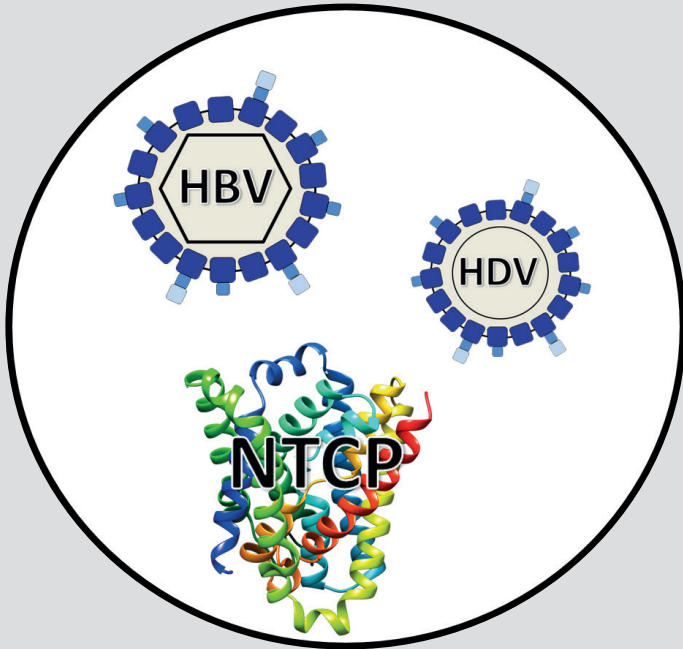


**Speziesunterschiede und  
Inhibitionscharakterisierung  
der Interaktion zwischen HBV/HDV  
und dem spezifischen Rezeptor NTCP**

---

**Simon Franz Müller**



Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.

---

am Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen





## **Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;  
detaillierte bibliografische Daten sind im Internet abrufbar über  
<http://dnb.ddb.de>

© 2019 by Verlag:

**Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**, Gießen  
Printed in Germany

**ISBN 978-3-86345-474-6**

1. Auflage 2019

### **Verlag:**

DVG Service GmbH  
Friedrichstraße 17  
35392 Gießen  
Tel.: 0641/24466  
[info@dvj.de](mailto:info@dvj.de)  
[www.dvj.de](http://www.dvj.de)

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Betreuer: Prof. Dr. Joachim Geyer**

**Speziesunterschiede und Inhibitionscharakterisierung  
der Interaktion zwischen HBV/HDV  
und dem spezifischen Rezeptor NTCP**

**Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.  
am Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Eingereicht von:**

**Simon Franz Müller  
Tierarzt aus Aura im Sinngrund**

**Gießen 2018**

**Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer**

**1. Gutachter: Prof. Dr. Joachim Geyer**

**2. Gutachter: Prof. Dr. Friedemann Weber**

**Tag der Disputation: 01.02.2019**

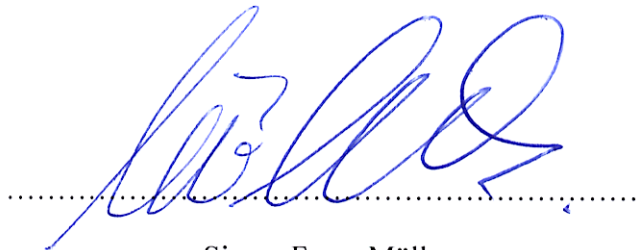
**Prüfungskommission:  
Prof. Dr. Joachim Geyer  
Prof. Dr. Friedemann Weber  
Prof. Dr. Christoph Grevelding**

## **Erklärung zur selbstständigen Anfertigung**

Ich erkläre hiermit die vorgelegte Dissertation mit dem Titel

**„Speziesunterschiede und Inhibitionscharakterisierung  
der Interaktion zwischen HBV/HDV  
und dem spezifischen Rezeptor NTCP“**

selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, sowie alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.



Simon Franz Müller

In Dankbarkeit.  
Für meinen Großvater und Jagdlehrer.  
Für mein Vorbild, nach Mehr zu streben.

**Karl Remlein**

\* 26.06.1925 † 25.02.2010

Unteroffizier  
Metzgermeister und Altbürgermeister  
Ehrenbürger der Gemeinde Aura im Sinngrund  
Träger des Bundesverdienstkreuzes am Bande



## Vorwort

*„Nicht hochtrabende Vorschriften sind unabdingbar „für die Existenz der Naturwissenschaften“ oder für die Bestimmung der Eigenschaften der Natur. Diese werden stets durch unseren Werkstoff bestimmt, durch die Natur selbst. Wir schauen ihn uns genau an und nehmen zur Kenntnis, was wir sehen. Aber wir können nicht im Voraus sagen, was dabei herauskommen wird. Nicht selten treten die einleuchtendsten Möglichkeiten nicht ein. Was wir für den Fortschritt der Wissenschaft brauchen, ist Experimentierfreude, ehrliche Berichterstattung - die sich an die Ergebnisse hält und sich nicht am Wunschdenken irgendwelcher Leute orientiert - und schließlich (aber nicht zuletzt) den zur Deutung der Ergebnisse nötigen Verstand. Dieser sollte sich vor allem dessen nicht zu sicher sein, was kommen muss. Er mag voreingenommen sein und sagen: „Das ist äußerst unwahrscheinlich; es gefällt mir auch nicht.“ Aber Voreingenommenheit ist etwas anderes als absolute Gewissheit. Ich spreche nicht von absolutem Vorurteil, sondern von Vorliebe. Solange Sie nur voreingenommen sind, spielt es keine Rolle. Erweist sich Ihre Vorliebe nämlich als falsch, werden die ständig wiederkehrenden Versuchsergebnisse Sie mit der Zeit so nerven, dass Sie sich den Fakten schließlich nicht länger verschließen können. Das vermöchten Sie nur, wenn Sie sich bestimmter unabdingbarere Voraussetzungen für die Wissenschaft von vorneherein absolut sicher wären, wie besagter Philosoph. Wirklich unerlässlich für die Existenz der Naturwissenschaften jedoch sind Geister, die nichts von solch unabdingbaren Voraussetzungen, die die Natur zu erfüllen hat, wissen wollen.“*

Von Richard P. Feynman aus „Vom Wesen physikalischer Gesetze“, 1990, Piper Verlag  
(Amerikanische Originalausgabe: „*The Character of Physical Law*“, 1965, M.I.T. Press)

*“Der Ablauf der Lebensvorgänge in einem Organismus zeigt eine bewundernswerte Regelmäßigkeit und Ordnung, die in der unbelebten Materie nicht ihresgleichen findet. Reguliert wird er von einer höchst geordneten Gruppe von Atomen, die nur einen winzigen Bruchteil ihrer Gesamtheit in der Zelle ausmachen. Nach der Auffassung, die wir uns vom Mutationsvorgang gebildet haben, genügt bereits die Verlagerung ganz weniger „regierender Atome“ in der Keimzelle, um eine deutlich erkennbare Veränderung der großmaßstäblichen Erbmerkmale des Organismus zu verursachen.*

*Diese Tatsachen gehören wohl zu dem Interessantesten, was uns die moderne Wissenschaft aufgedeckt hat. [...] Es ist gleichgültig, ob wir es selbstverständlich finden, dass eine kleine, aber hochorganisierte Atomgruppe fähig ist, in dieser Weise zu wirken; das ändert nichts an der Einmaligkeit dieses Tatbestandes, der ausschließlich bei der lebenden Substanz vorkommt.“*

Von Erwin Schrödinger aus „Was ist Leben?“, 1989, Piper Verlag  
(Englische Originalausgabe: „*What is Life?*“, 1944, Cambridge University Press)

*„Die Weisheit zieht auch der Erkenntnis Grenzen.“*

Von Friedrich Nietzsche aus „Götzen-Dämmerung“, 1889, Naumann Verlag, Leipzig

<b>I</b>	<b>Abkürzungen</b> .....	08
<b>II</b>	<b>Kurzeinleitung in das Thema der Arbeit</b> .....	09
<b>1</b>	<b>Literaturübersicht</b>	
<b>1.1</b>	<b>Das „Na<sup>+</sup>/Taurocholate Cotransporting Polypeptide“ (NTCP, <i>SLC10A</i>)</b> .....	10
1.1.1	Einordnung in die SLC10 Transporterfamilie und Nomenklatur.....	10
1.1.2	Entdeckung, Lokalisation, physiologische Funktion und Regulation.....	11
1.1.3	Bekannte Substrate und Inhibitoren.....	15
1.1.4	Genetische Abweichungen in der Population.....	16
1.1.5	3D-Proteinmodell und Homologie-Modellierung.....	17
<b>1.2</b>	<b>Hepadnaviren und das Hepatitis Delta Virus (HDV)</b> .....	20
1.2.1	Hepadnaviren und humanes Hepatitis B Virus (HBV).....	20
1.2.2	Weitere Mitglieder der Familie Hepadnaviridae.....	20
1.2.3	Molekularbiologie der Hepadnaviren am Beispiel HBV.....	21
1.2.4	Hepatitis Delta Virus (HDV).....	23
1.2.5	Prävalenz und Pathogenese von HBV- und HDV Infektionen.....	24
<b>1.3</b>	<b>NTCP als Rezeptor für HBV und HDV</b> .....	25
1.3.1	Vorgeschichte.....	25
1.3.2	Entdeckung von NTCP als Rezeptor für HBV.....	26
1.3.3	Mögliche HBV Therapie durch Inhibition der Bindung an NTCP.....	27

## **2 Publikationen und Eigenanteil**

2.1	Publikation 1.....	28
2.1.1	Darstellung Eigenanteil an Publikation 1 .....	29
2.1.2	Bescheinigung der Richtigkeit der Angaben in 2.1.2 durch den Seniorautor .....	30
2.2	Publikation 2.....	31
2.2.1	Darstellung Eigenanteil an Publikation 2 .....	32
2.2.2	Bescheinigung der Richtigkeit der Angaben in 2.2.2 durch den Seniorautor .....	33

## **3 Diskussion**

<b>3.1</b>	<b>NTCP als Transporter, Rezeptor und Drug-Target .....</b>	<b>34</b>
3.1.1	NTCP erwacht aus seinem Dornröschenschlaf .....	34
3.1.2	Studien zu HBV-Entry-Inhibitoren: Myrcludex B .....	34
3.1.3	Studien zu HBV-Entry-Inhibitoren: Im Allgemeinen.....	35
3.1.4	Studien zu HBV-Entry-Inhibitoren: Sonderfall Cyclosporinderivate .....	36
<b>3.2</b>	<b>Das neu entdeckte Cebus Monkey Hepatitis B Virus (CMHBV).....</b>	<b>36</b>
<b>3.3</b>	<b>Charakterisierung der de novo klonierten Neu- und Altweltaffen Ntcps als Transporter und Rezeptoren.....</b>	<b>40</b>
<b>3.4</b>	<b>Gemeinsame Diskussion der Veröffentlichungen.....</b>	<b>44</b>
3.4.1	Potenzielle neue Tiermodelle .....	44
3.4.2	Hepadnaviren - Zoonotisches Potenzial und potenzielle Reservoirs in der Wildnis ...	45
3.4.3	Reproduktion der Forschungsergebnisse durch eine unabhängige Arbeitsgruppe.....	48

<b>3.5</b>	<b>Ausblicke</b> .....	48
3.5.1	Die NTCP Variante S267F .....	48
3.5.2	Glykosylierungsmuster von NTCP während der Ontogenese .....	48
3.5.3	Allgemeine Betrachtung zu NTCP-Varianten und HBV-Resistenz .....	49
3.5.4	Aktuelles Bild der Evolutionsgeschichte von HBV .....	50
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung (Deutsch)</b> .....	52
<b>5</b>	<b>Summary (English)</b> .....	53
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	54
<b>7</b>	<b>Danksagungen</b> .....	62
<b>8</b>	<b>Anhang</b> .....	64

## I Abkürzungen

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
ASBT, <i>SLC10A2</i>	apical sodium-dependent bile acid transporter
cccDNA	covalently closed circular DNA
CMHBV	cebus monkey hepatitis B virus
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
DNA	Desoxiribonucleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
FXR	farnesoid X receptor
HBc / HBcAg	HBV core antigen
HBe / HBeAg	HBV e-antigen
HBHBV	horseshoe bat hepatitis B virus
HBs / HBsAg	HBV surface antigen
HBV	hepatitis B virus
HBx / HBxAg	HBV x-antigen
HDV	hepatitis delta virus
HDVpsWMHBV	HDV Partikel mit den Hüllproteinen von WMHBV
kb	Kilobasen
LHBs / LHBsAg	large HBV surface antigen
MHBs / MHBsAg	medium HBV surface antigen
mRNA	messenger RNA
NBD-TC	4-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole-taurocholat
NTCP, <i>SLC10A1</i>	Na <sup>+</sup> /taurocholate cotransporting polypeptide
OATP	organic anion transporting polypeptide
preS1-Peptid	myristoyliertes Peptid (Aminosäuren 2-48) des sHBsAg
RAR	retinoic acid receptor
RBHBV	roundleaf bat hepatitis B virus
RNA	Ribonucleinsäure
SHBs / SHBsAg	small HBV surface antigen
SLC10	solute carrier family 10
SLC	solute carrier
SOAT, <i>SLC10A6</i>	sodium-dependent organic anion transporter
SVP	subvirale Partikel
TBHBV	tent-making bat hepatitis B virus
TC	Taurocholat
WMHBV	woolly monkey hepatitis B virus
WMV	woodchuck hepatitis B virus
sHDAg	small hepatitis delta antigen
IHDAg	large hepatitis delta antigen

## II Kurzeinleitung in das Thema der Arbeit

Das „*Na<sup>+</sup>/Taurocholate Cotransporting Polypeptide*“ (NTCP, *SLC10A1*) ist in seiner physiologischen Rolle ein Gallensäuretransporter und wesentlich an der enterohepatischen Zirkulation der Gallensäuren beteiligt. NTCP transportiert Gallensäuren aus dem Blut in die Leberzellen hinein, wird exklusiv von Leberzellen exprimiert und ist in diesen in der dem Blut zugewandten Membran lokalisiert.

Das humane Hepatitis B Virus (HBV) ist, obwohl gegen HBV geimpft werden kann, noch heute eine globale Gefahr für die Gesundheit der Weltbevölkerung. Die Bekämpfung schreitet vor allem in den weniger wohlhabenden Nationen und Regionen der Erde nur langsam voran, da aktuell keine Therapie existiert, die zu einer zuverlässigen Heilung von bereits infizierten Individuen führt. Die Fähigkeit von HBV, lebenslang in seinen Wirt zu persistieren und dabei das Risiko für die Entwicklung von hepatozellulären Karzinomen massiv zu erhöhen, verlangt nach einer kurativen Lösung.

Der Gallensäuretransporter NTCP wurde vor wenigen Jahren als der entscheidende Eintrittsrezeptor für HBV in die Leberzellen identifiziert. Dieser Vorgang, auch als „*entry*“ bezeichnet, stellt einen essentiellen Schritt im Lebenszyklus des HBV dar.

Die wissenschaftliche Charakterisierung dieses Vorganges ist die Grundlage, um diesen als möglichen Angriffspunkt von pharmakologischen Substanzen adressieren zu können. Eine Substanz, welche die Invasion der Zellen durch das Virus verhindern könnte, wäre eine große Hilfe auf dem Weg zur Entwicklung einer kurativen Therapie für HBV.

Das Ziel dieser Arbeit war es, durch vergleichende Studien an den Ntcps verschiedener nahe verwandter Affenspezies herauszufinden, welche Regionen der Ntcps entscheidend für die Infektion mit HBV sind. Da sowohl Transporter von Altwelt- als auch von Neuweltaffen von uns kloniert werden konnten, haben wir diese auch im Hinblick auf die Infizierbarkeit mit dem „*Woolly Monkey Hepatitis Virus*“ (WMHBV), einem Neuweltaffen-Hepatitisvirus, verglichen um zu klären, ob dieses die gleichen Strukturen am Ntcp-Rezeptor nutzt.

