same peptide also bound DRB1*08:02 and DRB1*15:02 with high affinity, again suggesting that this may be a promiscuous epitope. The epitope composed of amino acids 11–30 also bound DRB1*08:02, DRB*10:01, DRB1*11:01, and DRB1*15:01 with high-to-intermediate affinity.

Fine Mapping

Following the binding experiment results for the peptide comprising amino acids 41–60, we tested the response to 18mer and 16mer truncations of this epitope (Figure 4). The experiments showed slightly differing immunogenic epitope cores between different patients with the same HLA alleles. Truncation experiments with the peptide composed of amino acids 41–60 showed responses in patients with DRB1*11:01 in accordance with the results of Nisini et al, who described a DRB10:01/11:01 restriction pattern for the peptide composed of amino acids 50–65 [5]. For most of the HDV-specific CD4+ T-cell epitopes, the most likely HLA restriction according to our in vitro and in silico binding data for each patient is shown in Supplementary Figure 4. Further restriction in vitro HLA restriction and peptide truncation experiments to establish optimal length and HLA restriction have to be further determined in future follow-up studies.

Ex Vivo HDV-Specific T-Cell Response in a Patient With Acute HBV/HDV Superinfection

During our study, we were able to monitor 1 HBV-monoinfected patient receiving nucleotide therapy who was acutely superinfected with HDV. Over 4 months, we performed regular ex vivo ELISpot experiments to measure the additive T-cell response against 21 single HDV-specific 20mer peptides and followed the patient's clinical course of disease progression during acute infection. A strong ex vivo T-cell response was detectable, reaching 800 spot-forming cells/10^6 PBMCs during the first months of infection, coinciding with a decrease of >1 log in the

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/article/219/4/568/5106138 by guest on 03 October 2021

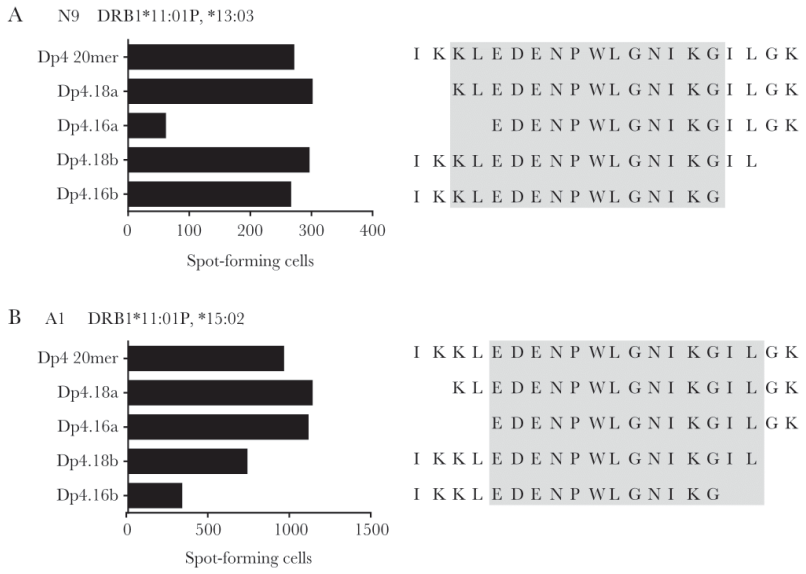

Figure 4. Fine mapping of the hepatitis delta virus (HDV) epitope comprising amino acids 41–60. Experiments were performed by enzyme-linked immunospot analysis for interferon γ production after stimulation with 20-, 18-, and 16mer peptide N-terminal and C- terminal peptide truncations.

HDV load and with relative control of HDV viremia. In further in vitro cultivation experiments, a strong CD4+ T-cell response against amino acids 41–60 could be reproduced in consecutive experiments, while a second HDV-specific CD4+ T-cell response against amino acids 21–40 was only detectable during the acute phase of infection. However, during our experiments, the CD4+ T-cell response to the peptide composed of amino acids 41–60, although still detectable, became significantly weaker. Unfortunately, within a few months, low-level HDV viremia was detectable, and the patient went on to be chronically coinfected with HBV/HDV, with low-level HDV viremia. This is the first demonstration of strong ex vivo HDV T-cell responses during acute HDV superinfection and suggests a role of the T-cell response in the control of HDV viremia.

The patient's longitudinal follow-up data and ELISpot response rates are presented in Figure 5. Detailed HDV-specific, single-peptide, longitudinal ELISpot responses after in vitro stimulation can be seen in Supplementary Figure 5.

DISCUSSION

Here, we present one of the largest data sets of HDV-specific T-cell responses in PBMCs from a well-characterized patient cohort at the single-epitope level. Not surprisingly, concordant with the results of previous studies, we did not detect HDV-specific T-cell responses in chronic HDV infection by ex vivo ELISpot analysis. However, with our sensitive in vitro testing approach [12, 31, 32], we were able to detect a broad range of low-level T-cell responses in 17 of 32 patients, discovering responses directed against the majority of HDV peptides (17 of 21) and making this the first study to comprehensively describe responses against a broad range of HDV-specific peptide specificities. Previous studies either just performed single-cell dilution cloning of CD4+ T cells from a few select patients [5], used few select single HDV-specific peptides from theoretical CD8+ T-cell epitope predictions [7, 33], or only analyzed the quality and quantity of T-cell responses directed against entire HDV-specific peptide pools [4].

In contrast to Nisini et al [5], who did not expand the T cells by using IL-2 and who reported a difference between the responses of IgM-positive patients with active HDV infection and IgM-negative patients with inactive infection (at that time, it was quite uncommon to regularly quantify HDV viremia), overall we did not see any significant difference in the breadth or magnitude of the in vitro–generated HDV-specific CD4+ T-cell response (or the CD8+ T-cell response) in HDV-viremic patients versus HDV Ab–positive, HDV PCR–negative patients. Detailed larger follow-up studies will have to further define the phenotype and functionality of HDV-specific T cells at different disease stages.

The detection pattern of HDV-specific CD4+ T-cell responses during chronic HDV infection is also in contrast to earlier findings during chronic HCV infection, in which virus-specific CD4+ T-cell responses were nearly absent but broadly directed and long lasting

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/article/219/4/568/5106138 by guest on 03 October 2021

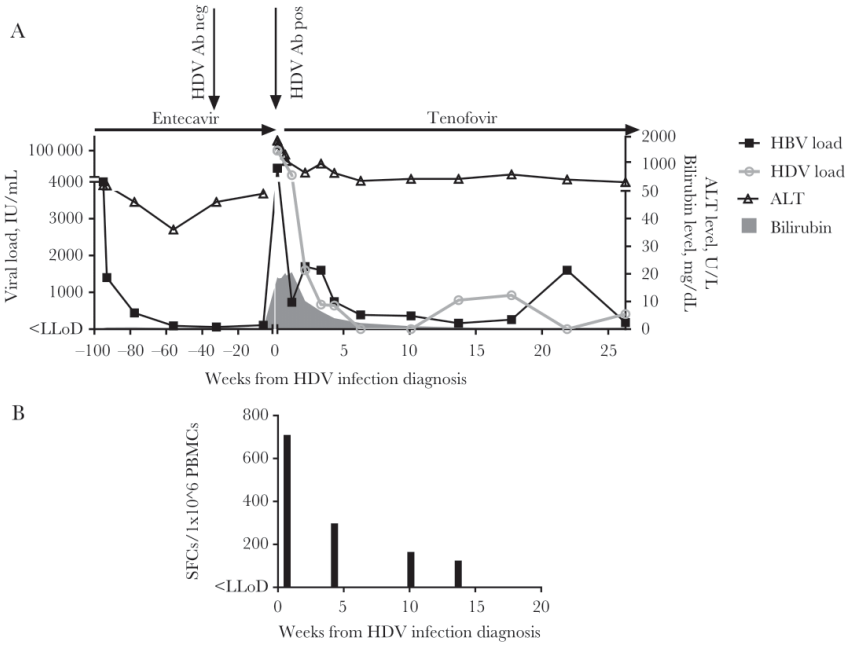

Figure 5. Clinical course and T-cell responses of a patient with acute hepatitis delta virus (HDV) superinfection. *A*, Hepatitis B virus and HDV loads (left), and alanine transaminase (ALT) values and bilirubin levels (shown as area under the curve; right). Therapy received and last negative/first positive result of HDV antibody (Ab) testing are shown above. Infection was suspected to have occurred within 6 weeks before the first positive HDV Ab test result. *B*, Enzyme-linked immunospot responses to the peptide comprising amino acids 41–60 during the course of monitoring, displayed as spot-forming cells. LLoD, lower limit of detection; neg, negative; pos, positive; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells.

in patients with spontaneously resolved (but not therapy-induced) HCV infection [12, 24]. Differences in antigen presentation, antigen load, or viral immune suppressive factors might be possible explanations for the different virus-specific T-cell response patterns in HCV versus HDV infection.

Interestingly, we saw a negative correlation between the breadth of the HDV-specific T-cell response and the level of HBV viremia. The reasons for this remain elusive at this point, although general T-cell exhaustion in patients with high-level HBV viremia might be one explanation [34]. Most of the $CD8^+$ T-cell responses in our study and previous studies [26] were elicited by HDV-specific peptides located within the C-terminus of the HDAg, and a different expression pattern between the S-HDAg and the L-HDAg in vivo might be one explanation of this observation.

We primarily aimed to detect HDV-specific $CD4^+$ T-cell responses, and for this reason, as well as for practical reasons, we used a HDV 20mer peptide set. However, we did not deplete $CD8^+$ T cells and did not exclude HDV $CD8^+$ T-cell responses a priori. In follow-up studies, we will compare the T-cell response breadth and pattern side by side after stimulation with recombinant HDV antigen [5], HDV-specific overlapping 20mer versus 15-17mer HDV peptide sets, and cytomegalovirus and influenza virus peptides, as well as after depletion of $CD4^+$ or $CD8^+$ T cells.

