

Bedeutung des HLA-B*27-Allels für den Ausgang einer Hepatitis-Delta-Virus-Infektion.

Natalia Graf

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen
Universität München zur Erlangung einer

Doktorin der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: apl. Prof. Dr. Ute Reuning

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Ulrike Protzer
2. Prof. Dr. Dirk H. Busch

Die Dissertation wurde am 04.04.2024 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die TUM School of Medicine and Health am 06.11.2024 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen	1
Verzeichnis der Tabellen	2
Abkürzungsverzeichnis	3
Zusammenfassung	5
Abstract	7
Liste der kooperierenden Zentren	9
1. Einleitung	10
1.1. Entdeckungsgeschichte von HDV	10
1.2. HDV-Taxonomie	11
1.3. HDV-Epidemiologie und -Genotypen	11
1.4. HDV-Struktur	12
1.5. Tiermodelle für HDV	14
1.6. HDV-Lebenszyklus und RNA-Replikation	15
1.7. HDV-Infektionsverlauf	20
1.8. HDV-Therapie	21
1.8.1. IFN	22
1.8.2. Aktivierung der angeborenen Immunität – PEG-IFN λ	22
1.8.3. Neue antiviral wirksame Therapien	23
1.8.3.1. Hemmung des Viruseintritts – Myrcludex B	24
1.8.3.2. Hemmung der HBsAg-Sekretion – Nukleinsäurepolymere	24
1.8.3.3. Inhibition der Assemblierung – Lonafarnib, ein Farnesyltransferase-Inhibitor	25
1.9. Immunantwort nach HDV-Infektion	25
1.9.1. Angeborene Immunität	25
1.9.2. Adaptive Immunantwort	26
1.9.2.1. Humorale Immunität	26
1.9.2.2. T-Zell-Antwort	26
1.9.2.2.1. CD4 ⁺ -T-Zellantwort	26
HDV-spezifische CD4 ⁺ -T-Zell-Epitope	26
1.9.2.2.2. CD8 ⁺ T-Zellantwort	28
HDV-spezifische CD8 ⁺ T-Zell-Epitope	28
1.9.2.3. Ausfall der T-Zell-Antwort bei chronischer Infektion	30
1.9.2.3.1. Virus escape	30
1.10. HLA-System	32
1.10.1. HLA-B*27-Allel	34

1.11. Zielsetzung der Doktorarbeit	36
2. Material und Methoden.....	38
2.1. Patienten und Proben.....	38
2.2. Methoden.....	40
2.2.1. Serologische Teste.....	40
2.2.1.1. Bestimmung vom HBs-Antigen.....	40
2.2.1.2. Bestimmung der Antikörper gegen HDV (Anti-HDV).....	42
2.2.2. PCR-Methoden	43
2.2.2.1. Messung der HDV-RNA.....	43
2.2.2.2. HLA-Klasse-I-Typisierung.....	46
2.2.3. Analyse der Datenbanken.....	47
2.2.4. Statistik	48
3. Ergebnisse	49
3.1. Korrelation zwischen dem HLA-B*27-Allel und einer höheren Ausheilungsrate der HDV-Infektion.	52
3.2. Bedeutung der escape-Mutationen in den HLA-B*27 restringierten Epitopen für die Immunantwort.....	52
3.3. Korrelation zwischen den anderen HLA-B*-Allelen und einer höheren Ausheilungsrate der HDV-Infektion.	54
3.4. Korrelation zwischen den HLA-B*-Allelen und einer erhöhten Rate chronischer Verläufe der HDV-Infektion.....	54
4. Diskussion.....	55
Anhang.....	61
Literaturverzeichnis.....	72

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Prävalenz von Anti-HD bei HBsAg-Trägern in der Gesamtbevölkerung	12
Abbildung 2: Struktur von HBV- und HDV-Virionen	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Hauptschritte des HDV-Lebenszyklus	15
Abbildung 4: Schematische Darstellung des S-HDAg und L-HDAg	19
Abbildung 5: Klinische Verlaufsformen der HDV-Infektion. Expressionsniveau von Antigen, DNA oder RNA, Immunoglobulin M (IgM) und Immunoglobulin G (IgG) für HDV und HBV	21
Abbildung 6: Lebenszyklus von HDV und Angriffspunkte für neue antivirale Therapien	23
Abbildung 7: Schematische Übersicht der CD4+ T-Zell-Epitope und ihrer Lokalisation im HDAg	27
Abbildung 8: Schematische Übersicht der CD8+ T-Zell-Epitope und ihrer Lokalisation im HDAg	29
Abbildung 9: Mechanismen der mutationsbedingten virus escape aus virusspezifischen CD8+ T-Zellen	31
Abbildung 10: MHC-Komplex	33
Abbildung 11: HLA-B*27-restringierte Epitope des HDV	36
Abbildung 12: Frequenz der HLA-B*-Allele für bekannte HDV-Epitope bei ausgeheilten und chronischer HDV-Infektion	51
Abbildung 13: Escape Mutationen in den HLA-B*27 restringierten Epitopen (aa99-108 und aa103-112) bei aa-Substitutionen in den Positionen 105 und 106	53
Abbildung 14: Escape Mutationen im HLA-B*15 restringiertem Epitop (aa170-179) bei aa-Substitutionen in der Position 170	53

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Anzahl und Verteilung der Proben aus den Kooperationszentren.....	39
Tabelle 2: Geräte für die Bestimmung von HBsAg.....	40
Tabelle 3: Kits für die Bestimmung von HBsAg	41
Tabelle 4: Reagenzien für die Bestimmung von HBsAg	41
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien für die Bestimmung von HBsAg	41
Tabelle 6: Geräte für die Bestimmung der Antikörper gegen HDV	42
Tabelle 7: Kits für die Bestimmung der Antikörper gegen HDV	42
Tabelle 8: Chemikalien/Reagenzien für die Bestimmung der Antikörper gegen HDV ..	42
Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien für die Bestimmung der Antikörper gegen HDV.....	43
Tabelle 10: Geräte für die RNA-Extraktion	43
Tabelle 11: Kits für die RNA-Extraktion	43
Tabelle 12: Reagenzien für die RNA-Extraktion.....	44
Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien für die RNA-Extraktion	44
Tabelle 14: Geräte für HDV-RNA real time PCR	45
Tabelle 15: Reagenzien für HDV-RNA real time PCR.....	45
Tabelle 16: Verbrauchsmaterialien für HDV-RNA real time PCR.....	46
Tabelle 17: Geräte für die Extraktion der genomischen DNA.....	46
Tabelle 18: Kits für die Extraktion für HLA-Typisierung	46
Tabelle 19: Chemikalien/Reagenzien für die Extraktion für HLA-Typisierung.....	47
Tabelle 20: Verbrauchsmaterialien für die Extraktion für HLA-Typisierung	47
Tabelle 21: Frequenz von HLA-B*-Allelen für bekannte HDV-Epitope bei Patienten mit ausgeheilten und chronischer HDV-Infektion im Vergleich zur Allelverteilung in der deutschen Population	50
Tabelle Anlage 1: Ergebnisse der HLA-Typisierung der Patienten mit der ausgeheilten HDV-Infektion.....	61
Tabelle Anlage 2: Ergebnisse der HLA-Typisierung der Patienten mit der chronischen HDV-Infektion.....	63

Abkürzungsverzeichnis

aa – Aminosäure (aminoacid)
AG - Antigenom
anti-HBc – Antikörper gegen Hepatitis-B-Kernantigen (Antibodies against the hepatitis B core antigen [Anti-HBc])
cccDNA - kovalent geschlossene zirkuläre (engl. covalently closed circular) DNA
CTL –zytotoxische T-Lymphozyten
DNA - Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
ER – endoplasmatisches Retikulum
HBeAg - Hepatitis B e-Protein Antigen (hepatitis B e-protein antigen)
HBcAg – Hepatitis B Kernantigen (hepatitis B core antigen)
HBsAg - Hepatitis B Oberflächenprotein – Antigen (hepatitis B surface antigen)
HBV - Hepatitis-B-Virus
HCC - hepatozelluläres Karzinom
HCV - Hepatitis-C-Virus
HDAg - Hepatitis-Delta-Antigen
HDV - Hepatitis-Delta-Virus
HIV – humanes Immunodefizit Virus
HLA – System - human leukocyte antigen system
HSPG - Heparansulfat-Proteoglykan
ICS - intrazelluläre Cytokin-Färbung
IFN- $\alpha/\beta/\lambda$ - Interferon-alpha /-beta/-lambda
IgG - Immunoglobulin G
IgM – Immunoglobulin M
L-HDAg - large Hepatitis-Delta-Antigen
MDA5 - Melanoma Differentiation-Associated Protein 5
MHC - major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
mRNA – Boten (messenger) Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
NK-Zellen – natürliche Killerzellen
negative sense - ns
NTCP – Sodium(natrium)-taurocholate-cotransporting polypeptide
ORF - open reading frame (offener Leserahmen)
PCR - polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RNAP I, II, III - Wirts-RNA-Polymerase I, II, III
PTM - posttranslationale Modifikation
RNA – Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)

RNP - Ribonukleoprotein

S-HDAg - small Hepatitis-Delta-Antigen

SVPs - subviralen Partikeln (subviral particles)

TCR - T cell receptor (T-Zell-Rezeptor)

WHO - Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)

WHV - Woodchuck-Hepatitis-Virus

Zusammenfassung

Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization [WHO]) sind weltweit ca. 296 Millionen Menschen (Stand 2019) chronisch mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV) infiziert, davon ca. 5% zusätzlich mit dem Hepatitis-Delta-Virus (HDV). HDV kann zu schweren Verlaufsformen der Hepatitis, einschließlich der fulminanten Hepatitis, und zu einer hohen Rate an Leberzirrhosen mit der Spätfolge des hepatozellulären Karzinoms (HCC) führen.

Die virusspezifische CD8+ T-Zell-Immunantwort scheint eine wichtige Rolle für den Ausgang einer HDV-Infektion zu spielen. Nur ein kleiner Teil der Patienten (10-20%) ist in der Lage, eine ausreichende virusspezifische CD8+ T-Zell-Antwort zu generieren und damit die HDV-Infektion auszuheilen. In den letzten Jahren konnten 18 CD4+ und 18 CD8+ T-Zell-Epitope charakterisiert werden. Bisher wurden zwei überlappende humane Leukozytenantigene (human leukocyte antigen [HLA])-B*27-restringierte CD8+ T-Zell-Epitope, large-HDAg (L-HDAg)99-108 und L-HDAg103-112, in der konservierten Region des großen HDV-Proteins identifiziert. Eine spezifische CD8+ T-Zell-Immunantwort gegen beide Epitope wurde bei HLA-B*27-positiven Patienten mit ausgeheilter HDV-Infektion nachgewiesen. Funktionelle T-Zell-Analysen zeigten, dass eine Substitution der Aminosäuren (aminoacid [aa]) an den Positionen 105 und 106 eine Immunevasion für HDV verursacht.

In dieser Studie wurde die Frage gestellt, ob das HLA-B*27-Allel mit einer höheren Ausheilungsrate bei Patienten mit einer HDV-Infektion assoziiert ist. Für den Fall, dass das HLA-B*27-Allel in dieser Studie nicht mit einer höheren Ausheilungsrate der HDV-Infektion assoziiert ist, sollte untersucht werden, inwieweit Escape-Mutationen innerhalb der HLA-B*27-restringierten Epitope des HDV für die fehlende Immunantwort verantwortlich sind. Zudem wurde untersucht, ob andere HLA-B*-Allele möglicherweise mit einer höheren Chronifizierungs- oder Ausheilungsrate der HDV-Infektion korrelieren.

Um diese Fragen zu beantworten, wurden Proben von 69 Patienten mit ausgeheilter HDV-Superinfektion bei weiter persistierender HBV-Infektion und einer Kontrollgruppe von 191 Patienten mit chronischer HBV/HDV-Superinfektion aus den Kooperationszentren in der EU, den USA und dem Iran analysiert. Bei allen Patienten wurde eine HLA-Klasse-I-Typisierung durchgeführt. Die Häufigkeit des HLA-B*27-Allels und der anderen HLA-B*-Allele bei Patienten mit ausgeheilter und chronischer HDV-Infektion wurde verglichen.

Im Gegensatz zum Hepatitis-C-Virus (HCV) und zum Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) gab es keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem HLA-B*27-Allel und einer höheren HDV-Ausheilungsrate: Das HLA-B*27-Allel wurde bei sechs von 69 ausgeheilten Patienten (8,7 %) und bei zehn von 191 chronisch kranken Patienten (5,2 %) nachgewiesen (p-Wert 0.38). Anhand der Daten der „Comprehensive Hepatitis D Virus Database“ wurde dann untersucht, inwieweit Escape-Mutationen innerhalb der beiden HLA-B*27-restringierten Epitope des HDV für die fehlende Immunantwort verantwortlich sind. Eine erhöhte Rate von Escape-Mutationen in den beiden beschriebenen HLA-B*27-Epitopen des HDV konnte nicht nachgewiesen werden: Nur bei neun von 848 Isolaten (1%) in der „Comprehensive Hepatitis D Virus Database“ wurden Escape-Mutationen in den beiden beschriebenen HLA-B*27-Epitopen gefunden.

Ein Vergleich der Verteilung anderer HLA-B*-Allele mit bekannten HDV-Epitopen bei ausgeheilten und chronisch erkrankten Patienten ergab, dass das HLA-B*53-Allel statistisch signifikant mit einer höheren Ausheilungsrate der HDV-Infektion korrelierte: das HLA-B*53-Allel wurde bei sieben von 69 Patienten mit ausgeheilter HDV-Infektion (10,1%) und nur bei fünf von 191 Patienten mit chronischer HDV-Infektion (2,6%) nachgewiesen (p-Wert 0.018).

Für das HLA-B*52-Allel konnte gezeigt werden, dass es mit einer erhöhten Rate an chronischen Verläufen der HDV-Infektion korrelierte: das HLA-B*52-Allel wurde bei 16 von 191 Patienten mit chronischer HDV-Infektion (8,4%), aber nur bei einem von 69 Patienten mit ausgeheilter Infektion (1,4%) nachgewiesen; dieser Unterschied war statistisch signifikant (p-Wert 0.048). Dies würde bedeuten, dass Träger dieses Allels ein höheres Risiko für die Chronifizierung einer HDV-Infektion haben könnten.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie keine Korrelation zwischen dem HLA-B*27-Allel und einer höheren Ausheilungsrate einer HDV-Infektion nachgewiesen werden und Escape-Mutationen als Ursache für die fehlende Immunantwort konnten nicht gefunden werden. Es wurde jedoch festgestellt, dass das HLA-B*53-Allel statistisch signifikant mit einer höheren Ausheilungsrate der HDV-Infektion korreliert. Für das HLA-B*52- Allel konnte gezeigt werden, dass es mit einer erhöhten Rate chronischer Verläufe der HDV-Infektion korreliert.

Abstract

According to the World Health Organization (WHO), around 296 million people worldwide (as of 2019) are chronically infected with the hepatitis B virus (HBV), of which around 5% are also infected with the hepatitis delta virus (HDV). HDV can lead to severe forms of hepatitis, including fulminant hepatitis, and to a high rate of liver cirrhosis with the late consequence of hepatocellular carcinoma.

The virus-specific CD8⁺ T-cell immune response appears to play an important role in the outcome of an HDV infection. Only a small proportion of patients (10-20%) are able to generate a sufficient virus-specific CD8⁺ T cell response and thus cure the HDV infection. In recent years, 18 CD4⁺ and 18 CD8⁺ T cell epitopes have been characterised. To date, two overlapping HLA-B*27-restricted CD8⁺ T cell epitopes, L-HDAg99-108 and L-HDAg103-112, have been identified in the conserved region of the large HDV protein. A specific CD8⁺ T cell immune response against both epitopes was detected in HLA-B*27-positive patients with cured HDV infection. Functional T cell analyses showed that a substitution of the amino acids at positions 105 and 106 causes immune evasion for HDV.

In this study, the question was asked whether the HLA-B*27 allele is associated with a higher cure rate in patients with HDV infection. In the event that the HLA-B*27 allele is not associated with a higher cure rate of HDV infection in this study, it should be investigated to what extent escape mutations within the HLA-B*27-restricted epitopes of HDV are responsible for the lack of immune response. It was also investigated whether other HLA-B* alleles might correlate with a higher chronification or cure rate of HDV infection.

To answer these questions, samples from 69 patients with cured HDV superinfection with persistent HBV infection and a control group of 191 patients with chronic HBV/HDV superinfection from the cooperation centres in the EU, the USA and Iran were analysed. HLA class I typing was performed on all patients. The frequency of the HLA-B*27 allele and the other HLA-B* alleles in patients with cured and chronic HDV infection was compared.

In contrast to the hepatitis C virus (HCV) and the human immunodeficiency virus (HIV), there was no statistically significant correlation between the HLA-B*27 allele and a higher HDV cure rate: the HLA-B*27 allele was detected in six of 69 cured patients (8.7 %) and in ten of 191 chronically ill patients (5.2 %) (p-value 0.38). Using data from the "Comprehensive Hepatitis

D Virus Database", the extent to which escape mutations within the two HLA-B*27-restricted epitopes of HDV are responsible for the lack of immune response was then analysed. An increased rate of escape mutations in the two described HLA-B*27 epitopes of HDV could not be detected: Only nine out of 848 isolates (1%) in the "Comprehensive Hepatitis D Virus Database" were found to have escape mutations in the two described HLA-B*27 epitopes.

A comparison of the distribution of other HLA-B* alleles with known HDV epitopes in cured and chronically ill patients showed that the HLA-B*53 allele correlated statistically significantly with a higher cure rate of HDV infection: the HLA-B*53 allele was detected in seven of 69 patients with cured HDV infection (10.1%) and only in five of 191 patients with chronic HDV infection (2.6%) (p-value 0.018).

The HLA-B*52 allele was shown to correlate with an increased rate of chronic courses of HDV infection: the HLA-B*52 allele was detected in 16 of 191 patients with chronic HDV infection (8.4%), but only in one of 69 patients with cured infection (1.4%); this difference was statistically significant (p-value 0.048). This would mean that carriers of this allele could have a higher risk of chronic HDV infection.

In summary, no correlation between the HLA-B*27 allele and a higher cure rate of HDV infection could be demonstrated in this study and escape mutations could not be found as a cause for the lack of immune response. However, it was found that the HLA-B*53 allele correlates statistically significantly with a higher cure rate of HDV infection. For the HLA-B*52 allele, it was shown that it correlates with an increased rate of chronic courses of HDV infection.

Liste der kooperierenden Zentren

- Institute of Virology, Technical University of Munich/Helmholtz Zentrum München, Munich, Germany
- Institute of Virology, University Hospital of Essen, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany
- University Hospital Freiburg, Department of Medicine II – University of Freiburg, Faculty of Medicine, Freiburg, Germany
- Department of Gastroenterology, Hepatology and Endocrinology, Hannover Medical School, Hannover, Germany
- CIBERehd and Departments of Biochemistry/Microbiology and Hepatology, Vall d'Hebron Hospital, University Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain
- Department of Medical Sciences, University of Turin, Torino, Italy
- University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany
- University Hospital Munich-Grosshadern, Department of Medicine II, Munich, Germany
- Institute of Virology, Heinrich-Heine-University, University Hospital, Duesseldorf, Germany
- Institute of Microbiology, University Regensburg, Germany
- Dept. of Virology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- University Hospital Heidelberg, Department of Infektiology, Virology
- Liver Center Munich, Germany
- National Institutes of Health, NIDDK, Bethesda, United States

1. Einleitung

1.1. Entdeckungsgeschichte von HDV

Ende der 70er Jahre wurde über ein neues Hepatitisvirus mit der ursprünglichen Bezeichnung Delta berichtet. Mitte der 70er Jahre entdeckten *Rizzetto et al.*, dass einige Hepatitis-B-Oberflächenprotein-Antigen (hepatitis B surface antigen [HBsAg])-positive Leberbiopsien nicht mit dem Referenzserum reagierten, das Antikörper gegen das Hepatitis-B-Kernantigen (hepatitis B core antigen [HBcAg]; antibodies against the hepatitis B core antigen [anti-HBc]) enthielt. Es wurde vermutet, dass diese Biopsien möglicherweise Immunkomplexe eines anderen Antigens enthielten. Aus dem Serum eines HBsAg-positiven Patienten wurde das neue Antiserum hergestellt, das mit einem unbekanntem Antigen in den Leberkernen reagierte und eine dem HBcAg ähnliche Fluoreszenzfärbung ergab. Elektronenmikroskopisch konnten in der Biopsie keine partikulären oder strukturierten virusähnlichen Elemente nachgewiesen werden. *Rizzetto* und Mitarbeiter bezeichneten das neu entdeckte Antigen als HBsAg-assoziiertes Delta-Antigen und berichteten 1977, dass es sich wahrscheinlich um einen bisher unbekanntem Bestandteil des HBV-Nukleokapsids handelt (*Rizzetto et al.*, 1977). Kurz darauf begannen in den USA experimentelle Untersuchungen an Schimpansen. Die Übertragung von HDV wurde nachgewiesen und zwei klinische Formen der HDV-Infektion beschrieben: Die HBV/HDV-Koinfektion und die HDV-Superinfektion. (*Rizzetto et al.*, 1980). Das Konzept der Koinfektion und Superinfektion ermöglichte es, den natürlichen Verlauf der HDV-Infektion zu verstehen (*Rizzetto et al.*, 1990). Dieses Infektionsmuster zeigte, dass HDV kein Bestandteil einer HBV-Variante war, sondern ein defektes, nicht autonomes pathogenes Virus, das der biologischen Hilfe von HBV bedurfte.

1981 wurden ein Radioimmunoassay und ein enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA-Test) auf der Basis von gereinigtem Delta-Antigen zum Nachweis spezifischer anti-HDV-Antikörper im Blutserum von Patienten entwickelt (*Crivelli et al.*, 1981).

Die Ribonukleinsäure (ribonucleic acid [RNA]) des HDV wurde 1986 von *A. Kos* am Primatenzentrum in Rijswijk (Niederlande) genauer charakterisiert und als einzelsträngiger, zirkulär geschlossener Ring erkannt (*Kos et al.*, 1986).

1.2. HDV-Taxonomie

Im Jahr 2020 hat die ICTV Hepadnaviridae and Hepatitis Delta Virus Study Group (Hepojoki et al.) eine Taxonomie von HDV vorgeschlagen:

Realm – Ribozviria

Familie – Kolmioviridae

Genus (Gattung)– Deltavirus

Art – Deltavirus italiense (Genotyp 1), D. japonense (Genotyp 2), D. taiwanense (Genotyp 4)

1.3. HDV-Epidemiologie und -Genotypen

Diagnostische Tests zum Nachweis von Anti-HDV-Antikörpern wurden nach der Entdeckung von HDV rasch entwickelt, und ihr Einsatz spielt eine wichtige Rolle beim Verständnis der weltweiten Epidemiologie von HDV. Die Bedeutung von Anti-HDV als epidemiologischer Marker variiert je nach klinischem Umfeld. Bei einer HBV/HDV-Koinfektion sind Antikörper transient, so dass es oft nicht möglich ist, eine frühere Infektion nachzuweisen. Bei einer HDV-Superinfektion bei HBsAg-Trägern sind Antikörper über einen längeren Zeitraum nachweisbar. Daher sind HDV-superinfizierte HBsAg-Träger eine zuverlässige Informationsquelle für die HDV-Epidemiologie, und Prävalenzdaten sollten auf diese Kategorie beschränkt werden.

Neuere Metaanalysen haben die Zahl der Patienten mit chronischer HDV-Infektion weltweit geschätzt, wobei die Zahlen stark schwanken: Die weltweite Prävalenz von HDV wird auf 12 Millionen Menschen geschätzt (Stockdale et al., 2020), andere Berechnungen gehen von 32-61 Millionen (Miao et al., 2020), (Stockdale et al., 2020) oder sogar 62-72 Millionen (Chen et al., 2019) Betroffenen aus.

Im Jahr 2020 fassten *Stockdale et al.* Studien zusammen, in denen 120.293 HBsAg-positive Personen auf Anti-HDV getestet wurden. Die Anti-HDV-Prävalenz betrug 4,5 % bei HBsAg-positiven Personen und 16,4 % bei Patienten in hepatologischen Kliniken. Weltweit wurden schätzungsweise 0,16 % der Allgemeinbevölkerung, d. h. insgesamt 12,0 Millionen Menschen, positiv auf Anti-HDV getestet. Die Prävalenz unter HBsAg-positiven Personen war am höchsten in der Mongolei, der Republik Moldau und in west- und zentralafrikanischen Ländern und war höher bei intravenös Drogenabhängigen, Hämodialysepatienten, Männern,

die Sex mit Männern haben, kommerziellen Sexarbeitern und Personen mit HCV oder HIV. (Stockdale et al., 2020).

Abbildung 1 fasst die Prävalenz der Anti-HD-positiven HBsAg-Träger zusammen.

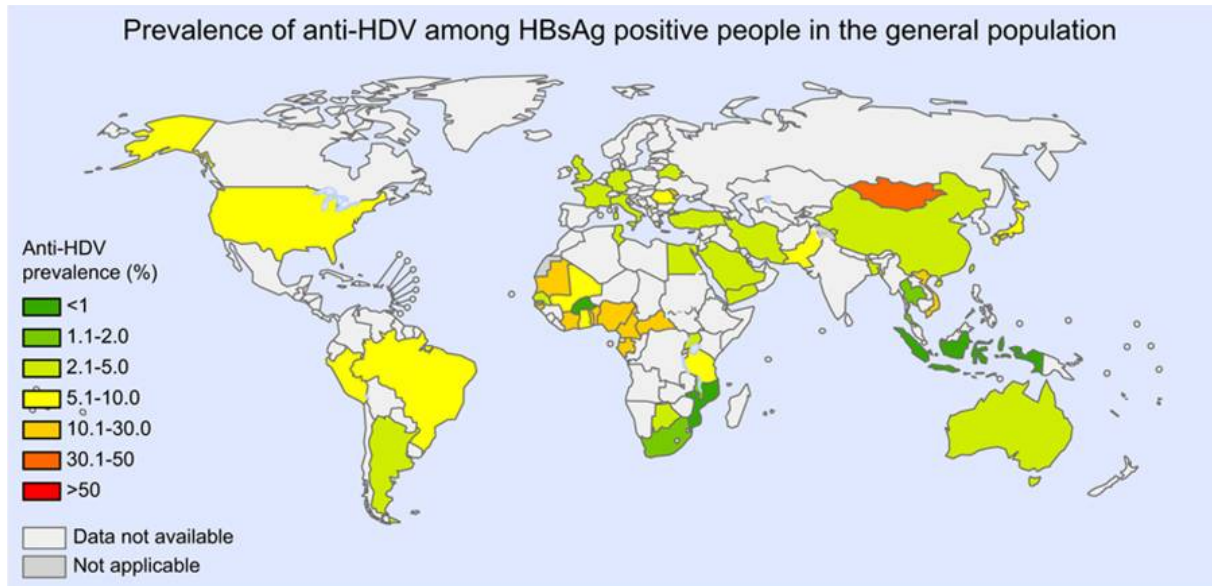


Abbildung 1: Prävalenz von Anti-HD bei HBsAg-Trägern in der Gesamtbevölkerung

Mit Hotspots in der Mongolei, der Republik Moldau und den Ländern West- und Zentralafrikas.

(Stockdale et al., 2020)

Zurzeit sind acht HDV-Genotypen beschrieben. Die HDV-Genotypen unterscheiden sich in ihrer Genomsequenz um 19-40 %, und die meisten können in zwei bis vier Subgenotypen (a-d) unterteilt werden, wobei die Subgenotypen eine Ähnlichkeit von > 84-90 % über das gesamte Genom aufweisen. (Le Gal et al., 2017). Genotyp 1 dominierte weltweit (89,9 % der veröffentlichten Daten). Andere Genotypen waren stärker lokalisiert, darunter Genotyp 2 in Asien, Genotyp 3 in Lateinamerika (hauptsächlich im Amazonasbecken), Genotyp 4 in Japan und China (Taiwan), Genotyp 5 in Westafrika und Genotyp 6-8 in Zentralafrika.

1.4. HDV-Struktur

HDV ist das kleinste humane Virus mit einem Durchmesser von 35-36 nm (Zhang and Urban, 2020) und benötigt HBV, genauer gesagt dessen Hülle - HBsAg, um in die Hepatozyten einzudringen, sich intrahepatisch zu vermehren und sich zwischen den Wirten zu verbreiten (Lempp et al., 2016, Lucifora and Delphin, 2020).

Die Struktur von HDV und HBV (aufgrund der gemeinsamen Hülle gemeinsam dargestellt) ist in Abbildung 2 dargestellt.

