

# **Einfluss der viralen Sequenzvariabilität auf die Reaktivität von Hepatitis B Virus-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.

der Fakultät für  
Biologie  
an der  
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Janine Brinkmann

aus Herten

Juni 2018

Für meine Familie

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Virologie der Universität Duisburg-Essen oder an einer anderen gleichwertigen Einrichtung durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Timm
2. Gutachter: Prof. 'in Dr. Wiebke Hansen

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Matthias Gunzer

Tag der mündlichen Prüfung: 26. September 2018

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>1.1. Hepatitis B Infektionen</b>	<b>6</b>
1.1.1. Epidemiologie	6
1.1.2. Diagnose und Einstufung einer HBV-Infektion	7
1.1.3. Präventionsmaßnahmen und Therapiemöglichkeiten	8
1.1.4. Virusaufbau und Lebenszyklus	11
<b>1.2. Immunologie der HBV-Infektion</b>	<b>14</b>
1.2.1. Die Rolle des angeborenen Immunsystems	14
1.2.2. Die Rolle des adaptiven Immunsystems	16
1.2.3. CD8+ T-Zellen in der HBV-Infektion	18
<b>1.3. Ziel und Hypothese</b>	<b>24</b>
<b>2. Patienten und Materialien</b>	<b>25</b>
<b>2.1. Material</b>	<b>25</b>
2.1.1. Antikörper, Dextramere und fluoreszierende Farbstoffe	25
2.1.2. Zelllinien und Bakterien	25
2.1.3. Zellkulturnährmedien, Nährmedien für Bakterienkulturen und Zusätze	26
2.1.4. Chemikalien, Enzyme und Reagenzien	27
2.1.5. Verbrauchsmaterialien	28
2.1.6. Kits	29
2.1.7. Technische Ausstattung	29
2.1.8. Plasmide	30
2.1.9. Primer and Oligonukleotide	30
2.1.10. Peptide	31
2.1.11. Software	34
<b>2.2. Patienten</b>	<b>35</b>
<b>3. Methoden</b>	<b>39</b>
<b>3.1. Zellbiologische Methoden</b>	<b>39</b>
3.1.1. Zelllinien	39
3.1.2. Aufreinigung mononukleärer Zellen des peripheren Bluts (PBMCs)	39
3.1.3. Standardkultivierung von PBMCs	40
<b>3.2. Kreuzreaktivitätsprofile von spezifischen CD8<sup>+</sup> T Zellen</b>	<b>40</b>
3.2.1. Expansion von epitopspezifischen CD8 <sup>+</sup> T Zellen	40
3.2.2. Restimulation der spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	40
3.2.3. Intrazelluläre Zytokinfärbung	41
3.2.4. Durchflusszytometrische Analyse	42
3.2.5. Phänotypische Charakterisierung der HBVcore <sub>18-27</sub> spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	43
<b>3.3. Titration häufig vorkommender HBVcore<sub>18-27</sub> Varianten</b>	<b>43</b>
<b>3.4. HLA-Restriktionsassay</b>	<b>44</b>
<b>3.5. Endogene Prozessierung</b>	<b>45</b>
3.5.1. Generierung von transient HBVcore exprimierende HepG2-Zellen	45
3.5.2. Stabil HBVcore exprimierende HepG2-Zelllinien	49
3.5.3. Prozessierungsassay	49
<b>3.6. Bindungsaffinität</b>	<b>50</b>
3.6.1. <i>In silico</i> Prognose	50
3.6.2. <i>In vitro</i> Bindungsassay	50
3.6.3. Titration von Peptiden	51
<b>3.7. Analyse des Proteasomverdauprofils</b>	<b>51</b>

3.7.1.	<i>In vitro</i> Proteasomverdau und massenspektrometrische Analyse	51
3.7.2.	Analyse des Fragmentprofils	52
<b>3.8.</b>	<b>Sequenzanalysen und HLA-Typisierung</b>	<b>53</b>
<b>3.9.</b>	<b>Statistische Analysen</b>	<b>53</b>
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>54</b>
<b>4.1.</b>	<b>Das HBVcore<sub>18-27</sub> Epitop kann durch verschiedene HLA-Klasse I Moleküle präsentiert werden</b>	<b>54</b>
<b>4.2.</b>	<b>Das HBVcore<sub>18-27</sub> Epitop weist eine hohe Sequenzvariabilität auf</b>	<b>58</b>
<b>4.3.</b>	<b>Individueller Einfluss der Substitutionen auf die Funktionalität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen</b>	<b>60</b>
4.3.1.	Die CD8 <sup>+</sup> T-Zellantwort ist abhängig von dem HBeAg-Status des Patienten	60
4.3.2.	Prototypspezifische CD8 <sup>+</sup> T-Zellen weisen Kreuzreaktivität auf	62
4.3.3.	Phänotypische Unterschiede der CD8 <sup>+</sup> T-Zellen sind minimal und unabhängig von der autologen Virussequenz	70
4.3.4.	Kreuzreaktivität der F24Y-spezifische CD8 <sup>+</sup> T-Zellen ist ebenfalls ausgeprägt	74
<b>4.4.</b>	<b>F24Y-Substitution beeinflusst die endogene Prozessierung des HBVcore<sub>18-27</sub> Epitops</b>	<b>75</b>
4.4.1.	Unterschiede im proteasomalen Verdau des Prototypepitops und der F24Y-Variante	75
4.4.2.	Funktioneller Effekt der endogene Prozessierung der transient exprimierten F24Y-Variante ist schwer darstellbar	77
4.4.3.	F24Y-Variante beeinflusst die endogene Prozessierung in stabil HBVcore exprimierenden HepG2-Zellen	79
<b>4.5.</b>	<b>Identifizierung einer CMVpp65<sub>495-503</sub> Variante mit niedriger T-Zell-Rezeptoravidität</b>	<b>81</b>
4.5.1.	Substitutionen im CMVpp65 <sub>495-503</sub> -Epitop beeinflussen das Kreuzreaktivitätsprofile von spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in Abhängigkeit der Position	82
4.5.2.	Bestimmte Substitutionen reduzieren die Avidität der CMVpp65-spezifischen T-Zell-Rezeptoren	85
4.5.3.	Die Substitutionen beeinflussen die Bindung an das HLA-A*02:01-Molekül in unterschiedlichem Maße	86
4.5.4.	Die Substitutionen P498W und P498S reduzieren die Avidität der T-Zell-Rezeptoren der CD8 <sup>+</sup> T-Zellen deutlich	87
4.5.5.	Die Substitutionen P498W und P498S inhibieren Restimulation nach endogener Prozessierung des Epitops	90
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>91</b>
<b>5.1.</b>	<b>Die untersuchten Substitutionen beeinflussen die Funktionalität der HBVcore<sub>18-27</sub> spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen</b>	<b>92</b>
5.1.1.	Das HBVcore <sub>18-27</sub> Epitops weist eine hohe Sequenzvariabilität auf und kann durch multiple HLA-Allele präsentiert werden	92
5.1.2.	HBVcore <sub>18-27</sub> spezifische CD8 <sup>+</sup> T-Zellen sind breit kreuzreaktiv	94
5.1.3.	HBVcore <sub>18-27</sub> spezifische CD8 <sup>+</sup> T-Zellen unterscheiden sich weder funktionell noch phänotypisch in Abhängigkeit der autologen Sequenz	96
5.1.4.	Die F24Y Substitution – <i>Escape</i> Mutation oder nicht?	98
<b>5.2.</b>	<b>Ist die Prozessierung einer CMVpp65<sub>495-503</sub> Epitopvariante mit niedriger Avidität vergleichbar mit HBVcore<sub>18-27</sub>?</b>	<b>100</b>
5.2.1.	Die Substitutionen P498W und P498S im CMVpp65 <sub>495-503</sub> Epitop reduzieren die Avidität der T-Zell-Rezeptoren	101
<b>5.3.</b>	<b>Fazit und Ausblick</b>	<b>104</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassungen</b>	<b>106</b>
<b>6.1.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>106</b>
<b>6.2.</b>	<b>Summary</b>	<b>108</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>111</b>

<b>8. Abkürzungen</b>	<b>123</b>
<b>9. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>126</b>
<b>10. Tabellenverzeichnis</b>	<b>128</b>
<b>11. Danksagungen</b>	<b>129</b>
<b>12. Lebenslauf</b>	<b>130</b>
<b>13. Publikationen</b>	<b>132</b>
<b>14. Eidstattliche Erklärungen</b>	<b>133</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Hepatitis B Infektionen

### 1.1.1. Epidemiologie

Jährlich können weltweit etwa 887.000 Todesfälle auf eine Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV) zurückgeführt werden (WHO, 2017a). Die meisten dieser Fälle werden durch häufig auftretende Komplikationen wie eine Leberzirrhose, die 20-30% der chronisch Infizierten im Laufe der Zeit entwickeln, oder ein Leberzellkarzinom verursacht. Insgesamt sind ca. 30% aller Leberzirrhose-Fälle auf eine chronische Infektion mit HBV zurückzuführen, im Fall von Leberzellkarzinomen sind es sogar 53% (ECDC, 2016b, von Laer et al., 2017). Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zufolge sind weltweit ca. 257 Millionen Menschen mit dem Virus infiziert, womit HBV-Infektionen zu den häufigsten Infektionserkrankungen zählen und somit von großer sozioökonomischer Bedeutung sind (WHO, 2017a). Im Jahr 2015 entsprach die Anzahl der Infizierten einer Prävalenz von etwa 3,5% der Gesamtbevölkerung (WHO, 2017b). Europaweit wird angenommen, dass sich knapp 4,7 Millionen Individuen in der Bevölkerung befinden, in deren Blut das HBV-Oberflächenantigen (HBsAg-positiv) nachzuweisen ist, was einer Prävalenz von 0,9% entspricht (ECDC, 2016b, von Laer et al., 2017). Deutschland zählt dabei, mit einer Prävalenz von 0,0116% (ECDC, 2016b), ähnlich wie die meisten Westeuropäischen Länder, zu den Niedrigprävalenzregionen.

Das HB Virus wird vor allem durch Kontakt mit Körperflüssigkeiten, wie Blut, Samenflüssigkeit und Vaginalsekret übertragen, wodurch Transmissionen über kontaminierte Blutprodukte und den Gebrauch unzureichend desinfizierter Injektionsnadel begünstigt werden, ebenso wie sexuelle und perinatale Übertragungen. Die Inkubationszeit beträgt zwischen 30 und 180 Tagen, wobei im Mittel nach 45 Tagen Virus im Blut detektiert werden kann (RKI, 2016, WHO, 2017a). In dieser Zeit können Patienten bereits eine Infektionsgefahr für Kontaktpersonen darstellen, wenn die virale DNA-Menge  $10^7$  IU/ml übersteigt (Gerlich et al., 2012, RKI, 2016). Da sich weltweit etwa 65 Millionen Frauen unter den chronisch Infizierten befinden, besteht ein hohes Risiko für Mutter-Kind-Transmissionen, insbesondere im Fall von HBeAg-positiven Frauen (Wong et al., 1984, WHO, 2015, WHO, 2017b). Vor allem in Gebieten mit hoher HBV-Prävalenz, wie beispielsweise in bestimmten Regionen Afrikas, aber auch Teilen Südosteuropas (Prävalenz Rumänien: 3,078%), spielen die perinatale Mutter-Kind-

Übertragung und der Kontakt mit Blut eines infizierten Gleichaltrigen eine große Rolle (Wong et al., 1984, von Laer et al., 2017, Mohr et al., 2017). Dies begünstigt insbesondere chronische Infektionen, da das Alter, in dem eine HBV-Infektion erworben wird, einen starken Einfluss auf den Verlauf hat. Während im Erwachsenenalter mehr als 90% der akuten HBV-Infektionen ausheilen, entwickeln Kinder, die in den ersten fünf Lebensjahren infiziert werden, in 90% der Fälle eine chronische Infektion (von Laer et al., 2017, WHO, 2017a). Der Anteil an sexuell erworbenen oder durch Drogengebrauch übertragenen Neuinfektionen ist in Niedrigprävalenzregionen im Vergleich sehr viel höher als in Hochprävalenzgebieten (von Laer et al., 2017).

### 1.1.2. Diagnose und Einstufung einer HBV-Infektion

Da akute HBV-Infektionen häufig symptomlos verlaufen, wird die Infektion mit dem Virus oft erst im Stadium einer chronischen Infektion, beispielsweise bei der Diagnose einer Leberzirrhose, erkannt. Anhand von klinischen Indikatoren kann eine Hepatitis B meist nicht von einer Hepatitis C unterschieden werden, daher erlauben es vor allem serologische Marker eine Hepatitis B-Infektion korrekt zu diagnostizieren. Die Viruskonzentration gibt zusätzlich Auskunft über die Infektiosität des Patienten. Zudem lassen erhöhte Alanin-Aminotransferase (ALT)-Blutwerte auf eine Inflammation der Leber, die meist Anlass für das Auftreten von Symptomen ist, schließen.

Marker für eine akute HBV-Infektion sind neben einer häufig hohen Viruskonzentration (HBV-DNA-Kopien/ml oder IU/ml), die Präsenz des HBsAg und der sezernierten Form des Kapsidantigens HBeAg, welche mit aktiver viraler Replikation und damit mit einer erhöhten Infektiosität assoziiert ist (Beasley et al., 1983, Liaw, 2009, WHO, 2017c). Darüber hinaus ist unter anderem die Anwesenheit von Immunglobulin-M (IgM) Antikörpern gegen das HBV-Kapsidantigen (HBcAg) ein Hinweis auf eine akute Infektion (Trepo et al., 2014, ECDC, 2016a). Obwohl eine frühe HBeAg-Serokonversion mit einer guten Prognose assoziiert ist (Hsu et al., 2002, Chu and Liaw, 2007, Liaw, 2009), wird eine langfristige Immunität nach Ausheilung jedoch nur durch anti-HBs-Antikörper vermittelt (Trepo et al., 2014). Anti-HBs-Antikörper sind zudem die einzigen, welche durch die HBV-Impfung induziert werden. Im Gegensatz zu Patienten mit einer ausgeheilten HBV-Infektion können entsprechend bei Geimpften keine Antikörper gegen das Kapsidprotein (HBc) detektiert werden (Trepo et al., 2014).

Man spricht von einer chronischen HBV-Infektion, wenn das HBsAg für mehr als sechs Monate im Blut nachgewiesen werden kann. Verschiedene Phasen einer chronischen Infektion können ebenfalls durch die Detektion der HBV-DNA, den HBeAg- und HBsAg-Werten im Serum

sowie Serum-ALT-Werte unterschieden werden. Aktuell wird zwischen fünf Phasen einer chronischen HBV-Infektion differenziert, die jedoch nicht zwingend in der gleichen Abfolge auftreten. HBeAg-positive Patienten, die eine hohe Viruskonzentration aufweisen, werden in Phase 1 und Phase 2 eingruppiert. Diese unterscheiden sich jedoch in der Ausprägung des Leberschadens. Bei niedrigen ALT-Werten spricht man daher von einer HBeAg-positiven chronischen HBV-Infektion (Phase 1), während Phase 2 aufgrund der stärker ausgeprägten Leberinflammation HBeAg-positive chronische Hepatitis B genannt wird (Lampertico et al., 2017). Auch Phase 3 und 4, die beide HBeAg-negative Stadien beschreiben, werden anhand der normwertigen bzw. erhöhten ALT-Konzentrationen differenziert. Phase 5 hingegen, die als HBsAg-negative Phase oder „okkulte HBV-Infektion“ deklariert wird, zeichnet sich durch Abwesenheit des HBsAg im Serum, niedrige ALT-Werte und niedrige bis nicht detektierbare HBV-DNA im Serum aus (Lampertico et al., 2017).

### 1.1.3. Präventionsmaßnahmen und Therapiemöglichkeiten

Auch wenn weltweit noch stets viele Neuinfektionen auftreten, ist die Prävalenz von HBV-Infektionen bei Kindern unter fünf Jahre seit der ersten Einführung eines Hepatitis B Impfstoffs im Jahr 1982 bis 2015 von etwa 4,7% auf ca. 1,3% gefallen (WHO, 2017a, WHO, 2017c). Die Änderungen im Impfverhalten nach der generellen Impfpflicht der WHO von 1992, sowie der Empfehlung der Ständigen Impfkommision (STIKO) des Robert Koch-Instituts von 1995 bereits Säuglinge zu impfen, um so die frühkindlichen Infektionen einzudämmen oder aber diese Impfung bis zum 18. Lebensjahr nachzuholen, wie es auch heute üblich ist (STIKO, 2017), haben maßgeblich dazu beigetragen. Die Säuglingsimpfung war im Jahr 2015 bereits in 185 Ländern gesetzlich implementiert, allerdings wurden tatsächlich nur 84% der Säuglinge mit drei Dosen der jeweiligen HBV-Impfstoffe vollständig immunisiert (WHO, 2017d, WHO, 2017c). Nachdem zu Beginn Plasma von chronisch HBV-Infizierten genutzt und die Pathogene mit verschiedensten Methoden inaktiviert wurden, um HBV-Impfstoffe herzustellen, basieren mittlerweile viele Impfstoffe auf dem rekombinanten HBV-Oberflächenantigen HBsAg, welches sicher und effizient sehr gute Immunantworten induziert (Hartmann and Keller-Stanislawski, 2002). In Deutschland sind heutzutage sowohl monovalente Impfstoffe gegen das Hepatitis B Virus zugelassen, als auch Kombinationsimpfstoffe, die gleichzeitig gegen Hepatitis B und Hepatitis A oder gegen Diphtherie, Tetanus und Pertussis, teilweise sogar zusätzlich gegen Poliomyelitis und Haemophilus influenzae Typ b, schützen (RKI, 2016, Paul-Ehrlich-Institut, 2017). Neben der aktiven Immunisierung existieren auch Impfstoffe, die zu einer passiven Immunisierung führen. Diese werden vor allem in der Prävention einer

perinatalen Infektion in Kombination mit einer aktiven Immunisierung eingesetzt (Beasley et al., 1983, Lee et al., 2007, Gerlich et al., 2012, WHO, 2017c, STIKO, 2017).

Der Impferfolg wird anhand des anti-HBsAg Titers überprüft. Etwa ein bis zwei Monate nach der letzten Impfung sollten im Blut  $\geq 10$  mIU/mL anti-HBs Antikörper nachweisbar sein, um eine langfristige Immunisierung zu garantieren, die nach aktuellen Schätzungen Schutz für 20 Jahre gewährleistet (STIKO, 2017). Auffrischungsimpfungen sind jedoch für darüberhinausgehenden Schutz anzuraten (STIKO, 2017, Pileggi et al., 2017).

Trotz der verfügbaren Impfstoffe und der weltweiten Implementierung der Säuglingsimpfung treten immer noch HBV-Infektionen auf. Insbesondere Infektionen mit chronischem Verlauf bedürfen Therapien, um den Leberschaden gering zu halten und die Progression zu einer Leberzirrhose oder einem Leberzellkarzinom hinauszuzögern oder zu verhindern. Eine anhaltend hohe Viruskonzentration (HBV-DNA  $> 2\,000$  IU/ml) in Kombination mit einer hohen Transaminasekonzentration (ALT  $> \text{ULN}$ ), sowie Anzeichen für moderate Inflammation der Leber oder Fibrosen, aber auch Zirrhosen sind, nach den Behandlungsrichtlinien der Europäischen Vereinigung für Leberstudien (EASL), Indikatoren für den Einsatz einer Therapie (WHO, 2015, Lampertico et al., 2017). Liegt eine Viruskonzentration von mehr als 20 000 IU/ml vor und die Transaminasekonzentration im Blut überschreitet den Normwert mindestens um das Zweifache, sollte ebenfalls mit einer Therapie begonnen werden. Zudem empfiehlt die EASL HBeAg-positive Patienten, die älter als 30 Jahre sind und eine hohe Viruskonzentration aufweisen, zu therapieren. Ebenso wird empfohlen Patienten, deren Anamnese auf eine Suszeptibilität für ein Hepatozelluläres Karzinom (HCC) und Zirrhosen schließen lässt, zu therapieren (Lampertico et al., 2017).

Die derzeit eingesetzten Therapien umfassen Nukleos(t)id-Analoga (NA) und Interferon- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ), insbesondere pegyliertes IFN $\alpha$  (PegIFN $\alpha$ ). Während die Wirkung von PegIFN $\alpha$  neben antiviraler auch immunmodulatorischer Natur ist (Micco et al., 2013, Ferrari, 2015), führen die verfügbaren NA, über die Konkurrenz mit natürlichen Nukleotiden, zur Inhibition der reversen Transkription durch die virale Polymerase (Severini et al., 1995). Vorteile der 48 Wochen andauernden Interferon-Therapie sind die mögliche HBsAg-Serokonversion, sowie in HBeAg-positiven Patienten eine HBeAg-Serokonversion und die begrenzte Therapiedauer. Therapieerfolg wird auch durch eine Reduktion der Viruskonzentration auf  $< 2\,000$  IU/ml sechs Monate nach Therapiebeginn, am Ende der Therapie und 12 Monate nach Therapieende definiert (Lampertico et al., 2017). Die Interferontherapie ist allerdings beispielsweise bei dekompensierter Leberzirrhose kontraindiziert (Janssen et al., 1993). Zudem geht diese Therapie mit starken Nebenwirkungen einher, was die Compliance negativ beeinflusst.

## Einleitung

Zusätzlich treten auch nach Serokonversion Reaktivierungen des Virus und serologische Reversionen auf, sodass erneut die Indikation für eine Therapie gegeben ist. Im Fall von HBeAg-positive Patienten gibt es allerdings auch Bestrebungen, die Therapie vorzeitig nach der HBeAg-Serokonversion abzusetzen und mit einem engmaschigen Screening mögliche Reversionen frühzeitig zu erkennen, sodass die Therapie bei Bedarf wieder eingesetzt werden kann (Liaw, 2009).

In Deutschland sind für die Therapie einer HBV-Infektion die NA Lamivudine, Adefovir dipivoxil, Entecavir, Telbivudin, Tenofovir disoproxil fumarat und Tenofoviralfenamid zugelassen. Auch wenn NA im Gegensatz zu Interferonen mit weniger Nebenwirkungen für den Patienten verbunden sind, stellt das Auftreten von Resistenzen ein Problem für die Behandlung dar. Entecavir und Tenofovir konnten bislang nur mit wenigen Resistenzen assoziiert werden und sind daher die erste Wahl bei einer Therapie mit NA. Allerdings ermöglicht auch diese Therapiemöglichkeit keine funktionelle Heilung der HBV-Infektion, da NA zwar die Virusreplikation unterdrücken, die Menge viraler DNA im Zellkern durch sie in der Regel nicht beeinflusst wird. Daher muss diese Form der Therapie ein Leben lang fortgesetzt werden, um die Virusreplikation zu kontrollieren. Für bestimmte Szenarien empfiehlt die EASL auch bei NA die Therapie abzusetzen, allerdings nur, wenn die Möglichkeit zu engmaschigem Monitoring gegeben ist (Lampertico et al., 2017).

Zurzeit gibt es jedoch Bestrebungen über andere therapeutische Ansätze die Therapiedauer zu verkürzen und dabei gleichzeitig Rezidive zu verhindern. Ein Aspekt dieser Anstrengungen zielt auf die Wiederherstellung der T-Zellantworten ab, da diese im Verlauf einer akuten HBV-Infektion maßgeblich an der Ausheilung beteiligt sind und prinzipiell in der Lage sind, infizierte Zellen zu erkennen und über zytotoxische Effektorfunktionen zu eliminieren. Dabei wird einerseits die Entwicklung von therapeutischen Impfstoffen, die die T-Zellantworten auch in Patienten mit chronischer HBV-Infektion wieder induzieren sollen, verfolgt. Hierfür gab es bereits experimentelle Impfstoffe, die auf subviralen Partikeln basieren, aber auch DNA-Vakzine, die für Hüllproteine des HBV kodieren (Vandepapelière et al., 2007, Godon et al., 2014, Kosinska et al., 2017). Die Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass weder die alleinige Induktion von T-Zellantworten, noch die Induktion von anti-HBsAg-spezifischen Antikörpern zum Erfolg führt. Andererseits gibt es auch den Ansatz T-Zellen *ex vivo* zu modifizieren und so über adoptiven T-Zelltransfer wieder funktionelle, viruskontrollierende T-Zellen einzubringen. Diese sollen daraufhin die Effektorfunktionen ausüben, die in einer akuten HBV-Infektion zur Ausheilung führen. Die Transduktion von HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren ermöglicht es beispielsweise ursprünglich nicht HBV-spezifischen T-Zellen

Zytotoxizität gegenüber Zellen auszuüben, die HBV Epitope endogen prozessieren und präsentieren (Wisskirchen et al., 2017).

### 1.1.4. Virusaufbau und Lebenszyklus

Das behüllte Hepatitis B Virus gehört als eines der kleinsten DNA-Viren überhaupt zur Familie der *Hepadnaviridae*. Das Virion, welches nur durchschnittlich 43 nm misst, besteht aus einer Hülle mit den kleinen (S), mittleren (M) und großen (L) Hüllproteinen, sowie dem ikosaederförmigen Kapsid, welches das Genom umschließt (Abbildung 1.1b). Sein Tropismus ist, ebenso wie bei den anderen Vertretern dieser Familie, wie beispielsweise dem Murmeltier HB-Virus (WHBV), sehr eingeschränkt, sodass es ausschließlich humane Hepatozyten und Hepatozyten anderer Primaten infizieren kann. Als essentieller Rezeptor für die Virusbindung und den Eintritt in die Zelle wurde das Natriumtaurocholat Kotransportpolypeptids (NTCP) identifiziert (Yan et al., 2012, Iwamoto et al., 2014, Ni et al., 2014)

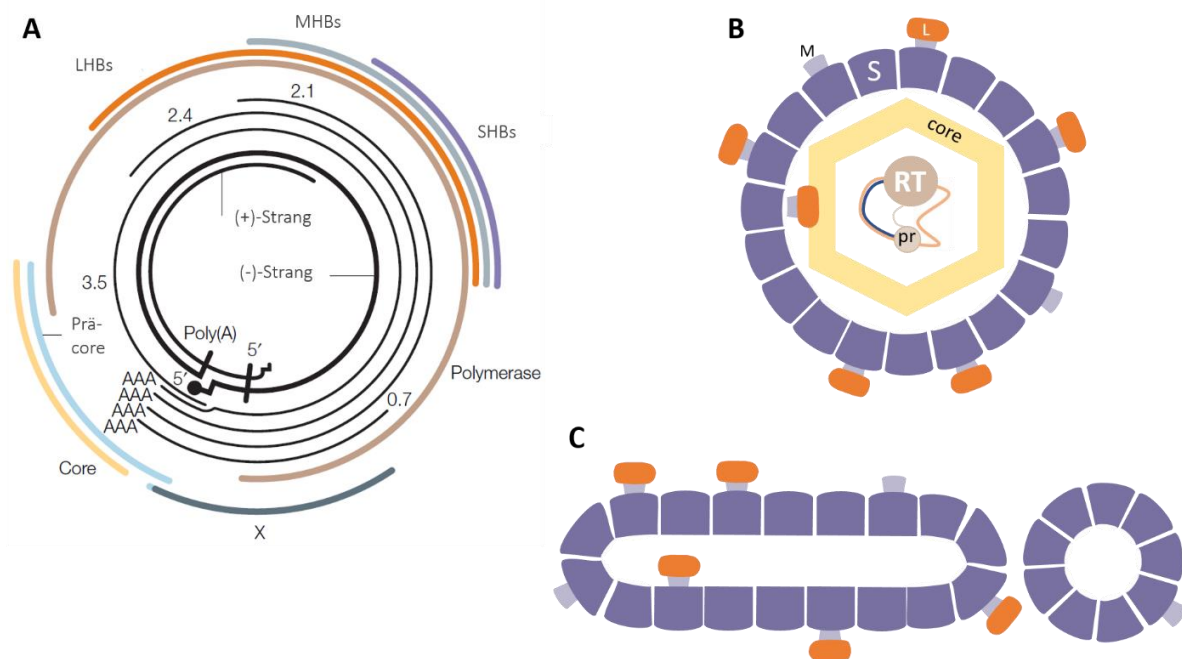
Im Virion liegt das nur 3,2 Kilobasen (kB) lange Genom als partiell geschlossene, relaxierte zirkuläre DNA (rcDNA) vor (Robinson et al., 1974). Nach der Infektion der Hepatozyten wird diese rcDNA im Nukleoplasma der Zelle kovalent geschlossen und liegt dann als sogenannte kovalent geschlossene zirkuläre DNA (cccDNA) vor, die als Matrize für verschiedene RNA-Transkripte dient. Vom Negativstrang der cccDNA werden vier RNAs (0,7 kB, 2,1 kB, 2,4 kB und 3,5 kB) abgeschrieben, die N-terminal alle mit dem gleichen Polyadenylierungsmotiv enden. In überlappenden offenen Leserahmen (ORF) werden im Genom insgesamt sieben Proteine kodiert (Abbildung 1.1a). Die 3,5 kB lange RNA dient dabei zum einen als Matrize für die Translation der Polymerase, fungiert zum anderen aber auch als prä-genomische RNA (pgRNA). Gebunden an das Kapsidprotein (HBc) wird diese im Zytoplasma in neugeformte Viruspartikel, auch Dane-Partikel genannt, verpackt (Dane et al., 1970, Hruska et al., 1977). Die Polymerase, die unter anderem die Funktion einer Reversen Transkriptase erfüllt, ist ebenfalls an die pgRNA gebunden, sodass diese in der Entwicklung der Virionen in rcDNA umgeschrieben werden kann (Abbildung 1.2). Darüber hinaus kodiert die 3,5 kB lange RNA, ausgehend von einem alternativen Start-Codon, auch das Kapsidprotein HBc selbst, sowie das Prä-Kapsidprotein (HBeAg), welches die sezernierte Form des Kapsidproteins darstellt (Abbildung 1.1).

Nach Verpackung der Polymerase-gebundene pgRNA in das Kapsid wird dieses von den in der Membran des endoplasmatischen Retikulums aggregierten Hüllproteinen umschlossen. Die so geformten Virionen können schließlich über das ER und den Golgi-Apparat aus der Zelle geschleust werden (Abbildung 1.2). Die drei Hüllproteine LHBs, auch PräS1 genannt, MHBs, auch PräS2 genannt, und SHBs, welches das eigentliche HBs-Antigen darstellt, werden von

## Einleitung

den 2,4 kB und 2,1 kB langen RNAs translatiert. Da die Hüllproteine, insbesondere das SHBs, im Überschuss gebildet werden, formen sich nicht nur vollständige Viruspartikel, sondern auch leere subvirale Hüllpartikel (SVP). Diese können in sphärischer oder filamentöser Form sezerniert werden (Abbildung 1.1c). Da die SVP den Anteil der infektiösen Virionen um mehr als das Hundertfache übersteigen, gibt der Nachweis des HBsAg im Blut eines Patienten vor allem Aufschluss über die Anwesenheit dieser (Mauss, Dandri 2012).

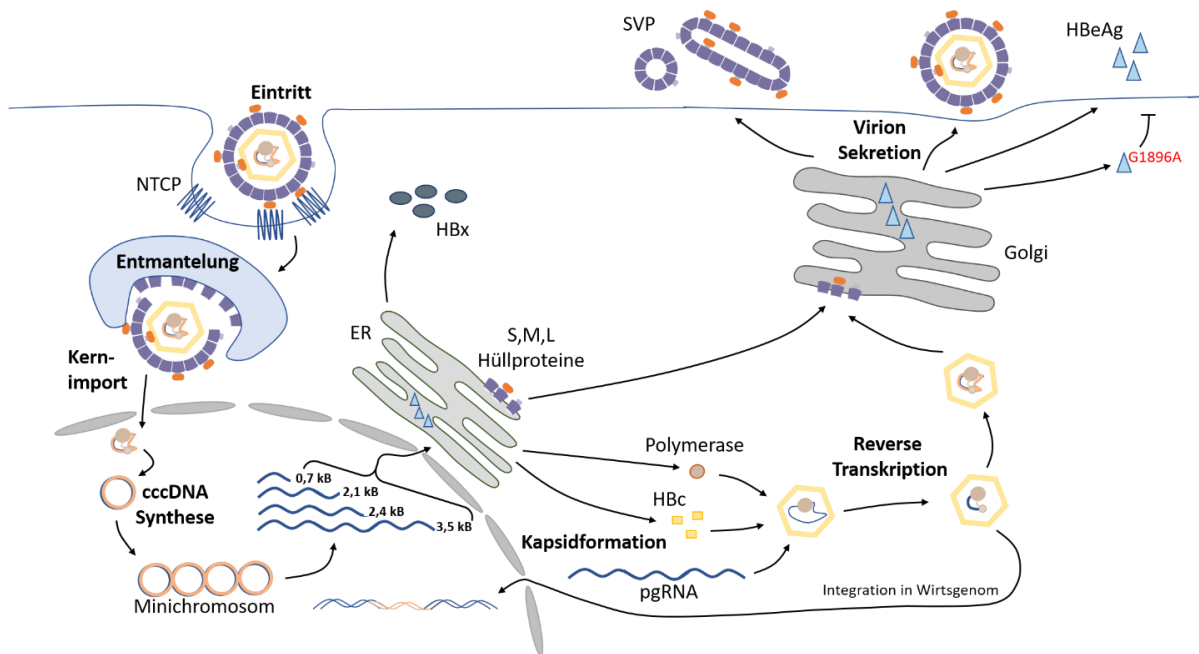
Von der kürzesten gebildeten RNA (0,7 kB) wird das regulatorische HBx-Protein translatiert, welches eine zentrale Rolle in der Infektion und Replikation spielen soll (Zoulim et al., 1994, Lucifora et al., 2011, Decorsière et al., 2016). Da die Abscheidung neuer Hepatitis B Viruspartikel nicht zur Lyse der Zelle führt und die cccDNA im Zellkern verbleibt, repräsentieren infizierte Hepatozyten ein Reservoir für neue Virusgenerationen. Dies stellt eine Herausforderung für die Entwicklung neuer HBV-Therapien dar, da es noch nicht möglich ist diese cccDNA in Patienten zu eliminieren (Lucifora et al., 2014, Nassal, 2015, Schinazi et al., 2018). Darüber hinaus kann das virale Genom in das Wirtsgenom integrieren, was der Auslöser



**Abbildung 1.1 – Genomstruktur und Struktur des Hepatitis B Viruspartikels**

In Abbildung A ist die Genomstruktur des Hepatitis B Virus dargestellt. Zu sehen sind die 3,2 kB lange rcDNA (dicke, schwarze Linien), gekoppelt an die Polymerase mit Funktion einer Reversen Transkriptase (dicker, schwarzer Punkt), die vier 0,7 kB, 2,1 kB, 2,4 kB und 3,5 kB langen RNA-Produkte der offenen Leserahmen (ORF) (dünne, schwarze Linien) und die Proteine, die von den jeweiligen Transkriptionsprodukten durch Nutzung verschiedener Startkodons, translatiert werden (farbige Linien). Adaptiert von (Rehermann and Nascimbeni, 2005). Abbildung B zeigt ein vollständiges, infektiöses Viruspartikel, während in Abbildung C die Formen der leeren subviralen Partikel, als filamentöse und sphärische Partikel, gezeigt sind. Adaptiert von (Mauss et al., 2017). LHBs (L, PräS1) = großes Hüllprotein, MHBs (M, PräS2) = mittleres Hüllprotein, SHBs (S oder HBsAg) = kleines Hüllprotein, RT = Polymerase mit Funktion einer Reversen Transkriptase, Core = Kapsidprotein, Prä-Core = HBeAg, die sezernierte Form des Kapsidproteins, Poly(A) = Polyadenylierungsmotiv, X = HBx-Protein.

für die Transformation der Hepatozyten sein könnte und so letztlich die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms induzieren könnte (Tu et al., 2015, Tu et al., 2017). Wenn die infizierte Zelle nicht im Verlauf einer Immunreaktion, beispielsweise durch zytotoxische T-Zellen (CTL), eliminiert wird, können daher auch Jahre später Virionen ausgeschieden werden.



**Abbildung 1.2 – Lebenszyklus des Hepatitis B Virus**

Nach Bindung des Virus an den Eintrittsrezeptor NTCP wird das Kapsid entmantelt und die rcDNA kann in den Nucleus transportiert werden. Dort wird die rcDNA kovalent geschlossen und liegt fortan als cccDNA bzw. Minichromosom im Nucleus vor und dient als Matrize für die Transkription von vier viralen RNAs. Das Kapsidprotein formt im Zytosol ein Icosaheder-förmiges Kapsid in das die pgRNA gebunden und die virale Polymerase geladen wird. Innerhalb des Kapsids findet die reverse Transkription der pgRNA statt, sodass schließlich wieder rcDNA vorliegt. Nach der Umhüllung des Kapsids von, in der ER-Membran aggregierten, Hüllproteinen wird das infektiöse Virion sezerniert. Zusätzlich können SVP und das HBe-Antigen von der Zelle ausgeschieden werden. Liegt im Genom die Substitution G1896A vor, unterbindet dies die Sezernierung des HBeAg. NTCP = Natriumtaurocholat Kotransportpolypeptid, ER = endoplasmatisches Retikulum, HBx = X-Protein, HBc = Kapsidprotein (HBVcore), pgRNA = prä-genomische RNA, HBeAg = sezernierte Form des Kapsidproteins, S,M,L-Hüllproteine = kleines (HBs), mittleres und großes Hüllprotein. Adaptiert von (Rehermann and Nascimbeni, 2005, Kim et al., 2016, Revill and Locarnini, 2016)

### 1.1.4.1. Sequenzvariabilität

Aufgrund der fehlenden Korrekturfunktion der viralen Polymerase während der reversen Transkription, kommt es immer wieder zu Mutationen im Genom des Virus. Der Einbau eines falschen Nukleotids kommt dabei *in vitro*  $6,28 \times 10^{-4}$  so häufig vor, wie der Einbau des korrekten Nukleotids (Park et al., 2003). Die Substitutionsrate soll dabei in einer HBeAg-negativen chronischen Hepatitis B sogar deutlich höher sein, als in Patienten mit einer HBeAg-positiven CHB (Tedder et al., 2013). Die langfristige Mutationsrate rangiert in unterschiedlichen Publikationen von  $7,9 \times 10^{-5}$  bis zu  $\sim 10^{-4}$  Substitutionen pro Genomposition

pro Jahr (*substitution/site/year*) (Okamoto et al., 1987, Orito et al., 1989, Osiowy et al., 2006, Littlejohn et al., 2016). Der Austausch von Nukleotiden kann in der *in vivo*-Situation jedoch immense Folgen für das Virus haben, da Substitutionen zu einem massiven Fitnessverlust, wenn nicht sogar zur absoluten Replikationsunfähigkeit führen können. Die tatsächlich aufzufindende Fehlerrate dürfte daher durch die negative Selektion darunterliegen (Tedder et al., 2013), führt aber dennoch zu der Entwicklung einer sogenannten Quasispezies von verschiedenen, aber phylogenetisch eng verwandten, Virusvarianten wie es auch in anderen viralen Infektionen, wie beispielsweise bei der Hepatitis C beschrieben ist (Domingo and Gomez, 2007). Für die Entstehung des humanen HBV werden zoonotische Transmission als Quelle diskutiert (Suh et al., 2013, Zhang et al., 2016). Hierbei werden auch wiederholte Transmission von nicht-humanen Primaten auf die Vorfahren des Homo sapiens und *vice versa* angeführt (Locarnini et al., 2013, Paraskevis et al., 2013). Als Resultat dieser Variationsmöglichkeiten sind mittlerweile weltweit zehn verschiedene HBV-Genotypen zu finden (A-J), die teilweise noch in Subgenotypen unterteilt werden (Norder et al., 2004, Locarnini et al., 2013). Während die Genotypen A und D gehäuft in der kaukasischen bzw. afrikanischen Bevölkerung zu finden sind, verteilen sich die Genotypen B und C beispielsweise auffällig häufig im asiatischen Raum (Orito et al., 2001, Norder et al., 2004). Die Varianz zwischen den Genotypen kann dabei mehr als 8% der Virussequenz betragen (Okamoto et al., 1988, Norder et al., 1994). Die hohe Mutationsrate hat jedoch nicht nur Einfluss auf die Entwicklung von Subtypen und die Quasispezies eines Patienten, sie birgt auch durch das Auftreten von Resistenzmutationen Probleme für die HBV-Therapie. Insbesondere die Behandlung mit den NA Adefovir und Lamivudin sind mit dem Auftreten von Resistenzmutationen assoziiert (Fung et al., 2006, WHO, 2015, Lampertico et al., 2017).

## 1.2. Immunologie der HBV-Infektion

### 1.2.1. Die Rolle des angeborenen Immunsystems

Über die Rolle von Typ I Interferonen im Hinblick auf den Verlauf einer HBV-Infektion besteht bislang kein einheitliches Bild. Einerseits konnte in Experimenten mit Murmeltieren, die allerdings mit sehr hohen Infektionsdosen des Virus infiziert worden sind, sehr zeitnah nach der Infektion eine erhöhte Expression von typischen Interferon-stimulierten Genen (ISG) in der Leber festgestellt werden (Guy et al., 2008, Fletcher et al., 2012). Andererseits deuten Ergebnisse aus Experimenten an Schimpansen darauf hin, dass in der frühen Phase einer HBV-Infektion die Interferon-induzierten Effektorfunktionen des angeborenen Immunsystems nicht

## Einleitung

aktiviert werden (Wieland et al., 2004). Dies wird durch Beobachtungen in infizierten Patienten vor der klinischen Manifestation einer HBV-Infektion untermauert. Proinflammatorische Zytokine, wie Typ I Interferone und Interleukin (IL)-15, konnten im Serum dieser Patienten nur in geringem Maße detektiert werden, während das antiinflammatorische Zytokin IL-10 in hoher Konzentration vorzufinden war (Dunn et al., 2009). Hohe IL-10 Konzentrationen konnten auch mit einer transienten Inhibition der Natürlichen Killerzellen (NK), einer der zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems, in Verbindung gebracht werden (Dunn et al., 2009). Diese steht in direkter Korrelation zur Viruskonzentration. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass die Inhibition der NK-Zellen durch die Reduktion der Viruskonzentration umkehrbar ist (Tjwa et al., 2011). Der Anstieg der IL-10 Konzentration korreliert sowohl in der akuten HBV-Infektion, als auch in Hepatitis-schüben einer chronischen Hepatitis B Infektion mit der steigenden Viruskonzentration (Das et al., 2012). Daher wird davon ausgegangen, dass das Virus das Immunsystem zu seinem Vorteil modulieren kann. Beschrieben ist dies auch im Hinblick auf einige Pathogen erkennenden Rezeptoren (PRR) des angeborenen Immunsystems. HBV kann beispielsweise die Signalkaskaden des Toll-like Rezeptor 3 (TLR-3) und *retinoic acid inducible gene I* (RIG-1)/Melanom-Differenzierungsantigen 5 (MDA-5) in Hepatozyten aktiv hemmen (Luangsay et al., 2015).

In Patienten mit chronischer Hepatitis B scheint die nicht-zytolytische Funktionalität der NK-Zellen ebenfalls beeinträchtigt zu sein, da sie laut Peppia *et al.* sowie Tjwa *et al.* Zytokine wie beispielsweise IFN $\gamma$  nicht produzieren können (Peppia et al., 2010, Tjwa et al., 2011). Dies soll allerdings nicht für die kontaktabhängigen zytotoxischen Effektorfunktionen der NK-Zellen gelten, da gezeigt werden konnte, dass sie in einer chronischen Hepatitis B T-Zellantworten modulieren (Peppia et al., 2013). Dies geschieht über die Induktion der Apoptose von T-Zellen und Hepatozyten, weshalb die NK-Zellen auf diese Weise zum einen das Virusreservoir verringern können, zum anderen aber für einen Teil des entstehenden Leberschadens verantwortlich sind (Peppia et al., 2013). Es gibt jedoch auch Indizien dafür, dass in einer chronischen Hepatitis B die zytolytischen Effektorfunktionen der NK-Zellen nicht aktiviert werden können. Dendritische Zellen (DC), eine weitere Komponente des angeborenen Immunsystems, scheinen in chronischer Hepatitis B nämlich nicht funktionell zu sein und die NK-Zellen nicht aktivieren zu können (Martinet et al., 2012). Auslöser dieser Modulation scheint zumindest in *ex vivo* Experimenten das HBsAg zu sein, was ferner die IFN $\gamma$ -Produktion der DC und die Induktion von regulatorischen T-Zellen durch die DC beeinflusst (Hong and Gong, 2008, Vincent et al., 2011, Woltman et al., 2011).

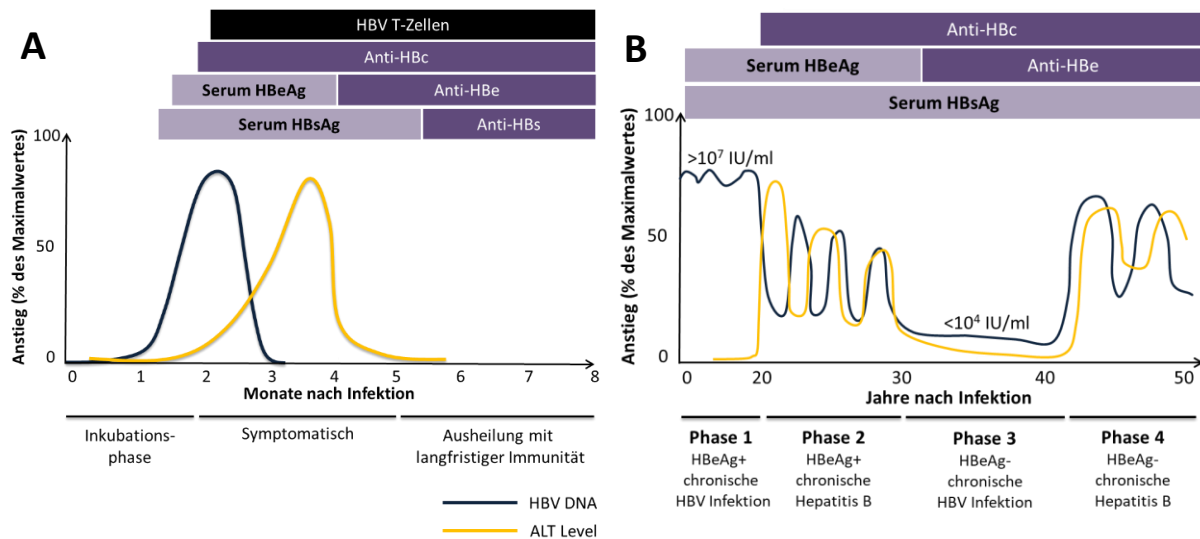
### 1.2.2. Die Rolle des adaptiven Immunsystems

Eine wichtige Rolle für den Verlauf einer HBV-Infektion wird dem adaptiven Immunsystem, insbesondere HBV-spezifischen T- aber auch Antikörper produzierenden B-Zellen, zugesprochen. Ob eine HBV-Infektion nach einer akuten Phase ausheilt oder einen chronischen Verlauf nimmt wird maßgeblich durch die An-oder Abwesenheit von reaktiven, HBV-spezifischen T-Zellen und Antikörpern bestimmt. Eine akute Infektion ist dadurch gekennzeichnet, dass zunächst neben einer hohen Viruskonzentration zwar anti-HBc Antikörper im Serum eines infizierten Patienten detektiert werden können, etwas sechs bis acht Wochen nach der Infektion jedoch auch HBV-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Erscheinung treten (Abbildung 1.3a) (Webster et al., 2000). Erst diese führen durch direkte und indirekte antivirale Effektormechanismen zur Hemmung der Virusreplikation und dadurch zum Abfall der nachweisbaren Menge HBV-DNA im Serum und bestenfalls zur Eliminierung des Virus im Patienten (Thimme et al., 2003, Rehermann, 2013). Dabei sind einerseits die klassischen Funktionen von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) nämlich die direkte Eliminierung der infizierten Zellen durch die Ausschüttung der lytischen Enzyme Perforin und Granzym, sowie die Fas-/Fas-Ligand induzierte Apoptose der infizierten Hepatozyten von großer Bedeutung. Zum anderen spielen aber auch durch IFN $\gamma$  und den Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) induzierte Mechanismen eine direkte Rolle bei der Reduktion der Genexpression und Replikation des HB Virus (Guidotti et al., 1996). Die Expansion HBV-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen korreliert jedoch durch ihre zytotoxische Wirkung in der Leber auch mit dem Anstieg der ALT und kann so zu einem symptomatischen Verlauf führen. CD4<sup>+</sup> T-Zellen nehmen in diesem Zusammenhang eher eine regulierende Rolle ein. Allerdings können ihre Funktion und Frequenz auch mit der Eliminierung des Virus korreliert werden (Penna et al., 1996). Insbesondere CD4<sup>+</sup> T-Zellantworten gegen das Kapsidprotein spielen hierbei eine Rolle (Ferrari et al., 1991, Rossol et al., 1997, Bertoletti and Gehring, 2006). Die Rolle der CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort wird ferner dadurch untermauert, dass Mäuse mit einer CD4<sup>+</sup> T-Zelldefizienz die Transkription der HBV kodierenden Sequenzen eines HBV-Transkriptionsplasmids im Gegensatz zu Mäusen mit einer B-Zelldefizienz nicht unterbinden konnten (Yang et al., 2010). Im weiteren Verlauf sinkt die Frequenz virusspezifischer T-Zellen, die während der akuten Phasen bis zu 3% der gesamten T-Zellpopulation ausmachen können, wieder auf maximal 0,3% der T-Zellen (Boettler et al., 2006). Diese Zellen verbleiben im Patienten und formen ein Repertoire an Gedächtniszellen, das nach Ausheilung reaktiviert werden kann (Rehermann et al., 1996, Penna et al., 1996), allerdings gibt es Hinweise, dass die Frequenz dieser mit der Zeit abnimmt (Kefalakes et al., 2015b). Zusätzlich kommt es dank HBV-spezifischer B-Zellen zur HBeAg- und HBsAg-Serokonversion (Abbildung 1.3a). Diese führt zu langfristiger Immunität, da speziell die im

## Einleitung

Laufe einer akuten HBV-Infektion entstehenden anti-HBs-Antikörper die zwei Domänen des HBV-Hüllproteins blockieren können, die nachweislich für die Bindung an den Eintrittsrezeptor NTCP bzw. an andere Oberflächenmolekülen der Hepatozyten notwendig sind. Durch diese Blockade können sie die Infektion weiterer Hepatozyten verhindern (Ryu et al., 1997, Glebe et al., 2003).

Im Gegensatz dazu nimmt eine chronische HBV-Infektion selten einen solch stringenten Verlauf, sondern wird durch unterschiedliche Phasen charakterisiert, in denen entweder das Virus oder das Immunsystem dominiert (Abbildung 1.3b). In der HBeAg-positiven chronischen HBV-Infektion, die vor allem bei perinatalen Infektionen Jahrzehnte andauern kann, gelingt es den Immunzellen nicht infizierte Hepatozyten zu eliminieren oder die Replikation einzudämmen. Daher bleibt der Patient ohne Therapie virämisch, ohne dass Leberschaden auftritt. Geht diese Phase in einen Hepatitis Schub über, werden wieder CD8<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert, die infizierte Hepatozyten in der Leber detektieren und so über ihre direkten und indirekten Effektormechanismen das Virus partiell kontrollieren können. Die so ausgelösten Immunreaktionen können allerdings zu Leberschaden, im schlimmsten Fall zu Nekrosen führen, die das Einwandern von weiteren CD8<sup>+</sup> T-Zellen und anderer Immunzellen in die Leber bei einer weiteren Reaktivierung des Virus verhindern können (Guidotti et al., 2015, Bertoletti and Ferrari, 2016). Dagegenwirkend werden teils von B-Zellen, teils von regulatorischen T-Zellen (Treg) antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 gebildet (Das et al., 2012). Der Anteil von Treg an mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMCs) in Patienten mit einer chronischen Hepatitis B Infektion ist folglich höher, als in Patienten mit ausgeheilten HBV-Infektion. Zudem scheinen die Tregs die Proliferation anderer HBcAg-spezifischer Zellen zu unterdrücken (Stoop et al., 2005). Im Verlauf einer chronischen HBV-Infektion sind CD8<sup>+</sup> T-Zellen jedoch häufig mit einem erschöpften Phänotyp assoziiert, welcher sich dadurch auszeichnet, dass diese keine Effektorfunktionen mehr ausüben können und die Virusreplikation somit nicht eindämmen (Bertoletti and Gehring, 2006, Bengsch et al., 2014).



**Abbildung 1.3 – Immunkinetik während einer HBV-Infektion**

Das adaptive Immunsystem ist im Verlauf einer akuten HBV-Infektion (A) maßgeblich an der Ausheilung beteiligt. Einige Wochen nach der Infektion beginnt die Produktion von anti-HBc-spezifischen Antikörpern, gefolgt von HBV-spezifischen T-Zellen, insbesondere  $CD8^+$  T-Zellen spielen hierbei eine Rolle. Diese zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) führen zur aktiven Eliminierung infizierter Hepatozyten und somit letztlich zur Reduzierung des Virusreservoirs. Zuletzt treten anti-HBs-spezifische Antikörper auf, die an freie Virionen und SVP binden können, wodurch wiederum die  $CD4^+$  T-Helferzellen aktiviert werden. Die HBs-Serokonversion führt letztlich zur Etablierung HBV-spezifischer Gedächtniszellen. Eine chronische HBV-Infektion (B) ist gekennzeichnet durch unterschiedlichen Phasen, von denen sich einige durch die Präsenz des HBeAg im Serum auszeichnen und in eine immuntolerante reine Infektionsphase Phase 1 ohne Leberschaden und in eine immunaktive Phase 2 mit Hepatitissschüben unterteilen lassen. Ebenso lassen sich HBeAg-negative Phasen in eine reine niedrigreplikative Infektionsphase Phase 3 und in eine Phase mit starker Virusreplikation und Symptomen einer Hepatitis B (Phase 4). Die HBsAg-negative „okkulte HBV-Infektion“ (Phase 5) ist nicht dargestellt. Serokonversionen treten häufig erst Jahre nach der initialen Infektion auf. Allerdings vermittelt beispielsweise die HBc-Serokonversion keine Kontrolle über die Virusreplikation. Adaptiert von (Rehermann and Nascimbeni, 2005, Bertoletti and Ferrari, 2016).