Recent studies suggest an enhancement of $CD8^+$ T-cell reactivity by supplementation with recombinant interleukin 12 [6], and in these more-detailed follow-up studies, different culture conditions should be compared side by side. These measures and techniques such as cytokine catch enrichment after HDV peptide stimulation might help generate polyclonal T-cell lines with higher specificity, since most of our in vitro–generated HDV-specific T-cell lines showed HDV peptide–specific responses of <1%, making further truncation and HLA restriction experiments difficult and partially futile [35].

Overall, we still might have underestimated the breadth of the HDV-specific T-cell response, since we used a relatively high cutoff as the definition of a positive response (0.02%) and because further subdominant responses might be detectable by use of peptide sets matching the autologous virus or by means of more-sensitive but much more-labor-intensive techniques, such as single-cell-dilution cloning. Preliminary HDV sequence data available for some patients demonstrate that the HDV epitope peptide sequence and the matching sequence of the autologous circulating HDV genome can differ quite considerably (Supplementary Figure 6).

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/article/219/4/568/5106138 by guest on 03 October 2021

Nevertheless, a response rate of 52% among patients is not unrealistic; other articles have described response rates in HDV-infected patients from around 30% [5, 6] up to 65% [4]. Also, this current study aimed to primarily discover novel HDV epitopes that have a high enough frequency to be detected, such as after enrichment by MHC class I or II tetramer technology.

Notably, while a broad range of peptide specificities were recognized by T cells from at least 1 HDV-infected patient, 3 peptide specificities were each recognized by >10% of patients, of which 2, composed of amino acids 11–30 and 41–60, appear to be MHC class II–restricted $CD4^+$ T-cell epitopes. The third T-cell epitope, composed of amino acids 191–210, is a MHC class I $CD8^+$ T-cell epitope. The HDV T-cell specificity for amino acids 41–60 overlaps with the sequence of a previously identified MHC class II–restricted immunogenic epitope, composed of amino acids 50–65 [5]. Both MHC class II–restricted peptides were promiscuous binders in in vitro HLA-binding assays and possibly can be presented by multiple MHC class II HLA molecules (Supplementary Figure 2). In silico calculations, as well as our patient HLA data, predict that the epitope(s) located within HDV amino acids 191–210 can be presented by multiple HLA class I alleles (Supplementary Figure 3).

In summary, broadly directed low-level HDV-specific $CD4^+$ T-cell and $CD8^+$ T-cell responses can be detected after in vitro expansion in a number of patients with HDV infection, regardless of the disease status. We present the largest database of HDV peptide-specific T-cell responses and HLA peptide-binding data to date that will be helpful for the development of HDV-specific tools such as MHC class I or MHC class II tetramers or to monitor the immune response at the epitope level during future therapeutic HDV trials.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *The Journal of Infectious Diseases* online. Consisting of data provided by the authors to benefit the reader, the posted materials are not copyedited and are the sole responsibility of the authors, so questions or comments should be addressed to the corresponding author.

Notes

Financial support. This work was supported by the German Research Agency (SFB841 project A6 to J. S. Z. W., A. W. L., J. L., C. A., V. M., C. S., M. L., and G. D. A.) and the German Center for Infection Research (to J. S. Z. W., A. W. L., J. B., J. H., and M. L.).

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts of interest. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

1. Hughes SA, Wedemeyer H, Harrison PM. Hepatitis delta virus. Lancet **2011**; 378:73–85.
2. Abbas Z, Afzal R. Life cycle and pathogenesis of hepatitis D virus: A review. World J Hepatol **2013**; 5:666–75.
3. Rizzetto M. The adventure of delta. Liver Int **2016**; 36(Suppl 1):135–40.
4. Grabowski J, Yurdaydìn C, Zachou K, et al.; HIDIT-1 study group. Hepatitis D virus-specific cytokine responses in patients with chronic hepatitis delta before and during interferon alfa-treatment. Liver Int **2011**; 31:1395–405.
5. Nisini R, Paroli M, Accapezzato D, et al. Human CD4+ T-cell response to hepatitis delta virus: identification of multiple epitopes and characterization of T-helper cytokine profiles. J Virol **1997**; 71:2241–51.
6. Schirdewahn T, Grabowski J, Owusu Sekyere S, 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**; 215:139–49.
7. Huang YH, Tao MH, Hu CP, Syu WJ, Wu JC. Identification of novel HLA-A*0201-restricted CD8+ T-cell epitopes on hepatitis delta virus. J Gen Virol **2004**; 85:3089–98.
8. Ferns RB, Nastouli E, Garson JA. Quantitation of hepatitis delta virus using a single-step internally controlled real-time RT-qPCR and a full-length genomic RNA calibration standard. J Virol Methods **2012**; 179:189–94.
9. Le Gal F, Gordien E, Affolabi D, et al. Quantification of hepatitis delta virus RNA in serum by consensus real-time PCR indicates different patterns of virological response to interferon therapy in chronically infected patients quantification of hepatitis delta virus RNA in serum by consensus R. J Clin Microbiol **2005**; 43:2363–9.
10. Ivaniushina V, Radjef N, Alexeeva M, et al. Hepatitis delta virus genotypes I and II cocirculate in an endemic area of Yakutia, Russia. J Gen Virol **2001**; 82:2709–18.
11. da Costa Lima Caniatti MC, Borelli SD, Guilherme ALF, Tsuneto LT. Association between HLA genes and dust mite sensitivity in a Brazilian population. Hum Immunol **2017**; 78:88–94.
12. Schulze zur Wiesch J, Lauer GM, Day CL, et al. Broad repertoire of the CD4+ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes. J Immunol **2005**; 175:3603–13.
13. Lauer GM, Ouchi K, Chung RT, et al. Comprehensive analysis of CD8(+)-T-cell responses against hepatitis C virus reveals multiple unpredicted specificities. J Virol **2002**; 76:6104–13.
14. Kim AY, Lauer GM, Ouchi K, et al. The magnitude and breadth of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells depend on absolute CD4+ T-cell count in individuals coinfected with HIV-1. Blood **2005**; 105:1170–8.

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/article/219/4/568/5106138 by guest on 03 October 2021

15. Kim Y, Ponomarenko J, Zhu Z, et al. Immune epitope database analysis resource. Nucleic Acids Res **2012**; 40:W525–30.
16. Wang P, Sidney J, Dow C, Mothé B, Sette A, Peters B. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. PLoS Comput Biol **2008**; 4:e1000048.
17. Wang P, Sidney J, Kim Y, et al. Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. BMC Bioinformatics **2010**; 11:568.
18. Nielsen M, Lundegaard C, Worning P, et al. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. Protein Sci **2003**; 12:1007–17.
19. Lundegaard C, Lamberth K, Harndahl M, Buus S, Lund O, Nielsen M. NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8–11. Nucleic Acids Res **2008**; 36:W509–12.
20. Peters B, Sette A. Generating quantitative models describing the sequence specificity of biological processes with the stabilized matrix method. BMC Bioinformatics **2005**; 6:132.
21. Sidney J, Southwood S, Moore C, et al. Measurement of MHC/peptide interactions by gel filtration or monoclonal antibody capture. Curr Protoc Immunol **2013**; Chapter 18:Unit 18.3.
22. Abbas Z, Afzal R. Life cycle and pathogenesis of hepatitis D virus: A review. World J Hepatol **2013**; 5:666–75.
23. Suneetha PV, Schlaphoff V, Wang C, et al. Effect of peptide pools on effector functions of antigen-specific CD8+ T cells. J Immunol Methods **2009**; 342:33–48.
24. Mueller M, Spangenberg HC, Kersting N, et al. Virus-specific CD4+ T cell responses in chronic HCV infection in blood and liver identified by antigen-specific upregulation of CD154. J Hepatol **2010**; 52:800–11.
25. Draenert R, Altfeld M, Brander C, et al. Comparison of overlapping peptide sets for detection of antiviral CD8 and CD4 T cell responses. J Immunol Methods **2003**; 275:19–29.
26. Karayiannis P, Saldanha J, Monjardino J, Jackson A, Luther S, Thomas HC. Immunisation of woodchucks with hepatitis delta antigen expressed by recombinant vaccinia and baculoviruses, controls HDV superinfection. Prog Clin Biol Res **1993**; 382:210–4.
27. Burrows SR, Rossjohn J, McCluskey J. Have we cut ourselves too short in mapping CTL epitopes? Trends Immunol **2006**; 27:11–6.
28. Southwood S, Sidney J, Kondo A, et al. Several common HLA-DR types share largely overlapping peptide binding repertoires. J Immunol **1998**; 160:3363–73.
29. Sidney J, Steen A, Moore C, et al. Divergent motifs but overlapping binding repertoires of six HLA-DQ molecules frequently expressed in the worldwide human population. J Immunol **2010**; 185:4189–98.
30. Sidney J, Steen A, Moore C, et al. Five HLA-DP molecules frequently expressed in the worldwide human population share a common HLA supertypic binding specificity. J Immunol **2010**; 184:2492–503.
31. Schulze Zur Wiesch J, Ciuffreda D, Lewis-Ximenez L, et al. Broadly directed virus-specific CD4+ T cell responses are primed during acute hepatitis C infection, but rapidly disappear from human blood with viral persistence. J Exp Med **2012**; 209:61–75.
32. Day CL, Lauer GM, Robbins GK, et al. Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. J Virol **2002**; 76:12584–95.
33. Karimzadeh H, Kiraithe MM, Kosinska AD, et al. Amino acid substitutions within HLA-B*27-restricted T cell epitopes prevent recognition by hepatitis delta virus-specific CD8 + TcCells. Ou J-HJ, editor. J Virol **2018**; 92:e01891–17.
34. Bertoletti A, Ferrari C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection. Postgrad Med J **2013**; 89:294–304.
35. Bissinger AL, Rauser G, Hebart H, Frank F, Jahn G, Einsele H. Isolation and expansion of human cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes using interferon-gamma secretion assay. Exp Hematol **2002**; 30:1178–84.