# 1 Literaturübersicht

## 1.1 Das „Na<sup>+</sup>/Taurocholate Cotransporting Polypeptide“ (NTCP, *SLC10A1*)

### 1.1.1 Einordnung in die SLC10 Transporterfamilie und Nomenklatur

Das „Na<sup>+</sup>/Taurocholate Cotransporting Polypeptide“ (NTCP, *SLC10A1*) ist ein Mitglied der „Solute Carrier“ (SLC) Familie 10 (SLC10), welche aufgrund der Funktion ihrer zuerst identifizierten Mitglieder auch „Sodium Bile Acid Cotransporter Family“ genannt wird (Geyer et al. 2006). Ebenfalls in die SLC10 Transporterfamilie eingeordnet wird der „Apical Sodium-dependent Bile Acid Transporter“ (ASBT, *SLC10A2*), welcher gemeinsam mit NTCP wesentlich an der physiologischen Aufrechterhaltung des Kreislaufs der Gallensäuren zwischen Verdauungstrakt und Leber, der so genannten enterohepatischen Zirkulation, beteiligt ist (Anwer & Stieger 2014).

Weiterhin werden aktuell der SLC10 Transporterfamilie P3 (*SLC10A3*), P4 (*SLC10A4*), P5 (*SLC10A5*), der „Sodium-dependent Organic Anion Transporter“ (SOAT, *SLC10A6*) und P7 (*SLC10A7*) auf der Basis von Sequenzhomologien zugeordnet (Geyer et al. 2006, Godoy et al. 2007, Geyer et al. 2007). Funktionell konnte der Transport von Gallensäuren bisher jedoch nur für NTCP und ASBT nachgewiesen werden (Hagenbuch et al. 1994, Wong et al. 1995). SOAT konnte als hoch selektiver Transporter für sulfatierte Steroide identifiziert werden (Geyer et al. 2007). Die weiteren Mitglieder der Familie sind Subjekt aktueller Forschung und werden bis zum Zeitpunkt der wissenschaftlichen Beschreibung ihrer Funktion als so genannte „Orphan Carrier“ bezeichnet.

Es ist Usus, dass die Entdecker der Funktion eines Proteins bei Erstbeschreibung einen Namen und eine entsprechende Abkürzung für das Protein vorschlagen, die in der Regel von der wissenschaftlichen Fachliteratur übernommen werden. So zum Beispiel bei NTCP (*SLC10A1*) geschehen (Hagenbuch et al. 1994). Es wurde festgelegt, dass die Schreibweise „NTCP“ in Großbuchstaben das menschliche Protein bzw. „*SLC10A1*“ das entsprechende Gen bezeichnet, wohingegen ein Groß- gefolgt von Kleinbuchstaben immer Proteine bzw. Gene nichtmenschlichen Ursprungs bezeichnet, so zum Beispiel „Ntcp“ oder „*Slc10a1*“ (Geyer et al. 2006). Aufgrund der Vielzahl der Spezies in dieser Arbeit wurde ein speziesspezifisches Präfix für die zu bezeichnenden Ntcps eingeführt: Vor dem jeweiligen Ntcp steht der erste Buchstabe des zoologischen Gattungsnamens als Großbuchstabe vor drei Kleinbuchstaben des zoologischen Artnamens. Zur Verdeutlichung wird nach dieser Nomenklatur das zu NTCP orthologe Protein der Hausmaus (*Mus musculus*) als „MmusNtcp“ bezeichnet.

### 1.1.2 Entdeckung, Lokalisation, physiologische Funktion und Regulation

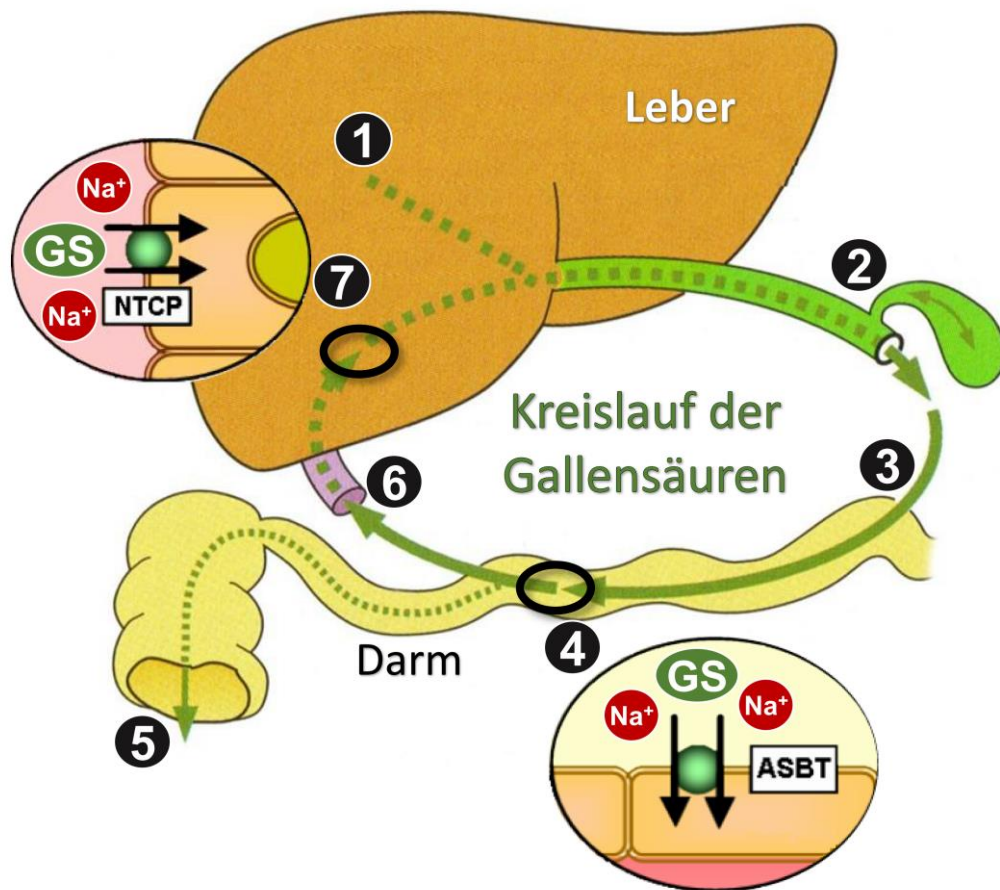
Das Grundprinzip der enterohepatischen Zirkulation der Gallensäuren war bereits zu Beginn des letzten Jahrhunderts bekannt. Auch konnte bereits 1932 die korrekte chemische Struktur der Gallensäuren beschrieben werden (Hofmann & Hagey 2014). Über die Jahrzehnte wurden insbesondere auf dem Gebiet der Membrantransporter große Fortschritte erzielt. 1988 wurden an isolierten Rattenhepatozyten und Membranvesikeln Transportexperimente durchgeführt. Diese wiesen, neben Na<sup>+</sup>-unabhängigen Systemen, auch auf ein bisher unbekanntes, Na<sup>+</sup>-abhängiges Transportsystem für die Aufnahme der Gallensäuren in die Zellen bzw. Vesikel hin, welches mit den damaligen Methoden jedoch nicht näher identifiziert werden konnte (Frimmer & Ziegler 1988). Über Expressionsklonierung von mRNA aus Rattenlebern und anschließender Expression in *Xenopus laevis* Oozyten gelang die Identifizierung des Ntcp von *Rattus norvegicus* als Na<sup>+</sup>-abhängiger Gallensäuretransporter (Hagenbuch et al. 1991). Wenige Jahre später konnte auf Grundlage dieser Daten ebenso das humane NTCP als Na<sup>+</sup>-abhängiger Gallensäuretransporter bestätigt werden (Hagenbuch et al. 1994), worauf die Ntcp weiterer Spezies folgten.

NTCP/Ntcp wird prädominant in Hepatozyten exprimiert (Ananthanarayanan et al. 1994, Stieger et al. 1994). Hepatozyten sind polarisierte Zellen, an welchen drei verschiedene Membranregionen unterschieden werden. Die laterale Region bildet eine dichte Verbindung zu den benachbarten Hepatozyten durch *tight junctions*; dies verhindert den parazellulären Stofftransport. Die Hepatozyten selbst in Kombination mit ihren *tight junctions* zueinander bilden so die Barriere zwischen den Gallenkanälchen und den Lebersinusoiden. Diese Barriere wäre ohne Transportsysteme für die meisten Moleküle weitestgehend undurchlässig. Die den Gallenkanälchen zugewandte Membranfläche wird als apikale, die dem Disse'schen Raum zugewandte Membranfläche als basolaterale Membran bezeichnet. NTCP wird *in vivo* in die basolaterale, dem Blut direkt zugewandte Membran der Hepatozyten sortiert (Ananthanarayanan et al. 1994, Stieger et al. 1994).

Der Na<sup>+</sup>-abhängige Transport von Gallensäuren durch NTCP nutzt den physiologischen Na<sup>+</sup>-Gradienten von extrazellulär nach intrazellulär. Durch diesen sekundär aktiven Transport können Gallensäuren sehr effizient aus dem Blut in die Hepatozyten aufgenommen, bzw. gegenüber der Konzentration im Portalblut intrazellulär aufkonzentriert werden, um von dort aus wieder in die Galle ausgeschieden zu werden. Die Stöchiometrie des NTCP-vermittelten Aufnahmetransportes wurde auf zwei Na<sup>+</sup>-Ionen gemeinsam mit einem Molekül Gallensäure



ermittelt; dies bedeutet bei einfacher negativer Ladung der Gallensäuren eine Ladungsverschiebung von einer positiven Ladung nach intrazellulär pro Transportvorgang, dieser ist somit elektrogen (Weinman et al. 1997).



**Abbildung 1 - Die enterohepatische Zirkulation der Gallensäuren**

Diese Abbildung verdeutlicht schematisch den Ablauf der enterohepatischen Zirkulation der Gallensäuren: Die Neusynthese von Gallensäuren findet unter hohem Energieaufwand in Hepatozyten in der Leber statt (1). Die Hepatozyten geben die Gallensäuren (GS) in die Gallekanälchen ab, welche in die Gallenblase münden, die als Zwischenspeicher für die Gallenflüssigkeit dient (2). Bei Nahrungsaufnahme wird Gallenflüssigkeit nach Bedarf in den Dünndarm abgegeben (3), um dort ihre Funktion als Emulgator zu erfüllen. Weiter distal im Darmkanal dient ASBT dazu, überschüssige und teilweise durch Bakterien konjugierte Gallensäuren aus dem Darmlumen zu reabsorbieren, um die Ausscheidung der energetisch wertvollen Gallensäuren mit den Faeces zu verhindern (4). Ein geringer Teil der Gallensäuren wird jedoch dennoch mit den Faeces ausgeschieden (5), geht so dem Organismus verloren und muss durch Neusynthese ersetzt werden. Mit dem Blut in der Portalvene gelangen die Gallensäuren aus dem Darm wieder zur Leber (6). Hier werden sie hauptsächlich durch NTCP aus dem Blut wieder in die Hepatozyten importiert und können so erneut am Kreislauf teilnehmen (7).

Bekannte physiologische Substrate von NTCP sind Gallensäuren sowohl in ihrer unkonjugierten als auch in ihrer taurin- und glycinkonjugierten Form (Hagenbuch et al. 1991, Kramer et al. 1999). In dieser Arbeit wird generell der Begriff Gallensäure verwendet. Gallensäuren liegen jedoch physiologisch zu einem gewissen Teil ionisiert vor. Unkonjugierte Gallensäuren haben etwa einen  $pK_s$ -Wert von 5, konjugierte Gallensäuren jedoch von bis zu 2. Dies bedeutet, dass sie bei physiologischem pH-Wert tatsächlich nahezu vollständig ionisiert vorliegen und man deshalb auch von Gallensalzen spricht (Hofmann & Hagey 2008).

Darüber hinaus wurde auch der Transport von sulfatierten Gallensäuren, Steroidsulfaten und freien sowie konjugierten Jodthyroninen via NTCP beschrieben (Kramer et al. 1999, Friesema et al. 1999).

Die Regulation von NTCP im Allgemeinen ist noch lückenhaft erforscht. Es ist bekannt, dass Gallensäuren direkt an manche Kernrezeptoren binden können. So zum Beispiel an den *Farnesoid X Receptor* (FXR), welcher unmittelbar Einfluss auf die NTCP-Expression nehmen kann. Gallensäuren können aber auch indirekt den *Retinoic Acid Receptor* (RAR) aktivieren, was sich wiederum auf die NTCP-Expression auswirken kann (Kullak-Ublick et al. 2004). Kernrezeptoren sind allerdings als Langzeitregulatoren anzusehen, da die Menge der gebildeten mRNA sich zeitlich nicht unmittelbar auf die Funktion des Transportproteins in der Plasmamembran auswirkt, sondern erst nach einer zeitlichen Latenz.

Die Kurzzeitregulation des Transportproteins hingegen findet vermutlich durch eine für die Zelle sehr kurzfristig regelbare Sortierung des NTCPs zwischen Speichervesikeln, basolateraler Membran und Lysosomen statt. Dies könnte potenziell über eine Vielzahl von Regelkreisen geschehen. Sowohl Kurzzeit- als auch Langzeitregulation der NTCP-Sortierung bzw. -Produktion stehen in einem komplexen Zusammenhang mit der Gallensäurehomöostase (Trauner et al. 2003, Trauner et al. 2005)

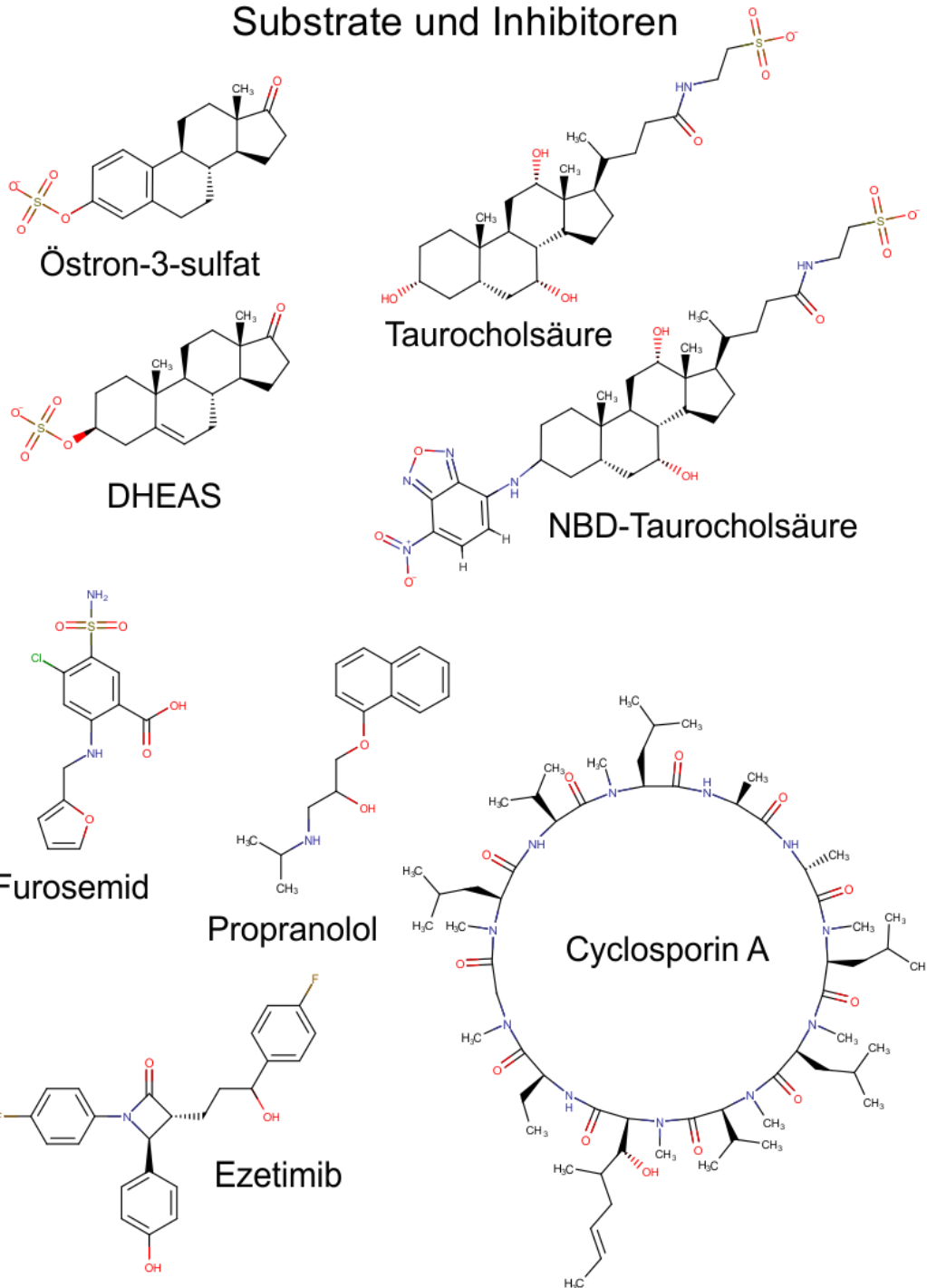
Es wird diskutiert, dass NTCP innerhalb der Membran in so genannte *membrane rafts* sortiert wird. Diese Regionen der Membran sind speziell zusammengesetzt und sollen unter anderem eine erhöhte Konzentration an Cholesterin aufweisen, was möglicherweise Auswirkungen auf die darin enthaltenen Proteine und deren Funktion hat (Molina et al. 2008).