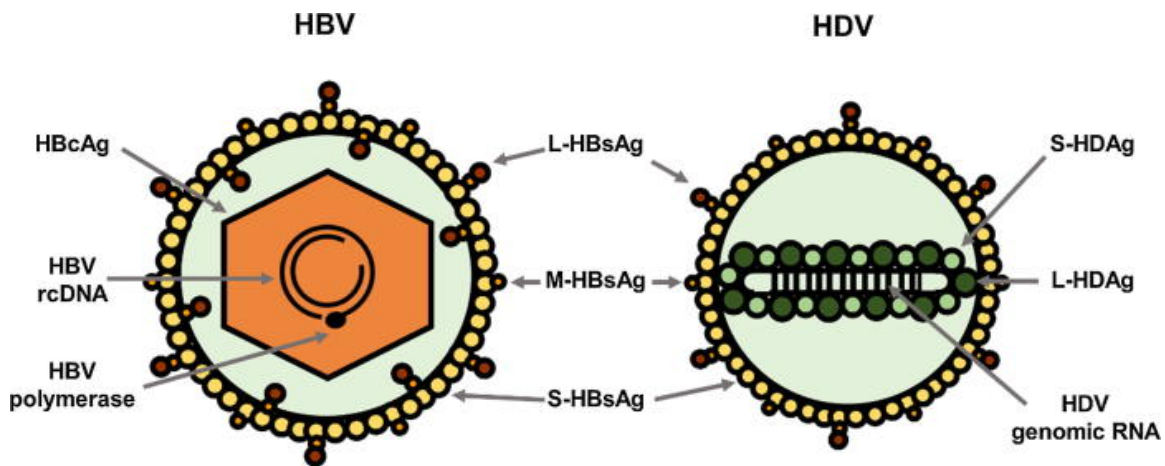


Abbildung 2: Struktur von HBV- und HDV-Virionen

Beide Viren verwenden HBsAg (small-, middle-, large- [S-, M- und L-HBsAg]) für ihren Zusammenbau. Das ikosaedrische HBV-Kapsid wird durch Multimerisierung seines HBcAg gebildet und enthält eine Kopie des viralen, teilweise doppelsträngigen Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid [DNA])-Genoms (oder relaxierte zirkuläre DNA, [rcDNA]) und die virale Polymerase. HDV-Virionen enthalten eine Kopie des viralen zirkulären, einzelsträngigen RNA-Genoms, die mit beiden Formen seines einzigen Proteins (Hepatitis-Delta-Antigen (HDAg)) - großes und kleines HDAg (large- und small-HDAg [L- und S-HDAg]) assoziiert ist und das virale Ribonukleoprotein (RNP) bildet.

(Mentha et al., 2019)

HD-Virionen enthalten eine Kopie des kovalent geschlossenen, einzelsträngigen viralen RNA-Genoms mit negativer Polarität, bestehend aus 1672 bis 1697 Ribonukleotiden (genotypabhängig) (Hughes et al., 2011). Das RNA-Genom weist eine Sequenzkomplementarität von 70 % auf und hat einen hohen Guanosin/Cytidin-Gehalt, wodurch es zu einer stäbchenförmigen Struktur gefaltet werden kann (Wang et al., 1986, Kos et al., 1986, Mentha et al., 2019).

Ein einziges Protein mit 214 Aminosäuren wird kodiert (Hughes et al., 2011), das HDAg, das in zwei Varianten vorkommt: das S-HDAg und das L-HDAg, das 19 zusätzliche C-terminale Aminosäuren aufweist (Zhang and Urban, 2020). Der RNP-Komplex besteht aus dem RNA-Genom und zwei Isoformen des HDAg, die das RNA-Genom umhüllen (Griffin et al., 2014).

1.5. Tiermodelle für HDV

Der Mensch ist der einzige natürliche Wirt für HDV. Leider sind die Tiermodelle für die Untersuchung von HDV sehr begrenzt, da ein Modell sowohl für HBV als auch für HDV empfänglich sein muss.

Die besten Modelle sind Primaten, darunter Schimpansen. Bereits 1978 begann die Gruppe *Rizzetto et al.* eine Zusammenarbeit mit dem National Institute of Health und der Georgetown University in den USA. Durch Infektion von Schimpansen (HBV-naive Tiere und asymptomatische HBV-Träger) mit Serum von HDV-Patienten konnten zwei Verlaufsformen (Koinfektion und Superinfektion) untersucht werden. (Rizzetto et al., 1980)

Einige Nichtprimaten wie *Tupaia bengaleri* (Zheng et al., 1995) können mit (humanem) HBV infiziert und mit HDV ko-/superinfiziert werden.

Ein weiteres gutes Tiermodell für HDV ist das Waldmurmeltier (Woodchuck). Waldmurmeltiere, die chronisch mit dem Woodchuck-Hepatitis-Virus (WHV) infiziert sind, können mit HDV superinfiziert werden. Studien haben gezeigt, dass mit WHV infizierte Waldmurmeltiere mit dem von Schimpansen stammenden HDV superinfiziert werden können (Ponzetto et al., 1984). Natürliche HDV-Infektionen bei Waldmurmeltieren sind bisher nicht bekannt.

Kürzlich wurden humanisierte chimäre Mausmodelle entwickelt (uPA/SCID-Mäuse). HDAg/HBsAg-transgene Mäuse entwickeln keine Lebererkrankung (Guilhot et al., 1994). In humanisierten uPA/SCID-Mäusen kann eine HDV-Monoinfektion intrahepatisch ohne HBsAg für mindestens sechs Wochen persistieren (Giersch et al., 2014).

1.6. HDV-Lebenszyklus und RNA-Replikation

Der HDV-Lebenszyklus ist in Abbildung 3 vereinfacht und schematisch dargestellt.

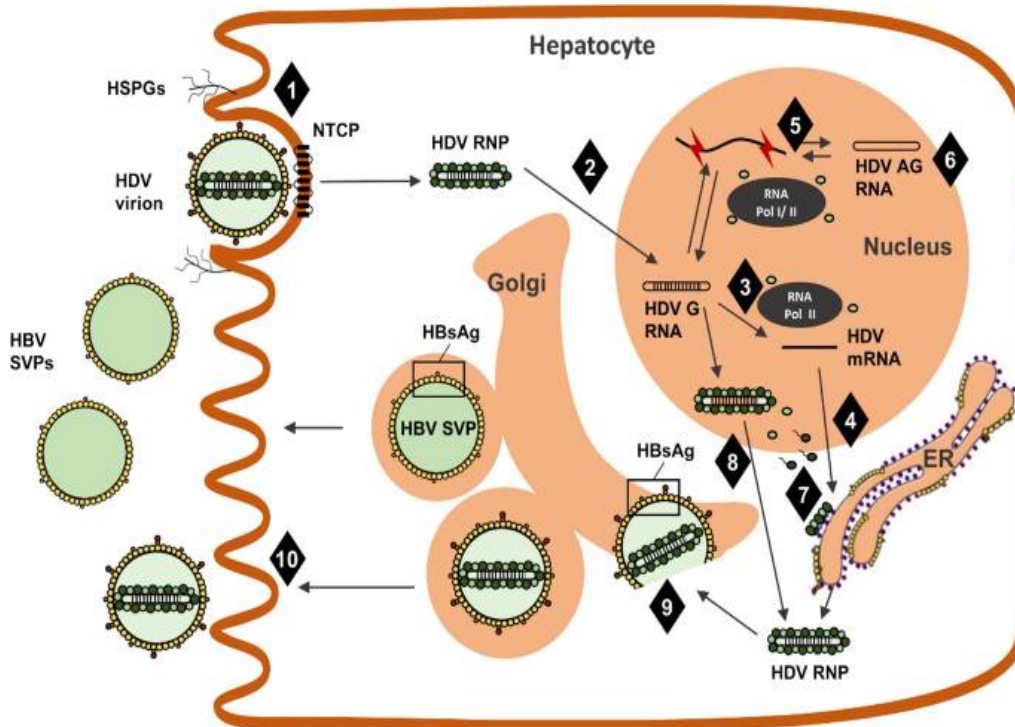


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Hauptschritte des HDV-Lebenszyklus

Der Eintritt in das HDV (Schritt 1) wird durch einen ersten Anheftungsschritt vermittelt, der aus der Interaktion des Virus mit Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPGs) und der späteren spezifischen Interaktion von L-HBsAg mit dem viralen Rezeptor Natrium-taurocholat-transportierenden Polypeptid (NTCP) resultiert. Das virale RNP wird dann in den Zellkern transportiert (Schritt 2), wo es das virale Genom freisetzt, das als Vorlage für die Transkription der HDV-Messenger-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid [mRNA]) dient (Schritt 3), aus der HDV-AG übersetzt wird (Schritt 4). Die Replikation der viralen RNA (Schritt 5) wird durch zelluläre DNA-abhängige RNA-Polymerasen in Gegenwart von S-HDV-AG über einen Rolling-Circle-Mechanismus unter Bildung von multimeren und antigenomischen RNA-Intermediaten vermittelt. Während der Replikation kann die antigenomische RNA durch die Adenosindesaminase, die auf RNA 1 wirkt (adenosine deaminase acting on RNA-1 [ADAR1]) (Schritt 6) editiert werden, was zur Expression von L-HDV-AG-Molekülen führt. Die Farnesylierung von L-HDV-AG (Schritt 7) ist für die Regulierung der Replikation und des viralen Aufbaus notwendig. Die neu gebildeten HDV-RNPs werden im Zellkern zusammengesetzt (Schritt 8), exportiert und dann von HBsAg umhüllt (Schritt 9), und zwar durch die Interaktion von farnesyliertem L-HDV-AG mit HBsAg. Es wird angenommen, dass HDV-Virionen parallel zu den HBV-subviralen Partikeln (subviral particles [SVPs]) durch das Golgi-System sezerniert werden (Schritt 10).

ADAR1- Adenosindesaminase, die auf RNA 1 wirkt; AG - Antigenom; ER - endoplasmatisches Retikulum; G - Genom; HBV - Hepatitis-B-Virus; HDV - Hepatitis-B-Virus; HSPGs -

Heparansulfat-Proteoglykane; NTCP - Natriumtaurocholat-Co-Rezeptorpeptid; RNP - Ribonukleoprotein; SVPs - subvirale Partikel.

(Mentha et al., 2019)

HBV und HDV werden von HBsAg umhüllt und dringen daher auf die gleiche Weise in die Hepatozyten ein (Sureau and Negro, 2016). Um infektiös zu sein, benötigen beide Viren L-HBsAg, insbesondere die 75 Aminosäuren an seinem N-Terminus (in der PreS1-Domäne), wo sich eine essentielle Myristoylierungsstelle befindet (Urban et al., 2014), sowie spezifische Aminosäurereste von S-HBsAg.

M-HBsAg scheint jedoch keine obligatorische Rolle zu spielen (Sureau et al., 1994, Abou-Jaoudé and Sureau, 2007). HBsAg bindet initial unter Beteiligung der PreS-Domäne und des „antigenic loop“ der S-Domäne an HSPGs (Schulze et al., 2007, Sureau and Salisse, 2013), die auf der Außenseite der Wirtszellmembran exponiert sind (Schulze et al., 2007, Leistner et al., 2008, Lamas Longarela et al., 2013).

Eine besonders wichtige Rolle wird dem Glypican-5 zugeschrieben, das als Eintrittsfaktor identifiziert wurde, dessen Ausschaltung die Infektion jedoch nicht verhindern kann (Verrier et al., 2016). Die Bindung an diesen Rezeptor ist notwendig, aber nicht entscheidend für den Eintritt des Virus. Im zweiten Schritt bindet der myristoylierte N-Terminus der PreS1-Domäne des L-HBsAg mit hoher Affinität an NTCP (Urban et al., 2014). Diese Rezeptorbindung ist notwendig und ausreichend für eine HBV- und HDV-Infektion (Yan et al., 2012, Ni et al., 2014). HDV wird in die Wirtszelle aufgenommen, es kommt zur Fusion von viraler und zellulärer Membran.

Nach dem Eintritt des HDV in die Zelle trennt sich die Hülle vom RNP und dieses wandert über ein Kernortungssignal in den Zellkern (Alvarado-Mora et al., 2013). Die HDV-Replikation erfolgt unabhängig von HBV und findet im Zellkern statt. HDV besitzt keine eigene RNA-abhängige RNA-Polymerase und nutzt auch keine Polymerase von HBV. HDV entführt Wirtsenzyme und erzwingt einen Matrizenwechsel von Wirts-DNA zu viraler RNA (Taylor, 2015, Botelho-Souza et al., 2017), möglicherweise mit Hilfe einer Histon-H3-Mimikry-Strategie (Abeywickrama-Samarakoon et al., 2020). Die genauen Mechanismen, mit denen HDV RNA-Polymerasen für seine Replikation entführt, sind noch nicht verstanden.

Die Identität der beteiligten Polymerasen wird noch diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass drei Wirts-RNA-Polymerase (RNAP)-Typen, II und III, mit dem HDV-Genom interagieren (Greco-Stewart et al., 2007, Greco-Stewart et al., 2009). RNAP I ist an der antigenomischen

Transkription beteiligt, für RNAP III wurde bisher keine genaue Funktion beschrieben (Greco-Stewart et al., 2009). Die RNAP II wurde als Wirts-RNAP identifiziert, die an der Synthese des Genoms und der mRNA beteiligt ist (Modahl and Lai, 2000, Chang et al., 2008). Obwohl es wahrscheinlich erscheint, dass RNAP II für die Synthese der Antigenom (AG)-RNA verantwortlich ist (Chang et al., 2008), wird die Identität der beteiligten Polymerase noch diskutiert (Lucifora and Delphin, 2020). Beide Formen von HDAg sind an der Regulation der HDV-Replikation beteiligt: S-HDAg fördert die Genomreplikation (Kuo et al., 1989, Yamaguchi et al., 2001), L-HDAg ist ein potenter transdominanter Inhibitor der Genomreplikation und fördert die Virionassemblierung (Chao et al., 1990, Glenn and White, 1991, Sato et al., 2004).

Das Virus produziert in infizierten Zellen drei virale RNAs: das Negativ-Sense (ns)-Genom (300.000 Kopien), die mRNA für das virale Protein HDAG (500 Kopien) und das AG (100.000 Kopien) (Alves et al., 2013). HDAG interagiert mit dem Genom und dem AG und bildet RNP-Komplexe (Chao et al., 1991, Wang and Lemon, 1993, Defenbaugh et al., 2009). HDV repliziert im Zellkern über einen Rolling-Circle-Mechanismus, die ringförmige genomische RNA dient als Matrize für die Synthese des AG und der mRNA, das ringförmige AG dient als Matrize für die Synthese des Genoms (Reid and Lazinski, 2000, Greco-Stewart et al., 2007). Genomische und antigenomische RNA enthalten selbstspaltende Ribozyme. Die Wirts-RNAP durchläuft mehrfach ringförmige HDV-RNA-Matrizen und produziert Multimere, aus denen ribozymgespaltene monomere Kopien entstehen; diese linearen Monomere werden dann durch Wirts-RNA-Ligase ligiert und bilden Kreise (Reid and Lazinski, 2000, Greco-Stewart et al., 2007), diese Kreise dienen als Matrizen für die Produktion von linearen Multimeren genomischer RNA mit entgegengesetzter Polarität. Diese prozessieren sich selbst zu linearen genomischen Monomeren durch autokatalytische Spaltung an einer anderen Ribozymstelle, die nur einmal in jeder genomischen RNA kodiert ist. Die genomischen Monomere werden zu Ringen ligiert, die entweder zusätzliche Replikationsrunden unterstützen oder in entstehende Virionen verpackt werden können (Lai, 1995). Eine kleinere antigenomische sense-mRNA wird von der genomischen Matrize transkribiert. Diese mRNA kodiert für beide Formen von HDAG (Chang et al., 2008).

Der Startpunkt der mRNA-Synthese befindet sich in der Nähe des Loop-Endes der geschlossenen Hairpin-RNA-Struktur, wo sich das 5'-Ende des HDAG-Gens befindet (Modahl and Lai, 1998, Gudima et al., 2000). Der Startpunkt der Genomsynthese ist derzeit nicht bekannt. Es ist möglich, dass die Initiationsstelle diskret ist, es ist auch möglich, dass es mehrere Initiationsstellen gibt. (Stephenson-Tsoris and Casey, 2022). *Greco-Stewart et al.* beobachteten die Bindung von RNAP II an HDV-RNA-Fragmente von beiden Loop-Enden der genomischen und antigenomischen Closed-Hairpin-Struktur (Greco-Stewart et al., 2007).

Es gibt mehrere offene Leserahmen (ORFs) in der genomischen und antigenomischen HDV-RNA, aber nur ein ORF auf dem AG kodiert für HDAg (Wang et al., 1986, Gudima et al., 2002), wobei dieser ORF nicht direkt in HDAg translatiert werden kann, dafür dient eine mRNA (Hsieh et al., 1990). Wie bereits erwähnt, gibt es zwei Isoformen von HDAg (S-HDAg und L-HDAg). Diese beiden Isoformen unterscheiden sich durch einen zusätzlichen C-terminalen Abschnitt von 19 Aminosäuren in L-HDAg. S-HDAg wird für die Replikation der HDV-RNA benötigt, L-HDAg ist für die Virionbildung essentiell. Die C-terminale Domäne von L-HDAg ermöglicht die Interaktion mit HBsAg (Glenn et al., 1992).

Eine wichtige Rolle im Lebenszyklus von HDV spielt ein Enzym namens ADAR1. Die Prozessierung der antigenomischen RNA durch ADAR1 fördert den Übergang von der S-HDAg-mRNA zur L-HDAg-mRNA-Transkription (Casey, 2012). ADAR1 hat zwei Isoformen: die kleine, die konstitutiv exprimiert wird, und die große, deren Expression durch Interferon (IFN) Typ I stimuliert wird. Über die Rolle der einzelnen ADAR1-Isoformen im HDV-Lebenszyklus liegen noch widersprüchliche Ergebnisse vor (Wong and Lazinski, 2002, Hartwig et al., 2006). ADAR1 wirkt auf die Amber/W-Stelle des HDV-AG. Diese Stelle ist ein UAG-Amber-Stoppocodon und führt zur Termination der Translation und nachfolgender S-HDAg-Produktion. ADAR1 desaminiert ein Adenosin (UAG → UIG) und das resultierende Inosin wird im nächsten Replikationszyklus als Guanosin erkannt, was zu einem ACC-Triplett auf dem Genom führt (anstelle der ursprünglichen AUC). Die Transkription dieses Triplettts erzeugt in der mRNA ein für Tryptophan kodierendes UGG-Codon, das nicht mehr als Stoppcodon fungiert. Folglich werden weitere 19 Aminosäuren translatiert, was zur Synthese von L-HDAg führt (Polson et al., 1996, Casey, 2012, Zhang and Urban, 2020). Für die Funktion der HDAg sind posttranslationale Modifikationen (PTMs) notwendig (Lai, 2005a, Goodrum and Pelchat, 2018). Die Struktur der beiden HDAg mit den funktionellen Domänen und den Stellen der posttranslationalen Modifikationen ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

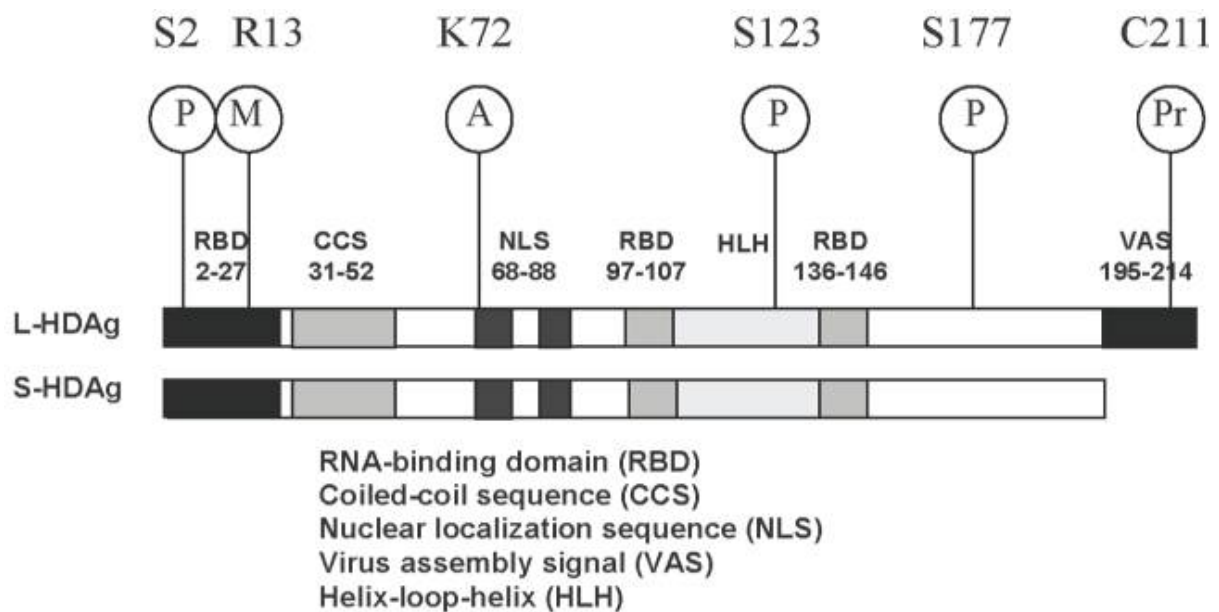


Abbildung 4: Schematische Darstellung des S-HDAg und L-HDAg

Abkürzungen: P - Phosphorylierung; M - Methylierung; A - Acetylierung; Pr - Prenylierung.

(Lai, 2005b)

Serin-2, -123 und -177 werden posttranslational phosphoryliert, Arginin-13 wird methyliert und Lysin-72 wird acetyliert. Die Acetylierung von Lysin-72 ist für die subzelluläre Lokalisierung von HDAg und die RNA-Replikation erforderlich. (Lee et al., 1994, Lai, 2005b, Taberero et al., 2018)

Für die RNA-Replikation benötigt das Virus die zelluläre RNA-Polymerase II, für die Interaktion mit dem Enzym müssen zwei Serinreste des S-HDAg phosphoryliert sein (Hong and Chen, 2010, Abbas and Afzal, 2013). Cystein-211 kommt nur in L-HDAg vor, die Farnesylierung von Cystein-211 ist für die Virusaggregation (Lee et al., 1994, Lai, 2005a, Taberero et al., 2018) und die Replikationshemmung (Hwang and Lai, 1994) notwendig.

HDV kann unabhängig von HBV replizieren und neue RNPs synthetisieren, benötigt jedoch HBsAg in derselben Zelle, um aus den Hepatozyten freigesetzt zu werden. Die HDV-Assemblierung hängt von der spezifischen Wechselwirkung zwischen dem farnesylierten N-Terminus von L-HDAg und der S-Region von HBsAg ab (Hwang and Lai, 1993). HDV-RNP kann mit der kleinen Form von HBsAg (S-HBsAg) zusammengesetzt werden (Sureau et al., 1993).

HDV-RNPs werden in das Zytoplasma transportiert, dieser Prozess wird wahrscheinlich durch Nuclear RNA export factor 1 (NXF1) und den zellulären Exportfaktor TAP/Aly vermittelt

(Huang et al., 2016). Die RNAs werden hauptsächlich im ER von HBV-Proteinen umhüllt (Jenna and Sureau, 1999, Blanchet and Sureau, 2006, Komla-Soukha and Sureau, 2006). Es wird angenommen, dass die HDV-Virionen die Hepatozyten mit Hilfe des Golgi-Apparates zusammen mit den HBV-SVPs verlassen (Bonino et al., 1986, Mentha et al., 2019).

Neben der Verbreitung von umhülltem HDV über NTCP-Rezeptoren ist auch ein direkter Transfer von replikationskompetenter HDV-RNA zwischen Zellen während der Mitose möglich. Dieser Prozess kann in Abwesenheit von HBsAg stattfinden. (Zhang et al., 2018, Giersch et al., 2019).

1.7. HDV-Infektionsverlauf

Für die HDV-Infektion sind zwei klassische Formen beschrieben: die gleichzeitige Infektion mit HBV und HDV (Koinfektion) und die HDV-Superinfektion einer chronisch HBV-infizierten Person. Die Koinfektion kann zu einer fulminanten Hepatitis oder zu einer persistierenden Infektion führen, die bei 95 % der Patienten ausheilt (Rizzetto, 2000). Das Hauptmerkmal der akuten Phase beider Formen der HDV-Infektion ist das vorübergehende Auftreten von HDAg innerhalb der ersten zwei Wochen der Erkrankung (Buti et al., 1986). Das HDAg verschwindet rasch durch die Immunantwort. Bei immungeschwächten Personen, z.B. bei HIV-Infektion, ist HDAg länger nachweisbar (Grippon et al., 1987). Eine spontane Clearance bei einer Superinfektion ist selten und führt bei 90% der Personen zu einer viralen Persistenz (Caredda et al., 1985, Yurdaydin et al., 2010). Bei einer HDV-Superinfektion wird sehr häufig eine Suppression der HBV-Replikation beobachtet (Farci et al., 1988), es ist davon auszugehen, dass eine Leberschädigung durch HDV verursacht wird.

Eine chronische HDV-Infektion führt im Vergleich zur HBV-Monoinfektion in der Regel zu einer beschleunigten Progression der Zirrhose, 50 % der Patienten entwickeln innerhalb von fünfzehn Jahren eine Zirrhose (Farci and Niro, 2012), das Risiko einer Leberdekompensation und eines HCC ist erhöht (Fattovich et al., 2000, Wranke et al., 2017).

Es gibt noch eine dritte, seltene Variante der HDV-Infektion, bei der HDV zwar Hepatozyten infizieren kann, aber ohne Anwesenheit von HBsAg die Zellen nicht verlassen kann. Diese Variante wurde zuerst im Rahmen der Transplantationsmedizin beschrieben (Ottobrelli et al., 1991, Smedile et al., 1998) und kurz darauf auch experimentell in humanisierten Mäusen

nachgewiesen (Giersch et al., 2014). Dies beweist, dass HBV nicht für die Replikation von HDV benötigt wird, sondern für die Verpackung und Freisetzung des Virus (Kuo et al., 1989). In Abbildung 5 sind zwei klassische Formen der HDV-Infektion mit dem zeitlichen Verlauf der serologischen und Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction [PCR])-Marker zusammengefasst.

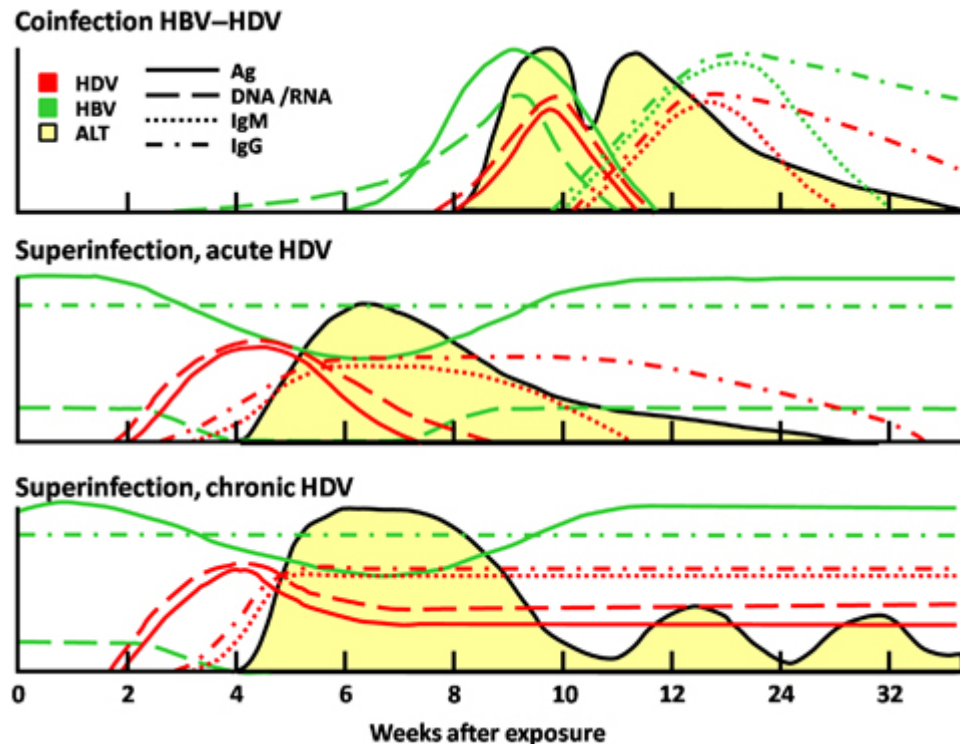


Abbildung 5: Klinische Verlaufsformen der HDV-Infektion. Expressionsniveau von Antigenen, DNA oder RNA, Immunoglobulin M (IgM) und Immunoglobulin G (IgG) für HDV und HBV

(Pascarella and Negro, 2011)

1.8. HDV-Therapie

Da HDV als Satellitenvirus von HBV dessen Hüllproteine für den Zusammenbau neuer Virionen und deren Übertragung benötigt, schützt die prophylaktische HBV-Impfung auch vor einer HDV-Infektion, da die überwiegend verwendeten Impfstoffe das rekombinant hergestellte HBsAg enthalten (Shouval et al., 1994). Eine spezifische Impfung gegen HDV gibt es bisher nicht.