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/article/219/4/568/5106138 by guest on 03 October 2021

2 Darstellung der Publikation

2.1 Einleitung

Die chronische Infektion mit dem Hepatitis Delta Virus (HDV) gilt als schwerwiegendste der viralen Hepatitiden. Ein großer Anteil an Betroffenen entwickelt als Folge der Infektion eine Leberzirrhose, häufig wird im weiteren Verlauf das Auftreten von Leberzellkarzinomen (HCC) berichtet (Bockmann *et al.*, 2020; Stockdale *et al.*, 2020). Das HD-Virus ist ein Virusoid – es benötigt ein Helfervirus für seinen Replikationszyklus und den Zellbefall. Um in eine Leberzelle gelangen zu können, nutzt HDV das Hüllantigen (HBsAg) des Hepatitis B Virus (HBV). Das RNA-Genom des HD-Virus kodiert nur für ein einzelnes Protein, welches aus 217 Aminosäuren besteht - das HDV-Antigen (HDAg). Das HDV-Antigen wird in einer kurzen (Small-HDAg, S-HDAg) und einer langen (Large-HDAg, L-HDAg) Isoform translatiert. Die verschiedenen Isoformen haben unterschiedliche Rollen unter anderem in der Replikation, Verpackung und Pathogenese (Abbas and Afzal, 2013; Tseligka, Clément and Negro, 2021).

Bei der Replikation des HDV-Genoms kommt es häufig zur Rekombination; weltweit sind bisher acht voneinander abgrenzbare Genotypen beschrieben. Mit Ausnahme von Genotyp 1, der global nachgewiesen werden kann, sind die Genotypen weitgehend endemisch und weisen jeweils mehrere regional gehäufte Subtypen auf (Le Gal *et al.*, 2006; Alfaiate, Dény and Durantel, 2015). Eine Auswirkung des HDV-Genotyps auf den klinischen Verlauf und die Schwere der Leberschädigung wird diskutiert; der in Europa überwiegend vorkommende Genotyp 1 scheint mit einem besonders schweren chronischen Krankheitsverlauf assoziiert zu sein (Su *et al.*, 2006; Abbas and Afzal, 2013). Die Infektion mit HDV kann simultan zur Infektion mit HBV erfolgen – in diesem Falle spricht man von einer Ko-Infektion – oder im Rahmen einer bereits bestehenden chronischen HBV-Infektion, dann Superinfektion genannt (Da, Heller and Koh, 2019). Die Ko-Infektion von HBV und HDV führt bei Erwachsenen in bis zu 90% der Fälle zu einer Ausheilung und verläuft wie eine akute HBV-Infektion, während bei der Superinfektion von einer Chronifizierung in fast 100% der Fälle ausgegangen wird (Buti *et al.*, 2011).

Weltweit sind ca. 12 Millionen Menschen chronisch mit HDV infiziert (Stockdale *et al.*, 2020). Durch die Verbreitung der HBV-Impfung in den 1990er Jahren konnte insbesondere in Europa ein konsekutiver Rückgang der HDV-Prävalenz beobachtet werden; in den letzten Jahren werden jedoch gleichbleibende bzw. sogar steigende Infektionszahlen für HDV beschrieben (Gilman, Heller and Koh, 2019). Eine mögliche Erklärung hierfür ist die zunehmende Migration von Menschen aus Gebieten mit hohen HDV-Prävalenzen. Insbesondere intravenöser Drogenabusus, aber auch eine HIV-Ko-Infektion erhöhen zudem das Risiko einer HDV-Infektion (Noureddin and Gish, 2014; Mentha *et al.*, 2019; Vlachogiannakos and Papatheodoridis, 2020). In Deutschland wird von ca. 30.000 Patient*Innen mit chronischer HBV/HDV-Infektion ausgegangen (Wedemeyer, 2006).

Die Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) veröffentlichte 2021 eine S3-Leitlinie zur Therapie der chronischen HBV-Infektion. Zur Behandlung der chronischen HBV/HDV-Ko-Infektion wird aktuell empfohlen, bei stabiler Lebererkrankung eine pegyliertes-Interferon-α-basierte Therapie über mindestens 48 Wochen durchzuführen (Cornberg *et al.*, 2021). In Studien konnte jedoch lediglich in 25% der Patient*Innen ein langfristiges Ansprechen auf die Therapie beschrieben werden; ebenso kam es in mehr als 50% der Fälle zu einem späten Therapieversagen auch Jahre nach Therapieende (Heidrich *et al.*, 2014; Wedemeyer *et al.*, 2019). Dies hat die Konsequenz, dass Patient*Innen mit vermeintlich ausgeheilter HDV-Infektion einer regelmäßigen und langfristigen Nachsorge bedürfen. Eine Therapie mit Nucleos(t)id-Analoga kann im Rahmen der Behandlung der HBV-Infektion erwogen werden, scheint jedoch keinen zusätzlichen antiviralen Nutzen gegenüber der HDV-Infektion zu haben. In vielen Fällen bleibt die Lebertransplantation als einzige Therapieoption, insbesondere bei fortgeschrittener Leberzirrhose.

Seit 2020 ist mit Bulevirtide (Hepcludex®) die erste vorläufige HDV-spezifische Therapie in Deutschland zugelassen, die das Eindringen des HD-Virus in Hepatozyten verhindern soll. In Phase I- und Phase II-Studien konnte eine gegenüber den bisherigen Therapieoptionen voraussichtlich verbesserte mittelfristige Heilungsrate beobachtet werden; die Langzeitwirkung von Bulevirtide wird aktuell in Phase-III-Studien untersucht (Lempp and Urban, 2017; Wedemeyer *et al.*, 2019). Einer HDV-Infektion kann nur mit einer HBV-Impfung präventiv entgegengewirkt werden; ein Impfstoff gegen HDV, um bei bereits bestehender HBV-Infektion die Superinfektion zu vermeiden, existiert nicht.

Für andere chronische Virushepatitiden wie HBV oder Hepatitis C (HCV) wurde bereits beschrieben, dass eine starke und Virus-spezifische $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zellantwort essenziell für eine Ausheilung der Infektion ist (Schulze zur Wiesch *et al.*, 2012; Binder and Thimme, 2020); die HDV-spezifische zelluläre Immunantwort ist jedoch noch nicht genauer erforscht. In Studienmodellen wurde sich entweder auf einzelne immunogene Epitope konzentriert, ohne das gesamte HDV-Antigen abzudecken, oder auf die T-Zellantworten auf größere Peptidpools (Nisini *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2004; Grabowski *et al.*, 2011; Karimzadeh *et al.*, 2018). Einzelne mögliche immunogene Epitope konnten so bereits beschrieben werden, es sind jedoch weitere Studien nötig, um die Breite und Spezifität der HDV-spezifischen Immunantwort zu verstehen (Kohsar *et al.*, 2021).

2.2 Arbeitshypothese

In der vorliegenden Dissertation erfolgte eine detaillierte Untersuchung der HDV-Peptid-spezifischen $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zellantworten mittels eines überlappenden Peptidsatzes, welcher das gesamte HDV-Antigen abdeckt. Mithilfe sensitiver intrazellulärer Zytokinfärbung (ICS Assay) nach Kurzzeitstimulation und Expansion der Zellen wurden insbesondere folgende Fragestellungen beantwortet:

- Bestimmung der Breite und Spezifität der spezifischen T-Zellantwort nach *in vitro* Stimulation mit einzelnen HDV-Peptiden.
- Untersuchung der T-Zellantwort-Stärke und -Breite bei Patient*Innen mit unterschiedlichem klinischen Verlauf der Hepatitis-D-Infektion.
- Bestimmung der optimalen Peptidlänge und HLA-Restriktion für ausgewählte, häufig detektierte HLA-Klasse II restringierte HDV-Epitope.

2.3 Material & Methoden

*2.3.1 Patient*Innen-Kohorte*

Die Patient*Innen wurden von 2010 bis 2016 am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) rekrutiert. Alle Patient*Innen erteilten ihr schriftliches Einverständnis, die Zustimmung der zuständigen Ethikkommission lag vor (Antrag WF-014/09). Im Rahmen dieser Studie konnten insgesamt 32 Patient*Innen sowohl mit chronischer (konstant messbare HDV-Viruslast sowie HDV-Antikörper, n=18) als auch mit ausgeheilter (nachweisbare HDV-Antikörper, keine messbare HDV-Viruslast, n=13) HDV-Infektion eingeschlossen werden. Aus den Proben wurden „Peripheral Blood Mononuclear Cells“ (PBMC) und Seren isoliert und kryokonserviert. Im Verlauf der Studie wurde zudem ein akut super HDV-infizierter Patient gewonnen und longitudinal untersucht. Zum Vergleich wurden sieben Proben von gesunden Proband*Innen sowie sechs Proben von chronisch HBV-Infizierten mit nachweislich negativem HDV-Status analysiert.

2.3.2 HDV-Peptide

Für die vorliegende Studie wurden die Peptide anhand des in Europa am weitesten verbreiteten Genotyp 1 synthetisiert. Zur Vergleichbarkeit wurde der Genotyp-1-Subtyp genutzt, der bereits in experimentellen HDV-Studien verwendet wurde (Grabowski *et al.*, 2011). Zusätzlich wurden für weitere Versuchsreihen kürzere Versionen von selektierten Peptiden synthetisiert. Die Einzelpeptide wurden in 100% Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und in einer Verdünnung von 20mg/dl verwendet. Aus je 11 bzw. 10 der Peptide wurden die Peptidpools 1 und 2 zur Stimulation der Zellkulturen gebildet. **Abbildung 1** zeigt eine schematische Übersicht der Aufteilung der Peptidpools.