Es wurde gezeigt, dass NTCP als Homodimer in die Plasmamembran inseriert wird, das heißt, zwei NTCP Moleküle scheinen gemeinsam transloziert zu werden, bilden aber wahrscheinlich keine funktionelle Einheit, sondern sind jeweils voneinander unabhängig aktiv (Bijmans et al. 2002).

Es ist bekannt, dass Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung des NTCPs dessen Membransortierung unmittelbar beeinflusst (Anwer & Stieger 2014). Auch ist bekannt, dass ein Eingreifen in die N-Glykosylierung am N-Terminus des NTCPs zu einer massiven Veränderung in der Membranlokalisation des NTCP führt (Appelman et al. 2017).

Weiterhin können immunologische Reize Einfluss auf die Regulation von NTCP/Ntcp haben. So führte in Nagern eine Verabreichung von Lipopolysaccharid, Tumor-Nekrose-Faktor-alpha oder Interleukin-1-beta zu verringerten mRNA-Mengen von NTCP im Vergleich zur Kontrolle. Interleukin-6 hingegen verminderte die hepatische Aufnahme von Taurocholat, ohne die Menge der mRNA von NTCP zu beeinflussen, was auf eine direkte Beeinflussung der Membransortierung hinweist (Kullak-Ublick et al. 2004).

## NTCP Substrate und Inhibitoren



### 1.1.3 Bekannte Substrate und Inhibitoren

#### Abbildung 2 - NTCP Substrate und Inhibitoren

Zweidimensionale Darstellung der chemischen Struktur bekannter Substrate und Inhibitoren von NTCP. Den Substraten ist die Grundstruktur des Steroidgerüsts gemein.

Substrate: Östron-3-sulfat (PubChem CID: 3001028), Taurocholsäure (PubChem CID: 6675), Dehydroepiandrosteron-sulfate (DHEAS, PubChem CID: 12594), 7-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD, PubChem CID: 25043) gekoppelt an Taurocholsäure (PubChem CID: 6675) abgekürzt mit NBD-TC.

Inhibitoren: Furosemid (PubChem CID: 3440), Propranolol (PubChem CID: 4946), Ezetimib (PubChem CID: 150311), Cyclosporin A (PubChem CID: 5284373)

Neben den oben bereits beschriebenen bekannten physiologischen Substraten von NTCP, den Gallensäuren, gibt es eine Vielzahl bekannter Substanzen, die mit NTCP bzw. dessen Transportmechanismus interagieren oder auch selbst von diesem transportiert werden. Es konnten Derivate von Gallensäuren entwickelt werden, an deren Grundgerüst erhebliche Modifikationen angebracht wurden. So entstanden zum einen sehr potente Inhibitoren, z.B. Gallensäuren-Dimere und -Trimere, aber auch Substrate wie z.B. das 4-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole-Taurocholat (NBD-TC) als nützliches, fluoreszenzmarkiertes Gallensäurederivat (Petzinger et al. 1999).

Neben den typischen Gallensäuren transportiert NTCP zum Beispiel auch Östron-3-sulfat und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS). Als Inhibitoren wirken eine Vielzahl von Stoffen, unter anderem auch zugelassene Arzneimittel, so beispielsweise Furosemid, Propranolol und Cyclosporin A (Geyer et al. 2006, Döring et al. 2012).

Zur Verdeutlichung der strukturellen Vielfalt der Substrate und Inhibitoren wurde eine Auswahl in Abbildung 2 dargestellt.

#### **1.1.4 Genetische Abweichungen in der Population**

Wie oben bereits beschrieben, ist NTCP nicht das einzige System der Leberzellen um Gallensäuren aus dem Blut aufzunehmen. Evolutionär vermutlich älter, aber weniger effizient ist die Aufnahme durch so genannte „Organic Anion Transporting Polypeptides“ (OATPs) (Kullak-Ublick et al. 2004, Geyer et al. 2006), von welchem beim Menschen vor allem OATP1B1, OATP1B3 und OATP2B1 in der Leber zu finden sind (Alam et al. 2018).

In einer Studie mit einer Ntcp-Knockout-Mauslinie zeigten sich insgesamt nur geringe Belastungen. So kam es zu erhöhten Spiegeln unkonjugierter Gallensäuren im Blut einzelner Tiere. Die Studie vermutet eine kompensatorische, verstärkte Expression von Oatp1a4 in der Leber, um den Ntcp-Verlust auszugleichen (Slijepcevic et al. 2015).

Beim Menschen ist bisher keine etablierte Erbkrankheit bekannt, welche auf genetische Fehler im *SLC10A1* Gen zurückzuführen wäre. Allerdings wurde bei einer einzelnen jungen Patientin aufgrund einer homozygoten Mutation im *SLC10A1* Gen eine vollständige, angeborene NTCP- Defizienz nachgewiesen (Vaz et al. 2015). Aufgefallen war die Patientin als Kleinkind mit ungewöhnlich langsamer Entwicklung und erhöhtem Gallensäurespiegel im Plasma. Die Patientin wurde weiter beobachtet und zeigte kontinuierlich erhöhte

Gallensäurespiegel über Jahre hinweg, wobei sich diese etwa seit dem fünften Lebensjahr auf ein konstant sehr hohes Niveau eingependelt zu haben schienen, nachdem sie in den ersten Lebensjahren noch wesentlich höher gelegen hatten. Die Patientin zeigte immer noch eine gewisse Verzögerung in der körperlichen Entwicklung und geringfügige Abweichungen bei typischen Leberbiomarken (Vaz et al. 2017). Insgesamt bestätigen sich in diesem bisherigen Einzelfall die Beobachtungen aus der Ntcp-Knockout-Mauslinie, nämlich, dass eine angeborene NTCP/Ntcp-Defizienz so weit kompensiert werden kann, dass die Individuen die ersten Lebensjahre weitestgehend unbeschadet überstehen. Die weitere Entwicklung der Patientin bleibt jedoch abzuwarten.

In den letzten Jahren rückte NTCP bzw. das *SLC10A1* Gen wieder stärker in das Interesse der Forschung. Der Grund dafür wird weiter unten beschrieben und diskutiert. Dies führte dazu, dass verstärkt Untersuchungen über die Variabilität des Gens durchgeführt wurden und werden, insbesondere in der chinesischen Bevölkerung, welche jedoch bisher zu keinen ungewöhnlichen Ergebnissen in Bezug auf den Gallensäuretransport, vergleichbar mit der Fallbeschreibung oben, geführt haben (Wang et al. 2017).

### **1.1.5 3D-Proteinmodell und Homologie-Modellierung**

Die Darstellung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins liefert häufig einen Durchbruch im Verständnis der molekularen Funktion. Bisher wurden über Kristallisation und Röntgenbeugungsstudien jedoch hauptsächlich lösliche Proteine untersucht. Dies liegt darin begründet, dass ein lösliches Protein sich in wässriger Lösung aufreinigen und aufkonzentrieren lässt und anschließend in seiner nativen Struktur durch Entzug des Lösungsmittels auskristallisiert. Der entstandene Monokristall kann dann analysiert werden. Für Membrantransporter von Säugetieren kommen hier jedoch zwei erschwerende Faktoren hinzu: Erstens werden Membranproteine von Säugetieren häufig posttranslational modifiziert, so auch NTCP, welcher wie oben beschrieben N-glykosyliert wird. Diese Modifikationen erhöhen die Komplexität und Variabilität der Struktur, was die Analyse der gewonnenen Daten erheblich erschweren kann und unter Umständen auch schon die Kristallbildung selbst negativ beeinflusst. Zweitens sind Membranproteine von Säugetieren komplexe Strukturen, welche in der Regel mehrfach die Membran penetrieren und für eine korrekte, biologisch aktive Faltung auf diverse Helferproteine angewiesen sind. Für eine erfolgreiche Kristallstrukturanalyse sind aber vergleichsweise große Mengen möglichst reinen Proteins erforderlich. Dies wird normalerweise dadurch erreicht, dass das zu analysierende Protein in

Bakterien rekombinant exprimiert wird, da sich durch Überexpression in Bakterien im Vergleich zu eukaryotischen Zellen wesentlich mehr reines Protein gewinnen lässt. Dies gelingt bei wasserlöslichen Proteinen häufig besser als bei Membranproteinen. Allerdings verfügen Bakterien nicht über die entsprechenden, den Säugerzellen eigenen, Faltungshelferproteine und die Maschinerie zur posttranslationalen Modifikation.

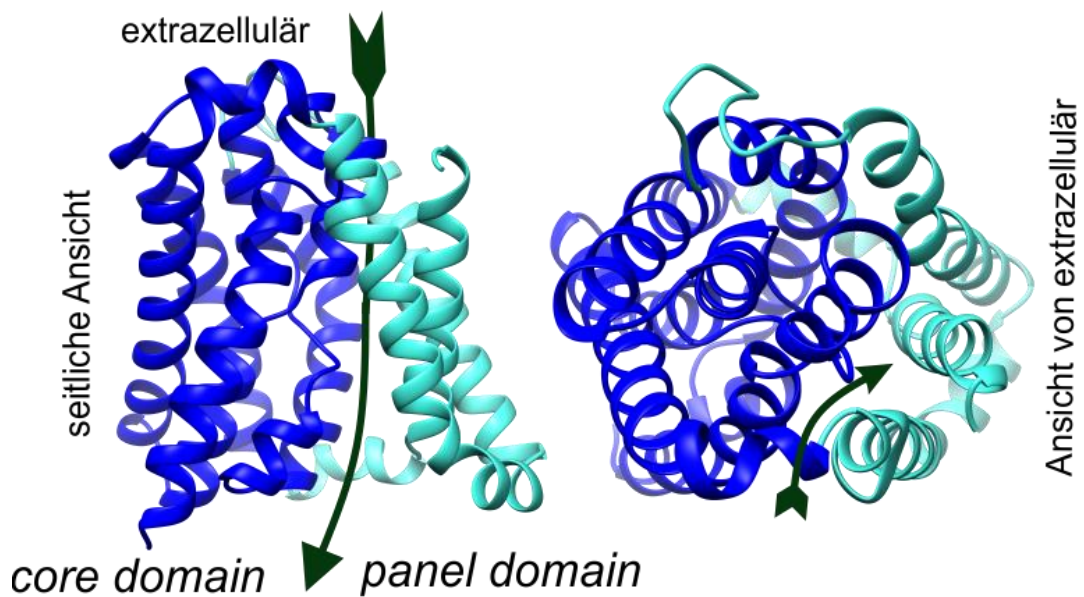
Deshalb ist es bislang noch nicht gelungen, NTCP in seiner nativen Form auszukristallisieren und damit einer Strukturaufklärung zugänglich zu machen. Jedoch gelang es 2012, ein bakterielles Homolog zum strukturell nahe verwandten ASBT zu kristallisieren, den so genannten ASBT<sub>NM</sub> aus *Neisseria meningitidis* (Hu et al. 2011).

Die ermittelte Kristallstruktur kann nun auch als Vorlage für die Homologie-Modellierung der Struktur des humanen ASBT und auch des humanen NTCP dienen. In weiteren Analysen dieser Struktur wurde auch ein Mechanismus für den Transport der Gallensäuren durch die Transporter postuliert. Das Protein wäre hiernach zunächst in einer Konformation, welche die mögliche Bindetasche für die Substrate nach extrazellulär exponiert. Nach der Substratbindung würde eine Konformationsänderung stattfinden, die zu einem Zustand führt, welcher das vorher gebundene Substrat nach intrazellulär exponiert, sodass dieses gemeinsam mit den Natriumionen abdiffundieren kann. Anschließend würde das Protein wieder in seine Ausgangskonformation zurückkehren und wäre wieder bereit für eine erneute Substratbindung (Zhou et al. 2014).

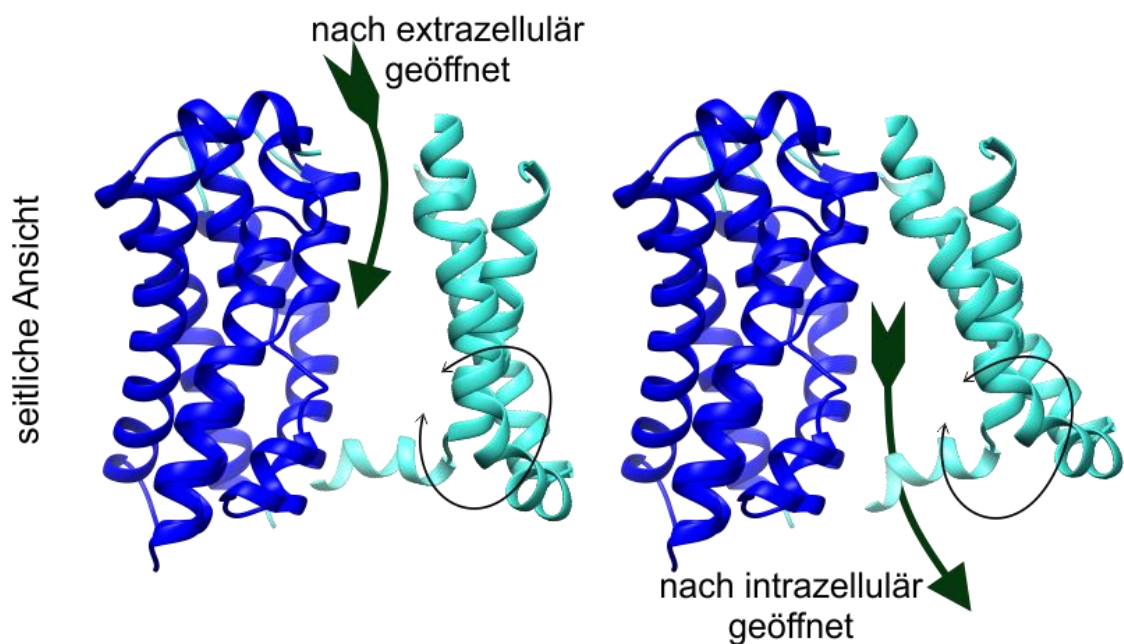
Das 3D-Homologiemodell von NTCP wird in Abbildung 3 zur Verdeutlichung dargestellt. Die *core domain* ist in dunkelblau und die *panel domain* ist in türkis dargestellt. Der vermutliche Weg der Substrate wird durch einen dunkelgrünen Pfeil verdeutlicht.

Die Substratbindung findet, wie oben beschrieben, vermutlich zunächst zwischen der *core domain* und der *panel domain* statt (Abb. 3 - unten links). Eine Konformationsänderung (schwarzer Pfeil) in Bereichen der *panel domain* führt dann vermutlich zu einem Aufkippen der Bindetasche nach intrazellulär bei gleichzeitigem Verschluss der Tasche nach extrazellulär (Abb. 3 - unten rechts).