1.8.1. IFN

In den letzten 20-30 Jahren und bis 2020 war die einzige Behandlungsoption für die HBV/HDV-Koinfektion die Off-Label-Anwendung (weder von der FDA noch von der EMA zugelassen) von Standard- und pegyliertem Interferon α (pegIFN α). PegIFN α wird über 48 Wochen wöchentlich subkutan injiziert und unterdrückt die HDV-Replikation bei ca. 20-30% der Patienten 24 Wochen nach Therapieende. Bei kontinuierlicher Gabe über mehr als 48 Wochen kann IFN dem Fortschreiten der Erkrankung entgegenwirken und führt bei ca. 10% dieser Patienten während der Langzeitbeobachtung zum Verlust des HbsAg (Heller et al., 2014).

Bei ca. 80% der Patienten ist eine Verlängerung der IFN-Therapie auf 96 Wochen vertretbar, dieses Therapieschema führt zu einer längeren Unterdrückung der HDV-Replikation, es zeigt sich eine Verbesserung der Leberfibrose (Wedemeyer et al., 2019). IFN wird im klinischen Alltag aufgrund von Kontraindikationen (z. B. bei älteren Menschen, Patienten mit Autoimmunerkrankungen oder fortgeschrittener bzw. dekompensierter Lebererkrankung) und erheblichen Nebenwirkungen nur eingeschränkt eingesetzt. Zudem wurden viele Patienten in der Vergangenheit bereits erfolglos mit Standard- oder pegIFN α behandelt. Roche hat die Produktion von pegIFN- α offiziell eingestellt, es wird nur noch bis Ende 2022 verfügbar sein.

1.8.2. Aktivierung der angeborenen Immunität – PEG-IFN λ

IFN λ ist ein Typ III IFN, dessen Rezeptoren hauptsächlich auf Epithelzellen u.a. in Leber und Lunge lokalisiert sind (Lasfar et al., 2011). Typ III IFN λ ist deutlich besser verträglich als IFN α . Dies wurde in großen randomisierten kontrollierten Studien gut dokumentiert, in denen PEG-IFN α mit PEG-IFN λ zur Behandlung von HCV und HBV verglichen wurde (Muir et al., 2010, Muir et al., 2014, Chan et al., 2016), wobei eine bessere Verträglichkeit von PEG-IFN λ bei ähnlicher antiviraler Wirksamkeit wie bei IFN α gezeigt wurde. PEG-IFN λ könnte in zukünftigen Kombinationsstudien ein überlegener Ersatz für PEG-IFN α sein (Elazar and Glenn, 2022). Darüber hinaus ist PEG-IFN λ der einzige neuartige Anti-HDV-Wirkstoff, der die HBsAg-unabhängige Zell-zu-Zell-Ausbreitung von HDV verhindert (Zhang et al., 2019). PEG-IFN λ befindet sich derzeit in der Phase-3-Studie LIMT-2 (clinicaltrials.gov # NCT05070364).

1.8.3. Neue antiviral wirksame Therapien

Die neuen Therapien, die sich derzeit in verschiedenen Stadien der klinischen Prüfung befinden, wirken auf HDV in verschiedenen Stadien des Lebenszyklus: Eintritt, Zusammenbau und Freisetzung sowie Immunaktivierung. Abbildung 6 zeigt die Angriffspunkte der neuen Medikamente.

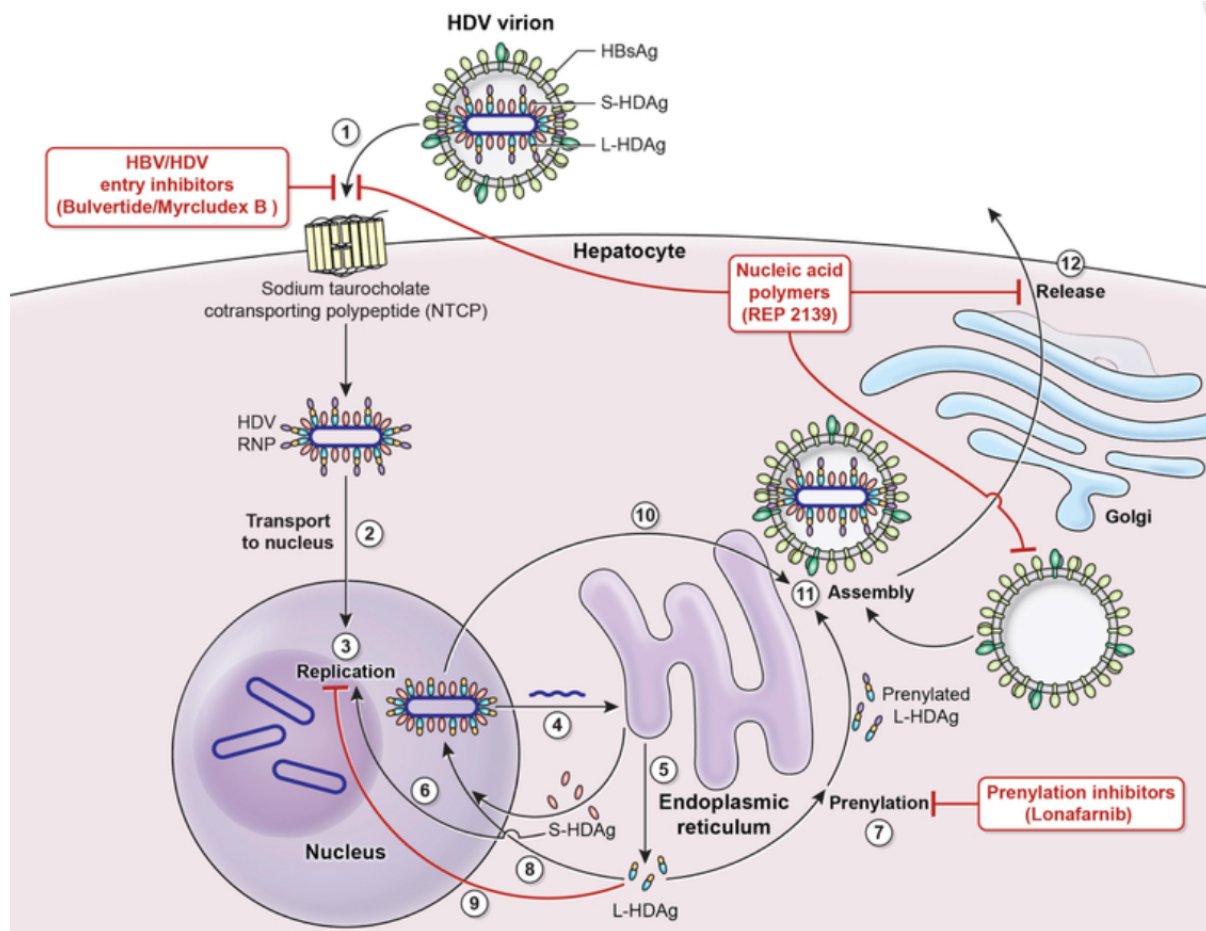


Abbildung 6: Lebenszyklus von HDV und Angriffspunkte für neue antivirale Therapien

1. Das HDV heftet sich an den Hepatozyten durch Interaktion zwischen HBsAg und dem NTCP.
2. Das HDV-RNP wird durch das HDAg in den Zellkern verlagert.
3. Die Replikation des HDV-Genoms erfolgt über einen "Rolling-Circle"-Mechanismus.
4. Das HDV-AG wird aus dem Zellkern in das ER transportiert.
5. Das HDV-AG wird im ER in S-HDAg und L-HDAg übersetzt.
6. S-HDAg wird in den Zellkern transportiert.
7. S-HDAg fördert die HDV-Replikation im Zellkern.

8. L-HDAg wird vor dem Zusammenbau prenyliert.
9. L-HDAg hemmt die HDV-Replikation im Zellkern.
10. Neue HDAg-Moleküle werden mit neuen Transkripten der genomischen RNA assoziiert, um neue RNPs zu bilden, die ins Zytoplasma exportiert werden.
11. Neue HDV-RNP assoziieren mit HBsAg und werden zu HDV-Virionen zusammengesetzt.
12. Fertige HDV-Virionen werden über das trans-Golgi-Netzwerk aus dem Hepatozyten freigesetzt.

Neue Arzneimittel und ihre Angriffspunkte:

HBV/HDV-Inhibitoren (Bulvertide) - greifen durch kompetitive Bindung das NTCP an.

Nukleinsäure-Polymere (REP 2139-Ca) - hemmen das HBsAg und den subviralen Aufbau sowie den HDV-Eintritt.

Prenylierungsinhibitoren (Lonafarnib) - hemmt den Prozess der Prenylierung des L-HDAg, der der Assemblierung vorausgeht.

(Koh et al., 2019)

1.8.3.1. Hemmung des Viruseintritts – Myrcludex B

Am 31.07.2020 hat die Europäische Arzneimittelagentur (EMA) Bulevirtid, ein Präparat zur Behandlung von HDV/HBV-koinfizierten Erwachsenen mit kompensierter Lebererkrankung, unter Auflagen zugelassen (Urban et al., 2021). Bulevirtid ist ein myristoyliertes Peptidmimetikum, das sich von 48 Aminosäuren des N-Terminus des HBV-L-Proteins ableitet und sowohl die Bindung von HBV als auch von HDV an hNTCP und deren Eintritt in die Hepatozyten *in vitro* (Gripon et al., 2005) und *in vivo* (Lütgehetmann et al., 2012) kompetitiv hemmt. Die bedingte Zulassung erfolgte im Anschluss an die Ausweisung als Arzneimittel für seltene Leiden (Orphan Drug). Der Orphan Drug Status und der Breakthrough Therapy Status wurden auch von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) erteilt. (Nkongolo et al., 2022)

1.8.3.2. Hemmung der HBsAg-Sekretion – Nukleinsäurepolymere

Nukleinsäurepolymere (NAPs) sind einzelsträngige Phosphorothioat-Nukleinsäurepolymere, die nachweislich antivirale Aktivität gegen mehrere Viren verschiedener Ordnungen besitzen (Kocisko et al., 2006, Vaillant et al., 2006, Guzman et al., 2007, Bernstein et al., 2008, Lee et al., 2008, Vaillant, 2016). In der Studie von *Bazinet et al.* konnte gezeigt werden, dass die Kombinationstherapie mit REP 2139 und pegyliertem Interferon alfa-2a zu einer funktionellen

Kontrolle der HBV- und HDV-Koinfektion und zu einer Normalisierung der Serum-Aminotransferasen bei einem hohen Anteil der Patienten ein Jahr nach Therapie führte. Dieser kombinierte Therapieansatz könnte eine neue Behandlungsoption für Patienten mit HBV- und HDV-Koinfektion darstellen (Bazinet et al., 2017, Bazinet et al., 2021).

1.8.3.3. Inhibition der Assemblierung – Lonafarnib, ein Farnesyltransferase-Inhibitor

Lonafarnib ist ein Farnesyltransferase-Inhibitor (FTI), der den Aufbau neuer Virionen verhindert und dadurch die HDV-RNA-Spiegel im Serum von chronisch mit HDV infizierten Patienten signifikant senkt (Koh et al., 2015). Es ist der einzige oral zu verabreichende Wirkstoff in der klinischen Entwicklung für HDV und Teil der ersten und einzigen Kombination zweier neuartiger Anti-HDV-Wirkstoffe, die Peginterferon lambda (PEG-IFN λ) enthält.

1.9. Immunantwort nach HDV-Infektion

1.9.1. Angeborene Immunität

HBV induziert sowohl bei akuter als auch bei chronischer Infektion nur eine sehr geringe Antwort des angeborenen Immunsystems und wird als „Stealth“-Virus bezeichnet (Wieland et al., 2004, Mutz et al., 2018, Suslov et al., 2018); im Gegensatz dazu induziert HDV eine IFN-Antwort. HDV interagiert mit dem Melanom-Differenzierungsantigen 5 (MDA-5), was zur Produktion von Interferon-stimulierten Genen (ISGs) führt (Williams et al., 2009, Giersch et al., 2015, Giersch et al., 2017, Suárez-Amarán et al., 2017, Zhang et al., 2018). Es konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit HDV in vitro und in vivo zu einer Hochregulation von Typ I (IFN- β) und Typ III (IFN- λ) IFN führt, jedoch nicht von IFN- α und im Vergleich zu anderen RNA-Viren eher schwach ausgeprägt ist (Suárez-Amarán et al., 2017, Zhang et al., 2018). Die HDV-Replikation scheint gegenüber dem antiviralen Angriff resistent zu sein (Zhang et al., 2018).

1.9.2. Adaptive Immunantwort

1.9.2.1. Humorale Immunität

Anti-HDV-Antikörper werden gebildet (Rizzetto et al., 1979), sind aber wahrscheinlich nicht in der Lage, HDV zu neutralisieren (Fiedler and Roggendorf, 2006, Grabowski and Wedemeyer, 2010, Urban et al., 2021). Die Antikörperantwort gegen HDAg scheint ein ähnliches Muster aufzuweisen wie die Antikörperantwort gegen das HBcAg (Aragona et al., 1987). Bei einer HDV-Infektion (unabhängig von einer Simultan- oder Superinfektion) sind im ersten Monat nach der Infektion Antikörper gegen S- und L-HDAg im Plasma nachweisbar (Rizzetto et al., 1979, Ponzetto et al., 1987). Interessanterweise findet kein vollständiger Klassenwechsel von IgM- zu IgG-Antikörpern statt, sondern die Plasmazellen produzieren eine Mischung aus IgM- und IgG-Antikörpern gegen HDV (Aragona et al., 1987). Beide Antikörpertypen sind sowohl bei akuter als auch bei chronischer HDV-Infektion nachweisbar und nehmen nach der viralen Clearance allmählich ab (Rizzetto et al., 1979, Aragona et al., 1987). Anti-HDV-Antikörper dienen daher eher als diagnostisches Hilfsmittel für einen früheren oder aktuellen Kontakt des Patienten mit dem Virus als als Marker für den Krankheitsverlauf (Smedile et al., 1982).

In der Vergangenheit, bevor routinemäßige pangenomische HDV-PCR-Analysen zur Verfügung standen, wurden Anti-IgM-Spiegel als Marker für die Krankheitsaktivität verwendet, da eine Assoziation zwischen IgM-Spiegeln und dem Grad der histologischen Entzündung beobachtet wurde (Govindarajan et al., 1989, Le Gal et al., 2005, Wranke et al., 2014). Obwohl Beweise für direkte antivirale Funktionen von Antikörpern fehlen, zeigte eine Studie aus dem Jahr 1990, dass 41 % der Aminosäuren von L-HDAg Teil eines immunogenen Epitops waren, wenn sie mit Serum von Patienten mit chronischer HDV-Infektion analysiert wurden (Wang et al., 1990).

1.9.2.2. T-Zell-Antwort

1.9.2.2.1. CD4+-T-Zellantwort

HDV-spezifische CD4+-T-Zell-Epitope

Bisher wurden 18 verschiedene HDAg-spezifische CD4+ T-Zell-Epitope beschrieben (Nisini et al., 1997, Landahl et al., 2019): *Landahl et al.* identifizierten 14 Epitope mittels in vitro -

Enzyme-Linked-Immunespot-Assay (ELISpot) unter Verwendung überlappender 20mer-Peptide, die das gesamte L-HDAg umfassen, gefolgt von intrazellulärer Cytokin-Färbung (ICS) für IFN- γ bei Patienten mit positiven ELISpots-Ergebnissen (Landahl et al., 2019).

CD4⁺ T-Zell-Epitope sind über das gesamte HD-Protein verteilt, wobei die Hotspots in Richtung des N-Terminus lokalisiert sind (Landahl et al., 2019). *Nisini et al.* identifizierten vier Epitope durch Pool-Stimulation (Nisini et al., 1997). In Abbildung 7 sind alle bekannten CD4⁺ T-Zell-Epitope schematisch dargestellt.

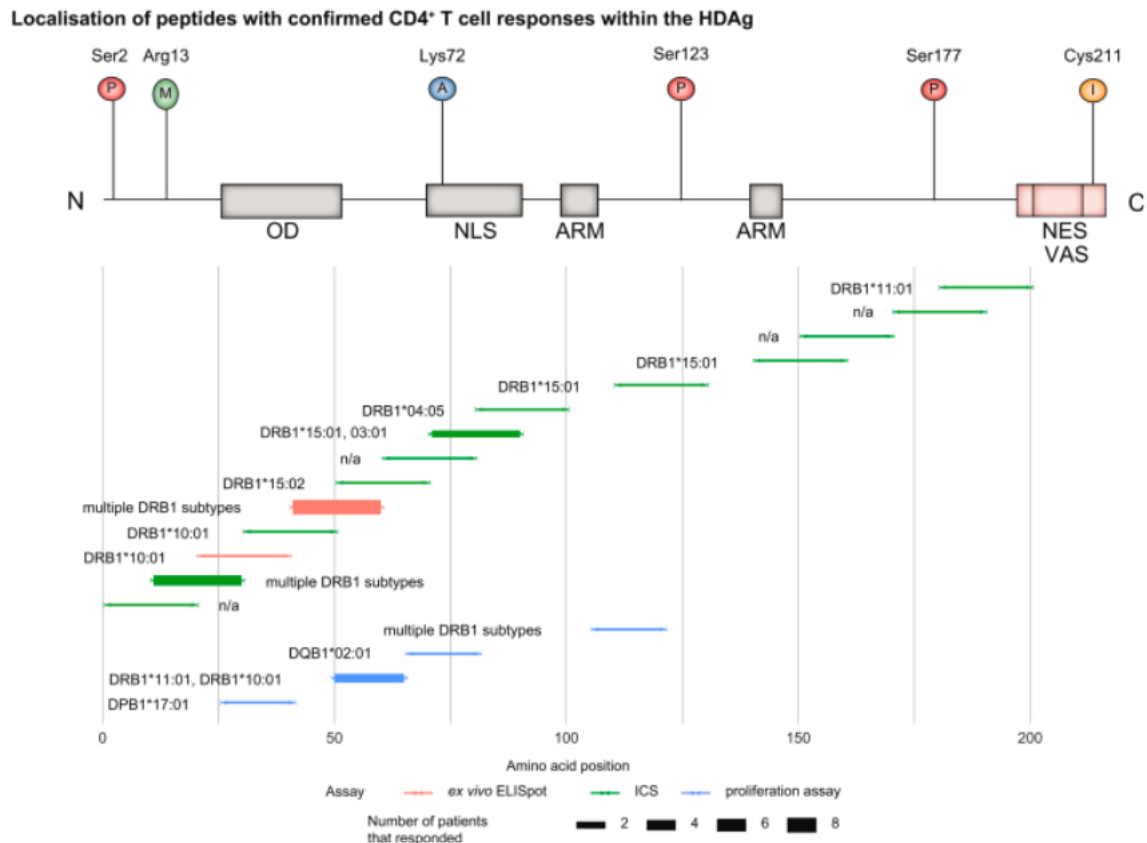


Abbildung 7: Schematische Übersicht der CD4⁺ T-Zell-Epitope und ihrer Lokalisation im HDAg

Die Dicke der Balken im unteren Diagramm gibt die Anzahl der antwortenden Patienten an, die Farbe steht für die Art des durchgeführten Assays.

Das obere Piktogramm zeigt PTM-Stellen und funktionelle Domänen von HDAg, basierend auf (Alfaiate et al., 2015).

ICS – intrazelluläre Cytokin-Färbung; L-HDAg – großes Hepatitis-Delta-Antigen; PTM-Modifikation nach der Translation.

(Kohsar et al., 2021)

1.9.2.2.2. CD8+ T-Zellantwort

HDV-spezifische CD8+ T-Zell-Epitope

Bislang wurden 18 HDV-spezifische CD8+ T-Zell-Epitope in fünf verschiedenen Studien identifiziert, teilweise mit Überlappungen zwischen den untersuchten Peptiden (Huang et al., 2004, Karimzadeh et al., 2018, Karimzadeh et al., 2019, Kefalakes et al., 2019, Landahl et al., 2019).

Huang et al. beschrieben zwei CD8+ T-Zell-Epitope, die durch HLA-A*02:01 restringiert sind (Huang et al., 2004). Diese Epitope waren jedoch bei vier europäischen HLA-A*02-positiven Patienten mittels ICS nicht nachweisbar (Karimzadeh et al., 2018). Möglicherweise sind unterschiedliche HLA-A*02-Subtypen in Asien und Europa die Ursache für diese Diskrepanz (Kohsar et al., 2021).

Karimzadeh et al. identifizierten zwei HLA-B*27-restringierte CD8+ T-Zell-Epitope: aa99-108 und aa103/104-112. 2019 identifizierten *Karimzadeh et al.* fünf zusätzliche HDV-spezifische CD8+ T-Zell-Epitope.

Im Jahr 2019 beschrieben *Kefalakes et al.* sechs weitere HDV-spezifische CD8+ T-Zell-Epitope, darunter das bereits erwähnte HLA-B*27-Epitop aa104-112 (Karimzadeh et al., 2018) (mit einem Arginin am C-Terminus), das HLA-B*18-Epitop aa46-54 (Karimzadeh et al., 2019) (zusätzlich restringiert durch HLA-B*44:02 und B*44:03) und vier weitere neue Epitope bei chronischer HDV-Infektion (Kefalakes et al., 2019).

Alle 18 derzeit bekannten CD8+ HDV-Epitope sind in Abbildung 8 zusammengefasst.

Localisation of peptides with confirmed CD8+ T cell responses within the HDAg

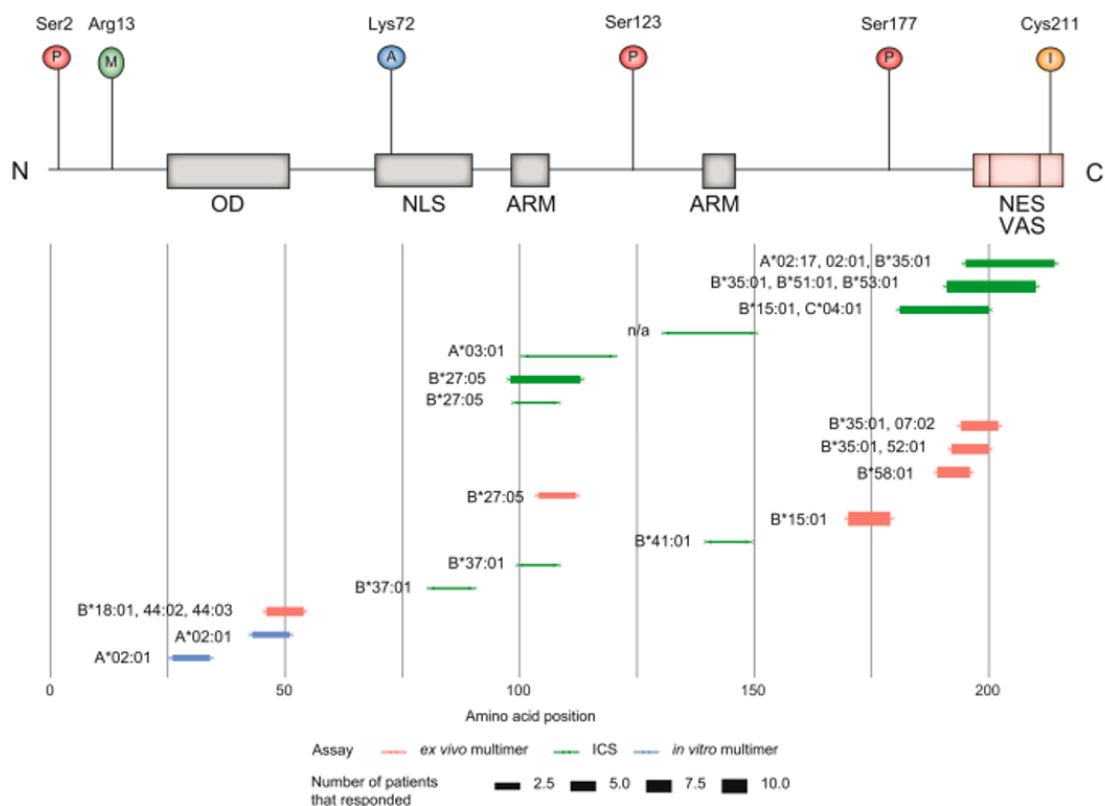


Abbildung 8: Schematische Übersicht der CD8+ T-Zell-Epitope und ihrer Lokalisation im HDAg

Die Dicke der Balken im unteren Diagramm gibt die Anzahl der antwortenden Patienten an, die Farbe steht für die Art des durchgeführten Assays.

Das obere Piktogramm zeigt die PTM-Stellen und funktionellen Domänen von HDAg, basierend auf (Alfaiate et al., 2015).

ICS – intrazelluläre Cytokin-Färbung; L-HDAg – großes Hepatitis-Delta-Antigen; PTM-Modifikation nach der Translation.

(Kohsar et al., 2021)

Im Gegensatz zu den CD4+-Epitopen, die über das gesamte HDAg verteilt sind (mit Hotspots am N-Terminus) und durch mehrere HLA-Typen präsentiert werden können, scheinen die bekannten HDV-spezifischen CD8+-T-Zell-Epitope an wenigen verschiedenen Stellen (hauptsächlich am C-Terminus) und hauptsächlich durch HLA-B-Subtypen, einschließlich relativ seltener Subtypen, restringiert zu sein. (Kohsar et al., 2021)

Es wird vermutet, dass spezifische T-Zell-Antworten für die HDV-Clearance notwendig sind, diese sind auch Treiber histopathologischer Leberschäden (Grabowski and Wedemeyer,

2010), ähnlich wie bei chronischen HBV- und HCV-Infektionen (Rehermann and Thimme, 2019).

1.9.2.3. Ausfall der T-Zell-Antwort bei chronischer Infektion

Einige virale Infektionskrankheiten werden vom Immunsystem nicht erfolgreich bekämpft und nehmen einen chronischen Verlauf. Bei Virusinfektionen wie HIV und HCV sind zwei Hauptmechanismen bekannt: mutational virus escape und CD8⁺ T-Zell-Erschöpfung, und es gibt Hinweise, dass diese Mechanismen auch für HDV gelten. Die Mechanismen des HDV-spezifischen CD8⁺ T-Zellversagens bei chronischer HBV/HDV-Koinfektion wurden kürzlich untersucht (Schirdewahn et al., 2017, Karimzadeh et al., 2018, Karimzadeh et al., 2019, Kefalakes et al., 2019).

In dieser Arbeit geht es hauptsächlich um den virus escape, daher wird das Thema der T-Zell-Erschöpfung nicht behandelt.

1.9.2.3.1. Virus escape

Die Virusevasion ist ein wichtiger Mechanismus des virusspezifischen T-Zell-Versagens bei persistierenden Virusinfektionen. Virus-Evasion wurde erstmals im Mausmodell des lymphozytären Choriomeningitis-Virus beschrieben (Pircher et al., 1990) und später bei HIV- und HCV-Infektionen des Menschen eingehend untersucht (Timm and Walker, 2015).

Innerhalb eines virusspezifischen CD8⁺-T-Zell-Epitops können virale Escape-Mutationen an drei verschiedenen Stellen lokalisiert sein (s. Abbildung 9) (Seto et al., 2018):

CD8⁺ T-Zellen erkennen virale Peptidepitope, die in der Regel acht bis zehn Aminosäuren lang sind und auf HLA-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden (Abb. 9a). Der Aminosäurerest 2 und der C-terminale Aminosäurerest dienen den meisten HLA-Klasse-I-Allelen als sogenannte HLA-Klasse-I-Bindungsanker. Mutationen an diesen Positionen führen häufig zum Verlust der HLA-Klasse-I-Bindung und -Präsentation (Abb. 9b) (Söderholm et al., 2006).

Eine wichtige Rolle für die spezifische Bindung an den T-Zell-Rezeptor (TCR) spielt der zentrale Teil des viralen Epitopeptids (z.B. Aminosäurereste drei-acht). Sind diese TCR-Kontaktreste aufgrund einer Mutation verändert, ist die Erkennung durch epitopspezifische CD8⁺ T-Zellen gestört. TCRs sind jedoch relativ flexibel in der Kreuzerkennung sehr ähnlicher

Peptide, und in einigen Fällen ist eine Anhäufung von mehr als einer Mutation erforderlich, um eine vollständige Flucht des Virus zu erreichen (Abb. 9c) (Dazert et al., 2009).

Tritt eine virale Escape-Mutation außerhalb des Epitops auf, meist in den flankierenden Regionen, wird eine korrekte Antigenprozessierung der Epitope durch das Proteasom verhindert (Abb. 9d) (Seifert et al., 2004, Kimura et al., 2005, Walker et al., 2016).