### 1.2.3. $CD8^+$ T-Zellen in der HBV-Infektion

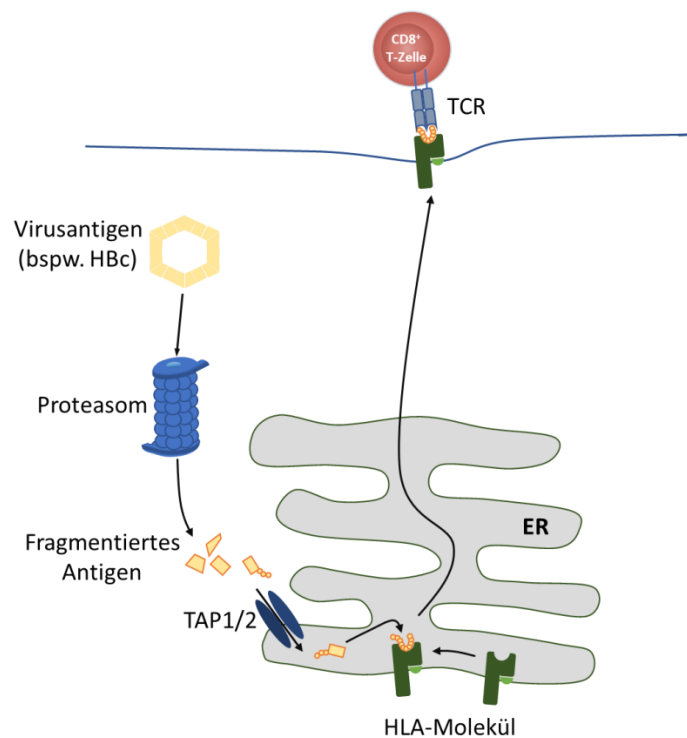
#### 1.2.3.1. Antigen-Präsentation und T-Zell-Rezeptor Entwicklung

Um die Effektorfunktionen spezifisch ausüben zu können, müssen  $CD8^+$  T-Zellen infizierte Zellen zunächst von nicht-infizierten Zellen differenzieren können. Dies geschieht über die Erkennung von viralen Epitopen, fragmentierte Proteine des Pathogens, die gebunden an ein Humanes Leukozyten Antigen (HLA)-Molekül an der Zelloberfläche der infizierten Zelle präsentiert werden. Der T-Zell-Rezeptor (TCR) einer  $CD8^+$  T-Zelle ist darauf spezialisiert an spezifische HLA:Peptid-Komplex-Kombinationen zu binden. Diese HLA:Peptid:TCR-Bindung induziert Signalkaskaden, die letztlich entweder zur Degranulierung der  $CD8^+$  T-Zelle führen oder zur Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie  $IFN\gamma$  oder  $TNF\alpha$  (Wange and Samelson, 1996, Guy and Vignali, 2009). Vor allem acht bis maximal 14 Aminosäuren lange Peptide, die im Komplex mit HLA-A, HLA-B oder HLA-C-Molekülen vorliegen, können von  $CD8^+$  T-Zellen erkannt werden. Diese HLA-Typen gehören zu den Hauptkompatibilitätskomplex (MHC) Klasse I Molekülen und präsentieren vor allem

## Einleitung

zytosolische Peptide, die über die endogene Prozessierung fragmentiert wurden. Über sogenannte Kreuzpräsentation können auch Antigene prozessiert und im Kontext von HLA-Klasse I präsentiert werden, die über Endozytose ins Endolysosom aufgenommen wurden und üblicherweise im Kontext von HLA-Klasse II präsentiert werden (Endert, 2016).

Während der endogenen Prozessierung werden die im Zytoplasma der Zelle vorliegenden Proteine oder Peptide, wie beispielsweise das HBV-Kapsidprotein, aber auch jedes zelleigene Peptid, durch das Proteasom in kleinere Peptidfragmente gespalten (Abbildung 1.4). Die so verdauten Peptide werden durch das ER-assoziierte Transportmolekül TAP (*transporter associated with antigen processing*) ins ER geschleust. Die generierten Peptide werden anschließend auf die in der ER-Membran lokalisierten HLA-Moleküle geladen und stabilisieren diese, wenn sie an die Peptidbindegrube binden können. Peptide, welche sich im Komplex mit einem HLA-Molekül befinden, werden zusätzlich von Aminopeptidasen am N-Terminus gekürzt (Chen et al., 2016).



**Abbildung 1.4 – Endogene Prozessierung eines HLA-A, -B oder -C-restringierten Peptids**

Zytoplastisch vorliegende Proteine und Peptide werden enzymatisch vom Proteasom fragmentiert. Die resultierenden Antigenpeptide werden durch die ER-assoziierten Transportproteine TAP1 und TAP2 ins ER transportiert, wo sie auf HLA-Moleküle geladen werden. Binden die Peptidfragmente an ein HLA-Molekül und stabilisieren es, wird der HLA:Peptid-Komplex an die Zelloberfläche transportiert. Durch Bindung eines spezifischen TCR an den HLA:Peptid-Komplex werden in der CD8<sup>+</sup> T-Zelle Signalkaskaden aktiviert, die die Effektorfunktionen dieser T-Zelle induzieren. Adaptiert von (Kobayashi and van den Elsen, 2012).

## Einleitung

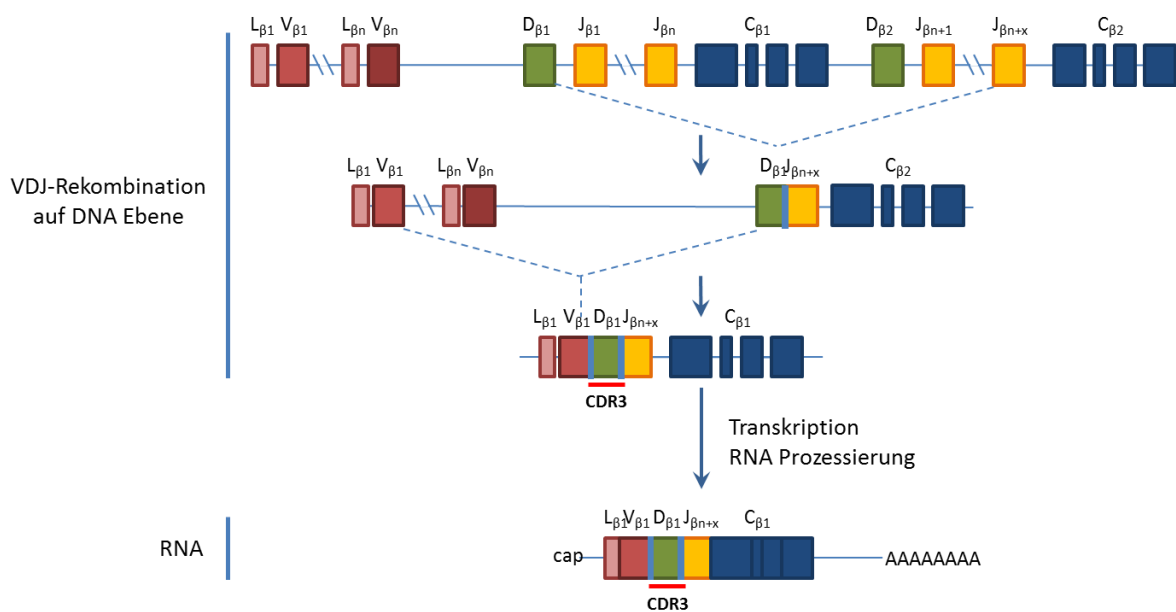
Spezifische Positionen des Peptids, sogenannte Ankerpositionen, determinieren ob ein Peptid mit dem HLA-Molekül einen Komplex eingehen kann. Jeder HLA-Subtyp bindet bestimmte Aminosäuren an diesen Ankerpositionen bevorzugt (Rapin et al., 2008). Man spricht hierbei von der HLA-Restriktion der Epitope. Die HLA:Peptid-Kombinationsmöglichkeiten eines Individuums sind vielfältig, werden jedoch durch den individuellen HLA-Haplotypen eingeschränkt. Jeweils eines von zwei HLA-A, HLA-B und HLA-C Allelen wird von jedem Elternteil vererbt, sodass jedes Individuum sechs der klassischen Klasse I HLA-Allele trägt, wobei bestimmte HLA-Allele gehäuft gemeinsam vererbt werden. Trotz der kombinierten Vererbung einiger Allele herrscht auf Populationsebene eine große Diversität aufgrund der großen Anzahl an Polymorphismen im HLA-Lokus. Bislang wurden 2.781 HLA-A, 3.501 HLA-B und 2.490 HLA-C Allele identifiziert, die funktionelle Proteine kodieren (Robinson et al., 2014). Die Nomenklatur beschreibt mit den ersten beiden Ziffern, wie im Beispiel des HLA-A\*02:01, die HLA-Familie zu der das entsprechende Allel gehört, während die nächsten beiden Ziffern in der Reihenfolge der Entdeckung neuer Aminosäuresubstitutionen zugeordnet werden (Marsh et al., 2010). Darauf folgende Ziffern deuten nur auf Mutationen auf Nukleotidebene hin, die keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz haben.

Diese Variabilität von HLA-Molekülen bedeutet, dass das präsentierte Epitop-Repertoire sich in jedem Individuum in Abhängigkeit des genetischen HLA-Typs unterscheidet. Nur wenn ein Peptid im ER erfolgreich bindet und so das HLA-Molekül stabilisiert, wird der HLA:Peptid-Komplex an die Zelloberfläche transportiert und kann dort von einer T-Zelle mit einem TCR, der spezifisch für diesen HLA:Peptid-Komplex ist, gebunden werden.

Ob dieses präsentierte Epitop tatsächlich eine spezifische Immunantwort auslösen kann, hängt zusätzlich von der Spezifität des T-Zell-Rezeptors für eben jenen HLA:Peptid-Komplex ab. Die Spezifität der TCR entwickelt sich durch das zufällige Rearrangement des genomischen Lokus des TCR während der T-Zellentwicklung im Thymus. Der TCR selbst besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, die beide in unterschiedlichem Maße zur Bindung des Komplexes beitragen. Insbesondere die variablen Regionen spielen hierbei eine entscheidende Rolle. Diese umfassen in beiden Ketten die drei Komplementarität-determinierenden Regionen (CDR) CDR1, CDR2 und CDR3. Während CDR1 und CDR2 die HLA-Bindungsdomänen darstellen, wird die Spezifität des HLA-Moleküls für das entsprechende Epitop durch die CDR3 Regionen vermittelt. Diese werden auch hypervariable Regionen genannt, weil sie während der TCR-Entwicklung die größte Sequenzveränderung durchlaufen. Zunächst wird, wie in Abbildung 1.5 beispielhaft für die  $\beta$ -Kette dargestellt ist, eines der beiden D-Segmente (*diversity segment*) mit einem der 13 J-Segmente (*joining segment*) zusammengefügt. Darauf aufbauend wird an das

## Einleitung

resultierende DJ-Segment eines der etwa 52 variablen V-Segmente gefügt, sodass schließlich C-terminal entweder nur noch ein konstantes Segment (C) verbleibt oder posttranslational eines der beiden C-Segmente an das VDJ-Exon gespleißt wird. Während dieses Rearrangierprozesses kann es zu Insertionen und Deletionen an den Fügungsstellen der VDJ-Region kommen, was die Variabilität dieser Bindungsstelle noch über die Kombinationsmöglichkeiten hinaus erhöht. Nach Rekombination der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Kette können so zusammengenommen theoretisch etwa  $10^{18}$  verschiedene T-Zell-Rezeptoren entstehen. In der Praxis kommen jedoch bestimmte VDJ-Kombinationen gehäuft vor und T-Zellen, die spezifisch für ein bestimmtes Epitop sind, besitzen häufig nur wenig abweichende TCR (Glanville et al., 2017). Dies ist auf die Selektion funktioneller TCR zurückzuführen. T-Zellen mit einem TCR, der eine zu hohe Affinität für endogene Peptide besitzt, werden negativ selektiert, um Autoimmunität zu verhindern. T-Zellen mit zu geringer Affinität für die HLA:Peptid-Komplexe erhalten dahingegen keine kostimulatorischen Überlebenssignale und gehen in Apoptose. Nur T-Zellen, deren TCR überhaupt HLA:Peptid-Komplexe erkennen können und zudem eine niedrige Affinität für Selbstpeptide besitzen, werden positiv selektioniert und maturieren zu reifen T-Zellen heran.



**Abbildung 1.5 – Rekombination der  $\beta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors**

Die Variabilität des TCR wird durch die zufällige Rekombination verschiedener Segmente des Keimbahnlokus generiert. Dabei wird zuerst eines von zwei D-Segmenten an eines von 13 J-Segmenten gefügt. Mit diesem entstandenen DJ-Segment wird eines von ca. 52 V-Segmenten verknüpft, sodass ein VDJ-Exon entsteht. Nach Translation wird eines von zwei konstanten Exons an dieses VDJ-Exon gespleißt, sollten nach Rekombination noch beide konstanten Segmente verfügbar sein. Durch Insertionen und Deletion beim Zusammenfügen der einzelnen Segmente wird an den Verbindungsstellen des VDJ-Exons eine hypervariable Region, die CDR3 genannt wird, geschaffen. Sie ist für die Bindung des Peptids im HLA:Peptid-Komplex essentiell und erlaubt durch ihre große Variabilität die Erkennung unterschiedlichster Peptide.

### 1.2.3.2. Kreuzreaktivität der T-Zell-Rezeptoren

Der klonalen Selektionstheorie zufolge, welche lange Zeit die Erklärung für die TCR-Spezifität bot, wird durch die VDJ-Rekombination und die darauffolgende Selektion in jedem Individuum ein T-Zellenpool generiert, bei dem jeder T-Zell-Klon spezifisch eine einzige HLA:Peptid-Kombination binden kann (Jerne, 1955, Jerne, 1971) .

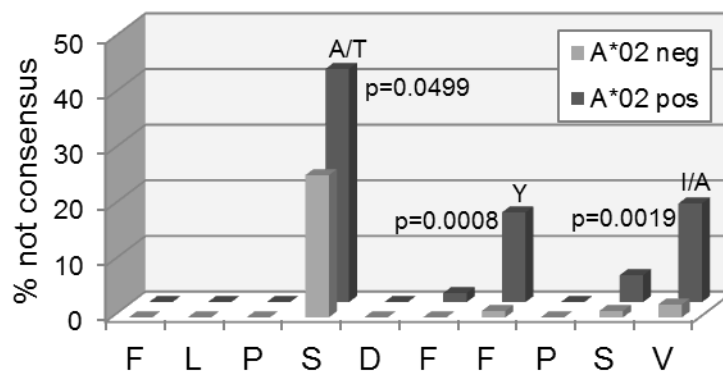
Die Peptide, die von einem HLA-Molekül gebunden werden können, variieren jedoch, mit Ausnahme der Ankerpositionen, in ihrer Aminosäurezusammensetzung und können darüber hinaus posttranslationale Modifikationen tragen, die die Bindung beeinflussen. Daher übersteigt die Anzahl an Peptiden, die potentiell HLA-Moleküle binden können, das tatsächlich vorhandene Repertoire an naiven T-Zellen ( $10^8$ ) (Arstila et al., 1999, Sewell, 2012). Durch diese Berechnungen wird die klonale Selektionstheorie in Frage gestellt. Strukturanalyse von isolierten HLA:Peptid:TCR-Komplexen unterstützen dieses Umdenken. Diesen strukturellen Daten zufolge zeichnet sich insbesondere die CDR3-Schleife des TCR durch eine gewisse Flexibilität aus. Diese erlaubt es einem TCR nicht nur einen spezifischen HLA:Peptid-Komplex zu binden, sondern durch Konformationsveränderungen ein gewisses Spektrum an Aminosäureabfolgen des Peptids zu tolerieren. Die Bindung unterschiedlicher Peptide an ein HLA-Molekül führt zudem zu Veränderungen der Konformation des HLA-Moleküls, was der TCR durch Änderung des Bindungswinkels ausgleicht. Der TCR scheint daher eine gewisse Kreuzreaktivität zu besitzen. Dies erlaubt ihm nicht nur ähnliche Epitope aus einem Pathogen erkennen zu können, sondern vermittelt auch heterologe Immunität zwischen unterschiedlichen Pathogenen(Sewell, 2012).

### 1.2.3.3. Selektionsdruck durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Die Spezifität dieser HLA:Peptid:TCR-Bindung ermöglicht den CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen gewissen Selektionsdruck auf das Virus auszuüben. Epitope die von dem TCR erkannt werden, lösen Immunantworten aus, die im Idealfall zur Eliminierung des Virus führen. Dies wird dank der viralen genetischen Plastizität umgangen, wodurch *Escape*-Mutationen in Zielepitopen selektiert werden können, die eine Erkennung durch die T-Lymphozyten verhindern (Timm et al., 2004). Diese Einzelnen oder teilweise auch kombinierten Substitutionen, unterbinden entweder die Präsentation des Epitops auf der Zelloberfläche, indem sie die Bindung der Ankerpositionen an das HLA-Molekül verhindern oder beeinflussen andere Schritte der Prozessierung (Bertoletti et al., 1997, Walker et al., 2015). Außerdem können sie die Erkennung des HLA:Peptid-Komplexes durch den TCR verhindern. Insbesondere für RNA-Viren, wie das Hepatitis C Virus und das HI-Virus, sind eine Vielzahl solcher *Escape*-Mutationen bekannt, aber auch in Epitopen des Hepatitis B Virus konnten derartige Mutationen identifiziert werden

## Einleitung

(Leslie et al., 2004, Timm et al., 2004, Desmond et al., 2012, Bronke et al., 2013, Kefalakes et al., 2015a). Besonders häufig treten dabei Mutationen in der Polymerase-kodierenden Region auf, was insbesondere für die Genotypen B und C beschrieben ist (Desmond et al., 2012). Allerdings sind auch in den Hüllproteinen und dem Kapsidprotein Substitutionen zu finden (Liu et al., 2008, Desmond et al., 2012). Speziell *Escape*-Mutationen sind jedoch vor allem für das Kapsidprotein HBVcore untersucht worden (Bertoletti et al., 1994a, Bertoletti et al., 1994b, Rehmann et al., 1995, Desmond et al., 2012, Kefalakes et al., 2015a) und in einer chinesischen Kohorte in dem Hüllprotein HBs (Liu et al., 2008). Dabei ist das immundominante HLA-A\*02-restringierte Epitop HBVcore<sub>18-27</sub> von besonderem Interesse. Kefalakes *et al.* (2015a) konnten zeigen, dass drei Positionen dieses Epitops auf Sequenzebene besonders häufig Substitutionen aufweisen und diese Polymorphismen in Patienten mit einem HLA-A\*02 Allel signifikant häufiger vorkommen, als in Patienten die kein HLA-A\*02 Allel tragen. Auffallend häufig treten dabei die Substitutionen S21A oder S21T, sowie F24Y und V27I, aber auch V27A auf. Während die Substitutionen an den Positionen 21 und 24 des Epitops möglicherweise eher Kontaktpunkte mit dem TCR sind, stellt Position 27 eine Ankerposition für die Bindung des HLA-A\*02-Moleküls dar. Dieses selektive Auftreten von Substitutionen verdichtet die Hinweise darauf, dass auch das Hepatitis B Virus unter Selektionsdruck steht.



**Abbildung 1.6 – Sequenzpolymorphismen im HBVcore<sub>18-27</sub> CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitop**

Die autologen viralen Sequenzen von 148 Patienten mit chronischer HBV-Infektion wurden dafür verglichen und die signifikanten Unterschiede mit einem exakten Test von Fisher nachgewiesen (Kefalakes et al., 2015a). Substitutionen an den Positionen S21, F24 und V27 des Epitops sind in HLA-A\*02 positiven Patienten signifikant häufiger zu detektieren, als in HLA-A\*02 negativen.

### 1.3. Ziel und Hypothese

Da bislang mit den verfügbaren Therapien noch keine funktionelle Heilung einer HBV-Infektion möglich ist, gibt es Bestrebungen über therapeutische Impfstoffe die HBV-spezifischen T-Zellen zu aktivieren, um so infizierte Hepatozyten eliminieren zu können. Außerdem könnten via adoptiven T-Zelltransfer, T-Zellen mit rekombinatem T-Zell-Rezeptor eingebracht werden, die durch eine starke Kreuzreaktivität ein breites Spektrum an HBV-Varianten angreifen können. Für den Erfolg dieser Ansätze sind detaillierte Kenntnisse über natürlich vorkommende HBV-Varianten und ihre Bedeutung für die Reaktivität von HBV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen notwendig. HBVcore-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten sind mit der Ausheilung akuter HBV-Infektionen assoziiert (Maini et al., 1999). Sie könnten daher auch im Hinblick auf Immuntherapien Vorteile bieten. Besonderes Interesse liegt hierbei auf dem HBVcore<sub>18-27</sub> Epitop. Als immundominantes HLA-A\*02 Epitop induziert es CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten deutlich, kann jedoch auch über weitere HLA-Allele präsentiert werden und könnte somit Therapieoptionen für eine große Bevölkerungsgruppe zugänglich machen.

Ziel dieser Arbeit ist es daher zu untersuchen, ob sich die von Kefalakes *et al.* auf Sequenzebene gefundenen Hinweise auf *Escape*-Mutationen im HLA-A\*02-restringierten HBVcore<sub>18-27</sub> Epitop durch funktionelle Daten untermauern lassen. Zudem sollte untersucht werden, auf welcher Ebene der Epitoperkennung die entsprechenden Substitutionen Einfluss haben. Zum einen sollte dafür analysiert werden, ob die Substitutionen im HBVcore<sub>18-27</sub> Epitop die Bindung an das HLA-Molekül und damit die Erkennung des Epitops durch den TCR unterbinden. Zum anderen sollten die Auswirkungen auf die Prozessierung analysiert werden. Letzteres wurde mit dem Fokus auf die zuvor noch nicht funktionell untersuchte Substitution F24Y betrachtet.

## 2. Patienten und Materialien

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Antikörper, Dextramere und fluoreszierende Farbstoffe

Tabelle 2.1 Antikörper, Dextramere und fluoreszierende Farbstoffe

Spezifität	Fluorochrom	Klon	Hersteller
2B4 (CD244)	R-phycoerythrin-CF594 (PE-CF594)	01.02.1969	BD
CCR7 (CD197)	Alexa Fluor®700	150503	BD
CD3	Peridinin-Chlorophyll Protein Cyanine 5.5 (PerCP Cy5.5)	OKT3	ebiosciences
CD3	Allophycocyanin-H7 (APC-H7)	SK7	BD
CD4	PE	RPA-T4	ebiosciences
CD4	Fluorescein Isothiocyanat (FITC)	RPA-T4	BD
CD4	Brilliant Violet 605 (BV605)	RPA-TA	BD
CD8	APC	RPA-T8	ebiosciences
CD8	BV510	RPA-TA	BD
CD8	eFluor 450	RPA-T8	BD
CD27	BV786	L128	BD
CD38	PE-Cy™7	HIT2	BD
CD45RA	Brilliant Blue 515 (BB515)	HI100	BD
CD127	BV711	HIL-7R-M21	BD
CTLA4 (CD152)	PE	BNI3	BD
IFN-γ	FITC	4S.B3	ebiosciences
IFN-γ	APC	B27	BD
IFN-γ	PE		Miltenyi im Kit
KLRG1	PerCP-Cy5.5	14C2A07	biolegend
PD-1 (CD279)	BV650	EH12.1	BD
TIM-3 (CD366)	BV421	7D3	BD
HLA-A2	FITC	BB7.2	BD
Fixierbarer Viabilitätsfarbstoff	eFluor 780		ebiosciences
Fixierbarer Viabilitätsfarbstoff	575V		BD Biosciences
BD™ CompBeads			BD Biosciences
Anti-Mouse Ig, κ			
BD™ CompBeads			BD Biosciences
Negative Control			
CellTrace™ Violet Farbstoff			Thermo Fisher Scientific
<b>Dextramer</b>	<b>Fluorochrom</b>		<b>Hersteller</b>
HLA-A*02:01-FLPSDFFPSV	APC		Immudex, Dänemark

#### 2.1.2. Zelllinien und Bakterien

Tabelle 2.2 Zelllinien und Bakterien

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz/Ursprung
HEK 293T	SV40 large T antigen	Humane Embryonale Nierenzelle 293
Huh 7.5		(Zhong et al., 2005, Wakita et al., 2005)

## Patienten und Materialien

HepG2	HLA-A*02:01 <sup>+</sup>	Humanes Leberzellkarzinom, 15-jähriger, männlicher Kaukasier
HepG2 [P151]	pWPI-BSD-core-mCherry-pp65	
HepG2 [P152]	pWPI-BSD-F24Y-core-mCherry-pp65	

Bezeichnung	Eigenschaften	Hersteller
NEB5-alpha competent <i>E. coli</i>	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	NEB

### 2.1.3. Zellkulturnährmedien, Nährmedien für Bakterienkulturen und Zusätze

Tabelle 2.3 Zellkulturnährmedien, Nährmedien für Bakterienkulturen und Zusätze

Produkt	Hersteller
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (no calcium, no magnesium)	Gibco™ Life Technologies Europe BV, Niederlande
RPMI 1640 (1X) + GlutaMAX™-I	Gibco™ Life Technologies Europe BV, Niederlande
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1X)	Gibco™ Life Technologies Europe BV, Niederlande
Opti-MEM® I (1X)	Gibco™ Life Technologies Europe BV, Niederlande
FBS Superior	Biochrom GmbH, Deutschland
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	Gibco™ Life Technologies Europe BV, Niederlande
HEPES Buffer Solution (1M)	Gibco™ Life Technologies Europe BV, Niederlande
MEM NEAA (100X)	Gibco™ Life Technologies Europe BV, Niederlande
Minimum Essential Medium Non-essential amino acids	Gibco™ Life Technologies Europe BV, Niederlande
Pen Strep (10,000 U/mL Penicillin, 10,000 µg/mL Streptomycin)	Gibco™ Life Technologies Europe BV, Niederlande
Interleukin-2, human (hIL-2) (10 000 U, 1 ml)	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Brefeldin A	Sigma Life Sciences, Deutschland
FastImmune™ CD28/CD49d	BD Biosciences
SOC Outgrowth Medium	New England Biolabs Inc., USA
Blasticidin (10mg/ml)	InvivoGen

Tabelle 2.4 Zusammensetzung der Nährmedien für Zell- und Bakterienkulturen

Medium	Zusammensetzung
R10 Nährmedium	RPMI 1640 10% FBS Superior 10 mM HEPES 100 U/mL Penicillin 100 µg /mL Streptomycin
DMEM Vollmedium	DMEM (1X)

	10% FBS Superior 10 mM HEPES 100 U/mL Penicillin 100 µg /mL Streptomycin 1X MEM NEAA
Einfriermedium	FBS 10% DMSO
Luria-Bertani (LB) Flüssigmedium	H <sub>2</sub> O 1% (w/v) Trypton 5% (w/v) Hefextrakt 5% (w/v) NaCl
LB Agar	LB broth 1.5% (w/v) Agar

### 2.1.4. Chemikalien, Enzyme und Reagenzien

Tabelle 2.5 Chemikalien, Enzyme und Reagenzien

Produkt	Hersteller
Ethidium bromide Lösung 0.025 % in Tropfflasche aqueous solution (250 µg/ml)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Deutschland
Ethanol absolute, Emparta®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
2-Propanol, AnalaR NORMAPUR	VWR, Frankreich
Biocoll Separating Solution	Biochrom GmbH, Deutschland
Dimethol sulfoxide (DMSO)	Carl Roth GmbH, Deutschland
ROTIPURAN® ≥99,8 %, p.a.	
TransIT®-LT1 Reagent	Mirus Bio LLC, USA
Lipofectamine 2000 Transfection Reagent	Invitrogen, USA
0.05% Trypsin-EDTA (1X)	Gibco™ Life Technologies Europe BV, Niederlande
Nuclease-Free Water	Ambion®
Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set	affymetrix ebiosciences
Q5 High Fidelity Polymerase	NEB
GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder	Thermo Scientific
6x DNA Loading dye	Thermo Scientific
Antarctic Phosphatase Buffer	NEB
Antarctic Phosphatase	NEB
T4 Ligase Buffer	NEB
T4 Ligase	NEB
HindIII	NEB
KpnI	NEB
AlwNI	NEB
EcoRI	NEB
XhoI	NEB
Bovines Serum Albumin (10X)	NEB
my-Budget dNTP (5 µmol per dNTP)	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland
DpnI, recombinant	New England BioLabs
Gibson Assembly Master Mix	NEB
NEB Buffer 1	NEB
NEB Buffer 2	NEB

NEB Buffer 3	NEB
NEB Buffer 4	NEB
CutSmart Buffer	NEB
Poly-L-lysine hydrobromide, 30-70 kDa	Sigma Aldrich
LB Agar (Lennox)	Invitrogen
LB Medium	Roth
Tris-Borate-EDTA buffer (10X)	Sigma Aldrich

### 2.1.5. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.6 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Cellstar® Röhrchen, 15 ml, (Falconröhrchen)	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Cellstar® Röhrchen, 50 ml, (Falconröhrchen)	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Leucosep™ Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Cryo.s™, 2 ml, PR and PP with Drehdeckel, steril	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Combitips advanced® 5 ml, Eppendorf BIOPUR	Eppendorf AG, Deutschland
Combitips advanced® 10 ml, Eppendorf BIOPUR	Eppendorf AG, Deutschland
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Deutschland
VWR® Zellkulturplatten, 96 Loch-U, steril	VWR, USA
costar® Stripette, 2 ml	Corning Incorporated, USA
costar® Stripette, 5 ml	Corning Incorporated, USA
costar® Stripette, 10 ml	Corning Incorporated, USA
costar® Stripette, 25 ml	Corning Incorporated, USA
BD™ FACSClean	BD Biosciences, Belgien
FACSRinse	BD Biosciences
BD FACFlow™	BD Biosciences
BD FACS™ Shutdown Solution	BD Biosciences
Stromatolyser®-WH	System Europe GmbH, Deutschland
CELLCLEAN® CL-50	System Europe GmbH, Deutschland
CELLPACK®	System Europe GmbH, Deutschland
Impfeschlinge leicht 10 µl, steril	VWR, Italien
1000 µl Graduated Filter Tip (steril)	StarLab, UK
200 µl Graduated Filter Tip (steril)	StarLab, UK
20 µl Graduated Filter Tip (steril)	StarLab, UK
10/20 µl Graduated Filter Tip (steril)	StarLab, UK
Safe-Lock Reaktionsgefäß 2.0 ml, Eppendorf	Eppendorf AG, Deutschland
SafeSeal Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Deutschland
costar® 50 mL Reagenzreservoir	Corning Incorporated, USA
CellTrics® Einwegfilter 50 µm	System Partec GmbH, Deutschland
C-Chip Einweghämocytometer Neubauer verbessert	NanoEnTek, USA
14 ml PP Röhrchen, steril	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
PCR Reaktionsgefäßstreifen, 0,2 mL	Eppendorf AG, Deutschland
25 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	Corning Incorporated, USA
75 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	Corning Incorporated, USA
175 cm <sup>2</sup> Nunc™ EasYFlask™ 175 cm <sup>2</sup> Nunclon™	Thermo Scientific
Delta Surface	
Ampicillin	Roth
LD Säulen	Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland
LS Säulen	Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland

### 2.1.6. Kits

Tabelle 2.7 Kits

Name	Hersteller
QIAquick® PCR Purification Kit	QIAGEN, Deutschland
QIAquick® Gel Extraction Kit	QIAGEN, Deutschland
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Deutschland
QIAprep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Deutschland
QIAamp® DNA Blood Mini Kit	QIAGEN, Deutschland
Gibson Assembly Cloning Kit	New England BioLabs

### 2.1.7. Technische Ausstattung

Tabelle 2.8 Technische Ausstattung

Instrument	Hersteller
Heraeus BBD 6220 CO <sub>2</sub> -Inkubator	Thermo Scientific, Deutschland
Eclipse TS100 Inverted Mikroskop	Nikon Instruments Europe B.V., Deutschland
Heraeus Megafuge 40R	Thermo Scientific, Deutschland
Allegra® X-15R Zentrifuge	Beckman Coulter, Deutschland
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Deutschland
Biozym® Sprout Minizentrifuge	Biozym Scientific GmbH, Deutschland
Geldokumentations UV-System	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Deutschland
Thermocycler T3000	Biometra GmbH, Deutschland
Thermocycler TProfessional TRIO	Biometra GmbH, Deutschland
Axiovert 40 CFL Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
MBQ 52 AC Power Supply	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
Mastercycler nexus GSX1	Eppendorf AG, Deutschland
Mastercycler nexus	Eppendorf AG, Deutschland
ThermoStat plus	Eppendorf AG, Deutschland
NanoDrop 2000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, USA
NALGENE® Mr. Frosty™ Cryo 1°C Einfriergefäß	Thermo Fisher Scientific Inc.,
Wasserbad	Kottermann Labortechnik, Deutschland
Mikrowelle microspeed	Küppersbusch, Deutschland
Eismaschine AF 100	Scotsman® Ice Systems, Italien
Ultra-Low Temperature Freezer U725-G Innova®	New Brunswick, Eppendorf AG, Deutschland
Biosafe® MD	Cryotherm, Deutschland
MVE HEco Series 800-190	Jutta Ohst german-cryo® GmbH, Deutschland
Vortexer VV 3	VWR
HeraSafe Laminar Flow	Thermo Electron Corporation, Deutschland
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Deutschland
Multipette® plus	Eppendorf AG, Deutschland
8-Kanal Pipette Research®, 300 µl	Eppendorf AG, Deutschland
12-Kanal Pipette Research® plus, 300 µl	Eppendorf AG, Deutschland
Pipette Research® plus, 1000 µl	Eppendorf AG, Deutschland
Pipette Research® plus, 200 µl	Eppendorf AG, Deutschland
Pipette Research® plus, 20 µl	Eppendorf AG, Deutschland
Pipette Research® plus, 10 µl	Eppendorf AG, Deutschland
Pipette Research® plus, 2,5 µl	Eppendorf AG, Deutschland
Gelelektrophorese Kammer Agagel, mini	Biometra GmbH, Goettingen, Deutschland

## Patienten und Materialien

Gelelektrophorese Kammer Agagel, maxi	Biometra GmbH, Goettingen, Deutschland
Gelelektrophorese Power Supply EPS301	Biometra GmbH, Goettingen, Deutschland
ECLIPSE TE2000-S	Nikon, Tokyo, Japan
Kühlschrank 4°C	Bosch
Gefrierschrank -20°C	Bosch
5 ml Polystyrene Rundbodenröhrchen	BD biosciences

### 2.1.8. Plasmide

Tabelle 2.9 Plasmide

Bezeichnung	Eigenschaften	Zur Verfügung gestellt von
pcDNA3.1	Amp <sup>r</sup> , CMV promoter <sup>+</sup> , SV40 promoter <sup>+</sup> , T7 promoter <sup>+</sup> , NeoR/KanR <sup>+</sup>	
psec-Nluc [28]	Basisvektor zur Generierung von pcopGFP, HygroR <sup>+</sup>	Wibke Bayer, Institut für Virologie, Essen
pmaxGFP	puC ori, Kan <sup>r</sup> , CMV promoter, copGFP <sup>+</sup> , SV40 polyA	Amaya GmbH, Köln
pcopGFP	copGFP <sup>+</sup> , AmpR <sup>+</sup> , ΔHygro <sup>r</sup>	basiert auf psecNluc [28] Andreas Walker, Institut für Virologie, Düsseldorf
pcopGFP-HBV-S12	Expressionsvektor für HBVcore <sub>10-35</sub> Prototyp S12, copGFP <sup>+</sup>	basiert auf pcopGFP
pcopGFP-HBV-F24Y	Expressionsvektor für HBVcore <sub>10-35</sub> Variante F24Y, copGFP <sup>+</sup>	basiert auf pcopGFP
pcopGFP-CMV-HBVflankiert	Expressionsvektor für CMVpp65 <sub>495-503</sub> , flankiert von HBVcore <sub>10-17</sub> und HBVcore <sub>28-35</sub> , copGFP <sup>+</sup>	basiert auf pcopGFP
pcopGFP-CMV-CMVflankiert	Expressionsvektor für CMVpp65 <sub>487-511</sub> Prototyp, copGFP <sup>+</sup>	basiert auf pcopGFP
pcopGFP-CMV-P498W	Expressionsvektor für CMVpp65 <sub>487-511</sub> Variante P498W, copGFP <sup>+</sup>	basiert auf pcopGFP
pcopGFP-CMV-P498S	Expressionsvektor für CMVpp65 <sub>487-511</sub> Variante P498S, copGFP <sup>+</sup>	basiert auf pcopGFP
pCMVR8.74		Didier Trono (Addgene plasmid # 22036)
pMD2.G		Didier Trono (Addgene plasmid # 12259)
pWPI-BSD-core-mCherry-pp65	AmpR <sup>+</sup>	basiert auf pWPI von Didier Trono (Addgene plasmid # 12254)
pWPI-BSD-F24Y-core-mCherry-pp65		basiert auf pWPI von Didier Trono (Addgene plasmid # 12254)

### 2.1.9. Primer and Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Eurofins Genomics synthetisiert.

Tabelle 2.10 Primer and Oligonukleotide

Primer	Sequenz
(+)-pHygro fwd [18762887]	GGGAGATGGGGGAGGCTA

(-)-pHygro-rev [18762886]	CTCATTGCCCCGGGATCTG
copGFP-fwd	ATCCCGGGCAATGAGTCACAGGTAAGTATCAAGGTTAC
copGFP-rev	CCTCCCCATCTCCCTCATCGAGCTCGAGATCTG
pcop-HBV-fwd	CTTCTAGATACCGCCTCGTGACTGCTAGCAAGCTCGGAT
pcop-HBV-fwd	CATGGTGGAAAGCTTCTCACTGGTACCCAGCTTCTAGA
HBV_consensus_fwd_forS21	CTTTCCTCAGTACGAGATCTTCT
HBV_consensus_fwd_forT12	GTGGAGTTACTCTCGTTTTTGC
HBV_consensus_rev_forF24Y	AAGTCAGAAGGCCAAAAACGAGAG
HBV_consensus_rev_forV27I	AAGGAAAGAAGTCAGAAGGCCAAAA
HBV_F24Y_modification_fwd	CTATCCTCAGTACGAGATCTTCT
HBV_S21A_modification_rev	AAGTCAGCAGGCCAAAAACGAGAG
HBV_S21H_modification_rev	AAGTCATGAGGCCAAAAACGAGAG
HBV_S21Q_modification_rev	AAGTCCTGAGGCCAAAAACGAGAG
HBV_T12_modification_rev	AGTAGCTCCCATGGTGGAAGC
HBV_V27I_modification_fwd	CAATCCGAGATCTTCTAGATACCGC
GA_CMV_p553-557_rev	AGGATGCCGGCCTGCCACATGGTGGAAAGCTTCTCACTGG
GA_CMV_p553-557_fwd	AGAATCTGAAGTACCACTGACTGCTAGCAAGCTCGGATC
(-)-pFUSE-PolyA	CCACATTTGTAGAGTTTTTACTTGC
(+)-CMV-Promoter	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG

**Oligonukleotide**

core <sub>10-35</sub> -Konsensus (S12)	ATGGGAGCTTCTGTGGAGTTACTCTCGTTTTTGCCTTCTGACTTCTTTCCT TCAGTACGAGATCTTCTAGATACCGCCTCA
core <sub>10-35</sub> -F24Y	ATGGGAGCTTCTGTGGAGTTACTCTCGTTTTTGCCTTCTGACTTCTATCC TTCAGTACGAGATCTTCTAGATACCGCCTCA
pp65 <sub>487-511</sub> -CMV-CMVflankiert	ATGTGGCAGGCCGGCATCCTGGCCCCGAACCTGGTGCCCATGGTGGCT ACGGTTCAGGGTCAGAATCTGAAGTACCAG
pp65 <sub>495-503</sub> -CMV-HBVflankiert	ATGGGAGCTACTGTGGAGTTACTCTCGAACCTGGTGCCCATGGTGGCTA CGGTT CGAGATCTTCTAGATACCGCCTCA
pp65 <sub>487-511</sub> -CMV-P498W	ATGTGGCAGGCCGGCATCCTGGCCCCGAACCTGGTGTGGATGGTGGCT ACGGTTCAGGGTCAGAATCTGAAGTACCAGTGA
pp65 <sub>487-511</sub> -CMV-P498S	ATGTGGCAGGCCGGCATCCTGGCCCCGAACCTGGTGAGCATGGTGGCT ACGGTTCAGGGTCAGAATCTGAAGTACCAGTGA

**2.1.10. Peptide**

Wenn nicht anders angegeben, wurden Peptide entweder mit Reinheiten von >70% von der Peptides&Elephants GmbH (Potsdam, Deutschland) oder im Fall von Peptiden mit >90% Reinheit von der EMC microcollections GmbH (Tübingen, Deutschland) synthetisiert. In beiden Fälle besteht der C-Terminus aus der freien Säure.

Tabelle 2.11 Peptide

Peptides & elephants GmbH, Potsdam, Germany (P), EMC microcollections GmbH, Tübingen, Germany (E)

Epitop	HLA	Substitution	Sequenz	Hersteller
<b>HBV</b>				
core <sub>18-27</sub>	A*02	-	FLPSDFFPV	P
	A*02	F24Y	FLPSDFYPSV	P
	A*02	V27I	FLPSDFFPSI	P
	A*02	S26N	FLPSDFFPNV	P
	A*02	S21Q	FLPQDFFPV	P

## Patienten und Materialien

	A*02	S21A	FLPADFFPSV	P
	A*02	S21T	FLPTDFYPSV	P
	A*02	V27A	FLPSDFFPSPA	P
	A*02	S21T	FLPTDFYPSV	P
	A*02	S21N	FLPNDFFPSPV	P
	A*02	S21T, F23Y	FLPTDYFPSPV	P
	A*02	S21Q, S26N	FLPQDFFPNV	P
	A*02	S21Q, F24Y	FLPQDFYPSV	P
	A*02	S21P, V27A	FLPPDFFPSPA	P
	A*02	S21P	FLPPDFFPSPV	P
	A*02	S21N, F24Y	FLPNDFYPSV	P
	A*02	S21I, F24Y	FLPIDFYPSV	P
	A*02	S21I	FLPIDFFPSV	P
	A*02	S21H, V27I	FLPHDFFPSPV	P
	A*02	S21H, F24Y	FLPHDFYPSV	P
	A*02	S21H	FLPHDFFPSPV	P
	A*02	S21G, V27I	FLPGDFFPSPV	P
	A*02	S21G	FLPGDFFPSPV	P
	A*02	S21A, V27T	FLPADFFPST	P
	A*02	S21A, F24Y	FLPADFYPSV	P
	A*02	S21A, V27I	FLPADFFPSPV	P
	A*02	S26N, V27I	FLPSDFFPSPV	P
core <sub>19-27</sub>	B*35; B*51		LPSDFFPSPV	P
<hr/>				
core <sub>8-37</sub>	A*02	T12	EFGATVELLSFLPSDFFPSPVRDLLDTASAL	E
	A*02	S12	EFGASVELLSFLPSDFFPSPVRDLLDTASAL	E
	A*02	F24Y	EFGASVELLSFLPSDFYPSVRDLLDTASAL	E
	A*02	V27I	EFGASVELLSFLPSDFFPSPVIRDLLDTASAL	E
	A*02	S21Q	EFGASVELLSFLPQDFFPSPVRDLLDTASAL	E
	A*02	S21A	EFGASVELLSFLPADFFFPSPVRDLLDTASAL	E
	A*02	T12, S21H	EFGATVELLSFLPHDFFPSPVRDLLDTASAL	E
	A*02	S21A, F24Y	EFGASVELLSFLPADFYPSVRDLLDTASAL	E
<hr/>				
<b>CMV</b>				
pp65 <sub>495-503</sub>	A*02	-	NLVPMVATV	P
pp65 <sub>495-503</sub>	A*02	N495G	GLVPMVATV	P
	A*02	N495A	ALVPMVATV	P
	A*02	N495L	LLVPMVATV	P
	A*02	N495M	MLVPMVATV	P
	A*02	N495F	FLVPMVATV	P
	A*02	N495W	WLVPMVATV	P
	A*02	N495K	KLVPMVATV	P
	A*02	N495Q	QLVPMVATV	P
	A*02	N495E	ELVPMVATV	P
	A*02	N495S	SLVPMVATV	P
	A*02	N495P	PLVPMVATV	P
	A*02	N495V	VLVPMVATV	P
	A*02	N495I	ILVPMVATV	P
	A*02	N495C	CLVPMVATV	P
	A*02	N495Y	YLVPMVATV	P
	A*02	N495H	HLVPMVATV	P
	A*02	N495R	RLVPMVATV	P

## Patienten und Materialien

	A*02	N495D	DLVPMVATV	P
	A*02	N495T	TLVPMVATV	P
pp65 <sub>495-503</sub>	A*02	V497G	NLGPMVATV	P
	A*02	V497A	NLAPMVATV	P
	A*02	V497L	NLLPMVATV	P
	A*02	V497M	NLMPMVATV	P
	A*02	V497F	NLFPMVATV	P
	A*02	V497W	NLWPMVATV	P
	A*02	V497K	NLKPMVATV	P
	A*02	V497Q	NLQPMVATV	P
	A*02	V497E	NLEPMVATV	P
	A*02	V497S	NLSPMVATV	P
	A*02	V497P	NLPPMVATV	P
	A*02	V497I	NLIPMVATV	P
	A*02	V497C	NLCPMVATV	P
	A*02	V497Y	NLYPMVATV	P
	A*02	V497H	NLHPMVATV	P
	A*02	V497R	NLRPMVATV	P
	A*02	V497N	NLNPMVATV	P
	A*02	V497D	NLDPMVATV	P
	A*02	V497T	NLTPMVATV	P
	pp65 <sub>495-503</sub>	A*02	P498G	NLVGMVATV
A*02		P498A	NLVAMVATV	P
A*02		P498L	NLVLMVATV	P
A*02		P498M	NLVMMVATV	P
A*02		P498F	NLVFMVATV	P
A*02		P498W	NLVWMVATV	P
A*02		P498K	NLVKMVATV	P
A*02		P498Q	NLVQMVATV	P
A*02		P498E	NLVEMVATV	P
A*02		P498S	NLVSMVATV	P
A*02		P498V	NLVVMVATV	P
A*02		P498I	NLVIMVATV	P
A*02		P498C	NLVCMVATV	P
A*02		P498Y	NLVYMVATV	P
A*02		P498H	NLVHMVATV	P
A*02		P498R	NLVRMVATV	P
A*02		P498N	NLVNMVATV	P
A*02		P498D	NLVDMVATV	P
A*02		P498T	NLVTMVATV	P
pp65 <sub>495-503</sub>		A*02	M499G	NLVPGVATV
	A*02	M499A	NLVPAVATV	P
	A*02	M499L	NLVPLVATV	P
	A*02	M499K	NLVPKVATV	P
	A*02	M499Q	NLV PQVATV	P
	A*02	M499E	NLVPEVATV	P
	A*02	M499S	NLVPSVATV	P
	A*02	M499P	NLVPPVATV	P
	A*02	M499V	NLVVVVATV	P
	A*02	M499C	NLVPCVATV	P
	A*02	M499H	NLVPHVATV	P
	A*02	M499R	NLVPRVATV	P
	A*02	M499N	NLVPNVATV	P

## Patienten und Materialien

	A*02	M499D	NLVDPVATV	P
	A*02	M499T	NLVPTVATV	P
pp65 <sub>495-503</sub>	A*02	A501G	NLVPMVGTV	P
	A*02	A501L	NLVPMVLTV	P
	A*02	A501M	NLVPMVMTV	P
	A*02	A501F	NLVPMVFTV	P
	A*02	A501W	NLVPMVWTV	P
	A*02	A501K	NLVPMVKTV	P
	A*02	A501Q	NLVPMVQTV	P
	A*02	A501E	NLVPMVETV	P
	A*02	A501S	NLVPMVSTV	P
	A*02	A501P	NLVPMVPTV	P
	A*02	A501V	NLVPMVVTV	P
	A*02	A501I	NLVPMVITV	P
	A*02	A501C	NLVPMVCTV	P
	A*02	A501Y	NLVPMVYTV	P
	A*02	A501H	NLVPMVHTV	P
	A*02	A501R	NLVPMVRTV	P
	A*02	A501N	NLVPMVNTV	P
	A*02	A501D	NLVPMVDTV	P
	A*02	A501T	NLVPMVTTV	P
	pp65 <sub>495-503</sub>	A*02	T502G	NLVPMVAGV
A*02		T502A	NLVPMVA AV	P
A*02		T502L	NLVPMVALV	P
A*02		T502M	NLVPMVAMV	P
A*02		T502F	NLVPMVAFV	P
A*02		T502W	NLVPMVAWV	P
A*02		T502K	NLVPMVAKV	P
A*02		T502Q	NLVPMVAQV	P
A*02		T502E	NLVPMVAEV	P
A*02		T502S	NLVPMVASV	P
A*02		T502P	NLVPMVAPV	P
A*02		T502V	NLVPMVAVV	P
A*02		T502I	NLVPMVAIV	P
A*02		T502C	NLVPMVACV	P
A*02		T502Y	NLVPMVAYV	P
A*02		T502H	NLVPMVAHV	P
A*02		T502R	NLVPMVARV	P
A*02		T502N	NLVPMVANV	P
A*02		T502D	NLVPMVADV	P

### 2.1.11. Software

Tabelle 2.12 Software

Software	Hersteller
Microsoft Office 2010	Microsoft
GraphPad Prism 5.04	GraphPad Software Inc., USA
FlowJo vX.0.7	
EndnoteX8	PDF Tron™ Systems Inc.
Geneious® 10.1.3	Biomatters Ltd.

## 2.2. Patienten

Tabelle 2.13 - HLA-A\*02-positive Patienten mit chronischer HBV-Infektion

Männlich (m), weiblich (w), nicht verfügbar (n.v.), negativ (neg), positiv (pos), keine Angabe (k.A.)

ID	Geschlecht	Alter	HLA-Haplotyp	HBV Genotyp	Autologe HBV core <sub>18-27</sub> Sequenz	Virus-konzentration	HBeAg	Anti-HBe	ALT	Therapie
HBV140	m	46	A*01:01,02:01 B*08:01,56:01	A	FLPSDFFPNI	<357	neg	pos	35	Tenofovir 10/2008
HBV183	m	44	A*02:01,68:01 B*18:01,44:02	D	FLPSDFFPNV	188860	neg	pos	112	Tenofovir 2002
HBV186	m	46	A*01:01,02:01 B*08:01,27:03	A	FLPHDFYPSV	<357	neg	pos	126	Pegylated IFNα 07/2012
HBV192	w	57	A*01:01,02:01 B*08:01,15:01	A	FLPLDFFPSV	4564	neg	pos	30	Pegylated IFNα k.A.
HBV197	m	33	A*02:01,29:01/02 B*18:01,44:03	D	FLPADFFPSV	38950	neg	pos	37	Keine
HBV222	m	44	A*02:01,24:02 B*13:02,37:01	n.v.	-	291	pos	neg	42	Tenofovir
HBV223	m	42	A*01:01,02:05 B*15:17,50:01	n.v.	-	<10	pos	neg	22	Entecavir, Tenofovir 1998
HBV225	m	33	A*02:01 B*44:05,52:01	n.v.	-	<10	neg	neg	20	Entecavir 11/2011
HBV230	m	58	A*02:01 B*18:01,44:02	D	FLPADFFPSI	177	neg	pos	15	Keine
HBV232	m	50	A*02:01,24:02 B*40:02,49:01	D	FLPSDFFPV	15	neg	pos	36	Tenofovir 07/2012
HBV233	w	30	A*01:01,02:01 B*18:01,44:02	n.v.	-	13	pos	neg	37	Tenofovir 10/2012
HBV239	m	41	A*01:01,02:05 B*15:17,50:01	n.v.	-	<10	pos	neg	37	Tenofovir 2008
HBV244	w	55	A*02:01,33:01 B*14:02,39:01	n.v.	-	11	neg	pos	26	Keine
HBV256	w	27	A*01:01,02:05 B*15:17,50:01	D	FLPSDFFPV	<10	neg	pos	17	k.A. 11/2008
HBV271					FLPADFFPSV					
HBV273	w	60	A*02:01 B*44:02,52:01	A	FLPNDFYPSV	526	neg	pos	30	k.A.
HBV276	w	30	A*02:01,03:01 B*44:02,55:01	D	FLPSDFFPV	190	neg	pos	19	Keine
HBV282	m	43	A*02:01,30:01 B*15:01,55:01	A	-	7608000	pos	pos	298	Tenofovir 2004
HBV293	w	43	A*02:01,68:01 B*15:01,44:02	D	FLPSDFFPV	37	neg	pos	26	Keine
HBV312	w	64	A*01:01,02:01 B*07:02,08:01	D	-	835	neg	pos	15	Keine
HBV314	w	30	A*02:01,24:02 B*41:01,44:02	n.v.	FLPSDFFPV	31	neg	pos	23	Keine
HBV348	m	28	A*02:01,02:05 B*50:01,57:01	A	FLPIDFFPSV	1700	neg	pos	24	k.A.
HBV368	m	47	A*02:01,68:02 B*40:02,53:01	A	FLPSDFFPV	<10	neg	pos	57	Tenofovir 04/201
HBV395	m	50	A*02:01,68:02 B*14:02,44:02	n.v.	-	<10	neg	pos	13	Keine

## Patienten und Materialien

HBV407	w	49	A*02:01,24:02 B*15:01,44:02	A	FLPSDFFFPSV	<10	neg	pos	23	Telbivudine	03/2008
HBV423	w	39	A*01:01,02:01 B*08:01,40:01	n.v.	-	29	neg	pos	20	k.A.	
HBV446	m	61	A*02:01 B*44:02	n.v.	-	116	neg	pos	28	Keine	
HBV451	w	59	A*02:01,68:01 B*07:02,44:02	D	-	432	neg	pos	21	Keine	
HBV454	m	24	A*02:01,32:01 B*08:01,18:01	n.v.	-	-	pos	pos	65	k.A.	
HBV458	w	49	A*02:01,03:01 B*15:01,18:01	A	FLPHDFFPSI	73	neg	pos	16	k.A.	
HBV462	m	75	A*01:01,02:01 B*07:02,27:03	B	-	31	neg	pos	51	k.A.	
HBV D7	w	36	A*02:01,29:01/02 B*07:05/06,57:01	A	FLPSDFFFPSV	8690					
HBV D9	m	49	A*02:01,11:01 B*50:01,58:01	n.v.	-	<20					
HBVD14	w	38	A*02:01,03:01 B*37:01,52:01	n.v.	-	865					
HBVD18	w	35	A*02:01,24:02 B27:03/05,44:02	D	FLPSDFYPSV	1918					
HBVD19	m	51	A*02:01,26:01 B*07:02,44:02	D	FLPHDFFPSI	132					
HBVD33	m	47	A*02:01,03:02 B*08:01,27:02		-	<20			54	Tenofovir	
HBVD60	w	49	A*02:01,68:01 B*27:03/05,44:02		FLPHDFFPSV		neg	pos	32	k.A.	
HBVD65	w	66	A*02:01,68:01 B*27:03/05,44:02		FLPI/LDFFPSV	117			27	k.A.	
HBVD79	m	46	A*02:01,11:01 B*15:01,58:01				neg	pos	33	k.A.	
HBVD87	m	41	A*02:01,23:01 B*41:01,50:01		FLPADFFPSV	218			38	k.A.	