## NTCP 3D-Homologiemodell mit wahrscheinlichem Weg der Substrate



## Möglicher Ablauf des Transportprozesses



**Abbildung 3 - 3D-Homologiemodell und möglicher Transportzyklus**

3D-Homologiemodell von NTCP generiert mit SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) auf Basis des Modells von ASBT von *Yersinia frederiksenii* (ASBT<sub>Yf</sub>, PDB 4n7w, 26% Sequenzidentität zu NTCP). Visualisiert und koloriert mit Hilfe von UCSF Chimera. Oben sind zwei Ansichten des erzeugten Modells dargestellt. Die *core domain* ist in dunkelblau und die *panel domain* ist in türkis dargestellt. Unten in der Abbildung wurden die beiden Domänen zur Verdeutlichung des möglichen Transportprozesses horizontal etwas auseinandergezogen. Die dicken schwarzen Pfeile stellen den möglichen Weg der Substrate dar. Die dünnen schwarzen Doppelpfeile stellen die mögliche Drehachse im Transportprozess dar.



## **1.2 Das Hepatitis B Virus (HBV), Hepadnaviren und das Hepatitis Delta Virus (HDV)**

### **1.2.1 Einführung zu Hepadnaviren und dem humanen Hepatitis B Virus (HBV)**

Die Entdeckungsgeschichte von HBV machte den ersten wesentlichen Schritt 1963, als Blumberg das so genannte „Australia Antigen“ im Blut eines australischen Ureinwohners entdeckte (Blumberg et al. 1967). Wenige Jahre später konnte Dane die wirklichen HBV Virionen erstmals elektronenmikroskopisch darstellen (Dane et al. 1970). Die Anfänge und die weitere Entwicklung der bis heute andauernden Geschichte der Erforschung von HBV wurde umfassend von Wolfram Gerlich dargelegt (Gerlich 2013).

HBV ist das Prototypvirus des Genus *Orthohepadnavirus* der Virusfamilie *Hepadnaviridae*. Es sind aktuell zehn Genotypen von HBV bekannt, welche als HBV Genotypen A-J bezeichnet werden (Littlejohn et al. 2016).

HBV ist eines der bedeutendsten humanpathogenen Viren weltweit. Die chronische Infektion mit HBV kann langfristig zu Leberzirrhose und zur Entwicklung hepatozellulärer Karzinome führen. Weltweit führt dies zu mindestens 680.000 Todesfällen jährlich, welche mit einer chronischen HBV Infektion in Kausalzusammenhang gebracht werden (GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators 2015).

### **1.2.2 Weitere Mitglieder der Familie Hepadnaviridae**

Dem Genus *Orthohepadnavirus* werden HBV zugeordnet, die in Säugetieren wie beispielsweise Menschenaffen, Affen, Nagern und Fledermäusen parasitieren. Dem Genus *Avihepadnavirus* hingegen werden Hepatitis B Viren zugeordnet, welche in Vögeln wie Enten und Reiher parasitieren (Littlejohn et al. 2016).

Aus einem Murmeltier (*Marmota monax*) wurde bereits 1982 das entsprechend benannte „Woodchuck Hepatitis Virus“ (WHV) isoliert, sequenziert und den *Orthohepadnaviren* zugeordnet (Galibert et al. 1982).

Erstmals wurde 1998 aus einem Neuweltaffen ein Hepatitis B Virus isoliert, welches hohe genetische Ähnlichkeit mit HBV aufweist und deshalb den *Orthohepadnaviren* zugeordnet wurde. Es handelte sich dabei um den Wollaffen (*Lagothrix lagotricha*), nach welchem das neu isolierte Virus „Woolly Monkey Hepatitis B Virus“ (WMHBV) benannt wurde (Lanford et al. 1998).

Weitere Orthohepadnaviren wurden aus Fledermäusen isoliert. Aus den Altweltspezies *Rhinolophus alcyone* und *Hipposideros ruber* sind dies das „Horseshoe Bat Hepatitis B Virus“ (HBHBV) bzw. das „Roundleaf Bat Hepatitis B Virus“ (RBHBV). Aus der Neuweltfledermaus *Uroderma bilobatum* konnte das entsprechende „Tent-making Bat Hepatitis B Virus“ (TBHBV) isoliert werden (Drexler et al. 2013).

Aus Menschenaffen wie Schimpansen (*Pan spez.*), Orang Utans (*Pongo spez.*) und Gibbons (*Hylobatidae*) wurden mehrfach nahverwandte Orthohepadnaviren isoliert, die in enger genetischer Verwandtschaft zu den Genotypen des Menschen stehen. Es wird vermutet, dass es in der Vergangenheit zu Rekombinationen der verschiedenen Genotypen gekommen ist (Bonvicino et al. 2014). Zum Beispiel wurden aus wildlebenden Schimpansen (*Pan troglodytes verus*) Hepatitis B Viren verschiedener Genotypen isoliert, welche eine sehr hohe Ähnlichkeit zu den menschlichen HBV Genotypen F, E und D aufwiesen. Dahingegen weist zum Beispiel der menschliche Genotyp C wesentlich weniger Übereinstimmungen zu den Isolaten aus Affen, aber auch sehr große evolutionäre Entfernung zu anderen menschlichen Genotypen auf, was darauf hindeutet, dass er sich über längere Zeit separiert von den anderen Genotypen entwickelt haben könnte (MacDonald et al. 2000).

Aufgrund solcher Funde ist die Evolution der Hepatitis B Viren und insbesondere die Frage, wann der Mensch bzw. dessen Vorfahren zuerst in Kontakt mit HBV kamen, Thema wissenschaftlichen Diskurses (Littlejohn et al. 2016).

### **1.2.3 Molekularbiologie der Hepadnaviren am Beispiel HBV**

Die in dieser Arbeit behandelten Orthohepadnaviren sind in ihrer Grundorganisation weitestgehend identisch. Dies gilt insbesondere für die oben beschriebenen Genotypen des menschlichen HBV und der Isolate aus Affen. Deshalb erfolgt die Darlegung des Grundaufbaus und der Organisation am Beispiel des humanen HBV, welches das Prototypvirus der Familie darstellt.

HBV ist ein behülltes DNA Virus. Das Genom besteht aus einer ca. drei Kilobasen (kb) kleinen, partiell doppelsträngigen DNA (dsDNA), welche durch Basenpaarungen an den überlappenden Enden in einem Komplex mit der viralen Polymerase im Virion ringförmig, jedoch nicht kovalent geschlossen vorliegt (Glebe & Bremer 2013). Im Zellkern der Wirtszelle wird aus dieser Vorstufe ein kovalent geschlossener, doppelsträngiger Ring aus DNA gebildet, die so genannte *circular covalently closed DNA* (cccDNA). Diese cccDNA bildet eine Art episomale Dauerform ähnlich der bakterieller Plasmide. Ausgehend von

cccDNA werden *messenger RNAs* (mRNAs) gebildet und aus dem Zellkern exportiert, die als Vorlagen für die Synthese der viralen Proteine dienen (Seeger & Mason 2015). Die Vervielfältigung des viralen Genoms erfolgt mittels einer prägenomischen RNA, welche sich im Zytoplasma mit viralen Kapsid-Proteinen (*core proteins*), der viralen Polymerase und verschiedenen zellulären Proteinen zu einem unreifen Kapsid formiert. Innerhalb dieser unreifen Kapside kommt es durch die virale Polymerase zur reversen Transkription der prägenomischen RNA zur viralen DNA und somit zur so genannten Reifung des viralen Genoms. Durch Reimport von gereiften Kapsiden in den Zellkern kann es durch den oben beschriebenen Zyklus zu einer Erweiterung des Bestandes an episomalen cccDNAs im Kern der Wirtszelle kommen. Alternativ wird das Kapsid im Zytoplasma in virale Hüllproteine verpackt, um als vollständiges HBV Virion aus der Wirtszelle exportiert zu werden (Glebe & Bremer 2013).

Das beschriebene HBV Genom codiert durch teils überlappende Leseraster unter Kontrolle viraler, aber auch leberspezifischer Promotoren für folgenden Proteine: Die virale Polymerase (Pol), das so genannte „HBx“ Protein (HBx), das so genannte „HBe“ und das „Core“ Kapsidprotein (HBc). Dazu kommen noch die drei Hüllproteine (*hepatitis B surface proteins* (HBs) genannt), welche aus demselben Leseraster stammen. Das größte dieser Hüllproteine wird als *large HBs* (LHBs) bezeichnet und entspricht der *full length* Variante, codiert durch das volle Leseraster. Das zweitgrößte Hüllprotein wird als *middle HBs* (MHBs) und das kleinste Hüllprotein als *small HBs* (SHBs) bezeichnet. Die MHBs und SHBs Proteine unterscheiden sich nicht in ihren c-terminalen Aminosäuresequenzen. Sie sind sozusagen lediglich N-terminal unterschiedlich stark trunke Varianten des LHBs (Glebe & Urban 2007).

Die eigentlichen HBV Virionen bestehen aus einer Lipidmembran, in welche die drei Oberflächenproteine integriert sind und unter dem Kryo-Elektronenmikroskop als sphärische Struktur mit etwa 52 nm Durchmesser in Erscheinung treten. Diese Hülle umschließt das icosahedrale, etwa 36 nm durchmessende Nukleokapsid bestehend aus 240 Kapsidproteinen. Darin befindet sich der oben beschriebene Komplex aus viralem Genom und viraler Polymerase. HBx wird als Nichtstrukturprotein angesehen und wurde bisher nicht in Virionen nachgewiesen. Es dient dem Virus als Regulator bei der Transkription des viralen Genoms in der Wirtszelle (Glebe & Bremer 2013).

Eine große Besonderheit der hepadnaviralen Infektion ist die Bildung so genannter subviraler Partikel (SVP). Diese Partikel, die nur aus den in eine Membran eingebetteten Hüllproteinen

bestehen, enthalten keine Kapside oder viralen Genome. Sie werden in großer Zahl von infizierten Zellen ausgeschieden, kommen sowohl in sphärischer als auch in filamentöser Form vor und dienen vermutlich als eine Art Täuschkörper für das Immunsystem des Wirtes (Glebe & Urban 2007). Eben diese subviralen Partikel waren 1967 das, was von Blumberg als „Australia Antigen“ entdeckt wurden und erschwerten aufgrund ihres massiven Erscheinens im mengenmäßigen Vergleich zu den eigentlichen Virionen die Entdeckung derselben durch Dane wenige Jahre später (Blumberg et al. 1967, Dane et al. 1970).

#### **1.2.4 Das Hepatitis Delta Virus (HDV)**

Das Hepatitis Delta Virus (HDV) stellt aus virologischer Sicht eine Kuriosität dar. Es weist Ähnlichkeiten zu bei Pflanzen parasitierenden, so genannten Viroiden auf, steht jedoch unter den Viren, die das Tierreich befallen, bisher völlig allein. Deshalb stellt es das Prototypvirus seines eigenen Genus Deltavirus dar. Es ist ein RNA Virus, welches für die Replikation seines 1,7 kb kleinen Genoms die RNA Polymerase der Wirtszelle nutzt, also selbst nicht für eine Polymerase codiert. Es codiert lediglich für zwei Proteine: das *large hepatitis delta antigen* (IHDAg) und das *small hepatitis delta antigen* (sHDAg). Allerdings fehlt HDV neben einer eigenen Polymerase auch das Rüstzeug zur selbstständigen Bildung von Virionen; es codiert keine eigenen Hüllproteine. HDV bedient sich in mit HBV koinfizierten Hepatozyten der Hüllproteine von HBV für seine Verpackung, deshalb wird es auch als Satellitenvirus von HBV bezeichnet. Prinzipiell ist es also nicht nur Parasit der Wirtszelle, sondern gleichzeitig auch von HBV (Sureau & Negro 2016).

Diese erstaunlichen Funktionen erreicht HDV, wie bereits erwähnt, mit lediglich zwei codierten Proteinen. Das sHDAg ist hierbei insbesondere als Cofaktor für die Replikation des Genoms durch die Wirtspolymerase entscheidend. Dem IHDAg hingegen wird vor allem eine Funktion als Stabilisator des RNA Genoms zugesprochen. Zudem vermittelt es den Vorgang der Verpackung des HDV Genoms in HBV Hüllproteine. Neben den beiden Proteinen ist jedoch das RNA Genom selbst von entscheidender Bedeutung: Es dient nicht nur als Informationsspeicher für die Proteincodierung, sondern erfüllt selbst einige Funktionen. HDV RNA enthält beispielsweise Sequenzen, welche Strukturen ausbilden, die in der Lage sind, den RNA Strang, auf dem sie sich selbst befinden, zu schneiden (s.g. „*self-cleaving RNA sequences*“). Diese Strukturen werden auch als HDV Ribozyme bezeichnet (Alfaiate et al. 2015). Der Begriff „Ribozym“ meint komplexe Moleküle, die aus Nucleinsäuren aufgebaut sind und biochemische Reaktionen katalysieren können. Wegen der Ähnlichkeit zu der

Funktionsweise der bekannten Enzyme, welche aus Aminosäuren aufgebaut sind, wurde die Bezeichnung „*ribozyme*“ aus „*ribonucleic acid enzyme*“ zusammengesetzt.

### **1.2.5 Prävalenz und Pathogenese von HBV und HDV Infektionen**

Die Prävalenz von HBV reicht von ca. sechs Prozent in Afrika und Ozeanien, über zwei bis drei Prozent in Südostasien und dem Mittleren Osten bis hin zu unter zwei Prozent in Zentraleuropa und Nordamerika. Dies bedeutet, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit weltweit über 200 Millionen Menschen chronisch mit HBV infiziert sind (Ott et al. 2012, WHO Global Hepatitis Report 2017).

Da HDV auf eine bestehende oder eine Koinfektion mit HBV angewiesen ist, steht die Prävalenz der globalen Infektionen mit HDV in direktem Zusammenhang mit der Prävalenz von HBV (Alfaiate et al. 2015). Es wird angenommen, dass circa fünf Prozent der HBV-Infizierten auch mit HDV koinfiziert sind. Es gibt jedoch regional erhebliche Unterschiede, so wird die Koinfektionsrate in der Mongolei auf bis zu 60 Prozent geschätzt (Alfaiate et al. 2015, WHO Global Hepatitis Report 2017).

HBV scheint nicht zytopathogen zu sein, ein ausgeprägter zytolytischer Effekt, wie er bei vielen anderen Viren vorhanden ist, ist für HBV nicht bekannt. Es kann zu einer transienten Infektion kommen, die klinisch weitestgehend oder völlig inapparent verläuft. Auch ein Großteil der chronischen HBV Infektionen bleibt lange Zeit ohne klinische Symptome. Es kommt in seltenen Fällen auch bei chronischen Infektionen zur Ausheilung, allerdings kann die cccDNA für lange Zeit klinisch unbemerkt persistieren. Das Virus scheint so gut an seinen Wirt angepasst zu sein, dass es viele Jahre in der Leber persistieren kann, ohne eliminiert zu werden.

Die seltenen Fälle akuter Hepatitis verursacht durch HBV Infektion sind auf eine starke Reaktion des Immunsystems zurückzuführen, welche zu massiven immunvermittelten Leberzelluntergängen führt. Die chronische Pathogenese wird einerseits auf eine anhaltende, latente Aktivierung des Immunsystems in der Leber zurückgeführt. Diese führt dauerhaft zur Erhöhung von Zelluntergang und Zellteilung. Derartige dauerhafte Belastungen für Gewebe werden im Allgemeinen als fördernd auf die Tumorentstehung angesehen. Insbesondere in Kombination mit anderen Noxen (so zum Beispiel bei Alkoholikern) wird die Leber dabei stark belastet. Andererseits kommt es in infizierten Zellen häufig zur Integration von HBV-DNA in das Genom der Wirtszellen, was eine stark onkogene Wirkung haben kann (Seeger et al. 2015).

Wird ein chronisch HBV Infizierter mit HDV superinfiziert, kommt es zeitweise zu einer Unterdrückung der typischen Marker für HBV in Leber und Serum des Patienten. HDV

scheint sein Wirtsvirus hierbei in einer akuten Phase erfolgreich zu unterdrücken (Sureau & Negro 2016).