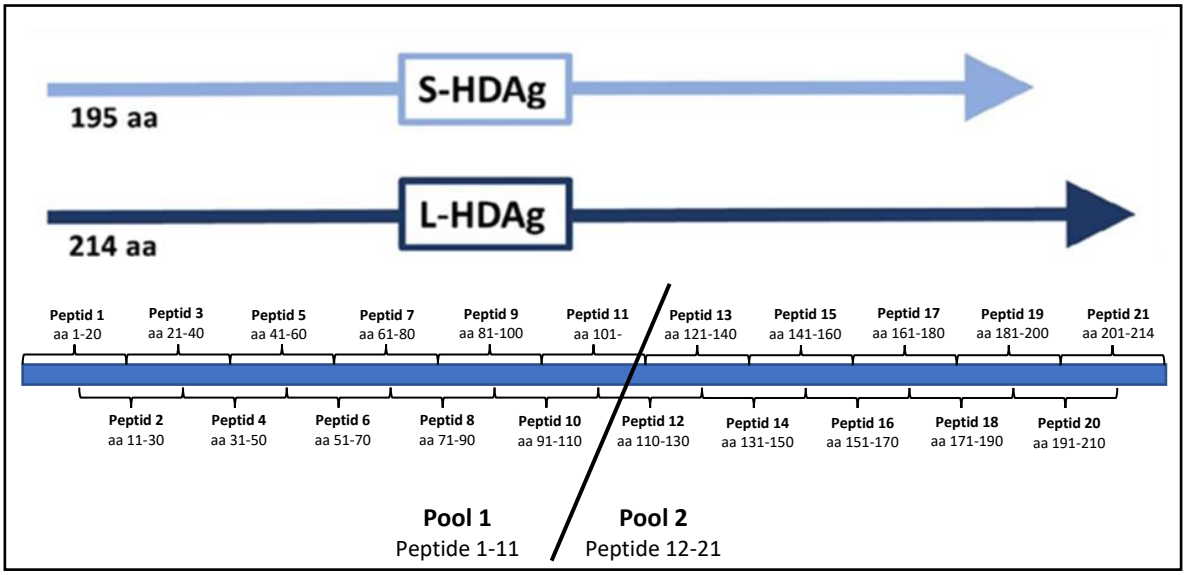

Abbildung 1: Schematische Übersicht des Aufbaus des HDV-Antigens sowie der Aufteilung des Peptidpools.

(**A**) Schematische Darstellung von S-HDAg (kurzes HDV-Antigen) und L-HDAg (langes HDV-Antigen) (aa = Aminosäuren). (**B**) Übersicht der Peptidpool-Zusammensetzung. Die synthetisierten Peptide weisen eine Länge von 20 aa auf und überlappen um 10 aa; Pool 1 besteht aus Peptiden 1-11, Pool 2 aus Peptiden 12-21.

2.3.3 Zellkulturen

Nach dem Auftauen der PBMC wurden die Zellen gezählt und in R10-Medium in je zwei Versuchsansätze aufgeteilt. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit den Peptidpools 1 oder 2. Die Zellkulturansätze wurden im Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 für 9-11 Tage inkubiert. Während der Kultur wurde das Medium dreimal gewechselt sowie Interleukin-2 (IL-2) zur Stimulation der Zellproliferation hinzugefügt. Nach der Kultivierung wurden die Zellen vor Beginn der Experimente zweimal mit Medium gewaschen.

2.3.4 ELISpot-Assays

Nach Inkubation der Zellkulturen erfolgte die Stimulation der Zellen mit den HDV-Einzelpeptiden im Rahmen eines ELISpot-Assays (Enzyme Linked Immuno Spot Assay). Die ELISpot-Platten wurden anhand der Herstellerangaben (Millipore Corporation, Billerica, USA) sowie früherer Publikationen vorbereitet und bestückt (Huang *et al.*, 2009; Mueller *et al.*, 2010). Die Auszählung erfolgte mittels AiD ELISpot Reader (AID Diagnostica GmbH, Straßberg, Deutschland) sowie manueller Mikroskopie. Als Positivantworten wurde eine Anzahl an Spot Forming Cells (SFC) entsprechend dreimal der Negativkontrolle gewertet; bei null SFC in der Negativkontrolle oder keinen deutlich positiven Antworten wurden die höchsten SFC im Vergleich zur Durchschnittsantwort für weitere Versuche genutzt.

2.3.5 Durchflusszytometrie und Intrazellulärfärbung von Interferon-γ

Für jede positive Antwort im ELISpot wurde im Anschluss eine Intrazellulärfärbung nach Stimulation mit dem gleichen HDV-Peptid zur Qualifizierung der Positivantworten durchgeführt. PMA/Ionomycin fungierte als Positivkontrolle, R10 als Negativkontrolle. Nach Stimulation wurden die Zellen intra- und extrazellulär gefärbt. Die Analyse der Proben erfolgte im Anschluss mit dem BD LSRFortessa (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland).

In **Abbildung 2A** ist die Gating-Strategie zur Einteilung von lebendigen Zellen, Einzelzellen, Lymphozyten, T-Lymphozyten und von $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zellpopulationen dargestellt. Die Aktivität der T-Zellen wurde anhand ihrer Expression von CD154 sowie Interferon-γ analysiert. **Abbildung 2B** zeigt repräsentative FACS Dotplots der CD154- und Interferon-γ-Expression auf $CD4^+$-T-Zellen einer Patientenprobe nach Stimulation mit einem HDV-Peptid.

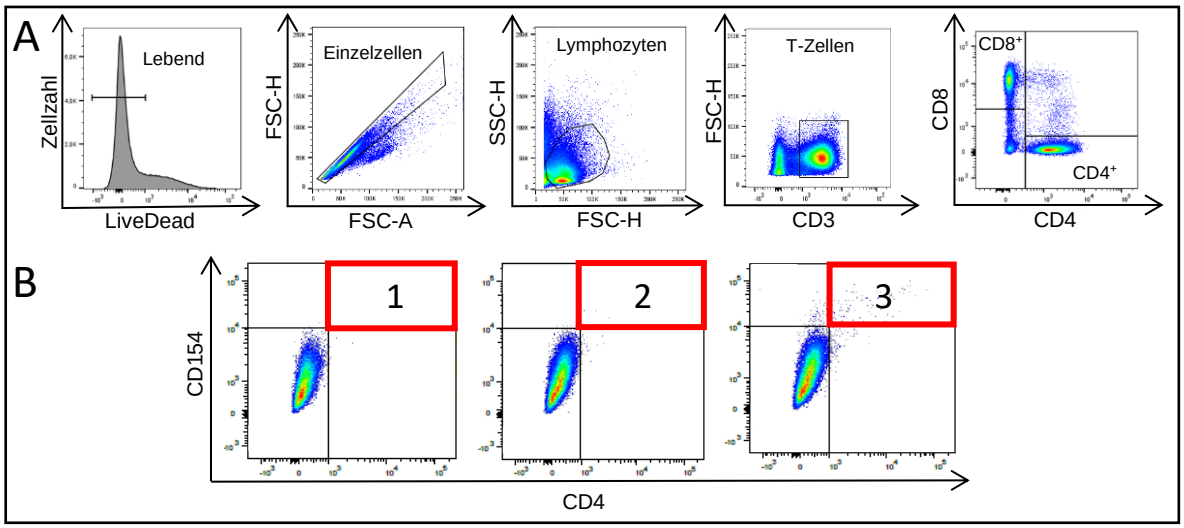

Abbildung 2: Repräsentatives Gating und Expression von CD154 und Interferon γ auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen nach Einzelpeptid-Stimulation

(**A**) Repräsentative FACS Dotplots zeigen die Gating-Strategie für die Analyse der CD154-Exprimierung und der Interferon-γ-Produktion auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen eines gesunden Probanden. Als Positivantwort wurden $CD4^+$- oder $CD8^+$-T-Zellen gewertet, die sowohl CD154 als auch Interferon-γ aufwiesen. (**B**) Beispielhafte Darstellung der Interferon-γ- und CD154-Expression von $CD4^+$-T-Zellen. Die rote Umrandung weist auf die doppelt positiven T-Zellen hin. Von links nach rechts: (1) Negativkontrolle (2) HDV-Peptidstimulation, keine signifikante Antwort (3) HDV-Peptidstimulation, signifikante Antwort.

2.3.6 HLA-Binding: in silico Prädiktionen und in vitro Assays

In Zusammenarbeit mit dem La Jolla Institute for Immunology, San Diego, USA erfolgte eine *in silico* Prädiktion der immunogenen Epitope mittels der Analysesoftware der Immune Epitope Database (IEDB) (Kim *et al.*, 2012). Zudem wurden *in vitro* Assays mit einem Set von MHC-Molekülen und allen Einzelpeptiden durchgeführt.

Anhand der Ergebnisse konnte eine Vorhersage der MHC-Restriktionen für alle Peptid-spezifischen Antworten der Patient*Innen gemacht werden (siehe **Supplemental 3** (Landahl *et al.*, 2019)).