**Tabelle 2.14 – HLA-B\*35:01-positive oder B\*35:03-positive Patienten mit chronischer HBV-Infektion**

Männlich (m), weiblich (w), nicht verfügbar (n.v.), negativ (neg), positiv (pos), keine Angabe (k.A.)

ID	Geschlecht	Alter	HLA-Haplotyp	HBV Genotyp	AutologeHBV core <sub>18-27</sub> Sequenz	Virus- konzentration	HBeAg	Anti-HBe	ALT	Therapie	
HBV159	m	31	A*01:01,31:01 B*35:01,37:01	D	FLPSDFFFPSV	2036	pos	neg	36	Tenofovir	12/2011
HBV162	m	23	A*23:01 B*35:01,45:01	D	FLPSDFFFPSA	<357	neg	pos	47	Telbivudine	11/2009
HBV173	m	32	A*03:01,23:01 B*35:01,50:01	D	FLPSDFFFPSV	<357	neg	pos	23	keine	06/11- 05/12
HBV188	m	44	A*31:01 B*35:01	D	FLPSDFFFPSV	<357	pos	neg	42	Entecavir	01/2009
HBV209	m	31	A*03:02,11:01 B*35:01	D	-	<10	pos	neg	67	Tenofovir	vor 2007
HBV240	m	35	A*11:01,66:01 B*35:01,41:02	n.v.	FLPSDFFFPSV	<10	neg	pos	32	Entecavir	06/2008

## Patienten und Materialien

HBV269	w	48	A*11:01,24:02 B*15:01,35:01	n.v.	FLPSDFFPSV	<10	neg	pos	79	keine	keine
HBV275	m	41	A*01:01,03:01 B*13:02,35:01	D	-	<10	neg	pos	20	Tenofovir	02/2005
HBV294	w	49	A*33:01,68:01 B*35:01,58:01	A	FLPSDFFPSV	898	neg	pos	9	keine	keine
HBV340	m	56	A*01:01,33:01 B*08:01,35:01	D	FLPSDFFPSV	<10	neg	neg	16	Tenofovir	09/2006
HBV358	w	68	A*11:01,30:01 B:1302,35:01	n.v.	FLPSDFFPSV	<10	neg	pos	19	Entecavir	10/2007
HBV376	w	40	A*11:01,24:02 B*18:01,35:01	n.v.	-	<10	neg	pos	40	keine	keine
HBV377	m	56	A*01:01,03:01 B*08:01,35:01	A	FLPSDFFPSV	<10	neg	neg	17	Tenofovir	11/2005
HBV381	w	53	A*11:01,68:01 B*35:01,44:03	D	-	41	neg	pos	16	keine	keine
HBV384	m	58	A*68:02,69:01 B*35:01,49:01	n.v.	-	<10	neg	pos	45	Lamivudine	12/1997
HBV428	m	46	A*11:01,26:01 B*35:01,38:01	D	FLPSDFFPSV	3154	neg	pos	38	keine	keine
HBV469			A*11:01,24:02 B*35:01,38:01	n.v.	-	-	-	-			
HBV D1	m	41	0A*1:01,03:01 B*13:02,35:01	n.v.	-	49	neg	pos			
HBV165	m	31	A*03:01,66:01 B*35:03,41:02	A	FLPSDFFPSV	<357	neg	pos	38	Tenofovir	02/2010
HBV270	m	53	A*11:01,68:01 B*35:03	n.v.	-	<10	neg	neg	20	Tenofovir	05/2001
HBV292	m	33	A*02:06,26:01 B*35:03,38:01	D	FLPSDFFPSV	59	neg	pos	36	keine	keine
HBV297	w	28	A*11:01,30:02 B*08:01,35:03	D	FLPSDFFPSV	<10	neg	pos	37	Tenofovir	01/2012
HBV306	m	41	A*03:01,24:02 B*15:01,35:03	D	-	151	neg	pos	25	keine	keine

**Tabelle 2.15 – HLA-B\*51-positive Patienten mit chronischer HBV-Infektion**

Männlich (m), weiblich (w), nicht verfügbar (n.v.), negativ (neg), positiv (pos), keine Angabe (k.A.)

ID	Geschlecht	Alter	HLA-Haplotyp	HBV Genotyp	Autologe HBV core <sub>18-27</sub> Sequenz	Virus-konzentration	HBeAg	Anti-HBe	ALT	Therapie
HBV134	m	39	A*24:02 B*14:02,51:01	D	FLPSDFFPSV	<357	neg	pos	26	Peg-IFN-a2a 01/2012
HBV135	w	33	A*23:01 B*51:01	D	FLPSDFFPSV	<357	neg	pos	16	Keine
HBV152m	m	36	A*01:01,11:01 B*49:01,51:01	n.v.	-	<357	pos	neg	68	Tenofovir 2001
HBV187m	m	33	A*26:02,33:01 B*14:02,51:01	D	FLPSDFFPSV	7293000	neg	pos	152	Peg-Interferon 11/2012
HBV189	w	31	A*11:01 B*18:01,51:01	D	FLPSDFFPSV	336900	pos	neg	34	Entecavir 06/2011

## Patienten und Materialien

<b>HBV280</b>	w	65	A*26:01,31:01 B*38:01,51:01	D	FLPSDFFPSV	135	pos	neg	47	Entecavir	11/2011
<b>HBV310</b>	m	44	A*29:01/02,33:01 B*50:01,51:01	D	FLPSDFFPSV	23	neg	pos	33	k.A.	
<b>HBV364</b>	m	53	A*11:01,68:01 B*51:01,52:01	D	FLPSDFFPSV		neg	pos	50	Entecavir/ Tenofovir	
<b>HBV379</b>	w	47	A*01:01,31:01 B*51:01,58:01	D	-	51	neg	pos	90	Keine	

**Tabelle 2.16 – Patienten mit chronischer HBV-Infektion mit einer Kombination aus zwei oder drei der HLA-Typen A\*02, B\*35 oder B\*51**

Männlich (m), weiblich (w), nicht verfügbar (n.v.), negativ (neg), positiv (pos), keine Angabe (k.A.)

ID	Geschlecht	Alter	HLA-Haplotyp	HBV Genotyp	Autologe HBV core <sup>18-27</sup> Sequenz	Virus-konzentration	HBeAg	Anti-HBe	ALT	Therapie	
<b>HBV258</b>	m	30	A*01:01,02:01 B*37:01,51:01	D	FLPSDFFPSV	17	pos	neg	84	Tenofovir	09/2009
<b>HBV278</b>	w	51	A*02:01,31:01 B*35:01,51:01	A	FLPHDFFPSV	<10	neg	pos	14	k.A.	k.A.
<b>HBV286</b>	w	54	A*01:01,02:01 B*15:01,51:01	A	FLPSDFFPSA	1424	neg	pos	18	keine	keine
<b>HBV298</b>	m	48	A*02:01 B*35:01, 35:03	D	FLPGDFFPSI	<10	neg	pos	16	Entecavir	03/2009
<b>HBV300</b>			A*02:03,03:02 B*38:02,51:01	D	FLPSDFFPSV	<10	neg	pos		Tenofovir	06/2004
<b>HBV320</b>	m	54	A*02:01,24:02 B35:01,40:01	D	FLPSDFFPSV	<10	neg	pos	21	Tenofovir	06/2003
<b>HBV336</b>	m	37	A*02:01,03:02 B*35:03,44:02	D	FLPSDFFPSV	<10	neg	pos	40	Tenofovir	03/2005
<b>HBV363</b>			A*02:06,26:01 B*35:03,38:01	D	FLPTDFYPSV	<10	neg	pos		Telbivudine	04/2008
<b>HBV369</b>	w	28	A*02:01,29:01/02 B*08:01,51:01	D	FLPSDFFPSA	<10	neg	neg	34	Peginterferon	02/2012
<b>HBV399</b>	m	67	A*02:01,11:01 B*51:01,52:01	n.v.	-	<10	neg	pos	56	keine	keine
<b>HBV404</b>	w	43	A*02:01,03:02 B*35:03,44:02	D	FLPQDFFPNV	<10	neg	pos	32	Tenofovir	10/2009
<b>HBV419</b>	m	21	A*02:01,03:01 B*13:02,35:08	D	FLPSDFFPSV	11	pos	neg	60	Entecavir	07/2010
<b>HBV438</b>	m	20	A*02:01,31:01 B*35:01,51:01	n.v.	-	26	neg	pos	27	keine	keine
<b>HBV451</b>	w	59	A*02:01,68:01 B*7:02,44:02	n.v.	-	432	neg	pos	21	keine	keine
<b>HBV455</b>	m	49	A*02:01,23:01 B*35:01,49:01	D	FLPSDFFPSV	<10	neg	pos	47	Tenofovir	06/2013
<b>HBV462</b>	m	75	A*01:01,02:01 B*07:02,27:03	n.v.	-	31	neg	pos	51	k.A.	2011

## 3. Methoden

### 3.1. Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1. Zelllinien

Die adhärenenten Zelllinien HEK 293T, Huh 7.5 und HepG2 wurden in DMEM Vollmedium bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 80% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zelllinien wurden mindestens zweimal die Woche, bei konfluentem Bewuchs oder nach Bedarf, passagiert. Hierfür wurden abgelöste Zellen, sowie Reste des Mediums, welche die Trypsinbehandlung beeinflussen könnten, mit PBS entfernt. Um die verbleibenden adhärenenten Zellen zu lösen wurden sie für wenige Minuten mit 0,05% Trypsin/EDTA (Gibco) bei 37°C inkubiert. Nach Abstoppen des Enzyms Trypsin durch Aufnahme in frischem, Fötalem Kälberserum (FBS)-haltigem Medium konnten die Zellen im gewünschten Verhältnis bzw. der gewünschten Zellzahl ausgesät werden. Dem Medium für die transduzierten HepG2-Zelllinien P151 und P152 wurde jeweils 25 µg/ml des Antibiotikums Blasticidin zugefügt, um den Verbleib des Plasmids in den Zellen und somit die konstante Expression des HBVcore Proteins, des CMVpp65<sub>495-503</sub> Epitops und des Markers mCherry zu gewährleisten.

#### 3.1.2. Aufreinigung mononukleärer Zellen des peripheren Bluts (PBMCs)

Die PBMCs wurden über eine Ficoll-basierte Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Hierfür wurde das EDTA-Blut von HBV-infizierten Patienten bzw. der Buffy-Coat von gesunden Spendern zur Gewinnung des Plasmas zuerst bei 1455 x g für 15 Min zentrifugiert. Das verbleibende Material wurde mit PBS im Verhältnis 1:2 verdünnt und die Erythrozyten, sowie einen Großteil der Granulozyten, wurden durch Zentrifugation bei 1126 x g für 10 Min in Leucosep™ Zentrifugenröhrchen, deren Filterebene mit 15 ml Biocoll (Merck) unterschichtet war, von den Leukozyten getrennt. Die als Ring aggregierten PBMCs wurden durch vorsichtiges Pipettieren gelöst und der nun PBMCs enthaltende Überstand in ein neues 50 ml Falconröhrchen dekantiert. Nach einem weiteren siebenminütigen Zentrifugationsschritt bei 931 x g, wurden die Zellen zweimal mit 50 ml PBS bei 931 x g für 7 Min gewaschen, gefolgt von der Zellzahlbestimmung mit Hilfe des Zellzählgeräts Sysmex. Die aufgereinigten PBMCs wurden in FBS mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen und über Nacht bei einer Abkühlgeschwindigkeit von -1°C/min in Nalgene® Mr. Frosty Einfrierbehältern auf -80°C tiefgefroren und am darauffolgenden Tag zur Langzeitaufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt.

### 3.1.3. Standardkultivierung von PBMCs

Gefrorene PBMCs wurden zügig bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Durch mehrmaliges Waschen mit 10 ml PBS, sowie zentrifugieren bei 526 x g für 5 min, wurde das toxische DMSO entfernt. Falls nicht anders angegeben, wurden PBMCs daraufhin bei einer Zelldichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in R10 Nährmedium bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 80% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

## 3.2. Kreuzreaktivitätsprofile von spezifischen CD8<sup>+</sup> T Zellen

### 3.2.1. Expansion von epitopspezifischen CD8<sup>+</sup> T Zellen

Zur Bestimmung des Kreuzreaktivitätsprofils spezifischer CD8<sup>+</sup> T- Zellen wurden PBMCs von chronisch HBV infizierten Patienten oder CMV-seropositiven gesunden Spendern aufgetaut, auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in R10 Nährmedium eingestellt und für zehn bzw. elf Tage in Anwesenheit von 25 U/ml des proinflammatorischen Zytokins IL-2, 0,1 µg/ml des kostimulatorischen Agens anti-CD28/CD49, sowie 1 µg/ml des entsprechenden Peptids inkubiert. CD8<sup>+</sup> T- Zellen chronisch HBV infizierter Individuen wurden entweder mit dem HLA-A\*02-restringierten Konsensus epitop HBV<sub>core18-27</sub> (FLPSDFFPSV) oder mit einer von 26 natürlich vorkommenden Varianten dieses Epitops expandiert (Tabelle 2.11). Zur Aktivierung der CMV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen von anti-CMV seropositiven gesunden Spendern wurde das immundominante HLA-A\*02-restringierte CMV-Epitop pp65<sub>495-503</sub> (NLVPMVATV) eingesetzt (Tabelle 2.11). Nach fünf bis sieben Tagen wurde einmalig die Hälfte des Ausgangsvolumens R10 Medium, versetzt mit IL-2 (25 U/ml bezogen auf das zugegebene Medium), zur Kultur gegeben.

### 3.2.2. Restimulation der spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Zur Bestimmung der basalen prototypspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort wurden die PBMCs nach zehntägiger Expansionsphase zunächst mit dem jeweiligen Prototyppeptid restimuliert. Patienten oder Spender, die eine prototypspezifische T-Zellantwort aufwiesen, wurden für die Bestimmung des Kreuzreaktivitätsprofils an Tag 11 der Expansion nochmals mit dem jeweiligen Prototyppeptid oder einer von 19 HBV<sub>core18-27</sub> Varianten bzw. einer von 114 CMVpp65<sub>495-503</sub> Varianten restimuliert. Zusätzlich wurde in fünf reaktiven chronisch HBV Infizierten überprüft, ob CD8<sup>+</sup> T-Zellen, welche spezifisch für eine der 19 Varianten waren, auch kreuzreaktiv gegenüber dem Prototyppeptid waren. Darüber hinaus wurden fünf T-Zellklone mit bekanntem FLPSDFFPSV-spezifischen T-Zell-Rezeptor, auf ihre Kreuzreaktivität hin untersucht (Wisskirchen et al., 2017). Diese wurden freundlicherweise von Ulrike Protzer und Karin Wisskirchen zur Verfügung gestellt. Nach dem Auftauen wurden

diese Zellklone über Nacht in R10 Medium bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 80% Luftfeuchtigkeit inkubiert und am darauffolgenden Tag mit den HBV-spezifischen Peptiden restimuliert. Für die oben genannten Analysen wurden je 100 µl der expandierten Zellsuspension in Vertiefungen einer 96-Loch-U-Bodenplatte überführt, die PBMCs zweimal mit 100 µl bzw. 200 µl PBS gewaschen und für 5 min bei 526 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl R10 Medium resuspendiert, welches mit 100 ng/µl des Sekretionshemmers Brefeldin A (BFA) versetzt war und je nach Fragestellung mit 10 µg/ml der HBV- und CMV-Peptidvarianten oder der Konsensuspeptide HBV<sub>core18-27</sub> und CMV<sub>pp65495-503</sub> für vier Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 80% Luftfeuchtigkeit inkubiert. In dieser Restimulationsphase konnten die aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen, welche das Epitop im Kontext des entsprechenden HLA-Moleküls erkennen können, als proinflammatorische Reaktion IFN $\gamma$  bilden. Durch die Anwesenheit von BFA wird dessen Sekretion inhibiert, sodass das im ER akkumulierte IFN $\gamma$  mit Hilfe einer intrazellulären Zytokinfärbung fluoreszierend markiert werden kann konnte.

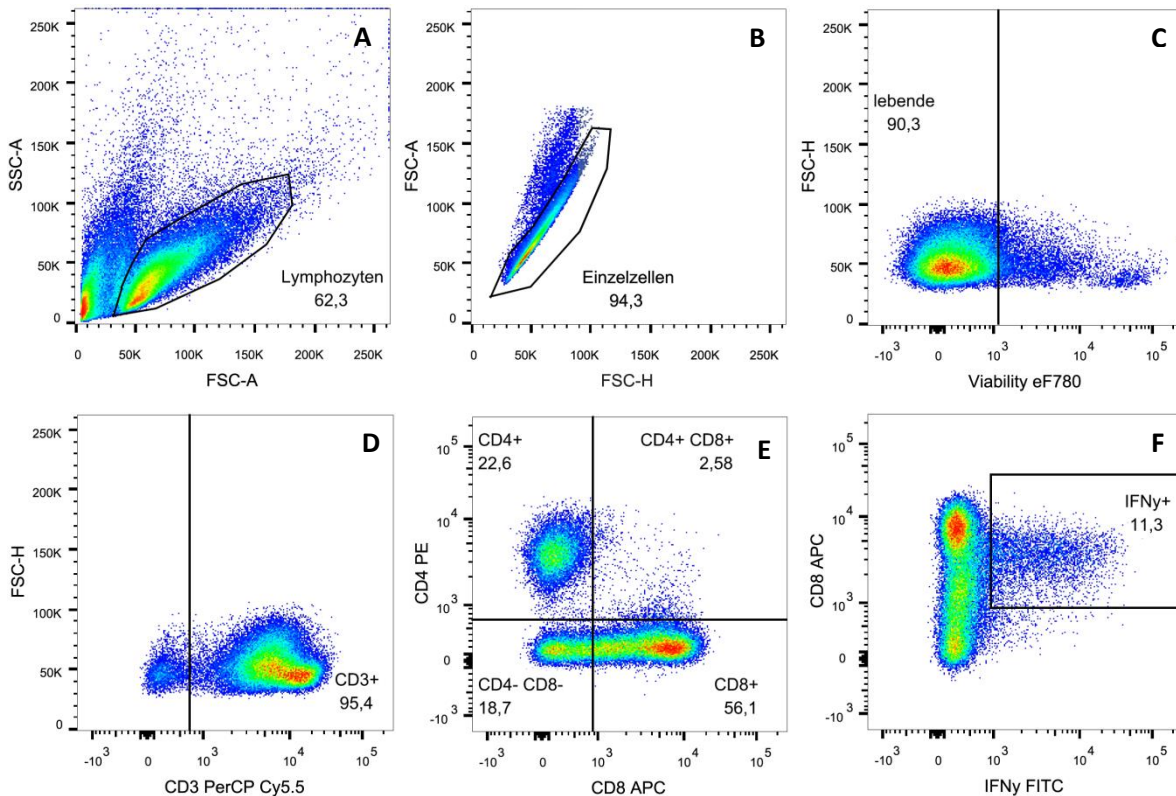
### 3.2.3. Intrazelluläre Zytokinfärbung

Zur Vorbereitung der durchflusszytometrischen Analyse der IFN $\gamma$ -positiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden zunächst die FBS-Rückstände des Mediums durch Zugabe von 100 µl bzw. 200 µl PBS, gefolgt von jeweils einem Zentrifugationsschritt bei 526 x g für 5 Min und dem Ausschlagen der Platte, entfernt. Dies erlaubte das Anfärben toter Zellen mit dem fixierbaren Zellviabilitätsfarbstoff eFluor780. Nach einem weiteren PBS-Waschschritt wurden T-Zellspezifische Oberflächenmoleküle, zur Diskriminierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen, innerhalb einer 15-minütigen Inkubationszeit bei 4°C im Dunkeln fluoreszierend, markiert. Standardmäßig wurden hierfür verdünnt in 100 µl PBS die Fluorochrom-gekoppelten Antikörper anti-*Cluster of differentiation 3* ( $\alpha$ CD3)-PerCP Cy5.5 (2 µl/10<sup>6</sup> Zellen),  $\alpha$ CD4-PE (1 µl/10<sup>6</sup> Zellen) und  $\alpha$ CD8-APC (1 µl/10<sup>6</sup> Zellen) genutzt. Die intrazellulären Proteine, sowie die extrazellulär gebundenen Antikörper wurden, nachdem überschüssige Antikörper mit PBS gewaschen worden waren, mit 100 µl des Fixierungspuffers des *Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Sets* für 15 min bei 4°C im Dunkeln fixiert. Zur Entfernung dieses Puffers, sowie zur Erhöhung der Membrandurchlässigkeit der PBMCs, wurden die Zellen zweimal mit 100 µl bzw. 200 µl des Permeabilisierungspuffers gewaschen. Um zu gewährleisten, dass intrazellulär vorhandenes IFN $\gamma$  von dem anti-IFN $\gamma$ -FITC Antikörper (1 µl/10<sup>6</sup> Zellen) gebunden werden konnte, wurden die Zellen mit diesem Antikörper für 15 min bei 4°C ebenfalls in Permeabilisierungspuffer inkubiert. Nach diesem letzten Färbeschritt wurden die PBMCs noch einmal mit PBS bei 526 x g für 5 min gewaschen und zentrifugiert,

sodass überschüssige Antikörper entfernt wurden. Die in 100  $\mu$ l PBS resuspendierten PBMCs wurden schließlich zur durchflusszytometrischen Analyse in FACS-Röhrchen überführt.

### 3.2.4. Durchflusszytometrische Analyse

Zur Analyse der fluoreszenzmarkierten Zellen wurden ein BD FACSCanto™ II bzw. ein BD LSRFortessa™ genutzt. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten wurde mit der Analysesoftware FlowJo X 10.0.7, Microsoft Excel 2010, sowie GraphPad Prism5.04 durchgeführt.



**Abbildung 3.1 - Gatingstrategie einer klassischen intrazellulären Zytokinfärbung.**

Nach Auswahl der Lympozyten (A) werden die Einzelzellen (B) von den Dupletten separiert. Aus dieser Population werden die ungefärbten lebenden Lympozyten (C) ausgewählt, gefolgt von der Auswahl von T-Zellen, also CD3<sup>+</sup> Lympozyten (D). Die CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten werden daraufhin unterteilt in CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> T-Lymphozyten (E). Der Anteil IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen wird aus den CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt (nicht gezeigt). Abbildung F zeigt repräsentativ, dass durch HLA-Klasse I restringierte Epitope vor allem CD8<sup>+</sup>, jedoch nicht CD8<sup>-</sup> T-Zellen zur IFN $\gamma$ -Produktion angeregt werden. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der jeweils ausgewählten Population an der Gesamtanzahl der in dem jeweiligen Feld gezeigten Events an.

Nach der entsprechenden Kompensation der Fluorochrome mit der BD FACSDIVA™ Software, wurden mit Hilfe von FlowJo die IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen, wie in Abbildung 3.1 dargestellt, detektiert. Nach Auswahl der Lympozytenpopulation, anhand der Größe (Vorwärtsstreulicht; FSC) und der Granularität (Seitwärtsstreulicht; SSC), und des Ausschlusses der Dupletten, deren Längen- zu Flächenverhältnis (FSC-H:FSC-A) verschoben ist, wurden die ungefärbten lebenden Zellen von den eFluor780-positiven toten Zellen abgegrenzt. Die Population der lebenden Zellen wurde weiter eingegrenzt auf PerCP Cy5.5<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> Zellen, also T-Zellen. Über die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD4 und

CD8 wurde die Population der zytotoxischen CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten isoliert betrachtet und der Anteil IFN $\gamma$ -produzierender T-Zellen in dieser Untergruppe detektiert. Die Prozentangaben wurden in Microsoft Excel 2010 exportiert, gegebenenfalls durch den Wert der Negativkontrolle, die nicht mit Peptid restimuliert wurde korrigiert und graphisch in GraphPad Prism5.04 aufbereitet.

### 3.2.5. Phänotypische Charakterisierung der HBVcore<sub>18-27</sub> spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Zur Untersuchung des Einflusses der Epitopvariationen auf den Phänotyp von HBVcore-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, wurde die Expression verschiedener Differenzierungs- und Aktivierungs- bzw. Inhibierungsmarker auf PBMCs von Patienten mit unterschiedlichen autologen HBV-Virussequenzen analysiert. Hierfür wurden 2x10<sup>6</sup> PBMCs von HLA-A\*02:01-positiven Patienten, direkt nach dem Auftauen, fluoreszierend markiert. Zunächst wurden tote bzw. apoptotische Zellen mit dem Viabilitätsfarbstoff 575V (1:1000, BD) für 15 min bei 4°C gefärbt, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation mit einem HLA-A\*02:01:FLPSDFFPSV-APC Dextramer (2  $\mu$ l/10<sup>6</sup> Zellen, Immudex, Dänemark) bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln. In einem letzten Färbeschritt wurden neben den CD8<sup>+</sup> T-Zelldifferenzierenden Molekülen, die mit den Antikörpern  $\alpha$ CD3 APC-H7 (1  $\mu$ l/10<sup>6</sup> Zellen, BD),  $\alpha$ CD4 BV605 (5  $\mu$ l/10<sup>6</sup> Zellen, BD) und  $\alpha$ CD8 BV510 (1  $\mu$ l/10<sup>6</sup> Zellen, BD) gefärbt wurden, Aktivierungs-, Inhibierungs- und Differenzierungsmarker auf der Oberfläche der Zellen markiert. In einem Ansatz wurden die folgenden Antikörper für die Färbung der Oberflächenmoleküle genutzt,  $\alpha$ CD38 PE-Cy<sup>TM</sup>7 (5  $\mu$ l/10<sup>6</sup> Zellen, BD),  $\alpha$ CTLA-4-PE (CD152, 20  $\mu$ l/10<sup>6</sup> Zellen, BD),  $\alpha$ CD127 BV711 (5  $\mu$ l/10<sup>6</sup> Zellen, BD),  $\alpha$ PD-1 BV650 (CD279, 5  $\mu$ l/10<sup>6</sup> Zellen, BD),  $\alpha$ TIM-3 BV421 (CD366, 2,5  $\mu$ l/10<sup>6</sup> Zellen, BD),  $\alpha$ KLRG1 PerCP-Cy5.5 (5  $\mu$ l/10<sup>6</sup> Zellen, biolegend),  $\alpha$ 2B4 PE-CF594 (CD244, 5  $\mu$ l/10<sup>6</sup> Zellen, BD) angefärbt. Ein zweiter Ansatz färbte neben den T-Zelldifferenzierenden Molekülen CD3, CD4 und CD8 auch weitere Marker CCR7 Alexa Fluor®700 (CD197, 2,5  $\mu$ l/10<sup>6</sup> Zellen, BD), CD27 BV786 (2,5  $\mu$ l/10<sup>6</sup> Zellen, BD), CD45RA BB515 (2,5  $\mu$ l/10<sup>6</sup> Zellen, BD).

### 3.3. Titration häufig vorkommender HBVcore<sub>18-27</sub> Varianten

Beispielhaft wurde in zwei chronisch HBV-Infizierten eine Auswahl von häufig vorkommenden HBVcore<sub>18-27</sub>-Epitopvarianten titriert. Hierfür wurden HBVcore<sub>18-27</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Patienten, wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, für zehn Tage mit dem Prototyppeptid expandiert. Zur Restimulation (s. Abschnitt 3.2.2) wurden die

Epitopvarianten HBVcore<sub>18-27</sub> F24Y, S21A, S21T, S21N, V27I, sowie eine Variante mit zwei Substitutionen S21T-F24Y, jeweils in den Konzentrationen 1 µg/ml, 0,01 µg/ml, 0,0001 µg/ml, sowie 0,000001 µg/ml eingesetzt. Die intrazelluläre Zytokinfärbung und durchflusszytometrische Analyse erfolgte, wie in den Abschnitten 3.2.3 und 3.2.4 beschrieben.

### 3.4. HLA-Restriktionsassay

Da es Anzeichen dafür gab, dass das HBVcore<sub>18-27</sub> Epitop (FLPSDFFPSV) neben HLA-A\*02, auch von den HLA-Klasse I Molekülen B\*35 und B\*51 erkannt werden kann (Thimme et al., 2001), wurde untersucht, ob CD8<sup>+</sup> T-Zellen tatsächlich auch über die Präsentation des Epitops im Kontext dieser HLA-Moleküle aktiviert werden können. Hierzu wurden, wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, PBMCs von chronisch HBV-Infizierten aufgetaut und für zehn Tage mit dem HBVcore<sub>18-27</sub> Peptid expandiert. Die gewählten Patienten waren entweder nur HLA-A\*02:01-positiv, exprimierten eine Kombination aus HLA-A\*02:01 und HLA-B\*35:01 oder eine Kombination aus HLA-A\*02:01 und HLA-B\*51. Um zu untersuchen, ob die Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, insbesondere der doppelt positiven Individuen, über die Erkennung des Peptids im Kontext von HLA-A\*02:01, HLA-B\*35:01 oder HLA-B\*51 geschah, wurden zur Restimulation der HBVcore<sub>18-27</sub> spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen peptidbeladene PBMCs von gesunden Spendern, die jeweils nur einen oder keinen dieser HLA-Subtypen exprimieren, genutzt. Diese wurden an Tag neun der Expansion aufgetaut und zur Bindung des Peptids an die HLA-Moleküle, über Nacht mit 10 µg/ml des HBVcore<sub>18-27</sub> Peptids inkubiert. Nachdem überschüssiges ungebundenes Peptid durch dreimaliges Waschen mit PBS und Zentrifugieren bei 526 x g für 5 min entfernt worden war, wurden die PBMCs der gesunden Spender für 20 min bei 37°C mit einem CellTrace™ Violet Farbstoff inkubiert, um die Zellen der gesunden Spender in der späteren Analyse ausschließen zu können. Anschließend wurden die gefärbten Zellen bei 526 x g für 5 min pelletiert und auf 4 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml in R10 Medium mit 100 ng/µl BFA eingestellt. Während dieser Vorbereitungsphase wurden jeweils 4x10<sup>5</sup> PBMCs der HBV-Infizierten in Vertiefungen einer 96-Loch U-Bodenplatte verteilt, für 5 Min bei 526 x g zentrifugiert, die Flüssigkeit aus der Platte geschlagen, mit 200 µl PBS gewaschen und nochmals zentrifugiert. Zu den gewaschenen PBMCs der HBV Infizierten wurden 8 x 10<sup>5</sup> peptidbeladene, vorgefärbte PBMCs der gesunden Spender gegeben, die zusammen für vier Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 80% Luftfeuchtigkeit inkubiert wurden. Da die PBMCs der gesunden Spender dank des CellTrace™ Violet Farbstoffs von den PBMCs der HBV Infizierten diskriminiert werden konnten, wurden die weiter Färbung wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben durchgeführt.

### 3.5. Endogene Prozessierung

Der Effekt der gefundenen *Escape*-Mutationen wirkt sich möglicherweise nicht allein auf die Bindung des HLA-Moleküls und die Erkennung durch den T-Zell-Rezeptor aus. Daher wurden Methoden etabliert, um den Einfluss der Substitutionen auf die endogene Prozessierung mit Hilfe von epitopexprimierenden HLA-A\*02:01-positiven HepG2-Zellen betrachten zu können. Zum einen wurden Plasmide generiert, durch die nach Transfektion das HBVcore<sub>18-27</sub> Epitop transient exprimiert wurde, zum anderen wurden stabile HepG2-Zellen generiert, die durch Transduktion lentiviraler Vektoren das gesamte HBVcore Protein kontinuierlich exprimierten.

#### 3.5.1. Generierung von transient HBVcore exprimierende HepG2-Zellen

##### 3.5.1.1. Klonierung der Basisvektoren p<sub>copGFP</sub>-HBVcore und p<sub>copGFP</sub>-CMV

Zur Herstellung der Basisvektoren wurde zunächst die kodierende Sequenz des, aus dem Ruderfußkrebs *Pontellina plumata* entstammenden, grün fluoreszierenden Protein (copGFP) im Austausch gegen die Hygromycin-Resistenzkassette in den Vektor psec-Nluc eingebracht. Hierfür wurde die, im Plasmid pMAX-GFP kodierte, 888 bp umfassende copGFP-kodierende Sequenz mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert (Tabelle 3.1, Tabelle 3.2) und das Zielplasmid psec-Nluc ebenfalls mittels eines PCR-Schritts geöffnet (Fragmentgröße 4652bp) (Tabelle 3.3, Tabelle 3.4).

Tabelle 3.1 Pipettierprotokoll für die Amplifizierung von copGFP

Mastermix	1x
5X Q5 Reaction Buffer	10 µl
10 mM dNTPs	1 µl
10 µM (+) Primer: copGFP-fwd	1 µl
10 µM (-) Primer: copGFP-rev	1 µl
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0,5 µl
H2O	36 µl
Matrize pMAX-GFP [P115]	Jeweils 0,5 µl (bei ca. 1 µg/ml)

Tabelle 3.2 PCR Programm für die Amplifizierung von copGFP

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	98°C	60 s
Denaturierung	98°C	30 s
Primerhybridisierung	62°C	30 s
Elongation	72°C	30 s (20-30s/kb)
Finale Elongation	72°C	10 min
Pause	4°C	∞

Tabelle 3.3 Pipettierprotokoll zur Amplifizierung und Öffnung des Plasmids psec-Nluc

Mastermix	1x
5X Q5 Reaction Buffer	10 µl
10 mM dNTPs	1 µl
10 µM (+) Primer: (+)-pHygro fwd [18762887]	1 µl
10 µM (-) Primer: (-)-pHygro-rev [18762886]	1 µl
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	36 µl
Matrize psec-Nluc [L28]	Jeweils 0,5 µl (bei ca. 1 µg/ml)

Tabelle 3.4 PCR Programm zur Amplifizierung von psec-Nluc- $\Delta$ hygro

Schritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	98°C	60 s	
Denaturierung	98°C	30 s	
Primerhybridisierung	66°C	30 s	30 Zyklen
Elongation	72°C	30 s (20-30s/kb)	
Finale Elongation	72°C	10 min	
Pause	4°C	∞	

Um zu verhindern, dass zu viel Ursprungs-Plasmid in den weiteren Klonierungsschritten mitgeführt wird, wurden diese Ansätze für 1 h mit 20 U des Restriktionsenzym DpnI (NEB) verdaut. Dies schneidet ausschließlich methylierte DNA, sodass nur eventuell noch vorhandene methylierte Ausgangsplasmide, jedoch nicht die Amplikons der PCR-Reaktion, fragmentiert werden. Nach Kontrolle der PCR-Effizienz mithilfe einer Agarosegelelektrophorese (1%) für 45 min bei 130 V, wurden die PCR Produkte mit dem *QIAquick® PCR Purification Kit* (Qiagen) aufgereinigt und die DNA-Konzentration mit einem NanoDrop2000 bestimmt.

Die beiden Fragmente copGFP und psec-Nluc- $\Delta$ hygro wurden nachfolgend mittels eines *Gibson Assembly* Ansatzes zusammengefügt. Dazu wurden 100 ng psec-Nluc- $\Delta$ hygro, 60 ng copGFP, 10 µl *Gibson Assembly MasterMix* (2x) (NEB) und das benötigte Volumen entmineralisiertes H<sub>2</sub>O in einem 20 µl Ansatz gemischt und für 1 h bei 50°C inkubiert. In dieser Zeit kreierte die Exonuklease Aktivität des Enzyms 3' Einzelstrangüberhänge, an die sich komplementäre Fragmente anheften konnten. Anschließend wurden die entstandenen Lücken durch die Polymerasefunktion aufgefüllt und durch die Ligasefunktion zusammengefügt. Das so ligierte Plasmid konnte bei -20°C gelagert werden, bis es in *Escherichia coli* (*E. coli*) transformiert wurde, wie in Abschnitt 3.5.1.2 noch beschrieben wird.

Nach Analyse der Sequenz und Amplifikation des so generierten Leervektors pcopGFP wurden die synthetisierten Fragmente HBVcore<sub>10-35</sub>-Konsensus, pp65<sub>487-511</sub>-CMV-CMVflankiert und pp65<sub>495-503</sub>-CMV-HBVflankiert, sowie pp65<sub>487-511</sub>-CMV-p553 und pp65<sub>487-511</sub>-CMV-p557 (Tabelle 2.10) ebenfalls mittels Gibson Assembly in diesen eingebracht. Zunächst wurde der Vektor in einem PCR-Schritt geöffnet und amplifiziert, hierfür wurden die Primer pcopGFP-

HBV-fwd, pcpoGFP-HBV-rev bzw. GA\_CMV\_p553-557\_rev und GA\_CMV\_p553-557\_fwd (Tabelle 2.10), wie in Tabelle 3.1 für die vorangegangene PCR beschrieben, verwendet. Allerdings wurde abweichend von Tabelle 3.2 für den Hybridisierungsschritt der HBV-Varianten 64°C und für die CMV-Varianten 68°C gewählt. Die Elongation fand für 110 s bzw. 130 s statt. Wie oben beschrieben wurde das PCR-Produkt mit DpnI verdaut, mit einem 1%-igen Agarosegel kontrolliert und aufgereinigt. Die HBVcore und CMVpp65 Fragmente, sowie die 5550 bp bzw. 5528 bp großen geöffneten Plasmide wurden für 1 h bei 50°C mit Hilfe des *Gibson Assembly MasterMixes* (2x) assembliert. Dafür wurden 100 ng des Vektors pcpoGFP, 10 ng synthetisiertes HBVcore- oder CMVpp65-Prototyp-Fragment bzw. 25 ng des pp65-CMV-p553 oder -p557 Fragments und 10 µl *Gibson Assembly MasterMix* (2x) mit H<sub>2</sub>O auf ein Reaktionsvolumen von 20 µl aufgefüllt und inkubiert. Wiederum wurden ausgewählte transformierte *E. coli* Klone angezüchtet (s. 3.5.1.2), mit dem Restriktionsenzym NcoI in NEB CutSmart-Puffer zur Kontrolle verdaut und mit den Primern (+)-CMV-Promoter und (-)-pFUSE-PolyA (Tabelle 2.10) sequenziert. Korrekte Klone wurden in großem Maßstab angezüchtet, um die Plasmide in weiteren Versuchen einzusetzen.

### 3.5.1.2. Transformation der Plasmide in *E. coli*

Zur Transformation der Plasmide in chemisch kompetente *E. coli* wurden 2 µl des *Gibson Assembly* Ansatzes mit 50 µl der auf Eis aufgetauten Bakterien vorsichtig vermischt. Nach einer zehnmütigen Inkubationsphase auf Eis, zur Anlagerung der Plasmide an die Bakterienmembran, wurde die Membran durch den darauffolgenden Hitzeschock bei 42°C für 30 s kurzzeitig für die Plasmide permeabel. Ein Kälteschock für 2 min auf Eis machte dies wieder rückgängig. Zur Regeneration der Bakterien wurden diese für eine Stunde bei 37°C und 600 rpm in 250 µl SOC Medium in einem Heizblock inkubiert, bevor sie auf warmen Luria Bertani (LB)-Agarplatten mit 100 µg/ml des Antibiotikums Ampicillin ausgestrichen wurden. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C wurden Einzelklone ausgewählt, deren Plasmide auf die Fusion der beiden generierten Fragmente geprüft werden sollten. Nach Kultivierung der gewählten Klone über Nacht in 3 ml LB-Medium, supplementiert mit 100 µg/ml Ampicillin, bei 37°C in Bewegung, wurden die Plasmide mit dem *QIAprep® Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) isoliert und 1 µg für 1 h bei 37°C mit 10 U des Restriktionsenzym KpnI in einem Reaktionsvolumen von 20 µl, welches 5 µl CutSmart Puffer (NEB) enthielt, verdaut. Mit einem 1% Agarosegel wurde kontrolliert, ob sich das entsprechende Bandenmuster ergeben hat. War dies der Fall wurden 15 µl des isolierten Plasmids entweder mit 2 µl des Primers (+)-HSV-TK-promoter oder des Primers (-)-HSV-TK-PolyA-Rev (je 10 µM) (Tabelle 2.10) zum Sequenzieren an die Firma Eurofins Genomics verschickt. Ergab die Sequenzierung, dass die

korrekten Plasmide vorlagen, wurden die entsprechenden Einzelklone in einem größeren Volumen Ampicillin-supplementiertem LB-Medium über Nacht bei 37°C angezchtet und mit dem QIAGEN® Plasmid Maxi Kit aufgereinigt. Die so gewonnenen Plasmide konnten entweder für weitere Klonierungsschritte oder für die Transfektion von Zelllinien genutzt werden.

### **3.5.1.3. Generierung spezifischer Varianten der Plasmide p<sub>cop</sub>GFP-HBV<sub>core</sub> und p<sub>cop</sub>HBV-CMV-CMVflankiert**

Mittels zielgerichteter Mutagenese, welche sich der PCR-Technik bediente, wurde die natürlich vorkommende Substitutionen F24Y in das Plasmid p<sub>cop</sub>GFP-HBV<sub>core</sub> eingebracht. Für die zielgerichtete Mutagenese wurden zur Amplifizierung des Plasmids die Primer HBV\_F24Y\_modification\_fwd und HBV\_consensus\_rev\_forF24Y genutzt, die die gewünschten Nukleotidsubstitutionen trugen, sodass in den entstehenden Amplikons eben jenes Nukleotid eingebaut wurde. Bei einer Hybridisierungstemperatur von 64°C wurde die Variante des Ausgangsplasmids p<sub>cop</sub>GFP-HBV<sub>core</sub> mit einem Standard-PCR-Protokoll generiert. Abweichend von Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2 wurde eine Elongationszeit von 130 s gewählt.

### **3.5.1.4. Transfektion der Plasmide in HepG2-Zellen**

Die in Abschnitt 3.5.1 beschriebenen Plasmide wurden zur Transfektion von HepG2-Zellen und zur Kontrolle der Transfektionseffizienz einmalig auch zur Transfektion von HLA-A\*02-negativen HEK293T-Zellen eingesetzt. Anhand der GFP-Expression sollte beurteilt werden, ob die kodierende Sequenzen der Plasmide tatsächlich transkribiert und translatiert werden und somit die Prozessierung und damit die Präsentation der Epitope im Komplex mit HLA-A\*02:01 überhaupt möglich ist.

Zur Transfektion wurden in dem gewünschten Volumen  $3 \times 10^5$  HepG2-Zellen/ml in 12-Lochplatten, T75er Zellkulturflaschen oder in T175er Zellkulturflaschen ausgesät. Sobald eine Konfluenz von 80% erreicht war, wurden die Zellen transfiziert. Hierzu wurde beispielweise für die Transfektion in 12-Lochplatten zunächst 1 µg Plasmid-DNA mit 100 µl Opti-MEM und 3 µl des Transfektionsreagens TransIT-LT1 für 30 min bei RT inkubiert. Die in dieser Zeit entstandenen TransIT-LT1:DNA-Komplexe, wurden daraufhin tröpfchenweise auf die Zellen in den einzelnen Vertiefungen gegeben. Nach 24 h wurde der Transfektionserfolg entweder mit einem Fluoreszenzmikroskop oder durchflusszytometrisch kontrolliert.

### **3.5.1.5. Sortierung der transfizierten GFP-positiven HepG2-Zellen**

Die generierten GFP-exprimierenden HepG2-Zellen wurden 24 h nach Transfektion in einem BD FACSAria II anhand ihrer GFP-Expression sortiert und je nach Sortierausbeute á  $3 \times 10^4$

bis  $1 \times 10^5$  Zellen ausgesät. Die zehn Tage zuvor expandierten PBMCs wurden 48 h nach Transfektion, der Zeitpunkt an dem die Frequenz der GFP-positiven Zellen am höchsten war, zugegeben und für 4 h mit diesen restimuliert.

### 3.5.2. Stabil HBVcore exprimierende HepG2-Zelllinien

Die HepG2-Zelllinien, welche stabil HBVcore exprimieren, wurden freundlicherweise von Andreas Walker zur Verfügung gestellt. Kurz zusammengefasst wurden zunächst die beiden Plasmide pWPI-BSD-core-mCherry-pp65 (P151, pt) und pWPI-BSD-F24Y-core-mCherry-pp65 (P152, F24Y), die das HBVcore Protein im HBVcore-mCherry-pp65-Fusionsprotein kodieren, mittels Gibson Assembly hergestellt. Diese Plasmide wurden für die Generierung lentiviraler Vektoren genutzt, mit denen anschließend HepG2-Zellen transduziert werden konnten. Um die konstante Expression des Fusionsproteins zu gewährleisten und zu verhindern, dass die HepG2-Zellen wieder in den Wildtyp revertieren, wurden die Zellen in DMEM Vollmedium versetzt mit  $25 \mu\text{g/ml}$  Blasticidin kultiviert. Dies führte dazu, dass nur die resistenten Zellen, durch die auf den Vektoren kodierte Blasticidinresistenzkassette (BSD), teilungsfähig blieben.

### 3.5.3. Prozessierungsassay

#### 3.5.3.1. Restimulation von epitopspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus PBMCs mit den transient bzw. stabil HBVcore exprimierenden HepG2-Zellen

Wie in Abschnitt 3.2.1 bereits beschrieben, wurden zur Etablierung des Prozessierungsassays, PBMCs von CMV-seropositiven gesunden Spendern bzw. chronisch HBV Infizierten für 10 Tage mit CMVpp65<sub>495-503</sub> bzw. HBVcore<sub>18-27</sub> expandiert. Diese wurden an Tag 10 zu den zuvor sortierten transient HBVcore<sub>18-27</sub> exprimierenden HepG2-Zellen in einem Verhältnis von 5:1 bzw. für einige Fragestellung 2:1 hinzugegeben.

Die transduzierten HepG2-Zelllinien P151 (pt), P152 (F24Y), die das gesamte HBVcore Protein endogen als HBVcore-mCherry-pp65 Fusionsprotein exprimierten und prozessierten wurden ebenfalls zur Stimulation von 10 Tage expandierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen eingesetzt. Die HepG2-Zelllinien wurden hierfür jeweils á  $1 \times 10^5$  Zellen in einer 48-Lochplatte ausgesät. Anschließend wurden nach einer Übernachtinkubation die expandierten PBMCs in einem Verhältnis von 5:1 zugegeben.

Nach einer vierstündigen Inkubationszeit wurde das intrazellulär produzierte IFN $\gamma$  in CD8<sup>+</sup> T-Zellen wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben mit einer intrazellulären Zytokinfärbung angefärbt und mittels durchflusszytometrischer Analyse detektiert. Im Fall der transfizierten GFP-positiven HepG2-Zellen, als Zielzellen, wurden die in Abschnitt 3.2.3 genannten

Standardantikörper spezifisch für CD8 und IFN $\gamma$  durch die Antikörper  $\alpha$ CD8 eF450 (0,2  $\mu$ l/1x10<sup>6</sup> Zellen) und  $\alpha$ IFN $\gamma$  APC (0,25  $\mu$ l/1x10<sup>6</sup> Zellen) ersetzt, um zu unterbinden, dass einzelne GFP<sup>+</sup>-HepG2-Zellen in das IFN $\gamma$ -Gate fallen. Wurden die transduzierten HepG2-Zellen als Zielzellen eingesetzt, wurden der  $\alpha$ CD4 Antikörper durch  $\alpha$ CD4-BV605 (5  $\mu$ l/1x10<sup>6</sup> Zellen) ersetzt.

### 3.6. Bindungsaffinität

Um eine CMVpp65 Variante zu finden, die in ihrer TCR Avidität mit HBVcore<sub>18-27</sub> vergleichbar war, wurden, neben Erstellung des Kreuzreaktivitätsprofils, zunächst *in silico* alle 114 generierten Varianten, auf ihre theoretische Bindungsaffinität hin untersucht. Die fünf Peptidvarianten, deren Reduktion der Peptidkonzentration die stärksten Effekte auf die CD8<sup>+</sup>-Antwort verzeichneten, wurden zudem mittels *in vitro* Bindungsversuchen in Kollaboration mit Wim von Esch (Sanquin Blood Supply, Amsterdam) auf ihre tatsächliche Bindekapazität an das HLA-A\*02:01-Molekül getestet. Aus diesen Daten ergaben sich zwei interessante Kandidaten, die zuletzt im Vergleich zur Prototypvariante titriert wurden, um die Konzentration zu ermitteln, die nötig war, um reduzierte IFN $\gamma$ -Antworten zu erzielen, die eventuell vergleichbar mit HBVcore<sub>18-27</sub> spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten wären.

#### 3.6.1. *In silico* Prognose

Zur theoretischen Vorhersage wurde *in silico* mit Hilfe der Immune Epitope Database und dem dort verfügbaren Analysealgorithmus *MHC-I Binding Predictions* (genutzt am 26.02.2017) (Kim et al., 2012), der die Vorhersagen der Datenbankalgorithmen ANN, auch als NetMHC (4.0) bekannt (Nielsen et al., 2003, Lundegaard et al., 2008, Andreatta and Nielsen, 2016), SMM (Peters and Sette, 2005) und Comblib (Sidney et al., 2008) nutzt, der kombinierte Bindungswert „Perzentilrang“ ermittelt. Je kleiner der ermittelte Konsensusperzentilrang aus der Kombination der drei verschiedenen Algorithmen ist, desto stärker bindet das Epitop an das HLA-Molekül (Nielsen et al., 2003, Peters and Sette, 2005, Lundegaard et al., 2008, Sidney et al., 2008, Kim et al., 2012, Andreatta and Nielsen, 2016).

#### 3.6.2. *In vitro* Bindungsassay

Die Bindung von fünf ausgewählten CMVpp65<sub>495-503</sub> Varianten wurde zudem von der Sanquin Blutbank (Amsterdam, Niederlande) in einem *in vitro* Testverfahren, wie bereits beschrieben, untersucht (Toebe et al., 2006, Ziegler et al., 2014). Hierzu wurde mit einem Sanquin-eigenen PeliChange p\*HLA-A\*0201 Kit (Katalognummer M2802; Sanquin) der Austausch eines an ein HLA-A\*02:01-Molekül gebundenen Kontrollpeptids (pHLA) durch die zu untersuchenden

Peptide (50  $\mu\text{M}$ ) unter Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (366 nm UV-Lampe, Camag, Muttenz, Schweiz) quantifiziert. Die Quantifizierung der Komplexe in denen das Kontrollpeptid durch das jeweilige Peptid von Interesse ausgetauscht war, wurde mit einem ebenfalls Sanquin-eigenen PeliScreen HLA class I ELISA Kit durchgeführt. Anhand des Absorptionsgrads des hochaffin bindenden Prototyppeptids wurde die Anwesenheit von intakten HLA-Klasse I Komplexen für alle Varianten relativiert. So konnte für jede Variante angegeben werden, wie stark die Anzahl der intakten Komplexe von denen in der Prototypkontrolle abweicht. Als Negativkontrolle wurde, wie beschrieben, das HLA-A\*01:01-restringierte Peptid CTELKLSDY genutzt (Toebes et al., 2006).

### 3.6.3. Titration von Peptiden

Ähnlich wie in den Abschnitten 3.3 und 3.2 beschrieben wurde zunächst das Prototyppeptid, beginnend mit einer finalen Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  im Restimulationsansatz, in 1:10 Verdünnungsschritten bis zu einer Konzentration von  $10^{-9}$   $\mu\text{g/ml}$  in CMV-seropositiven gesunden Spendern titriert. Fünf Varianten, die bei der ermittelten reduzierten Konzentration  $10^{-2}$   $\mu\text{g/ml}$ , eine starke Abweichung von der  $\text{IFN}\gamma$ -Antwort bei Standardkonzentration zeigten, wurden ebenso titriert wie der Prototyp.

## 3.7. Analyse des Proteasomverdauprofils

Zur Detektion von Einflüssen der Substitutionen auf den proteasomalen Verdau der zytosolisch vorhandenen HBVcore Peptide wurden N- und C-terminal elongierte HBVcore<sub>18-27</sub> Peptide *in vitro* verdaut und die entstehende Fragmentkomposition wurde mittels massenspektrometrischer Analyse ermittelt.

### 3.7.1. *In vitro* Proteasomverdau und massenspektrometrische Analyse

Mit dem 20S Proteasome Assay Kit, SDS-Activation Format (Katalognummer #K-900, BostonBiochem) wurden die Peptide EFGASVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASAL (pt) und EFGASVELLSFLPSDFYPSVRDLLDTASAL (F24Y) (EMC, Tübingen) verdaut. Dies und die massenspektrometrische Analyse wurden wie bereits beschrieben durchgeführt (Walker et al., 2015). Kurz zusammengefasst wurden in Duplikaten 15  $\mu\text{g}$  des entsprechenden Peptids (Ausgangskonzentration: 10 mg/ml), 3  $\mu\text{g}$  Proteasom (1 mg/ml), 18,75  $\mu\text{l}$  20X Reaktionspuffer, 3,75  $\mu\text{l}$  100X Aktivierungslösung (SDS) mit destilliertem  $\text{H}_2\text{O}$  auf ein Reaktionsvolumen von 375  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Diese Ansätze wurde für 6 h bei  $37^\circ\text{C}$  im Heizblock inkubiert und nach 0 h, 1 h und 6 h wurden Proben von je 125  $\mu\text{l}$  abgenommen. Für jeden Zeitpunkt wurde 375  $\mu\text{l}$  eiskaltes Azeton in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt, um die

Aktivität des Proteasoms zum gegebenen Zeitpunkt durch Fällung direkt abstoppen zu können. Als Nullstundenwert wurde das entsprechende Volumen Reaktionslösung vor der Zugabe des Proteasoms abgenommen. Zur besseren Auflösung im Massenspektrometer, wurde dieser Probe das Proteasom nachträglich in Anwesenheit des inaktivierenden Azetons zugeführt. Die abgenommenen Proben wurden bei -20°C gelagert. Im Anschluss daran wurde das gefällte Proteasom bei 4°C und 15 000 rpm für 30 min pelletiert, sodass der Überstand in ein neues proteasomfreies Reaktionsgefäß überführt werden konnte.

In Kooperation mit Barbara Sitek und Dominik Megger, des Proteasomcenters in Bochum, wurde ein Teil der so generierten Produkte zunächst mittels Aminosäureanalyse auf die vorhandenen Größen untersucht, bevor sie für die Messung mit einem *Linear Trap Quadrupole (LTQ) Orbitrap* Massenspektrometer durch Mitarbeiter des Proteasomcenters vorbereitet wurden wie zuvor bereits auf ähnliche Weise durchgeführt (Megger et al., 2013, Walker et al., 2015).