Die Pathogenesen von HDV und HBV sind nicht trennbar voneinander, da eine Monoinfektion mit HDV in der Natur nicht vorkommt. Die klinischen Auswirkungen einer Koinfektion aus HBV und HDV können somit nur gemeinsam betrachtet werden und eine kausale Rückführung auf nur eines der beiden Viren ist im Allgemeinen nicht möglich. Generell sind bei HBV/HDV-Koinfektionen alle Abstufungen von asymptomatisch bis hin zu fulminanter Hepatitis möglich. Die klinisch symptomatische Unterscheidung zwischen einer akuten Hepatitis B und einer Hepatitis D ist nicht möglich. Generell gilt, dass Koinfektionen verstärkt zu Symptomen führen und wesentlich häufiger zur Zirrhose fortschreiten. Durch HDV selbst bzw. seine Unterdrückungen der Funktionen von HBV kommt es im Vergleich zu einer Monoinfektion mit HBV zu einer erhöhten immunologischen Reaktion in der Leber, wodurch die verstärkten Symptome zu erklären sind. Diese verstärkte Reaktion des Immunsystems des Patienten auf eine HBV/HDV-Koinfektion, im Vergleich zu einer HBV Monoinfektion, ist letztendlich der Grund für die wesentlich schlechtere Prognose der Patienten unter Koinfektion (Sureau und Negro 2016).

### **1.3 NTCP als Rezeptor für HBV und HDV**

#### **1.3.1 Vorgeschichte**

Für HBV machte die Forschung in den ersten Jahren des einundzwanzigsten Jahrhunderts große Fortschritte. 2001 konnte gezeigt werden, dass die hohe Spezifität des HBV auf einen kleinen Abschnitt im N-terminalen Bereich des LHD<sub>Ag</sub> zurückzuführen ist (Chouteau et al. 2001). In den folgenden Jahren konnte diese Region genau charakterisiert werden und so wurde die preS1-Region als entscheidende Struktur der HBV Virionen für die Invasion der Leberzellen identifiziert (Glebe et al. 2005, Barrera et al. 2005). Trotz der Fortschritte auf Seiten des Virus blieb die exakte Zielstruktur auf Wirtsseite für weitere Jahre unbekannt. Es stand neben primären humanen Hepatozyten weiterhin kein geeignetes *in vitro* Infektionsmodell zur Verfügung, weshalb vielfach auf primäre *Tupaia belangeri* Hepatozyten zugegriffen wurde, welche sich ebenfalls mit HBV infizieren lassen (Gerlich 2013).

### 1.3.2 Entdeckung von NTCP als Rezeptor für HBV

Nachdem 1963 Baruch S. Blumberg auf der Suche nach dem infektiösen Agens von HBV zum ersten Mal öffentlich von der Entdeckung des „Australia antigens“ berichtete, verging nahezu ein halbes Jahrhundert, bis die Gruppe um Wenhui Li im Jahr 2012 NTCP als funktionellen Rezeptor für HBV beschreiben konnte (Gerlich 2013, Yan et al. 2012).

In der initialen Veröffentlichung wurde bereits gezeigt, dass NTCP sowohl für HBV als auch für HDV als Eintrittsrezeptor dient und Hepatomzelllinien durch Transfektion mit NTCP suszeptibel für HBV und HDV Infektionen gemacht werden können, so zum Beispiel für Huh7 Zellen. Auch wurde gezeigt, dass die endogenen Expressionslevel von NTCP mRNA in den untersuchten Hepatomzelllinien im Vergleich zu primären Leberzellen verschwindend gering waren, was erklärt, warum diese bis dahin nicht hatten infiziert werden können (Yan et al. 2012). Des Weiteren konnte bereits eine entscheidende Region im NTCP für die Bindung von HBV und HDV identifiziert werden, nämlich der Bereich von Aminosäure 157 bis 165. Wurde dieser Bereich im humanen NTCP durch die Aminosäuren aus dem Ntcp von *Macaca fascicularis* ersetzt, konnte durch diese NTCP/Ntcp-Chimäre keine Infektion mehr vermittelt werden (Yan et al. 2012). Die Ergebnisse dieser Studie wurden durch die Arbeitsgruppe von Stefan Urban in Heidelberg bestätigt, welche außerdem noch eine zweite entscheidende Region im NTCP entdeckte. Der Ntcp aus *Mus musculus* konnte zwar das virale preS1-Peptid binden, vermittelte jedoch keine Infektion. Durch Ersetzen der Aminosäuren 84 bis 87 durch die des humanen NTCP hat das so modifizierte Ntcp der Maus HBV/HDV Rezeptorfunktion erlangt (Ni et al. 2014).

Im Vorfeld dieser Arbeit konnten die Ergebnisse der Entdecker auch durch eine Studie unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden. Der Fokus dieser Arbeit erweiterte die Thematik jedoch wesentlich um die eigentliche, physiologische Funktion des NTCP als Gallensäuretransporter. Unter anderem konnte durch Dr. Alexander König und Dr. Barbara Döring gezeigt werden, dass die Bindung des preS1-Peptides mit einer Vielzahl physiologischer Gallensäuren interagiert und, dass Gallensäuren die Infektion von Zellen mit HBV/HDV inhibieren können. Damit wurde eine Interaktion zwischen Gallensäure-Transportfunktion und HBV/HDV-Rezeptorfunktion von NTCP gezeigt. Eine Inhibition von NTCP mit Derivaten des preS1-Peptides als therapeutischer Ansatz birgt damit das Risiko, die enterohepatische Zirkulation von Gallensäuren und damit die Gallensäurehomöostase zu beeinträchtigen. Auch konnte durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass bekannte



Substanzen, die den Gallensäuretransport durch NTCP hemmen, auch in der Lage waren, die Infektion mit HBV und HDV zu blockieren (König et al. 2014).

### **1.3.3 Mögliche HBV Therapie durch Inhibition der Bindung an NTCP**

Wie oben bereits erwähnt, existierte bereits zu Beginn dieser Arbeit das therapeutische Konzept, den HBV/HDV-Viruseintritt durch Inhibition des NTCP zu erreichen. Dieses Konzept wurde sogar bereits verfolgt, bevor NTCP als der eigentliche Rezeptor identifiziert wurde, aus pharmakologischer Sicht sozusagen noch bevor der *mode-of-action* aufgeklärt wurde. Der Einsatz von Peptiden, die sich aus dem LHBsAg ableiten wurde bereits 2008 in einer *in vivo* Studie erfolgreich getestet (Petersen et al. 2008). Aufgrund der oben beschriebenen Interaktion der Transport- und Rezeptorfunktion des NTCP stellt sich jedoch die Frage, ob die Entwicklung eines *HBV/HDV entry inhibitors* durch NTCP-Blockade ohne eine wesentliche Beeinträchtigung der Gallensäurehomöostase überhaupt möglich ist (König et al. 2014).

## 2 Publikationen

Dieser kumulativen Arbeit liegen folgende Veröffentlichungen zu Grunde:

### 2.1 Publikation I

#### 2.1.1 „A novel hepatitis B virus species discovered in capuchin monkeys sheds new light on the evolution of primate hepadnaviruses.”

de Carvalho Dominguez Souza BF, König A, Rasche A, de Oliveira Carneiro I, Stephan N, Corman VM, Roppert PL, Goldmann N, Kepper R, Müller SF, Völker C, de Souza AJS, Gomes-Gouvêa MS, Moreira-Soto A, Stöcker A, Nassal M, Franke CR, Rebello Pinho JR, Soares MDCP, Geyer J, Lemey P, Drosten C, Netto EM, Glebe D, Drexler JF

**J Hepatol. 2018 Jun;68(6):1114-1122. doi: 10.1016/j.jhep.2018.01.029. Epub 2018 Feb 8**

#### **Abstract:**

**BACKGROUND & AIMS:** All known hepatitis B virus (HBV) genotypes occur in humans and hominoid Old World non-human primates (NHPs). The divergent woolly monkey HBV (WMHBV) forms another orthohepadnavirus species. The evolutionary origins of HBV are unclear.

**METHODS:** We analysed sera from 124 Brazilian monkeys collected during 2012-2016 for hepadnaviruses using molecular and serological tools, and conducted evolutionary analyses.

**RESULTS:** We identified a novel orthohepadnavirus species in capuchin monkeys (capuchin monkey hepatitis B virus [CMHBV]). We found CMHBV-specific antibodies in five animals and high CMHBV concentrations in one animal. Non-inflammatory, probably chronic infection was consistent with an intact preCore domain, low genetic variability, core deletions in deep sequencing, and no elevated liver enzymes. Cross-reactivity of antisera against surface antigens suggested antigenic relatedness of HBV, CMHBV, and WMHBV. Infection-determining CMHBV surface peptides bound to the human HBV receptor (human sodium taurocholate co-transporting polypeptide), but preferentially interacted with the capuchin monkey receptor homologue. CMHBV and WMHBV pseudotypes infected human hepatoma cells via the human sodium taurocholate co-transporting polypeptide, and were poorly neutralised by HBV vaccine-derived antibodies, suggesting that cross-species infections may be possible. Ancestral state reconstructions and sequence distance comparisons associated HBV with humans, whereas primate hepadnaviruses as a whole were projected to NHP

ancestors. Co-phylogenetic analyses yielded evidence for co-speciation of hepadnaviruses and New World NHP. Bayesian hypothesis testing yielded strong support for an association of the HBV stem lineage with hominoid ancestors. Neither CMHBV nor WMHBV was likely the ancestor of the divergent human HBV genotypes F/H found in American natives.

**CONCLUSIONS:** Our data suggest ancestral co-speciation of hepadnaviruses and NHP, and an Old World origin of the divergent HBV genotypes F/H. The identification of a novel primate hepadnavirus offers new perspectives for urgently needed animal models of chronic hepatitis B.

### **2.1.2 Darstellung Eigenanteil an Publikation I**

Bei der Publikation „A novel hepatitis B virus species discovered in capuchin monkeys sheds new light on the evolution of primate hepadnaviruses” (J Hepatol. 2018 Jun;68(6):1114-1122. doi: 10.1016/j.jhep.2018.01.029. Epub 2018 Feb 8) war der Autor dieser Dissertation als Coautor beteiligt. Der Eigenanteil des Autors entspricht dieser Darstellung aus der Veröffentlichung:

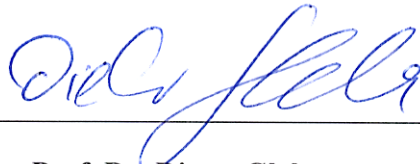
**Authors’ contributions:** B.F.C.D.S., A.K., A.R.: acquisition, analysis, and interpretation of data. I.D.O.C.: design and execution of field work. V.M.C., N.S.,P.L.R., N.G., R.K., S.F.M., C.V., A.M.S., A.J.S.D.S., M.S.G.G., A.S., M.N., C.R.F., J.R.R.P., M.D.C.P.S., J.G., P.L., C.D., E.M.N.: acquisition and analysis of data. D.G., J.F.D.: study concept, design, and supervision, and writing of the article.

#### **Zur Erläuterung:**

Durch den Autor wurden Experimente geplant, beschrieben, durchgeführt, statistisch analysiert und grafisch aufgearbeitet, welche den NTCP/Ntcp von Mensch und Kapuzineraffe im Gallensäuretransportassay verglichen und die Affinität des preS1-Peptides von CMHBV zu den beiden Rezeptoren analysierten. Auf Basis dieser Experimente wurden durch den Autor die Abbildungen 3D und 3E erstellt.

### **2.1.3 Bescheinigung der Richtigkeit der Angaben in 2.1.2 durch den Seniorautor**

Da die *authors' contributions* bereits bei Publikation der Arbeit von allen Autoren bestätigt wurden, wird hier auf eine Unterschrift aller Coautoren verzichtet. Stellvertretend bescheinigt hier der Seniorautor Prof. Dr. Dieter Glebe Herrn Simon Franz Müller den unter 2.1.2 aufgeführten Eigenanteil an der Publikation.



---

**Prof. Dr. Dieter Glebe**

Institute of Medical Virology

National Reference Center for Hepatitis B and D Viruses

Biomedical Research Center Seltersberg

Justus Liebig University, Giessen, Germany

## 2.2 Publikation II

### 2.2.1 “Characterisation of the hepatitis B virus cross-species transmission pattern via Na<sup>+</sup>/taurocholate co-transporting polypeptides from 11 New World and Old World primate species“

Müller SF, König A, Döring B, Glebe D, Geyer J

**PLoS One. 2018 Jun 18;13(6):e0199200. doi: 10.1371/journal.pone.0199200.eCollection 2018**

#### **Abstract:**

The hepatic Na<sup>+</sup>/taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP in man, Ntcp in animals) is the high-affinity receptor for the hepatitis B (HBV) and hepatitis D (HDV) viruses. Species barriers for human HBV/HDV within the order Primates were previously attributed to Ntcp sequence variations that disable virus-receptor interaction. However, only a limited number of primate Ntcps have been analysed so far. In the present study, a total of 11 Ntcps from apes, Old and New World monkeys were cloned and expressed in vitro to characterise their interaction with HBV and HDV. All Ntcps showed intact bile salt transport. Human NTCP as well as the Ntcps from the great apes chimpanzee and orangutan showed transport-competing binding of HBV derived myr-preS1-peptides. In contrast, all six Ntcps from the group of Old World monkeys were insensitive to HBV myr-preS1-peptide binding and HBV/HDV infection. This is basically predetermined by the amino acid arginine at position 158 of all studied Old World monkey Ntcps. An exchange from arginine to glycine (as present in humans and great apes) at this position (R158G) alone was sufficient to achieve full transport-competing HBV myr-preS1-peptide binding and susceptibility for HBV/HDV infection. New World monkey Ntcps showed higher sequence heterogeneity, but in two cases with 158G showed transport-competing HBV myr-preS1-peptide binding, and in one case (*Saimiri sciureus*) even susceptibility for HBV/HDV infection. In conclusion, amino acid position 158 of NTCP/Ntcp is sufficient to discriminate between the HBV/HDV susceptible group of humans and great apes (158G) and the non-susceptible group of Old World monkeys (158R). In the case of the phylogenetically more distant New World monkey Ntcps amino acid 158 plays a significant, but not exclusive role.

### 2.2.2 Darstellung Eigenanteil an Publikation II

Bei der Publikation “Characterisation of the hepatitis B virus cross-species transmission pattern via Na<sup>+</sup>/taurocholate co-transporting polypeptides from 11 New World and Old World primate species“ (PLoS One. 2018 Jun 18;13(6):e0199200. doi: 10.1371/journal.pone.0199200. eCollection 2018.) war der Autor dieser Dissertation der Erstautor und führte nach Einführung in die experimentellen Methoden durch Dr. Barbara Döring und Dr. Alexander König alle wesentlichen Experimente für die Publikation weitestgehend selbstständig durch. Auch wurden die Methoden durch den Autor zunächst optimiert oder teils neu etabliert. Der Eigenanteil des Autors entspricht dieser Darstellung aus der Veröffentlichung:

#### **Authors' Contributions:**

Conceptualization: Simon F. Müller, Joachim Geyer.

Formal analysis: Simon F. Müller, Alexander König, Barbara Döring, Dieter Glebe.

Funding acquisition: Dieter Glebe, Joachim Geyer.

Investigation: Simon F. Müller, Alexander König, Barbara Döring.

Methodology: Simon F. Müller, Alexander König, Barbara Döring, Dieter Glebe.

Project administration: Joachim Geyer.

Resources: Dieter Glebe, Joachim Geyer.

Software: Simon F. Müller.

Supervision: Dieter Glebe, Joachim Geyer.

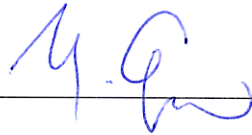
Validation: Simon F. Müller.

Visualization: Simon F. Müller.

Writing – original draft: Simon F. Müller, Joachim Geyer.

### **2.2.3 Bescheinigung der Richtigkeit der Angaben in 2.2.2 durch den Seniorautor**

Da die *authors' contributions* bereits bei Publikation der Arbeit von allen Autoren bestätigt wurden, wird hier auf eine Unterschrift aller Coautoren verzichtet. Stellvertretend bescheinigt hier der Seniorautor Prof. Dr. Joachim Geyer Herrn Simon Franz Müller den unter 2.2.2 aufgeführten Eigenanteil an der Publikation.