2.3.7 Statistische Analyse

Die Datenanalyse der Durchflusszytometrie-Ergebnisse erfolgte mit der FlowJo Software (Version 10.0.8, Treestar, Ashland, USA). Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung wurde die GraphPad Software genutzt (Versionen 6.0 und 7.0, GraphPad Software, San Diego, USA). Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurden sowohl der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test als auch der Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Bonferroni als post-hoc-Test angewendet. Die bivariate Korrelationsanalyse erfolgte mittels der Rangkorrelationsanalyse nach Spearman. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert, teilweise mit Standardabweichungen oder mit Standardfehler dargestellt. Ein p-Wert ≤0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

2.4 Ergebnisse

2.4.1 Nachweis von HDV-spezifischen T-Zellantworten nach Kurzzeitkultivierung und IL-2-Supplementierung

In einer initialen Versuchsreihe erfolgte die ICS-Durchführung ohne vorherige Kultivierung und IL-2-Supplementierung der T-Zellproben; es ließ sich jedoch bei keinem der Patient*Innen eine signifikante Interferon-γ-Produktion nach Stimulation mit HDV-Einzelpeptiden nachweisen. Ausnahme bot ein akut superinfizierter Patient, dessen T-Zellantwort über mehrere Wochen hinweg in Blutproben *ex vivo* nachgewiesen werden konnte (siehe *2.4.5*). Zur Stimulation einer T-Zellantwort erfolgte daher die Kultivierung der Lymphozyten mit Supplementierung von IL-2 (Ross and Cantrell, 2018). Nach IL-2-Stimulation ließen sich nun bei 17 von 32 Patient*Innen HDV-spezifische Antworten auf insgesamt 17 der 21 HDV-Peptide nachweisen; wie auch in ähnlichen Studien reagierte auch hier nur ein geringer Prozentsatz der $CD4^+$-T-Zellen auf die Peptidstimulation (siehe **Abbildung 3**). Insgesamt konzentrierten sich 47% der T-Zellantworten auf die Aminosäuren 11-30 und 41-60 ($CD4^+$-T-Zellantworten) sowie 191-210 ($CD8^+$-T-Zellantworten). Eine Übersicht des vollständigen Antwortmusters ist in **Figure 2** der vorliegenden Publikation zu sehen (Landahl *et al.*, 2019).

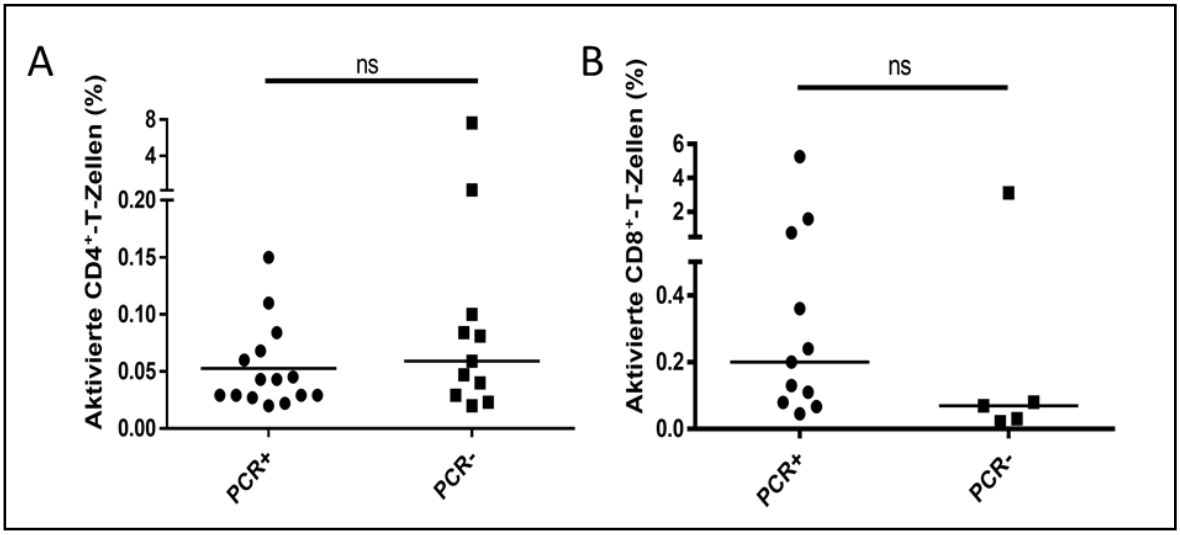

Abbildung 3: Prozentsatz der Interferon-γ-positiven T-Zellen nach Peptidstimulation
Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Frequenz an aktivierten T-Zellen in Patient*Innen ohne HDV-Nachweis (PCR-) oder mit HDV-Nachweis (PCR+). (**A**) Aktivierte $CD4^+$ T-Zellen. (**B**) Aktivierte $CD8^+$ T-Zellen. P-Werte wurden mittels der Rangkorrelationsanalyse nach Spearman berechnet. P-Werte ≤ 0,05 wurden als signifikant gewertet und als * dargestellt; ein p-Wert > 0,05 wurde als statistisch nicht signifikant angesehen und mit ns (nicht signifikant) gekennzeichnet. Dargestellt ist der Mittelwert.

*2.4.2 HDV-spezifische T-Zellantwort ist unabhängig von der bestehenden HDV Viruslast der Patient*Innen, korreliert aber mit der bestehenden HBV Viruslast*

In einer 1997 veröffentlichen Studie von Nisini *et al.* wurde ein potentieller Zusammenhang zwischen klinischem HDV Status und der Stärke der HDV-spezifischen T-Zellantwort beschrieben (Nisini *et al.*, 1997). Die in dieser Arbeit untersuchten 17 Patient*Innen mit nachweisbaren T-Zellantworten setzten sich aus neun chronischen, sieben ausgeheilten sowie einem akut HDV-infizierten Patienten zusammen. Im Gegensatz zu Nisini *et al.* zeigten sich in der vorliegenden Promotionsarbeit keine signifikanten Unterschiede in der Antwortbreite zwischen Patient*Innen mit nachweisbarer HDV-Virämie und Patient*Innen ohne (p=0,59); ebenso konnten keine Unterschiede in der Antwortstärke von $CD4^+$-T-Zellen (p=0,32) oder $CD8^+$-T-Zellen (p=0,18) der ausgeheilten und chronisch infizierten HDV-Patient*Innen fest-

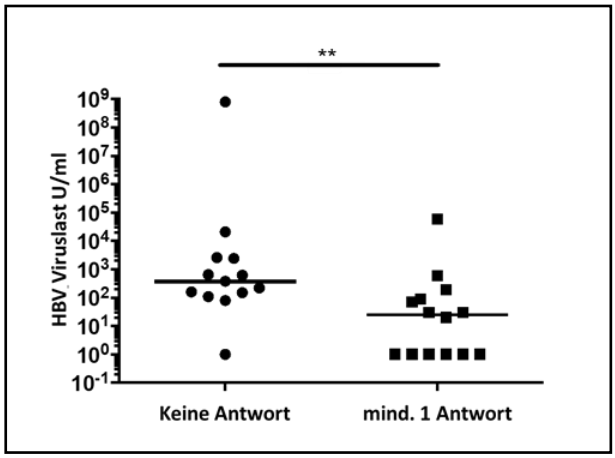

Abbildung 4: Anzahl der HDV-spezifischen Antworten korreliert mit der HBV-Viruslast.
Patient*Innen mit hoher HBV-Viruslast zeigten durchschnittlich seltener HDV-spezifische Antworten als Patient*Innen mit niedriger HBV-Viruslast. P-Werte wurden mittels der Rangkorrelationsanalyse nach Spearman berechnet. P-Werte ≤ 0,05 wurden als signifikant gewertet und als * dargestellt; ** repräsentiert einen p-Wert ≤ 0,01. Dargestellt ist der Mittelwert.

gestellt werden (siehe **Abbildung 3**). **Figure 3** der vorliegenden Publikation (Landahl *et al.*, 2019) zeigt die Antwortverteilung der untersuchten Patient*Innenproben in Hinblick auf die HDV-Virämie.
Bemerkenswert ist eine signifikante negative Korrelation zwischen HDV-spezifischer Antwortbreite und Hepatitis-B-Viruslast (**Abbildung 4)**.

2.4.3 Bestimmung der HLA-Restriktionen ausgewählter HDV-Epitope

In Zusammenarbeit mit dem La Jolla Institute, San Diego, USA, konnten sowohl *in silico* als auch *in vitro* Versuchsreihen zur Prädiktion möglicher HLA-Restriktionen durchgeführt werden. Als signifikant wurde eine Bindungsaffinität von <1000nM gewertet. In früheren Studien waren bereits mögliche MHC-I- und -II-Restriktionen beschrieben worden (Nisini *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2004; Karimzadeh *et al.*, 2018). Die Ergebnisse decken sich weitgehend mit den hier gemessenen Bindungskapazitäten. Für Epitop aa 50-65 ist in mehreren unabhängigen Studien die HLA-Restriktion DRB1*10:01/DRB1*11:01 beschrieben worden; von den sieben Patient*Innen, die auf Peptid aa41-60 reagierten, trugen vier einen der beiden HLA-Typen. Die nachgewiesenen T-Zellantworten von Patient*Innen mit weiteren HLA-Typen lassen jedoch darauf schließen, dass Epitop aa 41-60 zu einem gewissen Grad vielfältige Bindungen zulässt; in *in silico* Versuchen ließen sich Bindungen mit hoher Affinität zu 12 verschiedenen MHC-II-Molekülen feststellen. Auch *in vitro* zeigte Peptid aa 41-60 multiple hochaffine Bindungen.

2.4.4 Bestimmung der minimalen Epitop-Länge der HDV-Peptide

Um die immunogenen Epitope der verwendeten 20mer-HDV-Peptide auf die optimale Länge eingrenzen zu können, wurden für ausgewählte Peptide 18-mer- bzw. 16-mer-Trunkierungen synthetisiert. Es erfolgten wiederholte ELISpot- und ICS-Versuchsreihen mit Proben von Patient*Innen, die auf die 20mer-Peptide signifikant reagiert hatten. Eine eindeutige Eingrenzung von immunogenen Epitopen konnte dabei jedoch nicht abschließend erzielt werden. Während sich die T-Zellantworten in Versuchsreihen mit 20mer-Peptiden auf einzelne Peptide konzentrierte, konnte in Versuchen mit Trunkierungen kein Fokus auf einzelne 18- oder 16-mer-Peptide beobachtet werden. Selbst in Proben mit gleichem HLA-Typ und gleichem Reaktionsmuster auf das 20mer-Peptid zeigten sich Diskrepanzen im Erkennungsmuster der Trunkierungen (siehe **Figure 4** der vorliegenden Publikation (Landahl *et al.*, 2019)).