### 3.7.2. Analyse des Fragmentprofils

Durch die nachgeschaltete Analyse der massenspektrometrischen Daten, durch die Mitarbeiter des Proteasomcenters, mit der *Proteome Discoverer Software* Version 1.4.1.14 (Thermo Scientific, Deutschland) und den Algorithmen der Software *Sequest* (Borisenko et al., 1994), die mit einer Datenbank der eingesetzten Sequenzen arbeitet, konnten die tatsächlich im Peptid enthaltene Fragmente (Konfidenzlevel der Peptididentifikation FDR >1%) identifiziert werden und als *Peptide spectrum matches* (PSM) quantifiziert angegeben werden (Megger et al., 2013, Walker et al., 2015). So ergab sich für jeden Zeitpunkt und jedes Peptid ein spezifisches Fragmentprofil, welches genauer analysiert wurden. Anhand der Summe der gesamten PSM-Werte einer Probe wurden die einzelnen Fragmenthäufigkeiten normalisiert und fortan als normalisierte Spektralindices angegeben. Die normalisierten Spektralindices gleicher Fragmente der Versuchsduplikate wurde gemittelt. Mithilfe dieser normalisierten Spektralindices konnte zum einem die relative Häufigkeit spezifischer Fragmente beim Verdau des Prototyppeptids oder der Variante untersucht werden. Zum anderen wurde verglichen, ob Positionen existieren, die häufiger im Prototyppeptid als Schnittstelle des Proteasoms fungieren, als im Peptid mit der F24Y Substitution oder umgekehrt. Dafür wurden sämtliche Fragmente nach ihrem N- und C-Terminus geordnet und die jeweilige Schnittstelle identifiziert. Die gemittelten normalisierten Spektralindices aller Fragmente, die beispielweise nach der Aminosäure an Position 2 im Ausgangspeptid gespalten waren, also mit GASVELL begannen, wurden getrennt für den N- und C-Terminus addiert und die Differenz zwischen Prototyp und F24Y gebildet.

### 3.8. Sequenzanalysen und HLA-Typisierung

Die Frequenzen der im HBV<sub>core18-27</sub> Epitop vorhandenen Substitutionen in den autologen viralen Sequenzen wurden mit dem Kalkulationsprogramm Microsoft Office Excel 2010 analysiert. Mittels eines zweiseitigen exakten Tests von Fisher wurden determiniert, ob signifikante Assoziationen zwischen dem Vorhandensein bestimmter Substitutionen im HBV<sub>core18-27</sub> Epitop und den HLA-Subtypen HLA-A\*02:01, HLA-B\*35:01/03 und HLA-B\*51 bestehen. Mittels PCR-basierter Methoden wurden die autologen HBV Sequenzen der Patienten von Helenie Kefalakes und Tatjana Schwarz amplifiziert und darauffolgend mittels Sanger-Sequenzierung sequenziert (Kefalakes et al., 2015a, Schwarz et al.) (unveröffentlichte Daten von Schwarz et al.). Die vierstellige HLA-Klasse I-Typisierung der Patienten mit einer HBV-Infektion und der gesunden Spender wurde mittels eines LABType™ SSO Typisierungstests (OneLamda Inc., USA) im Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Essen wie bereits beschrieben durchgeführt (Heinemann, 2009, Thöns et al., 2017).

### 3.9. Statistische Analysen

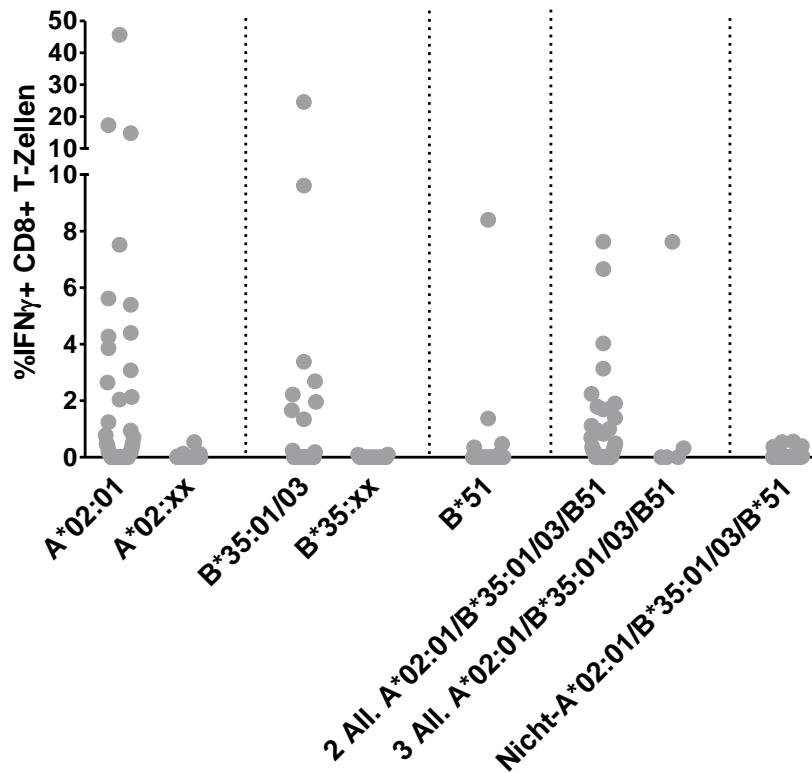
Die statistischen Analysen wurden entweder direkt mit der Software GraphPad Prism 5.04, Microsoft Office Excel 2010 oder der online verfügbaren statistischen Analysesoftware von GraphPad (Motulsky, 2017) durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Das HBVcore<sub>18-27</sub> Epitop kann durch verschiedene HLA-Klasse I Moleküle präsentiert werden

Das in dieser Arbeit genauer untersuchte HBVcore<sub>18-27</sub>-Epitop (FLPSDFFPSV) wurde ursprünglich als HLA-A\*02-restringiertes Epitop beschrieben (Bertoletti et al., 1993). Eine N-terminal um eine Aminosäure verkürzte Version, HBVcore<sub>19-27</sub> (LPSDFFPSV), scheint allerdings HLA-B\*35 und HLA-B\*51 restringiert zu sein (Thimme et al., 2001). Aufgrund einer gewissen Flexibilität der HLA-Peptid-TCR-Bindung (Borbulevych et al., 2009, Sewell, 2012), ist es möglich, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch diese beiden Peptide in unterschiedlichen HLA-Kontexten aktiviert werden können (Thimme et al., 2001). Funktionelle Daten zur Reaktivität von *ex vivo* expandierten HBVcore<sub>18-27</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen von Patienten mit chronischer HBV-Infektion zeigten, dass vor allem rein HLA-A\*02:01-positive Patienten HBVcore<sub>18-27</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen besitzen, Patienten mit anderen HLA-A\*02-Subtypen jedoch tendenziell nicht (Abbildung 4.1). Auch Patienten, die die Subtypen HLA-B\*35:01 oder HLA-B\*35:03 exprimieren, wiesen im Vergleich zu anderen HLA-B\*35-Subtypen, deutliche CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten gegenüber dem zehn Aminosäuren langen Peptid auf, ebenso wie Patienten, die HLA-B\*51-positiv sind oder eine Kombination aus zwei oder drei der Allele HLA-A\*02:01, HLA-B\*35:01/03 und HLA-B\*51 tragen. Nicht-HLA-A\*02:01/B\*35:01/03/B\*51-Träger zeigten keine CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten gegenüber dem HBVcore<sub>18-27</sub> Epitop (Abbildung 4.1).

Da tatsächlich zusätzlich zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen von HLA-A\*02:01-positiven Patienten auch T-Zellen von HLA-B\*35:01/03- oder HLA-B\*51-tragenden Patienten durch das HBVcore<sub>18-27</sub> Epitop aktiviert werden können, wurde untersucht über welchen HLA-Subtypen CD8<sup>+</sup> T-Zellen chronisch HBV-infizierter Patienten, die mehr als einen dieser HLA-Typen exprimieren, das zu untersuchende Prototyppepitop erkennen. Expandierte epitopspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen von Patienten, die ausschließlich HLA-A\*02:01-positiv waren oder aber HLA-A\*02:01 in Kombinationen mit HLA-B\*35:01/03 oder HLA-B\*51 aufweisen, wurden hierfür mit peptidbeladenen PBMCs von gesunden Spendern, die jeweils nur einen dieser HLA-Subtypen exprimieren, restimuliert und auf ihre IFN $\gamma$ -Produktion untersucht.

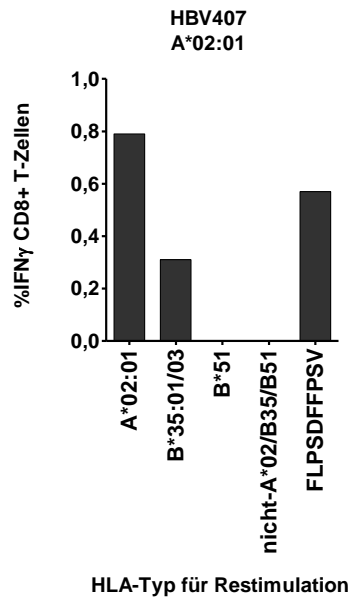
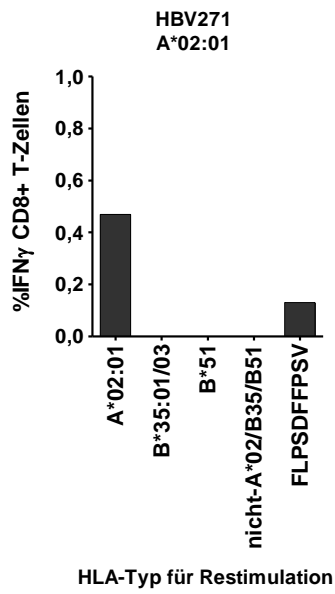


**Abbildung 4.1 – HBVcore<sub>18-27</sub> spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten nach *ex vivo* Expansion**

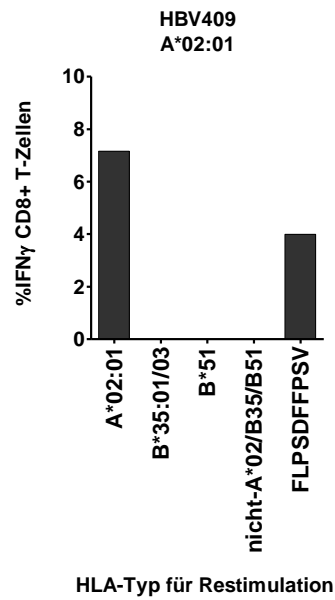
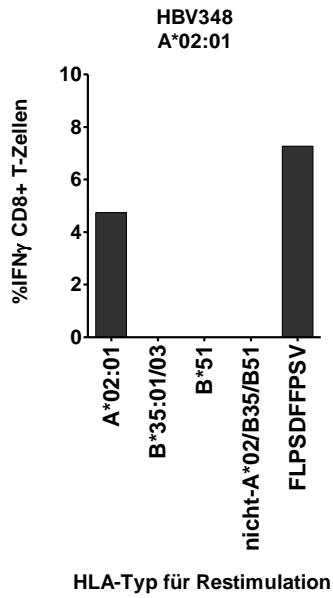
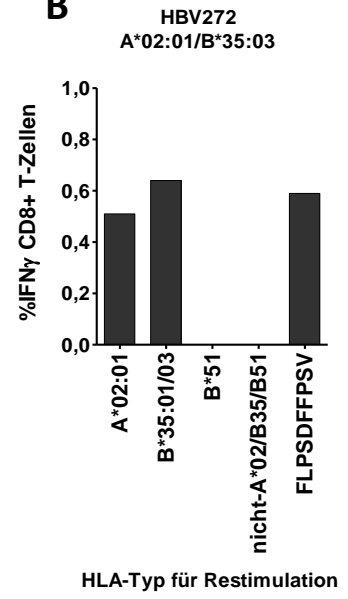
CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus frisch isolierten PBMCs von 179 Patienten mit chronischer HBV-Infektion wurden mit dem HBVcore<sub>18-27</sub> Peptid für zehn Tage expandiert, mit diesem restimuliert und der Anteil IFN $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt. Die Anzahl der Patienten in den unterschiedlichen HLA-Gruppen setzte sich wie folgt zusammen: A\*02:01, n=46; A\*02:xx, n=10; B\*35:01/03, n=27; B\*35:xx, n=12; B\*51, n=18; 2 Allele A\*02:01/B\*35:01/03/B\*51, n=41; 3 Allele A\*02:01/B\*35:01/03/B\*51, n=5; nicht-A\*02:01/B\*35:01/03/B\*51, n=28. Kombinationen aus HLA-A\*02:xx/HLA-B\*35:01/03/xx/HLA-B\*51-Subtypen wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. All. = Allele

Wie sich herausstellte, war es den prototypspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen von Patienten mit kombiniertem HLA-Typ möglich HBVcore<sub>18-27</sub> nicht nur im Kontext von HLA-A\*02:01 zu erkennen, sondern auch durch HLA-B\*35:01/03-FLPSDFFPSV- bzw. HLA-B\*51:FLPSDFFPSV-Komplexe aktiviert zu werden (Abbildung 4.2). Die zuvor beschriebene Restriktion (Bertoletti et al., 1993) des Epitops scheint daher nicht ausschließlich zu sein. Dieser Effekt stellte sich allerdings, genau wie das Ausmaß der IFN $\gamma$ -Antwort der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, als individuell variabel dar. In HLA-A\*02:01-positiven Patienten wurde nur durch die Restimulation mit peptidbeladenen HLA-A\*02:01-positiven Spenderzellen, jedoch nicht durch HLA-B\*51 oder HLA-B\*35:01/03 exprimierende PBMCs, die vermehrte Expression von IFN $\gamma$  in CD8<sup>+</sup> T-Zellen induziert. In Patient HBV407 schien die Restimulation mit dem Peptid, gebunden an ein HLA-B\*35:01 oder HLA-B\*35:03 Molekül, CD8<sup>+</sup> T-Zellen zusätzlich anzuregen, obwohl es sich dabei um Allele handelt, die in diesem Patienten nicht erkannt werden sollten (Abbildung 4.2a).

**A**



**B**



C

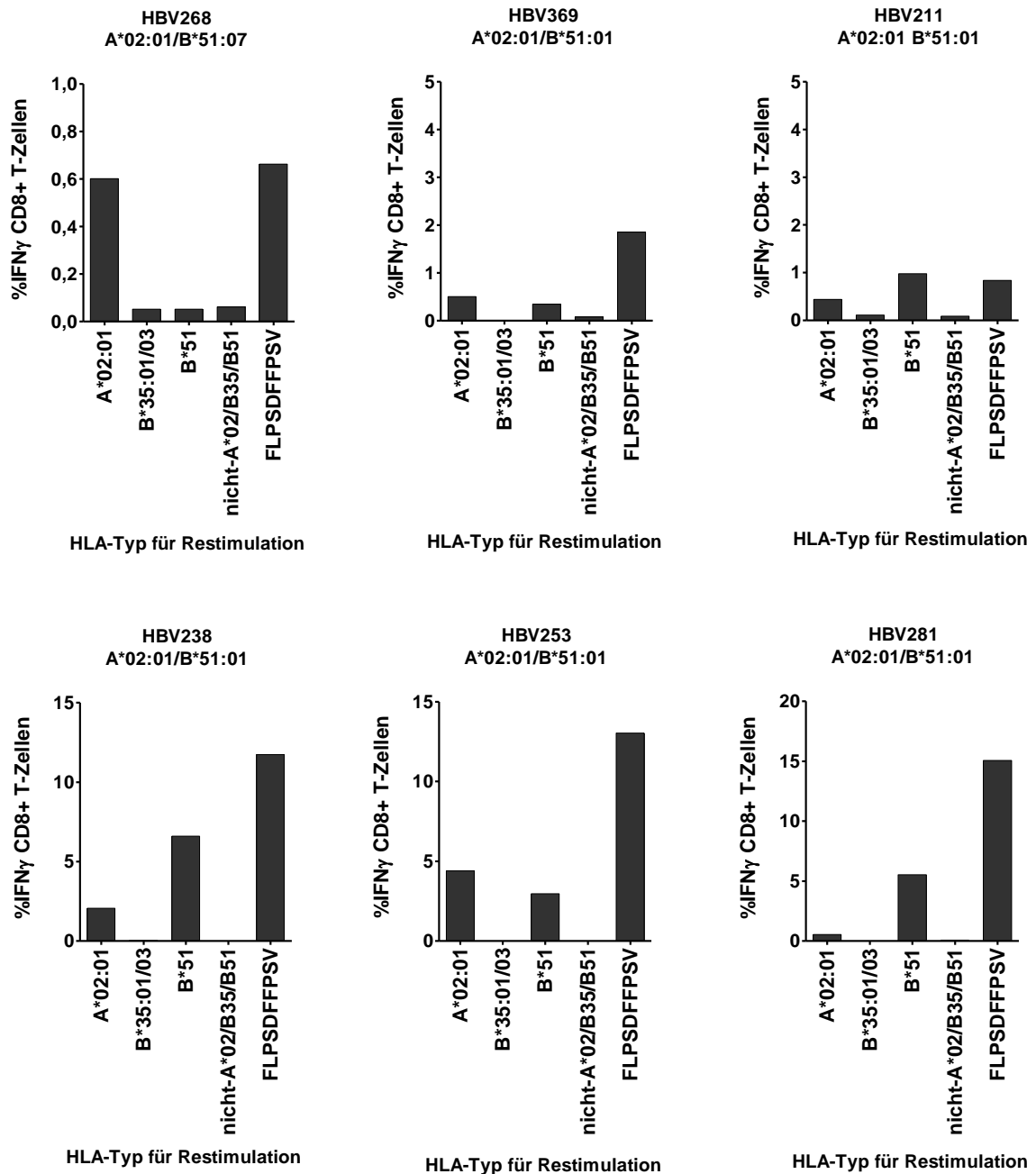


Abbildung 4.2 – Restriktion des HBVcore<sub>18-27</sub> Epitops

HBVcore<sub>18-27</sub>-spezifisch expandierte PBMCs wurden an Tag zehn mit peptidbeladenen PBMCs von gesunden Spendern, die jeweils nur einen einzigen oder keinen der untersuchten HLA-Subtypen exprimieren, restimuliert. Durch den Ausschluss der Präsentation des Epitops über einen anderen Subtyp wurde analysiert, ob die Aktivierung der CD8+ T-Zellen von chronisch HBV-Infizierten über die Bindung des Peptids an ein A\*02:01, B\*35:01/03 oder ein B\*51-Molekül zustande kommt. Als Maß für die HBVcore<sub>18-27</sub>-spezifische CD8+ T-Zellantwort ist deren IFN $\gamma$ -Produktion dargestellt: (A) ausschließlich A\*02:01-positive Patienten, (B) HLA-A\*02:01 und HLA-B\*35:01-Träger oder (C) HLA-A\*02:01 und HLA-B\*51-positive Patienten.

Die Individualität der Reaktivität wurde auch in den HLA-A\*02:01 plus HLA-B\*51 exprimierenden Patienten deutlich (Abbildung 4.2c). Während die CD8<sup>+</sup> T-Zellen von Patient HBV268 ausschließlich von peptidbeladenen HLA-A\*02:01-positiven Spenderzellen restimuliert werden konnten, schien in Patient HBV281 die Restimulation vor allem über HLA-B\*51 zu geschehen.

### **4.2. Das HBVcore<sub>18-27</sub> Epitop weist eine hohe Sequenzvariabilität auf**

In vorangegangenen Arbeiten wurden starke Indizien für das Vorhandensein von Selektionsdruck auf das HBVcore<sub>18-27</sub>-Epitop auf Ebene der Virussequenz gefunden (Kefalakes et al., 2015a). Aufgrund einer zu geringen Anzahl vollständiger HBVcore-Sequenzen von Patienten, die beispielsweise einen anderen A\*02-Subtyp tragen als A\*02:01, konnten einige Aussagen über andere HLA-A\*02-Subtypen nur bedingt getroffen werden. Durch die Erweiterung der Sequenzdaten zur HBVcore-Region konnten die bereits vorhandenen Ergebnisse in einer größeren Kohorte bestätigt und präzisiert werden.

In den zellulären Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass außer dem Subtyp A\*02:01 auch die HLA-Moleküle B\*35:01/03 und B\*51 HBVcore<sub>18-27</sub> präsentieren können. Aus diesem Grund wurden die Sequenzen von 291 Patienten, die Allele dieser HLA-Subtypen tragen, auf das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit von Substitutionen, die *Escape*-Mutationen sein könnten, untersucht. Tendenziell waren an den Aminosäureposition S21, F24 und V27 des Proteins, gehäuft Substitutionen in A\*02:01-, B\*35:01/03- und B\*51-positiven Patienten zu finden, im Vergleich zu Patienten, die weder A\*02-, noch B\*35- oder B\*51-Allele exprimieren (Abbildung 4.3). Interessanterweise waren Substitutionen an Position S21, der Position mit der größten Variabilität, nicht nur in HLA-A\*02:01-positiven Patienten häufiger vorhanden, als in nicht-HLA-A\*02/B\*35/B\*51-exprimierenden chronisch Infizierten, sondern auch in HLA-B\*51-Trägern (Abbildung 4.3a, c). Die Positionen F24 und V27 schienen allerdings ausschließlich in A\*02:01-positiven Patienten Selektionsdruck zu unterliegen, da in diesen im Vergleich mehr Substitutionen zu finden waren (Abbildung 4.3a).

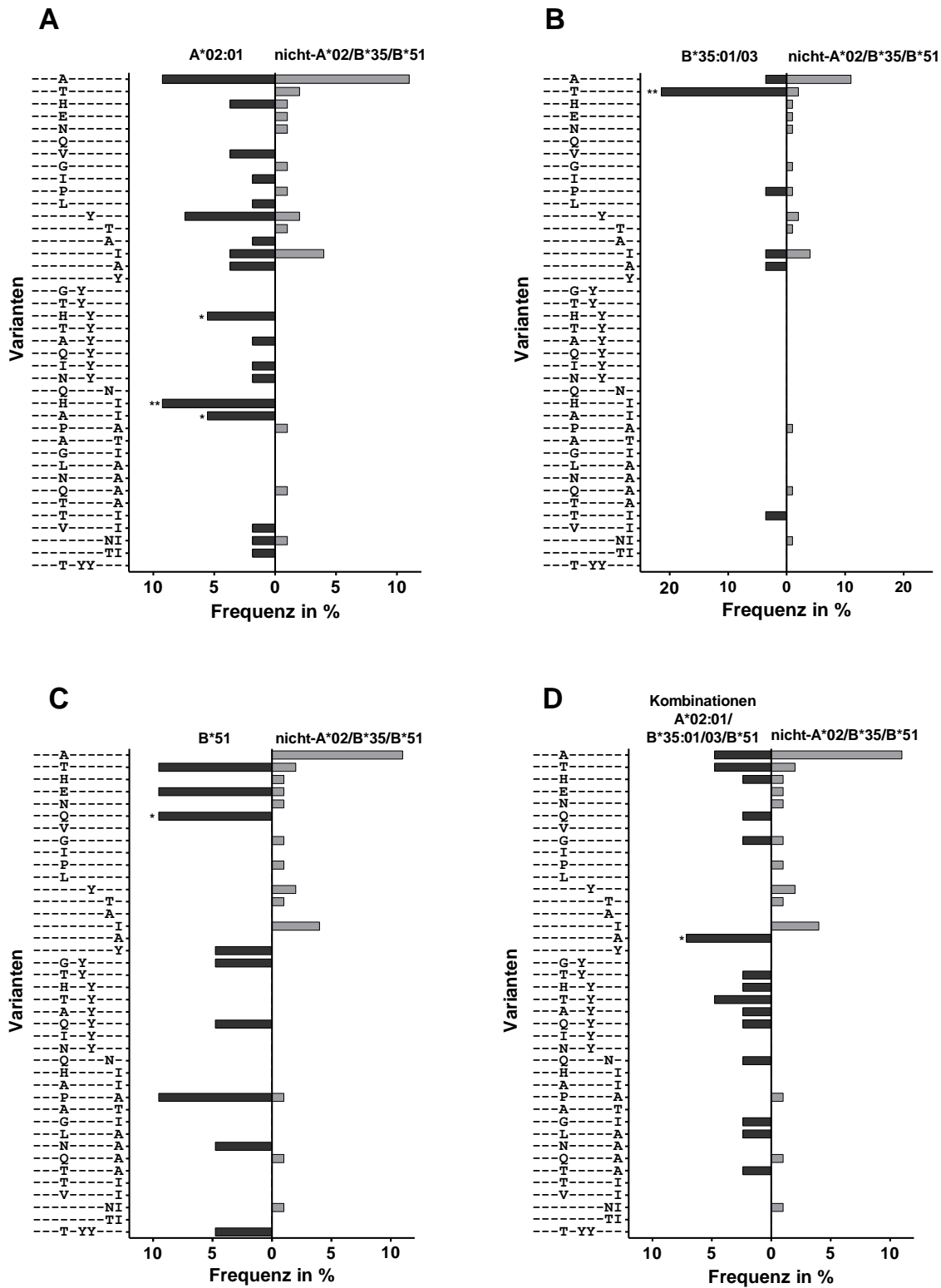


Abbildung 4.3 – Sequenzvariabilität im HBVcore<sub>18-27</sub> Epitop

Die Variabilität des Epitops in den autologen HBV-Sequenzen von insgesamt 291 Patienten mit chronischer HBV-Infektion und bekanntem HLA-Typ wurde verglichen. Die Frequenzen der Einzelsubstitutionen, Doppelsubstitutionen und Dreifachsubstitutionen in der viralen Sequenz von 54 HLA-A\*02:01- (A), 28 HLA-B\*35:01/03- (B) und 21 HLA-B\*51- positiven Patienten (C), sowie von 42 Patienten mit unterschiedlichen HLA-A\*02:01/B\*35:01/03/B\*51-Kombinationen (D) sind jeweils im Vergleich mit Substitutionsfrequenzen in 100 Patienten, die keines dieser Allele tragen, dargestellt. Patienten, die einen ausschließlich anderen HLA-Subtypen tragen, als HLA-A\*02:01, HLA-B\*35:01/03 oder HLA-B\*51 wurden dabei nicht berücksichtigt. (Exakter Test von Fisher, \* entspricht P-Wert<0,05; \*\* entspricht P-Wert<0,01)

Bei genauerer Beurteilung der Sequenzvariabilität, fiel auf, dass nicht nur Einzelsubstitutionen, sondern auch Doppelsubstitutionen, selektiert wurden. Substitutionen an Position S21 traten dabei nicht nur alleine auf, sondern vielmehr in Kombination mit einer Substitution an Position F24 oder V27. Hervorzuheben ist dabei die Substitution S21H, die in Kombination mit den Substitutionen F24Y und V27I in A\*02:01-positiven Patienten signifikant angereichert war, als Einzelsubstitution jedoch nicht (Abbildung 4.3). Die Einzelsubstitution F24Y lag tendenziell häufiger in A\*02:01-positiven Patienten vor. In Patienten mit einem kombinierten HLA-Typ hingegen schien sie vor allem in Kombination mit verschiedenen Aminosäureaustauschen an Position S21 aufzutreten. Weiterhin war die signifikante Anreicherung von S21T in B\*35:01/03-positiven Patienten, im Gegensatz zu A\*02:01-positiven Patienten überraschend, da Kefalakes *et al.* diese der Selektion durch HLA-A\*02 zugeschrieben hatten.

### **4.3. Individueller Einfluss der Substitutionen auf die Funktionalität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

Aufgrund der starken Variabilität des Epitops wurde die Fragestellung untersucht, ob diese Substitutionen einen Einfluss auf die Erkennung des Peptid:HLA-Komplexes durch den TCR haben und damit auf die Funktionalität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Hierfür wurden HBVcore-Varianten ausgewählt, die in der viralen Sequenz von mindestens zwei Patienten unserer Kohorte vorkommen.

#### **4.3.1. Die CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort ist abhängig von dem HBeAg-Status des Patienten**

Um einen Eindruck des Einflusses auf die Funktionalität zu erhalten, wurden zunächst PBMCs von Patienten mit chronischer HBV-Infektion auf ihre Reaktivität gegenüber dem Prototyppeptid untersucht. Patienten, die an Tag zehn der prototypspezifischen Expansion >0,5% IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen oder eine distinkte IFN $\gamma$ -Population gegenüber der Kontrolle in der durchflusszytometrischen Analyse aufwiesen, wurden für die Kreuzreaktivitätsanalyse ausgewählt (Abbildung 4.4).

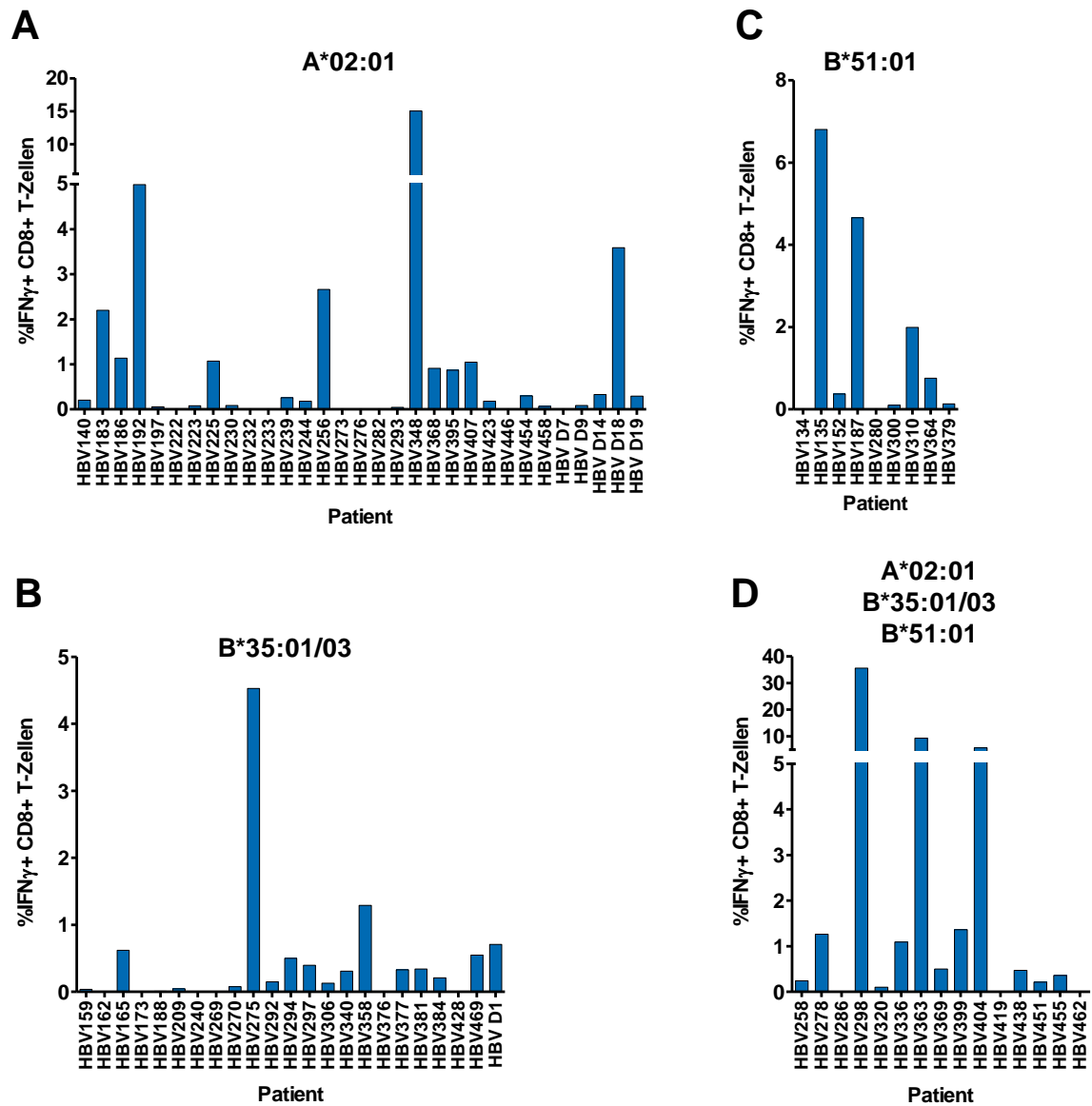


Abbildung 4.4 - HBVcore<sub>18-27</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort nach *in vitro* Expansion gefrorener PBMCs

PBMCs von Patienten mit chronischer Hepatitis B wurden aufgetaut und nach zehntägiger Expansion mit dem Prototyp ebenfalls mit diesem restimuliert. Dargestellt ist der Anteil IFN $\gamma$ -produzierender Zellen an der Gesamtheit der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in 31 HLA-A\*02:01-positiven Patienten (A), 9 HLA-B\*51-positiven Patienten (B), 23 HLA-B\*35:01/03-positiven Patienten (C) und 14 Patienten, die Kombinationen von zwei oder drei dieser HLA-Subtypen exprimieren (D).

So konnten HBVcore<sub>18-27</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen von neun von 31 (29,0%) A\*02:01-positiven, sechs von 23 (26,1%) B\*35:01/03-positiven, vier von neun (44,4%) B\*51-positiven und sechs von 15 Patienten (40,0%) mit kombiniertem HLA-Typ an Tag elf der Expansion auf ihre Kreuzreaktivität mit den ausgewählten Epitopvarianten untersucht werden. Die Abwesenheit einer IFN $\gamma$ -Antwort in einigen der Probanden korrelierte mit dem Nachweis des HBeAgs (Abbildung 4.5).

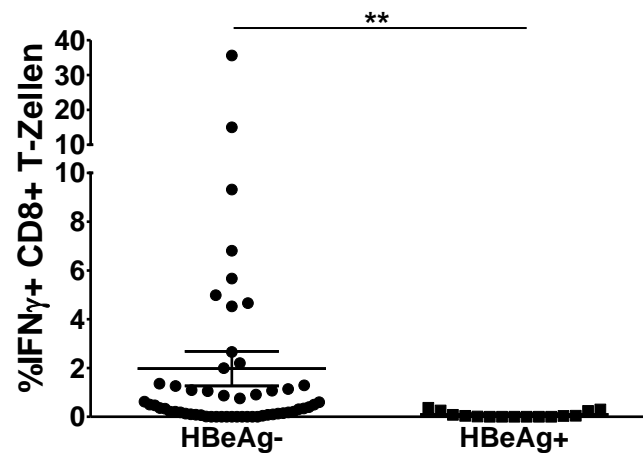


Abbildung 4.5 – Reaktivität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Abhängigkeit des HBeAg-Status

PBMCs von Patienten mit chronischer Hepatitis B wurden aufgetaut und nach zehntägiger Expansion mit dem Prototyp ebenfalls mit diesem restimuliert. Die Präsenz des HBeAg beeinflusst die Funktionalität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. HBVcore<sub>18-27</sub> spezifische IFN $\gamma$ -produzierende CD8<sup>+</sup> T-Zellen finden sich daher ausschließlich in HBeAg-Individuen, nicht aber in HBeAg+ Infizierten. Aufgetragen sind die Antworten der zuvor gefrorenen PBMCs der untersuchten Patienten, deren HBeAg-Status bekannt war. (zweiseitiger t-Test, \*\* entspricht P-Wert<0,01)

#### 4.3.2. Prototypspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen weisen Kreuzreaktivität auf

##### 4.3.2.1. HBVcore<sub>18-27</sub> Kreuzreaktivitätsprofile sind abhängig von dem HLA-Typ

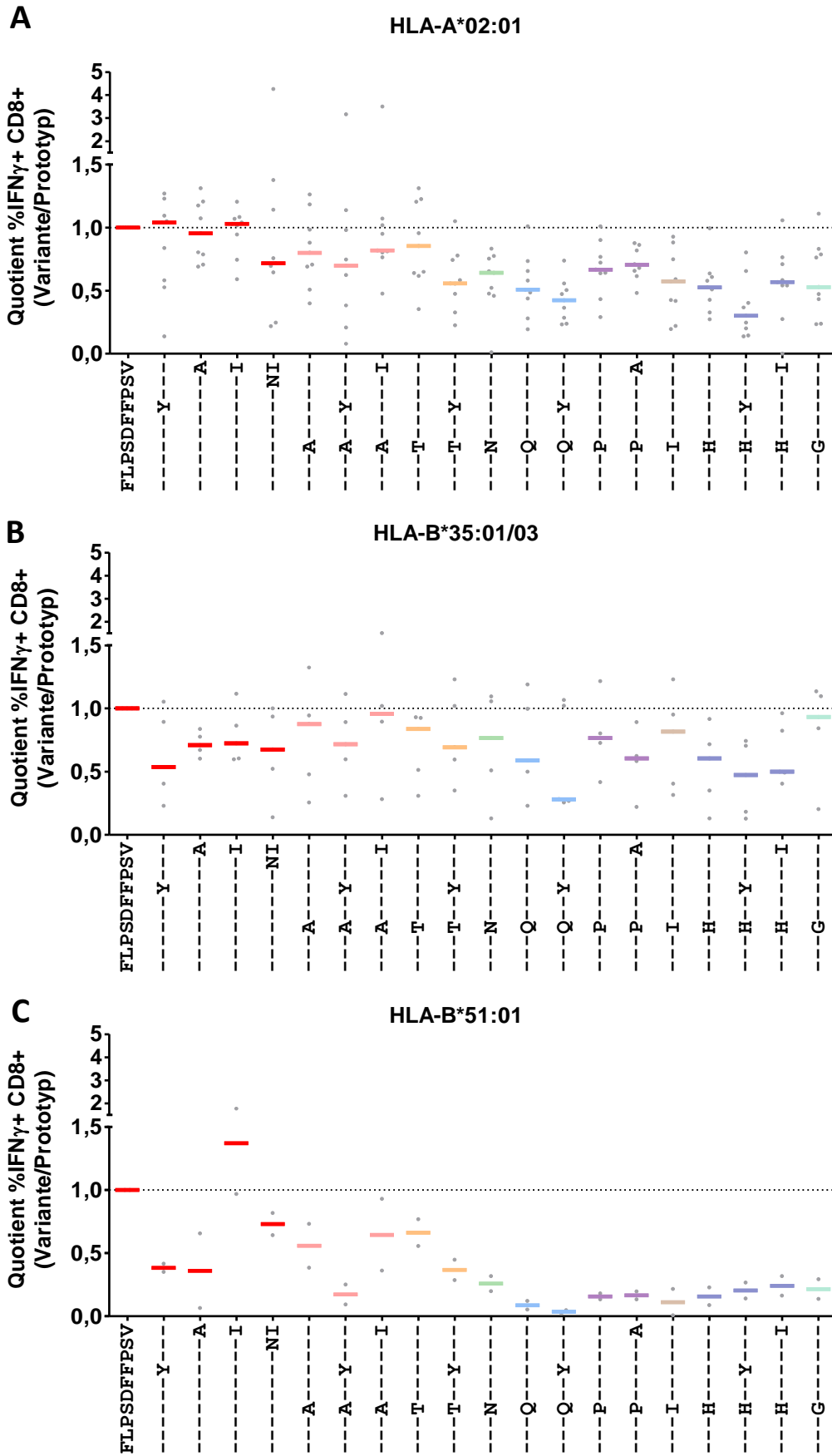
Die PBMCs von Patienten mit einer prototypspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort wurden an Tag elf jeweils mit allen 19 Varianten des HBVcore<sub>18-27</sub> Epitops sowie dem Prototyppeptid als Positivkontrolle restimuliert. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die IFN $\gamma$ -Werte anhand der prototypspezifischen IFN $\gamma$ -Antwort normalisiert. Auf den Sequenzdaten basierend war erwartet worden, dass die auf Ebene der Sequenzen als *Escape*-Mutationen identifizierten Substitutionen, auf funktioneller Ebene dazu führen, dass nur noch stark verringerte CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten nachweisbar sind. Der Einfluss der Substitutionen auf die IFN $\gamma$ -Produktion der T-Zellen war jedoch weniger ausgeprägt, als erwartet. Besonders auffallend war das Ergebnis für A\*02:01-positive Patienten. Signifikant von der prototypspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort abweichend waren nur einige der Varianten, die an Position S21 entweder eine Einzelsubstitution aufwiesen oder als Doppelsubstitution vorlagen (S21T-F24Y, S21N, S21Q, S21Q-F24Y, S21P, S21P-V27A, S21I, S21H, S21H-F24Y, S21H-V27I, S21G) (Abbildung 4.6a). Allerdings war dies trotz Signifikanz deutlich schwächer, als durch die Sequenzdaten zu erwarten gewesen wäre. Die häufig auftretende Substitution von Serin zu Threonin (S21T) wies als Einzelsubstitution keinen Effekt auf die Reaktivität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf. Die Substitution von Serin zu Alanin an dieser Position (S21A), die in allen Kombinationen zusammengenommen am häufigsten vorkam, beeinflusste die CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort zwar tendenziell, die T-Zellantworten wichen aufgrund der breiten individuellen Streuung jedoch nicht signifikant von der prototypspezifischen Antwort ab. Dies war sowohl in A\*02:01

## Ergebnisse

positiven Individuen, als auch in B\*35:01/03-positiven Patienten der Fall (Abbildung 4.6a, b). Überraschend war das Ergebnis der funktionellen Analyse der Variante F24Y, die im A\*02:01-Kontext einen tendenziellen Hinweis für *Escape*-Mutationen bietet. Auch wenn die Reaktion der prototypspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf diese Variante in HLA-A\*02:01-Trägern individuell sehr stark abwich, war die IFN $\gamma$  Produktion im Median mit der durch das Prototyppeptid selbst ausgelöst, vergleichbar (Abbildung 4.6a). Obwohl die Variante F24Y alleine die Funktion der T-Zellen nicht signifikant beeinflusste, sank die Veränderung der IFN $\gamma$ -Antwort im Median in Kombination mit einer Substitution an Position S21, insbesondere S21Q oder S21H, signifikant ab (Kruskal-Wallis, Dunn's Post Test;  $P < 0,05$ ) (Abbildung 4.6a). Nur in Patienten mit kombiniertem HLA-Typ fand sich ein vergleichbares Kreuzreaktivitätsprofil (Abbildung 4.6d). Die Doppelsubstitutionen S21H-F24Y und S21H-V27I waren die einzigen Substitutionen bei denen die signifikante Anreicherung in A\*02:01-positiven Patienten mit einer signifikanten Reduktion der T-Zellantwort übereinstimmte und somit der Hinweis auf *Escape* auch funktionell bestätigt werden konnte (Abbildung 4.3, S. 61, Abbildung 4.6).

Die ermittelten Kreuzreaktivitätsprofile von B\*35:01/03 und B\*51:01-positiven Individuen zeigten ein anderes Bild. In B\*35:01/03-positiven Patienten führten so gut wie alle Substitutionen, bis auf die Kombination S21A-V27I sowie S21G zu einer gewissen Reduktion der IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die individuellen Unterschiede umfassten dabei allerdings ein äußerst weites Spektrum (Abbildung 4.6b). Hingegen zeigten B\*51:01 exprimierende Patienten eine dramatische reduzierte CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort nach Restimulation mit den Varianten, die eine Substitution an Position S21 trugen.

Interessanterweise waren diese prototypspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch den Varianten F24Y und V27A gegenüber wenig kreuzreaktiv, was durch einen Anteil IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen, der weniger als der Hälfte der prototypspezifischen entsprach, zutage trat. Die Substitution von Valin zu Isoleucin (V27I) schienen die prototypspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen allerdings äußerst gut erkennen zu können.



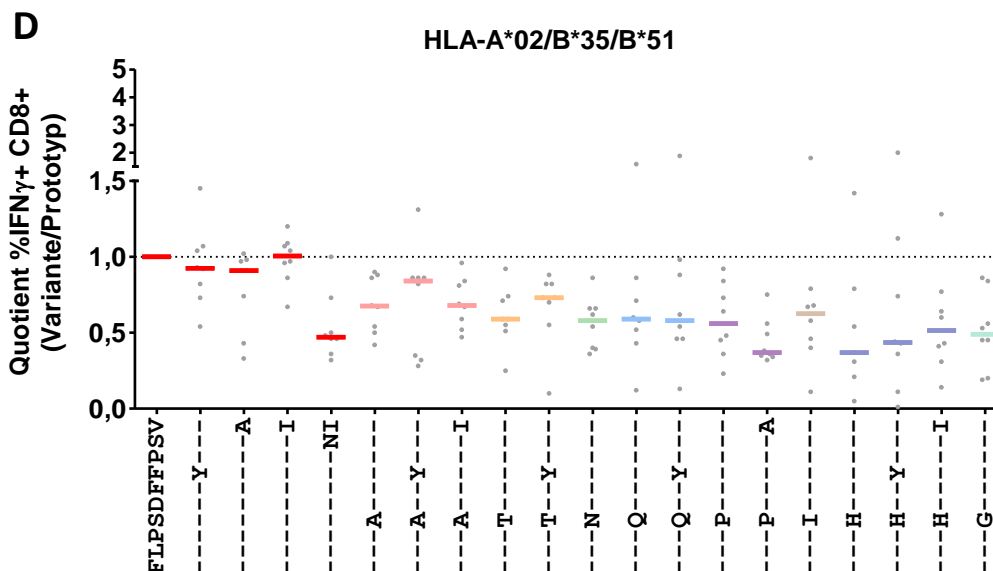


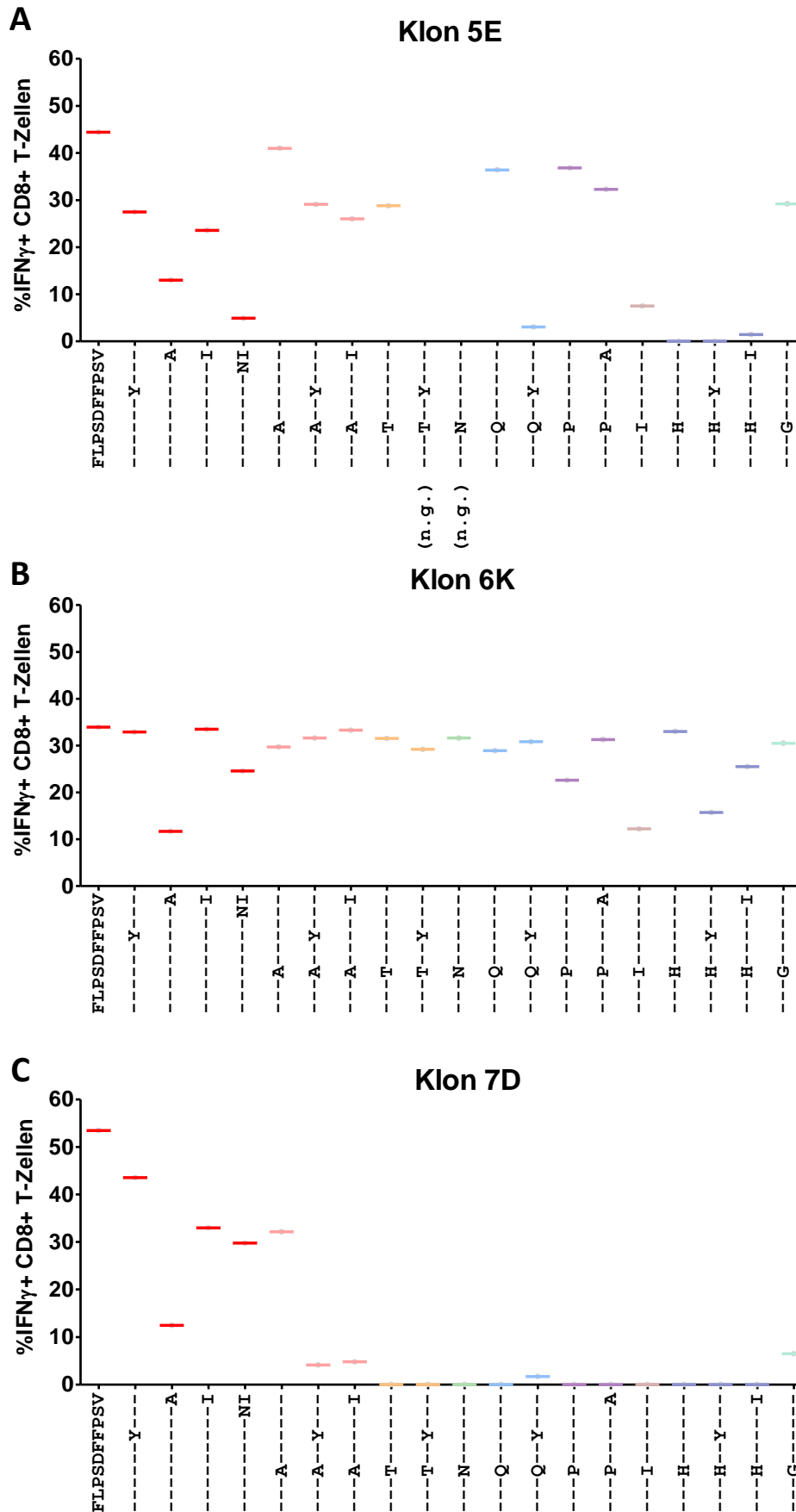
Abbildung 4.6 – Kreuzreaktivitätsprofil von HBVcore<sub>18-27</sub> spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen

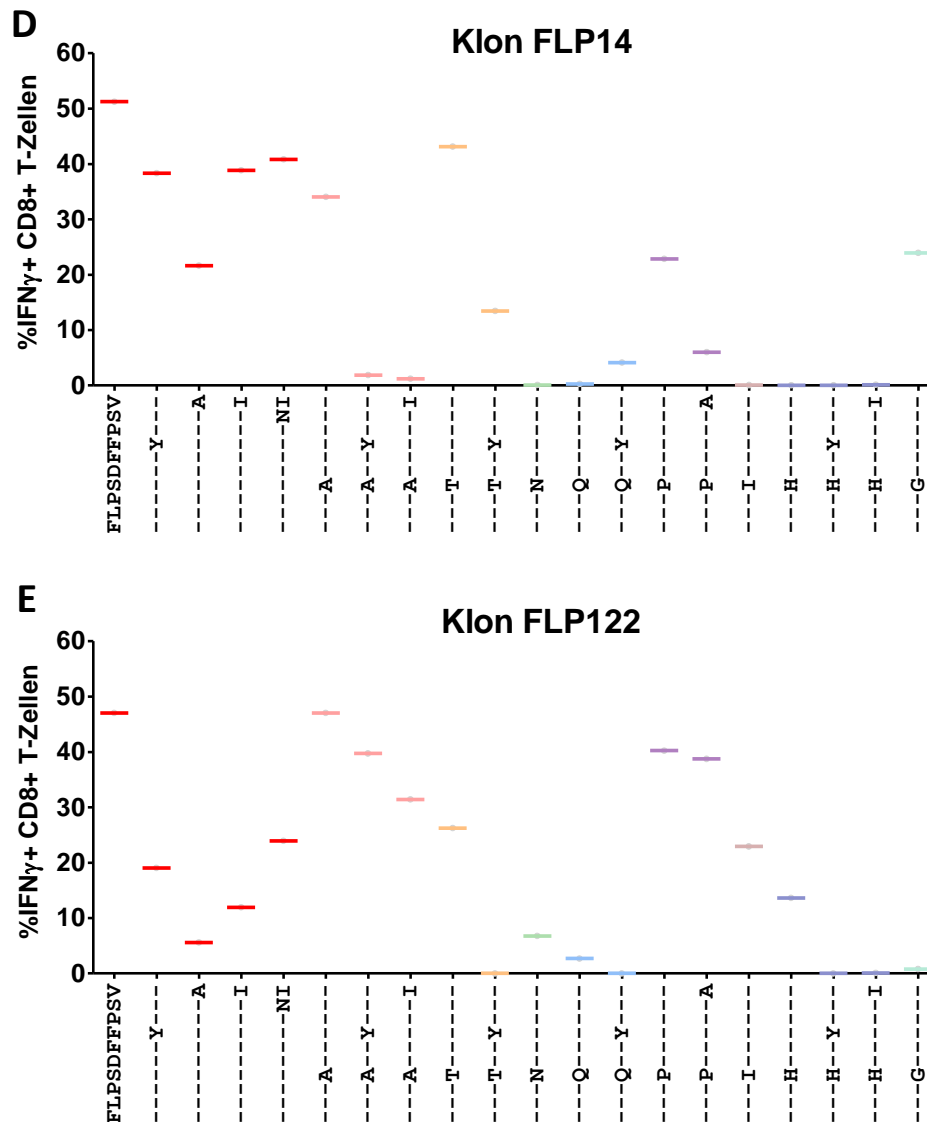
Dargestellt ist die Veränderung der Frequenz von IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Restimulation mit einer von 19 natürlich auftretenden Epitopvarianten normalisiert mit der IFN $\gamma$ -Antwort nach Restimulation mit dem Prototypen. Die Profile von neun HLA-A\*02:01- (A), fünf HLA-B\*35:01/03- (B) und zwei HLA-B\*51-positiven (C) chronisch infizierten Patienten sowie von acht Patienten mit einer Kombination dieser HLA-Typen (D) wurde verglichen.

#### 4.3.2.2. Ausmaß der Kreuzreaktivität ist von individuellem T-Zellrezeptor abhängig

Da die Kreuzreaktivitätsprofile der einzelnen Patienten starke individuelle Unterschiede aufwiesen, wurden für fünf T-Zellklone, die je einen einzigen HBVcore<sub>18-27</sub>:HLA-A\*02:01 spezifischen TCR mit bekannter CDR3 Region exprimieren, ebenfalls Kreuzreaktivitätsprofile angelegt. Die T-Zellklone wurden freundlicherweise von Ulrike Protzer und Karin Wisskirchen zur Verfügung gestellt (Wisskirchen et al., 2017). Die individuellen Unterschiede könnten schließlich durch eine unterschiedlich breite Diversität der patienteneigenen TCR spezifisch für den A\*02:01:FLPSDFFPSV-Komplex entstehen. Die Klone zeigten sowohl durch Restimulation mit dem exogen zugegebenen Prototyppeptid, als auch durch Restimulation mit peptidbeladenen HepG2-Zellen, stärkere Immunantworten, als die CD8<sup>+</sup> T-Zellen der untersuchten Patienten (Abbildung 4.7).

Da die T-Zellklone alle HLA-A\*02:01-spezifische TCR exprimieren, wurde anhand der Kreuzreaktivitätsdaten deutlich, dass einzelne TCR unterschiedliche Varianten des HBVcore<sub>18-27</sub> Epitops im Komplex mit HLA-A\*02:01 auf peptidbeladenen HepG2-Zellen erkennen konnten (Abbildung 4.7). Während vor allem der T-Zellklon 6K äußerst stark mit den meisten Varianten kreuzreagierte (Abbildung 4.7b), zeigte Klon 7D beispielsweise gegenüber den Varianten mit Substitutionen an S21 überhaupt keine Kreuzreaktivität (Abbildung 4.7c).