**Prof. Dr. Joachim Geyer**

Institute of Pharmacology and Toxicology  
Biomedical Research Center Seltersberg  
Justus Liebig University Giessen, Germany

### **3 Diskussion**

#### **3.1 NTCP als Transporter, Rezeptor und Drug-Target im Allgemeinen**

##### **3.1.1 NTCP erwacht aus seinem Dornröschenschlaf**

NTCP wurde 2012 als der funktionelle Rezeptor für HBV und HDV identifiziert und bestätigt (Yan et al. 2012, Ni et al. 2014, König et al. 2014). Wie in der Einleitung bereits erwähnt, konnten durch diese Entdeckung und die daraus resultierende Herstellung von NTCP exprimierenden Hepatomzelllinien die experimentellen Möglichkeiten zur Erforschung von HBV und HDV *in vitro* massiv erweitert werden. Kosten und Aufwand für Forschung an HBV oder HDV infizierten Zellen sind dadurch massiv gesunken und weltweit für viele Forscher und Unternehmen verfügbar geworden. Gleichzeitig ermöglichte die Entdeckung der Rezeptorfunktion von NTCP völlig neue Entwicklungsstrategien für potenzielle Wirkstoffe gegen HBV und HDV Infektionen.

##### **3.1.2 Studien zur HBV-Entry-Inhibitoren: Myrcludex B**

Das Konzept, HBV-Infektionen durch Inhibition des Eintritts (Englisch: „entry“) der Virionen in die Zelle zu bekämpfen, wurde, wie oben beschrieben, bereits vor Entdeckung von NTCP als Rezeptor verfolgt. Unter dem Markennamen „Myrcludex B“ befindet sich bereits ein preS1-basiertes Peptid in der therapeutischen Erprobung (Petersen et al. 2008). Aus pharmakologischer Sicht bringt jedoch der Einsatz eines Peptides als Therapeutikum eine Reihe von Nachteilen mit sich: Herstellung und Qualitätssicherung eines Peptides sind im Vergleich zu kleinen, chemisch synthetisierten Molekülen sehr aufwändig und mit höheren Kosten verbunden. Was die Akzeptanz bei den Patienten und den Aufwand für die behandelnden Ärzte angeht, sind hier ebenfalls kleine Moleküle überlegen, sofern sie z.B. oral aufgenommen werden können. Das Peptid hingegen muss regelmäßig subkutan appliziert werden, was den langfristigen Einsatz begrenzen und die Akzeptanz mindern dürfte.

Generell sind Peptide im Vergleich zu kleinen Molekülen sehr viel anspruchsvoller was die Lagerungsbedingungen und die Haltbarkeit angeht. So sind wässrige Lösungen von Peptiden auch gekühlt nur kurze Zeit haltbar. Selbst als Lyophilisat sind Peptide meist gefroren zu lagern, kleine Moleküle hingegen können in der Regel so stabil gemacht werden, dass sie in gängigen Lösungen oder Tablettenform über lange Zeit haltbar sind. Dies ist insbesondere für potenzielle Therapeutika von Hepatitis B relevant, da die Einsatzgebiete nicht in den



hochtechnisierten Industrieländern lägen, sondern in oft sehr unterentwickelten oder abgelegenen Gebieten, in denen eine dauerhafte Kühlung oft nicht sichergestellt werden kann.

Ein weiteres potenzielles Problem von Arzneimitteln in Proteinform sind Interaktionen mit dem Immunsystem des Patienten. Generell besteht bei der regelmäßigen Applikation von Proteinen die Gefahr einer immunologischen Reaktion. Hierbei kann die Reaktion von der Ausbildung von Antikörpern gegen das rekombinante Peptid, die dieses dann unter Umständen unwirksam machen, bis hin zu allergischen Reaktionen reichen. Allerdings scheinen aktuelle Studien darauf hinzudeuten, dass die immunologische Reaktion auf das preS1 Peptid weitestgehend ausbleibt (Blank et al. 2016). Das Immunsystem mancher Patienten scheint nach Behandlung mit Myrcludex B wieder effizienter auf HBV zu reagieren. Allerdings ist nicht klar, ob dieser Effekt auf eine direkte Wirkung des preS1-basierten Peptids auf das Immunsystem zurückzuführen ist oder ob durch eine verminderte Viruslast des Patienten, verursacht durch HBV-Entry-Inhibition durch Myrcludex B, das Immunsystem entlastet wird und seine Aufgaben dadurch wieder besser erfüllen kann (Blank et al. 2018).

### **3.1.3 Studien zu HBV-Entry-Inhibitoren: Im Allgemeinen**

Wie oben beschrieben, kann das Konzept, HBV-Infektionen durch Entry-Inhibition zu bekämpfen, seit der Entdeckung von NTCP als Rezeptor gezielt erforscht werden. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass sowohl die Gallensäuren als typische physiologische Substrate von NTCP als auch Ezetimib als bekannter Inhibitor des Gallensäuretransportes die Infektion durch HBV vermindern können (König et al. 2014). Dieser deutliche Hinweis auf eine sehr enge Verflechtung des Prozesses des Gallensäuretransportes und der Rezeptorfunktion von NTCP wurde frühzeitig bestätigt (Ni et al. 2014). Neben bekannten physiologischen Substraten von NTCP wurden auch bekannte Arzneistoffe auf ihr Potenzial als HBV-Entry-Inhibitor getestet, von denen eine positive Wirkung bei HBV Infektionen bekannt war oder vermutet wurde, deren Wirkmechanismus jedoch oft nur unvollständig erklärt werden konnte. Hierbei fiel frühzeitig Cyclosporin A auf, welches in einer Studie neben seiner bekannten und therapeutisch genutzten Wirkung auf Cyclophilin A/B/C auch eine Wirkung als direkter Entry-Inhibitor zu haben schien (Nkongolo et al. 2014). Neben bekannten Substraten und therapeutisch für andere Zwecke zugelassenen Substanzen wurden auch experimentelle Stoffe getestet um möglicherweise neue, als Inhibitoren einsetzbare Wirkstoffgruppen zu finden. So zeigte zum Beispiel Vanitaracin A, ein Metabolit im fungalen Stoffwechsel, Wirkung als Entry-Inhibitor, blockierte aber auch den Gallensäuretransport, so

wie dies alle bis dahin bekannten Substanzen auch tun (Kaneko et al. 2015). In den folgenden Jahren wurde eine Vielzahl von zugelassenen Substanzen in einer Studie auf ihre Wirksamkeit als NTCP-Transportinhibitoren und auf HBV-Entry-Inhibition untersucht. In dieser Studie wurde bei einer Wirkung der Substanz als HBV-Entry-Inhibitor auch stets eine Inhibition des Gallensäuretransports am NTCP nachgewiesen (Donkers et al. 2017).

### **3.1.4 Studien zu HBV-Entry-Inhibitoren: Sonderfall Cyclosporin-Derivate**

Einen Sonderfall zu der Regel, dass die Inhibition der Bindung von HBV immer auch mit der Inhibition der physiologischen Funktion von NTCP verknüpft ist, scheint es für einige Cyclosporin-Derivate zu geben. Eine Substanz mit der Arbeitsbezeichnung SCY995 zeigte bei niedrigen Konzentrationen nur minimale inhibitorische Effekte auf den Gallensäuretransport. Allerdings wurde durch die Substanz in diesen Konzentrationen die HBV-Infektionsrate und preS1-Peptid-Bindung signifikant verringert (Shimura et al. 2017). Diese Studie weist darauf hin, dass eine selektive Inhibition der viralen Bindung möglich sein könnte.

## **3.2 Das neu entdeckte Cebus Monkey Hepatitis Virus (CMHBV)**

Wie bereits in der Einleitung näher beschrieben, besteht zwischen den Genotypen von HBV und den Isolaten aus Altweltaffen eine große Ähnlichkeit. Die Infektion von Menschen mit HBV Genotypen aus anderen Spezies ist bisher jedoch noch nicht nachgewiesen worden. Im Gegensatz dazu können allerdings menschliche HBV Genotypen und HBV Genotypen anderer Affenspezies durchaus verschiedene Affenspezies infizieren, was das Potenzial von Orthohepadnaviren zur Überwindung der Speziesbarrieren verdeutlicht (Rasche et al. 2016). Anders als bei anderen bedeutenden humanpathogenen Viren, wie zum Beispiel bei HIV oder dem Ebola Virus, gibt es aktuell keine Hinweise auf einen Übersprung von HBV aus Affen oder anderen Spezies auf den Menschen in der jüngeren Vergangenheit (Simmonds 2001). Ebenso sind die evolutionären Ursprünge der unterschiedlichen menschlichen HBV Genotypen F und H, die mit amerikanischen Ureinwohnern in Alaska und Lateinamerika assoziiert sind, unbekannt (Alvarado-Mora et al. 2013). Da aktuell keine dauerhaften tierischen Reservoirs für menschliche HBV Genotypen bekannt sind, wäre die Ausrottung der menschlichen HBV Genotypen durch Universalimpfung und antivirale Behandlung möglich (Ni et al. 2012).

Kürzlich wurde ein Hepadnavirus in Neuweltfledermäusen beschrieben, welches *in vitro* menschliche Hepatozyten anstecken konnte und nicht durch Antikörper neutralisiert werden konnte, welche durch Vakzination durch den üblichen HBV Impfstoff induziert werden (Drexler et al. 2013). Ob dieses Fledermausvirus den Menschen jedoch *in vivo* infizieren kann, bleibt offen. Der direkte Kontakt zwischen Mensch und Fledermaus ist in Süd- und Mittelamerika im Vergleich zu Afrika selten, da die Gewinnung von Fledermäusen als so genanntes *bush meat* dort eher unüblich ist (Micklenburgh et al. 2009). Im Gegensatz dazu ist der Kontakt zwischen den indigenen südamerikanischen Völkern und Affen intensiver. Affen werden beispielsweise als Nahrungsmittel konsumiert, aber auch als Haustiere gehalten oder sie begeben sich von selbst in unmittelbare Nähe menschlicher Behausungen aufgrund der Zerstörung ihrer natürlichen Lebensräume (www.prowildlife.de 2007).

Grundsätzlich erleichtert die enge genetische Verwandtschaft von Mensch und Affen artenübergreifende Infektionen (Davies et al. 2008). Wie oben näher beschrieben, war das WMHBV aus dem Wollaffen (*Lagothrix lagotricha*) lange Zeit die einzige andere beschriebene Hepadnaviruspezies in der Ordnung der Primaten neben HBV (Lanford et al. 1998). Die Beschreibung von WMHBV als einzige Schwesterart von HBV stellte damals die existierenden Theorien zum evolutionären Ursprung von HBV in der Alten Welt in Frage und wurde Basis für Theorien, die den Ursprung von HBV in der Neuen Welt vermuteten (Lanford et al. 1998).

Der Beprobung von Affen stehen aus ethischen und technischen Gründen viele Hindernisse im Weg, deshalb gehören insbesondere die südamerikanischen Affenpopulationen zu den am wenigsten auf Infektionserreger untersuchten Affenpopulationen weltweit (Hopkins & Nunn 2007). Es gibt nur vier Studien zu HBV Prävalenz in Affen der Neuen Welt, die alle zusammen nur etwa 100 Tiere abdecken (Rasche et al. 2016). Deshalb wurden in unserer Studie 124 Neuweltaffen, verteilt auf mindestens zehn Arten, beprobt und auf HBV untersucht, mehr als in allen vorhergehenden Studien zusammen. Hierbei konnte aus einem Weibchen der Spezies *Sapajus xanthosteros* durch eine hochsensitive PCR Methode zur Detektion von Hepadnaviren eine neue HBV Spezies entdeckt werden. Das neue Orthohepadnavirus wurde entsprechend seiner Entdeckung in Kapuzineraffen als „Capuchin Monkey Hepatitis B Virus“ (CMHBV) benannt (Souza et al. 2018).

Unsere Daten deuten darauf hin, dass *Catarrhini* und *Platyrrhini* seit Millionen von Jahren Hepadnaviren in sich tragen, was einer früheren Hypothese zur Evolution von HBV widerspricht, die den Zeitpunkt der Spaltung zwischen den HBV Genotypen und den

Hepadnaviren der Neuweltaffen auf ein Ereignis vor nur wenigen tausend Jahren datiert (Fares & Holmes 2002). Auch die Theorie, dass alle Hepadnaviren von Primaten ihren Ursprung in Neuweltaffen haben, wird durch unsere Ergebnisse nicht gestützt.

Eine neue Analyse zur Herkunft der Neuweltaffen postuliert einen afrikanischen Ursprung der *Platyrrhini* und datiert ihre Ankunft in Südamerika mindestens 36 Millionen Jahre in die Vergangenheit (Bond et al. 2015). Unsere phylogenetische Rekonstruktion der Evolution der Orthohepadnaviren ist mit dieser Theorie logisch kompatibel. Die evolutionären Vorfahren der heutigen *Platyrrhini* könnten die entsprechenden Vorfahren von WMHBV und CMHBV bereits vor der transatlantischen Kolonisation in sich getragen haben. Wir vermuten, dass die entsprechenden Hepadnaviren gemeinsam mit ihren Wirten die Neue Welt erreicht haben.

Für eine evolutionär sehr langfristige Wirt-Parasit-Beziehung bei rezenten Hepadnaviren spricht insbesondere HBV mit seinen Genotypen. Es besteht eine sehr enge evolutionäre Verwandtschaft der HBV Genotypen mit den Genotypen anderer hominoider Spezies, was für eine langfristige Präsenz von Hepadnaviren in den Vorläuferspezies heutiger Hominiden spricht. Dem gegenüber steht das offensichtliche Fehlen divergierender HBV-Genotypen bei den *Cercopithecidae* in der Alten Welt (Makuwa et al. 2006). Ob andere, bisher unbekannte Hepadnaviruspezies in *Cercopithecidae* existieren, sollte untersucht werden, da die überwiegende Mehrheit der Primatenarten bisher nicht auf Hepadnaviren untersucht wurde (Rasche et al. 2016).

Aus Menschenaffen wurden wiederholt Genotypen des menschlichen HBV isoliert. Ob diese Infektionen allerdings das Ergebnis von Übertragungen von Menschen auf Affen sind, worauf unsere Analysen hinweisen, oder ob diese Genotypen in Wirklichkeit natürlicherweise in mehreren Spezies existieren und sich als Linien noch nicht vollständig getrennt haben, kann nur durch weitere Untersuchungen aufgeklärt werden (Paraskevis et al. 2013).