2.4.5 Longitudinale ex vivo Messung von HDV-spezifischen T-Zellantworten eines Patienten mit akuter HBV/HDV Superinfektion

Innerhalb dieser Studie konnte ein Patient mit einer akuten HDV Superinfektion rekrutiert und eingeschlossen werden. Im Vergleich zu Patient*Innen mit chronischer bzw. ausgeheilter Infektion (siehe *2.4.1*) konnten bei diesem Patienten HDV-spezifische T-Zellantworten *ex vivo* detektiert werden. In longitudinalen

ELISpot-Untersuchungen über 15 Wochen zeigte sich initial eine starke T-Zellantwort gegen zwei HDV-spezifische Einzelpeptide, die im Verlauf der Infektion jedoch stark abnahm.

In der akuten Phase der HDV Infektion ließen die klinischen und laborchemischen Daten des Patienten zunächst auf eine spontane Ausheilung der HDV-Infektion schließen. Im weiteren zeitlichen Verlauf war jedoch ein erneuter Anstieg der Hepatitis-D-Viruslast zu verzeichnen und der Patient entwickelte eine chronische HDV-Infektion; bemerkenswerterweise war bereits vor dem erneuten Anstieg der Viruslast eine deutliche geringere Antwortstärke im ELISpot messbar **(Abbildung 5**).

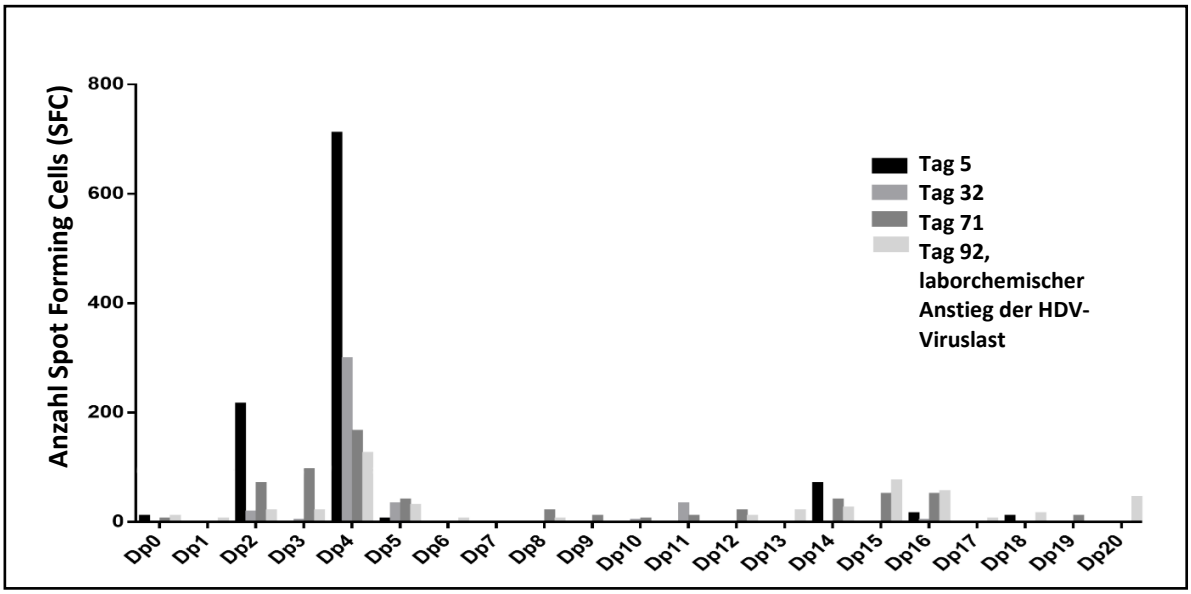

Abbildung 5: Ex vivoELISpot im zeitlichen Verlauf der akuten Superinfektion.
Zu Beginn der Superinfektion sind starke peptidspezifische Antworten messbar, im Verlauf dann rasche Abnahme der Antwortstärke. Die Hepatitis-D-Virämie war ab Tag 39 transient negativ, ab Tag 92 jedoch wieder detektierbar.

2.5 Diskussion

In der vorliegenden Dissertation wurde die Breite und Spezifität der HDV-spezifischen T-Zellantworten übersichtlich dargestellt; ein Zusammenhang zum klinischen Verlauf der Patient*Innen zeigte sich nicht. Bei 17 der 32 untersuchten Patient*Innen konnte eine HDV-spezifische T-Zellantwort nachgewiesen werden. Insgesamt wurden 17 der 21 HDV-Peptide von mindestens einem/r Patient*in erkannt. 47% der HDV-spezifischen T-Zellantworten konzentrierten sich auf drei bestimmte, unterschiedliche HDV-spezifische Peptide, die in Zukunft als geeignete, häufig erkannte Peptid-Epitope für weitere Studien der HDV T-Zellantwort dienen können. Der hier gewählte Versuchsaufbau konnte Limitationen von früheren Publikationen umgehen: in vorangegangen Studien wurden $CD4^+$-T-Zell-Klone von wenigen ausgewählten Patient*Innen verwendet (Nisini *et al.*, 1997), es erfolgte eine Vorauswahl der verwendeten HDV-Peptide anhand möglicher MHC-Restriktionen (Huang *et al.*, 2004; Karimzadeh *et al.*, 2018) oder eine Untersuchung

der T-Zellantworten auf Peptidpools im Gegensatz zu Einzelpeptiden (Grabowski *et al.*, 2011). Im Vergleich dazu stellt die vorliegende Dissertation eine umfassende Analyse der Peptid-spezifischen T-Zellantwort auf das gesamte HDV-Antigen dar.

Wie bereits in vorigen Studien ließ sich auch hier kein Zusammenhang zwischen dem Krankheitsverlauf und der T-Zellantwortstärke oder -breite feststellen. Im Gegensatz zu Nisini *et al.*, die 1997 eine Korrelation zwischen der Proliferationskraft von T-Zellen und der klinischen Aktivität der HDV-Hepatitis messen konnten, zeigte sich in der vorliegenden Studie kein signifikanter Unterschied in der T-Zellaktivität. Dies kann unter anderem mit dem gewählten Versuchsaufbau zusammenhängen; durch die Zugabe von IL-2 während der Zellkultivierung wurde eine künstliche Zellexpansion erzeugt, zudem wurde die Proliferationsrate der T-Zellen nicht überprüft. Die klinische Relevanz der hier beschriebenen immunogenen Epitope muss dementsprechend in weiterführenden Studien durch Messung der T-Zell-Funktionalität untersucht werden. Ein weiterer Erklärungsansatz ist, dass es in einigen Fällen erst nach HBV-Serokonversion zu einer Ausheilung der HDV-Infektion kam. Diese Patient*Innen wurden als HDV-ausgeheilt klassifiziert, auch wenn die PCR-Negativität vermutlich Folge des Mangels an HBsAg war und nicht einer zielgerichtete Immunantwort gegen HDV.

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnten bei 53% der Patient*Innen T-Zellantworten detektiert werden. Der Versuchsaufbau und die Peptidlänge von 20 Aminosäuren zielten primär auf eine Bestimmung der $CD4^+$-T-Zellantworten ab, es wurden jedoch auch einzelne $CD8^+$-T-Zellantworten gemessen. Zur optimalen T-Zell-Proliferation erfolgte zudem vor Verwendung der Zellen eine 7- bis 10-tägige Kultivierung mit Zusatz von IL-2. In ähnlichen Studienmodellen konnte eine Funktionssteigerung von T-Zellen durch Zusatz von Interleukin-12 (IL-12) beschrieben werden (Schirdewahn *et al.*, 2017). Es ist zu diskutieren, ob auch hier durch den Zusatz von IL-12 eine größere Anzahl an T-Zellantworten hätte erreicht werden können; die hier erzielte Antwortrate von 53% entspricht jedoch den Erwartungen und ist vergleichbar mit den Ergebnissen aus vorigen Studien. In ähnlichen HDV-Studien sind T-Zell- Antworten in 30-65% der getesteten Blutproben beschrieben – unabhängig von der Stimulationsart der Zellkulturen (Nisini *et al.*, 1997; Grabowski *et al.*, 2011; Schirdewahn *et al.*, 2017). Zudem ist unklar, ob die Stimulation mit IL-12 tatsächlich zu einer gezielten Funktionssteigerung geführt oder lediglich eine unspezifische Zellproliferation angeregt hätte. Auch die Lokalisation der hier erkannten Epitope auf dem HDAg stimmen mit zahlreichen Daten aus früheren Publikationen überein. Nisini *et al.* beschrieben unter anderem $CD4^+$-T-Zellantworten auf die Peptidsequenz aa 50-65, während Karayiannis et al. vermehrt $CD8^+$-T-Zellantworten im Carboxy-Terminus des S-HDAg (aa 94-195) detektierten (Karayiannis *et al.*, 1993; Nisini *et al.*, 1997). Dennoch hätte die hier erreichte Antwortrate von 53% der Patient*Innen durch Optimierung der Methodik eventuell gesteigert werden können; eine Depletion der $CD8^+$ T-Zellen sowie die Kultivierung mit IL-12 hätten zu einer stärkeren Fokussierung auf $CD4^+$ T-Zellen geführt und so vielleicht mehr Antworten ermöglicht. Die in *2.4.4* beschriebene Versuchsreihe zur

Eingrenzung der immunogenen Epitope konnte aufgrund der geringen Zellanzahl und niedrigen Antworten nur limitiert erfolgen; eine bessere Kultivierung der T-Zellen hätte mehr Versuchsreihen ermöglichen können .