**Abbildung 4.7 – Kreuzreaktivitätsprofile von CD8<sup>+</sup>T-Zellen mit bekanntem T-Zell-Rezeptorklon**

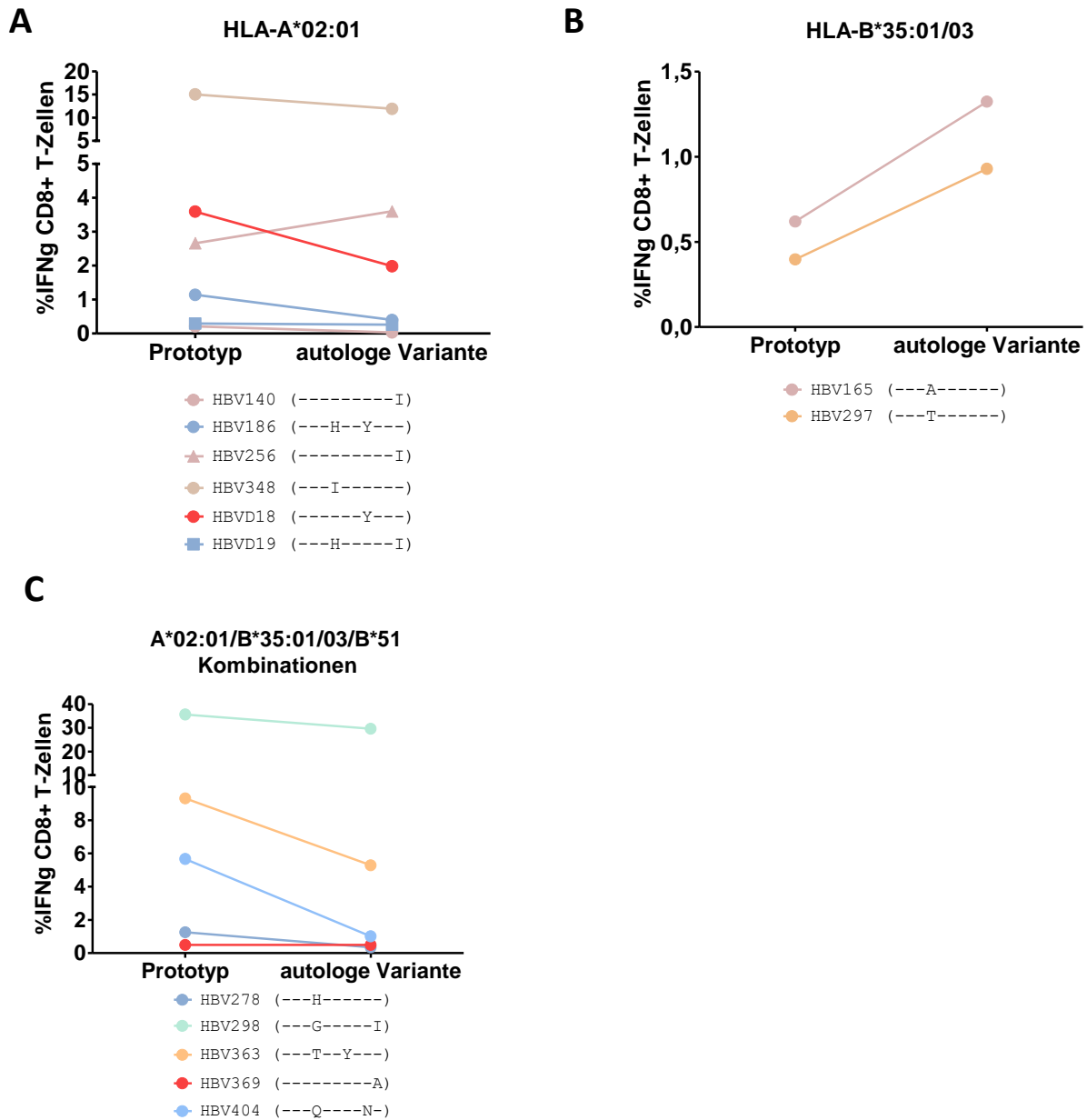
Die Kreuzreaktivität von fünf HLA-A\*02:01-FLPSDFFPSV spezifischen T-Zell-Rezeptorklone gegenüber den 19 getesteten Varianten des HBVcore<sub>18-27</sub> Epitops wurde ermittelt. Dargestellt sind die Profile der Klone 5E (A), 6K (B), 7D (C), FLP14 (D) und FLP122 (E), die von Ulrike Protzer und Karin Wisskirchen zur Verfügung gestellt wurden (Wisskirchen et al., 2017)

Die Klone 5E, FLP14 und FLP122 zeigen hingegen ein gewisses Maß an Kreuzreaktivität, jedoch gegenüber unterschiedlichen Varianten (Abbildung 4.7a, d, e). Nach genauer Betrachtung der Einzelsubstitution F24Y, die auf Sequenzebene tendenziell auf eine *Escape*-Mutation in A\*02-Positiven hindeutete, fand sich auch in den T-Zellklonen ein großes Maß an Kreuzreaktivität. Bis auf Klon FLP122, bei dem die IFN $\gamma$ -Antwort nach Restimulation mit dem F24Y Peptid nur 40,48% der Prototypantwort ausmacht, wurde in den anderen Klonen durch Stimulation mit der F24Y Variante mindestens 60% der Prototypantwort erreicht (Abbildung 4.7). Die IFN $\gamma$ -Produktion des Klons 6K, die durch F24Y induziert wird, entspricht sogar 97,05% der durch das Prototyppeptid induzierten Antwort. Eine durch Selektionsdruck

vermittelte *Escape*-Mutation ließ sich daher auch in diesem Kontext nicht eindeutig funktionell bestätigen.

### **4.3.2.3. Begrenzter Einfluss der autologen Virussequenz auf die Kreuzreaktivität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

Da die Breite der Kreuzreaktivität überraschend war, für einzelne Substitutionen jedoch deutliche Unterschiede zwischen den Patienten und auch verschiedenen T-Zellrezeptoren detektiert wurden, ist der Einfluss der autologen Virussequenz auf die T-Zellantwort betrachtet worden. Die IFN $\gamma$ -Antwort der prototypspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen induziert durch das Prototyppeptid wurde hierfür mit der Antwort dieser Zellen gegenüber der jeweiligen autologen Variante verglichen, falls sie vom Prototyp abwich (Abbildung 4.8). Da die Präsenz der in diesen Patienten zirkulierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht zur Ausheilung der Infektion führte, wurde ein deutlich reduzierter Anteil IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Anwesenheit der autologen Variante erwartet. Dies war jedoch nur in Einzelfällen, wie beispielsweise den Patienten HBV D18, dessen autologe Sequenz interessanterweise die F24Y-Substitution beinhaltet, HBV363 und HBV404, zu beobachten (Abbildung 4.8a, c). In B\*35-positiven Individuen war die Antwort der prototypspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen induziert durch die autologe Sequenz sogar stärker als durch das Prototyppeptid (Abbildung 4.8).



**Abbildung 4.8 – Einfluss der autologen Virussequenz auf die Reaktivität HBVcore<sub>18-27</sub> spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

Der Unterschied in der CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort vermittelt durch die Restimulation mit dem Prototyp wurde mit der durch die Restimulation mit der autologen Epitopvariante erreichten Antwort verglichen. Dargestellt sind die Frequenzen von IFN<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen aufgetauter PBMCs nach einer zehntägigen Expansion als Vergleich in HLA-A\*02:01-positiven (A) und HLA-B\*35:01/03-positiven (B) Patienten, sowie in Patienten mit einer Kombination der HLA-Subtypen A\*02:01, B\*35:01/03 oder B\*51 (C).

#### 4.3.2.4. Kein Einfluss der Peptidkonzentration auf die Reaktivität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Durch zu hohe Peptidkonzentrationen im Kreuzreaktivitätsassay könnten bestehende Unterschiede zwischen den Epitopvarianten bezüglich der T-Zellaktivierung möglicherweise maskiert werden. Daher wurde der Einfluss verringerter Peptidkonzentrationen der Variante beispielhaft für F24Y in zwei Patienten untersucht (Abbildung 4.9). Auch bei stark reduzierten Peptidkonzentrationen ( $10^{-4}$  µg/ml) gab es nur minimale Unterschiede im Anteil IFN $\gamma$ <sup>+</sup> prototypspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Bei der niedrigsten gewählten Peptidkonzentration  $10^{-6}$  µg/ml konnten weder das Prototyppeptid noch die F24Y Variante mehr IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten induzieren (Abbildung 4.9).

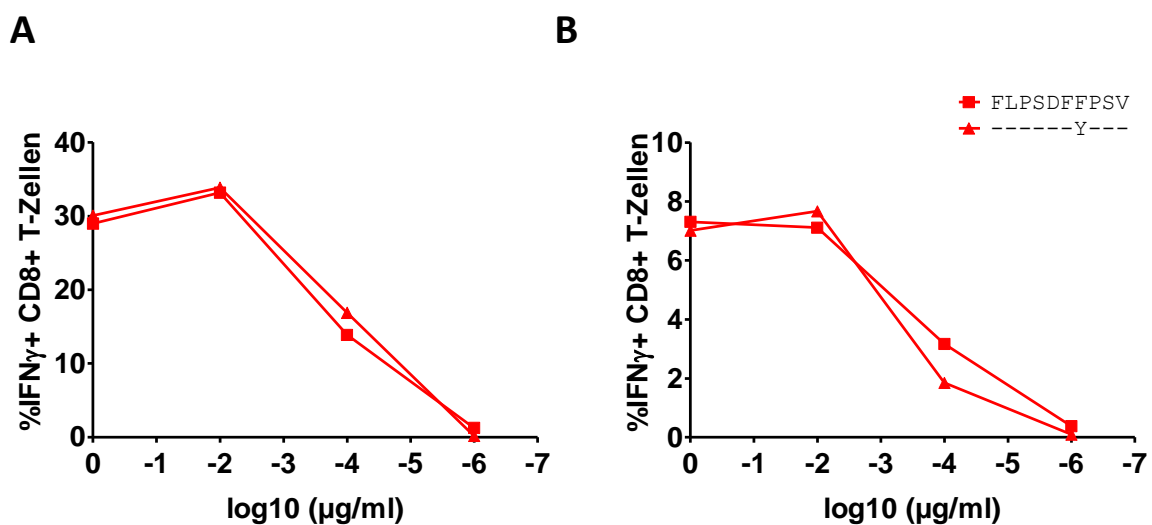


Abbildung 4.9 – Einfluss der Substitutionen auf die Affinität des Epitops

Die Affinität des Epitops kann durch die Substitutionen beeinflusst werden, was bei hohen Peptidkonzentrationen nicht deutlich wird. Der Prototyp und die F24Y Variante wurden daher titriert und die CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten bei unterschiedlichen Konzentrationen verglichen. Der Einfluss der zur Restimulation eingesetzten Peptidkonzentration wurde exemplarische für die zwei Patienten HBV298 (A) und HBV404 (B) mit kombiniertem HLA-Typ determiniert.

#### 4.3.3. Phänotypische Unterschiede der CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind minimal und unabhängig von der autologen Virussequenz

Ein weiterer Faktor, der die Variabilität der CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten beeinflussen kann, ist der Phänotyp der spezifischen Zellen. Der individuelle Aktivierungs- und Differenzierungsstatus der CD8<sup>+</sup> T-Zellen des entsprechenden Patienten könnte mit der Anwesenheit einer Substitution in der autologen Virussequenz assoziiert sein. Daher wurde die Expression verschiedener Aktivierungs- bzw. Inhibierungsmarker sowie Differenzierungsmarker auf HBVcore<sub>18-27</sub>-Dextramer spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen durchflusszytometrisch betrachtet (Abbildung 4.10, Abbildung 4.11).

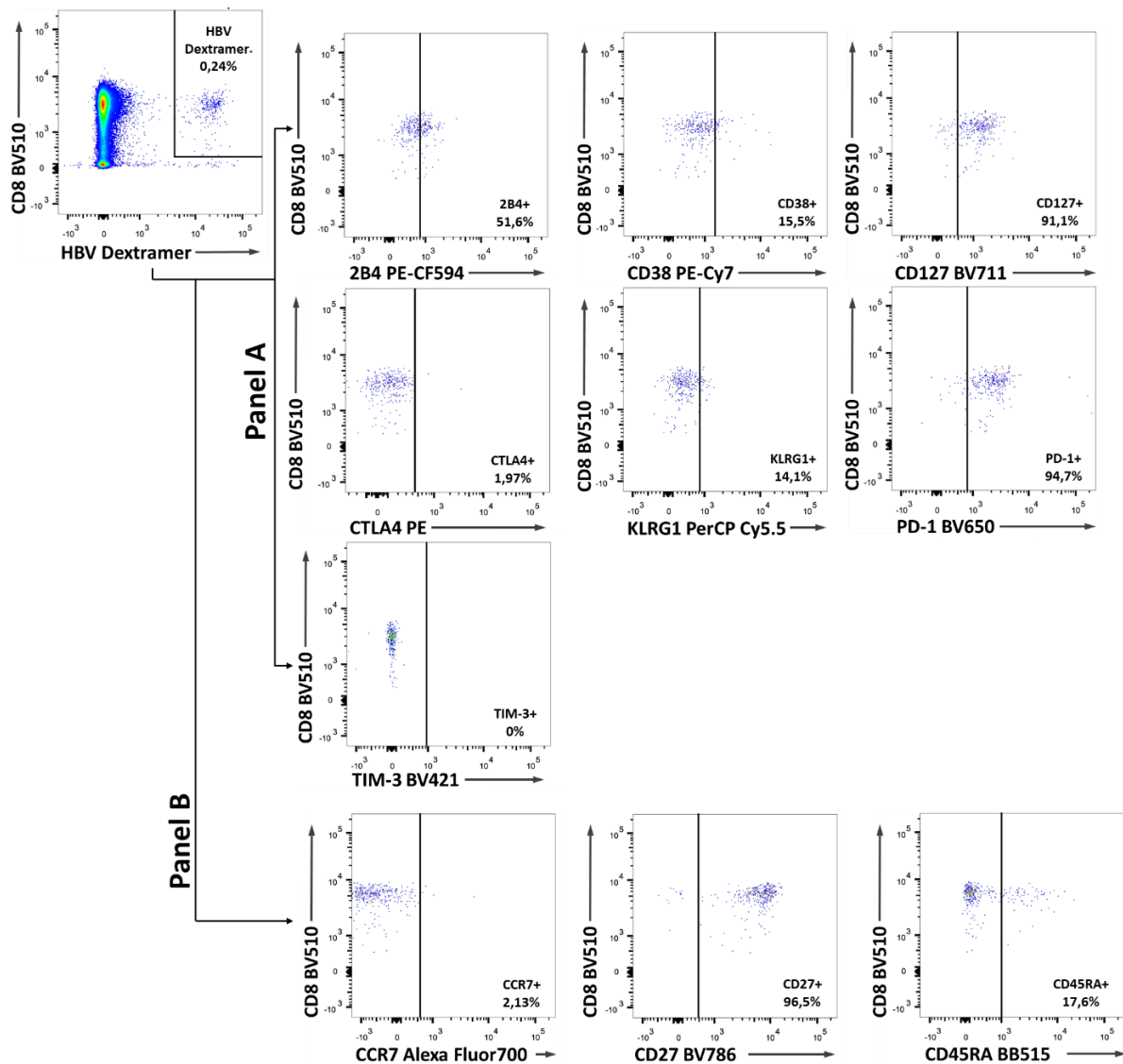
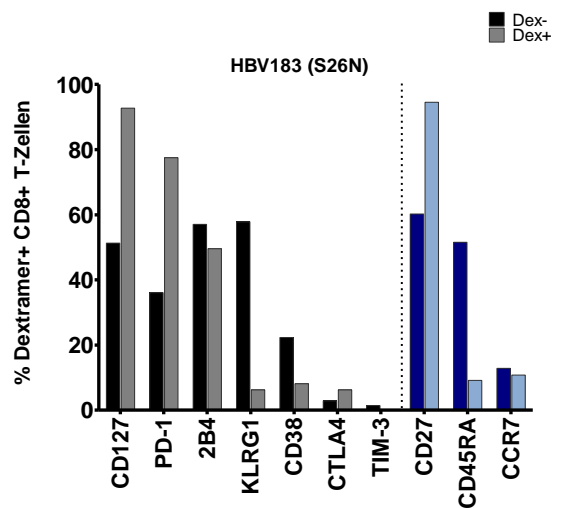
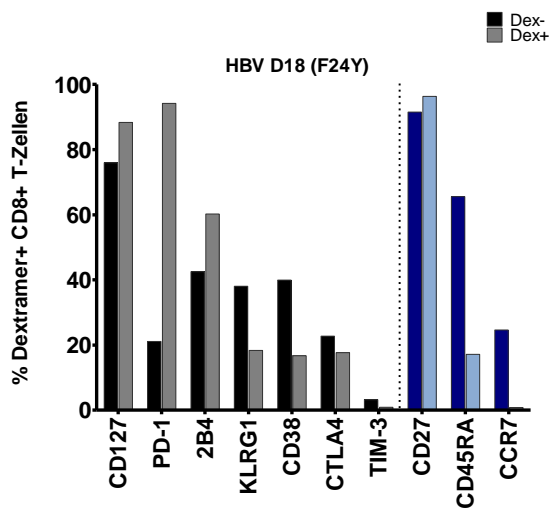
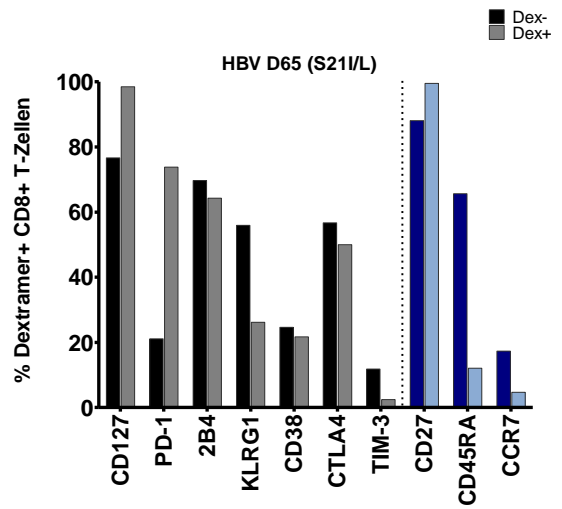
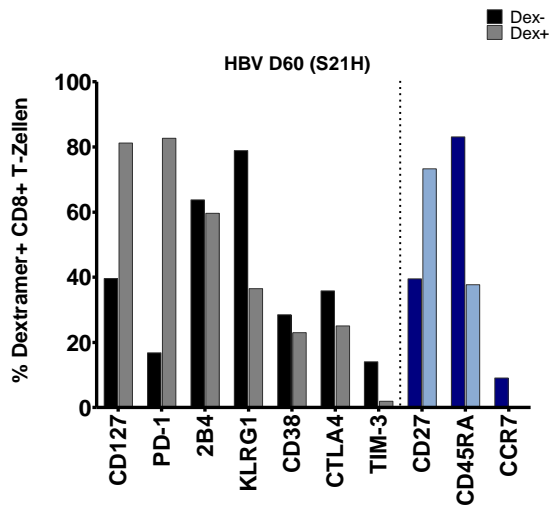
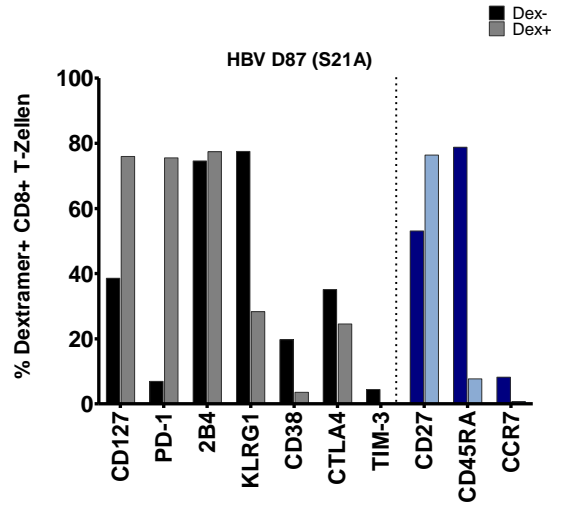
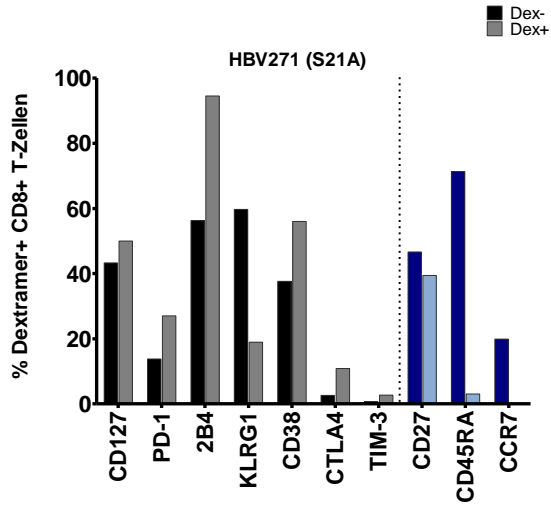


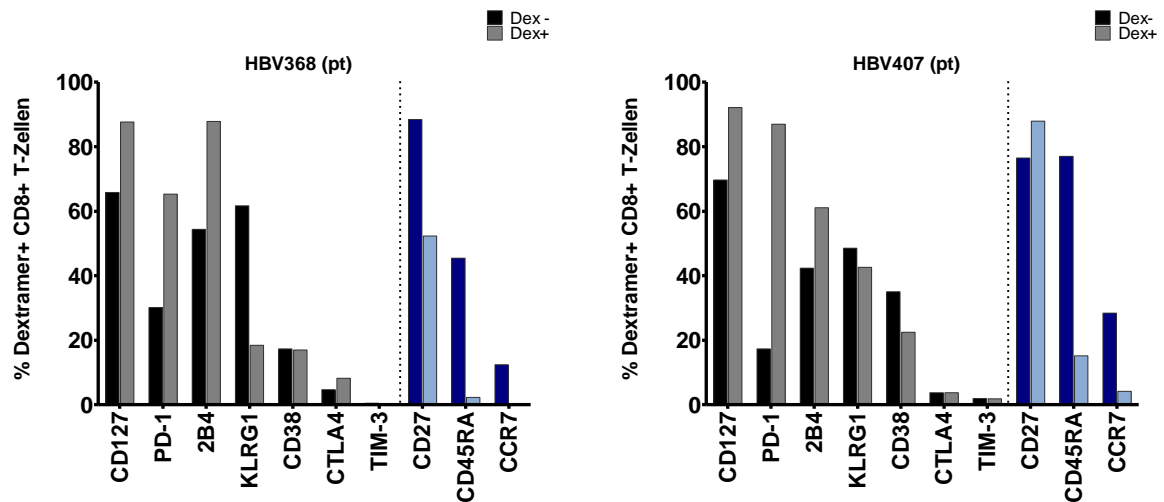
Abbildung 4.10 - Gatingstrategie für die phänotypische Charakterisierung der HBVcore<sub>18-27</sub> Dextramer-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Nach Auswahl der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> vitalen als Einzelzellen vorliegenden Lymphozyten wurden HBVcore<sub>18-27</sub>-Dextramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen selektiert. Diese wurden daraufhin in einer Messung (Panel A) auf die Oberflächenexpression von 2B4, CD38, CD127, CTLA4, KLRG1, PD-1 und TIM-3 untersucht, in einer zweiten Messung (Panel B) wurde die CCR7, CD27 und CD45RA Expression dieser HBVcore<sub>18-27</sub>-Dextramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen charakterisiert. Für jedes Panel wurden 2x10<sup>6</sup> frisch aufgetaute PBMCs gefärbt.

Unabhängig von der autologen Sequenz des Patienten wiesen die meisten HBVcore<sub>18-27</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine hohe Expression des Erschöpfungsmarkers PD-1 auf (Abbildung 4.11). Auch CD127, die Interleukin-7 Rezeptor Alphakette (IL-7RA), welche mit naiven und Gedächtnis T-Lymphozyten assoziiert ist, war im Mittel auf mehr als 80% der spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachweisbar.

# Ergebnisse





**Abbildung 4.11 – Phänotypische Charakterisierung von HBVcore<sub>18-27</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

Die Expression verschiedener Aktivierungs-, Inhibierungs- und Differenzierungsmarker wurde auf HLA-A\*02:01:HBVcore<sub>18-27</sub> spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen von Patienten mit chronischer HBV-Infektion untersucht. Verglichen wurde die Expression auf frisch aufgetauten PBMCs von zwei HLA-A\*02:01-positiven Patienten, deren autologe virale HBVcore<sub>18-27</sub> Sequenz dem Prototyp entsprach, und sechs HLA-A\*02:01-positiven Patienten, deren zirkulierendes Virus eine Substitution in diesem Epitop aufwies. Vergleichsweise ist die Expression der verschiedenen Marker auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die das Epitop nicht erkennen können, dargestellt.

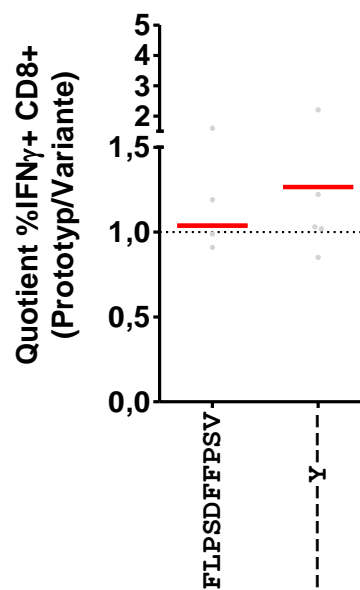
Den Rezeptor Natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) 2B4, welcher von aktivierten T-Zellen exprimiert wird, exprimierten interessanterweise die spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen ebenfalls stark. CD38, ein Aktivierungsmarker für T-Lymphozyten, hingegen war nur auf ca. 20% der spezifischen Zellen zu detektieren (Abbildung 4.11). Die HBVcore<sub>18-27</sub> Dextramer-positiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen von Patient HBV271 verzeichneten als einzige Ausnahme ein gegenläufiges Bild. 2B4 und CD38 waren in diesem Patienten stärker exprimiert, als PD-1 und CD127 (Abbildung 4.11). Beinahe alle Patienten exprimierten auf mehr als 60% der HBVcore<sub>18-27</sub> spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen das kostimulatorische Molekül CD27, welches vor allem auf naiven und Gedächtniszellen zu finden ist. Die anderen beiden Differenzierungsmarker CD45RA und CCR7 wurden jedoch in den meisten Patienten nur minimal exprimiert, was in Kombination auf Gedächtniszellen schließen ließ. Eine Ausnahme bildete Patient HBV D60, dessen Anteil an CD45RA exprimierenden HBVcore<sub>18-27</sub> spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen knapp 40% entsprach (Abbildung 4.11).

Bei Betrachtung der HBVcore<sub>18-27</sub> Dextramer-negativen CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Dex-), also der, die dieses Epitop nicht erkennen, ist hinsichtlich der Aktivierungs- und Inhibierungsmarker insbesondere für PD-1 und CD38 ein entgegengesetztes Bild zu verzeichnen, als in spezifischen T-Zellen. In den meisten Patienten ist der Anteil CD38<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen größer, als der Anteil PD-1<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 4.11). Auch die Expression der Differenzierungsmarker

unterscheidet sich stark. Der größte Unterschied ist hierbei für das Molekül CD45RA, einem Mitglied der Protein Tyrosin Phosphatase Rezeptorfamilie, auszumachen (Abbildung 4.11).

### 4.3.4. Kreuzreaktivität der F24Y-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist ebenfalls ausgeprägt

In der Infektionssituation spielen variantenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen zunächst eine größere Rolle, als prototypspezifische, wenn die autologe Sequenz nicht dem Prototyp entspricht. Dies wirft die Frage auf, ob diese CD8<sup>+</sup> T-Zellen in ihrer Funktionalität durch die Substitutionen beeinflusst werden. Beispielhaft für die zuvor untersuchten HLA-Subtypen wurde daher die Kreuzreaktivität F24Y-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in HBV Patienten mit kombinierten HLA-Typen gegenüber dem Prototyp betrachtet (Abbildung 4.12). Allerdings war auch in diesem Ansatz kein funktioneller Hinweis für das Auftreten der *Escape*-Mutationen zu identifizieren. Die Antworten, die durch Restimulation mit dem Prototyp erzielt wurden, entsprachen entweder der variantenspezifischen Antwort oder waren erhöht (Abbildung 4.12).



**Abbildung 4.12 – Kreuzreaktivitätsprofil variantenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

Die Kreuzreaktivität F24Y-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen von fünf chronisch HBV infizierten Patienten gegenüber dem Prototyp des HBVcore<sub>18-27</sub> Epitops wurde untersucht. Dargestellt ist die Änderung des Anteils IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Restimulation mit dem Prototypepitop gegenüber dem Anteil dieser Zellen nach Restimulation mit der Variante. Angegeben ist zusätzlich der Median dieser Änderung aller fünf Patienten.

#### 4.4. F24Y-Substitution beeinflusst die endogene Prozessierung des HBVcore<sub>18-27</sub> Epitops

Obwohl starke Indizien für das Vorhandensein von Selektionsdruck auf das HBVcore<sub>18-27</sub>-Epitop auf Sequenzebene gefunden wurden, konnten diese auf funktioneller Ebene der CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch exogene Zugabe des Peptids nicht bestätigt werden. Was allerdings bei dieser Form der Restimulierung nicht berücksichtigt wurde, ist ein möglicher Einfluss der Substitutionen auf die zelluläre endogene Prozessierung der Peptide.

##### 4.4.1. Unterschiede im proteasomalen Verdau des Prototyppeptids und der F24Y-Variante

Einen Aspekt der Prozessierungskette, den die Substitutionen beeinflussen könnten, ist die Degradation der Peptidfragmente durch das Proteasom im Zytosol. Daher wurde mittels *in vitro* Proteasomverdau ermittelt, ob und inwiefern sich das Antigen-Fragmentprofil des HBVcore<sub>18-27</sub> Epitops durch die Substitution F24Y verändert.

Das Proteasom zerlegt die viralen Proteine und Peptide im Zytosol in kleinere Fragmente und macht sie so für den Transport in das ER verfügbar, wo sie durch die ER-residenten Aminopeptidasen N-terminaler gekürzt und auf die HLA-Moleküle geladen werden können. Daher wurden für den *in vitro* Verdau elongierte HBVcore<sub>8-37</sub>-Peptide eingesetzt, in denen das

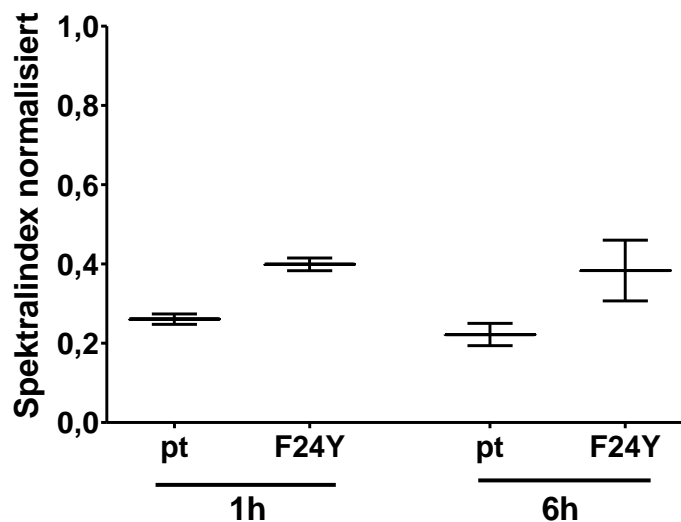
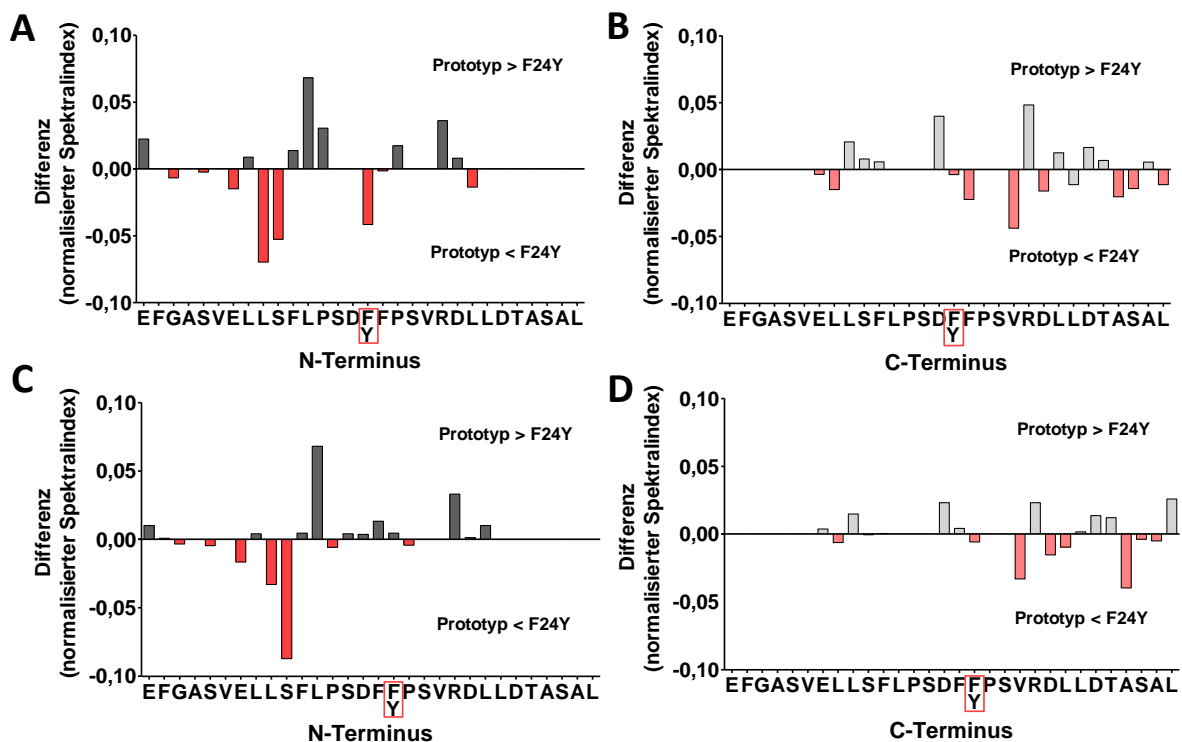


Abbildung 4.13 – Relative Häufigkeit von Fragmenten, die das vollständige HBVcore<sub>18-27</sub> Epitop nach dem proteasomalen Verdau enthalten

Ein N- und C-terminal elongiertes HBVcore<sub>18-27</sub> enthaltendes Peptid (EFGASVELLSFLPSSDFPSSVRDLLDTASAL) und die entsprechende Variante mit der F24Y Substitution (EFGASVELLSFLPSSDFYPSVRDLLDTASAL) wurden *in vitro* mit dem Proteasom verdaut. Nach 1 h und 6 h wurden Proben entnommen und das entstandene Fragmentprofil massenspektrometrisch analysiert. Die relative Häufigkeit aller detektierten Fragmente wurde als Spektralindex, der auf alle in der jeweiligen Probe identifizierten Fragmente normalisiert war, angegeben. Die relative Häufigkeit von Fragmenten, die das HBVcore<sub>18-27</sub> Epitop vollständig enthielten, wurde in den jeweiligen Proben verglichen. Im Vergleich zwischen Prototyp und F24Y-Variante ist die relative Häufigkeit aller Fragmente, die das Epitop vollständig enthalten als Summe der normalisierten Spektralindizes dargestellt. Die Summe dieser Werte nach 1 h und 6 h Verdau durch das Proteasom aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten sind als Mittelwert wiedergegeben.

Epitop N- und C-terminal jeweils von 10 flankierenden Aminosäuren umgeben war. Von Interesse waren daher alle Fragmente, die das HBVcore<sub>18-27</sub> Epitop komplett beinhalten. Sowohl nach einstündigem, als auch sechsständigem Verdau schienen in Anwesenheit der Substitution F24Y tendenziell mehr Epitop beinhaltende Degradationsprodukte entstanden zu sein, als nach dem Verdau des Prototyppeptids (Abbildung 4.13).



**Abbildung 4.14 – Relative Häufigkeit der N- und C-Termini nach dem proteasomalen Verdau des elongierten HBVcore<sub>18-27</sub> Peptids**

Die gemittelten normalisierten Spektralindizes aller Fragmente aus zwei unabhängigen Experimenten, deren N- bzw. C-Terminus mit der auf der X-Achse angegebenen Aminosäureposition übereinstimmte, wurden jeweils für das Prototyppeptid und die F24Y-Variante aufsummiert. Aus diesen Summen wurde für jede Peptidposition die Differenz zwischen Prototyp und F24Y-Variante gebildet. Werte >0 wiesen auf eine relativ größere Häufigkeit an Fragmenten mit dem entsprechenden N- bzw. C-Terminus im Prototypverdau hin, Werte <0 deuteten an, dass diese Position häufiger in der F24Y-Variante als N- bzw. C-Terminus vorkommt. Dargestellt sind die Profile für den N- und C-Terminus nach 1 h proteasomalem Verdau (A, B) und nach 6 h (C, D).

Die genauere Betrachtung der bevorzugten Schnittstellen in den beiden untersuchten Peptiden, untermauerte dies. Das Proteasom nutzte, in Anwesenheit der F24Y Substitution, häufiger die beiden Aminosäuren, die N-terminal des Epitops gelegen sind, als Schnittstelle. Dahingegen wurde das Prototyppeptid häufiger auf eine Weise gespalten, durch die, die Aminosäure, welche C-terminal von der ersten Aminosäure des HBVcore<sub>18-27</sub> Epitops F18 liegt, zum N-Terminus wurde (Abbildung 4.14a, c). Nach einem einstündigen Verdau mit dem Proteasom traten zudem in Anwesenheit der F24Y Substitution gehäuft Spaltungen innerhalb des Epitops, genauer

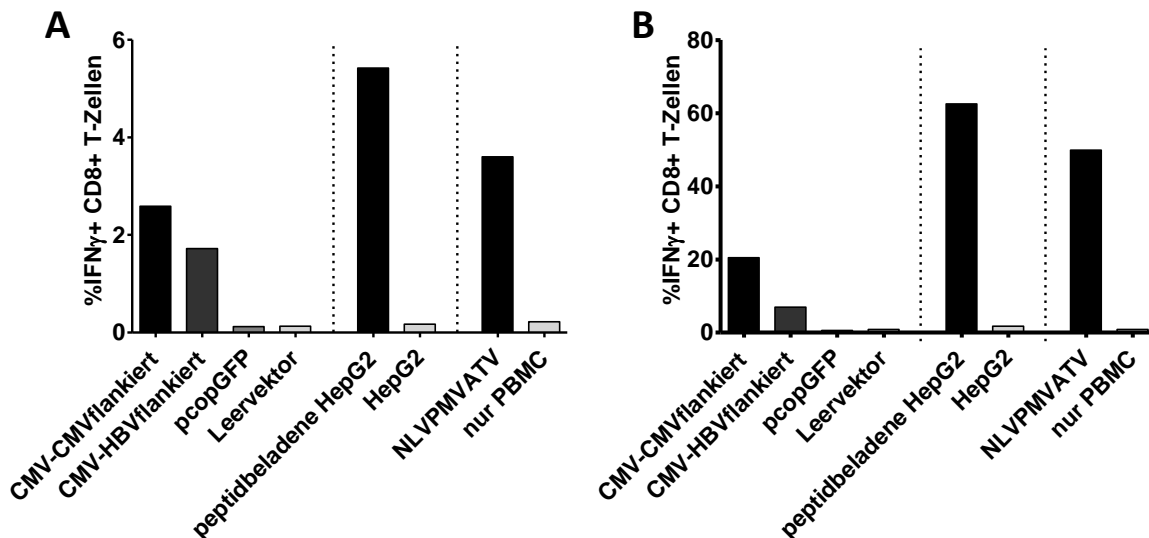
gesagt eine Aminosäure vor der Substitution auf (Abbildung 4.14a). Die Frequenz des korrekten C-Terminus des Epitops V27 war in Anwesenheit der Substitution ebenfalls erhöht, während das Proteasom im Prototypen vermehrt die Aminosäure R28, welche sich bereits außerhalb des Epitops befindet, als C-Terminus generierte (Abbildung 4.14b).

### **4.4.2. Funktioneller Effekt der endogene Prozessierung der transient exprimierten F24Y-Variante ist schwer darstellbar**

Um den Einfluss von Substitutionen auf die endogene Prozessierung untersuchen zu können wurde ein Prozessierungsassay abgewandelt, um ihn für die Detektion der teilweise HBV-spezifischen Immunantworten nutzbar zu machen (Walker et al., 2015). Die erste Herangehensweise nutzte dabei HepG2-Zellen, die das HBVcore<sub>18-27</sub> Epitop transient exprimieren und prozessieren sollten. Diese wurden zur Restimulation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen genutzt, um den Effekt der Substitution auf die Prozessierung funktionell sichtbar zu machen. Zur Assaykontrolle wurden zwei Plasmide entworfen, die CMVpp65<sub>495-503</sub> entweder in Kombination mit der CMV-eigenen flankierenden Regionen oder im Kontext der HBVcore-flankierenden Regionen kodierten. Die Expression von copGFP, dem grün fluoreszierenden Protein des Ruderfußkrebses *Pontellina plumata*, diente einerseits zur Kontrolle des Transfektionserfolgs, andererseits ermöglichte es die Sortierung der transfizierten GFP- und Epitop-exprimierenden HepG2-Zellen.

#### **4.4.2.1. Etablierung des Prozessierungsassays mit PBMCs von gesunden Spendern**

Mit den Kontrollplasmiden p<sub>copGFP</sub>-CMV-CMVflankiert und p<sub>copGFP</sub>-CMV-HBVflankiert, die statt des HBVcore<sub>18-27</sub> Epitops das CMVpp65<sub>495-503</sub> Epitop exprimierten, wurde determiniert, ob auf diesem Plasmid kodierte Epitope tatsächlich exprimiert und prozessiert werden. Da die Plasmide, insbesondere CMV-HBVflankiert, sich von den HBVcore-kodierenden Plasmiden nur in der Sequenz des Epitops unterschieden, welches ebenfalls im Leseraster kodiert wurde, sollte ein erfolgreiches Transfektions- und Restimulationsprotokoll mit den CMV-Plasmiden sich auch auf die HBV-Plasmide übertragen lassen. CMVpp65<sub>495-503</sub> spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen von zwei gesunden Spendern wurden daher mit HepG2 Zellen, die eben jenes Epitop exprimierten, im Verhältnis 1:1 restimuliert und der Anteil IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt (Abbildung 4.15).



**Abbildung 4.15 – Kapazität der transient CMVpp65<sub>495-503</sub> exprimierenden HepG2-Zellen IFN $\gamma$ -Antworten auszulösen**

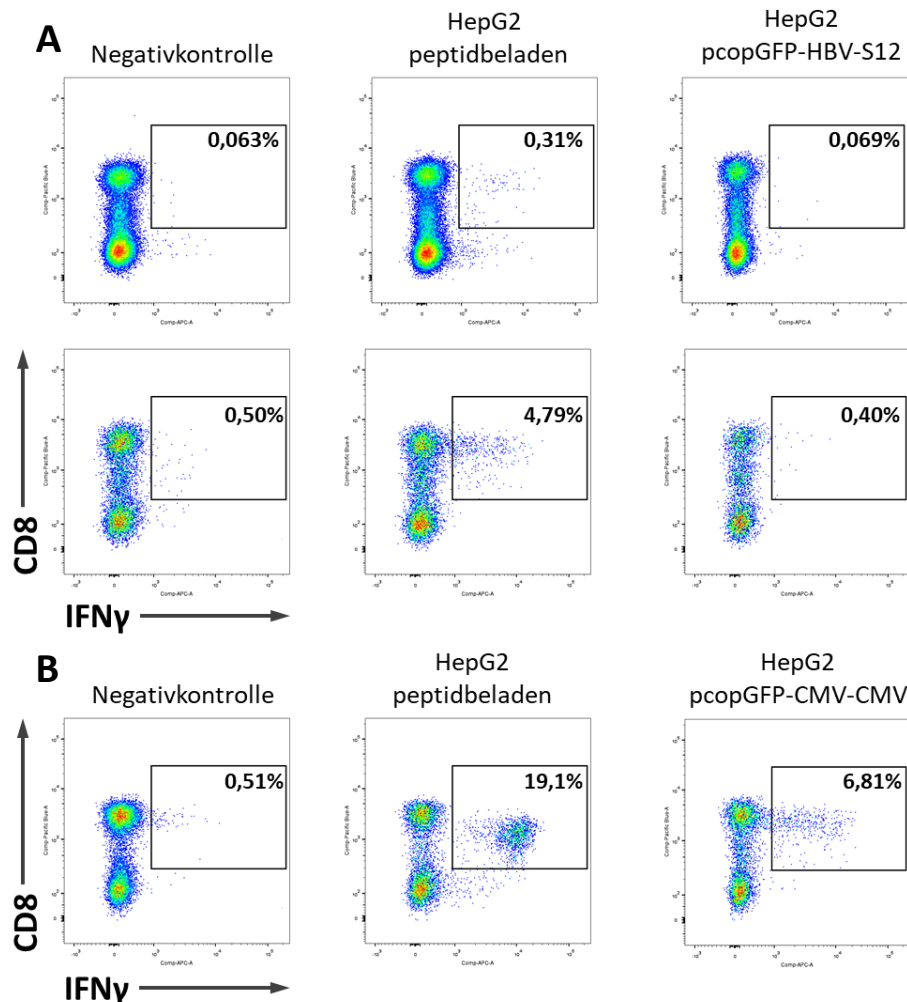
Die Prozessierung des, auf den Plasmiden pcopGFP-CMV-CMVflankiert und pcopGFP-CMV-HBVflankiert kodierten, CMV-Epitops wurde anhand der Induktion der IFN $\gamma$ -Produktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch HepG2-Zellen, welche mit diesen Plasmiden transfiziert waren, untersucht. Dies wurde in Relation mit den CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten nach Restimulierung mit exogen NLVPMVATV-beladenen HepG2-Zellen, sowie exogener Zugabe des CMVpp65<sub>495-503</sub> Peptids, betrachtet. Dargestellt sind die Resultate von zwei gesunden Spendern mit intermediärer CMVpp65<sub>495-503</sub> spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort, B308, (A) und starker pp65-spezifischer Antwort, B316 (B).

In der Tat war es möglich mit den transfizierten Zellen IFN $\gamma$  epitopspezifisch zu induzieren. Die Kontrollen in denen das Ursprungsplasmid sowie das Plasmid pcopGFP, welches nur copGFP kodierte, transfiziert wurden, konnten keine IFN $\gamma$ -Antworten induzieren. Allerdings war der Anteil IFN $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu den Positivkontrollen, in denen die CD8<sup>+</sup> T-Zellen entweder mit peptidbeladenen HepG2-Zellen oder dem exogen zugegebenen pp65-Peptid restimuliert wurden, reduziert. Durch die Restimulation mit den sortierten, transfizierten HepG2-Zellen konnte nur 30-50% der durch peptidbeladene HepG2-Zellen erzielten Antworten erreicht werden (Abbildung 4.15). Des Weiteren deuteten die Ergebnisse bereits an, dass die flankierende Region des HBVcore<sub>18-27</sub> Epitops die Prozessierungseffizienz beeinflusst. Obwohl die gleiche Anzahl GFP<sup>+</sup> HepG2-Zellen eingesetzt wurde, wurden durch die CMV-HBVflankiert Variante tendenziell weniger CD8<sup>+</sup> T-Zellen restimuliert als durch die CMV-CMVflankiert Variante (Abbildung 4.15).

#### **4.4.2.2. Transient exprimiertes, endogen prozessiertes HBVcore<sub>18-27</sub> Epitop induziert keine nachweisbaren CD8<sup>+</sup>T-Zellantworten**

Da es möglich war CMV-spezifische T-Zellantworten mit den generierten Plasmiden zu induzieren, wurde das System auf PBMCs von Patienten mit chronischer HBV-Infektion übertragen. Hierfür wurden HepG2-Zellen zur Restimulation der Epitop-spezifisch

expandierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen eingesetzt, die das HBVcore<sub>18-27</sub> Epitop transient exprimieren. Die HBV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort in den meisten chronisch HBV infizierten Individuen, fielen jedoch deutlich geringer aus, als CMV-spezifische Antworten in gesunden Spendern (Abbildung 4.16). Dies führte dazu, dass sich eine mögliche IFN $\gamma$ -Produktion nicht von der Hintergrundfluoreszenz der Negativkontrolle abgrenzen ließ (Abbildung 4.16).



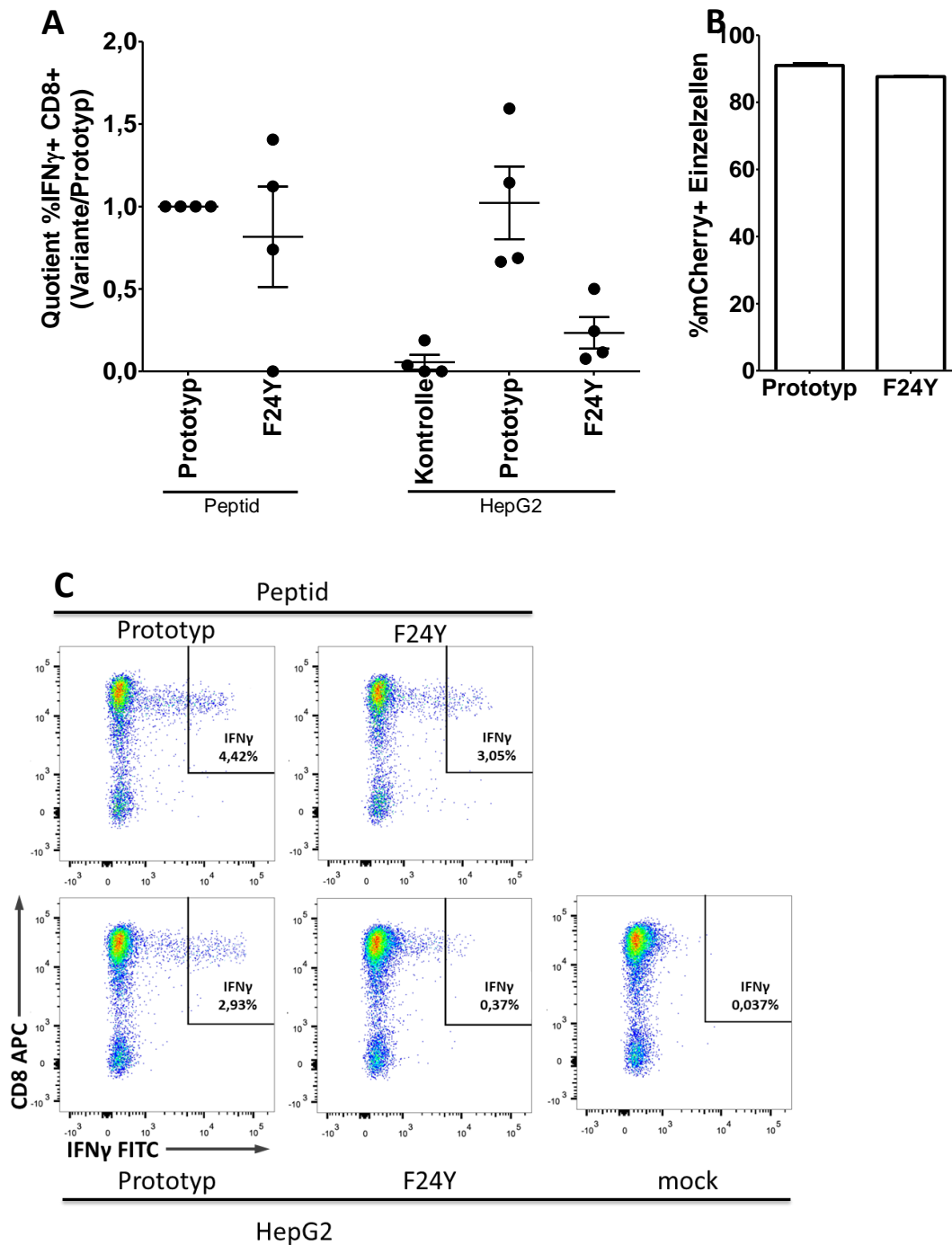
**Abbildung 4.16 – Restimulationskapazität im HBV-Kontext im Vergleich zum CMV-Kontext**

Die transient HBVcore<sub>18-27</sub> (S12) bzw. CMVpp65<sub>495-503</sub> exprimierenden HepG2-Zellen wurden zur Restimulation von expandierten PBMC von zwei Patienten mit chronischer HBV-Infektion bzw. einem gesunden CMV-seropositiven Spender eingesetzt. HepG2-Zellen, welche mit dem HBVcore<sub>18-27</sub> kodierenden Plasmid transfiziert waren, konnten im Vergleich zu peptidbeladenen HepG2-Zellen keine detektierbaren CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten induzieren (A). Im Vergleich dazu war die Restimulation von CMVpp65<sub>495-503</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit HepG2-Zellen, die das Epitop transient exprimieren und endogen prozessieren möglich (B).

### 4.4.3. F24Y-Variante beeinflusst die endogene Prozessierung in stabil HBVcore exprimierenden HepG2-Zellen

Neben der Nutzung von HepG2-Zellen, die das HBVcore<sub>18-27</sub> Epitop transient exprimierten, wurden von Dr. Andreas Walker freundlicherweise HepG2-Zelllinien generiert, die das

gesamte HBVcore Protein stabil exprimieren. Die beiden Zelllinien unterschieden sich einzig und allein durch die An- oder Abwesenheit der F24Y-Substitution im HBVcore<sub>18-27</sub> Epitop.



**Abbildung 4.17 – Effekt der F24Y-Substitution auf die endogene Prozessierung des HBVcore<sub>18-27</sub> Epitops**

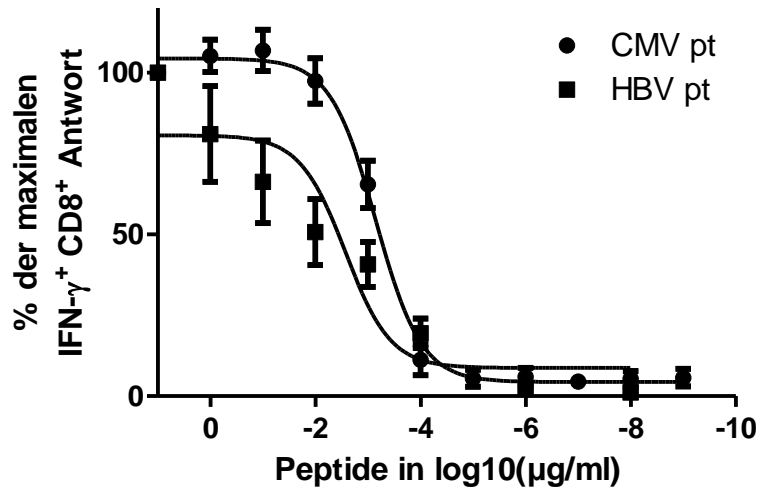
Mit Hilfe von HepG2-Zellen, welche entweder stabil das HBVcore<sub>18-27</sub> Prototyppeptid oder die F24Y Variante exprimierten, wurden spezifisch expandierte PBMCs von HLA-A\*02:01-positiven Patienten mit chronischer HBV-Infektion restimuliert. Anhand der resultierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten wurde der Einfluss der Substitution F24Y im HBVcore<sub>18-27</sub> Protein auf die endogene Prozessierung des Epitops untersucht. Das Verhältnis an IFN $\gamma$ -produzierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist, normalisiert auf die Frequenz dieser Zellen nach Restimulation mit dem exogen zugegebenen Prototyppeptid, dargestellt (A). Die Expression des fluoreszierenden Markers mCherry gibt Aufschluss über die Expression des HBVcore Proteins mit einer Substitution (F24Y) oder ohne (Prototyp), da das gesamte HBVcore Protein als Fusionsprotein mit mCherry kodiert vorlag (B). Repräsentative DotPlots der durchflusszytometrischen Analyse sind für einen Patienten dargestellt (C).