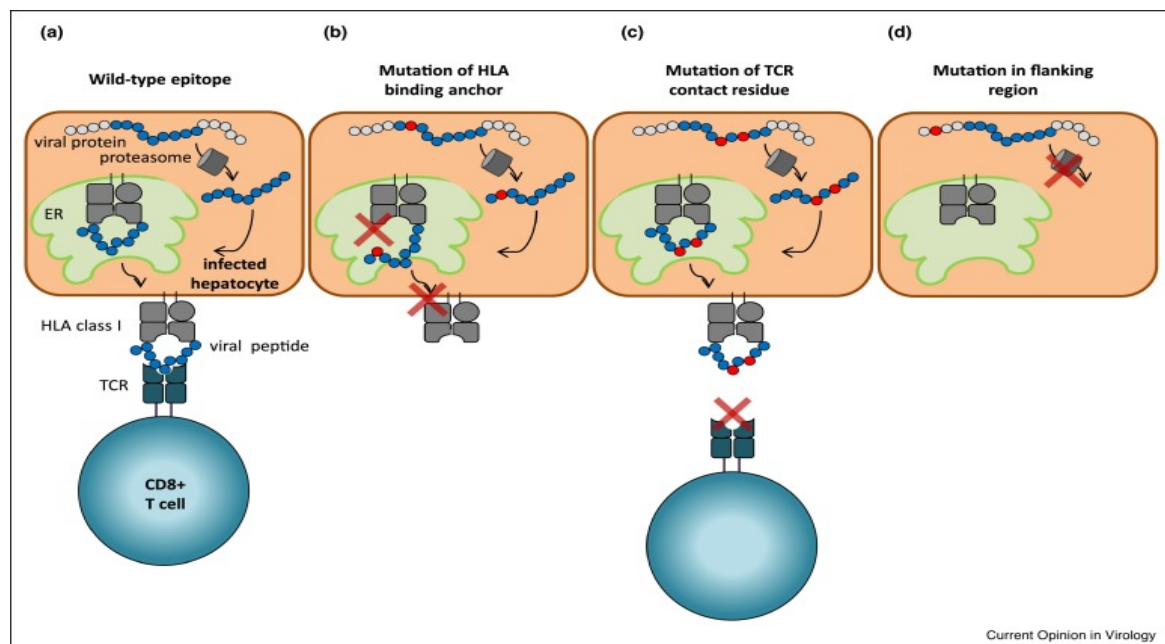


Abbildung 9: Mechanismen der mutationsbedingten virus escape aus virusspezifischen CD8+ T-Zellen

(a) Antigenprozessierung und Präsentation eines Wildtyp-Epitops (vereinfacht). ER: Endoplasmatisches Retikulum; HLA: Humanes Leukozyten-Antigen; TCR: T-Zell-Rezeptor.

(b) Virales Entkommen durch Mutation des HLA-Klasse-I-Bindungsankers (normalerweise aa-Position 2 und C-terminaler aa-Rest).

(c) Virales Entkommen durch Mutation der TCR-Kontaktreste (in der Regel aa-Position 1 und 3-8). Die Mutation mehrerer aa-Reste kann für ein vollständiges Entkommen des Virus erforderlich sein, da das variante Peptid kreuzweise erkannt wird.

(d) Virale Flucht durch Mutationen in der flankierenden Region des Epitops, die die Antigenverarbeitung durch das Proteasom stören.

(Salimi Alizei et al., 2021)

Virus escape bei HDV wurde von *Karimzadeh et al.* untersucht. Erste experimentelle Hinweise auf Virus-Evasion wurden von *Karimzadeh et al.* für die beiden HLA-B*27-restringierten CD8+-T-Zell-Epitope (HDAg aa99-108 und HDAg aa103/104-112) erhalten. Untersucht wurde eine Kohorte von 104 Patienten mit chronischer HBV/HDV-Infektion, von denen acht HLA-B*27

positiv und 96 HLA-B*27 negativ waren. Die durchgeführte Virussequenzanalyse zeigte eine Häufung von aa-Mutationen in der Epitopregion bei HLA-B*27 positiven Patienten. Mutanten mit aa-Substitutionen an den Positionen 105 und 106 wurden von T-Zellen nicht erkannt und entgingen somit der Immunantwort.

Das Epitopenrepertoire wurde durch relativ seltene HLA-Klasse-I-Allele eingeschränkt, was bedeuten könnte, dass sich HDV auf Populationsebene an den HLA-Klasse-I-Hintergrund seines Wirts angepasst hat, was zum Verschwinden häufiger HDV-spezifischer CD8+-T-Zell-Epitope geführt hat. Somit sind virale Escape-Mutationen ein Treiber der viralen Evolution auf Populationsebene (Karimzadeh et al., 2019).

1.10. HLA-System

Die Hauptaufgabe des Haupthistokompatibilitätskomplexes („major histocompatibility complex“ [MHC]) ist die Präsentation von Fremdantigenen aller Art an T-Zellen. T-Lymphozyten sind nicht in der Lage, fremde Antigene als isolierte komplette Einzelstrukturen zu erkennen, sondern die Antigene müssen als Peptide aufbereitet und in Verbindung mit körpereigenen MHC-Strukturen präsentiert werden.

Der MHC besteht aus mehreren Genen, die in einem Genkomplex zusammengefasst sind. Die MHC-Gene sind sehr polymorph, die aktuelle HLA-Datenbank enthält über 12.000 HLA-Allele. Der MHC liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6. Die Klasse-I-Antigene werden von den Genen A, B und C kodiert. Die Klasse-II-Antigene werden von der D-Region kodiert und wurden ursprünglich als „HLA-D-related“ bezeichnet, woraus sich später die Bezeichnung HLA-DR entwickelte. In der Klasse-II-Region unterscheiden sich die Subregionen DP, DQ und DR genetisch. Auf dem MHC gibt es noch die S-Region, in der die Klasse-III-Gene zusammengefasst sind, die strukturell sehr heterogen sind und unter anderem für bestimmte Komplementkomponenten kodieren.

Die Klasse-I-Gene kodieren Proteine, die als Klasse-I-Moleküle bezeichnet werden. Sie werden auch als klassische Transplantationsantigene bezeichnet, da sie bei der Erforschung der Transplantatabstoßung entdeckt wurden. Die Klasse-II-Gene kodieren entsprechend für Klasse-II-Moleküle, sie werden auch "Immunantwort-assoziierte (Ia) Antigene" genannt.

Abbildung 10 zeigt schematisch den MHC-Komplex.

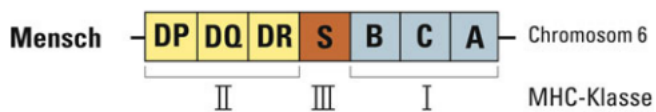


Abbildung 10: MHC-Komplex

(S. Suerbaum et al. (Hrsg.), Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, DOI 10.1007/978-3-662-48678-8, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016)

Fast alle Körperzellen können Klasse-I-Moleküle exprimieren. Im Gegensatz dazu werden Klasse-II-Moleküle nur von Körperzellen exprimiert, die an der Induktion einer zellulären Immunantwort beteiligt sind, wie z. B.: Zellen des mononukleären Phagozytensystems und dendritische Zellen, B-Zellen, aktivierte T-Zellen und Endothelzellen. Sowohl Klasse-I- als auch Klasse-II-Moleküle bestehen aus einer extrazellulären Region, einer Transmembranregion (die zur Verankerung in der Zellmembran dient) und einer zytoplasmatischen Region.

Klasse-I-Moleküle sind ein Transportsystem zwischen dem Zytoplasma und der Zelloberfläche. Die Klasse-I-Moleküle präsentieren den CD8-T-Zellen endogene Antigene, darunter körpereigene, virale und Tumorantigene, die von der Zelle selbst produziert werden. Proteasen (ein Komplex von Proteasen wird als Proteasom bezeichnet) spalten Proteine im Zytoplasma in Peptidfragmente, diese Fragmente werden von spezialisierten Transportmolekülen (=TAP: Transporter associated with antigen processing) in das endoplasmatische Retikulum transportiert. Im ER treffen Peptid und Klasse-I-Molekül aufeinander. Durch Peptidbeladung wird das Klasse-I-Molekül umstrukturiert und an die Zelloberfläche transportiert, so dass die Präsentation des endogenen Peptids durch das MHC-Klasse-I-Molekül an die CD8-T-Lymphozyten erfolgt.

Das MHC-Klasse-II-Molekül dient als Transportsystem zwischen Endosom und Zelloberfläche für exogene Antigene: Bakterien, Pilze und Protozoen sowie verschiedene lösliche Proteine, die durch Endozytose in die Zelle gelangen. Exogene Proteine werden in den Endosomen durch lysosomale Proteasen abgebaut, die Peptide werden an Klasse-II-Moleküle gebunden und zur Zelloberfläche transportiert, wo sie den CD4-T-Zellen angeboten werden.

CD8-T-Zellen können auch bestimmte bakterielle Proteine erkennen, wenn Bakterien aus dem Endosom ins Zytoplasma gelangen können. Ebenso können körpereigene, virale oder Tumorantigene in exogene Antigene umgewandelt werden und die CD4-T-Zelle stimulieren.

1.10.1. HLA-B*27-Allel

Bereits 1973 wurde über eine Assoziation zwischen dem HLA-B*27-Allel (damals HL-A27) und M. Reiter (Brewerton et al., 1973a) bzw. Morbus Bechterew (Brewerton et al., 1973b) berichtet. Folgende Erkrankungen sind bisher mit HLA-B*27 assoziiert: Spondylitis ankylosans (Morbus Bechterew) (90% der Erkrankten sind HLA-B*27-Träger), reaktive Arthritis (früher auch Morbus Reiter) (70-80%), Psoriasis-Arthritis (60-70%), juvenile idiopathische Arthritis mit Entesitis (75%) (Saxena et al., 2006), rheumatoide Arthritis (ca. 10 %), akute anteriore Uveitis, Iritis oder Iridozyklitis (ca. 50 %), Morbus Whipple (28 %) (Dobbins, 1987). Diese Erkrankungen gehören zur Gruppe der Autoimmunerkrankungen, wobei die beteiligten pathogenetischen Mechanismen unbekannt sind (Martin and Rosenbaum, 2011). Für diese Krankheitsassoziationen gibt es mehrere Hypothesen:

- Molekulare Mimikry zwischen fremden und körpereigenen Peptiden könnte eine zytotoxische T-Zell-Antwort auslösen, die zur autoimmunen Zerstörung körpereigenen Gewebes führt (Benjamin and Parham, 1990),
- eine ungewöhnliche Neigung von HLA-B*27 zur Fehlfaltung: HLA-B*27 kann während der Assemblierung falsch gefaltet werden, was zu Stress im ER und zu Autophagiereaktionen führen kann (Mear et al., 1999),
- Beteiligung nicht-kanonischer Formen von HLA-B*27, wie z. B. Schwereketten-Homodimere: β 2-Mikroglobulin-freie Schwereketten-Strukturen von HLA-B*27 einschließlich Homodimeren (B27 (2)) können nach endosomalem Recycling von Zelloberflächen-Heterotrimeren auch an der Zelloberfläche exprimiert werden. Freie schwere Ketten der Zelloberfläche und HLA-B*27 binden an angeborene Immunrezeptoren auf T-, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und myeloiden Zellen mit proinflammatorischen Effekten. (Allen et al., 2001, Kollnberger et al., 2002)

Mehrere Studien haben eine Assoziation zwischen dem HLA-B*27-Allel und einem günstigeren Verlauf einiger viraler Infektionen gezeigt, insbesondere bei HIV, wo HLA-B*27-Träger als Langzeit-Nonprogressoren bekannt sind (Goulder et al., 1997), und HCV, mit einer häufigeren Ausheilung der Infektion als bei HLA-B*27-negativen Personen (McKiernan et al., 2004). Ein viral escape aus diesen HLA-B*27-restringierten CD8+ T-Zell-Epitopen vermittelt ein CD8+ T-Zellversagen bei Patienten mit ungünstigerem Ausgang: HIV-Progression (Goulder et al., 1997) oder persistierende HCV-Infektion (Ziegler et al., 2013).

Die genauen Mechanismen der protektiven Wirkung des HLA-B*27-Allels bei verschiedenen viralen Infektionen sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Bei HIV- und HCV-Infektionen ist die Virus-Evasion von HLA-B*27-restringierten zytotoxischen T-Zellen gegen immundominante Epitope ein schwieriger Prozess. Er erfordert in der Regel mehrere kompensatorische Mutationen, um strukturelle und funktionelle Einschränkungen auszugleichen, die mit hohen Kosten für die virale Fitness verbunden sind (Ziegler et al., 2013, McMichael, 2007, Schneidewind et al., 2008). Eine Reihe von immunologischen Vorteilen virusspezifischer HLA-B*27-restringierter CD8+ T-Zellen wurden beschrieben, die sich auf eine breitere Polyfunktionalität und eine höhere funktionelle Avidität beziehen (Almeida et al., 2007).

Darüber hinaus wurde durch eine spezifische Thymusselektion ein größeres Repertoire an B*27-getriebenen CD8+T-Zell-Vorläufern induziert, eine bevorzugte Nutzung bestimmter T-Zell-Rezeptoren (TCR-Klontypen), die mit einer höheren Kreuzreaktivität assoziiert ist, und schließlich eine verbesserte Fähigkeit zur Flucht vor der durch regulatorische T-Zellen (TReg) vermittelten Suppression dokumentiert (Kosmrlj et al., 2010, Elahi et al., 2011, Liu et al., 2013, Ladell et al., 2013).

Darüber hinaus würde eine schnelle und effiziente Prozessierung der richtigen immundominanten Epitope zu diesen erfolgreichen HLA-B*27-restringierten T-Zell-Antworten beitragen (Schmidt et al., 2012).

Eine weitere mögliche Erklärung könnte z.B. das Versagen von B*27-Liganden sein, KIR3DL1 anzugreifen, was zu einer erhöhten natürlichen Killeraktivierung oder zu einem Kopplungsungleichgewicht mit anderen Immunantwortgenen führt (López de Castro, 2005, Stewart-Jones et al., 2005).

Die „protektive“ Rolle des HLA-B*27-Allels, die bereits in mehreren Studien beschrieben wurde, sollte bei der HDV-Infektion untersucht werden, da derzeit noch keine entsprechenden Berichte vorliegen.

Für das HLA-B*27-Allel wurden bei HDV zwei restringierte Epitope identifiziert (Karimzadeh et al., 2018): L-HDAg99-108 und L-HDAg103-112, mit teilweise überlappenden Peptiden (s. Abbildung 11).

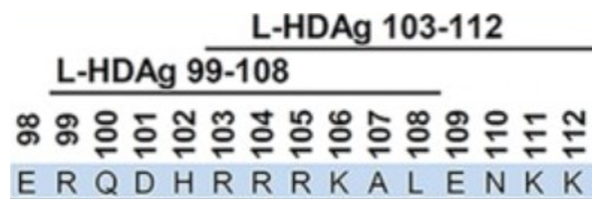


Abbildung 11: HLA-B*27-restringierte Epitope des HDV

Aminosäuresequenzen, die die beiden überlappenden HLA-B*27-restringierten Epitope L-HDAg99-108 (RRDHRRRKAL) und L-HDAg103-112 (RRRKALENKK) umfassen.

R – Arginin, K – Lysin, A – Alanin, L – Leucin, E – Glutaminsäure, N – Asparagin, K – Lysin, D – Asparaginsäure, H - Histidin

(Karimzadeh et al., 2018)

1.11. Zielsetzung der Doktorarbeit

Einige Studien haben bereits den Einfluss des HLA-B*27-Allels auf den Verlauf von HCV- und HIV-Infektionen untersucht. Eine irische Studie an 227 Patientinnen, die durch kontaminiertes Anti-D-Immunglobulin mit HCV des Genotyps 1b infiziert wurden, zeigte, dass HLA-B*27-Trägerinnen die HCV-Infektion häufiger ausheilten als HLA-B*27-negative Personen (McKiernan et al., 2004). Darüber hinaus sind HLA-B*27-Träger als Langzeit-Nonprogressoren bei HIV-Infektionen bekannt (Goulder et al., 1997).

Auf der Grundlage dieser Studien sollte untersucht werden, ob das HLA-B*27-Allel auch mit einer höheren Ausheilungsrate der HDV-Infektion assoziiert ist, wie dies bei anderen viralen Infektionen (HIV und HCV) beschrieben wurde.

Dazu sollten Proben von Patienten mit ausgeheilter HDV-Superinfektion bei weiter persistierender HBV-Infektion aus den Kooperationszentren in der EU, den USA und dem Iran analysiert werden. Als Kontrollgruppe dienten Proben von Patienten mit chronischer HBV/HDV-Superinfektion. Bei allen Patienten mit ausgeheilter oder chronischer HDV-Infektion wurde eine HLA-Klasse-I-Typisierung durchgeführt. Die Frequenz des HLA-B*27-Allels bei Patienten mit ausgeheilter und chronischer HDV-Infektion wurde verglichen.

Falls das HLA-B*27-Allel nicht mit einer erhöhten Rate an ausgeheilten HDV-Infektionen assoziiert ist, sollte untersucht werden, ob Escape-Mutationen in den bekannten HLA-B*27-restringierten Epitopen dafür verantwortlich sind. Dazu sollte die Häufigkeit von Escape-Mutationen in den HLA-B*27 restringierten Epitopen von HDV untersucht werden. Eine Virussequenzierung aus den untersuchten Proben war nicht möglich, da die Proben nicht

mehr verfügbar waren, daher wurde eine Analyse der Mutationsrate in HLA-B*27 und anderen Epitopen (z.B. HLA-B*15), in Isolaten aus den Daten der „Comprehensive Hepatitis D Virus Database“ durchgeführt (Usman et al., 2020).

Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob andere HLA-B*-Allele mit einer höheren Ausheilungsrate der HDV-Infektion korrelieren. Dazu wurde die Häufigkeit anderer HLA-B*-Allele bei Patienten mit ausgeheilter und chronischer HDV-Infektion bestimmt und verglichen. Außerdem sollte untersucht werden, ob bestimmte HLA-B*-Allele nicht mit einer erhöhten Ausheilungsrate, sondern mit einer erhöhten Rate chronischer HDV-Infektionen assoziiert sind.

2. Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Methoden aufgelistet.

2.1. Patienten und Proben

Die Studienpopulation, bestehend aus zwei Kohorten: Patienten mit chronischer HBV/HDV-Infektion und Patienten mit ausgeheilter HDV-Infektion bei persistierender HBV-Infektion, wurde aus folgenden Kooperationszentren rekrutiert (alphabetische Auflistung, s. Tabelle 1): Barcelona, Düsseldorf, Essen, Hamburg, Hannover, Heidelberg, München: LMU, TUM, Leberzentrum; Regensburg, Teheran, Turin, USA.

Die Ethikkommission des HelmholtzZentrum München hat diese Studie gemäß den Richtlinien der Deklaration von Helsinki von 1975 genehmigt.

In den oben genannten Zentren wurden Serumproben von Personen gesammelt, die positiv auf Anti-HDV getestet wurden. Die virale RNA wurde aus diesen Serumproben extrahiert, in einigen Fällen wurden die Ergebnisse der HDV-RNA-Bestimmung von den Zentren zur Verfügung gestellt.

Zur Extraktion der genomischen DNA für die HLA-Typisierung wurde Plasma oder Serum verwendet. Alle Patientenproben und extrahierten Materialien wurden bei -80 °C gelagert.

Alle Proben sind in Tabelle 1 aufgeführt. * Ein Teil der Proben von chronisch HDV-infizierten Patienten wurde bereits in früheren Studien von Karimzadeh verwendet (Karimzadeh et al., 2018, Karimzadeh et al., 2019).

Tabelle 1: Anzahl und Verteilung der Proben aus den Kooperationszentren

Zentrum	Proben von Patienten mit ausgeheilter HDV-Infektion (Anti-HD-Antikörper positiv, HDV-RNA negativ)	Proben von Patienten mit chronischer HDV-Infektion (Anti-HD-Antikörper positiv, HDV-RNA positiv)	Proben gesamt
Barcelona*	19	26	45
Düsseldorf	10	0	10
Essen*	0	33	33
Hamburg	14	16	30
Hannover*	11	17	28
Heidelberg	4	0	4
Regensburg	1	0	1
München LMU	0	43	43
München TUM	9	0	9
München Hepatology Center	1	0	1
Tehran*	0	11	11
Turin*	0	17	17
USA	0	28	28
Gesamt	69	191	260

Insgesamt wurden 260 Proben gesammelt, davon 69 Proben von Patienten mit ausgeheilter HDV-Infektion und 191 Proben von Patienten mit chronischer HDV-Infektion. Dabei wurden von einigen Kooperationszentren nur Proben von ausgeheilten Patienten, von anderen nur Proben von chronisch erkrankten Patienten und von dritten gemischt in unterschiedlicher Gewichtung erhalten.

2.2. Methoden

In einigen Fällen wurden die kompletten Ergebnisse (HBsAg, Anti-HDV, HDV-RNA und HLA-Klasse-I-Typisierung) von den Kooperationszentren bereitgestellt.

Von einigen Kooperationspartnern haben wir Blutproben (Serum und EDTA) bekommen, die wir in unserem Labor (TUM, Virologie) auf HBsAg, Anti-HDV, HDV-RNA untersucht haben, bei passender Konstellation (ausgeheilte HDV-Infektion bei weiter persistierender HBV-Infektion) wurde aus den Proben genomische DNA mittels QIAamp DNA Blood Mini Kit (50) extrahiert und aus den Eluatn eine HLA-Klasse-I-Typisierung durchgeführt (im Labor für Immungenetik und molekulare Diagnostik, LMU München).

Unten sind Geräte, Kits und Reagenzien aufgelistet, die in unserem Labor verwendet wurden.

2.2.1. Serologische Teste

2.2.1.1. Bestimmung vom HBs-Antigen

HBsAg wurde mittels ARCHITECT HBsAg Qualitative II (Abbott) gemessen. Das ist ein Chemilumineszenz-Mikropartikelimmunoassay (CMIA). Der Testhersteller gibt die diagnostische Sensitivität als 100% und Spezifität als 99,93% an.

Tabelle 2: Geräte für die Bestimmung von HBsAg

Gerätename	Hersteller
ARCHITECT I1000SR	Abbott
Centrifuge 5417C	Eppendorf
Centrifuge 5810	Eppendorf
Thermo Scientific™ Safe 2020 biologische Sicherheitswerkbänke der Klasse II	Thermo Fisher Scientific Inc.

Tabelle 3: Kits für die Bestimmung von HBsAg

Name	Hersteller
Architect HBsAg Qual II Kit (REF:2G22-25), im Kit erhalten:	Abbott Laboratories
Mikropartikel: 1 Flasche (6,6ml) anti-HBs beschichtete Mikropartikel in MES-Puffer	Abbott Laboratories
Konjugat: 1 Flasche (5,9ml): Akridinium- markiertes Anti-HBs in Phosphatpuffer mit Humanplasma und Proteinstabilisatoren	Abbott Laboratories
Wash Buffer: 1 Flasche (5,9ml)	Abbott Laboratories
Kontrollen HBsAg Qualitative II Controls (REF: 2G22-10)	Abbott Laboratories
Kalibratoren HBsAg Qualitative II Calibrator (REF: 2G22-01)	Abbott Laboratories

Tabelle 4: Reagenzien für die Bestimmung von HBsAg

Name	Hersteller
ARCHITECT i HBsAg manuelles Verdünnungsmittel (REF: 6C36-40)	Abbott Laboratories
ARCHITECT i concentrated wash buffer (Konzentrat; REF: 6C54-58)	Abbott Laboratories
ARCHITECT i trigger solution (REF: 6C55-60; 6C55-63)	Abbott Laboratories
ARCHITECT i pre-trigger solution (REF: 6E23-65)	Abbott Laboratories

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien für die Bestimmung von HBsAg

Name	Hersteller
ARCHITECT i reaction vessels (4x500 Stück) (REF: 7C15-03)	Abbott Laboratories
ARCHITECT i sample cups (4x250 Stück) (REF: 7C14-01)	Abbott Laboratories
ARCHITECT i septum	Abbott Laboratories

(REF: 4D18-03)	
ARCHITECT i replacement caps	Abbott Laboratories
SafeSeal SurPhob Spitzen 1250 µl, Filterspitzen, Low Binding, graduiert	Biozym

2.2.1.2. Bestimmung der Antikörper gegen HDV (Anti-HDV)

Anti-HDV wurden mittels LIAISON XL MUREX Anti-HDV Assay (DiaSorin S.p.A.) bestimmt. Es ist ein indirekter Chemilumineszenz-Immunoassay (CLIA). Vom Testhersteller wurde die diagnostische Spezifität als 99,35% und Sensitivität als 100% angegeben.

Tabelle 6: Geräte für die Bestimmung der Antikörper gegen HDV

Gerätename	Hersteller
LIAISON® XL	DiaSorin S.p.A
Centrifuge 5417C	Eppendorf
Centrifuge 5810	Eppendorf
Thermo Scientific™ Safe 2020 biologische Sicherheitswerkbänke der Klasse II	Thermo Fisher Scientific Inc.

Tabelle 7: Kits für die Bestimmung der Antikörper gegen HDV

Name	Hersteller:
LIAISON® XL Murex Anti-HDV (Best.-Nr. 311.260)	DiaSorin S.p.A
LIAISON® XL Murex Control Anti-HDV (Best.-Nr. 311.261)	DiaSorin S.p.A
LIAISON® XL Starter Kit (Best.-Nr. 319.200)	DiaSorin S.p.A
LIAISON® XL Cleaning Tool (Best.-Nr. 310.995)	DiaSorin S.p.A

Tabelle 8: Chemikalien/Reagenzien für die Bestimmung der Antikörper gegen HDV

Name	Hersteller
LIAISON® Wasch/System Liquid (Best.-Nr. 319.100)	DiaSorin S.p.A

Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien für die Bestimmung der Antikörper gegen HDV

Name	Hersteller
LIAISON® XL Cuvettes (Best.-Nr. X0016 E)	DiaSorin S.p.A
LIAISON® XL Disposable Tips (Best.-Nr. X0015 E)	DiaSorin S.p.A
LIAISON® XL Waste Bags (REF X0025)	DiaSorin S.p.A
Pipetten Eppendorf research plus: 100-1000 µl, 0,5-10 µl, 20-200 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen: 10 µl ,200 µl, 1000 µl, 1250 µl	Eppendorf
Reaktionsgefäße Eppendorf DNA LoBind Tube 1.5 ml	Eppendorf

2.2.2. PCR-Methoden

2.2.2.1. Messung der HDV-RNA

HDV-RNA Extraktion

Die virale RNA aus dem Serum oder Plasma der Patienten wurde isoliert. Die RNA-Extraktion wurde mit einem automatisierten DNA/RNA-Extraktor m2000sp von Abbott durchgeführt (s. u.). Die Eluate wurden entweder frisch verwendet oder bei -80 °C gelagert.

Tabelle 10: Geräte für die RNA-Extraktion

Gerätename	Hersteller
M2000sp	Abbott
Zentrifuge 5417C	Eppendorf
Thermo Scientific™ Safe 2020 biologische Sicherheitswerkbänke der Klasse II	Thermo Fisher Scientific Inc.

Tabelle 11: Kits für die RNA-Extraktion

Kit	Hersteller
DNA Sample Preparation Reagent Kit (Best.-Nr. 6K12-24, Fa. Abbott)	Abbott Molecular Inc.

Tabelle 12: Reagenzien für die RNA-Extraktion

Reagenzien	Hersteller
Isotonische Natriumchlorid-Lösung (20 Injektionsflaschen zu 50 ml)	Fa. Diaco
Aqua inieciabilia (20 Injektionsflaschen zu 50 ml)	Fa. Diaco
Na-Hypochlorit (10 – 13%, 250 ml Flasche)	Fa. Sigma-Aldrich
Ethanol absolut zur Analyse (Best.- Nr. 1.00983.1000)	Fa. Merck

Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien für die RNA-Extraktion

Name	Hersteller
12x75mm-Röhrchen (5 ml Reaction Vessel, 4x500 St.)	Sarstedt
Spitzen 200 µl	Abbott
Spitzen 1000µl	Abbott
96er-Deepwell Platten	Abbott
Plastikwannen	Abbott

HDV-RNA real time PCR (Taqman)

Die quantitative PCR im Taqman ist als in house Verfahren etabliert. Dabei wird aus der Patientenprobe extrahierte virale Nukleinsäure mittels Zugabe von für die Zielsequenz spezifischen Primern, einer Fluoreszenz-markierten Sonde und einer DNA-Polymerase amplifiziert. Die unter Nachweisgrenze des Verfahrens liegt bei 500 Genomäquivalente pro ml. Unten sind alle Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien aufgelistet, die für dieses Verfahren gebraucht werden.