Eines der Haupthindernisse für die Auflösung der Widersprüche zwischen den Theorien zu der evolutionären Geschichte von Menschen und HBV war der rätselhafte Ursprung der HBV Genotypen F und H, welche der Neuen Welt zugeordnet werden und deren Ursprung von manchen Theorien in Neuweltaffen-Hepadnaviren vermutet wurde. Im Gegensatz zu manchen älteren Theorien scheinen in unseren Berechnungen weder CMHBV noch WMHBV direkte evolutionäre Vorfahren der HBV Genotypen F und H zu sein. Neuere archäologische Funde legen nahe, dass eine Subpopulation *Homo sapiens* auf dem Weg zur Besiedlung Amerikas während des vergangenen Gletschermaximums für etwa 9.000 Jahre auf der Beringschen Landbrücke geografisch isoliert war (Nielsen et al. 2017). Deshalb ist es denkbar, dass

Individuen dieser relativ kleinen Gruppe den oder die Vorfahren der HBV-Genotypen F und H getragen haben könnten. Im Rahmen unserer Berechnungen scheint es auch möglich, dass die evolutionär jüngste Aufspaltung in die Genotypen F und H während der raschen Ausbreitung der Menschen über den amerikanischen Kontinent stattgefunden haben könnte (Paraskevis et al. 2015). Die Kolonisierung eines geografisch so weit ausgedehnten Areals durch eine ursprünglich sehr kleine Zahl von Individuen lässt viel Raum für Spekulation über potenzielle Ereignisse. Sofern diese erste Welle der Kolonisten Amerikas nicht bereits zwei Genotypen mitgebracht hat, sondern einen gemeinsamen Vorläufertyp (Genotyp F/H), könnte dieser Typ in der Alten Welt ausgestorben sein. Alternativ könnte der ursprüngliche Genotyp F/G aufgrund von Aufspaltungen der Population und divergenter Entwicklung der beiden Subpopulationen während der Ausbreitung über den amerikanischen Kontinent verloren gegangen sein. Bemerkenswert ist, dass die jüngsten Funde einen potenziellen präkolumbischen Kontakt zwischen Polynesiern und südamerikanischen Ureinwohnern vor etwa 3.000-5.000 Jahren vermuten lassen. Dieser Kontakt könnte zeitlich mit dem Auftreten des Genotyps F in Polynesien übereinstimmen (Blitz et al. 1998). Angesichts der potenziellen Ausbreitungsroute über Polynesien liegt eine hypothetische Ausbreitung eines ursprünglichen Genotyps F/H über diese Route nahe. Allerdings lässt sich so kaum das Vorkommen des Genotyps F in Alaska erklären. Dies würde voraussetzen, dass sich die Genotypen F und H sehr früh separiert hätten. Zudem hätten sich die Subgenotypen von Genotyp F sogar mit einer noch höheren Geschwindigkeit abspalten und ausbreiten müssen. Diese rasche Entwicklung der Genotypen und Subtypen stünde aber in deutlichem Widerspruch zu der langsamen, langfristigen Evolutionsrate der HBV Genotypen, welche sich anhand der Isolation einer HBV Genotyp-C-Sequenz aus einer koreanischen Mumie aus dem 16. Jahrhundert belegen lässt (Kahila et al. 2012). Aufgrund der begrenzten Datenlage ist jedoch nicht auszuschließen, dass während der Ausbreitung von *Homo sapiens* der oder die Vorfahren der Genotypen F und H mehr als einmal den Weg auf den amerikanischen Kontinent gefunden haben.

Unsere experimentellen Daten zeigen eine deutliche Interaktion von CMHBV Peptiden mit dem menschlichen HBV Rezeptor NTCP, die nur geringfügig schwächer ausgeprägt ist als die Interaktion mit dem Ntcp von Kapuzineraffen und implizieren deshalb ein zoonotisches Potenzial von CMHBV. Diese Schlussfolgerung wird weiter gestützt durch unsere Versuche mit HDVpsCMHBV Partikeln, die zeigen, dass die Hüllproteine von CMHBV potenziell eine Infektion via NTCP in menschlichen Zellen vermitteln können und damit alle Voraussetzungen für eine erfolgreiche Invasion der menschlichen Leber durch CMHBV auf Ebene des viralen Entry gegeben sind. Natürlich müssen diese Thesen weiter durch

Infektionsexperimente, die sich auf vollständige Hepadnaviren und primäre menschliche Leberzellen stützen, überprüft werden, um Rückschlüsse auf das wahre zoonotische Potenzial von CMHBV zu ermöglichen.

### **3.3 Charakterisierung der *de novo* klonierten Neu- und Altweltaffen Ntcps als Transporter und Rezeptoren**

Wie oben bereits genauer im Teil zu Publikation I beschrieben, wurden diverse Genotypen von HBV in Menschenaffen gefunden (Bovincino et al. 2014). In dieser ersten Veröffentlichung wurde das neu entdeckte CMHBV vor allem auf Virusökologie und im Kontext der hepadnaviralen Evolution analysiert. In einer weiteren Studie (Publikation II) wollten wir uns explizit auf die Mechanistik der Virus-Rezeptor-Interaktion fokussieren und der Frage nachgehen, welche Faktoren auf Virus- und Wirtsseite die Speziesbarrieren zwischen Mensch, Menschenaffen, Neu- und Altweltaffen determinieren. Dazu klonierten wir aus den uns verfügbaren Proben von Affenlebern die jeweiligen Ntcps und analysierten deren Interaktion mit HBV als Altwelt- und Menschen(affen)virus und WMHBV als Neuweltaffenvirus.

Bei der Analyse der Interaktionen der NTCP/Ntcps mit den beiden Viren war besonders auffällig, dass innerhalb der bekannten Bindungsdomäne des Rezeptors für das virale Hüllprotein die Aminosäure an der Position 158 im jeweiligen NTCP/Ntcp allein entscheidend ist, um zwischen der HBV/HDV-empfindlichen Gruppe von Menschen und Menschenaffen (alle mit 158G) und der nichtempfindlichen Gruppe von Altweltaffen (alle mit 158R) zu unterscheiden (Yan et al. 2012). In unseren Experimenten war der Austausch von 158R auf 158G allein ausreichend, um eine vollständige Transport-konkurrierende preS1-Peptidbindung und Empfänglichkeit für HBV/HDV Infektionen in allen analysierten Ntcp-Mutanten der Altweltaffen herzustellen. Umgekehrt machte die G158R-Mutation Mensch und Affen NTCP/Ntcps völlig unempfindlich gegen preS1-Peptidbindung und HBV/HDV-Infektion.

Bemerkenswert ist, dass die NTCP/Ntcp-Transportaktivität von der G158R- oder R158G-Mutation weitestgehend unberührt bleibt, wohingegen andere Mutationen, wie z.B. S267F, N5Q oder N11Q, die Transportfunktion, Membraninsertion oder Proteinfaltung negativ beeinflussen können. Die funktionelle Transportaktivität wurde von uns durch Gallensäuretransportexperimente für alle Wildtypen und Mutanten überprüft. Auch wurden preS1-Peptide von HBV und WMHBV in steigenden Konzentrationen eingesetzt, um den

Gallensäuretransport durch NTCP/Ntcp zu hemmen. Dieser Assay misst nicht nur den Transport von Gallensäuren, sondern auch indirekt die Bindung von myr-preS1-Peptiden an NTCP/Ntcp und erlaubt dadurch sowohl den funktionellen Nachweis der Transporterexpression in der Plasmamembran als auch den Nachweis der Interaktion der preS1-Peptide mit der Transportfunktion innerhalb desselben Assays (König et al. 2014).

Der direkte Nachweis der Bindung von preS1-Peptiden an die jeweiligen Rezeptoren wurde mit fluoreszenzmarkierten Peptiden von HBV und WMHBV durchgeführt und mit einem neu etablierten Assay quantifiziert. Hierbei zeigte sich eine logische Übereinstimmung der Daten aus den Transportinhibitionsexperimenten mit denen aus den direkten Bindungsexperimenten. Dies lässt darauf schließen, dass, wie bereits von Dr. König und Dr. Döring publiziert, eine sehr enge Verflechtung des Prozesses der Bindung des viralen preS1-Peptides mit der Transportfunktion bestehen muss (König et al. 2014). Durch die gefundene Mutation an der Stelle 158 kann jedoch ein noch wesentlich differenzierteres Bild der Mechanistik dieses Prozesses ermittelt werden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass NTCP durch die Einführung von Aminosäuren verschiedener chemischer Eigenschaften an der Stelle 158 (G zu R, N, V, S oder D) unempfindlich für die Bindung und Transporthemmung durch preS1-Peptide gemacht werden kann, während die Transportfunktion für Gallensäure erhalten bleibt. Diese unveränderte Transportfunktion und unsere Vorhersagen durch 3D-Modelle lassen den Schluss zu, dass sich NTCP in seiner Makrostruktur als Protein durch diese Mutationen nicht wesentlich verändert. Wir gehen also davon aus, dass diese Mutationen einen lokal begrenzten Effekt in der extrazellulären Domäne des NTCPs hat. Dadurch, dass sich so mutierte NTCPs durch preS1-Peptide nicht mehr hemmbar zeigen, erhalten wir deutliche Hinweise auf die exakte Lokalisation des kritischen Teils der Bindung des Virus an seinen Rezeptor.

Infektionsexperimente wurden wie oben beschrieben mit HBV, HDV und HDVpsWMHBV durchgeführt. Es zeigte sich, wie in den Assays zuvor, dass sowohl HBV/HDV als auch HDVpsWMHBV ein ähnliches Reaktionsmuster aufweisen. Es wurden unterschiedlich effiziente Infektionsergebnisse für die verschiedenen Viren sichtbar, allerdings trat zu keiner Zeit der Fall ein, dass ein Rezeptor oder eine Rezeptormutante nur für das Altwelt- oder nur für das Neuweltvirus empfänglich war, sondern stets für beide, was vermutlich auf die hohe Ähnlichkeit von HBV und WMHBV in der preS1-Region zurückzuführen ist.

Basierend auf diesen Experimenten an sechs verschiedenen Altweltaffen Ntcpns sehen wir Arginin an Position 158 der entsprechenden Ntcpns als Hauptquelle für die Resistenz der

untersuchten *Cercopithecidae* gegenüber Hepadnaviren an. Diese Schlussfolgerung wird durch die Ergebnisse einer weiteren aktuellen Studie gestützt, die zeigt, dass sowohl mit MfasNtcp oder MmulNtcp transfizierte Hepatomzellen als auch primäre Hepatozyten von *Macaca fascicularis* oder *mulatta* unempfindlich gegen preS1-Peptidbindung und HBV/HDV Infektion sind (Lempp et al. 2017). Wurden diese primären Affenhepatozyten jedoch mit humanem NTCP transfiziert, konnte dadurch volle Suszeptibilität für HBV/HDV Infektion hergestellt werden. Dies zeigt, dass NTCP/Ntcp der einzige limitierende Faktor für HBV/HDV Infektion der Makakenhepatozyten darstellt, was die Bedeutung und Übertragbarkeit unserer Studie wesentlich untermauert.

Die bedeutende Rolle von Arginin 158 als entscheidender Faktor für die Resistenz gegen HBV/HDV Infektion gibt Anlass zu weiteren Spekulationen. Da Arginin unter allen untersuchten Altweltaffen Ntcps an dieser Stelle konserviert ist, könnte es durch Mutation früh im Zweig der *Cercopithecidae* aufgetreten sein und so rein zufällig diesen gemein sein. Allerdings kann man auch spekulieren, dass diese Mutation zwar ein Zufallsereignis war, sich jedoch durch Selektionsdruck innerhalb der Vorläuferspezies durchgesetzt hat. Diese Theorie kann insbesondere durch die Schlussfolgerung aus Publikation I nicht als völlig unwahrscheinlich abgetan werden, da die dort angestellten Analysen eine Koevolution von Hepadnaviren und Primaten über einen Zeitraum von vielen Millionen Jahren als sehr wahrscheinlich ansehen (Souza et al. 2018). Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass sich die Variante 158 R im Ntcp der Altweltaffen als Reaktion auf einen dauerhaften Selektionsdruck durch Hepadnaviren herausgebildet hat und möglicherweise zu einem Aussterben der diese Affenspezies befallenden Hepadnaviren geführt hat. Alternativ ist auch denkbar, dass es bisher noch nicht entdeckte Hepadnaviren in Altweltaffen gibt, die durch Mutationen in der preS1-Region diese Barriere am Rezeptor überwinden können. Sollten diese eines Tages gefunden werden, wäre es von großem wissenschaftlichem Interesse, deren Reaktivität mit der 158 G Variante zu testen.

Abgesehen von diesem evolutionären Aspekt können unsere Erkenntnisse für die Entwicklung von HBV/HDV-Entry-Inhibitor von Bedeutung sein. Wie einleitend bereits beschrieben, wurde für eine gewisse Zeit davon ausgegangen, dass eine Inhibition der Bindung von preS1-Peptid an NTCP stets mit einer Beeinträchtigung der physiologischen Funktion von NTCP einhergehen muss, da bekannt ist, dass der Gallensäuretransport und die preS1-Rezeptorfunktionen von NTCP miteinander verknüpft sind (König et al. 2014).



Von Myrcludex B, dem preS1-Peptid-basierten HBV/HDV-Entry-Inhibitor, wird aufgrund seiner Wirkungsweise eine Störung der Gallensäurehomöostase erwartet. Tatsächlich hat die jüngste Erprobung von Myrcludex B bei gesunden Probanden den Serumspiegel von konjugierten Gallensäuren um zwei Größenordnungen erhöht (Blank et al. 2014).

Wie oben bereits diskutiert, ist die Frage, ob es möglich ist ein kleines Molekül zu finden, welches die Virusbindung an NTCP blockiert, diesen aber in seiner physiologischen Funktion nicht beeinträchtigt, von zentraler Bedeutung für die Entwicklung eines erfolgreichen und sicher einzusetzenden HBV/HDV-Entry-Inhibitors.

Unsere Daten und die Analyse der 3D-Homologie-Modelle zeigen uns, dass es sehr wahrscheinlich genügen würde, eine nur sehr kleine räumliche Struktur am NTCP zu blockieren, um diesen gewünschten Effekt erzielen zu können. Aufgrund der ausgetesteten variablen Seitenketten der Aminosäure an der Position 158 im NTCP halten wir diese Stelle für eine prädestinierte *drug target* Region. Auch ist die Lokalisation dieser Stelle aus pharmakologischer Sicht besonders attraktiv, da sie extrazellulär und damit zum Blutstrom hin exponiert liegt und für hydrophile Moleküle zugänglich sein sollte. Dies bedeutet, dass ein Arzneistoff, sobald er das Portalblut erreicht hat, direkten Zugang zur Zielstruktur hätte und das in relativ hohen Konzentrationen direkt nach enteraler Absorption. Die Möglichkeit einen solchen niedermolekularen HBV/HDV-Entry-Inhibitor zu finden, wird durch neue Erkenntnisse mit Derivaten des zyklischen Peptids Cyclosporin A gestützt. Die Substanz mit der Arbeitsbezeichnung SCY995 zeigte bei niedrigen Konzentrationen kaum inhibitorische Effekte auf den Gallensäuretransport, aber durchaus inhibierende Wirkung auf die HBV Infektion und preS1-Peptid Bindung (Shimura et al. 2017).

Diese Daten sind in der Hinsicht ermutigend, dass sehr wahrscheinlich kleine Moleküle identifiziert werden könnten, die dem vorgeschlagenen Profil entsprechen. Interessanterweise erreichte die preS1-Peptid-Bindungsfähigkeit der R158G Ntcp-Mutanten der Altweltaffen ähnliche Werte wie die der Wildtyp NTCP/Ntcps von Mensch und Menschenaffen. Die Fähigkeit dieser R158G-Mutanten, eine HBV/HDV Infektion zu vermitteln, war jedoch eine Größenordnung niedriger. Dies wird höchstwahrscheinlich durch Sequenzvariationen der Ntcps jenseits der preS1-Bindungsregion verursacht. Die Region mit den Aminosäuren 84-87 ist in dieser Hinsicht besonders zu erwähnen, da diese bereits früher als kritisch für die Internalisierung des Virus-Rezeptor-Komplexes identifiziert wurde (Yan et al. 2012, Ni et al. 2014). Im Vergleich zur Sequenz des menschlichen NTCPs (<sup>84</sup>RLKN<sup>87</sup>), tragen alle

Altweltaffen Ntcps eine <sup>84</sup>QLNN<sup>87</sup>-Sequenz an der entsprechenden Position, was für die geringeren Infektionsraten verantwortlich oder zumindest daran beteiligt sein könnte.

In der Gruppe der von uns klonierten Neuweltaffen zeigte sich in unseren Assays ein wesentlich differenzierteres Muster als bei der sehr homogenen Gruppe der Altweltaffen. Die beiden Ntcps von *Saimiri sciureus* und *Callithrix jacchus* (beide mit Glycin an Position 158) zeigten sowohl eine klare Bindung der HBV/WMHBV-preS1-Peptide als auch Inhibition des Gallensäuretransportes durch eben diese. Allerdings konnte eine Infektion nur durch das Ntcp von *Saimiri sciureus* nachgewiesen werden, wenn auch mit äußerst geringer Effizienz, während durch das Ntcp von *Callithrix jacchus* keine Infektion vermittelt werden konnte. Das Ntcp von *Saguinus oedipus* konnte ebenfalls keine Infektion vermitteln und eine Inhibition des Gallensäuretransportes konnte auf dem hohen Signifikanzniveau der anderen untersuchten Ntcps nicht nachgewiesen werden. Allerdings konnten in dem Assay, der die direkte Bindung der fluoreszenzmarkierten Peptide betrachtet, geringe, aber signifikante Signale für die Bindung des markierten preS1-Peptides bei dem SoedNtcp nachgewiesen werden. Die Aminosäure Serin an der Stelle 158 oder aber andere, vom humanen NTCP verschiedene Aminosäuren von SoedNtcp könnten dafür verantwortlich sein. Der Effekt von Serin an der Stelle 158 konnte auch in einer Mutante des humanen NTCP nachgewiesen werden. Die Sonderrolle von Serin könnte Thema weiterer Untersuchungen sein und ist insbesondere bei der Entwicklung von Substanzen, die gegen Aminosäure 158 gerichtet sind, von Bedeutung.