Als Expressionsmarker diente hier das fluoreszierende Protein mCherry, das als Fusionsprotein mit dem HBVcore Protein kodiert war. So konnte der Einfluss dieser Substitution auf die Prozessierung des Epitops im Kontext des gesamten Proteins untersucht werden. Der Anteil IFN $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen induziert durch exogen zugegebenes Prototyppeptid wick nur marginal von dem Anteil, der durch endogen prozessiertes Prototyppeptid angeregt wurde, ab. Die Restimulation mit der exogen zugegebenen F24Y Variante des Peptids hatte einen variierenden Einfluss auf den Anteil IFN $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen, der sich aber im Mittel nicht signifikant vom Prototyppeptid unterschied. Wurde jedoch die durch endogene Prozessierung präsentierte F24Y-Variante für die Restimulierung der HBVcore<sub>18-27</sub> spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen eingesetzt, reduzierte sich der Anteil IFN $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen deutlich im Vergleich zum endogen prozessierten Prototyp. Die Variante F24Y schien daher einen Einfluss auf die endogene Prozessierung des Epitops zu haben (Abbildung 4.17a). Die Unterschiede sollten jedoch nicht in unterschiedlich starker Expression der beiden Epitopvarianten begründet liegen, da sie als Fusionsproteine mit mCherry beide gleichermaßen exprimiert zu sein schienen (Abbildung 4.17b).

### **4.5. Identifizierung einer CMVpp65<sub>495-503</sub> Variante mit niedriger T-Zell-Rezeptoravidität**

Da es deutliche Unterschiede in der Prozessierungs- und Restimulationseffizienz der auf Plasmiden kodierten CMV- und HBV-Epitope zu geben schien, wurde nach einer CMVpp65 Variante gesucht, die für den Vergleich mit dem HBVcore Epitop geeigneter war. Die Avidität des HBVcore<sub>18-27</sub>-spezifischen TCR schien nämlich geringer zu sein, als die Avidität der CMVpp65<sub>495-503</sub>-spezifischen TCR für das entsprechende Epitop ( $EC_{50_{HBV}} 2 \times 10^{-3}$  zu  $EC_{50_{CMV}} 7 \times 10^{-4}$ ) (Abbildung 4.18).

Die Variante sollte zum einen eine mit dem CMVpp65 Prototyp vergleichbare Affinität für das HLA-A\*02:01 Molekül haben, durch eine niedrigere Avidität des T-Zell-Rezeptors gekennzeichnet sein und dennoch von CMVpp65-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen kreuzreaktiv erkannt werden.

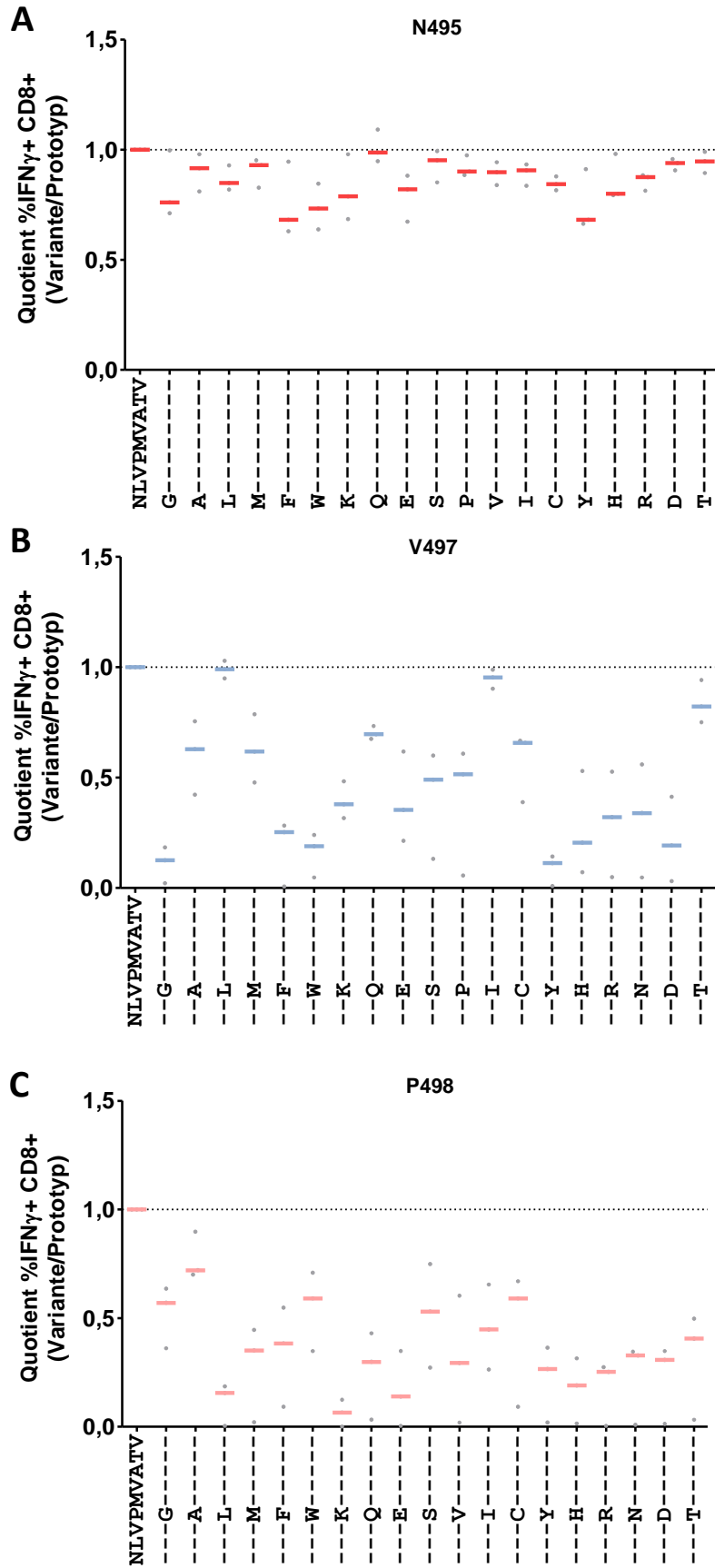


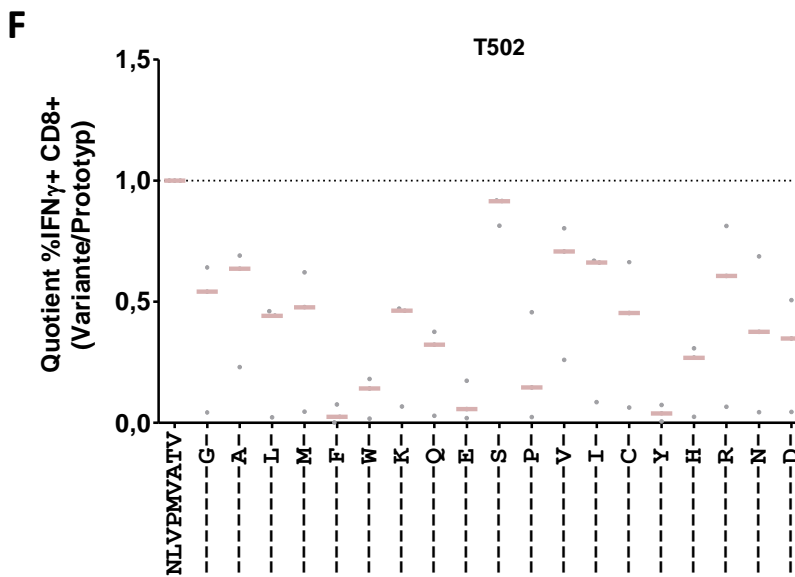
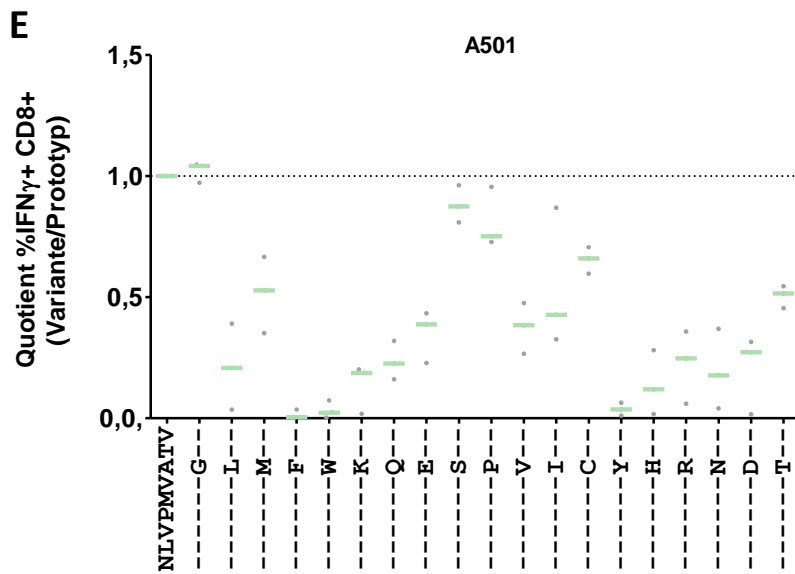
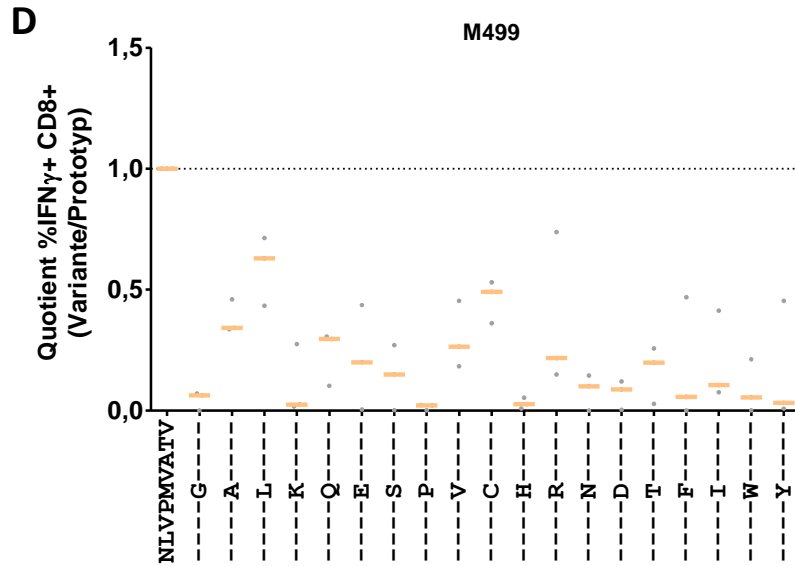
**Abbildung 4.18 – Einfluss der Peptidkonzentration auf die Restimulation der HBVcore und CMVpp65-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

Die Konzentration der Prototyppeptide, die zur Restimulation der proliferierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen eingesetzt werden, wurde anhand der PBMCs von jeweils drei Spendern titriert. Hierfür wurde die Standardkonzentration (10 µg/ml) in 1:10-Verdünnungsschritten bis zu einer Konzentration von 10<sup>-9</sup> µg/ml verdünnt und die IFN $\gamma$ -Produktion der spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen analysiert.

#### 4.5.1. Substitutionen im CMVpp65<sub>495-503</sub>-Epitop beeinflussen das Kreuzreaktivitätsprofile von spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Abhängigkeit der Position

Zunächst wurde eine Peptidsammlung generiert in der alle Positionen des CMVpp65<sub>495-503</sub> Epitops NLVPMVATV, die keine Ankerfunktion für die Bindung an das HLA-Molekül haben, durch sämtliche natürlich vorkommende Aminosäuren substituiert waren. Die Sammlung umfasste 114 Varianten mit Substitutionen an den Positionen N495, V497, P498, M499, V501 und A502 des Nonamerepitops. CMVpp65<sub>495-503</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen von drei CMV-positiven HLA-A\*02:01-positiven Spendern wurden auf ihre Kreuzreaktivität all dieser Varianten gegenüber untersucht. Eine breite Kreuzreaktivität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen war nur beim Austausch von Asparagin (N495) zu verzeichnen, während Substitutionen an allen anderen Positionen, in den meisten Fällen, mindestens zu einer 50%-igen Reduktion der IFN $\gamma$ -Antwort im Vergleich zum Prototyppeptid führten (Abbildung 4.19). Die niedrigsten durch kreuzreaktive Erkennung der Varianten induzierten IFN $\gamma$ -Antworten wurden bei Substitutionen an Position M499 detektiert (Abbildung 4.19d).





### Abbildung 4.19 – Kreuzreaktivität CMVpp65-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber 114 Varianten des A\*02-Epitops NLVPMVATV

Jede Position des CMVpp65<sub>495-503</sub> NLVPMVATV-Epitops, die keinen essentiellen Beitrag zur Bindung an das HLA-A\*02-Molekül liefert, wurde durch jede verfügbare Aminosäure substituiert und CMVpp65-Prototyp-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit den resultierenden Peptide restimuliert, um Varianten zu identifizieren, auf die CD8<sup>+</sup> T-Zellen kreuzreaktiv reagieren können. Die CMVpp65-spezifisch expandierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus PBMCs von drei CMV-seropositiven HLA-A\*02:01 tragenden anderweitig gesunden Spendern wurden dabei mit Peptiden, die Substitutionen an Position N495 (A), Position V497 (B), Position P498 (C), Position M499 (D), Position A501 (E) und Position T502 (F) aufwiesen, restimuliert. Dargestellt ist die Abweichung des Anteils IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen von der prototypspezifischen Antwort nach Restimulation mit der jeweiligen Variante (%IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen Variante/%IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen Prototyp).

#### 4.5.2. Bestimmte Substitutionen reduzieren die Avidität der CMVpp65-spezifischen T-Zell-Rezeptoren

Da eine Variante gesucht wurde, die kreuzreaktiv von CMVpp65<sub>495-503</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkannt werden konnte, wurden in die weitere Analyse nur die Varianten eingeschlossen, die 50% oder mehr der prototypspezifischen Antwort induzieren konnten. Um die Avidität der T-Zell-Rezeptoren dem Prototyppeptid und den Varianten gegenüber besser vergleichen zu können, wurde die niedrigste Konzentration des Prototyppeptids gewählt, die noch eine maximale CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort auslösen konnte ( $10^{-2}$   $\mu\text{g/ml}$ ) (Abbildung 4.18). Damit wurde der Einfluss dieser Konzentrationsreduktion der ausgewählten Varianten auf ihr Potential CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu restimulieren untersucht. Indem der Anteil IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen unter Standardbedingungen mit dem Anteil IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei reduzierter Peptidkonzentration ins Verhältnis gesetzt wurde, konnten einige Varianten, die durch die Peptidreduktion am stärksten in ihrer Kapazität IFN $\gamma$ -Antworten auszulösen eingeschränkt waren, identifiziert werden (Abbildung 4.20). Auf die Varianten N495W, N495D, P498W, P498S sowie T502A waren die Auswirkungen am stärksten, sodass im Folgenden ihre Bindungskapazität mit dem HLA-A\*02:01-Molekül *in silico* und *in vitro* untersucht wurde.

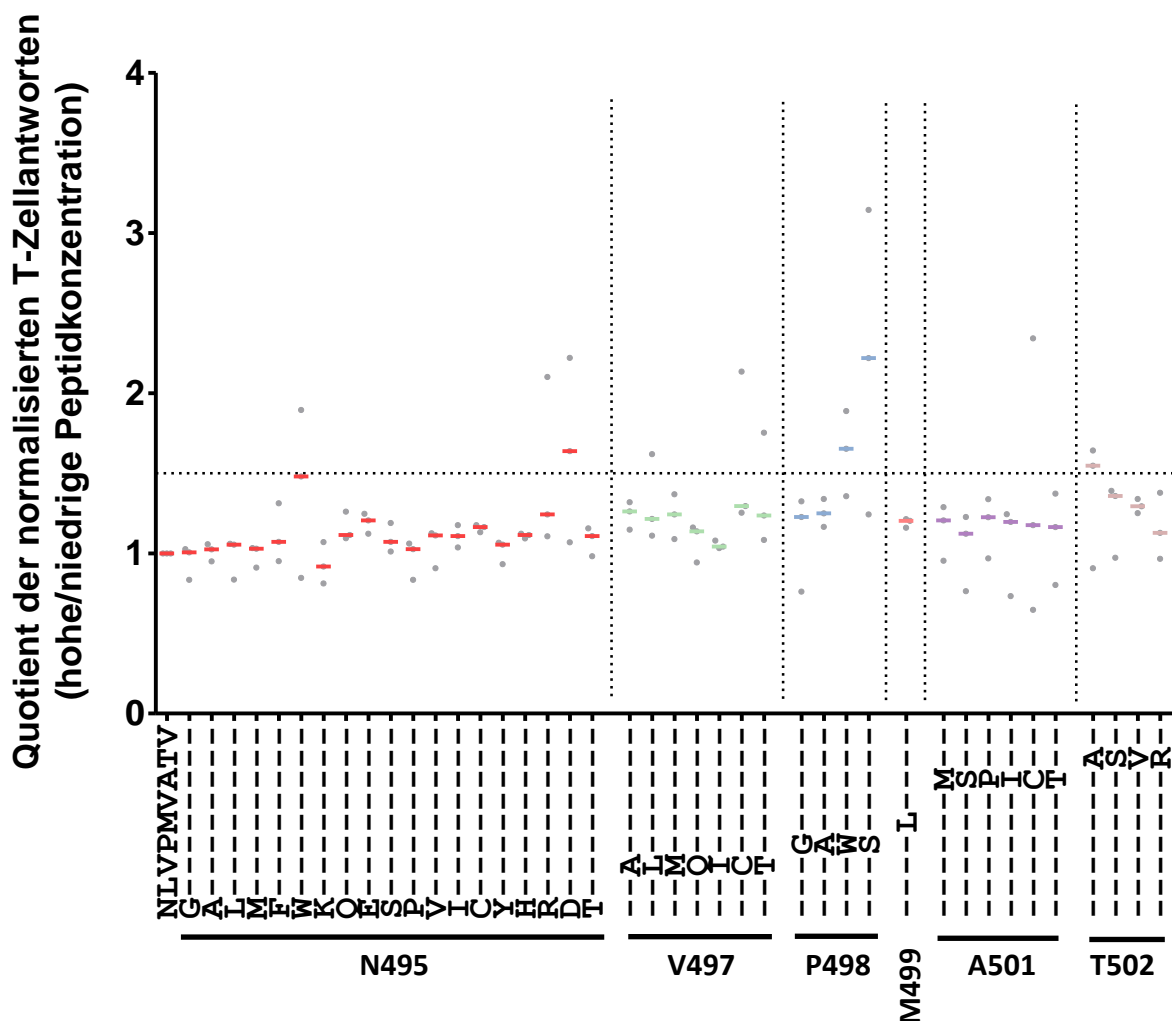


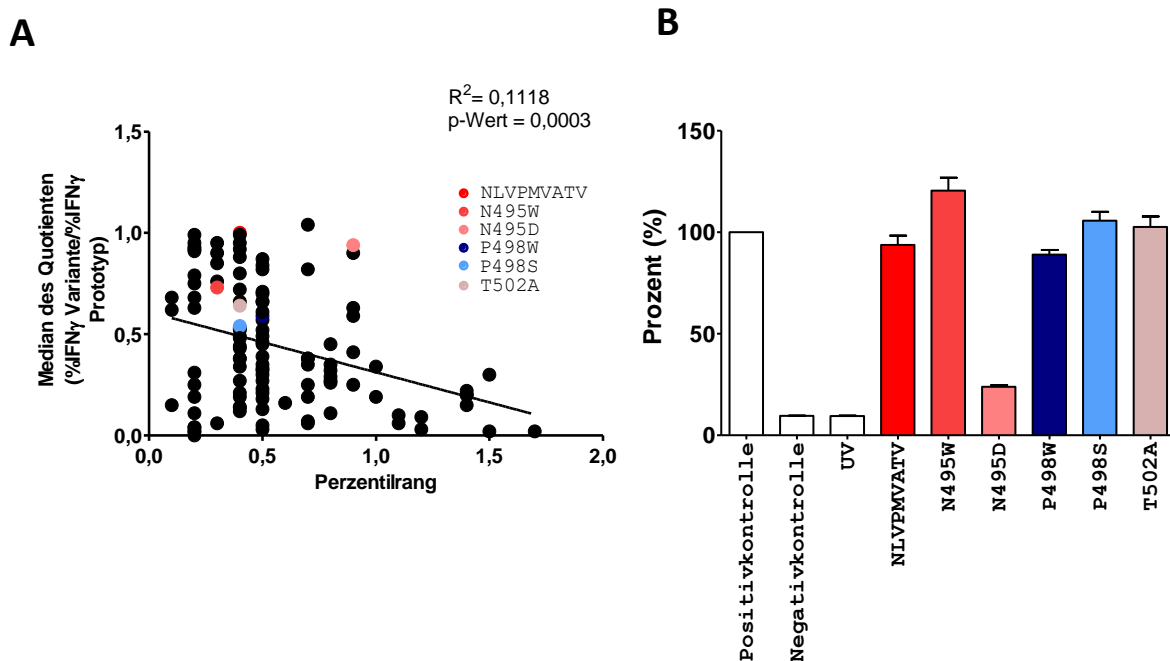
Abbildung 4.20 – Kreuzreaktivität CMVpp65-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei 10 µg/ml vs 10<sup>-2</sup> µg/ml Peptid

Expandierte CMVpp65<sub>495-503</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> aus PBMCs von CMV-seropositiven Spendern wurden an Tag zehn entweder mit der Standardpeptidkonzentration 10 µg/ml oder der zuvor gewählten reduzierten Konzentration 10<sup>-2</sup> µg/ml des Prototyppeptids oder den Varianten restimuliert. Dargestellt ist der Einfluss der reduzierten Peptidkonzentration auf den Anteil IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Angegeben ist der Faktor mit dem sich die auf den Prototyp normalisierte Abweichung der CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort der unterschiedlichen Varianten durch die reduzierte Peptidkonzentration ändert.

#### 4.5.3. Die Substitutionen beeinflussen die Bindung an das HLA-A\*02:01-Molekül in unterschiedlichem Maße

Da die Bindung der Peptidvarianten an das HLA-Molekül ein ausschlaggebendes Kriterium für den starken Einfluss der Peptidreduktion sein kann, wurde die HLA-A\*02:01-Bindung der fünf Varianten mit der des Prototyppeptids verglichen. Mit Hilfe des MHC-I Bindungsprognosealgorithmus der *Immune Epitope Database And Analysis Resource* ([www.iedb.org](http://www.iedb.org)) wurde determiniert, wie gut die Varianten theoretisch an das HLA-A\*02:01-Molekül binden können. Die untersuchten Substitutionen schienen die Bindung der CMVpp65-Varianten an das HLA-A\*02:01-Molekül allerdings nur minimal zu beeinflussen, da die Rangverteilung sich nur in einem Bereich von 0,1 bis 1,7 bewegte, was auf eine hohe Affinität

der Moleküle füreinander hindeutet. Einige der Substitutionen verstärkten sogar die Bindung des Epitops an das HLA-A\*02:01-Molekül. Ein Beispiel hierfür ist N495W, welches sowohl in der theoretischen Vorhersage, als auch im *in vitro* Bindungsassay der Prototypvariante überlegen war (Abbildung 4.21). Im Gegenzug dazu reduzierten einige Substitutionen die Bindung des Peptids an das HLA-Molekül. Die Variante N495D beispielsweise, führt *in silico* zu einer Verschiebung des Rangs von 0,4 auf 0,9 führte. Auch im praktischen Versuch konnte dies bestätigt werden, da sie nur einen Bruchteil der Bindungskapazität des Prototyppeptids aufwies (Abbildung 4.21). Allerdings schien es keine starke, dennoch signifikante Korrelation der HLA-Bindungsstärke und der Induktion einer kreuzreaktiven T-Zellantwort zu geben ( $R^2=0,1118$ , p-Wert=0,0003) (Abbildung 4.21).



**Abbildung 4.21 – Bindung der CMVpp65<sub>495-503</sub> Varianten an das HLA-A\*02:01 Molekül**

Die Bindung der Varianten des CMVpp65<sub>495-503</sub> Epitops an das HLA-A\*02:01 Molekül wurde *in silico* (A) in Korrelation mit der durch sie induzierten Änderung der CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort und *in vitro* (B) betrachtet. Das CMVpp65<sub>495-503</sub> Prototyppeptid wurde in diesem Assay auch als Positivkontrolle eingesetzt. Als Negativkontrolle diente das HLA-A\*11:01-restringierte EBV Epitop IVTDFSVIK, ebenso, wie das ungebundene UV-bestrahlte HLA-A\*02:01 Molekül.

#### 4.5.4. Die Substitutionen P498W und P498S reduzieren die Avidität der T-Zell-Rezeptoren der CD8<sup>+</sup> T-Zellen deutlich

Um herauszufinden, ob es bei diesen Varianten tatsächliche Unterschiede in der funktionellen Avidität gibt, wurde die IFN $\gamma$ -Antwort der T-Zellen in einer Verdünnungsreihe von zehn Logstufen titriert. Die Substitution N495W, die die HLA-Epitop-Bindung sogar verstärkte,

## Ergebnisse

zeigte erst bei einer Reduzierung der Peptide um drei Logstufen eine Verminderung der maximalen Antwort. Der Austausch T502A, der keinen Einfluss auf die HLA-Bindung hatte, zeigte auch hier neben der N495W Variante die geringste Veränderung in der Avidität der T-Zellen (Abbildung 4.22).

Die beiden Varianten mit Substitutionen an Position 498 hingegen banden das HLA-A\*02:01-Molekül vergleichbar mit dem Prototyppeptid (Abbildung 4.21). Zudem zeigten die CD8<sup>+</sup> T-Zellen schon bei einer Reduktion der Peptidkonzentration um eine Logstufe (P498W) bzw. zwei Logstufen (P498S) ein Absinken der maximal möglichen Reaktion (Abbildung 4.22a). Die Avidität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde also im Vergleich zum Prototyppeptid NLVPMVATV durchaus verringert. Der Einfluss dieser beiden Varianten auf die Avidität der TCR konnte durch Expansion variantenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen untermauert werden. CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die mit dem Prototyppeptid expandiert wurden, zeigten bereits bei einer geringeren Peptidreduktion einen Abfall der IFN $\gamma$ -Antwort, während andersherum variantenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen selbst bei einer Reduktion des Prototyppeptids um fünf Logstufen nur minimal geringere Antworten aufwiesen (Abbildung 4.22b). Die Restimulation der variantenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit dem entsprechenden Peptid jedoch zeigten bereits bei deutlich höheren Konzentrationen reduzierte T-Zellantworten. Zusammengefasst deutete dies daraufhin, dass die Avidität der prototypspezifischen, aber auch der variantenspezifischen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen für das Prototyppeptid deutlich über der Avidität für die jeweilige Variante lag. Daher wurden die beiden Substitutionen P498W und P498S ausgewählt, um zu verifizieren, ob die geringe Avidität der HBVcore<sub>18-27</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen tatsächlich eine Rolle in der endogenen Prozessierung transient exprimierter Varianten spielen könnte.

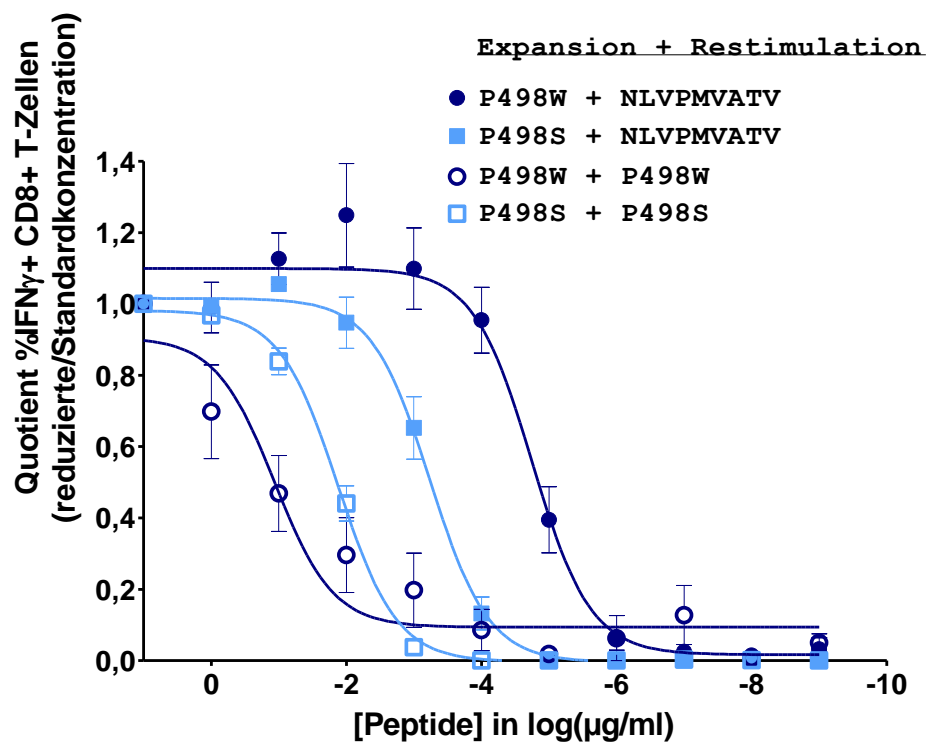
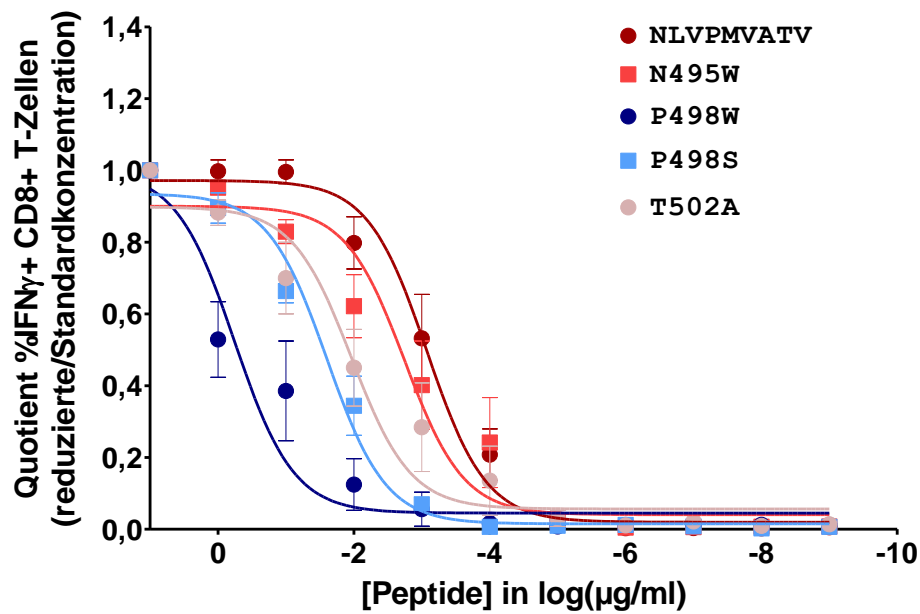
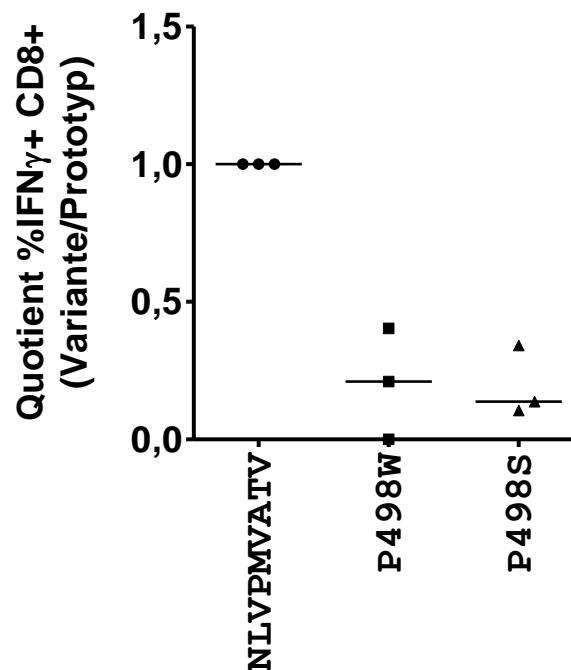


Abbildung 4.22 – Titration der ausgewählten CMVpp65<sub>495-503</sub> Varianten

Die Kapazität der ausgewählten Varianten des Epitops in verschiedenen Konzentrationen spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten zu induzieren wurde bestimmt. Hierfür wurden CMVpp65<sub>495-503</sub>-spezifisch expandierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen von CMV-seropositiven Spendern mit den ausgewählten Varianten in den Konzentrationen 1:10-Verdünnungsschritten bis zu einer Konzentration von 10<sup>-9</sup> μg/ml restimuliert (A). Daneben wurden CMVpp65<sub>495-503</sub>-Varianten-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen expandiert und mit der entsprechenden Variante oder dem Prototyppeptid in den oben genannten Konzentrationen restimuliert (B).

#### 4.5.5. Die Substitutionen P498W und P498S inhibieren Restimulierung nach endogener Prozessierung des Epitops

Die generierten Plasmide p<sub>cop</sub>GFP-CMV-P498W und p<sub>cop</sub>GFP-CMV-P498S wurden ebenso wie das Plasmid, welches das Prototyppepitop NLVPMVATV kodiert, zur transienten Transfektion von HepG2-Zellen eingesetzt. Diese wurden nach Anreicherung der copGFP exprimierenden Zellen durch durchflusszytometrische Sortierung zur Restimulation von CMVpp65<sub>495-503</sub> spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen von gesunden Spendern eingesetzt. Die IFN $\gamma$ -Antwort der CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Restimulation mit einer der Zelllinien, die eine Substitution aufwiesen, waren deutlich reduziert, im Vergleich zur Restimulation mit Prototyp-exprimierenden HepG2-Zellen (Abbildung 4.23). Die Substitutionen schienen also entweder die Avidität der TCR der CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu beeinflussen oder aber die Prozessierung des Epitops.



**Abbildung 4.23 – Prozessierung der CMVpp65<sub>495-503</sub> Varianten im Vergleich zum Prototyppepitop**

PBMCs von drei gesunden CMV-seropositiven Spendern wurden mit dem Prototyp des CMVpp65<sub>495-503</sub> Epitops expandiert und an Tag zehn mit HepG2-Zellen, die transient das Epitop oder die Varianten P498W bzw. P498S exprimieren restimuliert. Dargestellt ist die Abweichung der durch die Varianten induzierten Antworten von der Prototyp-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort als Median der Quotienten.

## 5. Diskussion

Trotz der Verfügbarkeit präventiver Vakzine, die effektiv vor einer Infektion mit HBV schützen, und einem weltweit implementierten Impfschema, stellen Neuinfektionen und chronisch verlaufende Infektionen noch immer ein großes Problem für die Gesundheit der Weltbevölkerung dar. Die Möglichkeit des Virus auch Jahre nach Etablierung der Immunkontrolle wieder replizieren zu können und die damit verbundene Notwendigkeit direkt antiviral wirkende Therapien ein Leben lang fortzuführen sind dabei zwei Faktoren, welche die Suche nach neuen Therapieansätzen nötig machen. Aufgrund der Relevanz von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der funktionellen Ausheilung einer akuten HBV-Infektion, wie in Schimpansen als Modellorganismus gezeigt werden konnte, ist dieser Zelltyp ein attraktives Ziel neuer Therapien (Thimme et al., 2003). Ein möglicher Ansatz ist die Entwicklung therapeutischer Vakzine durch die CD8<sup>+</sup> T-Zellen, aber auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen, mobilisiert und aktiviert werden. Alternativ ist der adoptive Transfer von genetisch modifizierten autologen T-Zellen denkbar (Wisskirchen et al., 2017). Exprimieren diese Zellen TCR, die kreuzreaktiv verschiedene HBV-spezifische Epitope und Epitopvarianten erkennen, könnte das idealerweise zur Zytokin-vermittelten Reduzierung der cccDNA, sowie zur Eliminierung der infizierten Hepatozyten und damit des Reservoirs an cccDNA führen (Xia et al., 2016). Bei dieser Entwicklung müsste allerdings das Gleichgewicht zwischen T-Zell vermittelter Zytotoxizität und Leberregeneration beachtet werden. Solche zielgerichteten, genetisch modifizierten T-Zellen werden in der Behandlung bestimmter maligner Erkrankungen, wie Melanomen und Neuroblastomen, bereits erprobt (Pule et al., 2008, Johnson et al., 2009).

Insbesondere HBVcore spezifische CD8<sup>+</sup> T Zellantworten sind mit der Ausheilung akuter HBV-Infektionen assoziiert (Maini et al., 1999). Aufgrund dessen und seiner Immundominanz liegt insbesondere in dem HBVcore<sub>18-27</sub> Epitop deutliches Potential für die Entwicklung einer neuen Therapie. Als HLA-A\*02-restringiertes Epitop, induziert es CD8<sup>+</sup> T Zellantworten. Es kann jedoch auch über weitere HLA-Allele präsentiert werden und könnte dadurch Therapieoptionen für mehr als die Hälfte der Bevölkerung bieten (González-Galarza et al., 2014). Kefalakes et al. konnten anhand der autologen Virussequenzen in einer Kohorte von Patienten mit chronischer HBV-Infektion zeigen, dass Mutationen auftreten, die wahrscheinlich durch CD8<sup>+</sup> T-Zell vermittelten, immunologischen Selektionsdruck auf das HBVcore<sub>18-27</sub> Epitop entstehen (Kefalakes et al., 2015a). Die Analyse der funktionellen Effekte dieser Substitutionen auf die Immunantworten von CD8<sup>+</sup> T-Zellen könnte Informationen liefern, die der Entwicklung von therapeutischen Impfstoffen oder der Modifikation von T-Zell-Rezeptoren nützen. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob sich die auf

Sequenzebene identifizierten Substitutionen auch funktionell als *Escape*-Mutationen bestätigen lassen oder ob HBV<sub>core18-27</sub> spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen gewissen Substitutionen gegenüber kreuzreaktiv sind.

### **5.1. Die untersuchten Substitutionen beeinflussen die Funktionalität der HBV<sub>core18-27</sub> spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

#### **5.1.1. Das HBV<sub>core18-27</sub> Epitops weist eine hohe Sequenzvariabilität auf und kann durch multiple HLA-Allele präsentiert werden**

Der Selektionsdruck, den Kefalakes et al. beschrieben haben, bezieht sich ausschließlich auf den Einfluss von HLA-A\*02 auf die Sequenzvariabilität des HBV<sub>core18-27</sub> Epitops (Kefalakes et al., 2015a). Eine um eine Aminosäure verkürzte Sequenz, HBV<sub>core19-27</sub>, ist jedoch als HLA-B\*35- und HLA-B\*51-restringiert beschrieben (Bertoni et al., 1997). Diese Restriktion scheint allerdings nicht ausschließlich zu sein, da das Epitop HBV<sub>core18-27</sub> auch die IFN $\gamma$ -Produktion von HBV<sub>core19-27</sub> spezifisch expandierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen von HLA-B\*51-positiven Patienten induzieren kann (Thimme et al., 2001). Auch andersherum ist diese Restriktion nicht exklusiv, wie in dieser Arbeit an Patienten mit chronischer HBV-Infektion gezeigt werden konnte. Der deutliche Anteil IFN $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach HBV<sub>core18-27</sub> spezifischer Expansion der frisch isolierten PBMCs von Patienten, die ausschließlich HLA-A\*02:01-, HLA-B\*35:01/03- oder HLA-B\*51-Subtypen exprimieren, verglichen mit den CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten in chronisch infizierten Patienten, die andere A\*02 oder B\*35-Subtypen exprimieren, unterstreicht dies. Eine gewisse Bindung des Epitops an andere HLA-A\*02-Subtypen kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, da eine minimale Antwort auch bei den HLA-A\*02:xx exprimierenden Patienten zu verzeichnen ist. Die Anzahl der untersuchten A\*02:xx-positiven Patienten erlaubt jedoch keine vollständigen Rückschlüsse, wie auch von Livingston *et al.* (Livingston et al., 1999) detektiert, da in diesen Patienten individuell keine CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten induzierbar sind. Bertoletti *et al.* haben die Bindung unterschiedlicher HLA-A\*02:xx-Subtypen ebenfalls nur anhand einzelner individueller EBV-transformierter B-Lymphoblastoidzelllinien beschrieben (Bertoletti et al., 1997). Der Fokus dieser Arbeit liegt daher auf HLA-A\*02:01-positiven Patienten. HBV<sub>core18-27</sub> spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen von Patienten, die entweder die HLA-Allele A\*02:01 und B\*35:01/03 oder die Allele A\*02:01 und B\*51 exprimieren, zeigten IFN $\gamma$ -Antworten nach Restimulation mit HBV<sub>core18-27</sub> beladenen PBMCs sowohl von gesunden Spendern, die ausschließlich HLA-A\*02:01 exprimieren, als auch von Spendern, die eines der Allele HLA-B\*35:01/03 oder -B\*51 exprimieren. Der

Selektionsdruck der CD8<sup>+</sup> T-Zellen und das damit einhergehende Auftreten von Substitutionen kann daher nicht allein durch die Immunantworten, welche durch die HLA-A\*02:01:FLPSDFFPSV:TCR-Bindung ausgelöst werden, vermittelt werden, sondern auch durch Einflüsse dieser HLA-B Allele.

In dieser Arbeit war es, anders als bei Kefalakes *et al.*, möglich die HBVcore<sub>18-27</sub> Sequenzen einer substantiellen Anzahl an HLA-A\*02:01-positiven Patienten, unabhängig von denjenigen, die zusätzlich ein HLA-B\*35:01/03, HLA-B\*51-Allel oder einen andere HLA-A\*02-Subtypen exprimieren, zu untersuchen (Kefalakes *et al.*, 2015a). Durch die Inklusion von Patienten aus Düsseldorf mit einer chronischen HBV-Infektion und bekanntem HLA-Haplotypen, konnte die Anzahl der verfügbaren autologen Sequenzen auf 291 ausgeweitet werden. Daher konnte die Analyse ebenfalls für Patienten, die B\*35:01/03 oder B\*51 unabhängig exprimieren, durchgeführt werden. Darüberhinausgehend konnte eine Patientengruppe inkludiert werden, welche zwei oder drei dieser Allele in Kombination exprimiert. Den Ergebnisse dieser Analyse zufolge, ist die Sequenzvariabilität dieses Epitops deutlich diverser, als ursprünglich angenommen (Bertoletti *et al.*, 1994a, Rehmann *et al.*, 1995, Kefalakes *et al.*, 2015a). Im Kontext von HLA-A\*02:01 positiven Patienten und in Patienten mit kombiniertem HLA-Typ war der Variantenreichtum zudem ausgeprägter als in HLA-B\*35:01/03- oder HLA-B\*51-positiven Patienten. Diese Unterschiede wurden vor allem durch die Präsenz von Doppelsubstitutionen in A\*02:01-positiven Patienten vermittelt. Da die Substitutionen an Position S21, F24 und V27 sowohl als Einzelsubstitutionen als auch in Kombination mit weiteren Mutationen auftreten, ist davon auszugehen, dass sie die virale Fitness nicht signifikant einschränken, wie es beispielsweise für einige Einzelsubstitutionen in HCV-spezifischen Epitopen beschrieben ist (Neumann-Haefelin *et al.*, 2011, Oniangue-Ndza *et al.*, 2011).

Die zuvor angenommene Dominanz der Substitutionen S21A und S21T in HLA-A\*02-positiven Patienten, im Gegensatz zu nicht-A\*02-positiven Patienten (Kefalakes *et al.*, 2015a), ließ sich durch die Erweiterung der Kohorte nur tendenziell für S21A in der Kombination aus Einzel- und Doppelsubstitutionen bestätigen. Selbst aufaddiert war diese Anreicherung in A\*02:01-positiven Patienten nicht signifikant gegenüber Patienten, die weder A\*02, B\*35 noch B\*51 Allele tragen. Das Virus toleriert unserer Kohorte zufolge jedoch insgesamt elf verschiedene Aminosäuresubstitutionen an dieser Position, wovon nur vereinzelte bereits genauer beschrieben sind (Bertoletti *et al.*, 1994a, Bertoletti *et al.*, 1994b, Aye *et al.*, 1994, Rehmann *et al.*, 1995, Bertoletti *et al.*, 1997, Maini *et al.*, 2000). Überraschend war zudem die signifikante Anreicherung der Substitutionen S21H-F24Y und S21H-V27I in A\*02:01-

positiven Patienten, für die bislang kein Hinweis auf Selektionsdruck zu verzeichnen war. Anzumerken ist dabei allerdings, dass beispielsweise V27I der Konsensussequenz der HBV Genotypen B und C entspricht, zwei Genotypen, die vor allem im südostasiatischen Raum eine hohe Prävalenz aufweisen (Cheng et al., 2014). Anderen Quellen zufolge ist die Aminosäurerestriktion dieser Position im HLA-A\*02:01 Kontext zudem flexibel. So kann im optimalen Bindungsmotiv des HLA-A\*02:01-Moleküls diese Position von einem Valin oder anderen Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten besetzt sein (Falk et al., 1991, Hunt et al., 1992, Bertoletti et al., 1993). Hierzu zählen auch die Aminosäuren Isoleucin und Alanin, welche auch in unserer Kohorte häufig in der HBVcore<sub>18-27</sub> Sequenz detektiert werden konnten. Ein funktioneller Hinweis auf eine *Escape*-Mutation durch Substitution mit diesen beiden Aminosäuren wäre demnach wahrscheinlich nicht auf eine eingeschränkte Bindung an das HLA-A\*02:01 Molekül zurückzuführen. Dies lässt sich auch für Isoleucin im Kontext der HLA-B\*51-Allelfamilie sagen, da das optimale Bindungsmotiv, ebenso wie im A\*02-Kontext, ein Isoleucin als C-terminale Ankerposition enthält (Rapin et al., 2008), was der Variante V27I des HBVcore<sub>18-27</sub> Epitops entspricht. Interessanterweise scheinen die HLA-B\*35:01/03 Moleküle das HBVcore<sub>18-27</sub> Epitop unseren Daten zufolge binden und präsentieren zu können, obwohl das Epitop nicht deren optimalen Bindungsmotiven entspricht (Rapin et al., 2008).

Da nach detaillierterer Betrachtung der Sequenzvariabilität in A\*02:01-positiven Patienten ein größeres Spektrum an Substitutionen in dem HBVcore<sub>18-27</sub> Epitop zu verzeichnen war, als ursprünglich angenommen, war es von noch größerem Interesse zu determinieren, ob einige der gefundenen Substitutionen auch funktionell Hinweise auf *Escape* bieten.

### 5.1.2. HBVcore<sub>18-27</sub> spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind breit kreuzreaktiv

Dem Charakter einer *Escape*-Mutation zu Eigen wäre das Unvermögen prototypspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen diesen Epitopvarianten adäquate Immunreaktionen entgegenzubringen, wie bereits für HCV, HIV und für ein weiteres HBV-Epitop beschrieben ist (Goulder et al., 1997, Khakoo et al., 2000, Timm et al., 2004, Meyer-Olson et al., 2004, Crawford et al., 2009, Bronke et al., 2013). Zum einen können sie die Bindung der T-Zell-Rezeptoren an den HLA:Peptid-Komplex einschränken, wie für HCV bereits bekannt ist (Meyer-Olson et al., 2004), zum anderen kann die Bindung der Peptide an das entsprechende HLA-Molekül beeinträchtigt sein (Bronke et al., 2013). Ob die in unserer Patientenkohorte identifizierten Substitutionen daher auch auf funktioneller Ebene als *Escape*-Mutationen zu deklarieren sind, wurde anhand ihrer Kapazität die IFN $\gamma$ -Produktion HBVcore<sub>18-27</sub> prototypspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen kreuzreaktiv zu induzieren, untersucht.

Insgesamt bot sich ein unerwartetes Bild für die Kreuzreaktivität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen der HLA-A\*02:01-positiven Patienten. Anders als angenommen reduzierte keine der getesteten Varianten die CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten der HLA-A\*02:01-positiven Patienten vollständig, wie es für viele Varianten in HLA-B\*51 positiven Patienten der Fall war. Bei der Betrachtung der Ergebnisse für HLA-B\*35:01/03 und HLA-B\*51 muss allerdings berücksichtigt werden, dass nur sehr wenige Proben für die Analyse genutzt werden konnten. Daher ist es in diesen Gruppen nicht möglich statistische Analyse durchzuführen, sondern nur Tendenzen zu vergleichen. Für die Substitution V27A konnten Bertoletti *et al.* (1994a) in HLA-A\*02-positiven Patienten bereits ein vergleichbares Maß an Kreuzreaktivität feststellen, allerdings gemessen an der Zytotoxizität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Weitere Substitutionen an der Ankerposition V27 wurden hingegen zuvor als *Escape*-Mutationen deklariert (Bertoletti *et al.*, 1994a, Rehermann *et al.*, 1995). In dieser Arbeit konnte nur für die in A\*02:01-positiven Patienten signifikant angereicherten Substitutionen, S21H-F24Y und S21H-V27I, eine funktionelle Bestätigung des auf Sequenzebene identifizierten Hinweises auf *Escape* erbracht werden. In diesen beiden Varianten war die Reduktion der prototypspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten der Patienten schließlich signifikant. Interessanterweise wurden Substitutionen, die S21H inkludieren, zuvor noch nicht als *Escape* Substitution beschrieben. Weitere Analysen, die auch die Bindung der Varianten an das HLA-Molekül, den TCR und die Prozessierung mit einbeziehen, wären daher von Interesse.

Da die beiden Positionen S21 und F24 nicht zu den Ankerpunkten des HLA-Moleküls gehören (Rapin *et al.*, 2008) und dennoch kombinierte Substitutionen, wie S21H-F24Y zu einer Reduktion der IFN $\gamma$ -Antwort führen, wäre es möglich, dass diese in Kombination die Bindung zu den TCR der CD8<sup>+</sup> T-Zellen beeinflussen. Perspektivisch sollte daher die Sequenz der TCR determiniert werden, und die tatsächlichen Epitop-Bindungsstellen präzise identifiziert werden. Die Isolation und Charakterisierung von HLA-A\*02:01:HBV<sub>core18-27</sub>:TCR-Komplexen könnte hierbei direkte Hinweise liefern, und Interpretationen aus indirekten Methoden (Bertoletti *et al.*, 1997) bestätigen oder entkräften. Dies würde Aufschluss darüber geben, ob tatsächlich die TCR-Bindung durch die Substitutionen unterbunden wird oder ob andere Mechanismen involviert sind. Die Streuung der Kreuzreaktivitätsprofile deutet bereits starke individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten an. Dies könnte in der unterschiedlichen Zusammensetzung der TCR-Repertoires begründet liegen. Mittels CD8<sup>+</sup> T-Zellklonen (Wisskirchen *et al.*, 2017), die jeweils einen einzigen HBV<sub>core18-27</sub> spezifischen TCR exprimieren, konnte in dieser Arbeit schließlich bestätigt werden, dass verschiedene TCR individuelle Unterschiede in der Kreuzreaktivität aufweisen.

### 5.1.3. HBVcore<sub>18-27</sub> spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterscheiden sich weder funktionell noch phänotypisch in Abhängigkeit der autologen Sequenz

Unabhängig von der autologen Sequenz des Virus gibt es Publikationen, die eine HBV-spezifische Reaktivität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen Jahre nach Einsetzen einer HBV-Infektion beschreiben. Rehermann *et al.* postulieren, dass auch mehr als 20 Jahre nach Ausheilung einer HBV-Infektion noch stets minimale Mengen HBV-DNA in der Zirkulation zu finden und deutliche CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten detektierbar sind (Rehermann *et al.*, 1996). Dies legen sie als Resultat eines kontinuierlichen Kontakts und *Priming* der Zellen mit zirkulierendem Antigen aus, welche zur Kontrolle der Virusreplikation führen. Sie sehen dies im Kontrast zu chronischen Infizierten, deren CD8<sup>+</sup> T-Zellen nur noch schwach aktiviert werden können, auch wenn sich virale Antigene in der Zirkulation befinden. Dies impliziert, dass sich die CD8<sup>+</sup> T-Zellen chronischer und ausgeheilter Patienten deutlich unterscheiden. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Patienten mit chronischer HBV-Infektion untersucht. Da diese die Infektion mit dem autologen Virus nicht ausheilen können, wäre davon auszugehen, dass ihre prototypspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Epitopvarianten, die der autologen Virussequenz entsprechen, nicht kreuz-aktiviert werden können. Bei der Betrachtung der individuellen Kreuzreaktivität der HBVcore<sub>18-27</sub>-spezifischen T-Zellen gegenüber der autologen Epitopsequenz des Virus, konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zur Prototyp Reaktivität festgestellt werden. Der größte Unterschied in HLA-A\*02:01-positiven Patienten konnte in einem Patienten, dessen autologe Virussequenz die F24Y Substitution beinhaltet, detektiert werden. Erwähnenswert ist, dass die ermittelte autologe Sequenz eine Momentaufnahme darstellt. Welche Sequenz das Virus der initialen Infektion hatte ist häufig nicht mehr nachzuvollziehen.