Tabelle 14: Geräte für HDV-RNA real time PCR

Gerätename	Hersteller
Vortexer	Heidolph
Centrifuge 5417C	Eppendorf
Centrifuge 5810	Eppendorf
Thermo Scientific™ Safe 2020 biologische Sicherheitswerkbänke der Klasse II	Thermo Fisher Scientific Inc.
Taqman-Cycler Real-Time PCR System 7500	Appliedbiosystems by Thermo Fisher Scientific

Tabelle 15: Reagenzien für HDV-RNA real time PCR

Reagenzien	Hersteller
Mastermix (Qiagen; QuantiTect + Rox Vial Kit, Bestell-Nr. 211035 für 1000 und 211033 für 200 Reaktionen)	Qiagen
<p>Primer:</p> <p>-Forward Primer Delta-F1: 5' CCC TTA GCC ATC CGA GTG G 3'</p> <p>-Forward Primer Delta-F3: 5' CCC TTA GCC ATC CGA GTW GG 3'</p> <p>-Reverse Primer Delta-R: 5' TCC TCT TCG GGT CGG CA 3' Die Forward-Primer werden als Mix angesetzt und zugegeben: (196 µl A.d. + 2µl F1 + 2 µl F3)</p> <p>Für Patienten aus Venezuela und dem Amazonasgebiet wird anstelle des Forward Primer-Mix aus Delta-F1 und Delta-F3 nur folgender Primer verwendet:</p> <p>-Forward Primer Delta-F2-2: 5' CCTTTGCCATCCGAGGGG 3'</p>	Microsynth
<p>Sonde:</p> <p>- Delta Sonde: FAM-5' ATGCCAGGTCGGACCGCG 3'-TAMRA</p>	Microsynth
50x Rox Dye Solution	Qiagen
QuantiTect RT-Mix	Qiagen

Tabelle 16: Verbrauchsmaterialien für HDV-RNA real time PCR

Name	Hersteller
Pipetten Eppendorf research plus: 100-1000 µl, 0,5-10 µl, 20-200 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen: 10 µl ,200 µl, 1000 µl, 1250 µl	Eppendorf
Reaktionsgefäße Eppendorf DNA LoBind Tube 1.5 ml	Eppendorf

2.2.2.2. HLA-Klasse-I-Typisierung

Extraktion der genomischen DNA:

Genomische DNA wurde aus 200 µl Plasma oder Serum (Aufgrund der Tatsache, dass genomische DNA zerstörter Zellen an das Serum abgegeben wird) mit dem QIAamp® DNA Mini und Blood Mini Kit (QIAGEN®, Deutschland) isoliert, genau nach der Anleitung des Herstellers (Anhang I). Die DNA-Konzentration wurde mit NanoDrop™ (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) gemessen. Die Eluate wurden entweder frisch verwendet oder bei -80 °C gelagert. Schließlich wurden die Eluate zur HLA-Klasse-I-Typisierung weitergeleitet (Labor für Immungenetik und molekulare Diagnostik, LMU München).

Unten sind alle Geräte, Kits, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien aufgelistet, die für dieses Verfahren verwendet wurden.

Tabelle 17: Geräte für die Extraktion der genomischen DNA

Gerätename	Hersteller
Vortexer Reax 2000	Heidolph
Heizplatte	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Heizplatte Thermomixer compact	Eppendorf
Centrifuge 5417R	Eppendorf

Tabelle 18: Kits für die Extraktion für HLA-Typisierung

Kit	Hersteller
QIAamp DNA Blood Mini Kit (50) 51104	Qiagen

Tabelle 19: Chemikalien/Reagenzien für die Extraktion für HLA-Typisierung

Name	Hersteller
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS-Lösung 100 mL	Wasser PBS 10x

Tabelle 20: Verbrauchsmaterialien für die Extraktion für HLA-Typisierung

Name	Hersteller
Pipetten Eppendorf research plus: 100-1000 µl, 0,5-10 µl, 20-200 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen: 10 µl, 200 µl, 1000 µl, 1250 µl	Eppendorf
Reaktionsgefäße Eppendorf DNA LoBind Tube 1.5 ml	Eppendorf

HLA-Klasse-I-Typisierung

Die extrahierte genomische DNA wurde verwendet, um eine zweistellige HLA-Klasse-I-Typisierung durch eine Luminex™ Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotid Probe (PCR SSO) unter Verwendung der LABType™ SSO Kits (One Lambda, Canoga Park, CA, USA), durchzuführen, wie hier beschrieben (Heinemann, 2009).

2.2.3. Analyse der Datenbanken

- Analyse der HDV Sequenzen aus den Daten der „Comprehensive Hepatitis D Virus Database“ (<https://hdvdb.bio.wzw.tum.de/hdvdb/>) (Usman et al., 2020) auf die Aminosäuresubstitutionen in den HLA-B*27 und HLA-B*15 restringierten Epitopen.
- Analyse der allele frequency net database (<http://www.allelefrequencies.net/>) (Gonzalez-Galarza et al., 2018) auf der Frequenz der Allele der entsprechenden HDV-Epitope.

2.2.4. Statistik

Statistische Auswertung wurde mittels exaktem Fisher-Test durchgeführt. Aufgrund des explorativen Charakters der Studie wurde keine Korrektur für multiples Testen durchgeführt. Ergebnisse sollten in einer confirmatorischen Studie bestätigt werden.

3. Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der HLA-B*-Typisierung von 69 Patienten mit ausgeheilter und 191 Patienten mit chronischer HDV-Infektion vorgestellt und analysiert, um die Fragen dieser Arbeit zu beantworten.

Um eine mögliche Korrelation zwischen HLA-B*27 und/oder anderen HLA-B*-Allelen und der Ausheilung einer HDV-Infektion zu untersuchen, wurden 260 Proben von Patienten aus 13 Zentren eingeschlossen (s. Tabelle 1 in „Material und Methoden“). 191 Patienten hatten einen chronischen Verlauf (HDV-PCR positiv) und 69 Patienten hatten die HDV-Infektion ausgeheilt (HDV-PCR negativ). Die Ergebnisse der HLA-Klasse-I-Typisierung für beide Patientengruppen sind in Tabelle Anlage 1 und Tabelle Anlage 2 im Anhang aufgeführt. Bei der Auswertung und Analyse der Allele von Probanden mit ausgeheilter und chronischer HDV-Infektion wurden nur Allele berücksichtigt, für die restringierte HDV-Epitope nachgewiesen wurden.

Bisher wurden 18 CD8+ T-Zell-Epitope des HDAg identifiziert, von denen 15 durch 12 HLA-B*-Allele restringiert sind (Karimzadeh et al., 2018, Karimzadeh et al., 2019, Kefalakes et al., 2019, Landahl et al., 2019). Einige Allele (z.B. HLA-B*37, -B*27, -B*15) restringieren mehr als ein Epitop und einige Epitope (z.B. aa46-54, aa194-202) werden von mehr als einem Allel restringiert. Die CD8+ -T-Zell-Epitope für HDV wurden fast ausschließlich für HLA-B*-Allele identifiziert, deswegen wurde nur die Häufigkeit der HLA-B*-Allele in beiden Patientenkollektiven analysiert. Für das HLA-B*27-Allel wurden zwei restringierte Epitope identifiziert (Karimzadeh et al., 2018): L-HDAg99-108 und L-HDAg103-112, mit teilweise überlappenden Peptiden (s. Abbildung 11).

Die 69 Proben von Patienten mit ausgeheilter HDV wurden in mehreren Kooperationszentren in Deutschland und Spanien (Barcelona) gesammelt (s. Tabelle Anlage 1 im Anhang). Die 191 Proben von Patienten mit chronischer HDV stammen aus mehreren Kooperationszentren in Deutschland, Spanien, Italien, Iran und USA (s. Tabelle Anlage 2 im Anhang).

Die Ergebnisse der HLA-B*-Typisierung von Patienten mit ausgeheilter und chronischer HDV-Infektion sind in Tabelle 21 und Abbildung 12 graphisch dargestellt. Die Häufigkeiten der einzelnen Allele in den beiden Gruppen (ausgeheilte und chronische HDV-Infektion) wurden verglichen und der Unterschied mit dem exakten Fisher-Test auf Signifikanz geprüft. Zum

Vergleich wurde der Anteil der Träger der entsprechenden Allele in der deutschen Bevölkerung angegeben (die Daten stammen aus der „The Allele Frequency Net Database“ (<http://www.allelefreqencies.net>) von 11.407 Probanden (Gonzalez-Galarza et al., 2018)).

Tabelle 21: Frequenz von HLA-B*-Allelen für bekannte HDV-Epitope bei Patienten mit ausgeheilten und chronischer HDV-Infektion im Vergleich zur Allelverteilung in der deutschen Population

HLA-B*-Allel	Ausgeheilte HDV (HDV-RNA negativ) (n=69)	Chronische HDV (HDV-RNA positiv) (n=191)	p-Wert	Anzahl und Anteil der Allel-Träger in der deutschen Population (n=11.407)
07	9 (13%)	20 (10,5%)	0.66	2794 (24,5%)
15	5 (7,2%)	27 (14,1%)	0.20	1745 (15,3%)
18	9 (13%)	20 (10,5%)	0.66	1026 (9%)
27	6 (8,7%)	10 (5,3%)	0.38	969 (8,5%)
35	22 (31,9%)	64 (33,5%)	0.88	2167 (19%)
37	0 (0%)	7 (3,7%)	0.19	342 (3%)
41	3 (4,3%)	5 (2,6%)	0.44	194 (1,7%)
44	7 (10,1%)	26 (13,6%)	0.53	2726 (23,9%)
51	13 (18,8%)	43 (22,5%)	0.61	1369 (12%)
52	1 (1,4%)	16 (8,4%)	0.048	205 (1,8%)
53	7 (10,1%)	5 (2,6%)	0.018	80 (0,7%)
58	3 (4,3%)	4 (2,6%)	0.39	240 (2,1%)

Wie man aus der Tabelle 21 sieht, waren auffallend viele Patienten mit ausgeheilten und chronischer HDV-Infektion Träger des Allels HLA-B*35: 31,9% der ausgeheilten Patienten (p-Wert 0,0128) und 33,5% der chronisch erkrankten Patienten (p-Wert <0,00001). Auch das HLA-B*53-Allel wurde bei Patienten mit ausgeheilten und chronischer HDV-Infektion häufiger beobachtet als in der deutschen Bevölkerung: bei 10,1% der ausgeheilten Patienten (p-Wert <0,00001) und bei 2,6% der chronisch Erkrankten (p-Wert 0,013), während in der deutschen Bevölkerung nur 0,7% dieses Allel tragen.

Statistisch signifikant häufiger in der Kohorte von chronisch kranken Patienten kamen Träger der Allele B*51 (p-Wert <0,00001) und B*52 (p-Wert <0,00001) vor, als in der Gesamtpopulation in Deutschland.

Im Gegensatz dazu wurden Träger der HLA-B*07- und HLA-B*44-Allele bei ausgeheilten und chronisch kranken Patienten statistisch signifikant seltener beobachtet als in der deutschen Bevölkerung. Der Anteil der HLA-B*07-Träger betrug [in der deutschen Bevölkerung 24,5%] bei ausgeheilten Patienten 13% (p-Wert 0,02) bei chronisch Kranken 10,5% (p-Wert <0,00001). Das HLA-B*44-Allel wurde [in der deutschen Bevölkerung 23,9%] bei 10,1% ausgeheilten Patienten (p-Wert 0,0065) und bei 13,6% chronisch Kranken (p-Wert 0,0006) nachgewiesen.

Diese Unterschiede in der Allelverteilung könnten durch Migration der mit HDV infizierten Menschen aus Ländern mit hoher HDV-Prävalenz erklärt werden, in denen die entsprechenden Allele anders verteilt sind als in Deutschland.

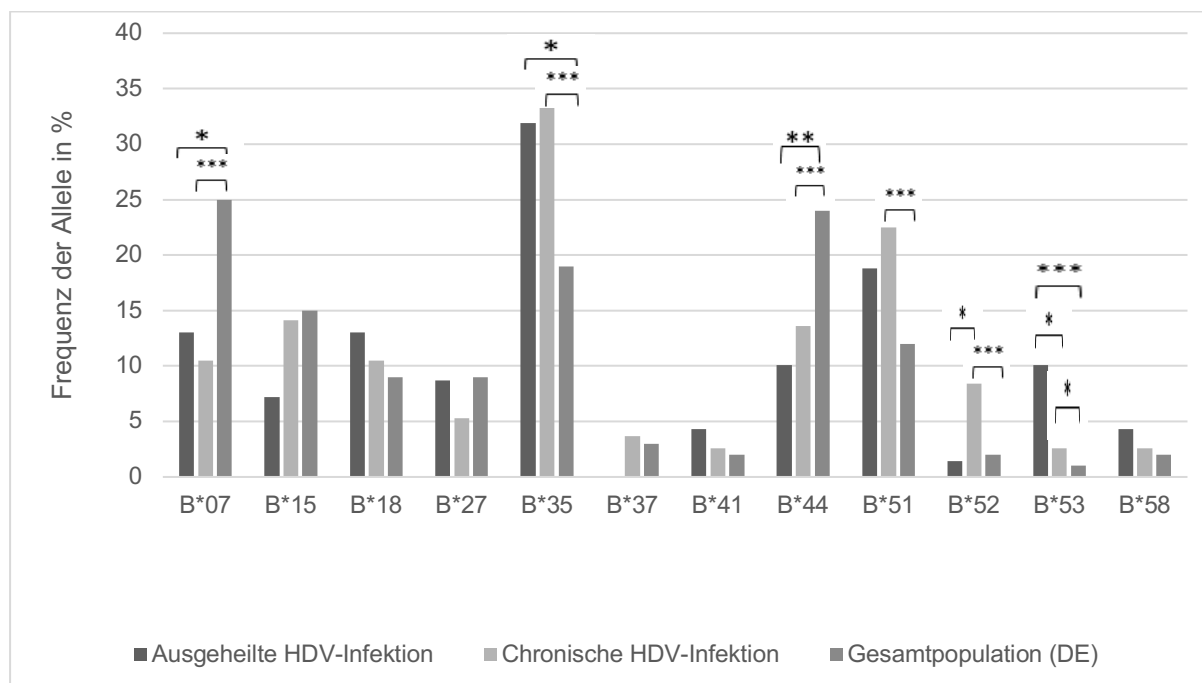


Abbildung 12: Frequenz der HLA-B*-Allele für bekannte HDV-Epitope bei ausgeheilter und chronischer HDV-Infektion

*p≤0,05 **p≤0,01 ***p≤0,001

3.1. Korrelation zwischen dem HLA-B*27-Allel und einer höheren Ausheilungsrate der HDV-Infektion.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob das HLA-B*27-Allel, ähnlich wie bei HCV- und HIV-Infektionen, mit einer höheren Ausheilungsrate der HDV-Infektion assoziiert ist.

Das HLA-B*-27-Allel wurde bei sechs von 69 ausgeheilten Patienten (8,7 %) und bei zehn von 191 chronisch kranken Patienten (5,2 %) nachgewiesen. Die Auswertung und der Vergleich der Häufigkeit der HLA-B*-Allele aller 69 Patienten mit ausgeheilter HDV-Infektion und 191 Patienten mit chronischer HDV-Infektion (siehe Tabelle 21) ergab keine statistisch signifikante Assoziation des HLA-B*27-Allels mit einer höheren HDV-Ausheilungsrate (p-Wert: 0,38).

3.2. Bedeutung der escape-Mutationen in den HLA-B*27 restringierten Epitopen für die Immunantwort.

Da im Gegensatz zu anderen viralen Infektionen wie z.B. HIV keine Korrelation zwischen einer erhöhten Ausheilungsrate einer HDV-Infektion und dem HLA-B* 27-Allel nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, inwieweit Mutationen in den beiden beschriebenen HLA-B*27-Epitopen dafür verantwortlich sind, dass eine solche Korrelation nicht auftritt, da diese Epitope von CD8+ T-Zellen nicht erkannt werden.

Um die Häufigkeit von Escape-Mutationen in den HLA-B*27 restringierten Epitopen des HDV zu untersuchen, wurden die HLA-B*27-Epitope von 848 Isolaten aus der „Comprehensive Hepatitis D Virus Database“ (Usman et al., 2020) in den aa-Positionen 105 und 106 analysiert. In früheren Studien hat *Karimzade* die Größteil der Proben von Patienten mit chronischer HDV-Infektion bereits untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die aa-Substitutionen an den Positionen 105 und 106 zu einer Immunevasion führen (s. Abbildung 13).

Dagegen waren die aa-Substitutionen in den Positionen 100 und 112 für die Immunantwort ohne Bedeutung. Insgesamt waren beide HLA-B*27 restringierte Epitope stabil (Karimzadeh et al., 2018, Karimzadeh et al., 2019). In der „Comprehensive Hepatitis D Virus Database“ wurde nur eine extrem niedrige Rate von Escape-Mutanten in neun von 848 Isolaten (1%) in den beiden beschriebenen HLA-B*27 Epitopen gefunden. Zum Vergleich wurde die Rate der Escape-Mutationen im HLA-B*15-Epitop bestimmt (s. Abbildung 14): 1033 HDV-Isolaten zeigten 418 Escape-Mutanten im HLA-B*15 restringierten Epitop, das entspricht 40,6%. Die

Mutationsrate im HLA-B*15-Epitop ist deutlich höher als in HLA-B*27-Epitopen. Die Analyse zeigt, dass die durch das HLA-B*27-Allel restringierten Epitope im Gegensatz zum HLA-B*15-Epitop sehr stabil sind (1% viral escape vs. 40,6%). Offensichtlich sind Mutationen in HLA-B*27-Epitopen nicht möglich, da es die virale Fitness drastisch beeinflusst. Dagegen scheint eine hohe Mutationsrate des HLA-B*15-Allels ohne Beeinträchtigung der viralen Replikation zu sein.

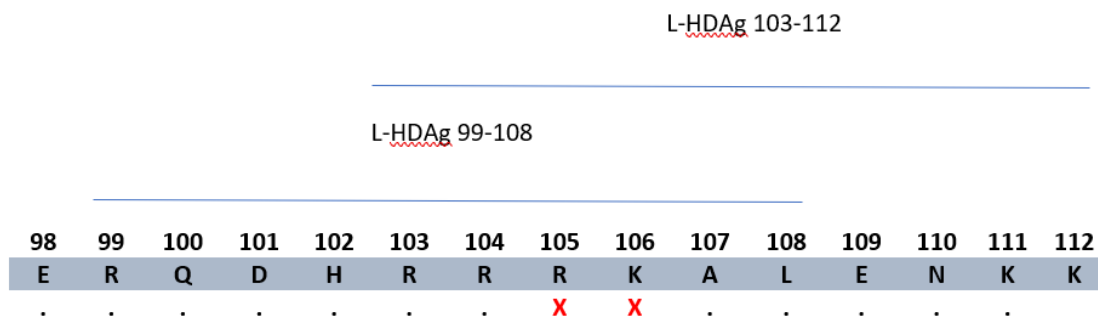


Abbildung 13: Escape Mutationen in den HLA-B*27 restringierten Epitopen (aa99-108 und aa103-112) bei aa-Substitutionen in den Positionen 105 und 106

In Anlehnung an (Karimzadeh et al., 2018)

R – Arginin, K – Lysin, A – Alanin, L – Leucin, E – Glutaminsäure, N – Asparagin, K – Lysin, D – Asparaginsäure, H – Histidin, Q – Glutamin

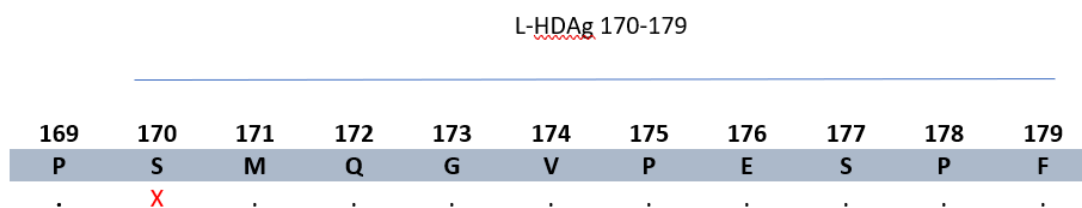


Abbildung 14: Escape Mutationen im HLA-B*15 restringiertem Epitop (aa170-179) bei aa-Substitutionen in der Position 170

In Anlehnung an (Karimzadeh et al., 2018)

P – Prolin, S – Serin, M – Methionin, Q – Glutamin, G – Glycin, V – Valin, E – Glutaminsäure, F - Phenylalanin

3.3. Korrelation zwischen den anderen HLA-B*-Allelen und einer höheren Ausheilungsrate der HDV-Infektion.

Es wurde auch untersucht, ob im Gegensatz zum HLA-B*27-Allel eine Korrelation zwischen anderen HLA-B*-Allelen und einer höheren Ausheilungsrate der HDV-Infektion besteht.

Eine Analyse der Verteilung der HLA-B*-Allele bei ausgeheilten und chronisch erkrankten Patienten (s. Tabelle 21) ergab, dass das HLA-B*53-Allel bei sieben von 69 Patienten mit ausgeheilter HDV-Infektion (10,1%) und nur bei fünf von 191 Patienten mit chronischer HDV-Infektion (2,6%) positiv war. Das HLA-B*53-Allel zeigte somit eine statistisch signifikante Korrelation mit einer höheren Ausheilungsrate der HDV-Infektion (p-Wert 0.018) (s. Abbildung 12).

3.4. Korrelation zwischen den HLA-B*-Allelen und einer erhöhten Rate chronischer Verläufe der HDV-Infektion

Es wurde auch untersucht, ob eine Korrelation zwischen HLA-B*-Allelen, für die ein oder mehrere HDV-Epitope beschrieben sind, und erhöhter Rate chronischer Verläufe der HDV-Infektion existiert. Dies würde bedeuten, dass Träger bestimmter Allele ein höheres Risiko für die Chronifizierung einer HDV-Infektion haben könnten.

Die Analyse der Allelfrequenz aus der Tabelle 26 ergab, dass das HLA-B*52-Allel bei 16 von 191 Patienten mit chronischer HDV-Infektion (8,4%), aber nur bei einem von 69 Patienten mit ausgeheilter Infektion (1,4%) nachgewiesen werden konnte; dieser Unterschied war statistisch signifikant (p-Wert 0.048) (s. Abbildung 12).

4. Diskussion

Trotz der Verfügbarkeit einer HBV-Impfung stellen HBV- und HDV-Infektionen nach wie vor ein sehr ernstes Gesundheitsproblem dar. Nach Angaben der WHO sind weltweit ca. 296 Millionen Menschen (Stand 2019) chronisch mit dem HBV infiziert, davon ca. 5% zusätzlich mit dem HDV. Nur ein kleiner Teil der Patienten (10-20%) ist in der Lage, eine ausreichende virusspezifische CD8+ T-Zell-Antwort zu generieren und damit die HDV-Infektion zu heilen. In den letzten Jahren konnten CD4+ und CD8+ T-Zell-Epitope des HDV charakterisiert werden. Aktuell sind 18 CD8+ T-Zell-Epitope des HDV beschrieben. Kürzlich wurden zwei überlappende HLA-B*27-restringierte CD8+-T-Zell-Epitope, L-HDAg99-108 und L-HDAg103-112, in der konservierten Region des L-HDAg identifiziert. Eine spezifische CD8+ T-Zell-Immunantwort gegen beide Epitope wurde bei HLA-B*27-positiven Patienten mit ausgeheilter HDV-Infektion nachgewiesen. (Karimzadeh et al., 2018, Karimzadeh et al., 2019).

Mehrere Studien haben einen positiven Einfluss des HLA-B*27-Allels auf den Verlauf bestimmter Virusinfektionen gezeigt. Das HLA-B*27-Allel korreliert mit einer erhöhten Ausheilungsrate bei HCV-Infektionen. Eine irische Studie an 227 Patientinnen, die durch kontaminiertes Anti-D-Immunglobulin mit HCV des Genotyps 1b infiziert wurden, zeigte, dass HLA-B*27-Trägerinnen die HCV-Infektion häufiger ausheilten als HLA-B*27-negative Personen (McKiernan et al., 2004). Darüber hinaus sind HLA-B*27-Träger als Langzeit-Nonprogressoren bei HIV-Infektionen bekannt (Goulder et al., 1997).

Basierend auf diesen Studien für HCV und HIV wurde die Frage gestellt, ob das HLA-B*27-Allel auch mit einer höheren Ausheilungsrate der HDV-Infektion assoziiert ist. Um diese Fragen zu beantworten, wurden Proben von 69 Patienten mit ausgeheilter HDV-Superinfektion bei weiter persistierender HBV-Infektion und eine Kontrollgruppe aus den Proben von 191 Patienten mit chronischer HBV/HDV-Superinfektion aus den Kooperationszentren in der EU, den USA und dem Iran analysiert. Bei allen Patienten wurde eine HLA-Klasse-I-Typisierung durchgeführt. Die Häufigkeit des HLA-B*27-Allels bei Patienten mit ausgeheilter und chronischer HDV-Infektion wurde verglichen.

Im Gegensatz zu HCV in der irischen Kohorte und HIV gab es keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem HLA-B*27-Allel und einer höheren HDV-Ausheilungsrate. Das HLA-B*27-Allel wurde bei sechs von 69 ausgeheilten Patienten (8,7 %) und bei zehn von 191 chronisch kranken Patienten (5,2 %) nachgewiesen (p -Wert: 0,38). Die Ursache für das

Fehlen dieser Korrelation zwischen dem HLA-B*27-Allel und einer erhöhten Ausheilungsrate einer HDV-Infektion könnte in einer erhöhten Rate von Escape-Mutationen in den beiden HLA-B*27-Epitopen liegen. In einem Kollektiv von Patienten mit einer HCV-Infektion konnte ein solches Immun-Escape nachgewiesen werden: *Ziegler et al.* untersuchten 216 Frauen mit chronischer HCV-Infektion und 95 Frauen mit spontan ausgeheilter HCV-Infektion, die in Ostdeutschland mit HCV-infizierten Anti-D-Immunglobulinen infiziert worden waren. Im Gegensatz zur irischen Kohorte wurde keine Korrelation zwischen dem HLA-B*27-Allel und einer erhöhten HCV-Ausheilungsrate gefunden. Als Ursache wurden in der ostdeutschen Kohorte aa-Substitutionen im HLA-B*27 restringierten Epitop mit daraus resultierendem Immunescape und Immunversagen identifiziert. (Ziegler et al., 2013)

Ähnlich verhält es sich bei den Patienten mit HIV-Infektion in der Studie von *Goulder et al.*: zwei Personen, die zuvor über Jahre stabil mit guter Viruskontrolle waren, entwickelten nach zwölf Jahren ein AIDS-Bild. Die Virussequenzierung zeigte, dass bei diesen Patienten eine R264K-Escape-Mutation im HLA-B*27-restringierten Epitop KRWILGLNK (KK10, Gag 263-272) aufgetreten war. Diese Mutanten entzogen sich der Erkennung durch CD8+ T-Zellen. (Goulder et al., 1997)

Es stellte sich die Frage, ob auch bei HDV-Infektion Escape-Mutationen in den HLA-B*27-Epitopen als Ursache für das Versagen des Immunsystems in Frage kommen. *Karimzadeh et al.* untersuchten den Einfluss von Aminosäuresubstitutionen innerhalb der HDV-Epitope. Dazu wurden 104 Patienten mit chronischer HDV-Infektion HLA-typisiert und die HDV-Genome sequenziert. Für die HLA-B*27-Epitope wurden aa-Substitutionen an den Positionen 100, 105 und 106 beobachtet. Es zeigte sich, dass Viren mit aa-Substitutionen an den Positionen 105 und 106 beider HLA-B*27-Epitope der Immunantwort entgehen, während eine aa-Substitution an Position 100 keinen Einfluss auf die Immunantwort hat. (Karimzadeh et al., 2019)

Daher wurde die Häufigkeit von Escape-Mutationen in den beiden HLA-B*27 restringierten Epitopen untersucht. Dazu wurden die HLA-B*27 restringierte Epitope von 848 sequenzierten HDV-Isolaten aus der „Comprehensive Hepatitis D Virus Database“ analysiert. Escape-Mutationen wurden nur bei neun von 848 der Viren gefunden (1%), d.h. die HLA-B*27-Epitope scheinen bei HDV sehr stabil zu sein. Einige Escape-Mutationen könnten die virale Replikationsfähigkeit dramatisch beeinträchtigen, was die Stabilität der HLA-B*27 restringierten Epitopen von HDV erklären könnte. Zum Beispiel war das HLA-B*15-Epitop sehr variabel mit ca. 41% Escape-Mutationen (von 1033 Isolaten wiesen 418 eine aa-Substitution in Position 170 auf). Somit konnte ein Immunescape in den beiden HLA-B*27 restringierten

Epitopen als Ursache für die fehlende Immunantwort bei HDV-Infektion bei den HLA-B*27-Allel-Trägern in dieser Studie ausgeschlossen werden.

Für das Ausbleiben einer Immunantwort bei Virusinfektionen wurden verschiedene andere Ursachen beschrieben. *Neumann-Haefelin et al.* haben in einer Studie den Beitrag des HLA-B*27-restringierten Epitops zum natürlichen Verlauf einer HCV-Infektion definiert, indem sie die biologische Wirkung des hochkonservierten HCV-Genotyp-1-Epitops, für das die protektive Rolle des HLA-B*27-Allels beschrieben wurde, mit der entsprechenden Region des Genotyp-3-Peptids verglichen, die sich in der Sequenz um drei Aminosäurereste unterscheidet. Das Peptid des Genotyps 3a wurde von CD8⁺-T-Zellen, die spezifisch für das Peptid des Genotyps 1 sind, nicht erkannt. Patienten mit einer akuten oder chronischen Infektion mit dem HCV-Genotyp 3a zeigten keine T-Zell-Antwort auf diese Epitop-Region. *Neumann-Haefelin et al.* fanden eine signifikant höhere Inzidenz von HLA-B*27-Positivität bei Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion vom Genotyp 3a im Vergleich zu Patienten mit einer Infektion vom Genotyp 1, was darauf hindeutet, dass bei einer HCV-Infektion vom Genotyp 3 kein Schutz durch HLA-B*27-Allel besteht.