Die Festlegung der Signifikanzgrenze spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Anzahl der detektierten T-Zellantworten. Ein gängiges Studienmodell ist die Definition eines Dreifachen der Negativantwort als Grenzwert, in der vorliegenden Studie zeigte jedoch die überwiegende Mehrheit der untersuchten Patient*Innenproben keine Interferon-γ-Produktion in der Negativkontrolle. Aus diesem Grund wurde die Definition des Grenzwertes erweitert. Im ELISpot wurden Positivantworten aus mindestens drei SFC gewertet, in der Durchflusszytometrie galt die Interferon-γ-Produktion durch mindestens 0,02% der T-Zellen mit realistischem Verteilungsmuster als Positivantwort. Hier wurde sich an früheren Studien orientiert, jedoch ist dieser Aspekt bei der Analyse und Auswertung der erzielten Daten zu berücksichtigen. Ein niederschwelliges Korrigieren des Grenzwertes von 0,02% ergab jedoch keine signifikanten Änderungen in der Bewertung der Zellantworten (Draenert *et al.*, 2003; Lauer *et al.*, 2004; Schulze zur Wiesch *et al.*, 2005).

Um die HDV-spezifische Immunantwort im Detail besser einordnen zu können, kann der Vergleich mit der Antwortgröße und -breite der T-Zellantworten in anderen humanen Virusinfektionen helfen. Eine generelle Minderung der T-Zell-Funktionalität ist bei HBV-Infektionen mit hoher Viruslast bereits beschrieben (Bertoletti and Ferrari, 2013); dies könnte erklären, weshalb eine Korrelation zwischen HBV-Viruslast und HDV-spezifischer T-Zellantwort detektiert wurde. Zusätzlich hätte ein Vergleich der T-Zellantworten mit anderen viralen Infektionen wie Influenza und/oder Cytomegalievirus (CMV) weiteren Aufschluss zum Verstehen der Immunantwort bei HDV liefern können. Bei einer HCV Infektion ist im Vergleich ein signifikanter Zusammenhang zwischen $CD4^+$-T-Zellaktivität und klinischem Verlauf beschrieben (Mueller *et al.*, 2010; Schulze zur Wiesch *et al.*, 2012); dieses Konzept lässt sich jedoch auf die chronische HDV-Infektion nicht übertragen. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, dass Patient*Innen mit ausgeheilter HDV-Infektion häufig noch eine hohe HBV-Viruslast aufweisen und es so zu einer funktionellen T-Zellerschöpfung kommt (Urban, Neumann-Haefelin and Lampertico, 2021). Auch das Prinzip der Immunevasion ist bereits für HDV beschrieben – virale Polymorphismen können eine sichere MHC-Bindung und ausreichende T-Zellantwort verhindern (Karimzadeh *et al.*, 2019; Kefalakes *et al.*, 2019).

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Promotion multiple niedrigfrequente, HDV-spezifische $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zellantworten nach *in vitro*-Stimulation der Zellen unabhängig von der Krankheitsaktivität detektiert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind für die Entwicklung und Etablierung von MHC-I-/II-Tetrameren hilfreich und können eine Rolle in der Analyse der Immunantwort in zukünftigen HDV-Therapie-Studien spielen.

3 Zusammenfassung

Die chronische Ko-Infektion mit Hepatitis B (HBV) und Hepatitis D (HDV) zählt zu den schwerwiegendsten viralen Lebererkrankungen mit hoher Morbiditätsrate und limitierten Therapieoptionen. Wenig ist über die zellulären Abwehr- und Kontrollmechanismen bekannt. In dieser Promotionsarbeit sollten nun die Breite sowie Spezifität der HDV-spezifischen T-Zellantwort in einer Kohorte von 32 HDV-Patient*Innen, welche sich in verschiedenen Infektions-Stadien befanden, charakterisiert werden.

Mit der Ausnahme eines akut mit HDV superinfizierten Patienten konnten *ex vivo* keine HDV-spezifischen T-Zellantworten per ELISpot nachgewiesen werden. Nach *in vitro* Expansion und Stimulation war es jedoch möglich, in über 50% der Patient*Innen Virus-spezifische T-Zellantworten gegen ein oder mehrere der HDV-Peptide nachzuweisen; insgesamt wurde eine Mehrzahl der Peptide (17/21) von mindestens einem Patienten erkannt. Interessanterweise gab es keinen signifikanten Unterschied in der Antwortstärke von HDV-PCR^{+}- gegenüber PCR^{-}-Patient*Innen. Die HDV-spezifischen Antworten konzentrierten sich hauptsächlich auf drei Epitope, die jeweils von 12-21% der Patient*Innen erkannt wurden – zwei davon MHC Klasse II-restringiert (aa 11-30, aa 41-60) sowie ein MHC Klasse I-restringiertes Epitop (aa 181-210). *In vitro* HLA-Binding-Assays zeigten multiple HLA-DR-Bindungen der beiden CD4^{+}-T-Zell-spezifischen Epitope (aa 11-30, aa 41-60).

Diese umfassende Charakterisierung von HDV-spezifischen T-Zell-Epitopen bildet eine wichtige Grundlage für zukünftige Studien der Immunpathogenese der HDV-Infektion.

4 Summary

Chronic co-infection with hepatitis B (HBV) and hepatitis delta virus (HDV) has a high liver disease related morbidity with limited treatment options. Little is known about the correlates of viral control. This study aimed to comprehensively define the breadth and specificity of the HDV-specific T cell response in patients at different stages of infection.

Apart from one patient with acute HDV infection, HDV-specific T cell responses could not be detected *ex vivo* by ELISpot. However, on average, T cell responses after *in vitro* expansion were detected in more than 50% of the patients against one or more peptides, and most peptides (17/21) were recognized. Interestingly, there was no significant difference between the breadth of response in HDV PCR^+ versus PCR^- patients. HDV-specific T cell responses focused on three distinct HDV-specific epitopes that were each detected by 12-21% of patients – two MHC class II restricted (aa 11-30, aa 41-60) as well as one MHC class I restricted epitope (aa 191-210). In *in vitro* HLA binding assays, the two $CD4^+$ T cell specificities (aa 11-30, aa 41-60) showed promiscuous binding to multiple HLA-DR molecules.

This thesis established the first comprehensive experimental overview of HDV T cell epitopes that will facilitate studies of immunopathogenesis.

5 Literaturverzeichnis

Abbas, Z. and Afzal, R. (2013) ‘Life cycle and pathogenesis of hepatitis D virus: A review’, *World Journal of Hepatology*, 5(12), pp. 666–675. doi: 10.4254/wjh.v5.i12.666.

Alfaiate, D., Dény, P. and Durantel, D. (2015) ‘Hepatitis delta virus: From biological and medical aspects to current and investigational therapeutic options’, *Antiviral Research*, 122, pp. 112–129. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.08.009.

Bertoletti, A. and Ferrari, C. (2013) ‘Republished: Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection’, *Postgraduate Medical Journal*, 89(1051), pp. 294–304. doi: 10.1136/postgradmedj-2011-301073rep.

Binder, B. and Thimme, R. (2020) ‘CD4+ T cell responses in human viral infection: Lessons from hepatitis C’, *Journal of Clinical Investigation*, 130(2), pp. 595–597. doi: 10.1172/JCI133222.

Bockmann, J. H. *et al.* (2020) ‘High rates of cirrhosis and severe clinical events in patients with HBV/HDV co-infection: longitudinal analysis of a German cohort’, *BMC gastroenterology*, 20(1), p. 24. doi: 10.1186/s12876-020-1168-9.

Buti, M. *et al.* (2011) ‘Clinical outcome of acute and chronic hepatitis delta over time: A long-term follow-up study’, *Journal of Viral Hepatitis*. doi: 10.1111/j.1365-2893.2010.01324.x.

Cornberg, M. *et al.* (2021) ‘S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft fUr Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-B-Virusinfektion’, *Zeitschrift fur Gastroenterologie*, 59(7), pp. 691–776. doi: 10.1055/a-1498-2512.

Da, B. L., Heller, T. and Koh, C. (2019) ‘Hepatitis D infection: From initial discovery to current investigational therapies’, *Gastroenterology Report*, 7(4), pp. 231–245. doi: 10.1093/gastro/goz023.

Draenert, R. *et al.* (2003) ‘Comparison of overlapping peptide sets for detection of antiviral CD8 and CD4 T cell responses’, *Journal of Immunological Methods*. doi: 10.1016/S0022-1759(02)00541-0.

Le Gal, F. *et al.* (2006) ‘Eighth major clade for hepatitis delta virus’, *Emerging Infectious Diseases*, 12(9), pp. 1447–1450. doi: 10.3201/eid1209.060112.

Gilman, C., Heller, T. and Koh, C. (2019) ‘Chronic hepatitis delta: A state-of-the-art review and new therapies’, *World Journal of Gastroenterology*, 25(32), pp. 4580–4597. doi: 10.3748/wjg.v25.i32.4580.

Grabowski, J. *et al.* (2011) ‘Hepatitis D virus-specific cytokine responses in patients with chronic hepatitis delta before and during interferon alfa-treatment.’, *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 31(9), pp. 1395–405. doi: 10.1111/j.1478-3231.2011.02593.x.

Heidrich, B. *et al.* (2014) ‘Late HDV RNA relapse after peginterferon alpha-based therapy of chronic hepatitis delta’, *Hepatology*, 60(1), pp. 87–97. doi: 10.1002/hep.27102.