Auch wenn Kefalakes *et al.* zeigen konnten, dass Patienten, die seit mehr als 30 Jahren HBsAg-negativ sind, weit weniger reaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen aufweisen (Kefalakes *et al.*, 2015b), konnten auch sie keinen Unterschied im Ausmaß der Proliferationskapazität der HBcAg-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen zwischen chronisch infizierten Patienten und solchen, deren HBV-Infektion seit mehr als 30 Jahren ausgeheilt ist detektieren. Dies sehen sie in Verbindung mit einer starken Expression des Gedächtniszellmarkers CD127, auch IL7-Rezeptor-Alpha-Kette (IL-7R $\alpha$ ) genannt, wie es auch für chronische HCV-Infektionen beschrieben ist (Bensch *et al.*, 2007). Eine solch starke Expression konnte in dieser Arbeit auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen von Patienten mit chronischer HBV-Infektion bestätigt werden. Allerdings konnten in dieser Arbeit auf den HBVcore<sub>18-27</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen neben dem Marker CD127, der mit einem schnellen Proliferationsvermögen assoziiert ist, auch die inhibitorischen Moleküle PD-1, 2B4 und

KLRG1 detektiert werden. Eine starke Expression dieser Marker identifizierten auch Bengsch *et al.* auf HBV<sub>core18-27</sub> spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Bengsch *et al.*, 2014). Dies steht im starken Kontrast zu HCV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen. In diesen ist CD127 in Abhängigkeit von *Escape*-Mutationen in der autologen Sequenz gegenläufig zu PD-1, 2B4 und KLRG1 exprimiert, was sich in einem erschöpften bzw. Gedächtnisphänotyp niederschlägt (Bengsch *et al.*, 2010). Eine Sequenzabhängigkeit der Expression konnte in dieser Arbeit im Kontext von HBV jedoch nicht festgestellt werden. Andere Faktoren scheinen in HBV-Infektionen daher eine größere Rolle zu spielen. Beispielsweise exprimieren CD8<sup>+</sup> T-Zellen von Patienten mit einer chronischen HBV-Infektion PD-1 und 2B4 stärker, als von Patienten mit akuter HBV-Infektion (Raziorrouh *et al.*, 2010). Insbesondere PD-1 wird mit einem erschöpften T-Zellphänotyp assoziiert, sowohl im Hinblick auf CD8<sup>+</sup>, als auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen, allerdings kann die Blockade dieses Moleküls intrahepatische T-Zellantworten widerherstellen (Fisicaro *et al.*, 2010, Moorman *et al.*, 2011). Man würde annehmen, dass dies nicht mit einem schnellen Proliferationsvermögen zu vereinbaren ist. Die Expression inhibitorischer Marker weist jedoch nicht unbedingt auf die Dysfunktionalität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen hin. In gesunden Spendern und Melanom-Patienten konnte beispielsweise gezeigt werden, dass auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die eine Vielzahl an inhibitorischen Rezeptoren exprimieren, welche eigentlich mit einem erschöpften Phänotyp assoziiert sind, dennoch Zytokine ausschütten können (Legat *et al.*, 2013). Legat *et al.* postulieren, dass die Hochregulation inhibitorischer Moleküle auch mit der Aktivierung und dem Differenzierungsstatus der T-Zellen assoziiert sein kann (Legat *et al.*, 2013). Die Expressionsprofile der Differenzierungsmarker CD27, CCR7 und CD45RA der CD8<sup>+</sup> T-Zellen charakterisieren diese als intermediäre Gedächtniszellen (Bengsch *et al.*, 2014). Eine hohe Ko-Expression des Erschöpfungsmarkers PD-1 und des Markers für funktionelle Gedächtniszellen CD127 wurde bereits von Fisicaro *et al.* in chronischer HBV-Infektion beschrieben. Diese Kombination charakterisiert vor allem die HBV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen des peripheren Bluts, jedoch nicht die intrahepatischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Fisicaro *et al.*, 2010). Intrahepatische HBV-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen verzeichnen Fisicaro *et al.* zufolge eine deutlich geringere CD127 Expression, dafür jedoch eine weit höhere PD-1 Expression. Dies weist auf einen erschöpften Phänotyp hin, der im peripheren Blut nicht zu finden ist. Es liegt daher nahe, dass das Unvermögen die HBV-Infektion auszuheilen sich aus dem erschöpften Phänotyp der intrahepatischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen ergibt. In dieser Arbeit wurden jedoch ausschließlich CD8<sup>+</sup> T-Zellen des peripheren Bluts untersucht. Trotz ihres Proliferationsvermögens, wie die starke CD127-Expression andeutet, residieren sie wahrscheinlich nicht in der Leber und können daher HBV nicht am Ort der Infektion bekämpfen. Zudem könnte sich die Kreuzreaktivität der intrahepatischen und peripheren CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterscheiden, beispielsweise durch distinkte

TCR-Repertoires. HBVcore-spezifische TCR in Zellen des peripheren Bluts scheinen beispielsweise polyklonal zu sein und daher kreuzreagieren zu können (Maini et al., 2000). Die Entwicklung der identifizierten *Escape*-Mutationen in Respons zu dem intrahepatischen TCR-Repertoire wäre daher möglich. Informationen über die Unterschiede im TCR-Repertoire und die Kreuzreaktivität von intrahepatischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, im Vergleich zu peripheren CD8<sup>+</sup> T-Zellen könnte Aufschluss darüber geben. Hierzu ist jedoch die Akquise von intrahepatischen Lymphozyten zusammen mit peripheren Lymphozyten des gleichen Patienten nötig. Zur Gewinnung von intrahepatischen Lymphozyten sind allerdings Leberbiopsien notwendig, die nur bei entsprechender Indikation durchgeführt werden und daher seltener zur Verfügung stehen, als PBMC. Zudem lassen sich deutlich weniger Lymphozyten aus dem Gewebe isolieren, als aus dem peripheren Blut, was die Akquise zusätzlich erschwert.

### 5.1.4. Die F24Y Substitution – *Escape* Mutation oder nicht?

Einerseits war kaum ein Unterschied in der Reaktivität der HBVcore<sub>18-27</sub> spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber der Einzelsubstitution F24Y und dem Prototypepitop zu detektieren. Zudem erkannten F24Y-variantenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen Patienten unserer Kohorte das Prototypepitop ebenfalls kreuzreaktiv. Dies ist interessant, da in einer vorangegangenen Studie das Epitop mit Substitution an Position F24Y nur bedingt CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten induzieren konnte (Maini et al., 2000). Andererseits reduzierte F24Y die Kreuzreaktivität anderer Substitutionen deutlich, wenn diese in Kombination mit F24Y auftraten. Aufgrund dieser widersprüchlichen Ergebnisse, wurde die Epitopvariante F24Y in dieser Arbeit besonders betrachtet. Die Einzelsubstitution, die von Bertoletti *et al.* (1994a) und Maini *et al.* (2000) neben anderen Substitutionen in Patienten mit akuter HBV-Infektion untersucht wurde, scheint Kefalakes *et al.* (2015a) zufolge in A\*02-positiven Patienten durch Selektionsdruck angereichert zu sein. In unserer erweiterten Kohorte war sie als Einzelsubstitution in A\*02:01-positiven Individuen tendenziell vermehrt zu identifizieren, im Vergleich zu Patienten, die weder A\*02:01, noch B\*35:01/03 noch B\*51 exprimieren. In Kombination mit Substitutionen an Position S21 erreichten die Anzahlen der Sequenzen, die die F24Y beinhalten, sogar Signifikanz. Die Häufigkeit der F24Y-Substitution lässt darauf schließen, dass sie sich nicht negativ auf die virale Fitness auswirkt. Möglicherweise spielt hierbei die strukturelle Ähnlichkeit der Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin eine Rolle, die beide zu den aromatischen Aminosäuren gehören, auch wenn sie eine unterschiedliche Polarität aufweisen (Taylor, 1986).

Da die Indizien für Selektionsdruck auf Sequenzebene und die deutliche Kreuzreaktivität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber der F24Y Variante, im Vergleich zu anderen Epitopvarianten, derart abwichen, stellte sich die Frage, ob dies durch einen Konzentrationseffekt bedingt war. Die hohe standardmäßig eingesetzte Konzentration des Peptids zur Restimulation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen schien mögliche Effekte auf die Bindung des TCR und die Kreuzreaktivität allerdings nicht zu maskieren, wie die Titration des Prototyppepitops und der Variante andeuten. Bertoletti *et al.* (1994b) zufolge können Varianten des HBVcore<sub>18-27</sub> Epitops jedoch auch einen konzentrationsabhängigen antagonisierenden Effekt auf die Reaktivität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen haben. Dieser Antagonismus könnte im Patienten dazu führen, dass bei Anwesenheit des Prototyppepitops und der Epitopvarianten besonders geringe Mengen der Varianten die Reaktivität der prototypspezifischen T-Zellen eines Patienten einschränken können. Dieser antagonisierende Effekt wurde bislang jedoch ausschließlich für Varianten mit Substitutionen an den Positionen S21 und V27 beschrieben und ist zudem individuell unterschiedlich für verschiedene T-Zellklone (Bertoletti *et al.*, 1994b). Nach Akquise von neuem Patientenmaterial sollte daher ein möglicher antagonisierender Effekt der F24Y Variante in HLA-A\*02:01-positiven Patienten in Titrationsexperimenten adressiert werden.

### **5.1.4.1. Die F24Y-Substitution verhindert die korrekte endogene Prozessierung des HBVcore<sub>18-27</sub> Epitops**

Einen weiteren Aspekt, den der Austausch von Phenylalanin zu Tyrosin an dieser Position des Epitops beeinflussen kann, ist die endogene Prozessierung. Da in den vorangegangenen Kreuzreaktivitätsexperimenten das Peptid exogen zugegeben wurde, war es durch diesen Versuchsaufbau nicht mögliche Effekte auf dieser Ebene zu identifizieren. Ein Aspekt einer unvollständigen oder fehlerhaften Prozessierung kann eine inkorrekte proteasomale Spaltung des Vorläuferpeptids sein, die dazu führt, dass das Peptid nicht in das ER transportiert wird. Des Weiteren könnten weitere Spaltungsschritte im ER unterbunden werden, sodass kein korrekt gespaltenes Peptid das HLA-Molekül binden und stabilisieren kann (Yokomaku *et al.*, 2004). Sowohl Substitutionen innerhalb des Epitops, als auch Substitutionen in den flankierenden Regionen können die Prozessierung beeinflussen (Seifert *et al.*, 2004, Kimura *et al.*, 2005), wie beispielsweise für ein HLA-B\*51-restringiertes HCV Epitops gezeigt werden konnte (Walker *et al.*, 2015). Für das N-Terminal elongierte Peptid HBVcore<sub>17-27</sub> konnte eine geringere Affinität dem Peptid-Transporter TAP gegenüber demonstriert werden (Lauvau *et al.*, 1999). Die Konsequenz sollte ein reduzierter Transport in das ER und folglich eine seltenere Präsentation des Epitops im HLA-Molekül sein. Die Fragmentprofile des Prototyps und der

F24Y-Variante zeigten, dass durch den proteasomalen Verdau in Anwesenheit der F24Y Substitution häufiger die Aminosäure Serin, welche die Position 17 des HBVcore Proteins darstellt, das N-terminale Ende der Peptidfragmente bildete. Die Substitution innerhalb des Epitops hat somit einen Einfluss auf die proteasomalen Schnittstellen außerhalb des Epitops. Dies hat zur Folge, dass in Anwesenheit der F24Y Substitution eben jenes elongierte Peptid HBVcore<sub>17-27</sub> (SFLPSDFYPSV) häufiger entstand, welches möglicherweise schlechter in das ER transportiert wird. Ohne die Möglichkeit des Transports in das ER gibt es auch für die Aminopeptidasen des ERs nicht die Möglichkeit die N-terminal elongierten Peptide zu trimmen, um sie in die Bindungsspalte der HLA-Moleküle einzupassen (Beninga et al., 1998, Mo et al., 1999). Dies könnte eine Erklärung für die in dieser Arbeit identifizierten geringeren Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Restimulation mit HLA-A\*02:01-positiven HepG2-Zellen, die das Epitop endogen prozessieren, liefern. Allerdings würde diese Erkenntnis allein keine eindeutige Erklärung für die verstärkte Präsenz dieser Substitution in HLA-A\*02:01- im Vergleich zu HLA-B\*35:01/03- oder HLA-B\*51-positiven Patienten liefern, da dieser Effekt nicht spezifisch für das HLA-A\*02:01-Molekül ist. Es sollte allerdings bedacht werden, dass die Kreuzreaktivität der HBVcore<sub>18-27</sub> spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen HLA-B\*35 und HLA-B\*51-positiver Infizierter der Epitopvariante F24Y auch bei exogener Zugabe des Epitops bereits deutlich geringer ausfällt. Der Einfluss der Substitution auf die Prozessierung sollte daher keine Rolle für die Reaktivität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen HLA-B\*35 und HLA-B\*51-positiver Patienten spielen.

### **5.2. Ist die Prozessierung einer CMVpp65<sub>495-503</sub> Epitopvariante mit niedriger Avidität vergleichbar mit HBVcore<sub>18-27</sub>?**

Im Gegensatz zu HBV ist die Seroprävalenz von CMV in der Bevölkerung relativ hoch. In Europa beispielsweise können in etwa 40-60% der Bevölkerung CMV-spezifische Antikörper im Serum nachgewiesen werden (Cannon et al., 2010), dies schließt die gesunde Bevölkerung mit ein. CMV-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten sind selbst in gesunden CMV-seropositiven Individuen zu verzeichnen (Sylwester et al., 2005, Slezak et al., 2007), daher dienen CMV-Epitope häufig als Positivkontrolle in CD8<sup>+</sup> T-Zellassays. Insbesondere das in dieser Arbeit gewählte Kontrollepitop CMVpp65<sub>495-503</sub> spielt hierbei eine Rolle. Dieses gilt in der CMV-Infektion als immundominantes HLA-A\*02-restringiertes Epitop (McLaughlin-Taylor et al., 1994, Wills et al., 1996) und stellt ein interessantes Ziel für CMV-Impfstoffe dar (Wang et al., 2007). Das pp65-Gen wird erst spät im Lebenszyklus des CMV transkribiert woraufhin das

Protein gebildet werden kann. Als eines der Hauptbestandteile des Virions, gelangt das Tegumentprotein jedoch bereits bei der Infektion der Zelle ins Zytosol, wodurch es funktionell aktiviert wird. Einerseits kann das Protein so direkt prozessiert und über die HLA-Moleküle präsentiert werden (Riddell et al., 1991, Khan et al., 2005). Andererseits hat es als funktionelles Protein immunmodulatorische Eigenschaften, welche die Prozessierung und Präsentation weiterer CMV-Proteine, wie die sogenannten *immediate early* (IE) Proteine, unterbinden (Gilbert et al., 1993, Gilbert et al., 1996, Kalejta, 2008, Tomtishen, 2012).

Obwohl es möglich war mit transient CMVpp65<sub>495-503</sub>-exprimierenden HLA-A\*02:01-positiven HepG2-Zellen, spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten zu induzieren, ließ sich diese Methode nicht auf HBV übertragen. Nach endogener Prozessierung des transient exprimierten HBV-Epitops konnten keine HBVcore<sub>18-27</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten detektiert werden. Die entsprechende Technik wurde von Walker *et al.* bereits zur Untersuchung eines HCV-Epitops genutzt (Walker et al., 2015) und ermöglicht den Vergleich verschiedener Epitopvarianten ohne auf den Zwischenschritt der Vektorproduktion und der Etablierung der Zelllinien, wie es im Fall von stabil exprimierenden Zelllinien notwendig ist, angewiesen zu sein. So könnten flexibel verschiedenste Epitopvarianten miteinander verglichen werden. Da das HBV- und das CMV-Epitop gleichermaßen konstitutiv exprimiert werden sollten, ist davon auszugehen, dass kein Unterschied in der Menge des auf der Oberfläche präsentierten Antigens besteht. Aus diesem Grund stellt sich die Frage worauf der Unterschied beruht. Die Avidität der T-Zellen könnte Einfluss auf die Erkennung durch die CD8<sup>+</sup> T-Zellen nehmen, denn es konnte gezeigt werden, dass CMVpp65<sub>495-503</sub>-spezifische T-Zellen eine höhere funktionelle Avidität, als HBVcore<sub>18-27</sub>-spezifische aufweisen. Um diese These zu hinterfragen wurde nach einer niedrig aviden CMV-Epitopvariante gesucht, die in dem Prozessierungsassay vergleichend eingesetzt werden konnte.

### **5.2.1. Die Substitutionen P498W und P498S im CMVpp65<sub>495-503</sub> Epitop reduzieren die Avidität der T-Zell-Rezeptoren**

Durch die Substitution aller Positionen des CMVpp65<sub>495-503</sub> Epitops, die keine HLA-Ankerpositionen darstellen, mit dem gesamten Spektrum an genetisch kodierbaren Aminosäuren, konnte gezeigt werden, dass auch CMVpp65<sub>495-503</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen kreuzreaktiv sind. Für ein anderes CMV-Epitop, das IE<sub>315-324</sub> Epitop sind natürlich vorkommende Polymorphismen bereits bekannt und die Kreuzreaktivität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist auch beschrieben (Prod'homme et al., 2003). Interessanterweise findet sich in der Literatur jedoch noch kein Hinweis auf kreuzreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten, die durch das

CMVpp65<sub>495-503</sub> Epitop induziert werden. Insbesondere die erste Aminosäure N495 des CMVpp65<sub>495-503</sub> Epitops scheint jedoch frei austauschbar zu sein. Auch an anderen Positionen des Epitops sind einzelne Substitutionen zu verzeichnen, die von CD8<sup>+</sup> T-Zellen kreuzreaktiv erkannt werden können. Welcher Aminosäureaustausch zu einer Reduktion der Antwort führt ist allerdings für jede Position variabel, was auf den Einfluss auf die TCR-Bindung aber auch auf die HLA-Bindung zurückzuführen sein kann. Interessanterweise scheint insbesondere der Austausch zu Alanin an den meisten Positionen die CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort nur geringfügig zu beeinflussen.

Nach primärem Ausschluss aller nicht kreuzreaktiven Epitopvarianten, konnten auch diejenigen Substitutionen, die durch eine Reduktion der Peptidkonzentration nicht beeinflusst wurden, exkludiert werden. Für die fünf Varianten N495W, N495D, P498W, P498S und T502A des CMVpp65-Epitops zeigte sich ein besonders starker Einfluss der Konzentrationsreduktion der exogen zugegebenen Peptide auf die CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten. Da diese Varianten, zumindest bei reduzierter Peptidkonzentration, scheinbar einen Einfluss auf die Erkennung des Epitops durch die T-Zellen haben, wurden sie weitergehend untersucht. Um aus diesen Kandidaten mögliche Kontrollvarianten mit niedriger Avidität des T-Zell-Rezeptors zu identifizieren, war es wichtig, die Schwächung der HLA-Bindung, als Quelle für die Beeinträchtigung der T-Zellantwort auszuschließen. Die *in silico* ermittelte Bindungskapazität der Varianten an das HLA-A\*02:01-Molekül, konnte *in vitro* bestätigt werden. Die Substitution N495D hob die Bindung des Epitops an das HLA-Molekül nahezu vollständig auf, weshalb sie in der weiterführenden Analyse nicht betrachtet wurde. Die Titration der verbliebenen Varianten zeigte ein interessantes Bild für die Variante des Epitops mit der Substitution P498W. Obwohl die Bindung dieser Variante an das HLA-A\*02:01-Molekül mit der des Prototyp epitops vergleichbar war, wies die T-Zellreaktivität eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit auf. Da dies nicht auf die HLA-Bindung zurückzuführen sein kann, spielt die TCR-Avidität hierbei wahrscheinlich eine Rolle (Bachmann et al., 1998, Bachmann and Ohashi, 1999, Fahmy et al., 2001). Ähnlich verhielt es sich mit der Substitution P498S. Da diese beiden Substitutionen scheinbar die Avidität beeinträchtigen, wurde ihr Einfluss auf die endogene Prozessierung untersucht. Die transiente Expression der Epitope von Interesse wurde durch Transfektion von HLA-A\*02:01-positiven HepG2-Zellen mit Plasmiden, welche die entsprechenden Epitopvarianten kodieren, erreicht. Anhand dieses experimentellen Ansatzes konnte in der Tat gezeigt werden, dass die beiden Epitopvarianten in endogen prozessierter Form CD8<sup>+</sup> T-Zellen schlechter restimulieren können, als das endogen prozessierte Prototyp epitop. Die Avidität des Epitops bzw. der CD8<sup>+</sup> T-Zellen scheint also eine große Rolle zu spielen und könnte die Erklärung für die Abwesenheit einer CD8<sup>+</sup> T-Zellreaktion im HBVcore<sub>18-27</sub>-Kontext bieten.

Dies ist selbstverständlich in weiterführenden Experimenten mit Hilfe von neuem Patientenmaterial CMV-seropositiver, chronisch HBV-infizierter, HLA-A\*02:01-positiver Patienten in den direkten Vergleich mit HBV zu setzen. In dieser Arbeit konnte dies allerdings nicht adressiert werden, da entsprechende Patientenproben nicht ausreichend zur Verfügung standen und somit die Rekrutierung neuer Patienten notwendig wurde. Um den Einfluss der Avidität zu minimieren und so auch niedrig averse Epitope untersuchen zu können, wäre es zudem hilfreich, wenn das Effektor/Zielzell-Verhältnis in zukünftigen Untersuchungen angepasst werden könnte. Um dies zu erreichen sollte der Versuchsaufbau optimiert werden, um die variable Transfektionseffizienz in aufeinanderfolgenden Ansätzen auszugleichen und so ein effektiveres Effektor/Zielzell-Verhältnis gewährleisten zu können (Walker et al., 2015). Sollte dieser Aspekt zukünftig untersucht werden, würde eine solche Optimierung möglicherweise auch die CD8<sup>+</sup> T-Zellaktivierung durch die HBV-Epitopvarianten mit niedriger Avidität in transient exprimierenden HepG2-Zellen sichtbar machen können, sodass auch im Kontext von HBV eine größere Flexibilität zur Beantwortung dieser Fragestellung erreicht werden kann.

Allerdings sollte die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Substitution auch Schritte der endogenen Prozessierung beeinflusst werden könnten. Es ist leider nicht möglich aus diesen Ergebnissen abzuleiten, welche dies sein könnten. Effekte auf Schritte der Prozessierung vor der Beladung der HLA-Moleküle im ER könnten beispielsweise eine Rolle spielen (Rock et al., 2004, Kloetzel, 2004). Da in diesem System die Epitope konstitutiv exprimiert werden, sollten ausreichend Vorläuferepitope gebildet werden, um eine Sättigung der HLA-Moleküle zu gewährleisten, sodass Effekte in Abhängigkeit der Konzentration, also nach der Beladung der Moleküle im ER keine Rolle spielen sollten. Es dürften also genügend beladene HLA-Moleküle zur Verfügung stehen, um CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten induzieren zu können (Christinck et al., 1991). Vielmehr wäre der proteasomale Verdau der zytosolischen Peptidvarianten ein Faktor, den die Substitutionen beeinflussen könnten. Ebenso wäre ein Einfluss auf den Transport der Vorläuferpeptide in das ER oder die Abspaltung der N-terminalen Aminosäuren durch die Aminopeptidasen im ER denkbar. Diese Möglichkeiten könnten jedoch erst in weiteren Experimenten adressiert werden.

### 5.3. Fazit und Ausblick

Auch wenn es seit Beginn der Achtzigerjahre wirksame und stetig weiterentwickelte Impfstoffe gegen Infektionen mit dem HB-Virus gibt, konnte bislang keine Therapie entwickelt werden, die zur vollständigen Ausheilung einer chronischen HBV-Infektion führt. Die Medikamente unterdrücken zwar die Replikation des Virus, müssen aber im Allgemeinen ein Leben lang eingenommen werden. Insbesondere chronisch Infizierte würden von einer Therapie, beispielsweise einem therapeutischen Impfstoff, der nur einige wenige Male verabreicht werden muss, profitieren. Neue T-Zelltherapien und therapeutische Impfstoffe auf Basis von T-Zellen bieten hierfür ein weites Feld. Die in dieser Arbeit generierten Daten untermauern die Herausforderungen, die an die Entwicklung eines therapeutischen Vakzins gestellt werden. Trotz einer gewissen Kreuzreaktivität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, auch den autologen Virussequenzen gegenüber, scheinen sie keine Ausheilung der Infektion induzieren zu können. Der Vergleich verschiedener, individueller TCR-Repertoires der Patienten in Kombination mit der Reaktivität der entsprechenden T-Zellen könnte Aufschluss darüber geben, ob einige TCR für die Nutzung in modifizierten T-Zellen besonders geeignet sind. Die intrahepatischen T-Zellen sollten sich in ihrer Funktionalität von den peripher vorzufindenden T-Zellen deutlich unterscheiden. Möglicherweise akkumulieren in einem der beiden Kompartimenten oligoklonale T-Zellen, während in dem anderen vorwiegend polyklonale CD8<sup>+</sup> T-Zellen vorliegen. Die Sequenzierung von TCR peripherer T-Lymphozyten im Vergleich zu intrahepatischen T-Lymphozyten in Kombination mit Kreuzreaktivitätsprofilen der jeweiligen T-Zellpopulationen würde ein sehr viel umfassenderes Bild schaffen. Eventuell lassen sich sogar TCR-Gruppen identifizieren oder auf Basis einer Vielzahl von TCR-Daten vorhersagen, die primär in der Leber residieren (Glanville et al., 2017). Sollte es auch im Kontext von HBV besondere TCR-Gruppen geben, die als sogenannte öffentliche TCR deklariert werden könnten, würde dies der Entwicklung therapeutischer Maßnahmen neue Richtungen eröffnen.

Dennoch gilt es noch weitere Aspekte zu untersuchen und aufzuklären. Obwohl die Kreuzreaktivität, zumindest des HBVcore<sub>18-27</sub> Epitops, auch HLA-übergreifend zu sein scheint und damit bereits ein Großteil der Bevölkerung abgedeckt ist, müsste eine Vielzahl an Epitopen inkludiert werden, um möglichst viele verschiedene HLA-Kombinationen adressieren zu können. Ob eine allgemein gültige Formulierung eines therapeutischen Vakzins möglich sein wird, ist aufgrund der Vielzahl der möglichen HLA-Kombinationen fraglich, sollte dennoch weiterverfolgt werden. Alternativ bietet der adoptive Transfer spezifischer modifizierter autologer T-Zellen, individuell abgestimmte Möglichkeiten einer Immuntherapie. Hierbei könnte auch die individuelle HLA-Komposition des Patienten mit einbezogen werden.

Auf der Ebene der Epitope selbst würde die Untersuchung zusätzlicher nicht-immundominanter Epitope weitere Einblicke schaffen, da diese in Patienten mit einer chronischen HBV-Infektion möglicherweise ein völlig anderes CD8<sup>+</sup> T-Zellreaktivitätsprofil aufzeigen oder entsprechend spezifische T-Zellen noch keinen erschöpften Phänotyp aufweisen. Die genomweite Identifizierung weiterer Epitope durch die HBV-Sequenzanalyse von Patienten mit den verschiedensten HLA-Typen wird dies unterstützen. Interessant wäre hiernach zudem, ob CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die spezifisch für die Epitope mit diesen Substitutionen sind, eine vergleichbare Kreuzreaktivität aufweisen, wie es für das immundominante HBV<sub>core18-27</sub> Epitop in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

Die bisher genutzten Versuchssysteme basieren zumeist auf der Nutzung partieller Virusbestandteile. Durch die Einbindung von NTCP-HepG2-Zellen, einer von Hepatozyten abstammenden Zelllinie, die mit HBV infiziert werden kann, könnte der Einfluss von Substitutionen im Zusammenspiel aller HBV-Proteine untersucht werden. Eingeschränkt wird dies nur durch den HLA-Typ der NTCP-HepG2-Zellen. Mit Hilfe dieses Modellsystems könnte darüber hinaus die größte verbleibende Hürde bei der Entwicklung von HBV-spezifischen Therapeutika angegangen werden – die Eliminierung der cccDNA. Es wäre denkbar über diesen Weg, Effekte der CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf die, in den infizierten Zellen verbleibende, cccDNA genauer zu untersuchen und im Idealfall Wege zu finden, diese herauszulösen. Denkbar wäre hier auch der Einsatz von CRISPR/Cas9 (Seeger and Sohn, 2014). Dies könnte nicht nur bei chronisch infizierten Patienten Anwendung finden, sondern auch Patienten, die eine akute HBV-Infektion ausheilen, vor einer Reaktivierung schützen. Statt einer rein funktionellen Heilung könnte mit diesem Hilfsmittel möglicherweise eine sterilisierende Heilung erzielt werden. Auch wenn dieses Modell solch eine Möglichkeit aufzeigen sollte, gilt es einen Weg zu finden die T-Zellen zu ihrem Wirkungsort zu dirigieren, seien es körpereigene oder modifizierte T-Zellen. Insbesondere in chronisch infizierten Patienten, die bereits fibrotisches oder zirrhotisches hepatisches Gewebe aufweisen stellt dies eine Herausforderung dar.

Auf dem Weg zu einer T-Zellbasierten Therapie einer HBV-Infektion gilt es daher noch einige Hürden zu überwinden, um möglichst viele Ausprägungen der Infektion abdecken zu können. Der Weg zur induzierten Heilung wird jedoch nicht allein auf T-Zellen basieren. Vielmehr muss wahrscheinlich ein Zusammenspiel der verschiedenen zellulären und humoralen Elemente des Immunsystems T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen oder neutralisierende Antikörper erwirkt werden, um langfristige Heilung und Immunität zu erreichen.

## 6. Zusammenfassungen

### 6.1. Zusammenfassung

Weltweit leben etwa 257 Millionen Menschen mit einer Hepatitis B Virus Infektion. Jährlich führt dies zu rund 887.000 Todesfällen, trotz wirksamer Impfstrategien im Kindesalter, die weltweit implementiert sind. Etwa 5-10% aller Infektion im Erwachsenenalter entwickeln sich zu einer chronischen Infektion. Zudem verbleibt selbst in Patienten, die eine HBV-Infektion ausheilen, auch Jahre nach der Infektion die sogenannte cccDNA in den Hepatozyten. Die aktuell verfügbaren Therapiemöglichkeiten gehen entweder mit starken Nebenwirkungen einher, müssen ein Leben lang eingenommen werden oder führen zu Resistenzen des Virus. Mit neuen Therapieansätzen könnten diese Probleme gelöst werden.

CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind an der Immunkontrolle einer HBV-Infektion beteiligt. Sowohl über direkt zytotoxische Mechanismen, als auch durch immunmodulatorische Funktionen. Insbesondere HBVcore-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnten mit der Ausheilung von HBV-Infektionen korreliert werden. Sie sind somit attraktive Kandidaten für innovative Immuntherapien, wie therapeutische Impfstoffe oder adoptiven T-Zelltransfer.

Für diverse Viren sind Mechanismen der Immunevasion beschrieben, die die T-Zellreaktivität reduzieren und so die Effektivität T-Zellbasierter Immuntherapien in Frage stellen. Auch in dem immundominanten, HLA-A\*02-restringierten Epitop HBVcore<sub>18-27</sub> konnte eine Vielzahl an Polymorphismen identifiziert werden, die auf eine Immunevasion des HB-Virus hindeuten. Primär wurde daher in dieser Arbeit untersucht, ob sich die Hinweise auf Immunevasion auch funktionell anhand der Reaktivität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestätigen lassen. Zunächst wurde die Kreuzreaktivität von peripheren prototypspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen von HLA-A\*02-positiven Patienten mit chronischer HBV-Infektion untersucht. Da es zudem Hinweise auf die Bindung dieses Epitops durch Moleküle der HLA-Familien B\*35 und B\*51 gibt, wurde die CD8<sup>+</sup> T-Zellfunktionalität auch in Patienten mit diesen HLA-Typen evaluiert. Ferner sollte beantwortet werden, ob die Substitutionen in diesem HBV-Epitop auf die Ebene der CD8<sup>+</sup> T Zellerkennung oder der Prozessierung einwirken. Dies wurde spezifisch für die herausstechende Substitution F24Y betrachtet. Des Weiteren wirken sich der Differenzierungsgrad sowie der Aktivierungsgrad von CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf ihre Funktionalität aus. Aufgrund dessen wurden HBVcore<sub>18-27</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen von HLA-A\*02:01-positiven Patienten zusätzlich phänotypisch charakterisiert.

Die Sequenzanalyse der erweiterten Kohorte offenbarte eine deutlich diversere Sequenzvariabilität als zuvor von Kefalakes *et al.* beschrieben wurde. Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen von

## Zusammenfassungen

neun von 31 A\*02:01-positiven, sechs von 23 B\*35:01/03-positiven, vier von neun B\*51-positiven und sechs von 15 Patienten mit kombiniertem HLA-Typ waren reaktiv gegenüber dem HBVcore<sub>18-27</sub> Epitop. Diese prototypspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnten auf ihre Kreuzreaktivität gegenüber 19 Varianten des Epitops untersucht werden. Entgegen der Erwartungen wiesen die CD8<sup>+</sup> T-Zellen der HLA-A\*02-positiven Patienten mit prototypspezifischer Respons eine breite Kreuzreaktivität gegenüber dem getesteten Spektrum der substituierten Aminosäuren auf. Dies schien in HLA-A\*02:01-positiven Patienten besonders ausgeprägt zu sein, während HLA-B\*51-positive Patienten kaum kreuzreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen verzeichnen. Der T-Zellrezeptor der individuellen CD8<sup>+</sup> T-Zelle sollte maßgeblich an den individuellen Profilen beteiligt sein, wie anhand von CD8<sup>+</sup> T-Zellklonen mit individuellem bekanntem TCR gezeigt werden konnte. Obwohl die Patienten, die HBV-Infektion nicht ausheilen konnten, wiesen ihre HBVcore<sub>18-27</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen keinen ausschließlich erschöpften Phänotyp auf, auch wenn sie im Vergleich mit denjenigen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die keine HBVcore<sub>18-27</sub>-Spezifität aufwiesen, in diese Richtung tendierten. Dies unterschied sich auch nicht in Abhängigkeit der autologen viralen Sequenz. Sie wiesen gleichzeitig eine starke Expression des Marker CD127, der mit einem schnellen Proliferationsvermögen assoziiert ist, sowie einiger inhibitorischer Rezeptoren insbesondere des Erschöpfungsmarkers PD-1, auf, eine Kombination, die wahrscheinlich charakteristisch für spezifische T-Lymphozyten des peripheren Bluts ist. Im Hinblick auf die spezifisch untersuchte Substitution F24Y ließ sich die Diskrepanz in der Sequenzevidenz und der Funktionalität der HBVcore<sub>18-27</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch eine Veränderung in der Prozessierung des Epitops in Anwesenheit der Substitution erklären. Dies wurde sowohl durch den proteasomalen Verdau der Vorläuferepitops, als auch durch die reduzierte Restimulationskapazität nach endogener Prozessierung deutlich. Dies könnte mit den identifizierten, niedrig aviden CMVpp65<sub>495-503</sub> Epitopvarianten P498W und P498S als Kontrolle detaillierter auch für andere Substitutionen untersucht werden.

Zusammengenommen deuten die Ergebnisse dieser Arbeit daraufhin, dass sequenzbasierte Hinweise auf Immunevasion nicht vollständig mit der Funktionalität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen korrelieren müssen. Die mit exogen zugegebenem Peptid restimulierten HBVcore<sub>18-27</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen wiesen schließlich eine breite Kreuzreaktivität gegenüber einigen natürlich vorkommenden Epitopvarianten auf. Der Phänotyp und die autologe Virusvariante schienen dies nicht zu beeinflussen. Vielmehr zeigte sich eine Diskrepanz in der Kapazität T-Zellen zu restimulieren zwischen den exogen zugebenen Peptiden und der endogenen Prozessierung dieser. Die so gewonnenen Erkenntnisse untermauern die Notwendigkeit neuer Modellsysteme, wie beispielsweise NTCP-HepG2-

Zellen. Mit diesen würden sich die Effekte von Polymorphismen auf die T-Zellreaktivität vollständiger darstellen. Aspekte, die in der Infektionssituation ebenfalls von Bedeutung sind, wie die CD8<sup>+</sup> T-Zellzytotoxizität oder Mechanismen zur Eliminierung der cccDNA könnten so gleichzeitig untersucht werden. Für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze bedarf es folglich noch ausgiebiger, weiterer Untersuchungen, die alle Aspekte einer HBV-Infektion berücksichtigen. Hierbei sollte das Zusammenspiel der verschiedenen zellulären und humoralen Elemente des Immunsystems T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen oder neutralisierende Antikörper erwirkt werden, um langfristige Heilung und Immunität zu erreichen.

### 6.2. Summary

Worldwide 257 million people are estimated to be infected with the Hepatitis B virus. Despite global implementation of vaccinations in early childhood as effective preventive strategy, still, about 887,000 cases of death due to infection with HBV occur each year. Children up to the age of five are most susceptible for development of chronic hepatitis upon infection (90-95%), whereas, HBV infection in adults progresses to a chronic infection in only 5-10% of all cases. However, even in patients who resolve an acute HBV infection, the cccDNA remains in hepatocytes. All available therapy options for chronically infected patients either do have severe side-effects, need to be taken life-long or induce viral resistance. Moreover, none of the available therapies addresses resolution of cccDNA. Novel therapeutic approaches might overcome these hurdles.

CD8<sup>+</sup> T cells are known to be involved in immune control of HBV infections. Both, cytotoxic and immunomodulatory mechanisms contribute to it. Particular, CD8<sup>+</sup> T cells specific for HBVcore are associated with recovery from an acute HBV infection. Therefore, these cells are interesting candidates for innovative immune therapies, such as therapeutic vaccination or adoptive T cell transfer.

Several immune evasion mechanisms described for a broad range of viruses may affect T cell reactivity, questioning efficacy of prospective T cell-based immune therapies. Sequence based evidence for immune evasion has also been described for the immune dominant, HLA-A\*02-restricted epitope HBVcore<sub>18-27</sub> by Kefalakes *et al.*. Therefore, the primary aim of this thesis was to evaluate whether functional analyses of CD8<sup>+</sup> T cell cross-reactivity supports the established sequence-based evidence for immune escape. A substantial expansion of the previously utilized patient cohort allowed detailed analysis of 291 epitope sequences in correlation with HLA-types. Taking these results into account, cross-reactivity of peripheral

## Zusammenfassungen

prototype specific CD8<sup>+</sup> T cells of HLA-A\*02:01 positive patients chronically infected with HBV was determined. Due to reports stating that this epitope might also bind to HLA-B\*35- and HLA-B\*51-family members, functionality of CD8<sup>+</sup> T cells was also evaluated in patients carrying these HLA-alleles. Additionally, it was addressed whether these polymorphisms impact recognition by CD8<sup>+</sup> T cells or epitope processing. The analysis focused on the particularly interesting substitution F24Y. Moreover, as functionality of CD8<sup>+</sup> T cells is influenced by their degree of differentiation, exhaustion and activation, HBV<sub>core18-27</sub> specific CD8<sup>+</sup> T cells were phenotypically characterized.

Detailed analysis revealed a more diverse sequence variability than previously described, especially in HLA-A\*02:01 positive patients. CD8<sup>+</sup> T cells of nine of 31 A\*02:01-positive patients, six of 23 B\*35:01/03-positive patients, four of nine B\*51-positive patients and six of 15 patients expressing combinations showed reactivity against the prototypic HBV<sub>core18-27</sub> epitope, thus, cross-reactivity of these CD8<sup>+</sup> T cells was determined. Contrary to what has been expected, cross-reactive responses of those prototype-specific CD8<sup>+</sup> T cells were broadly detectable. CD8<sup>+</sup> T cells of HLA-A\*02:01 positive patients were particularly broad, whereas HLA-B\*51-positive patients' T cells hardly exhibited any cross-reactivity. A major determinant of cross-reactivity is the individual T cell receptor, as seen in profiles of CD8<sup>+</sup> T cell clones with known T cell receptor. Despite their incapability to resolve an HBV infection, the HBV<sub>core18-27</sub>-specific CD8<sup>+</sup> T cells of these chronically infected patients did not express a completely exhausted phenotype independent of their autologous viral sequence. Both CD127, which is associated with fast proliferation capacity, and the inhibitory receptor, PD-1, particularly known as exhaustion marker, were strongly expressed – a characteristic combination of peripheral T lymphocytes. Differential processing of HBV<sub>core18-27</sub> and its F24Y variant delivered an explanation for the discrepancy in sequence-based evidence and functional cross-reactivity. A reduced restimulation capacity by the endogenously processed epitope as well as the differences in *in vitro* proteasomal digestion substantiates this. After comparative evaluation, CMV<sub>pp65<sub>495-503</sub></sub> P498W and P498S, the identified CMV epitope variants with low avidity, may serve as control to broaden the range of HBV epitope variants assessed for their influence on endogenous processing.

Taken together, sequence-based evidence for immune evasion does not necessarily correlate with CD8<sup>+</sup> T cell functionality. HBV<sub>core18-27</sub>-specific CD8<sup>+</sup> T cells appeared to be broadly cross-reactive to naturally occurring variants upon exogenous peptide restimulation. Phenotype and autologous viral sequence did not seem to affect recognition. In fact, assaying endogenous processing revealed a discrepancy in impact of exogenously added and endogenous processed

## **Zusammenfassungen**

epitopes on CD8<sup>+</sup> T cell reactivity. This underpins the necessity for novel model systems, such as HBV permissive NTCP-HepG2 cells, for more detailed studies on the impact of polymorphisms on T cell reactivity. By this, other aspects of an infectious situation such as CD8<sup>+</sup> T cell cytotoxicity or mechanisms to eliminate cccDNA may also be enabled to study. Novel therapeutic strategies, however, ask for further extensive research targeting all different aspects of an HBV infection. For cure and subsequent long-term immunity, both, cellular and humoral elements of the immune system should be addressed, keeping in mind their interplay. Thus, not only T cells, but also B cells, NK cells and neutralizing antibodies may be necessary to address in future research.

## 7. Literaturverzeichnis

- Andreatta, M. and Nielsen, M. (2016) 'Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system', *Bioinformatics*, 32(4), pp. 511-7.
- Arstila, T. P., Casrouge, A., Baron, V., Even, J., Kanellopoulos, J. and Kourilsky, P. (1999) 'A direct estimate of the human  $\alpha\beta$  T cell receptor diversity', *Science*, 286(5441), pp. 958-961.
- Aye, T. T., Uchida, T., Becker, S. O., Hirashima, M., Shikata, T., Komine, F., Moriyama, M., Arakawa, Y., Mima, S., Mizokami, M. and Lau, J. Y. N. (1994) 'Variations of hepatitis B virus precore/core gene sequence in acute and fulminant hepatitis B', *Digestive Diseases and Sciences*, 39(6), pp. 1281-1287.
- Bachmann, M. F. and Ohashi, P. S. (1999) 'The role of T-cell receptor dimerization in T-cell activation', *Immunology today*, 20(12), pp. 568-576.
- Bachmann, M. F., Salzmann, M., Oxenius, A. and Ohashi, P. S. (1998) 'Formation of TCR dimers/trimers as a crucial step for T cell activation', *European journal of immunology*, 28(8), pp. 2571-2579.
- Beasley, R. P., George, C.-Y. L., Roan, C.-H., Hwang, L.-Y., Lan, C.-C., Huang, F.-Y. and Chen, C.-L. (1983) 'Prevention of perinatally transmitted hepatitis B virus infections with hepatitis B immune globulin and hepatitis B vaccine', *The Lancet*, 322(8359), pp. 1099-1102.
- Bensch, B., Martin, B. and Thimme, R. (2014) 'Restoration of HBV-specific CD8+ T cell function by PD-1 blockade in inactive carrier patients is linked to T cell differentiation', *J Hepatol*, 61(6), pp. 1212-9.
- Bensch, B., Seigel, B., Ruhl, M., Timm, J., Kuntz, M., Blum, H. E., Pircher, H. and Thimme, R. (2010) 'Coexpression of PD-1, 2B4, CD160 and KLRG1 on exhausted HCV-specific CD8+ T cells is linked to antigen recognition and T cell differentiation', *PLoS pathogens*, 6(6), pp. e1000947.
- Bensch, B., Spangenberg, H. C., Kersting, N., Neumann-Haefelin, C., Panther, E., von Weizsacker, F., Blum, H. E., Pircher, H. and Thimme, R. (2007) 'Analysis of CD127 and KLRG1 expression on hepatitis C virus-specific CD8+ T cells reveals the existence of different memory T-cell subsets in the peripheral blood and liver', *J Virol*, 81(2), pp. 945-53.
- Beninga, J., Rock, K. L. and Goldberg, A. L. (1998) 'Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase', *J Biol Chem*, 273(30), pp. 18734-42.
- Bertoletti, A., Chisari, F. V., Penna, A., Guilhot, S., Galati, L., Missale, G., Fowler, P., Schlicht, H. J., Vitiello, A. and Chesnut, R. C. (1993) 'Definition of a minimal optimal cytotoxic T-cell epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid protein', *Journal of Virology*, 67(4), pp. 2376-2380.
- Bertoletti, A., Costanzo, A., Chisari, F. V., Levrero, M., Artini, M., Sette, A., Penna, A., Giuberti, T., Fiaccadori, F. and Ferrari, C. (1994a) 'Cytotoxic T lymphocyte response to a wild type hepatitis B virus epitope in patients chronically infected by variant viruses carrying substitutions within the epitope', *J Exp Med*, 180(3), pp. 933-43.
- Bertoletti, A. and Ferrari, C. (2016) 'Adaptive immunity in HBV infection', *J Hepatol*, 64(1 Suppl), pp. S71-83.
- Bertoletti, A. and Gehring, A. J. (2006) 'The immune response during hepatitis B virus infection', *Journal of General Virology*, 87(6), pp. 1439-1449.
- Bertoletti, A., Sette, A., Chisari, F. V., Penna, A., Levrero, M., De Carli, M., Fiaccadori, F. and Ferrari, C. (1994b) 'Natural variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells', *Nature*, 369(6479), pp. 407-10.
- Bertoletti, A., Southwood, S., Chesnut, R., Sette, A., Falco, M., Ferrara, G. B., Penna, A., Boni, C., Fiaccadori, F. and Ferrari, C. (1997) 'Molecular features of the hepatitis B virus nucleocapsid T-cell epitope 18-27: Interaction with HLA and T-cell receptor', *Hepatology*, 26(4), pp. 1027-1034.
- Bertoni, R., Sidney, J., Fowler, P., Chesnut, R. W., Chisari, F. V. and Sette, A. (1997) 'Human histocompatibility leukocyte antigen-binding supermotifs predict broadly cross-reactive cytotoxic T lymphocyte responses in patients with acute hepatitis', *Journal of Clinical Investigation*, 100(3), pp. 503-513.
- Boettler, T., Panther, E., Bensch, B., Nazarova, N., Spangenberg, H. C., Blum, H. E. and Thimme, R. (2006) 'Expression of the Interleukin-7 Receptor Alpha Chain (CD127) on Virus-Specific CD8+ T

## Literaturverzeichnis

- Cells Identifies Functionally and Phenotypically Defined Memory T Cells during Acute Resolving Hepatitis B Virus Infection', *Journal of Virology*, 80(7), pp. 3532-3540.
- Borbulevych, O. Y., Piepenbrink, K. H., Gloor, B. E., Scott, D. R., Sommese, R. F., Cole, D. K., Sewell, A. K. and Baker, B. M. (2009) 'T cell receptor cross-reactivity directed by antigen-dependent tuning of peptide-MHC molecular flexibility', *Immunity*, 31(6), pp. 885-896.
- Borisenko, I. A., Viazovichenko Iu, E. and Gudkov, V. I. (1994) '[An improvement in information support in the interests of the epidemiological health welfare of the troops]', *Voen Med Zh*, (12), pp. 37-42, 80.
- Bronke, C., Almeida, C. A., McKinnon, E., Roberts, S. G., Keane, N. M., Chopra, A., Carlson, J. M., Heckerman, D., Mallal, S. and John, M. (2013) 'HIV escape mutations occur preferentially at HLA-binding sites of CD8 T-cell epitopes', *Aids*, 27(6), pp. 899-905.
- Cannon, M. J., Schmid, D. S. and Hyde, T. B. (2010) 'Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection', *Reviews in Medical Virology*, 20(4), pp. 202-213.
- Chen, H., Li, L., Weimershaus, M., Evnouchidou, I., van Endert, P. and Bouvier, M. (2016) 'ERAP1-ERAP2 dimers trim MHC I-bound precursor peptides; implications for understanding peptide editing', *Sci Rep*, 6, pp. 28902.
- Cheng, H.-Y., Kang, P.-J., Chuang, Y.-H., Wang, Y.-H., Jan, M.-C., Wu, C.-F., Lin, C.-L., Liu, C.-J., Liaw, Y.-F., Lin, S.-M., Chen, P.-J., Lee, S.-D. and Yu, M.-W. (2014) 'Circulating Programmed Death-1 as a Marker for Sustained High Hepatitis B Viral Load and Risk of Hepatocellular Carcinoma', *PLOS ONE*, 9(11), pp. e95870.
- Christinck, E. R., Luscher, M. A., Barber, B. H. and Williams, D. B. (1991) 'Peptide binding to class I MHC on living cells and quantitation of complexes required for CTL lysis', *Nature*, 352(6330), pp. 67.
- Chu, C. M. and Liaw, Y. F. (2007) 'Chronic hepatitis B virus infection acquired in childhood: special emphasis on prognostic and therapeutic implication of delayed HBeAg seroconversion', *J Viral Hepat*, 14(3), pp. 147-52.
- Crawford, H., Lumm, W., Leslie, A., Schaefer, M., Boeras, D., Prado, J. G., Tang, J., Farmer, P., Ndung'u, T., Lakhi, S., Gilmour, J., Goepfert, P., Walker, B. D., Kaslow, R., Mulenga, J., Allen, S., Goulder, P. J. R. and Hunter, E. (2009) 'Evolution of HLA-B\*5703 HIV-1 escape mutations in HLA-B\*5703-positive individuals and their transmission recipients', *The Journal of Experimental Medicine*, 206(4), pp. 909-921.
- Dane, D., Cameron, C. and Briggs, M. (1970) 'Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis', *The lancet*, 295(7649), pp. 695-698.
- Das, A., Ellis, G., Pallant, C., Lopes, A. R., Khanna, P., Peppas, D., Chen, A., Blair, P., Dusheiko, G., Gill, U., Kennedy, P. T., Brunetto, M., Lampertico, P., Mauri, C. and Maini, M. K. (2012) 'IL-10 producing regulatory B cells in the pathogenesis of chronic HBV infection', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 189(8), pp. 3925-3935.
- Decorsière, A., Mueller, H., Van Breugel, P. C., Abdul, F., Gerossier, L., Beran, R. K., Livingston, C. M., Niu, C., Fletcher, S. P. and Hantz, O. (2016) 'Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor', *Nature*, 531(7594), pp. 386.
- Desmond, C. P., Gaudieri, S., James, I. R., Pfafferott, K., Chopra, A., Lau, G. K., Audsley, J., Day, C., Chivers, S., Gordon, A., Revill, P. A., Bowden, S., Ayres, A., Desmond, P. V., Thompson, A. J., Roberts, S. K., Locarnini, S. A., Mallal, S. A. and Lewin, S. R. (2012) 'Viral adaptation to host immune responses occurs in chronic hepatitis B virus (HBV) infection, and adaptation is greatest in HBV e antigen-negative disease', *J Virol*, 86(2), pp. 1181-92.
- Domingo, E. and Gomez, J. (2007) 'Quasispecies and its impact on viral hepatitis', *Virus research*, 127(2), pp. 131-150.
- Dunn, C., Peppas, D., Khanna, P., Nebbia, G., Jones, M., Brendish, N., Lascar, R. M., Brown, D., Gilson, R. J., Tedder, R. J., Dusheiko, G. M., Jacobs, M., Klenerman, P. and Maini, M. K. (2009) 'Temporal analysis of early immune responses in patients with acute hepatitis B virus infection', *Gastroenterology*, 137(4), pp. 1289-300.
- ECDC (2016a) *European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2016 - Hepatitis B*, Stockholm: ECDC. Available at:

- [http://staging10.ecdcnet.europa.eu/en/healthtopics/hepatitis\\_B/Pages/Annual-Epidemiological-Report-2016.aspx](http://staging10.ecdcnet.europa.eu/en/healthtopics/hepatitis_B/Pages/Annual-Epidemiological-Report-2016.aspx) (Accessed: 2017/09/02).
- ECDC (2016b) *European Centre for Disease Prevention and Control. Systematic review on hepatitis B and C prevalence in the EU/EEA.*, Stockholm: ECDCTQ-02-16-837-EN-N) (Accessed: 2017/09/02).
- Endert, P. (2016) 'Intracellular recycling and cross-presentation by MHC class I molecules', *Immunological Reviews*, 272(1), pp. 80-96.
- Fahmy, T. M., Bieler, J. G., Edidin, M. and Schneck, J. P. (2001) 'Increased TCR avidity after T cell activation: a mechanism for sensing low-density antigen', *Immunity*, 14(2), pp. 135-143.
- Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. and Rammensee, H. G. (1991) 'Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules', *Nature*, 351(6324), pp. 290-6.
- Ferrari, C. (2015) 'HBV and the immune response', *Liver Int*, 35 Suppl 1, pp. 121-8.
- Ferrari, C., Bertoletti, A., Penna, A., Cavalli, A., Valli, A., Missale, G., Pilli, M., Fowler, P., Giuberti, T. and Chisari, F. (1991) 'Identification of immunodominant T cell epitopes of the hepatitis B virus nucleocapsid antigen', *The Journal of clinical investigation*, 88(1), pp. 214-222.
- Fisicaro, P., Valdatta, C., Massari, M., Loggi, E., Biasini, E., Sacchelli, L., Cavallo, M. C., Silini, E. M., Andreone, P., Missale, G. and Ferrari, C. (2010) 'Antiviral Intrahepatic T-Cell Responses Can Be Restored by Blocking Programmed Death-1 Pathway in Chronic Hepatitis B', *Gastroenterology*, 138(2), pp. 682-693.e4.
- Fletcher, S. P., Chin, D. J., Ji, Y., Iniguez, A. L., Taillon, B., Swinney, D. C., Ravindran, P., Cheng, D. T., Bitter, H., Lopatin, U., Ma, H., Klumpp, K. and Menne, S. (2012) 'Transcriptomic analysis of the woodchuck model of chronic hepatitis B', *Hepatology*, 56(3), pp. 820-830.
- Fung, S. K., Chae, H. B., Fontana, R. J., Conjeevaram, H., Marrero, J., Oberhelman, K., Hussain, M. and Lok, A. S. (2006) 'Virologic response and resistance to adefovir in patients with chronic hepatitis B', *Journal of hepatology*, 44(2), pp. 283-290.
- Gerlich, W. H., Dieter, G. and Schüttler, C. G. (2012) 'Infektiösität des Hepatitis-B-Virus', *Hepatitis & more*, (01/2012), pp. 32-41.
- Gilbert, M. J., Riddell, S. R., Li, C. R. and Greenberg, P. D. (1993) 'Selective interference with class I major histocompatibility complex presentation of the major immediate-early protein following infection with human cytomegalovirus', *Journal of Virology*, 67(6), pp. 3461-3469.
- Gilbert, M. J., Riddell, S. R., Plachter, B. and Greenberg, P. D. (1996) 'Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product', *Nature*, 383, pp. 720.
- Glanville, J., Huang, H., Nau, A., Hatton, O., Wagar, L. E., Rubelt, F., Ji, X., Han, A., Krams, S. M., Pettus, C., Haas, N., Arlehamn, C. S. L., Sette, A., Boyd, S. D., Scriba, T. J., Martinez, O. M. and Davis, M. M. (2017) 'Identifying specificity groups in the T cell receptor repertoire', *Nature*, 547(7661), pp. 94-98.
- Glebe, D., Aliakbari, M., Krass, P., Knoop, E. V., Valerius, K. P. and Gerlich, W. H. (2003) 'Pre-S1 Antigen-Dependent Infection of Tupaia Hepatocyte Cultures with Human Hepatitis B Virus', *Journal of Virology*, 77(17), pp. 9511-9521.
- Godon, O., Fontaine, H., Kahi, S., Meritet, J. F., Scott-Algara, D., Pol, S., Michel, M. L. and Bourguin, M. (2014) 'Immunological and antiviral responses after therapeutic DNA immunization in chronic hepatitis B patients efficiently treated by analogues', *Mol Ther*, 22(3), pp. 675-684.
- González-Galarza, F. F., Takeshita, L. Y., Santos, E. J., Kempson, F., Maia, M. H. T., Silva, A. L. S. d., Silva, A. L. T. e., Ghattaoraya, G. S., Alfirevic, A. and Jones, A. R. (2014) 'Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations', *Nucleic acids research*, 43(D1), pp. D784-D788.
- Goulder, P. J., Phillips, R. E., Colbert, R. A., McAdam, S., Ogg, G., Nowak, M. A., Giangrande, P., Luzzi, G., Morgan, B., Edwards, A., McMichael, A. J. and Rowland-Jones, S. (1997) 'Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS', *Nat Med*, 3(2), pp. 212-7.