Die protektive Wirkung von HLA-B*27-Allel scheint also auf eine Infektion mit HCV-Genotyp 1 beschränkt zu sein und sich nicht auf andere Genotypen wie Genotyp 3a auszudehnen. Die Häufigkeit der HLA-B*27-Positivität bei chronisch infizierten Patienten mit Genotyp 1 und 3a wurde ebenfalls verglichen. Chronisch mit HCV Genotyp 3a Infizierte waren signifikant häufiger HLA-B*27-Träger als mit Genotyp 1 Infizierte. Dies zeigt, dass die protektive Rolle von HLA-B*27-Allel auf die HCV-Genotyp 1-Infektion beschränkt ist. (*Neumann-Haefelin et al., 2010*). Bei den Patienten dieser Studie war eine Virussequenzierung mit Genotypbestimmung größtenteils nicht durchführbar, so dass die Viruspopulation recht inhomogen gewesen sein könnte, was auch erklären könnte, warum eine protektive Rolle des HLA-B*27-Allels in dieser Studie nicht nachgewiesen werden konnte.

Es ist auch möglich, dass das Ausbleiben einer Immunantwort bei einer HDV-Infektion wirtsspezifische Ursachen hat, z. B. könnte der HLA-Klasse-I-Subtyp eine Rolle spielen. Es wurde beschrieben, dass das HCV-Epitop NS5B 2820 nur durch den Subtyp HLA-B*27:02 (der in mediterranen Populationen häufig vorkommt), nicht aber durch den Subtyp HLA-B*27:05 eingeschränkt wird. Dieser Befund deutet auf eine wichtige Rolle der HLA-Subtypen bei der Einschränkung der HCV-spezifischen CD8⁺-Antwort hin. (*Nitschke et al., 2014*) In unserer Studie wurde die HLA-Klasse-I-Typisierung nicht in allen kooperierenden Zentren bis zum Subtyp durchgeführt, so dass diese Ursache weder bestätigt noch widerlegt werden kann.

Es ist auch möglich, dass immunologische Faktoren wie die Diversität der T-Zell-Rezeptoren zur Escape von CD8⁺ T-Zellen beitragen. Die Aminosäurediversität innerhalb der Antigenenerkennungsstelle CDR3 des T-Zell-Rezeptors könnte einen direkten Einfluss auf die Evolution von Escape-Mutationen innerhalb viraler Epitope haben und somit ein entscheidender Faktor für den Ausgang viraler Infektionen wie HCV sein, bei denen virale Escape-Mutationen zur Immunevasion beitragen. (Meyer-Olson et al., 2004). Dieser Faktor muss für HDV noch untersucht werden.

Ein Mangel an ausreichender CD4⁺ T-Zell-Hilfe kann dazu beitragen, dass Viren einer CD8⁺ T-Zell-Antwort entgehen (Grakoui et al., 2003). Dies wurde im Schimpansenmodell gezeigt, in dem eine unvollständige Kontrolle der HCV-Replikation durch Gedächtnis-CD8⁺-T-Zellen in Abwesenheit einer adäquaten CD4⁺-T-Zell-Hilfe auftrat und mit dem Auftreten von viralen Escape-Mutationen assoziiert war. In Abwesenheit von CD4⁺ T-Zellen waren CD8⁺ T-Zellen nicht in der Lage, die Entstehung von HCV-Mutationen zu verhindern, was zu einer Anhäufung von Escape-Mutationen führte. (Grakoui et al., 2003). Wichtig ist, dass die Antikörpervermittelte Depletion von CD4⁺ T-Zellen im Schimpansenmodell zu abgeschwächten HCV-spezifischen CD8⁺ T-Zellantworten und zur Selektion von viralen Escape-Mutationen führt. Dies deutet darauf hin, dass das Fehlen von CD4⁺ T-Zell-Unterstützung ein Schlüsselfaktor sein könnte, der zu viralem Escape führt (Grakoui et al., 2003, Schulze zur Wiesch et al., 2012). Bei HDV muss die CD4⁺-T-Zell-Unterstützung noch untersucht werden.

Eine Ursache für das Immunversagen bei HDV könnte auch ein Mangel an CD8⁺ T-Zellen sein. CD8⁺ T-Zellen werden gelegentlich bei persistierend mit HCV infizierten Menschen und Schimpansen nachgewiesen, aber ihnen fehlt möglicherweise eine adäquate Effektorfunktion (Lechner et al., 2000a, Lechner et al., 2000b, Gruener et al., 2001, Thimme et al., 2001, Urbani et al., 2002, Wedemeyer et al., 2002), sie zielen auf ein begrenztes Repertoire viraler Epitope (Cooper et al., 1999, Lechner et al., 2000b) und selektieren schnell Viren, die MHC Klasse-I-Escape-Mutationen enthalten (Weiner et al., 1995, Erickson et al., 2001).

Reifungsdefekte oder funktionelle Beeinträchtigungen antigenspezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL)-Antworten wurden von mehreren Forschern beobachtet und gelten als mögliche Ursachen für die virale Persistenz trotz messbarer T-Zell-Antworten bei HCV (Appay et al., 2002, Wedemeyer et al., 2002, Crispe, 2003, Willberg et al., 2003).

Eine weitere Ursache könnten Polymorphismen in der Antigenprozessierungs-/Präsentationsmaschinerie wie Aminopeptidase 1 des ER (Typ-1-Tumor-Nekrose-Faktor-

Rezeptor-Shedding-Aminopeptidase-Regulator [ERAP1]) sein. ERAP1 ist eine Aminopeptidase des endoplasmatischen Retikulums, die an der Epitop-Trimmung von Peptiden beteiligt ist, bevor diese auf das HLA-Klasse-I-Molekül geladen werden. ERAP1 spielt eine Schlüsselrolle bei der Antigenpräsentation. Genetische Varianten von ERAP1 (die zu unterschiedlichen Allotypen führen) sind mit bestimmten autoinflammatorischen Erkrankungen wie Morbus Bechterew und Morbus Behçet assoziiert. ERAP1-Allotypen modifizieren das virusspezifische CD8 + T-Zell-Epitop-Repertoire in vivo, was zu veränderten Immundominanzmustern führt, die zum Versagen der antiviralen Immunität nach HCV-Infektion beitragen können. (Kemming et al., 2019). Weitere Untersuchungen zu HDV sind erforderlich.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem HLA-B*27-Allel und einer höheren Ausheilungsrate einer HDV-Infektion nachgewiesen werden. Eine Virusmutation konnte als Ursache des Immunversagens nicht nachgewiesen werden. Andere mögliche Ursachen eines Immunversagens, die für andere virale Infektionen wie z.B. HCV beschrieben wurden, konnten in dieser Studie nicht geprüft werden.

Es wurde auch untersucht, ob andere HLA-B*-Allele möglicherweise mit einer höheren Ausheilungsrate der HDV-Infektion korrelieren. Eine Analyse der Verteilung der HLA-B*-Allele bei ausgeheilten und chronisch erkrankten Patienten ergab, dass das HLA-B*53-Allel bei sieben von 69 Patienten mit ausgeheilter HDV-Infektion (10,1%) und nur bei fünf von 191 Patienten mit chronischer HDV-Infektion (2,6%) positiv war. Das HLA-B*53-Allel zeigte somit eine statistisch signifikante Korrelation mit einer höheren Ausheilungsrate der HDV-Infektion (p-Wert 0.018). Für das HLA-B*53-Allel wurde bereits ein protektiver Effekt gegen HIV-Infektion bei perinatal exponierten Säuglingen nachgewiesen (Mekue et al., 2019). Das HLA-B*53-Allel war in Uganda jedoch mit einem erhöhten Risiko für *P. falciparum*-Parasitämie assoziiert (Digitale et al., 2021).

Abschließend wurde untersucht, ob bestimmte HLA-B*-Allele mit einer höheren Rate an chronischen HDV-Infektionen assoziiert sind. Die Analyse ergab, dass das HLA-B*52-Allel bei 16 von 191 Patienten mit chronischer HDV-Infektion (8,4%), aber nur bei einem von 69 Patienten mit ausgeheilter Infektion (1,4%) nachgewiesen werden konnte; dieser Unterschied war statistisch signifikant (p-Wert 0.048). Das HLA-B*52-Allel ist bekanntermaßen mit Morbus Behçet (Arber et al., 1991), Takayasu-Arteriitis (Sahin et al., 2012) und Colitis ulcerosa (Takahashi et al., 2011, Horai et al., 2011) assoziiert. In anderen Studien wurde eine protektive Rolle dieses Allels gezeigt: Es wurde ein Schutz vor HIV-Progression (Tsai et al., 2020, Teixeira et al., 2014, Chikata et al., 2017, El Kenz et al., 2023) sowie ein protektiver Effekt

gegen Lungentuberkulose (Vijaya Lakshmi et al., 2006) zugeschrieben. Es ist möglich, dass im HLA-B*52 restringierten Epitop besonders häufig Escape- Mutationen auftreten, die zur Immunevasion führen. Bisher ist jedoch nicht bekannt, ob es in diesem Epitop überhaupt Escape-Mutationen gibt und wenn ja, welche Aminosäure im Epitop substituiert werden müssen, damit Escape-Mutanten entstehen, so dass eine Analyse der Häufigkeit von Escape-Mutationen nicht möglich war. Hier sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Weitere Studien sind erforderlich, um die Bedeutung des HLA-B*52 und B*53-Allele für den Ausgang anderer viraler Infektionen zu untersuchen.

Anhang

Tabelle Anlage 1: Ergebnisse der HLA-Typisierung der Patienten mit der ausgeheilten HDV-Infektion

	Zentrum	Nummer	HLA-B*-Allele	
1	Hannover	H03/9291	B*15	B*35
2		H04/7783	B*13	B*35
3		H05/7784	B*49	B*50
4		H09/9144	B*27	B*44
5		H10/9713	B*14	B*44
6		H14/9292	B*08	B*51
7		H24/10185	B*07	B*18
8		H27/8126	B*07	B*08
9		H28/9193	B*35	B*55
10		H36/12754	B*27	B*50
11		H39/9191	B*08	-
12	Leberzentrum München	03	B*07	B*35
13	Heidelberg	HD-01	B*40	B*40
14		HD-03	B*51	B*58
15		HD-05	B*27	B*35
16		HD-06	B*35	B*54
17	Barcelona	VH7	B*07	B*39
18		VH9	B*07	B*57
19		VH11	B*07	B*18
20		VH13	B*35	B*57
21		VH18	B*35	B*53
22		VH26	B*44	B*48
23		VH27	B*07	B*15
24		VH28	B*51	B*53
25		VH29	B*07	B*53
26		VH64	B*44	B*51
27		VH72	B*08	B*51
28		VH73	B*14	B*49
29		VH84	B*27	B*35

30		VH88	B*18	B*41
31		VH95	B*47	B*53
32		VH111	B*08	B*42
33		VH132	B*39	B*57
34		VH143	B*35	B*44
35		VH155	B*35	B*35
36	Hamburg	HH-11-056	B*35	B*51
37		HH-15-005	B*07	B*38
38		HH-15-016	B*35	B*57
39		HH-15-046	B*08	B*51
40		HH-15-059	B*53	B*57
41		HH-15-075	B*18	-
42		HH-16-004	B*38	B*55
43		HH-16-010	B*35	B*51
44		HH-16-021	B*18	B*35
45		HH-16-090	B*40	B*41
46		HH-16-117	B*44	B*51
47		HH-18-100	B*18	B*35
48		HH-19-007	B*15	B*42
49		HH-19-057	B*14	B*41
50	Düsseldorf	42236	B*27	B*51
51		15867	B*13	B*40
52		4566	B*18	B*38
53		45870	B*51	B*51
54		40235	B*13	B*58
55		38481	B*18	B*35
56		10999	B*40	B*57
57		10682	B*18	B*35
58		7947	B*35	B*57
59		7003	B*15	B*53
60	TUM	1	B*46	B*57
61		2	B*35	B*45
62		3	B*27	B*49
63		4	B*08	B*49
64		5	B*35	B*44

65		6	B*38	-
66		7	B*15	B*51
67		8	B*53	B*58
68		9	B*39	B*52
69	Regensburg	51707231	B*45	B*45

Tabelle Anlage 2: Ergebnisse der HLA-Typisierung der Patienten mit der chronischen HDV-Infektion

	Zentrum	Nummer	HLA-B*-Allele	
1	Hannover*	H06	B*13	B*51
2		H13	B*07	B*15
3		H15	B*40	B*40
4		H16	B*07	B*51
5		H17	B*13	B*51
6		H20	B*27	B*52
7		H21	B*07	B*18
8		H23	B*41	B*44
9		H25	B*35	B*38
10		H33	B*35	B*51
11		H34	B*35	B*44
12		H35	B*18	B*39
13		H37	B*40	B*57
14		H38	B*39	B*51
15		H40	B*08	B*44
16		H41	B*35	B*51
17		H42	B*35	B*51
18	Hamburg	HH-13-021	B*07	B*51
19		HH-14-009	B*15	B*51
20		HH-15-001	B*07	B*51
21		HH-15-037	B*35	B*54
22		HH-15-048	B*35	B*51
23		HH-15-055	B*35	B*44
24		HH-15-056	B*15	B*47
25		HH-15-103	B*07	B*51

26		HH-16-081	B*27	B*44
27		HH-17-058	B*13	B*44
28		HH-17-063	B*35	B*57
29		HH-17-074	B*15	B*51
30		HH-17-125	B*07	B*35
31		HH-18-011	B*08	B*35
32		HH-18-115	B*51	-
33		HH-19-107	B*37	B*50
34	Barcelona*	VH1	B*08	B*39
35		VH2	B*14	B*41
36		VH3	B*35	B*44
37		VH4	B*13	B*44
38		VH5	B*15	B*53
39		VH6	B*35	B*40
40		VH8	B*35	B*37
41		VH10	B*08	B*08
42		VH12	B*15	B*40
43		VH14	B*18	B*27
44		VH15	B*52	B*52
45		VH16	B*37	B*52
46		VH17	B*40	B*52
47		VH19	B*35	B*44
48		VH20	B*08	B*14
49		VH21	B*15	B*58
50		VHB-70	B*08	B*35
51		VHB-74	B*18	B*27
52		VHB-76	B*35	B*44
53		VHB-77	B*44	B*53
54		VHB-87	B*15	B*42
55		VHB-110	B*07	B*35
56		VHB-147	B*15	B*37
57		VH23	B*52	B*56
58		VH24	B*51	B*54
59		VH25	B*08	B*35
60	Essen*	E01	B*15	B*57

61		E02	B*35	B*62
62		E03	B*07	B*08
63		E04	B*35	-
64		E06	B*18	B*50
65		E07	B*44	B*51
66		E08	B*35	B*52
67		E09	B*14	B*35
68		E10	B*41	B*51
69		E11	B*15	-
70		E12	B*35	B*58
71		E13	B*08	B*35
72		E14	B*55	B*60
73		E15	B*38	B*51
74		E16	B*51	B*55
75		E17	B*35	B*51
76		E18	B*35	B*51
77		E19	B*18	B*35
78		E20	B*18	B*41
79		E21	B*50	B*52
80		E23	B*35	B*51
81		E24	B*18	B*35
82		E26	B*18	B*51
83		E27	B*13	B*38
84		E28	B*38	B*51
85		E29	B*07	B*40
86		E30	B*15	B*44
87		E31	B*35	B*40
88		E32	B*52	B*57
89		E33	B*18	B*51
90		E34	B*14	-
91		E36	B*44	-
92		E38	B*15	B*52
93	Turin*	It01	B*13	B*35
94		It02	B*35	B*52
95		It03	B*44	B*57

96		It04	B*18	B*50
97		It05	B*18	B*37
98		It06	B*27	B*57
99		It07	B*07	B*44
100		It08	B*18	B*58
101		It09	B*35	B*37
102		It10	B*35	B*37
103		It11	B*35	-
104		It12	B*13	B*50
105		It13	B*35	B*39
106		It14	B*42	B*49
107		It16	B*49	B*51
108		It17	B*08	B*15
109		It20	B*50	B*51
110	Tehran*	T02	B*44	B*57
111		T03	B*35	B*38
112		T04	B*35	B*49
113		T05	B*35	B*38
114		T07	B*35	B*51
115		T08	B*52	-
116		T10	B*40	B*50
117		T11	B*35	B*50
118		T12	B*14	B*35
119		T15	B*49	B*51
120		T16	B*44	B*51
121	LMU	294	B*07	B*40
122		437	B*35	B*40
123		645	B*07	B*18
124		719	B*13	B*51
125		723	B*13	B*18
126		726	B*08	B*44
127		782	B*35	B*51
128		909	B*13	B*35
129		1313	B*15	B*35
130		1704	B*35	B*40

131		2094	B*41	B*57
132		3072	B*35	B*45
133		3132	B*27	B*45
134		3296	B*13	B*w4
135		3907	B*51	-
136		4212	B*15	B*40
137		4449	B*40	B*44
138		4462	B*08	B*35
139		6134	B*13	B*39
140		6237	B*07	B*35
141		6242	B*27	B*35
142		6244	B*08	-
143		6253	B*48	B*52
144		6447	B*35	B*39
145		6522	B*15	B*40
146		7127	B*15	B*52
147		7221	B*13	B*15
148		7483	B*08	B*35
149		7588	B*15	B*53
150		7589	B*08	B*13
151		7615	B*07	B*44
152		7899	B*07	B*56
153		7999	B*40	B*55
154		8217	B*45	B*49
155		8690	B*13	B*27
156		8811	B*08	B*15
157		8974	B*42	B*53
158		9175	B*14	B*57
159		9214	B*35	B*44
160		9279	B*50	B*51
161		9302	B*07	B*51
162		9342	B*13	B*45
163		9346	B*08	B*13
164	USA	1	B*35	B*44
165		2	B*39	B*52

166		3	B*13	B*54
167		4	B*27	B*35
168		5	B*15	B*15
169		6	B*13	B*48
170		7	B*44	B*44
171		8	B*15	B*51
172		9	B*15	B*18
173		10	B*27	B*40
174		11	B*51	B*51
175		12	B*18	B*40
176		13	B*13	B*49
177		14	B*44	B*50
178		15	B*15	B*40
179		16	B*35	B*51
180		17	B*07	B*51
181		18	B*51	B*58
182		19	B*07	B*15
183		20	B*51	B*54
184		21	B*07	B*35
185		22	B*18	B*51
186		23	B*18	B*52
187		24	B*35	B*71
188		25	B*35	B*53
189		26	B*13	B*35
190		27	B*18	B*35
191		28	B*35	B*57

Anlage 3: QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit Handbuch 06/2012

Protokoll: Isolierung und Reinigung genomischer DNA aus Blutproben mit einer Mikrozentrifuge (Spin-Protokoll)

Zur Isolierung und Reinigung genomischer DNA aus 200 µl mit EDTA oder Citrat behandelten Vollblutproben mithilfe einer Mikrozentrifuge.

Wichtige Hinweise vor Präparationsbeginn

- Die folgenden Anweisungen zur Durchführung des Protokolls beziehen sich auf die Verarbeitung einer einzelnen Blutprobe. Es können jedoch mehrere Proben gleichzeitig verarbeitet werden; die Anzahl hängt von der Kapazität der verwendeten Mikrozentrifuge ab.

Vor Protokollbeginn durchzuführende Arbeiten

- Äquilibrieren Sie die Blutproben auf Raumtemperatur (15–25 °C) und vergewissern Sie sich, dass sie gut durchmischt sind.
- Falls sich im Lysepuffer (AL) ein Niederschlag gebildet hat, lösen Sie diesen durch Erwärmen auf 56 °C auf.
- Vergewissern Sie sich, dass Waschpuffer 1 (AW1), Waschpuffer 2 (AW2) und die QIAGEN Protease (QP) gemäß den Anweisungen im Abschnitt „Vorbereitung der Reagenzien und Puffer“ auf den Seiten 14 und 15 vorbereitet wurden.
- Äquilibrieren Sie den für Schritt 15 benötigten Elutionspuffer (AE) auf Raumtemperatur (15–25 °C).
- Temperieren Sie für Schritt 4 einen Heizblock auf 56 °C.
- Bei der Qualitätskontrolle von QIAGEN wird jede Kit-Charge vor der Freigabe einer Funktionsüberprüfung unterzogen. Mischen Sie daher nicht Reagenzien verschiedener Kit-Chargen miteinander und kombinieren Sie auch nicht einzelne Reagenzien aus unterschiedlichen Reagenzien-Chargen.

Durchführung

1. Pipettieren Sie 20 µl QIAGEN Protease (QP) in ein Lyseröhrchen (LT).


 Überprüfen Sie vor Gebrauch das Verfallsdatum der gelösten Protease.

2. Geben Sie 200 µl Blutprobe in ein Lyseröhrchen (LT).

3. Pipettieren Sie 200 µl Lysepuffer (AL) hinzu, verschließen Sie den Deckel und mischen Sie durch Schütteln für 15 Sekunden auf einem Vortex-Mischer.

Um eine effiziente Lyse sicherzustellen, ist es besonders wichtig, Probe und Lysepuffer (AL) sofort und gründlich zu mischen, bis eine homogene Lösung vorliegt.

- i** Achten Sie wegen der hohen Viskosität des Lysepuffers (AL) besonders auf eine korrekte Dosierung des Lysepuffers (AL), indem Sie sorgfältig pipetieren oder eine entsprechend geeignete Pipette verwenden.
- i** Geben Sie die QIAGEN Protease (QP) nicht direkt in den Lysepuffer (AL).
- 4. Inkubieren Sie für 10 Minuten (± 1 Minute) bei 56 °C (± 1 °C).**
- 5. Zentrifugieren Sie das Lyseröhrchen (LT) kurz (ca. 5 Sekunden) bei maximaler Drehzahl, um Tröpfchen aus dem Deckelinneren mit der übrigen Flüssigkeit zu vereinen und Kreuzkontaminationen zu vermeiden.**
- 6. Geben Sie 200 μ l Ethanol (96–100 %) in das Lyseröhrchen (LT), schließen Sie den Deckel und mischen Sie gründlich für ≥ 15 Sekunden auf einem Vortex-Laborschüttler.**
- 7. Zentrifugieren Sie das Lyseröhrchen (LT) kurz (ca. 5 Sekunden) bei maximaler Drehzahl, um Tröpfchen aus dem Deckelinneren mit der übrigen Flüssigkeit zu vereinen und Kreuzkontaminationen zu vermeiden.**
- 8. Geben Sie das gesamte Lysat aus Schritt 7 vorsichtig – ohne den oberen Rand zu benetzen – in die QIAamp Mini-Spinsäule. Vermeiden Sie es, die Membran in der QIAamp Mini-Spinsäule mit der Pipettenspitze zu berühren.**
- i** Bei der gleichzeitigen Verarbeitung mehrerer Proben empfehlen wir, immer nur ein Lyseröhrchen (LT) zu öffnen.
- 9. Schließen Sie den Deckel der QIAamp Mini-Spinsäule und zentrifugieren Sie für 1 Minute bei ca. 6000 x g. Setzen Sie anschließend die QIAamp Mini-Spinsäule in ein sauberes Waschröhrchen (WT) und werfen Sie das benutzte Röhrchen mitsamt Filtrat.**
- i** Falls das Lysat nach der Zentrifugation bei 6000 x g (8000 UpM) die Membran nicht vollständig passiert hat, zentrifugieren Sie noch einmal für 1 Minute bei maximaler Drehzahl (bis zu 20.800 x g).
- i** Sollte das Lysat nach dieser erneuten Zentrifugation immer noch nicht die Membran passiert haben, werfen Sie die Probe und wiederholen Sie das Isolierungs- und Reinigungsprotokoll mit einer neuen Probe beginnend bei Schritt 1 auf Seite 23.
- 10. Öffnen Sie die QIAamp Mini-Spinsäule vorsichtig und geben Sie 500 μ l Waschpuffer 1 (AW1) hinein, ohne den oberen Rand zu**

- benetzen. Vermeiden Sie es, die Membran in der QIAamp Mini-Spinsäule mit der Pipettenspitze zu berühren.
11. Schließen Sie den Deckel der QIAamp Mini-Spinsäule und zentrifugieren Sie für 1 Minute bei ca. 6000 x g. Setzen Sie anschließend die QIAamp Mini-Spinsäule in ein sauberes Waschröhrchen (WT) und werfen Sie das benutzte Röhrchen mitsamt Filtrat.
 12. Öffnen Sie die QIAamp Mini-Spinsäule vorsichtig und geben Sie 500 µl Waschpuffer 2 (AW2) hinein, ohne den oberen Rand zu benetzen. Vermeiden Sie es, die Membran in der QIAamp Mini-Spinsäule mit der Pipettenspitze zu berühren.
 13. Schließen Sie den Deckel der QIAamp Mini-Spinsäule und zentrifugieren Sie für 1 Minute bei maximaler Drehzahl (ca. 20.000 x g bzw. 14.000 UpM). Setzen Sie anschließend die QIAamp Mini-Spinsäule in ein sauberes Waschröhrchen (WT) und werfen Sie das benutzte Röhrchen mitsamt Filtrat.
 14. Zentrifugieren Sie für 3 Minuten bei maximaler Drehzahl (ca. 20.000 x g bzw. 14.000 UpM), um die Membran vollständig zu trocknen.
-  Das Auslassen des Zentrifugationsschritts zur Trocknung der Membran kann zu einer Beeinträchtigung des nachfolgenden Tests führen.
15. Setzen Sie anschließend die QIAamp Mini-Spinsäule in ein sauberes Elutionsröhrchen (ET) und werfen Sie das benutzte Waschröhrchen (WT) mitsamt Filtrat. Öffnen Sie vorsichtig den Deckel der QIAamp Mini-Spinsäule und tragen Sie 50 bis 200 µl Elutionspuffer (AE) auf die Mitte der Membran auf. Schließen Sie den Deckel und inkubieren Sie für 1 Minute bei Raumtemperatur (15–25 °C). Zentrifugieren Sie für 1 Minute bei ca. 6000 x g (8000 UpM), um die DNA zu eluieren.

Literaturverzeichnis

- ABBAS, Z. & AFZAL, R. 2013. Life cycle and pathogenesis of hepatitis D virus: A review. *World J Hepatol*, 5, 666-75.
- ABEYWICKRAMA-SAMARAKOON, N., CORTAY, J. C., SUREAU, C., MÜLLER, S., ALFAIATE, D., GUERRIERI, F., CHAIKUAD, A., SCHRÖDER, M., MERLE, P., LEVRERO, M. & DÉNY, P. 2020. Hepatitis Delta Virus histone mimicry drives the recruitment of chromatin remodelers for viral RNA replication. *Nat Commun*, 11, 419.
- ABOU-JAOUDE, G. & SUREAU, C. 2007. Entry of hepatitis delta virus requires the conserved cysteine residues of the hepatitis B virus envelope protein antigenic loop and is blocked by inhibitors of thiol-disulfide exchange. *J Virol*, 81, 13057-66.
- ALFAIATE, D., DÉNY, P. & DURANTEL, D. 2015. Hepatitis delta virus: From biological and medical aspects to current and investigational therapeutic options. *Antiviral Res*, 122, 112-29.
- ALLEN, R. L., RAINE, T., HAUDE, A., TROWSDALE, J. & WILSON, M. J. 2001. Leukocyte receptor complex-encoded immunomodulatory receptors show differing specificity for alternative HLA-B27 structures. *J Immunol*, 167, 5543-7.
- ALMEIDA, J. R., PRICE, D. A., PAPAGNO, L., ARKOUB, Z. A., SAUCE, D., BORNSTEIN, E., ASHER, T. E., SAMRI, A., SCHNURIGER, A., THEODOROU, I., COSTAGLIOLA, D., ROUZIQUX, C., AGUT, H., MARCELIN, A. G., DOUEK, D., AUTRAN, B. & APPAY, V. 2007. Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J Exp Med*, 204, 2473-85.
- ALVARADO-MORA, M. V., LOCARNINI, S., RIZZETTO, M. & PINHO, J. R. 2013. An update on HDV: virology, pathogenesis and treatment. *Antivir Ther*, 18, 541-8.
- ALVES, C., BRANCO, C. & CUNHA, C. 2013. Hepatitis delta virus: a peculiar virus. *Adv Virol*, 2013, 560105.
- APPAY, V., DUNBAR, P. R., CALLAN, M., KLENERMAN, P., GILLESPIE, G. M., PAPAGNO, L., OGG, G. S., KING, A., LECHNER, F., SPINA, C. A., LITTLE, S., HAVLIR, D. V., RICHMAN, D. D., GRUENER, N., PAPE, G., WATERS, A., EASTERBROOK, P., SALIO, M., CERUNDOLO, V., MCMICHAEL, A. J. & ROWLAND-JONES, S. L. 2002. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med*, 8, 379-85.
- ARAGONA, M., MACAGNO, S., CAREDDA, F., CRIVELLI, O., LAVARINI, C., MARAN, E., FARCI, P., PURCELL, R. H. & RIZZETTO, M. 1987. Serological response to the hepatitis delta virus in hepatitis D. *Lancet*, 1, 478-80.