Huang, Y.-H. *et al.* (2004) 'Identification of novel HLA-A*0201-restricted CD8+ T-cell epitopes on hepatitis delta virus.', *The Journal of general virology*, 85(Pt 10), pp. 3089–98. doi: 10.1099/vir.0.80183-0.

Huang, Y. H. *et al.* (2009) 'Generation of cytotoxicity against hepatitis delta virus genotypes and quasispecies by epitope modification', *Journal of Hepatology*, 50(4), pp. 779–788. doi: 10.1016/j.jhep.2008.11.028.

Karayiannis, P. *et al.* (1993) 'Immunisation of woodchucks with hepatitis delta antigen expressed by recombinant vaccinia and baculoviruses, controls HDV superinfection.', *Progress in clinical and biological research*, 382, pp. 210–214.

Karimzadeh, H. *et al.* (2018) 'Amino Acid Substitutions within HLA-B*27-Restricted T Cell Epitopes Prevent Recognition by Hepatitis Delta Virus-Specific CD8 + T Cells', *Journal of Virology*. doi: 10.1128/JVI.01891-17.

Karimzadeh, H. *et al.* (2019) 'Mutations in Hepatitis D Virus Allow It to Escape Detection by CD8+ T Cells and Evolve at the Population Level', *Gastroenterology*, 156(6), pp. 1820–1833. doi: 10.1053/j.gastro.2019.02.003.

Kefalakes, H. *et al.* (2019) 'Hepatitis D Virus-Specific CD8+ T Cells Have a Memory-Like Phenotype Associated With Viral Immune Escape in Patients With Chronic Hepatitis D Virus Infection', *Gastroenterology*, 156(6), pp. 1805-1819.e9. doi: 10.1053/j.gastro.2019.01.035.

Kim, Y. *et al.* (2012) 'Immune epitope database analysis resource', *Nucleic Acids Research*, 40(W1). doi: 10.1093/nar/gks438.

Kohsar, M. *et al.* (2021) 'Human hepatitis D virus-specific T cell epitopes', *JHEP Reports*. Available at: https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2021.100294.

Landahl, J. *et al.* (2019) 'Detection of a Broad Range of Low-Level Major Histocompatibility Complex Class II-Restricted, Hepatitis Delta Virus (HDV)-Specific T-Cell Responses Regardless of Clinical Status', *Journal of Infectious Diseases*, 219(4), pp. 568–577. doi: 10.1093/infdis/jiy549.

Lauer, G. M. *et al.* (2004) 'High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection', *Gastroenterology*. doi: 10.1053/j.gastro.2004.06.015.

Lempp, F. A. and Urban, S. (2017) 'Hepatitis delta virus: Replication strategy and upcoming therapeutic options for a neglected human pathogen', *Viruses*, 9(7). doi: 10.3390/v9070172.

Mentha, N. *et al.* (2019) 'A review on hepatitis D: From virology to new therapies', *Journal of Advanced Research*, 17, pp. 3–15. doi: 10.1016/j.jare.2019.03.009.

Mueller, M. *et al.* (2010) 'Virus-specific CD4+ T cell responses in chronic HCV infection in blood and liver identified by antigen-specific upregulation of CD154', *Journal of Hepatology*, 52(6), pp. 800–811. doi: 10.1016/j.jhep.2009.12.038.

Nisini, R. *et al.* (1997) 'Human CD4+ T-cell response to hepatitis delta virus: identification of multiple epitopes and characterization of T-helper cytokine profiles', *J Virol*, 71(3), pp. 2241–2251. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9032359.

Noureddin, M. and Gish, R. (2014) 'Hepatitis delta: Epidemiology, diagnosis and management 36 years after discovery', *Current Gastroenterology Reports*, 16(1).

doi: 10.1007/s11894-013-0365-x.

Ross, S. H. and Cantrell, D. A. (2018) ‘Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes’, *Annual Review of Immunology*, 36(1), pp. 411–433. doi: 10.1146/annurev-immunol-042617-053352.

Schirdewahn, T. *et al.* (2017) ‘The Third Signal Cytokine Interleukin 12 Rather Than Immune Checkpoint Inhibitors Contributes to the Functional Restoration of Hepatitis D Virus-Specific T Cells’, *The Journal of infectious diseases*, 215(1), pp. 139–149. doi: 10.1093/infdis/jiw514.

Schulze zur Wiesch, J. *et al.* (2005) ‘Broad repertoire of the CD4+ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes.’, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175, pp. 3603–3613. doi: 10.4049/jimmunol.175.6.3603.

Schulze zur Wiesch, J. *et al.* (2012) ‘Broadly directed virus-specific CD4 $^{+}$ T cell responses are primed during acute hepatitis C infection, but rapidly disappear from human blood with viral persistence’, *The Journal of Experimental Medicine*, 209(1), pp. 61–75. doi: 10.1084/jem.20100388.

Stockdale, A. J. *et al.* (2020) ‘The global prevalence of hepatitis D virus infection: Systematic review and meta-analysis’, *Journal of Hepatology*, 73(3), pp. 523–532. doi: 10.1016/j.jhep.2020.04.008.

Su, C. W. *et al.* (2006) ‘Genotypes and Viremia of Hepatitis B and D Viruses Are Associated With Outcomes of Chronic Hepatitis D Patients’, *Gastroenterology*, 130(6), pp. 1625–1635. doi: 10.1053/j.gastro.2006.01.035.

Tseligka, E. D., Clément, S. and Negro, F. (2021) ‘HDV Pathogenesis: Unravelling Ariadne’s Thread’. doi: 10.3390/v13050778.

Urban, S., Neumann-Haefelin, C. and Lampertico, P. (2021) ‘Hepatitis D virus in 2021: Virology, immunology and new treatment approaches for a difficult-to-treat disease’, *Gut*, 70(9), pp. 1782–1794. doi: 10.1136/gutjnl-2020-323888.

Vlachogiannakos, J. and Papatheodoridis, G. V. (2020) ‘New epidemiology of hepatitis delta’, *Liver International*, 40(S1), pp. 48–53. doi: 10.1111/liv.14357.

Wedemeyer, H. *et al.* (2019) ‘GS-13-Final results of a multicenter, open-label phase 2 clinical trial (MYR203) to assess safety and efficacy of myrcludex B in cwith PEG-interferon Alpha 2a in patients with chronic HBV/HDV co-infection’, *Journal of Hepatology*, 70(1), p. e81. doi: 10.1016/s0618-8278(19)30141-0.

Wedemeyer, P. D. H. (2006) ‘Hepatitis D : Bedeutung von PEG-Interferonen’, pp. 28–29.

6 Erklärung des Eigenanteils

Das Thema sowie die Materialien wurden von Prof. Dr. med. Julian Schulze zur Wiesch, Dr. med. Christoph Scheurich sowie Dr. med. Jan Hendrik Bockmann erarbeitet.

Die Methoden und der Versuchsaufbau wurden ausgesucht und diskutiert von Prof. Dr. med. Julian Schulze zur Wiesch, Dr. med. Christoph Scheurich, Dr. rer. nat. Christin Ackermann und Johanna Landahl.

Die Rekrutierung von Patient*Innen sowie Gewinnung von Proben erfolgte durch Prof. Dr. med. Julian Schulze zur Wiesch, Dr. med. Christoph Scheurich, Dr. med. Jan Hendrik Bockmann und Dr. med. Johann von Felden.

Die Bereitstellung der Gerätschaften und Räumlichkeiten erfolgte von Prof. Dr. med. Ansgar Lohse und Prof. Dr. med. Julian Schulze zur Wiesch.

Die Durchführung der Zellkulturen, ELISpot- und ICS-Versuchsreihen erfolgte maßgeblich von Johanna Landahl, mit Hilfe von Dr. rer. nat. Christin Ackermann, Verena Matzat, Gianluca D'Antonio und Dr. med. Janna Heide.

Die Auswertung der Versuchsreihen erfolgte von Johanna Landahl. Die Diskussion und Deutung der Ergebnisse erfolgte von Johanna Landahl, Prof. Dr. med. Julian Schulze zur Wiesch, Dr. rer. nat. Christin Ackermann, Dr. rer. nat. Melanie Wittner und Dr. med. Jan Hendrik Bockmann.

Die HLA-Typisierung der Patient*Innenproben erfolgte von Matthias Marget, PhD. Die Genotypisierung und Sequenzierung der Patient*Innenproben wurde von Dr. med. Marc Luetgehetmann, Tungalag Nuurei sowie Dr. med. Jan Hendrik Bockmann durchgeführt.

Die *in silico* Prädiktionen sowie *in vitro* Binding Assays wurden in Kooperation mit John Sidney, MD und Alessandro Sette, MD in La Jolla durchgeführt.

Die graphische Darstellung erfolgte von Johanna Landahl.

Die Verfassung der vorliegenden Dissertationsschrift erfolgte von Johanna Landahl.

7 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei meinem Doktorvater Julian Schulze zur Wiesch für die Bereitstellung von Forschungsgeldern, Thema, Materialien und vor allen Dingen von viel eigener Zeit – auch an Wochenenden und im Urlaub.

Bei Jan Bockmann und Christoph Scheurich bedanke ich mich für die Staffellauf-Betreuung und geduldige Anleitung.

Ich bedanke mich bei Christin Ackermann, Melanie Wittner und Verena Matzat für die hohe Frustrationstoleranz, moralische und fachliche Unterstützung und Begleitung über das Labor hinaus.

Meiner Familie danke ich für die emotionale, gedankliche und finanzielle Unterstützung.

Bei meinen Freund*Innen bedanke ich mich sehr für die Hilfestellungen und für die Toleranz meiner späten Abende.

Zu Guter Letzt bedanke ich mich bei Felix Landahl für den ansteckenden Optimismus, das volle Verständnis und die Betreuung unserer Tochter Lilly.

8 Lebenslauf

- entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen -

- entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen -

9 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.
Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....