## Literaturverzeichnis

- Guidotti, L. G., Inverso, D., Sironi, L., Di Lucia, P., Fioravanti, J., Ganzer, L., Fiocchi, A., Vacca, M., Aiolfi, R. and Sammiceli, S. (2015) 'Immunosurveillance of the liver by intravascular effector CD8+ T cells', *Cell*, 161(3), pp. 486-500.
- Guidotti, L. G., Ishikawa, T., Hobbs, M. V., Matzke, B., Schreiber, R. and Chisari, F. V. (1996) 'Intracellular Inactivation of the Hepatitis B Virus by Cytotoxic T Lymphocytes', *Immunity*, 4(1), pp. 25-36.
- Guy, C. S., Mulrooney-Cousins, P. M., Churchill, N. D. and Michalak, T. I. (2008) 'Intrahepatic Expression of Genes Affiliated with Innate and Adaptive Immune Responses Immediately after Invasion and during Acute Infection with Woodchuck Hepadnavirus', *Journal of Virology*, 82(17), pp. 8579-8591.
- Guy, C. S. and Vignali, D. A. A. (2009) 'Organization of proximal signal initiation at the TCR:CD3 complex', *Immunological Reviews*, 232(1), pp. 7-21.
- Hartmann, K. and Keller-Stanislawski, B. (2002) 'Rekombinante Hepatitis-B-Impfstoffe und Verdachtsfälle unerwünschter Reaktionen Eine Bewertung der Spontanerfassungsdaten des Paul-Ehrlich-Instituts 1995 bis 2000', *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 45(4), pp. 355-363.
- Heinemann, F. M. (2009) 'HLA genotyping and antibody characterization using the Luminex™ multiplex technology', *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 36(4), pp. 273-278.
- Hong, J. and Gong, Z. J. (2008) 'Human plasmacytoid dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection induce the generation of a higher proportion of CD4+ and CD25+ regulatory T cells compared with healthy patients', *Hepatology Research*, 38(4), pp. 362-373.
- Hruska, J. F., Clayton, D., Rubenstein, J. and Robinson, W. (1977) 'Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after the Dane particle DNA polymerase reaction', *Journal of virology*, 21(2), pp. 666-672.
- Hsu, Y. S., Chien, R. N., Yeh, C. T., Sheen, I. S., Chiou, H. Y., Chu, C. M. and Liaw, Y. F. (2002) 'Long-term outcome after spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B', *Hepatology*, 35(6), pp. 1522-7.
- Hunt, D., Henderson, R., Shabanowitz, J., Sakaguchi, K., Michel, H., Sevilir, N., Cox, A., Appella, E. and Engelhard, V. (1992) 'Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry', *Science*, 255(5049), pp. 1261-1263.
- Iwamoto, M., Watashi, K., Tsukuda, S., Aly, H. H., Fukasawa, M., Fujimoto, A., Suzuki, R., Aizaki, H., Ito, T. and Koiwai, O. (2014) 'Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP', *Biochemical and biophysical research communications*, 443(3), pp. 808-813.
- Janssen, H. L., Brouwer, J. T., Nevens, F., Sanchez-Tapias, J. M., Craxi, A. and Hadziyannis, S. (1993) 'Fatal hepatic decompensation associated with interferon alfa. European concerted action on viral hepatitis (Eurohep)', *Bmj*, 306(6870), pp. 107-8.
- Jerne, N. K. (1955) 'THE NATURAL-SELECTION THEORY OF ANTIBODY FORMATION', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 41(11), pp. 849-57.
- Jerne, N. K. (1971) 'The somatic generation of immune recognition', *European Journal of Immunology*, 1(1), pp. 1-9.
- Johnson, L. A., Morgan, R. A., Dudley, M. E., Cassard, L., Yang, J. C., Hughes, M. S., Kammula, U. S., Royal, R. E., Sherry, R. M., Wunderlich, J. R., Lee, C.-C. R., Restifo, N. P., Schwarz, S. L., Cogdill, A. P., Bishop, R. J., Kim, H., Brewer, C. C., Rudy, S. F., VanWaes, C., Davis, J. L., Mathur, A., Ripley, R. T., Nathan, D. A., Laurencot, C. M. and Rosenberg, S. A. (2009) 'Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen', *Blood*, 114(3), pp. 535-546.
- Kalejta, R. (2008) 'Functions of human cytomegalovirus tegument proteins prior to immediate early gene expression', *Human cytomegalovirus*, pp. 101-115.
- Kefalakes, H., Budeus, B., Walker, A., Jochum, C., Hilgard, G., Heinold, A., Heinemann, F. M., Gerken, G., Hoffmann, D. and Timm, J. (2015a) 'Adaptation of the hepatitis B virus core protein to CD8(+) T-cell selection pressure', *Hepatology*, 62(1), pp. 47-56.
- Kefalakes, H., Jochum, C., Hilgard, G., Kahraman, A., Bohrer, A. M., El Hindy, N., Heinemann, F. M., Verheyen, J., Gerken, G., Roggendorf, M. and Timm, J. (2015b) 'Decades after recovery from

- hepatitis B and HBsAg clearance the CD8+ T cell response against HBV core is nearly undetectable', *Journal of Hepatology*, 63(1), pp. 13-19.
- Khakoo, S., Ling, R., Scott, I., Dodi, A., Harrison, T., Dusheiko, G. and Madrigal, J. (2000) 'Cytotoxic T lymphocyte responses and CTL epitope escape mutation in HBsAg, anti-HBe positive individuals', *Gut*, 47(1), pp. 137-143.
- Khan, N., Bruton, R., Taylor, G. S., Cobbold, M., Jones, T. R., Rickinson, A. B. and Moss, P. A. H. (2005) 'Identification of Cytomegalovirus-Specific Cytotoxic T Lymphocytes In Vitro Is Greatly Enhanced by the Use of Recombinant Virus Lacking the US2 to US11 Region or Modified Vaccinia Virus Ankara Expressing Individual Viral Genes', *Journal of Virology*, 79(5), pp. 2869-2879.
- Kim, D. H., Kang, H. S. and Kim, K.-H. (2016) 'Roles of hepatocyte nuclear factors in hepatitis B virus infection', *World Journal of Gastroenterology*, 22(31), pp. 7017-7029.
- Kim, Y., Ponomarenko, J., Zhu, Z., Tamang, D., Wang, P., Greenbaum, J., Lundegaard, C., Sette, A., Lund, O., Bourne, P. E., Nielsen, M. and Peters, B. (2012) 'Immune epitope database analysis resource', *Nucleic Acids Res*, 40(Web Server issue), pp. W525-30.
- Kimura, Y., Gushima, T., Rawale, S., Kaumaya, P. and 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(8), pp. 4870-4876.
- Kloetzel, P. M. (2004) 'Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TAP', *Nature immunology*, 5(7), pp. 661.
- Kobayashi, K. S. and van den Elsen, P. J. (2012) 'NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses', *Nat Rev Immunol*, 12(12), pp. 813-20.
- Kosinska, A. D., Bauer, T. and Protzer, U. (2017) 'Therapeutic vaccination for chronic hepatitis B', *Current Opinion in Virology*, 23(Supplement C), pp. 75-81.
- Lampertico, P., Agarwal, K., Berg, T., Buti, M., Janssen, H. L. A., Papatheodoridis, G., Zoulim, F. and Tacke, F. (2017) 'EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection', *Journal of Hepatology*, 67(2), pp. 370-398.
- Lauvau, G., Kakimi, K., Niedermann, G., Ostankovitch, M., Yotnda, P., Firat, H., Chisari, F. V. and van Endert, P. M. (1999) 'Human Transporters Associated with Antigen Processing (Taps) Select Epitope Precursor Peptides for Processing in the Endoplasmic Reticulum and Presentation to T Cells', *The Journal of Experimental Medicine*, 190(9), pp. 1227-1240.
- Lee, C., Gong, Y., Brok, J., Boxall, E. and Gluud, C. (2007) 'Cochrane review: Hepatitis B immunisation for newborn infants of hepatitis B surface antigen-positive mothers', *Evidence-Based Child Health: A Cochrane Review Journal*, 2(1), pp. 67-155.
- Legat, A., Speiser, D. E., Pircher, H., Zehn, D. and Fuertes Marraco, S. A. (2013) 'Inhibitory Receptor Expression Depends More Dominantly on Differentiation and Activation than "Exhaustion" of Human CD8 T Cells', *Frontiers in Immunology*, 4, pp. 455.
- Leslie, A., Pfafferott, K., Chetty, P., Draenert, R., Addo, M., Feeney, M., Tang, Y., Holmes, E., Allen, T. and Prado, J. (2004) 'HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission', *Nature medicine*, 10(3), pp. 282.
- Liaw, Y. F. (2009) 'HBeAg seroconversion as an important end point in the treatment of chronic hepatitis B', *Hepatology*, 49(3), pp. 425-33.
- Littlejohn, M., Locarnini, S. and Yuen, L. (2016) 'Origins and Evolution of Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(1).
- Liu, H. G., Fan, Z. P., Chen, W. W., Yang, H. Y., Liu, Q. F., Zhang, H., Tien, P. and Wang, F. S. (2008) 'A mutant HBs antigen (HBsAg)183-191 epitope elicits specific cytotoxic T lymphocytes in acute hepatitis B patients', *Clin Exp Immunol*, 151(3), pp. 441-7.
- Livingston, B. D., Crimi, C., Fikes, J., Chesnut, R. W., Sidney, J. and Sette, A. (1999) 'Immunization with the HBV core 18-27 epitope elicits CTL responses in humans expressing different HLA-A2 supertype molecules', *Human Immunology*, 60(11), pp. 1013-1017.
- Locarnini, S., Littlejohn, M., Aziz, M. N. and Yuen, L. (2013) 'Possible origins and evolution of the hepatitis B virus (HBV)', *Seminars in Cancer Biology*, 23(6, Part B), pp. 561-575.

- Luangsay, S., Gruffaz, M., Isorce, N., Testoni, B., Michelet, M., Faure-Dupuy, S., Maadadi, S., Ait-Goughoulte, M., Parent, R., Rivoire, M., Javanbakht, H., Lucifora, J., Durantel, D. and Zoulim, F. (2015) 'Early inhibition of hepatocyte innate responses by hepatitis B virus', *Journal of Hepatology*, 63(6), pp. 1314-1322.
- Lucifora, J., Arzberger, S., Durantel, D., Belloni, L., Strubin, M., Levrero, M., Zoulim, F., Hantz, O. and Protzer, U. (2011) 'Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection', *Journal of hepatology*, 55(5), pp. 996-1003.
- Lucifora, J., Xia, Y., Reisinger, F., Zhang, K., Stadler, D., Cheng, X., Sprinzl, M. F., Koppensteiner, H., Makowska, Z. and Volz, T. (2014) 'Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA', *Science*, 343(6176), pp. 1221-1228.
- Lundegaard, C., Lamberth, K., Harndahl, M., Buus, S., Lund, O. and Nielsen, M. (2008) 'NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11', *Nucleic Acids Res*, 36(Web Server issue), pp. W509-12.
- Maini, M. K., Boni, C., Ogg, G. S., King, A. S., Reignat, S., Lee, C. K., Larrubia, J. R., Webster, G. J., McMichael, A. J. and Ferrari, C. (1999) 'Direct ex vivo analysis of hepatitis B virus-specific CD8+ T cells associated with the control of infection', *Gastroenterology*, 117(6), pp. 1386-1396.
- Maini, M. K., Reignat, S., Boni, C., Ogg, G. S., King, A. S., Malacarne, F., Webster, G. J. M. and Bertoletti, A. (2000) 'T cell receptor usage of virus-specific CD8 cells and recognition of viral mutations during acute and persistent hepatitis B virus infection', *European Journal of Immunology*, 30(11), pp. 3067-3078.
- Marsh, S. G. E., Albert, E. D., Bodmer, W. F., Bontrop, R. E., Dupont, B., Erlich, H. A., Fernández-Viña, M., Geraghty, D. E., Holdsworth, R., Hurley, C. K., Lau, M., Lee, K. W., Mach, B., Maiers, M., Mayr, W. R., Müller, C. R., Parham, P., Petersdorf, E. W., Sasazuki, T., Strominger, J. L., Svejgaard, A., Terasaki, P. I., Tiercy, J. M. and Trowsdale, J. (2010) 'Nomenclature for factors of the HLA system, 2010', *Tissue Antigens*, 75(4), pp. 291-455.
- Martinet, J., Dufeu-Duchesne, T., Bruder Costa, J., Larrat, S., Marlu, A., Leroy, V., Plumas, J. and Aspor, C. (2012) 'Altered functions of plasmacytoid dendritic cells and reduced cytolytic activity of natural killer cells in patients with chronic HBV infection', *Gastroenterology*, 143(6), pp. 1586-1596.e8.
- Mauss, S., Berg, T., Rockstroh, J., Sarrazin, C. and Wedemeyer, H. (2017) *Hepatology - A clinical textbook* Hamburg: Medizin Fokus Verlag. Available at: <http://www.hepatologytextbook.com/> (Accessed: 02 September 2017).
- McLaughlin-Taylor, E., Pande, H., Forman, S. J., Tanamachi, B., Li, C. R., Zaia, J. A., Greenberg, P. D. and Riddell, S. R. (1994) 'Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes', *J Med Virol*, 43(1), pp. 103-110.
- Megger, D. A., Bracht, T., Kohl, M., Ahrens, M., Naboulsi, W., Weber, F., Hoffmann, A. C., Stephan, C., Kuhlmann, K., Eisenacher, M., Schlaak, J. F., Baba, H. A., Meyer, H. E. and Sitek, B. (2013) 'Proteomic differences between hepatocellular carcinoma and nontumorous liver tissue investigated by a combined gel-based and label-free quantitative proteomics study', *Mol Cell Proteomics*, 12(7), pp. 2006-20.
- Meyer-Olson, D., Shoukry, N. H., Brady, K. W., Kim, H., Olson, D. P., Hartman, K., Shintani, A. K., Walker, C. M. and Kalams, S. A. (2004) 'Limited T Cell Receptor Diversity of HCV-specific T Cell Responses Is Associated with CTL Escape', *The Journal of Experimental Medicine*, 200(3), pp. 307-319.
- Micco, L., Peppas, D., Loggi, E., Schurich, A., Jefferson, L., Cursaro, C., Panno, A. M., Bernardi, M., Brander, C. and Bihl, F. (2013) 'Differential boosting of innate and adaptive antiviral responses during pegylated-interferon-alpha therapy of chronic hepatitis B', *Journal of hepatology*, 58(2), pp. 225-233.
- Mo, X. Y., Cascio, P., Lemerise, K., Goldberg, A. L. and Rock, K. (1999) 'Distinct proteolytic processes generate the C and N termini of MHC class I-binding peptides', *J Immunol*, 163(11), pp. 5851-9.

- Mohr, R., Boesecke, C. and Wasmuth, J.-C. (2017) 'Hepatitis B', in Mauss, S., Berg, T., Rockstroh, J., Sarrazin, C. & Wedemeyer, H. (eds.) *Hepatology - A clinical textbook*. 8 ed. Hamburg: Medizin Fokus Verlag, pp. 39-51.
- Moorman, J. P., Zhang, C. L., Ni, L., Ma, C. J., Zhang, Y., Wu, X. Y., Thayer, P., Islam, T. M., Borthwick, T. and Yao, Z. Q. (2011) 'Impaired hepatitis B vaccine responses during chronic hepatitis C infection: Involvement of the PD-1 pathway in regulating CD4+ T cell responses', *Vaccine*, 29(17), pp. 3169-3176.
- Author (2017) *QuickCalcs*. Available at: <https://www.graphpad.com/quickcalcs/>.
- Nassal, M. (2015) 'HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B', *Gut*, 64(12), pp. 1972-1984.
- Neumann-Haefelin, C., Oniangue-Ndza, C., Kuntzen, T., Schmidt, J., Nitschke, K., Sidney, J., Caillet-Saguy, C., Binder, M., Kersting, N., Kemper, M. W., Power, K. A., Ingber, S., Reyor, L. L., Hills-Evans, K., Kim, A. Y., Lauer, G. M., Lohmann, V., Sette, A., Henn, M. R., Bressanelli, S., Thimme, R. and Allen, T. M. (2011) 'Human leukocyte antigen B27 selects for rare escape mutations that significantly impair hepatitis C virus replication and require compensatory mutations', *Hepatology*, 54(4), pp. 1157-1166.
- Ni, Y., Lempp, F. A., Mehrle, S., Nkongolo, S., Kaufman, C., Fälth, M., Stindt, J., Königer, C., Nassal, M. and Kubitz, R. (2014) 'Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes', *Gastroenterology*, 146(4), pp. 1070-1083. e6.
- Nielsen, M., Lundegaard, C., Worning, P., Lauemoller, S. L., Lamberth, K., Buus, S., Brunak, S. and Lund, O. (2003) 'Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations', *Protein Sci*, 12(5), pp. 1007-17.
- Norder, H., Couroucé, A.-M. and Magnius, L. O. (1994) 'Complete Genomes, Phylogenetic Relatedness, and Structural Proteins of Six Strains of the Hepatitis B Virus, Four of Which Represent Two New Genotypes', *Virology*, 198(2), pp. 489-503.
- Norder, H., Couroucé, A. M., Coursaget, P., Echevarria, J. M., Lee, S. D., Mushahwar, I. K., Robertson, B. H., Locarnini, S. and Magnius, L. O. (2004) 'Genetic Diversity of Hepatitis B Virus Strains Derived Worldwide: Genotypes, Subgenotypes, and HBsAg Subtypes', *Intervirology*, 47(6), pp. 289-309.
- Okamoto, H., Imai, M., Kametani, M., Nakamura, T. and Mayumi, M. (1987) 'Genomic heterogeneity of hepatitis B virus in a 54-year-old woman who contracted the infection through materno-fetal transmission', *Jpn J Exp Med*, 57(4), pp. 231-6.
- Okamoto, H., Tsuda, F., Sakugawa, H., Sastrosoewignjo, R. I., Imai, M., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. (1988) 'Typing Hepatitis B Virus by Homology in Nucleotide Sequence: Comparison of Surface Antigen Subtypes', *Journal of General Virology*, 69(10), pp. 2575-2583.
- Oniangue-Ndza, C., Kuntzen, T., Kemper, M., Berical, A., Wang, Y. E., Neumann-Haefelin, C., Foote, P. K., Hills-Evans, K., Reyor, L. L., Kane, K., Gladden, A. D., Bloom, A. K., Power, K. A., Thimme, R., Lauer, G. M., Henn, M. R., Kim, A. Y. and Allen, T. M. (2011) 'Compensatory Mutations Restore the Replication Defects Caused by Cytotoxic T Lymphocyte Escape Mutations in Hepatitis C Virus Polymerase', *Journal of Virology*, 85(22), pp. 11883-11890.
- Orito, E., Ichida, T., Sakugawa, H., Sata, M., Horiike, N., Hino, K., Okita, K., Okanoue, T., Iino, S., Tanaka, E., Suzuki, K., Watanabe, H., Hige, S. and Mizokami, M. (2001) 'Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan', *Hepatology*, 34(3), pp. 590-594.
- Orito, E., Mizokami, M., Ina, Y., Moriyama, E. N., Kameshima, N., Yamamoto, M. and Gojobori, T. (1989) 'Host-independent evolution and a genetic classification of the hepadnavirus family based on nucleotide sequences', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(18), pp. 7059-62.
- Osiowy, C., Giles, E., Tanaka, Y., Mizokami, M. and Minuk, G. Y. (2006) 'Molecular Evolution of Hepatitis B Virus over 25 Years', *Journal of Virology*, 80(21), pp. 10307-10314.
- Paraskevis, D., Magiorkinis, G., Magiorkinis, E., Ho, S. Y. W., Belshaw, R., Allain, J. P. and Hatzakis, A. (2013) 'Dating the origin and dispersal of hepatitis B virus infection in humans and primates', *Hepatology*, 57(3), pp. 908-916.

- Park, S. G., Kim, Y., Park, E., Ryu, H. M. and Jung, G. (2003) 'Fidelity of hepatitis B virus polymerase', *Eur J Biochem*, 270(14), pp. 2929-36.
- Paul-Ehrlich-Institut (2017) *Hepatitis B Impfstoffe*. Langen: Paul-Ehrlich-Institut. Available at: <http://www.pei.de/DE/arzneimittel/impfstoff-impfstoffe-fuer-den-menschen/hepatitis-b/hepatitis-b-alle-table.html?nn=3252230> (Accessed: 30. August 2017).
- Penna, A., Artini, M., Cavalli, A., Levrero, M., Bertoletti, A., Pilli, M., Chisari, F. V., Rehermann, B., Del Prete, G., Fiaccadori, F. and Ferrari, C. (1996) 'Long-lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B', *J Clin Invest*, 98(5), pp. 1185-94.
- Peppas, D., Gill, U. S., Reynolds, G., Easom, N. J., Pallett, L. J., Schurich, A., Micco, L., Nebbia, G., Singh, H. D., Adams, D. H., Kennedy, P. T. and Maini, M. K. (2013) 'Up-regulation of a death receptor renders antiviral T cells susceptible to NK cell-mediated deletion', *J Exp Med*, 210(1), pp. 99-114.
- Peppas, D., Micco, L., Javadi, A., Kennedy, P. T., Schurich, A., Dunn, C., Pallant, C., Ellis, G., Khanna, P., Dusheiko, G., Gilson, R. J. and Maini, M. K. (2010) 'Blockade of immunosuppressive cytokines restores NK cell antiviral function in chronic hepatitis B virus infection', *PLoS Pathog*, 6(12), pp. e1001227.
- Peters, B. and Sette, A. (2005) 'Generating quantitative models describing the sequence specificity of biological processes with the stabilized matrix method', *BMC Bioinformatics*, 6, pp. 132.
- Pileggi, C., Papadopoli, R., Bianco, A. and Pavia, M. (2017) 'Hepatitis B vaccine and the need for a booster dose after primary vaccination', *Vaccine*, 35(46), pp. 6302-6307.
- Prod'homme, V., Retière, C., Imbert-Marcille, B.-M., Bonneville, M. and Hallet, M.-M. (2003) 'Modulation of HLA-A\*0201-Restricted T Cell Responses by Natural Polymorphism in the IE1<sub>315-324</sub> Epitope of Human Cytomegalovirus', *The Journal of Immunology*, 170(4), pp. 2030.
- Pule, M. A., Savoldo, B., Myers, G. D., Rossig, C., Russell, H. V., Dotti, G., Huls, M. H., Liu, E., Gee, A. P., Mei, Z., Yvon, E., Weiss, H. L., Liu, H., Rooney, C. M., Heslop, H. E. and Brenner, M. K. (2008) 'Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma', *Nat Med*, 14(11), pp. 1264-1270.
- Rapin, N., Hoof, I., Lund, O. and Nielsen, M. (2008) 'MHC motif viewer', *Immunogenetics*, 60(12), pp. 759-65.
- Raziorrouh, B., Schraut, W., Gerlach, T., Nowack, D., Grüner, N. H., Ulsenheimer, A., Zachoval, R., Wächter, M., Spannagl, M., Haas, J., Diepolder, H. M. and Jung, M. C. (2010) 'The immunoregulatory role of CD244 in chronic hepatitis B infection and its inhibitory potential on virus-specific CD8+ T-cell function', *Hepatology*, 52(6), pp. 1934-1947.
- Rehermann, B. (2013) 'Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells', *Nature medicine*, 19(7), pp. 859.
- Rehermann, B., Ferrari, C., Pasquinelli, C. and Chisari, F. V. (1996) 'The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response', *Nat Med*, 2(10), pp. 1104-1108.
- Rehermann, B. and Nascimben, M. (2005) 'Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection', *Nat Rev Immunol*, 5(3), pp. 215-29.
- Rehermann, B., Pasquinelli, C., Mosier, S. M. and Chisari, F. V. (1995) 'Hepatitis B virus (HBV) sequence variation of cytotoxic T lymphocyte epitopes is not common in patients with chronic HBV infection', *J Clin Invest*, 96(3), pp. 1527-34.
- Revill, P. A. and Locarnini, S. A. (2016) 'New perspectives on the hepatitis B virus life cycle in the human liver', *The Journal of Clinical Investigation*, 126(3), pp. 833-836.
- Riddell, S. R., Rabin, M., Geballe, A. P., Britt, W. J. and Greenberg, P. D. (1991) 'Class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of cells infected with human cytomegalovirus does not require endogenous viral gene expression', *The Journal of Immunology*, 146(8), pp. 2795.
- RKI, Robert Koch-Institut (2016) *RKI-Ratgeber für Ärzte: Hepatitis B und D*. Berlin: Robert Koch-Institut.
- Robinson, J., Halliwell, J. A., Hayhurst, J. D., Flicek, P., Parham, P. and Marsh, S. G. (2014) 'The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases', *Nucleic Acids Research*, 43(D1), pp. D423-D431.

- Robinson, W. S., Clayton, D. A. and Greenman, R. L. (1974) 'DNA of a human hepatitis B virus candidate', *J Virol*, 14(2), pp. 384-91.
- Rock, K. L., York, I. A. and Goldberg, A. L. (2004) 'Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation', *Nature immunology*, 5(7), pp. 670.
- Rossol, S., Marinou, G., Carucci, P., Singer, M. V., Williams, R. and Naoumov, N. V. (1997) 'Interleukin-12 induction of Th1 cytokines is important for viral clearance in chronic hepatitis B', *The Journal of clinical investigation*, 99(12), pp. 3025-3033.
- Ryu, C. J., Gripon, P., Park, H. R., Park, S. S., Kim, Y. K., Guguen-Guillouzo, C., Yoo, O. J. and Hong, H. J. (1997) 'In vitro neutralization of hepatitis B virus by monoclonal antibodies against the viral surface antigen', *Journal of medical virology*, 52(2), pp. 226-233.
- Schinazi, R. F., Ehteshami, M., Bassit, L. and Asselah, T. (2018) 'Towards HBV curative therapies', *Liver International*, 38(S1), pp. 102-114.
- Schwarz, T., Kefalakes, H., Walker, A., Hoffmann, D. and Timm, J. Implications of HBV Sequence Polymorphisms on specific CD8<sup>+</sup>T cells. University Hospital Düsseldorf, Heinrich-Heine University Düsseldorf.
- Seeger, C. and Sohn, J. A. (2014) 'Targeting hepatitis B virus with CRISPR/Cas9', *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 3.
- Seifert, U., Liermann, H., Racanelli, V., Halenius, A., Wiese, M., Wedemeyer, H., Ruppert, T., Rispeter, K., Henklein, P. and Sijts, A. (2004) 'Hepatitis C virus mutation affects proteasomal epitope processing', *The Journal of clinical investigation*, 114(2), pp. 250-259.
- Severini, A., Liu, X. Y., Wilson, J. S. and Tyrrell, D. L. (1995) 'Mechanism of inhibition of duck hepatitis B virus polymerase by (-)-beta-L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine', *Antimicrob Agents Chemother*, 39(7), pp. 1430-5.
- Sewell, A. K. (2012) 'Why must T cells be cross-reactive?', *Nat Rev Immunol*, 12(9), pp. 669-77.
- Sidney, J., Assarsson, E., Moore, C., Ngo, S., Pinilla, C., Sette, A. and Peters, B. (2008) 'Quantitative peptide binding motifs for 19 human and mouse MHC class I molecules derived using positional scanning combinatorial peptide libraries', *Immunome Research*, 4, pp. 2-2.
- Slezak, S. L., Bettinotti, M., Selleri, S., Adams, S., Marincola, F. M. and Stroncek, D. F. (2007) 'CMV pp65 and IE-1 T cell epitopes recognized by healthy subjects', *Journal of Translational Medicine*, 5(1), pp. 17.
- STIKO (2017) *Ständige Impfkommision: Empfehlung der Ständigen Impfkommision (STIKO) am Robert Koch-Institut: Ständige Impfkommision am Robert Koch-Institut* (Accessed: 23. Oktober 2017).
- Stoop, J. N., Molen, R. G. v. d., Baan, C. C., Laan, L. J. W. v. d., Kuipers, E. J., Kusters, J. G. and Janssen, H. L. A. (2005) 'Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection', *Hepatology*, 41(4), pp. 771-778.
- Suh, A., Brosius, J., Schmitz, J. and Kriegs, J. O. (2013) 'The genome of a Mesozoic paleovirus reveals the evolution of hepatitis B viruses', *Nat Commun*, 4, pp. 1791.
- Sylwester, A. W., Mitchell, B. L., Edgar, J. B., Taormina, C., Pelte, C., Ruchti, F., Sleath, P. R., Grabstein, K. H., Hosken, N. A., Kern, F., Nelson, J. A. and Picker, L. J. (2005) 'Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells dominate the memory compartments of exposed subjects', *The Journal of Experimental Medicine*, 202(5), pp. 673-685.
- Taylor, W. R. (1986) 'The classification of amino acid conservation', *Journal of theoretical Biology*, 119(2), pp. 205-218.
- Tedder, R. S., Bissett, S. L., Myers, R. and Ijaz, S. (2013) 'The 'Red Queen'dilemma—running to stay in the same place: reflections on the evolutionary vector of HBV in humans', *Antivir Ther*, 18(3 Pt B), pp. 489-96.
- Thimme, R., Chang, K.-M., Pemberton, J., Sette, A. and Chisari, F. V. (2001) 'Degenerate Immunogenicity of an HLA-A2-Restricted Hepatitis B Virus Nucleocapsid Cytotoxic T-Lymphocyte Epitope That Is Also Presented by HLA-B51', *Journal of Virology*, 75(8), pp. 3984-3987.

- Thimme, R., Wieland, S., Steiger, C., Ghayeb, J., Reimann, K. A., Purcell, R. H. and Chisari, F. V. (2003) 'CD8+ T Cells Mediate Viral Clearance and Disease Pathogenesis during Acute Hepatitis B Virus Infection', *Journal of Virology*, 77(1), pp. 68-76.
- Thöns, C., Senff, T., Hydes, T. J., Manser, A. R., Heinemann, F. M., Heinold, A., Heilmann, M., Kim, A. Y., Uhrberg, M. and Scherbaum, N. (2017) 'HLA-Bw4 80 (T) and multiple HLA-Bw4 copies combined with KIR3DL1 associate with spontaneous clearance of HCV infection in people who inject drugs', *Journal of hepatology*, 67(3), pp. 462-470.
- Timm, J., Lauer, G. M., Kavanagh, D. G., Sheridan, I., Kim, A. Y., Lucas, M., Pillay, T., Ouchi, K., Reyor, L. L., zur Wiesch, J. S., Gandhi, R. T., Chung, R. T., Bhardwaj, N., Klenerman, P., Walker, B. D. and Allen, T. M. (2004) 'CD8 Epitope Escape and Reversion in Acute HCV Infection', *The Journal of Experimental Medicine*, 200(12), pp. 1593-1604.
- Tjwa, E. T., van Oord, G. W., Hegmans, J. P., Janssen, H. L. and Woltman, A. M. (2011) 'Viral load reduction improves activation and function of natural killer cells in patients with chronic hepatitis B', *J Hepatol*, 54(2), pp. 209-18.
- Toebes, M., Coccoris, M., Bins, A., Rodenko, B., Gomez, R., Nieuwkoop, N. J., van de Kastele, W., Rimmelzwaan, G. F., Haanen, J. B., Ovaa, H. and Schumacher, T. N. (2006) 'Design and use of conditional MHC class I ligands', *Nat Med*, 12(2), pp. 246-51.
- Tomtishen, J. P., 3rd (2012) 'Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28)', *Viral J*, 9, pp. 22.
- Trepo, C., Chan, H. L. and Lok, A. (2014) 'Hepatitis B virus infection', *Lancet*, 384(9959), pp. 2053-63.
- Tu, T., Budzinska, M. A., Shackel, N. A. and Jilbert, A. R. (2015) 'Conceptual models for the initiation of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma', *Liver International*, 35(7), pp. 1786-1800.
- Tu, T., Budzinska, M. A., Shackel, N. A. and Urban, S. (2017) 'HBV DNA Integration: Molecular mechanisms and clinical implications', *Viruses*, 9(4), pp. 75.
- Vandepapelière, P., Lau, G. K. K., Leroux-Roels, G., Horsmans, Y., Gane, E., Tawandee, T., Merican, M. I. b., Win, K. M., Trepo, C., Cooksley, G., Wettendorff, M. and Ferrari, C. (2007) 'Therapeutic vaccination of chronic hepatitis B patients with virus suppression by antiviral therapy: A randomized, controlled study of co-administration of HBsAg/AS02 candidate vaccine and lamivudine', *Vaccine*, 25(51), pp. 8585-8597.
- Vincent, I. E., Zannetti, C., Lucifora, J., Norder, H., Protzer, U., Hainaut, P., Zoulim, F., Tommasino, M., Trépo, C., Hasan, U. and Chemin, I. (2011) 'Hepatitis B Virus Impairs TLR9 Expression and Function in Plasmacytoid Dendritic Cells', *PLOS ONE*, 6(10), pp. e26315.
- von Laer, A., Simeonova, Y., Harder, T., Zimmermann, R. and Dudareva-Vizule, S. (2017) 'Virushepatitis B und D im Jahr 2016', *Epidemiologisches Bulletin*, Epid Bull 2017(31), pp. 297-308.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Kräusslich, H.-G., Mizokami, M., Bartenschlager, R. and Liang, T. J. (2005) 'Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome', *Nature Medicine*, 11, pp. 791.
- 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. and Timm, J. (2015) 'Distinct Escape Pathway by Hepatitis C Virus Genotype 1a from a Dominant CD8+ T Cell Response by Selection of Altered Epitope Processing', *J Virol*, 90(1), pp. 33-42.
- Wang, Z., Rosa, C. L., Li, Z., Ly, H., Krishnan, A., Martinez, J., Britt, W. J. and Diamond, D. J. (2007) 'Vaccine properties of a novel marker gene-free recombinant modified vaccinia Ankara expressing immunodominant CMV antigens pp65 and IE1', *Vaccine*, 25(6), pp. 1132-1141.
- Wange, R. L. and Samelson, L. E. (1996) 'Complex complexes: signaling at the TCR', *Immunity*, 5(3), pp. 197-205.
- Webster, G. J., Reignat, S., Maini, M. K., Whalley, S. A., Ogg, G. S., King, A., Brown, D., Amlot, P. L., Williams, R., Vergani, D., Dusheiko, G. M. and Bertoletti, A. (2000) 'Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms', *Hepatology*, 32(5), pp. 1117-24.
- WHO 2015. Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection. Genf: WHO.

- WHO (2017a) *Fact Sheet Hepatitis B No. 204*: World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/> (Accessed: 02 September 2017).
- WHO (2017b) *Global hepatitis report, 2017*, Genf: World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/> (Accessed: 2017/08/24).
- WHO (2017c) *Hepatitis B vaccines: WHO position paper - July 2017*, Genf: WHO (27, 27). Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255841/1/WER9227.pdf?ua=1>.
- WHO (2017d) *World Health statistics 2017: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals*, Genf: WHO. Available at: [http://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/2017/EN\\_WHS2017\\_Part2.pdf?ua=1](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2017/EN_WHS2017_Part2.pdf?ua=1).
- Wieland, S., Thimme, R., Purcell, R. H. and Chisari, F. V. (2004) 'Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(17), pp. 6669-6674.
- Wills, M. R., Carmichael, A. J., Mynard, K., Jin, X., Weekes, M. P., Plachter, B. and Sissons, J. G. (1996) 'The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL', *Journal of Virology*, 70(11), pp. 7569-79.
- Wisskirchen, K., Metzger, K., Schreiber, S., Asen, T., Weigand, L., Dargel, C., Witter, K., Kieback, E., Sprinzl, M. F., Uckert, W., Schiemann, M., Busch, D. H., Krackhardt, A. M. and Protzer, U. (2017) 'Isolation and functional characterization of hepatitis B virus-specific T-cell receptors as new tools for experimental and clinical use', *PLOS ONE*, 12(8), pp. e0182936.
- Woltman, A. M., Op den Brouw, M. L., Biesta, P. J., Shi, C. C. and Janssen, H. L. A. (2011) 'Hepatitis B Virus Lacks Immune Activating Capacity, but Actively Inhibits Plasmacytoid Dendritic Cell Function', *PLOS ONE*, 6(1), pp. e15324.
- Wong, V. C., Ip, H. M., Reesink, H. W., Lelie, P. N., Reerink-Brongers, E. E., Yeung, C. Y. and Ma, H. K. (1984) 'Prevention of the HBsAg carrier state in newborn infants of mothers who are chronic carriers of HBsAg and HBeAg by administration of hepatitis-B vaccine and hepatitis-B immunoglobulin. Double-blind randomised placebo-controlled study', *Lancet*, 1(8383), pp. 921-6.
- Xia, Y., Stadler, D., Lucifora, J., Reisinger, F., Webb, D., Hösel, M., Michler, T., Wisskirchen, K., Cheng, X. and Zhang, K. (2016) 'Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  produced by T cells reduce the HBV persistence form, cccDNA, without cytolysis', *Gastroenterology*, 150(1), pp. 194-205.
- Yan, H., Zhong, G., Xu, G., He, W., Jing, Z., Gao, Z., Huang, Y., Qi, Y., Peng, B. and Wang, H. (2012) 'Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus', *elife*, 1.
- Yang, P., Althage, A., Chung, J., Maier, H., Wieland, S., Isogawa, M. and Chisari, F. (2010) *Immune effectors required for hepatitis B virus clearance*.
- Yokomaku, Y., Miura, H., Tomiyama, H., Kawana-Tachikawa, A., Takiguchi, M., Kojima, A., Nagai, Y., Iwamoto, A., Matsuda, Z. and Ariyoshi, K. (2004) 'Impaired Processing and Presentation of Cytotoxic-T-Lymphocyte (CTL) Epitopes Are Major Escape Mechanisms from CTL Immune Pressure in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection', *Journal of Virology*, 78(3), pp. 1324-1332.
- Zhang, Z.-H., Wu, C.-C., Chen, X.-W., Li, X., Li, J. and Lu, M.-J. (2016) 'Genetic variation of hepatitis B virus and its significance for pathogenesis', *World Journal of Gastroenterology*, 22(1), pp. 126-144.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D. R., Wieland, S. F., Uprichard, S. L., Wakita, T. and Chisari, F. V. (2005) 'Robust hepatitis C virus infection in vitro', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26), pp. 9294-9299.
- Ziegler, S., Skibbe, K., Walker, A., Ke, X., Heinemann, F. M., Heinold, A., Mok, J. Y., van Esch, W. J., Yang, D., Wolf, M. and Timm, J. (2014) 'Impact of sequence variation in a dominant HLA-A\*02-restricted epitope in hepatitis C virus on priming and cross-reactivity of CD8+ T cells', *J Virol*, 88(19), pp. 11080-90.

## Literaturverzeichnis

Zoulim, F., Saputelli, J. and Seeger, C. (1994) 'Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo', *Journal of virology*, 68(3), pp. 2026-2030.

## 8. Abkürzungen

Abkürzung	
ALT	Alanin-Aminotransferase
APC	Allophycocyanin
BB	Brilliant Blue
BFA	Brefeldin A
BSD	Blasticidin-Resistenzkassette
BV	Brilliant Violet
cccDNA	kovalent geschlossene zirkuläre DNA (engl. <u>c</u> o <u>v</u> alently <u>c</u> losed <u>c</u> ircular <u>D</u> NA)
CCR7	C-C Chemokin Rezeptor Typ 7
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDR	Komplementaritäts-determinierende Region (engl. complementarity determining region)
CHB	chronische Hepatitis B
CMV	Zytomegalivirus (engl. Cytomegalovirus)
copGFP	grün fluoreszierendes Protein des Ruderfußkrebs <i>Pontellina plumata</i>
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyte (engl. <u>C</u> ytotoxic <u>T</u> <u>L</u> ymphocyte)
CTLA 4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein-4</i>
DC	Dendritische Zellen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Deoxyribonucleic acid)
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
D-Segment	<i>diversity segment</i>
EASL	Europäische Vereinigung für Leberstudien (engl. European Association for the study of the liver)
EBV	Epstein Barr Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetra..... (engl. Ethylenediaminetetraacetic acid)
ER	endoplasmatische Retikulum
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
FBS	fötales Kälberserum (engl. <u>F</u> etal <u>B</u> ovine <u>S</u> erum)
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. <u>f</u> orward <u>s</u> catter)
<i>g</i>	Gravitationskonstante
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HBc	Hepatitis B Kapsidprotein
HBeAg	Hepatitis B e-Antigen
HBsAg	Hepatitis B Oberflächen-Antigen
HBV	Hepatitis B Virus
HB Virus	Hepatitis B Virus
HBx	Hepatitis X Protein
HCC	Hepatozelluläres Karzinom (engl. <u>H</u> epato <u>c</u> ellular <u>c</u> arcinoma)
CMV	humanes Zytomegalovirus
HCV	Hepatitis C Virus
HEK	Humane embryonale Nierenzellen (engl. human embryonic kidney cells)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HepG2	Hepatozelluläres Karzinomzelllinie
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HLA-A*02:xx	HLA-A*02-Subtypen außer HLA-A*02:01

## Abkürzungen

IFN	Interferon
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IU	Internationale Einheit (engl. International Unit)/Infektiöse Einheiten (engl. Infectious Units)
J-Segment	joining segment
k.A.	keine Angabe
kB	Kilobasen
KLRG1	<i>killer-cell lectin like receptor G1</i>
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LHBs	großes Hepatitis B Hüllprotein (engl. large Hepatitis B surface protein)
LTQ	<i>Linear Trap Quadrupole</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MHC	Hauptkompatibilitätskomplex (engl. Major Histocompatibility Complex)
MDA-5	Melanom-Differenzierungsantigen 5
$\mu$ g	Mikrogramm
MHBs	mittleres Hepatitis B Hüllprotein (engl. middle Hepatitis B surface protein)
min	Minute
$\mu$ l	Mikroliter
ml	Milliliter
NA	Nukleos(t)id-Analoga
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
neg	negativ
NTCP	Natriumtaurocholat Kotransportpolypeptid
ORF	offener Leserahmen (engl. Open Reading Frame)
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
P	Peptides&Elephants GmbH
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (engl. peripheral blood mononuclear cells)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	<i>Programmed Cell Death Protein 1</i>
PE	R-phycoerythrin
PegIFN $\alpha$	pegyliertes Interferon alpha
Pen Strep	Penicillin Streptomycin
PerCP Cy5.5	Peridin-chlorophyll protein Cyanine 5.5
pgRNA	prä-genomische RNA
pos	positiv
PRR	Pathogen erkennende Rezeptoren (engl. pathogen recognition receptors)
PSM	<i>Peptide spectrum match</i>
pt	Prototyp
rcDNA	relaxierte zirkuläre DNA (engl. <u>r</u> elaxed <u>c</u> ircular <u>DNA</u> )
RIG-1	retinoic acid inducible gene 1
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <u>r</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s	Sekunde
SHBs	kleines Hepatitis B Hüllprotein (engl. small Hepatitis B surface protein)
SSC	Seitwärtsstreulicht ( <u>s</u> ide <u>s</u> catter)

## Abkürzungen

SVP	subvirale Hüllpartikel
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor (T-cell receptor)
TIM-3	<i>T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zellen
U	Einheiten (engl. units)
ULN	Obere Grenze des Normalwerts (engl. <i>upper limit of normal</i> )
UV	Ultraviolett
V-Segment	variables Segment
WHBV	Murmeltier Hepatitis B Virus (engl. Woodchuck Hepatitis B virus)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. <u>World Health Organization</u> )

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 – Genomstruktur und Struktur des Hepatitis B Viruspartikels .....	12
Abbildung 1.2 – Lebenszyklus des Hepatitis B Virus .....	13
Abbildung 1.3 – Immunkinetik während einer HBV-Infektion.....	18
Abbildung 1.4 – Endogene Prozessierung eines HLA-A, -B oder -C-restringierten Peptids.....	19
Abbildung 1.5 – Rekombination der $\beta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors.....	21
Abbildung 1.6 – Sequenzpolymorphismen im HBVcore <sub>18-27</sub> CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Epitop.....	23
Abbildung 3.1 - Gatingstrategie einer klassischen intrazellulären Zytokinfärbung .....	42
Abbildung 4.1 – HBVcore <sub>18-27</sub> spezifische CD8 <sup>+</sup> T-Zellantworten nach <i>ex vivo</i> Expansion.....	55
Abbildung 4.2 – Restriktion des HBVcore <sub>18-27</sub> Epitops .....	57
Abbildung 4.3 – Sequenzvariabilität im HBVcore <sub>18-27</sub> Epitop.....	59
Abbildung 4.4 - HBVcore <sub>18-27</sub> -spezifische CD8 <sup>+</sup> T-Zellantwort nach <i>in vitro</i> Expansion gefrorener PBMCs.....	61
Abbildung 4.5 – Reaktivität der CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in Abhängigkeit des HBeAg-Status .....	62
Abbildung 4.6 – Kreuzreaktivitätsprofil von HBVcore <sub>18-27</sub> spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	65
Abbildung 4.7 – Kreuzreaktivitätsprofile von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen mit bekanntem T-Zell-Rezeptorklon .....	67
Abbildung 4.8 – Einfluss der autologen Virusequenz auf die Reaktivität HBVcore <sub>18-27</sub> spezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	69
Abbildung 4.9 – Einfluss der Substitutionen auf die Affinität des Epitops .....	70
Abbildung 4.10 - Gatingstrategie für die phänotypische Charakterisierung der HBVcore <sub>18-27</sub> Dextramer-spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	71
Abbildung 4.11 – Phänotypische Charakterisierung von HBVcore <sub>18-27</sub> -spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	73
Abbildung 4.12 – Kreuzreaktivitätsprofil variantenspezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	74
Abbildung 4.13 – Relative Häufigkeit von Fragmenten, die das vollständige HBVcore <sub>18-27</sub> Epitop nach dem proteasomalen Verdau enthalten .....	75
Abbildung 4.14 – Relative Häufigkeit der N- und C-Termini nach dem proteasomalen Verdau des elongierten HBVcore <sub>18-27</sub> Peptids .....	76
Abbildung 4.15 – Kapazität der transient CMVpp65 <sub>495-503</sub> exprimierenden HepG2-Zellen IFN $\gamma$ -Antworten auszulösen .....	78
Abbildung 4.16 – Restimulationskapazität im HBV-Kontext im Vergleich zum CMV-Kontext	79

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 4.17 – Effekt der F24Y-Substitution auf die endogene Prozessierung des HBVcore <sub>18-27</sub> Epitops.....	80
Abbildung 4.18 – Einfluss der Peptidkonzentration auf die Restimulation der HBVcore und CMVpp65-spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	82
Abbildung 4.19 – Kreuzreaktivität CMVpp65-spezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellen gegenüber 114 Varianten des A*02-Epitops NLVPMVATV .....	85
Abbildung 4.20 – Kreuzreaktivität CMVpp65-spezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellen bei 10 µg/ml vs 10 <sup>-2</sup> µg/ml Peptid.....	86
Abbildung 4.21 – Bindung der CMVpp65 <sub>495-503</sub> Varianten an das HLA-A*02:01 Molekül .....	87
Abbildung 4.22 – Titration der ausgewählten CMVpp65 <sub>495-503</sub> Varianten.....	89
Abbildung 4.23 – Prozessierung der CMVpp65 <sub>495-503</sub> Varianten im Vergleich zum Prototyppepitop.....	90

## 10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Antikörper, Dextramere und fluoreszierende Farbstoffe .....	25
Tabelle 2.2 Zelllinien und Bakterien.....	25
Tabelle 2.3 Zellkulturnährmedien, Nährmedien für Bakterienkulturen und Zusätze .....	26
Tabelle 2.4 Zusammensetzung der Nährmedien für Zell- und Bakterienkulturen .....	26
Tabelle 2.5 Chemikalien, Enzyme und Reagenzien .....	27
Tabelle 2.6 Verbrauchsmaterialien .....	28
Tabelle 2.7 Kits .....	29
Tabelle 2.8 Technische Ausstattung.....	29
Tabelle 2.9 Plasmide.....	30
Tabelle 2.10 Primer and Oligonukleotide .....	30
Tabelle 2.11 Peptide.....	31
Tabelle 2.12 Software.....	34
Tabelle 2.13 - HLA-A*02-positive Patienten mit chronischer HBV-Infektion .....	35
Tabelle 2.14 – HLA-B*35:01-positive oder B*35:03-positive Patienten mit chronischer HBV-Infektion .....	36
Tabelle 2.15 – HLA-B*51-positive Patienten mit chronischer HBV-Infektion.....	37
Tabelle 2.16 – Patienten mit chronischer HBV-Infektion mit einer Kombination aus zwei oder drei der HLA-Typen A*02, B*35 oder B*51 .....	38
Tabelle 3.1 Pipettierprotokoll für die Amplifizierung von copGFP .....	45
Tabelle 3.2 PCR Programm für die Amplifizierung von copGFP.....	45
Tabelle 3.3 Pipettierprotokoll zur Amplifizierung und Öffnung des Plasmids psec-Nluc .....	46
Tabelle 3.4 PCR Programm zur Amplifizierung von psec-Nluc- $\Delta$ hygro .....	46

# 11. Danksagungen

Zunächst gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Jörg Timm, der mir die Möglichkeit gegeben hat in meiner Doktorarbeit an dieser spannenden Fragestellung zu arbeiten. Deine wissenschaftlichen Ratschläge und Anregungen waren sehr wertvoll und haben mir dabei geholfen so manche Hürde in dem Projekt zu nehmen. Auch für deine Unterstützung über die Doktorarbeit hinaus möchte ich dir an dieser Stelle danken.

Auch Prof./in Dr. Wiebke Hansen möchte ich für die Unterstützung und den ein oder anderen Tipp als Zweitbetreuerin im Rahmen des Graduiertenkollegs herzlich danken.

Darüber hinaus danke ich allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Timm für die wunderbare Atmosphäre und den sehr lustigen Laboralltag, die amüsanten Kaffeepausen und die zahlreichen „Unsinn-vollen“ Gespräche im Büro. Andreas Walker, Alexandra Graupner, Christine Thöns, Christopher Menne, Eugen Bäcker, Nadine Lübke, Tatjana Schwarz und Tina Senff ohne euch wären so einige Tage deutlich frustrierender gewesen. An dieser Stelle möchte ich mich bei Andreas und Christine auch für die unglaublich hilfreiche fachliche Unterstützung von Tag eins an bedanken.

Besonders danken möchte ich Christine, Tatjana und Tina, die mir auch mit persönlichem und freundschaftlichem Rat zur Seite standen. Die Freundschaften, die daraus erwachsen sind, möchte ich nicht missen. Tina, es war etwas ganz Besonderes dich als Wegbegleiterin für die gesamte Zeit der Doktorarbeit zu haben. Danke für dein offenes Ohr, deine aufbauenden und motivierenden Worte und die wunderbaren Momente, die wir in den letzten Jahren gemeinsam erleben durften. Es ist sehr schön, dass daraus eine so tolle Freundschaft geworden ist.

All dies wäre ohne die unglaubliche Unterstützung meiner Familie, gar nicht möglich gewesen. Euch gilt daher mein allergrößter Dank. Seit ich denken kann, habt ihr, Mama und Papa, mir alles ermöglicht, was ich mir in den Kopf gesetzt hatte und mich motiviert. Ich danke euch für euren Halt und den bedingungslosen Glauben daran, dass ich meine Ziele erreiche. Marian und Sarah, auch euch danke ich für all die Unterstützung. Ich bin sehr froh genau euch als Geschwister zu haben. Unser Zusammenhalt ist für mich unglaublich wertvoll.

Meiner Oma und Ane möchte ich an dieser Stelle ebenfalls danken. Ich weiß wie sehr ihr bei jedem Schritt, den ich vorwärts ging, mitgefiebert habt und für mich da wart. Es ist sehr schön zu wissen, wie stolz ihr auf mich seid und wäret.

Jonas, ich bin unglaublich glücklich, dich in meinem Leben zu haben. Ich bin sehr dankbar, dass du immer für mich da bist, mit deinem Optimismus so manche Situation relativierst und meinem Dickkopf mit einem ebenso großen Dickkopf begegnest. Ich freue mich auf unsere gemeinsame Zukunft.

## 12. Lebenslauf

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht  
enthalten.**

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht  
enthalten.**

## 13. Publikationen

### Publikationen

---

**Artikel:**

Pfaender S, Brinkmann J, Todt D, Riebesehl N, Steinmann J, Steinmann J, Pietschmann T, Steinmann E. 2015. Mechanisms of methods for hepatitis C virus inactivation. *Appl Environ Microbiol* 81:1616–1621. doi:10.1128/AEM.03580-14.

**Poster Präsentationen:**

27. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Münster und 46. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Hamburg

„Cross-reactivity profiles of CD8+ T cells targeting an immunodominant epitope in the core protein of HBV“

3<sup>rd</sup> International Symposium of the Virtual Institute VISTRIE

„Analysis of the T cell receptor repertoire of HCV-specific cross-reactive CD8+ T cells“

## 14. Eidstattliche Erklärungen

Ich gebe folgende Erklärung ab:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Janine Brinkmann

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) e) + g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Janine Brinkmann

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Einfluss der viralen Sequenzvariabilität auf die Reaktivität von Hepatitis B Virus-spezifischen CD8+ T Zellen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Janine Brinkmann befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

\_\_\_\_\_  
Name in Druckbuchstaben

Essen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. med. Jörg Timm