- ARBER, N., KLEIN, T., MEINER, Z., PRAS, E. & WEINBERGER, A. 1991. Close association of HLA-B51 and B52 in Israeli patients with Behçet's syndrome. *Ann Rheum Dis*, 50, 351-3.
- BAZINET, M., PÂNTEA, V., CEBOTARESCU, V., COJUHARI, L., JIMBEI, P., ALBRECHT, J., SCHMID, P., LE GAL, F., GORDIEN, E., KRAWCZYK, A., MIJOČEVIĆ, H., KARIMZADEH, H., ROGGENDORF, M. & VAILLANT, A. 2017. Safety and efficacy of REP 2139 and pegylated interferon alfa-2a for treatment-naive patients with chronic hepatitis B virus and hepatitis D virus co-infection (REP 301 and REP 301-LTF): a non-randomised, open-label, phase 2 trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2, 877-889.
- BAZINET, M., PÂNTEA, V., CEBOTARESCU, V., COJUHARI, L., JIMBEI, P., ANDERSON, M., GERSCH, J., HOLZMAYER, V., ELSNER, C., KRAWCZYK, A., KUHN, M. C., CLOHERTY, G., DITTMER, U. & VAILLANT, A. 2021. Persistent Control of Hepatitis B Virus and Hepatitis Delta Virus Infection Following REP 2139-Ca and Pegylated Interferon Therapy in Chronic Hepatitis B Virus/Hepatitis Delta Virus Coinfection. *Hepatol Commun*, 5, 189-202.
- BENJAMIN, R. & PARHAM, P. 1990. Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol Today*, 11, 137-42.
- BERNSTEIN, D. I., GOYETTE, N., CARDIN, R., KERN, E. R., BOIVIN, G., IRELAND, J., JUTEAU, J. M. & VAILLANT, A. 2008. Amphipathic DNA polymers exhibit antiherpetic activity in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 2727-33.
- BLANCHET, M. & SUREAU, C. 2006. Analysis of the cytosolic domains of the hepatitis B virus envelope proteins for their function in viral particle assembly and infectivity. *J Virol*, 80, 11935-45.
- BONINO, F., HEERMANN, K. H., RIZZETTO, M. & GERLICH, W. H. 1986. Hepatitis delta virus: protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope. *J Virol*, 58, 945-50.
- BOTELHO-SOUZA, L. F., VASCONCELOS, M. P. A., DOS SANTOS, A. O., SALCEDO, J. M. V. & VIEIRA, D. S. 2017. Hepatitis delta: virological and clinical aspects. *Virology*, 14, 177.
- BREWERTON, D. A., CAFFREY, M., NICHOLLS, A., WALTERS, D., OATES, J. K. & JAMES, D. C. 1973a. Reiter's disease and HL-A 27. *Lancet*, 302, 996-8.
- BREWERTON, D. A., HART, F. D., NICHOLLS, A., CAFFREY, M., JAMES, D. C. & STURROCK, R. D. 1973b. Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet*, 1, 904-7.
- BUTI, M., ESTEBAN, R., JARDÍ, R., ESTEBAN, J. I. & GUARDIA, J. 1986. Serological diagnosis of acute delta hepatitis. *J Med Virol*, 18, 81-5.
- CAREDDA, F., ROSSI, E., D'ARMINIO MONFORTE, A., ZAMPINI, L., RE, T., MERONI, B. & MORONI, M. 1985. Hepatitis B virus-associated coinfection and superinfection with

- delta agent: indistinguishable disease with different outcome. *J Infect Dis*, 151, 925-8.
- CASEY, J. L. 2012. Control of ADAR1 editing of hepatitis delta virus RNAs. *Curr Top Microbiol Immunol*, 353, 123-43.
- CHAN, H. L. Y., AHN, S. H., CHANG, T. T., PENG, C. Y., WONG, D., COFFIN, C. S., LIM, S. G., CHEN, P. J., JANSSEN, H. L. A., MARCELLIN, P., SERFATY, L., ZEUZEM, S., COHEN, D., CRITELLI, L., XU, D., WIND-ROTOLO, M. & COONEY, E. 2016. Peginterferon lambda for the treatment of HBeAg-positive chronic hepatitis B: A randomized phase 2b study (LIRA-B). *J Hepatol*, 64, 1011-1019.
- CHANG, J., NIE, X., CHANG, H. E., HAN, Z. & TAYLOR, J. 2008. Transcription of hepatitis delta virus RNA by RNA polymerase II. *J Virol*, 82, 1118-27.
- CHAO, M., HSIEH, S. Y. & TAYLOR, J. 1990. Role of two forms of hepatitis delta virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication. *J Virol*, 64, 5066-9.
- CHAO, M., HSIEH, S. Y. & TAYLOR, J. 1991. The antigen of hepatitis delta virus: examination of in vitro RNA-binding specificity. *J Virol*, 65, 4057-62.
- CHEN, H. Y., SHEN, D. T., JI, D. Z., HAN, P. C., ZHANG, W. M., MA, J. F., CHEN, W. S., GOYAL, H., PAN, S. & XU, H. G. 2019. Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis. *Gut*, 68, 512-521.
- CHIKATA, T., MURAKOSHI, H., KOYANAGI, M., HONDA, K., GATANAGA, H., OKA, S. & TAKIGUCHI, M. 2017. Control of HIV-1 by an HLA-B*52:01-C*12:02 Protective Haplotype. *J Infect Dis*, 216, 1415-1424.
- COOPER, S., ERICKSON, A. L., ADAMS, E. J., KANSOPON, J., WEINER, A. J., CHIEN, D. Y., HOUGHTON, M., PARHAM, P. & WALKER, C. M. 1999. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity*, 10, 439-49.
- CRISPE, I. N. 2003. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol*, 3, 51-62.
- CRIVELLI, O., RIZZETTO, M., LAVARINI, C., SMEDILE, A. & GERIN, J. L. 1981. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to the hepatitis B surface antigen-associated delta antigen. *J Clin Microbiol*, 14, 173-7.
- DAZERT, E., NEUMANN-HAEFELIN, C., BRESSANELLI, S., FITZMAURICE, K., KORT, J., TIMM, J., MCKIERNAN, S., KELLEHER, D., GRUENER, N. & TAVIS, J. E. 2009. Loss of viral fitness and cross-recognition by CD8+ T cells limit HCV escape from a protective HLA-B27-restricted human immune response. *The Journal of clinical investigation*, 119, 376-386.

- DEFENBAUGH, D. A., JOHNSON, M., CHEN, R., ZHENG, Y. Y. & CASEY, J. L. 2009. Hepatitis delta antigen requires a minimum length of the hepatitis delta virus unbranched rod RNA structure for binding. *J Virol*, 83, 4548-56.
- DIGITALE, J. C., CALLAWAY, P. C., MARTIN, M., NELSON, G., VIARD, M., REK, J., ARINAITWE, E., DORSEY, G., KAMYA, M., CARRINGTON, M., RODRIGUEZ-BARRAQUER, I. & FEENEY, M. E. 2021. HLA Alleles B(*)53:01 and C(*)06:02 Are Associated With Higher Risk of *P. falciparum* Parasitemia in a Cohort in Uganda. *Front Immunol*, 12, 650028.
- DOBBINS, W. O., 3RD 1987. HLA antigens in Whipple's disease. *Arthritis Rheum*, 30, 102-5.
- EL KENZ, B., SCHMIDT, K. G., OGUNGBEMI-ALT, V. K., BERGMANN, S., STEININGER, P., KORN, K., SPRIEWALD, B., HARRER, E. G., NGANOU-MAKAMDOP, K. & HARRER, T. 2023. Definition of a New HLA B*52-Restricted Rev CTL Epitope Targeted by an HIV-1-Infected Controller. *Viruses*, 15.
- ELAHI, S., DINGES, W. L., LEJARCEGUI, N., LAING, K. J., COLLIER, A. C., KOELLE, D. M., MCEL RATH, M. J. & HORTON, H. 2011. Protective HIV-specific CD8+ T cells evade Treg cell suppression. *Nat Med*, 17, 989-95.
- ELAZAR, M. & GLENN, J. S. 2022. Combination of Novel Therapies for HDV. *Viruses*, 14.
- ERICKSON, A. L., KIMURA, Y., IGARASHI, S., EICHELBERGER, J., HOUGHTON, M., SIDNEY, J., MCKINNEY, D., SETTE, A., HUGHES, A. L. & WALKER, C. M. 2001. The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*, 15, 883-895.
- FARCI, P., KARAYIANNIS, P., LAI, M. E., MARONGIU, F., ORGIANA, G., BALESTRIERI, A. & THOMAS, H. C. 1988. Acute and chronic hepatitis delta virus infection: direct or indirect effect on hepatitis B virus replication? *J Med Virol*, 26, 279-88.
- FARCI, P. & NIRO, G. A. 2012. Clinical features of hepatitis D. *Semin Liver Dis*, 32, 228-36.
- FATTOVICH, G., GIUSTINA, G., CHRISTENSEN, E., PANTALENA, M., ZAGNI, I., REALDI, G. & SCHALM, S. W. 2000. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep). *Gut*, 46, 420-6.
- FIEDLER, M. & ROGGENDORF, M. 2006. Immunology of HDV infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, 307, 187-209.
- GIERSCH, K., ALLWEISS, L., VOLZ, T., HELBIG, M., BIERWOLF, J., LOHSE, A. W., POLLOK, J. M., PETERSEN, J., DANDRI, M. & LÜTGEHETMANN, M. 2015. Hepatitis Delta co-infection in humanized mice leads to pronounced induction of innate immune responses in comparison to HBV mono-infection. *J Hepatol*, 63, 346-53.

- GIERSCH, K., BHADRA, O. D., VOLZ, T., ALLWEISS, L., RIECKEN, K., FEHSE, B., LOHSE, A. W., PETERSEN, J., SUREAU, C., URBAN, S., DANDRI, M. & LÜTGEHETMANN, M. 2019. Hepatitis delta virus persists during liver regeneration and is amplified through cell division both in vitro and in vivo. *Gut*, 68, 150-157.
- GIERSCH, K., HELBIG, M., VOLZ, T., ALLWEISS, L., MANCKE, L. V., LOHSE, A. W., POLYWKA, S., POLLOK, J. M., PETERSEN, J., TAYLOR, J., DANDRI, M. & LÜTGEHETMANN, M. 2014. Persistent hepatitis D virus mono-infection in humanized mice is efficiently converted by hepatitis B virus to a productive co-infection. *J Hepatol*, 60, 538-44.
- GIERSCH, K., HOMS, M., VOLZ, T., HELBIG, M., ALLWEISS, L., LOHSE, A. W., PETERSEN, J., BUTI, M., POLLICINO, T., SUREAU, C., DANDRI, M. & LÜTGEHETMANN, M. 2017. Both interferon alpha and lambda can reduce all intrahepatic HDV infection markers in HBV/HDV infected humanized mice. *Sci Rep*, 7, 3757.
- GLENN, J. S., WATSON, J. A., HAVEL, C. M. & WHITE, J. M. 1992. Identification of a prenylation site in delta virus large antigen. *Science*, 256, 1331-3.
- GLENN, J. S. & WHITE, J. M. 1991. trans-dominant inhibition of human hepatitis delta virus genome replication. *J Virol*, 65, 2357-61.
- GONZALEZ-GALARZA, F. F., MCCABE, A., MELO DOS SANTOS, E. J., TAKESHITA, L., GHATTAORAYA, G., JONES, A. R. & MIDDLETON, D. 2018. Allele Frequency Net Database. *Methods Mol Biol*, 1802, 49-62.
- GOODRUM, G. & PELCHAT, M. 2018. Insight into the Contribution and Disruption of Host Processes during HDV Replication. *Viruses*, 11.
- GOULDER, P. J. R., PHILLIPS, R. E., COLBERT, R. A., MCADAM, S., OGG, G., NOWAK, M. A., GIANGRANDE, P., LUZZI, G., MORGANA, B., EDWARDS, A., MCMICHAEL, A. J. & ROWLAND-JONES, S. 1997. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nature Medicine*, 3, 212-217.
- GOVINDARAJAN, S., GUPTA, S., VALINLUCK, B. & REDEKER, A. G. 1989. Correlation of IgM anti-hepatitis D virus (HDV) to HDV RNA in sera of chronic HDV. *Hepatology*, 10, 34-5.
- GRABOWSKI, J. & WEDEMEYER, H. 2010. Hepatitis delta: immunopathogenesis and clinical challenges. *Dig Dis*, 28, 133-8.
- GRAKOU, A., SHOUKRY, N. H., WOOLLARD, D. J., HAN, J.-H., HANSON, H. L., GHRAYEB, J., MURTHY, K. K., RICE, C. M. & WALKER, C. M. 2003. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science*, 302, 659-662.

- GRECO-STEWART, V. S., MIRON, P., ABRAHEM, A. & PELCHAT, M. 2007. The human RNA polymerase II interacts with the terminal stem-loop regions of the hepatitis delta virus RNA genome. *Virology*, 357, 68-78.
- GRECO-STEWART, V. S., SCHISSEL, E. & PELCHAT, M. 2009. The hepatitis delta virus RNA genome interacts with the human RNA polymerases I and III. *Virology*, 386, 12-5.
- GRIFFIN, B. L., CHASOVSKIKH, S., DRITSCHILO, A. & CASEY, J. L. 2014. Hepatitis delta antigen requires a flexible quasi-double-stranded RNA structure to bind and condense hepatitis delta virus RNA in a ribonucleoprotein complex. *J Virol*, 88, 7402-11.
- GRIPON, P., CANNIE, I. & URBAN, S. 2005. Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. *J Virol*, 79, 1613-22.
- GRIPPON, P., RIBIERE, O., CADRANEL, J. F., PELLETIER, S., PILLOT, B., EMERIT, J. & OPOLON, P. 1987. Long-term delta antigenaemia without appearance of delta antibody in two immunodeficient patients. *Lancet*, 1, 1031.
- GRUENER, N. H., LECHNER, F., JUNG, M. C., DIEPOLDER, H., GERLACH, T., LAUER, G., WALKER, B., SULLIVAN, J., PHILLIPS, R., PAPE, G. R. & KLENERMAN, P. 2001. Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *J Virol*, 75, 5550-8.
- GUDIMA, S., CHANG, J., MORALEDA, G., AZVOLINSKY, A. & TAYLOR, J. 2002. Parameters of human hepatitis delta virus genome replication: the quantity, quality, and intracellular distribution of viral proteins and RNA. *J Virol*, 76, 3709-19.
- GUDIMA, S., WU, S. Y., CHIANG, C. M., MORALEDA, G. & TAYLOR, J. 2000. Origin of hepatitis delta virus mRNA. *J Virol*, 74, 7204-10.
- GUILHOT, S., HUANG, S. N., XIA, Y. P., LA MONICA, N., LAI, M. M. & CHISARI, F. V. 1994. Expression of the hepatitis delta virus large and small antigens in transgenic mice. *J Virol*, 68, 1052-8.
- GUZMAN, E. M., CHESHENKO, N., SHENDE, V., KELLER, M. J., GOYETTE, N., JUTEAU, J. M., BOIVIN, G., VAILLANT, A. & HEROLD, B. C. 2007. Amphipathic DNA polymers are candidate vaginal microbicides and block herpes simplex virus binding, entry and viral gene expression. *Antivir Ther*, 12, 1147-56.
- HARTWIG, D., SCHÜTTE, C., WARNECKE, J., DORN, I., HENNIG, H., KIRCHNER, H. & SCHLENKE, P. 2006. The large form of ADAR 1 is responsible for enhanced hepatitis delta virus RNA editing in interferon-alpha-stimulated host cells. *J Viral Hepat*, 13, 150-7.
- HEINEMANN, F. M. 2009. HLA Genotyping and Antibody Characterization Using the Luminex™ Multiplex Technology. *Transfus Med Hemother*, 36, 273-278.

- HELLER, T., ROTMAN, Y., KOH, C., CLARK, S., HAYNES-WILLIAMS, V., CHANG, R., MCBURNEY, R., SCHMID, P., ALBRECHT, J., KLEINER, D. E., GHANY, M. G., LIANG, T. J. & HOOFNAGLE, J. H. 2014. Long-term therapy of chronic delta hepatitis with peginterferon alfa. *Aliment Pharmacol Ther*, 40, 93-104.
- HONG, S. Y. & CHEN, P. J. 2010. Phosphorylation of serine 177 of the small hepatitis delta antigen regulates viral antigenomic RNA replication by interacting with the processive RNA polymerase II. *J Virol*, 84, 1430-8.
- HORAI, Y., MIYAMURA, T., SHIMADA, K., TAKAHAMA, S., MINAMI, R., YAMAMOTO, M. & SUEMATSU, E. 2011. A case of Takayasu's arteritis associated with human leukocyte antigen A24 and B52 following resolution of ulcerative colitis and subacute thyroiditis. *Intern Med*, 50, 151-4.
- HSIEH, S. Y., CHAO, M., COATES, L. & TAYLOR, J. 1990. Hepatitis delta virus genome replication: a polyadenylated mRNA for delta antigen. *J Virol*, 64, 3192-8.
- HUANG, H. C., LEE, C. P., LIU, H. K., CHANG, M. F., LAI, Y. H., LEE, Y. C. & HUANG, C. 2016. Cellular Nuclear Export Factors TAP and Aly Are Required for HDAg-L-mediated Assembly of Hepatitis Delta Virus. *J Biol Chem*, 291, 26226-26238.
- HUANG, Y. H., TAO, M. H., HU, C. P., SYU, W. J. & WU, J. C. 2004. Identification of novel HLA-A*0201-restricted CD8+ T-cell epitopes on hepatitis delta virus. *J Gen Virol*, 85, 3089-3098.
- HUGHES, S. A., WEDEMEYER, H. & HARRISON, P. M. 2011. Hepatitis delta virus. *Lancet*, 378, 73-85.
- HWANG, S. B. & LAI, M. M. 1993. Isoprenylation mediates direct protein-protein interactions between hepatitis large delta antigen and hepatitis B virus surface antigen. *J Virol*, 67, 7659-62.
- HWANG, S. B. & LAI, M. M. 1994. Isoprenylation masks a conformational epitope and enhances trans-dominant inhibitory function of the large hepatitis delta antigen. *J Virol*, 68, 2958-64.
- JENNA, S. & SUREAU, C. 1999. Mutations in the carboxyl-terminal domain of the small hepatitis B virus envelope protein impair the assembly of hepatitis delta virus particles. *J Virol*, 73, 3351-8.
- KARIMZADEH, H., KIRAITHE, M. M., KOSINSKA, A. D., GLASER, M., FIEDLER, M., OBERHARDT, V., SALIMI ALIZEI, E., HOFMANN, M., MOK, J. Y., NGUYEN, M., VAN ESCH, W. J. E., BUDEUS, B., GRABOWSKI, J., HOMES, M., OLIVERO, A., KEYVANI, H., RODRÍGUEZ-FRÍAS, F., TABERNERO, D., BUTI, M., HEINOLD, A., ALAVIAN, S. M., BAUER, T., SCHULZE ZUR WIESCH, J., RAZIORROUH, B., HOFFMANN, D., SMEDILE, A., RIZZETTO, M., WEDEMEYER, H., TIMM, J., ANTES, I., NEUMANN-HAEFELIN, C., PROTZER, U. & ROGGENDORF, M. 2018.

- Amino Acid Substitutions within HLA-B*27-Restricted T Cell Epitopes Prevent Recognition by Hepatitis Delta Virus-Specific CD8(+) T Cells. *J Virol*, 92.
- KARIMZADEH, H., KIRAITHE, M. M., OBERHARDT, V., SALIMI ALIZEI, E., BOCKMANN, J., SCHULZE ZUR WIESCH, J., BUDEUS, B., HOFFMANN, D., WEDEMEYER, H., CORNBERG, M., KRAWCZYK, A., RASHIDI-ALAVIJEH, J., RODRÍGUEZ-FRÍAS, F., CASILLAS, R., BUTI, M., SMEDILE, A., ALAVIAN, S. M., HEINOLD, A., EMMERICH, F., PANNING, M., GOSTICK, E., PRICE, D. A., TIMM, J., HOFMANN, M., RAZIORROUH, B., THIMME, R., PROTZER, U., ROGGENDORF, M. & NEUMANN-HAEFELIN, C. 2019. Mutations in Hepatitis D Virus Allow It to Escape Detection by CD8(+) T Cells and Evolve at the Population Level. *Gastroenterology*, 156, 1820-1833.
- KEFALAKES, H., KOH, C., SIDNEY, J., AMANAKIS, G., SETTE, A., HELLER, T. & REHERMANN, B. 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, 1805-1819.e9.
- KEMMING, J., REEVES, E., NITSCHKE, K., WIDMEIER, V., EMMERICH, F., HERMLE, T., GOSTICK, E., WALKER, A., TIMM, J. & PRICE, D. A. 2019. ERAP1 allotypes shape the epitope repertoire of virus-specific CD8+ T cell responses in acute hepatitis C virus infection. *Journal of hepatology*, 70, 1072-1081.
- KIMURA, Y., GUSHIMA, T., RAWALE, S., KAUMAYA, P. & WALKER, C. M. 2005. Escape mutations alter proteasome processing of major histocompatibility complex class I-restricted epitopes in persistent hepatitis C virus infection. *Journal of virology*, 79, 4870-4876.
- KOCISKO, D. A., VAILLANT, A., LEE, K. S., ARNOLD, K. M., BERTHOLET, N., RACE, R. E., OLSEN, E. A., JUTEAU, J. M. & CAUGHEY, B. 2006. Potent antiscrapie activities of degenerate phosphorothioate oligonucleotides. *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 1034-44.
- KOH, C., CANINI, L., DAHARI, H., ZHAO, X., UPRICHARD, S. L., HAYNES-WILLIAMS, V., WINTERS, M. A., SUBRAMANYA, G., COOPER, S. L., PINTO, P., WOLFF, E. F., BISHOP, R., AI THANDA HAN, M., COTLER, S. J., KLEINER, D. E., KESKIN, O., IDILMAN, R., YURDAYDIN, C., GLENN, J. S. & HELLER, T. 2015. Oral prenylation inhibition with lonafarnib in chronic hepatitis D infection: a proof-of-concept randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2A trial. *Lancet Infect Dis*, 15, 1167-1174.
- KOH, C., DA, B. L. & GLENN, J. S. 2019. HBV/HDV Coinfection: A Challenge for Therapeutics. *Clin Liver Dis*, 23, 557-572.

- KOHSAR, M., LANDAHL, J., NEUMANN-HAEFELIN, C. & SCHULZE ZUR WIESCH, J. 2021. Human hepatitis D virus-specific T cell epitopes. *JHEP Rep*, 3, 100294.
- KOLLNBERGER, S., BIRD, L., SUN, M. Y., RETIERE, C., BRAUD, V. M., MCMICHAEL, A. & BOWNESS, P. 2002. Cell-surface expression and immune receptor recognition of HLA-B27 homodimers. *Arthritis Rheum*, 46, 2972-82.
- KOMLA-SOUKHA, I. & SUREAU, C. 2006. A tryptophan-rich motif in the carboxyl terminus of the small envelope protein of hepatitis B virus is central to the assembly of hepatitis delta virus particles. *J Virol*, 80, 4648-55.
- KOS, A., DIJKEMA, R., ARNBERG, A. C., VAN DER MEIDE, P. H. & SCHELLEKENS, H. 1986. The hepatitis delta (delta) virus possesses a circular RNA. *Nature*, 323, 558-60.
- KOSMRLJ, A., READ, E. L., QI, Y., ALLEN, T. M., ALTFELD, M., DEEKS, S. G., PEREYRA, F., CARRINGTON, M., WALKER, B. D. & CHAKRABORTY, A. K. 2010. Effects of thymic selection of the T-cell repertoire on HLA class I-associated control of HIV infection. *Nature*, 465, 350-4.
- KUO, M. Y., CHAO, M. & TAYLOR, J. 1989. Initiation of replication of the human hepatitis delta virus genome from cloned DNA: role of delta antigen. *J Virol*, 63, 1945-50.
- LADELL, K., HASHIMOTO, M., IGLESIAS, M. C., WILMANN, P. G., MCLAREN, J. E., GRAS, S., CHIKATA, T., KUSE, N., FASTENACKELS, S., GOSTICK, E., BRIDGEMAN, J. S., VENTURI, V., ARKOUB, Z. A., AGUT, H., VAN BOCKEL, D. J., ALMEIDA, J. R., DOUEK, D. C., MEYER, L., VENET, A., TAKIGUCHI, M., ROSSJOHN, J., PRICE, D. A. & APPAY, V. 2013. A molecular basis for the control of preimmune escape variants by HIV-specific CD8+ T cells. *Immunity*, 38, 425-36.
- LAI, M. M. 1995. The molecular biology of hepatitis delta virus. *Annu Rev Biochem*, 64, 259-86.
- LAI, M. M. 2005a. RNA replication without RNA-dependent RNA polymerase: surprises from hepatitis delta virus. *Journal of virology*, 79, 7951-7958.
- LAI, M. M. 2005b. RNA replication without RNA-dependent RNA polymerase: surprises from hepatitis delta virus. *J Virol*, 79, 7951-8.
- LAMAS LONGARELA, O., SCHMIDT, T. T., SCHÖNEWEIS, K., ROMEO, R., WEDEMEYER, H., URBAN, S. & SCHULZE, A. 2013. Proteoglycans act as cellular hepatitis delta virus attachment receptors. *PLoS One*, 8, e58340.
- LANDAHL, J., BOCKMANN, J. H., SCHEURICH, C., ACKERMANN, C., MATZAT, V., HEIDE, J., NUUREI, T., D'ANTONIO, G., VON FELDEN, J., SETTE, A., PEINE, S., LOHSE, A. W., LUETGEHETMANN, M., MARGET, M., SIDNEY, J. & SCHULZE ZUR WIESCH, J. 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. *J Infect Dis*, 219, 568-577.
- LASFAR, A., ABUSHAHBA, W., BALAN, M. & COHEN-SOLAL, K. A. 2011. Interferon lambda: a new sword in cancer immunotherapy. *Clin Dev Immunol*, 2011, 349575.
- LE GAL, F., BRICHLER, S., DRUGAN, T., ALLOUI, C., ROULOT, D., PAWLITSKY, J. M., DÉNY, P. & GORDIEN, E. 2017. Genetic diversity and worldwide distribution of the deltavirus genus: A study of 2,152 clinical strains. *Hepatology*, 66, 1826-1841.
- LE GAL, F., GORDIEN, E., AFFOLABI, D., HANSLIK, T., ALLOUI, C., DÉNY, P. & GAULT, E. 2005. 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. *J Clin Microbiol*, 43, 2363-9.
- LECHNER, F., GRUENER, N. H., URBANI, S., UGGERI, J., SANTANTONIO, T., KAMMER, A. R., CERNY, A., PHILLIPS, R., FERRARI, C., PAPE, G. R. & KLENERMAN, P. 2000a. CD8+ T lymphocyte responses are induced during acute hepatitis C virus infection but are not sustained. *Eur J Immunol*, 30, 2479-87.
- LECHNER, F., WONG, D. K., DUNBAR, P. R., CHAPMAN, R., CHUNG, R. T., DOHRENWEND, P., ROBBINS, G., PHILLIPS, R., KLENERMAN, P. & WALKER, B. D. 2000b. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med*, 191, 1499-512.
- LEE, A. M., ROJEK, J. M., GUNDERSEN, A., STRÖHER, U., JUTEAU, J. M., VAILLANT, A. & KUNZ, S. 2008. Inhibition of cellular entry of lymphocytic choriomeningitis virus by amphipathic DNA polymers. *Virology*, 372, 107-17.
- LEE, C. Z., CHEN, P. J., LAI, M. M. & CHEN, D. S. 1994. Isoprenylation of large hepatitis delta antigen is necessary but not sufficient for hepatitis delta virus assembly. *Virology*, 199, 169-75.
- LEISTNER, C. M., GRUEN-BERNHARD, S. & GLEBE, D. 2008. Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cell Microbiol*, 10, 122-33.
- LEMPP, F. A., NI, Y. & URBAN, S. 2016. Hepatitis delta virus: insights into a peculiar pathogen and novel treatment options. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 13, 580-589.
- LIU, X., BUSHNELL, D. A. & KORNBERG, R. D. 2013. RNA polymerase II transcription: structure and mechanism. *Biochim Biophys Acta*, 1829, 2-8.
- LÓPEZ DE CASTRO, J. A. 2005. HLA-B27: portraying immunodominant viral epitopes. *Eur J Immunol*, 35, 336-40.
- LUCIFORA, J. & DELPHIN, M. 2020. Current knowledge on Hepatitis Delta Virus replication. *Antiviral Res*, 179, 104812.

- LÜTGEHETMANN, M., MANCKE, L. V., VOLZ, T., HELBIG, M., ALLWEISS, L., BORNSCHEUER, T., POLLOK, J. M., LOHSE, A. W., PETERSEN, J., URBAN, S. & DANDRI, M. 2012. Humanized chimeric uPA mouse model for the study of hepatitis B and D virus interactions and preclinical drug evaluation. *Hepatology*, 55, 685-94.
- MARTIN, T. M. & ROSENBAUM, J. T. 2011. An update on the genetics of HLA B27-associated acute anterior uveitis. *Ocul Immunol Inflamm*, 19, 108-14.
- MCKIERNAN, S. M., HAGAN, R., CURRY, M., MCDONALD, G. S., KELLY, A., NOLAN, N., WALSH, A., HEGARTY, J., LAWLOR, E. & KELLEHER, D. 2004. Distinct MHC class I and II alleles are associated with hepatitis C viral clearance, originating from a single source. *Hepatology*, 40, 108-14.
- MCMICHAEL, A. J. 2007. From influenza to HIV--and back? *Nat Immunol*, 8, 1149-51.
- MEAR, J. P., SCHREIBER, K. L., MÜNZ, C., ZHU, X., STEVANOVIĆ, S., RAMMENSEE, H. G., ROWLAND-JONES, S. L. & COLBERT, R. A. 1999. Misfolding of HLA-B27 as a result of its B pocket suggests a novel mechanism for its role in susceptibility to spondyloarthropathies. *J Immunol*, 163, 6665-70.
- MEKUE, L. M., NKENFOU, C. N., NDUKONG, E., YATCHOU, L., DAMBAYA, B., NGOUFACK, M. N., KAMENI, J. K., KUIATÉ, J. R. & NDJOLO, A. 2019. HLA A*32 is associated to HIV acquisition while B*44 and B*53 are associated with protection against HIV acquisition in perinatally exposed infants. *BMC Pediatr*, 19, 249.
- MENTHA, N., CLÉMENT, S., NEGRO, F. & ALFAIATE, D. 2019. A review on hepatitis D: From virology to new therapies. *J Adv Res*, 17, 3-15.
- MEYER-OLSON, D., SHOUKRY, N. H., BRADY, K. W., KIM, H., OLSON, D. P., HARTMAN, K., SHINTANI, A. K., WALKER, C. M. & KALAMS, S. A. 2004. Limited T cell receptor diversity of HCV-specific T cell responses is associated with CTL escape. *J Exp Med*, 200, 307-19.
- MIAO, Z., ZHANG, S., OU, X., LI, S., MA, Z., WANG, W., PEPPELENBOSCH, M. P., LIU, J. & PAN, Q. 2020. Estimating the Global Prevalence, Disease Progression, and Clinical Outcome of Hepatitis Delta Virus Infection. *J Infect Dis*, 221, 1677-1687.
- MODAHL, L. E. & LAI, M. M. 1998. Transcription of hepatitis delta antigen mRNA continues throughout hepatitis delta virus (HDV) replication: a new model of HDV RNA transcription and replication. *J Virol*, 72, 5449-56.
- MODAHL, L. E. & LAI, M. M. 2000. The large delta antigen of hepatitis delta virus potently inhibits genomic but not antigenomic RNA synthesis: a mechanism enabling initiation of viral replication. *J Virol*, 74, 7375-80.
- MUIR, A. J., ARORA, S., EVERSON, G., FLISIAK, R., GEORGE, J., GHALIB, R., GORDON, S. C., GRAY, T., GREENBLOOM, S., HASSANEIN, T., HILLSON, J., HORGHA, M. A., JACOBSON, I. M., JEFFERS, L., KOWDLEY, K. V., LAWITZ, E., LUETH, S.,

- RODRIGUEZ-TORRES, M., RUSTGI, V., SHEMANSKI, L., SHIFFMAN, M. L., SRINIVASAN, S., VARGAS, H. E., VIERLING, J. M., XU, D., LOPEZ-TALAVERA, J. C. & ZEUZEM, S. 2014. A randomized phase 2b study of peginterferon lambda-1a for the treatment of chronic HCV infection. *J Hepatol*, 61, 1238-46.
- MUIR, A. J., SHIFFMAN, M. L., ZAMAN, A., YOFFE, B., DE LA TORRE, A., FLAMM, S., GORDON, S. C., MAROTTA, P., VIERLING, J. M., LOPEZ-TALAVERA, J. C., BYRNES-BLAKE, K., FONTANA, D., FREEMAN, J., GRAY, T., HAUSMAN, D., HUNDER, N. N. & LAWITZ, E. 2010. Phase 1b study of pegylated interferon lambda 1 with or without ribavirin in patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 52, 822-32.
- MUTZ, P., METZ, P., LEMPP, F. A., BENDER, S., QU, B., SCHÖNEWEIS, K., SEITZ, S., TU, T., RESTUCCIA, A., FRANKISH, J., DÄCHERT, C., SCHUSSER, B., KOSCHNY, R., POLYCHRONIDIS, G., SCHEMMER, P., HOFFMANN, K., BAUMERT, T. F., BINDER, M., URBAN, S. & BARTENSCHLAGER, R. 2018. HBV Bypasses the Innate Immune Response and Does Not Protect HCV From Antiviral Activity of Interferon. *Gastroenterology*, 154, 1791-1804.e22.
- NEUMANN-HAEFELIN, C., TIMM, J., SCHMIDT, J., KERSTING, N., FITZMAURICE, K., ONIANGUE-NDZA, C., KEMPER, M. N., HUMPHREYS, I., MCKIERNAN, S., KELLEHER, D., LOHMANN, V., BOWNESS, P., HUZLY, D., ROSEN, H. R., KIM, A. Y., LAUER, G. M., ALLEN, T. M., BARNES, E., ROGGENDORF, M., BLUM, H. E. & THIMME, R. 2010. Protective effect of human leukocyte antigen B27 in hepatitis C virus infection requires the presence of a genotype-specific immunodominant CD8+ T-cell epitope. *Hepatology*, 51, 54-62.
- NI, Y., LEMPP, F. A., MEHRLE, S., NKONGOLO, S., KAUFMAN, C., FÄLTH, M., STINDT, J., KÖNIGER, C., NASSAL, M., KUBITZ, R., SÜLTMANN, H. & URBAN, S. 2014. Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology*, 146, 1070-83.
- NISINI, R., PAROLI, M., ACCAPEZZATO, D., BONINO, F., ROSINA, F., SANTANTONIO, T., SALLUSTO, F., AMOROSO, A., HOUGHTON, M. & BARNABA, V. 1997. Human CD4+ T-cell response to hepatitis delta virus: identification of multiple epitopes and characterization of T-helper cytokine profiles. *J Virol*, 71, 2241-51.
- NITSCHKE, K., BARRIGA, A., SCHMIDT, J., TIMM, J., VIAZOV, S., KUNTZEN, T., KIM, A. Y., LAUER, G. M., ALLEN, T. M. & GAUDIERI, S. 2014. HLA-B* 27 subtype specificity determines targeting and viral evolution of a hepatitis C virus-specific CD8+ T cell epitope. *Journal of hepatology*, 60, 22-29.

- NKONGOLO, S., HOLLNBERGER, J. & URBAN, S. 2022. [Bulevirtide as the first specific agent against hepatitis D virus infections-mechanism and clinical effect]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 65, 254-263.
- OTTOBRELLI, A., MARZANO, A., SMEDILE, A., RECCHIA, S., SALIZZONI, M., CORNU, C., LAMY, M. E., OTTE, J. B., DE HEMPTINNE, B., GEUBEL, A. & ET AL. 1991. Patterns of hepatitis delta virus reinfection and disease in liver transplantation. *Gastroenterology*, 101, 1649-55.
- PASCARELLA, S. & NEGRO, F. 2011. Hepatitis D virus: an update. *Liver International*, 31, 7-21.
- PIRCHER, H., MOSKOPHIDIS, D., ROHRER, U., BÜRKI, K., HENGARTNER, H. & ZINKERNAGEL, R. M. 1990. Viral escape by selection of cytotoxic T cell-resistant virus variants in vivo. *Nature*, 346, 629-33.
- POLSON, A. G., BASS, B. L. & CASEY, J. L. 1996. RNA editing of hepatitis delta virus antigenome by dsRNA-adenosine deaminase. *Nature*, 380, 454-6.
- PONZETTO, A., COTE, P. J., POPPER, H., HOYER, B. H., LONDON, W. T., FORD, E. C., BONINO, F., PURCELL, R. H. & GERIN, J. L. 1984. Transmission of the hepatitis B virus-associated delta agent to the eastern woodchuck. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 2208-12.
- PONZETTO, A., HOYER, B. H., POPPER, H., ENGLE, R., PURCELL, R. H. & GERIN, J. L. 1987. Titration of the infectivity of hepatitis D virus in chimpanzees. *J Infect Dis*, 155, 72-8.
- REHERMANN, B. & THIMME, R. 2019. Insights From Antiviral Therapy Into Immune Responses to Hepatitis B and C Virus Infection. *Gastroenterology*, 156, 369-383.
- REID, C. E. & LAZINSKI, D. W. 2000. A host-specific function is required for ligation of a wide variety of ribozyme-processed RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 424-9.
- RIZZETTO, M. 2000. Hepatitis D: virology, clinical and epidemiological aspects. *Acta Gastroenterol Belg*, 63, 221-4.
- RIZZETTO, M., CANESE, M. G., ARICÒ, S., CRIVELLI, O., TREPO, C., BONINO, F. & VERME, G. 1977. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut*, 18, 997-1003.
- RIZZETTO, M., CANESE, M. G., GERIN, J. L., LONDON, W. T., SLY, D. L. & PURCELL, R. H. 1980. Transmission of the hepatitis B virus-associated delta antigen to chimpanzees. *J Infect Dis*, 141, 590-602.
- RIZZETTO, M., PONZETTO, A. & FORZANI, I. 1990. Hepatitis delta virus as a global health problem. *Vaccine*, 8, S10-S14.

- RIZZETTO, M., SHIH, J. W., GOCKE, D. J., PURCELL, R. H., VERME, G. & GERIN, J. L. 1979. Incidence and significance of antibodies to delta antigen in hepatitis B virus infection. *Lancet*, 2, 986-90.
- SAHIN, Z., BİCAKÇIĞIL, M., AKSU, K., KAMALI, S., AKAR, S., ONEN, F., KARADAG, O., OZBALKAN, Z., ATES, A., OZER, H. T., YILMAZ, V., SEYAHİ, E., OZTURK, M. A., CEFLE, A., COBANKARA, V., ONAT, A. M., TUNC, E., DÜZGÜN, N., AYDIN, S. Z., YILMAZ, N., FRESKO, İ., KARAASLAN, Y., KIRAZ, S., AKKOC, N., INANC, M., KESER, G., UYAR, F. A., DİRESKENELI, H. & SARUHAN-DİRESKENELI, G. 2012. Takayasu's arteritis is associated with HLA-B*52, but not with HLA-B*51, in Turkey. *Arthritis Res Ther*, 14, R27.
- SALIMI ALIZEI, E., HOFMANN, M., THIMME, R. & NEUMANN-HAEFELIN, C. 2021. Mutational escape from cellular immunity in viral hepatitis: variations on a theme. *Curr Opin Virol*, 50, 110-118.
- SATO, S., CORNILLEZ-TY, C. & LAZINSKI, D. W. 2004. By inhibiting replication, the large hepatitis delta antigen can indirectly regulate amber/W editing and its own expression. *J Virol*, 78, 8120-34.
- SAXENA, N., MISRA, R. & AGGARWAL, A. 2006. Is the enthesitis-related arthritis subtype of juvenile idiopathic arthritis a form of chronic reactive arthritis? *Rheumatology (Oxford)*, 45, 1129-32.
- SCHIRDEWAHN, T., GRABOWSKI, J., OWUSU SEKYERE, S., BREMER, B., WRANKE, A., LUNEMANN, S., SCHLAPHOFF, V., KIRSCHNER, J., HARDTKE, S., MANNS, M. P., CORNBERG, M., WEDEMEYER, H. & SUNEETHA, P. V. 2017. 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*, 215, 139-149.
- SCHMIDT, J., IVERSEN, A. K., TENZER, S., GOSTICK, E., PRICE, D. A., LOHMANN, V., DISTLER, U., BOWNESS, P., SCHILD, H., BLUM, H. E., KLENERMAN, P., NEUMANN-HAEFELIN, C. & THIMME, R. 2012. Rapid antigen processing and presentation of a protective and immunodominant HLA-B*27-restricted hepatitis C virus-specific CD8+ T-cell epitope. *PLoS Pathog*, 8, e1003042.
- SCHNEIDEWIND, A., BROCKMAN, M. A., SIDNEY, J., WANG, Y. E., CHEN, H., SUSCOVICH, T. J., LI, B., ADAM, R. I., ALLGAIER, R. L., MOTHÉ, B. R., KUNTZEN, T., ONIANGUE-NDZA, C., TROCHA, A., YU, X. G., BRANDER, C., SETTE, A., WALKER, B. D. & ALLEN, T. M. 2008. Structural and functional constraints limit options for cytotoxic T-lymphocyte escape in the immunodominant HLA-B27-restricted epitope in human immunodeficiency virus type 1 capsid. *J Virol*, 82, 5594-605.

- SCHULZE, A., GRIPON, P. & URBAN, S. 2007. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology*, 46, 1759-68.
- SCHULZE ZUR WIESCH, J., CIUFFREDA, D., LEWIS-XIMENEZ, L., KASPROWICZ, V., NOLAN, B. E., STREECK, H., ANEJA, J., REYOR, L. L., ALLEN, T. M. & LOHSE, A. W. 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. *Journal of Experimental Medicine*, 209, 61-75.
- SEIFERT, U., LIERMANN, H., RACANELLI, V., HALENIUS, A., WIESE, M., WEDEMEYER, H., RUPPERT, T., RISPETER, K., HENKLEIN, P. & SIJTS, A. 2004. Hepatitis C virus mutation affects proteasomal epitope processing. *The Journal of clinical investigation*, 114, 250-259.
- SETO, W.-K., LO, Y.-R., PAWLOTSKY, J.-M. & YUEN, M.-F. 2018. Chronic hepatitis B virus infection. *The Lancet*, 392, 2313-2324.
- SHOUVAL, D., ILAN, Y., ADLER, R., DEEPEN, R., PANET, A., EVEN-CHEN, Z., GORECKI, M. & GERLICH, W. H. 1994. Improved immunogenicity in mice of a mammalian cell-derived recombinant hepatitis B vaccine containing pre-S1 and pre-S2 antigens as compared with conventional yeast-derived vaccines. *Vaccine*, 12, 1453-9.
- SMEDILE, A., CASEY, J. L., COTE, P. J., DURAZZO, M., LAVEZZO, B., PURCELL, R. H., RIZZETTO, M. & GERIN, J. L. 1998. Hepatitis D viremia following orthotopic liver transplantation involves a typical HDV virion with a hepatitis B surface antigen envelope. *Hepatology*, 27, 1723-9.
- SMEDILE, A., FARCI, P., VERME, G., CAREDDA, F., CARGNEL, A., CAPORASO, N., DENTICO, P., TREPO, C., OPOLON, P., GIMSON, A., VERGANI, D., WILLIAMS, R. & RIZZETTO, M. 1982. Influence of delta infection on severity of hepatitis B. *Lancet*, 2, 945-7.
- SÖDERHOLM, J., AHLEN, G., KAUL, A., FRELIN, L., ALHEIM, M., BARNFIELD, C., LILJESTRÖM, P., WEILAND, O., MILICH, D. R. & BARTENSCHLAGER, R. 2006. Relation between viral fitness and immune escape within the hepatitis C virus protease. *Gut*, 55, 266-274.
- STEPHENSON-TSORIS, S. & CASEY, J. L. 2022. Hepatitis Delta Virus Genome RNA Synthesis Initiates at Position 1646 with a Nontemplated Guanosine. *J Virol*, 96, e0201721.
- STEWART-JONES, G. B., DI GLERIA, K., KOLLNBERGER, S., MCMICHAEL, A. J., JONES, E. Y. & BOWNESS, P. 2005. Crystal structures and KIR3DL1 recognition of three immunodominant viral peptides complexed to HLA-B*2705. *Eur J Immunol*, 35, 341-51.

- STOCKDALE, A. J., KREUELS, B., HENRION, M. Y. R., GIORGI, E., KYOMUHANGI, I., DE MARTEL, C., HUTIN, Y. & GERETTI, A. M. 2020. The global prevalence of hepatitis D virus infection: Systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*, 73, 523-532.
- SUÁREZ-AMARÁN, L., USAI, C., DI SCALA, M., GODOY, C., NI, Y., HOMMEL, M., PALOMO, L., SEGURA, V., OLAGÜE, C., VALES, A., RUIZ-RIPA, A., BUTI, M., SALIDO, E., PRIETO, J., URBAN, S., RODRÍGUEZ-FRIAS, F., ALDABE, R. & GONZÁLEZ-ASEGUINOLAZA, G. 2017. A new HDV mouse model identifies mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) as a key player in IFN- β induction. *J Hepatol*, 67, 669-679.
- SUREAU, C., GUERRA, B. & LANFORD, R. E. 1993. Role of the large hepatitis B virus envelope protein in infectivity of the hepatitis delta virion. *J Virol*, 67, 366-72.
- SUREAU, C., GUERRA, B. & LEE, H. 1994. The middle hepatitis B virus envelope protein is not necessary for infectivity of hepatitis delta virus. *J Virol*, 68, 4063-6.
- SUREAU, C. & NEGRO, F. 2016. The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. *J Hepatol*, 64, S102-s116.
- SUREAU, C. & SALISSE, J. 2013. A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus a-determinant. *Hepatology*, 57, 985-94.
- SUSLOV, A., BOLDANOVA, T., WANG, X., WIELAND, S. & HEIM, M. H. 2018. Hepatitis B Virus Does Not Interfere With Innate Immune Responses in the Human Liver. *Gastroenterology*, 154, 1778-1790.
- TABERNERO, D., CORTESE, M. F., BUTI, M. & RODRIGUEZ-FRIAS, F. 2018. HDV evolution-will viral resistance be an issue in HDV infection? *Curr Opin Virol*, 32, 100-107.
- TAKAHASHI, N., TANABE, K., SUGAMORI, T., SATO, M., KITAMURA, J., SATO, H., YOSHITOMI, H., ISHIBASHI, Y. & SHIMADA, T. 2011. Association between Takayasu arteritis and ulcerative colitis - case report and review of serological HLA analysis. *Med Sci Monit*, 17, Cs81-4.
- TAYLOR, J. M. 2015. Hepatitis D Virus Replication. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 5.
- TEIXEIRA, S. L., DE SÁ, N. B., CAMPOS, D. P., COELHO, A. B., GUIMARÃES, M. L., LEITE, T. C., VELOSO, V. G. & MORGADO, M. G. 2014. Association of the HLA-B*52 allele with non-progression to AIDS in Brazilian HIV-1-infected individuals. *Genes Immun*, 15, 256-62.
- THIMME, R., OLDACH, D., CHANG, K. M., STEIGER, C., RAY, S. C. & CHISARI, F. V. 2001. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med*, 194, 1395-406.

- TIMM, J. & WALKER, C. M. 2015. Mutational escape of CD8+ T cell epitopes: implications for prevention and therapy of persistent hepatitis virus infections. *Med Microbiol Immunol*, 204, 29-38.
- TSAI, M. C., SINGH, S., ADLAND, E. & GOULDER, P. 2020. Impact of HLA-B*52:01-Driven Escape Mutations on Viral Replicative Capacity. *J Virol*, 94.
- URBAN, S., BARTENSCHLAGER, R., KUBITZ, R. & ZOULIM, F. 2014. Strategies to inhibit entry of HBV and HDV into hepatocytes. *Gastroenterology*, 147, 48-64.
- URBAN, S., NEUMANN-HAEFELIN, C. & LAMPERTICO, P. 2021. Hepatitis D virus in 2021: virology, immunology and new treatment approaches for a difficult-to-treat disease. *Gut*, 70, 1782-1794.
- URBANI, S., BONI, C., MISSALE, G., ELIA, G., CAVALLO, C., MASSARI, M., RAIMONDO, G. & FERRARI, C. 2002. Virus-specific CD8+ lymphocytes share the same effector-memory phenotype but exhibit functional differences in acute hepatitis B and C. *J Virol*, 76, 12423-34.
- USMAN, Z., VELKOV, S., PROTZER, U., ROGGENDORF, M., FRISHMAN, D. & KARIMZADEH, H. 2020. HDVdb: A Comprehensive Hepatitis D Virus Database. *Viruses*, 12.
- VAILLANT, A. 2016. Nucleic acid polymers: Broad spectrum antiviral activity, antiviral mechanisms and optimization for the treatment of hepatitis B and hepatitis D infection. *Antiviral Res*, 133, 32-40.
- VAILLANT, A., JUTEAU, J. M., LU, H., LIU, S., LACKMAN-SMITH, C., PTAK, R. & JIANG, S. 2006. Phosphorothioate oligonucleotides inhibit human immunodeficiency virus type 1 fusion by blocking gp41 core formation. *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 1393-401.
- VERRIER, E. R., COLPITTS, C. C., BACH, C., HEYDMANN, L., WEISS, A., RENAUD, M., DURAND, S. C., HABERSETZER, F., DURANTEL, D., ABOU-JAOUDÉ, G., LÓPEZ LEDESMA, M. M., FELMLEE, D. J., SOUMILLON, M., CROONENBORGHES, T., POCHET, N., NASSAL, M., SCHUSTER, C., BRINO, L., SUREAU, C., ZEISEL, M. B. & BAUMERT, T. F. 2016. A targeted functional RNA interference screen uncovers glypican 5 as an entry factor for hepatitis B and D viruses. *Hepatology*, 63, 35-48.
- VIJAYA LAKSHMI, V., RAKH, S. S., ANU RADHA, B., HARI SAI PRIYA, V., PANTULA, V., JASTI, S., SUMAN LATHA, G. & MURTHY, K. J. 2006. Role of HLA-B51 and HLA-B52 in susceptibility to pulmonary tuberculosis. *Infect Genet Evol*, 6, 436-9.
- WALKER, A., SKIBBE, K., STEINMANN, E., PFAENDER, S., KUNTZEN, T., MEGGER, D. A., GROTEN, S., SITEK, B., LAUER, G. M., KIM, A. Y., PIETSCHMANN, T., ALLEN, T. M. & TIMM, J. 2016. Distinct Escape Pathway by Hepatitis C Virus Genotype 1a

- from a Dominant CD8⁺ T Cell Response by Selection of Altered Epitope Processing. *J Virol*, 90, 33-42.
- WANG, J. G., JANSEN, R. W., BROWN, E. A. & LEMON, S. M. 1990. Immunogenic domains of hepatitis delta virus antigen: peptide mapping of epitopes recognized by human and woodchuck antibodies. *J Virol*, 64, 1108-16.
- WANG, J. G. & LEMON, S. M. 1993. Hepatitis delta virus antigen forms dimers and multimeric complexes in vivo. *J Virol*, 67, 446-54.
- WANG, K. S., CHOO, Q. L., WEINER, A. J., OU, J. H., NAJARIAN, R. C., THAYER, R. M., MULLENBACH, G. T., DENNISTON, K. J., GERIN, J. L. & HOUGHTON, M. 1986. Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome. *Nature*, 323, 508-14.
- WEDEMEYER, H., HE, X. S., NASCIMBENI, M., DAVIS, A. R., GREENBERG, H. B., HOOFNAGLE, J. H., LIANG, T. J., ALTER, H. & REHERMANN, B. 2002. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol*, 169, 3447-58.
- WEDEMEYER, H., YURDAYDIN, C., HARDTKE, S., CARUNTU, F. A., CURESCU, M. G., YALCIN, K., AKARCA, U. S., GÜREL, S., ZEUZEM, S., ERHARDT, A., LÜTH, S., PAPANICOLAOU, G. V., KESKIN, O., PORT, K., RADU, M., CELEN, M. K., IDILMAN, R., WEBER, K., STIFT, J., WITTKOP, U., HEIDRICH, B., MEDERACKE, I., VON DER LEYEN, H., DIENES, H. P., CORNBERG, M., KOCH, A. & MANN, M. P. 2019. Peginterferon alfa-2a plus tenofovir disoproxil fumarate for hepatitis D (HIDIT-II): a randomised, placebo controlled, phase 2 trial. *Lancet Infect Dis*, 19, 275-286.
- WEINER, A., ERICKSON, A. L., KANSOPON, J., CRAWFORD, K., MUCHMORE, E., HUGHES, A. L., HOUGHTON, M. & WALKER, C. M. 1995. Persistent hepatitis C virus infection in a chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 2755-9.
- WIELAND, S., THIMME, R., PURCELL, R. H. & CHISARI, F. V. 2004. Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 6669-74.
- WILLBERG, C., BARNES, E. & KLENERMAN, P. 2003. HCV immunology--death and the maiden T cell. *Cell Death Differ*, 10 Suppl 1, S39-47.
- WILLIAMS, V., BRICHLER, S., RADJEF, N., LEBON, P., GOFFARD, A., HOBER, D., FAGARD, R., KREMSDORF, D., DÉNY, P. & GORDIEN, E. 2009. Hepatitis delta virus proteins repress hepatitis B virus enhancers and activate the alpha/beta interferon-inducible MxA gene. *J Gen Virol*, 90, 2759-2767.

- WONG, S. K. & LAZINSKI, D. W. 2002. Replicating hepatitis delta virus RNA is edited in the nucleus by the small form of ADAR1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 15118-23.
- WRANKE, A., HEIDRICH, B., ERNST, S., CALLE SERRANO, B., CARUNTU, F. A., CURESCU, M. G., YALCIN, K., GÜREL, S., ZEUZEM, S., ERHARDT, A., LÜTH, S., PAPTAEODORIDIS, G. V., BREMER, B., STIFT, J., GRABOWSKI, J., KIRSCHNER, J., PORT, K., CORNBERG, M., FALK, C. S., DIENES, H. P., HARDTKE, S., MANNS, M. P., YURDAYDIN, C. & WEDEMEYER, H. 2014. Anti-HDV IgM as a marker of disease activity in hepatitis delta. *PLoS One*, 9, e101002.
- WRANKE, A., SERRANO, B. C., HEIDRICH, B., KIRSCHNER, J., BREMER, B., LEHMANN, P., HARDTKE, S., DETERDING, K., PORT, K., WESTPHAL, M., MANNS, M. P., CORNBERG, M. & WEDEMEYER, H. 2017. Antiviral treatment and liver-related complications in hepatitis delta. *Hepatology*, 65, 414-425.
- YAMAGUCHI, Y., FILIPOVSKA, J., YANO, K., FURUYA, A., INUKAI, N., NARITA, T., WADA, T., SUGIMOTO, S., KONARSKA, M. M. & HANDA, H. 2001. Stimulation of RNA polymerase II elongation by hepatitis delta antigen. *Science*, 293, 124-7.
- YAN, H., ZHONG, G., XU, G., HE, W., JING, Z., GAO, Z., HUANG, Y., QI, Y., PENG, B., WANG, H., FU, L., SONG, M., CHEN, P., GAO, W., REN, B., SUN, Y., CAI, T., FENG, X., SUI, J. & LI, W. 2012. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife*, 1, e00049.
- YURDAYDIN, C., IDILMAN, R., BOZKAYA, H. & BOZDAYI, A. M. 2010. Natural history and treatment of chronic delta hepatitis. *J Viral Hepat*, 17, 749-56.
- ZHANG, Z., FILZMAYER, C., NI, Y., SÜLTMANN, H., MUTZ, P., HIET, M. S., VONDRAN, F. W. R., BARTENSCHLAGER, R. & URBAN, S. 2018. Hepatitis D virus replication is sensed by MDA5 and induces IFN- β/λ responses in hepatocytes. *J Hepatol*, 69, 25-35.
- ZHANG, Z., NI, Y. & URBAN, S. 2019. SAT-202-Endogenous and exogenous IFN responses suppress HDV persistence during proliferation of hepatocytes in vitro. *Journal of Hepatology*, 70, e718-e719.
- ZHANG, Z. & URBAN, S. 2020. Interplay between Hepatitis D Virus and the Interferon Response. *Viruses*, 12, 1334.
- ZHENG, Y., LIU, D., FENG, D., TANG, H., LI, Y. & YOU, X. 1995. An animal study on transmission of hepatitis B virus through mosquitoes. *Chin Med J (Engl)*, 108, 895-7.
- ZIEGLER, S., RUHL, M., TENCKHOFF, H., WIESE, M., HEINEMANN, F. M., HORN, P. A., SPENGLER, U., NEUMANN-HAEFELIN, C., NATTERMANN, J. & TIMM, J. 2013. Susceptibility to chronic hepatitis C virus infection is influenced by sequence differences in immunodominant CD8+ T cell epitopes. *Journal of hepatology*, 58, 24-30.