### **3.4 Gemeinsame Diskussion der Veröffentlichungen**

#### **3.4.1 Potenzielle neue Tiermodelle**

Eine chronische Hepatitis B Infektion ist eine bedeutende menschliche Infektionskrankheit, jedoch bisher mit eingeschränkter Therapierbarkeit. Trotz der jüngsten Fortschritte mit transgenen Mäusen wird die Forschung zur Heilung von HBV Infektionen durch den Mangel an geeigneten Tiermodellen für eine persistente HBV Infektion behindert (Bukh et al. 2013). Insbesondere die ethischen, aber auch die finanziellen Hürden für ein Tiermodell in Menschenaffen sind kaum überwindbar. Für nichtmenschliche Primaten sind diese immer noch wesentlich höher als für beispielsweise ein Nagermode, dennoch ist es in vielen Nationen möglich, Affenhaltung in großem und langfristigem Stil zu betreiben. Ob sich Makaken als nützliche Tiermodelle für chronische Hepatitis B erweisen können, bleibt abzuwarten. Eine Veröffentlichung zu HBV in einer Makakenkolonie auf Mauritius ist in Fachkreisen hoch umstritten und die Ergebnisse konnten bisher nicht im Labor verifiziert

werden (Dupinay et al. 2013). Auch deuten unsere Daten zu Makaken darauf hin, dass Makaken mit typischem Wildtyp Ntcp kein geeignetes Modell darstellen. Es besteht theoretisch die Möglichkeit, dass eine Subpopulation von Makaken die Ntcp 158 G Variante trägt oder erworben haben könnte. Allerdings gibt es dafür bei der beschriebenen Makakenkolonie keine Hinweise.

Die mögliche Anwendung von modernen molekularbiologischen Methoden macht Modelle mit modifizierten Ntcps oder auch mit eingebrachtem humanen NTCP theoretisch in einer Vielzahl von Spezies möglich, ist jedoch mit einem hohen Aufwand verbunden. Auch führt dies dazu, dass die erzeugten Individuen in Deutschland unter das Gentechnikgesetz fallen (oder entsprechende Regelungen anderer Nationen), was die Haltung und Zucht auch von Tieren, die noch nicht in Versuchen mit Infektionserregern verwendet werden, sehr aufwändig macht. Zucht und Haltung nichtmenschlicher Primaten unterliegt bereits einer hohen Regulierung durch Tier- und Artenschutzrecht, was jeden weiteren bürokratischen Faktor noch unattraktiver erscheinen lässt.

Naheliegender ist deshalb die Verwendung einer Spezies, die bereits als Wildtyp für den zu untersuchenden Erreger empfänglich ist. Dies ist auch aus tiermedizinischer Sicht als optimales, natürliches Modell anzusehen, da die Infektion nicht durch einen artfremden Rezeptor vermittelt wird.

Die Entdeckungen unserer beiden Veröffentlichungen legen Kapuzineraffen als mögliche Modelltiere nahe. Kapuzineraffen können in Gefangenschaft nachweislich leicht und erfolgreich vermehrt werden, was bei Primaten keine Selbstverständlichkeit darstellt und diverse Spezies als Modelle ungeeignet macht (Fragaszy et al. 1998). Außerdem gehören sie zu den in der Forschung am meisten verbreiteten nichtmenschlichen Primaten aus der Neuen Welt, was den Zugriff auf bereits gesammelte physiologische Parameter erleichtert (Torres et al. 2010). Dass sich Kapuzineraffen tatsächlich als Tiermodelle in der Infektionsforschung eignen, lässt sich durch bereits einige Jahre zurückliegende Studien zur Forschung an Schistosomen und Herpesviren belegen (Kuntz et al. 1971, Wallen et al. 1975).

Mit Kapuzineraffen als Modelltieren könnte mit CMHBV als Modellvirus in seinen natürlichen Wirten geforscht werden. Zumindest deuten die Ergebnisse aus den Publikationen I und II darauf hin. Außerdem ist es sehr wahrscheinlich, dass auch HBV und/oder WMHBV in Kapuzineraffen studiert werden könnte. Es erscheint daher sinnvoll, dieser Fragestellung weiter nachzugehen, da dies den Durchbruch zu einem HBV-Modell an nichtmenschlichen, nicht gentechnisch veränderten Primaten bedeuten würde.

### 3.4.2 Hepadnaviren - Zoonotisches Potenzial und potenzielle Reservoirs in der Wildnis

Unsere Veröffentlichungen zeigen, dass unser Kenntnisstand über Hepadnaviren in Wildtieren, insbesondere in Affen, nur sehr begrenzt ist. Bemerkenswert ist auch, dass HBV-Impfstoffe der dritten Generation, die preS1-Epitope bis zur Aminosäure 50 enthalten, möglicherweise wirksamer sind, um divergente Hepadnaviren wie CMHBV effizient zu neutralisieren. Dies hebt den zusätzlichen Wert der neueren Impfstoffgenerationen hervor, zeigt aber auch, dass der Impfschutz älterer Generationen bei weitem nicht vollständig ist (Souza et al. 2018).

Wir konnten zeigen, dass mit dem CMHBV ein Hepadnavirus existiert, das durchaus das Potenzial besitzen könnte auf den Menschen überzuspringen und dies bereits in seiner heutigen Wildform. Auch die Vielzahl der oben beschriebenen Genotypen von Mensch und Affen belegt einen regen Austausch von Subtypen innerhalb von Populationen einer Wirtsart, aber auch zwischen nahe verwandten Wirtsspezies.

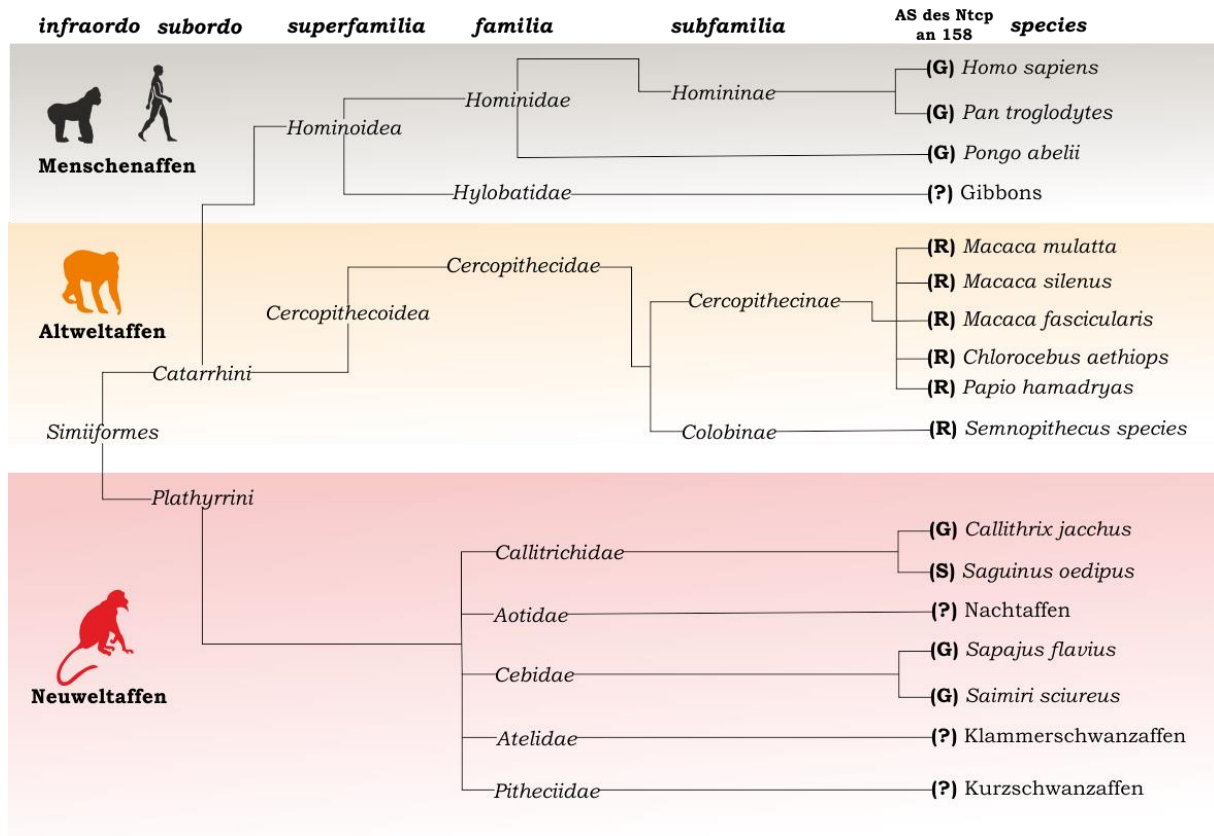
Unsere Daten weisen klar darauf hin, dass sowohl Menschenaffen, als auch Neuweltaffen potenzielle Reservoirs für HBV oder andere Hepadnaviren sein könnten. Es ist jedoch langfristig auch nicht auszuschließen, dass eine bisher nicht untersuchte Altweltaffenspezies empfänglich sein könnte. Alternativ könnte eine bereits untersuchte Spezies in einer Subpopulation die Rezeptorfunktion erworben haben oder immer noch tragen, da die von uns identifizierte einzelne Aminosäure an der Stelle 158 durch einen Einbasenaustausch leicht von der resistenten in die suszeptible Version und umgekehrt übergehen könnte. Auch eine heterozygote Subpopulation ist denkbar.

Zur Erläuterung wird in Abbildung 4 die biologische Systematik der Spezies erläutert, von denen NTCP/Ntcps kloniert werden konnten. Es zeigt sich hier insbesondere, dass die von uns klonierten Ntcps aus Altweltaffen die einzige rezente Familie der *Cercopithecidae* abdecken und die aktuell lebenden Altweltaffenspezies sehr nahe miteinander verwandt sind.

Aus der Überfamilie der *Hominoidea* wird die Familie *Hominidae* durch drei untersuchte Spezies gut abgebildet. Allerdings standen leider aus der Familie der *Hylobatidae* keine Proben zur Verfügung. Von großem Interesse wäre die Aminosäure an der Stelle 158 in Gibbons.

In den Neuweltaffen gibt es generell eine größere Vielfalt an rezenten Familien. Wir konnten den Status anhand von je zwei Spezies aus den Familien *Callitrichidae* und *Cebidae*

ermitteln. Wir hoffen, dass auch die Ntcps der drei verbleibenden Neuweltaffenfamilien eines Tages der Forschung zur Verfügung stehen werden, sodass ein geschlossenes Gesamtbild über den Status der Aminosäure 158 auch in Neuweltaffen entstehen kann.



#### Abbildung 4 - Einordnung der untersuchten Spezies in die zoologische Systematik

Hier wird die zoologische Systematik der rezenten Familien der zoologischen Teilordnung der Affen (*Simiiformes*) dargestellt. Die von uns untersuchten Spezies wurden ihrer jeweiligen Familie, beziehungsweise der jeweiligen Unterfamilie zugeordnet. Die Aminosäure (AS) an der Position 158 der bekannten NTCP/Ntcps wurde dargestellt; sofern kein Ntcp für die jeweilige Familie bekannt war, wurde dies durch ein Fragezeichen (?) kenntlich gemacht.

Die Abbildung zeigt ein zoologisches Schema zur Verdeutlichung von untersuchten und noch nicht untersuchten Affenfamilien. Die Verbindungslinien dienen lediglich zur Veranschaulichung der Verwandtschaftsverhältnisse entsprechend der aktuellen zoologischen Systematik; ihre Länge ist willkürlich gewählt und enthält keine Information. Ein Baumdiagramm zur Sequenzähnlichkeit der klonierten Ntcps ist in *Figure 2* der Publikation II dargestellt.

### **3.4.3 Reproduktion der Forschungsergebnisse durch eine unabhängige Arbeitsgruppe**

Unsere Forschungsergebnisse bezüglich der Relevanz der Aminosäure 158 für die Empfänglichkeit von Primaten für HBV und HDV wurden durch ein unabhängiges Team von Forschern aus Japan und Frankreich während der Anfertigung dieser Arbeit bereits in Form einer Vorabpublikation, welche sich aktuell in der Begutachtung befindet, bestätigt (Takeuchi et al. 2018).

## **3.5 Ausblick und neueste Veröffentlichungen zum Thema**

### **3.5.1 Die NTCP Variante S267F**

Während des Zeitraums der Anfertigung dieser Arbeit ist, wie oben ausführlich dargelegt, NTCP im Kontext mit HBV in den Fokus einer Vielzahl von Forschern gerückt. Insbesondere die aufstrebenden asiatischen Nationen sind sehr aktiv in der Forschung an HBV, da sie selbst zu den stärker betroffenen Regionen der Welt gehören. Allen voran die Volksrepublik China, aus der mehrere epidemiologische Studien zu NTCP Varianten und deren Auswirkung auf HBV-Empfänglichkeit und Krankheitsverlauf publiziert wurden (Yu et al. 2018). Besonders die Variante NTCP S267F wurde häufiger in Probanden gefunden und zunächst als gallensäuretransportdefizient und auch resistent gegen HBV-Infektion angesehen (Yu et al. 2018). Allerdings konnte jüngst gezeigt werden, dass auch ein homozygoter Träger der NTCP S267F Variante an einer chronischen HBV Infektion leiden kann. Auch *in vitro* wurde die These der völligen Resistenz von NTCP S267F gegen HBV Infektion widerlegt (Liu et al. 2018).

### **3.5.2 Glykosylierungsmuster von NTCP während der Ontogenese**

Die wesentlichen Auswirkungen der N-Terminalen N-Glykosylierung von NTCP wurde oben bereits einleitend erwähnt. In einer neuen Studie wurde gezeigt, dass sich das Glykosylierungsmuster von NTCP im Laufe der Entwicklung von einer fetalen zu einer adulten Leber deutlich verändert (Sargiacomo et al. 2018). HBV führt bekanntermaßen zu keiner intrauterinen Infektion der ungeborenen Kinder von infizierten Müttern. Allerdings hat es mit dem oben erwähnten, plazentagängigen HBe-Antigen die virologisch ungewöhnliche Eigenschaft erworben, das Immunsystem des ungeborenen Kindes auf eine Invasion mit HBV vorzubereiten (Seeger et al. 2015). Es lässt sich spekulieren, dass unter Umständen HBV durchaus durch Mikroläsionen in den Blutkreislauf des Fetus übertreten könnte, allerdings

aufgrund der noch fehlenden Plasmamembranexpression von NTCP, wie in der Veröffentlichung beschrieben, keine Invasion der Leberzellen des Fetus stattfinden kann. Es wurde gezeigt, dass bereits die Blockade einer der beiden N-terminalen Glykosylierungsstellen zu verminderter Membranexpression von NTCP führt. Kann jedoch keine der Stellen glykosyliert werden, ist NTCP in der Membran praktisch nicht mehr nachweisbar, was diese Theorie stützt (Appelman et al. 2017).

### **3.5.3 Allgemeine Betrachtung zu NTCP Varianten und HBV Resistenz**

Wie am Fall NTCP S267F oben dargelegt, werden immer mehr Studien durchgeführt, die die genetischen Variationen des *SLC10A1* Gens, beziehungsweise Varianten des NTCP Proteins in Kombination mit HBV Infektion betrachten. Das Bild scheint bisher noch unvollständig zu sein und angesichts einer Vielzahl menschlicher Ethnien, Lebensbedingungen und regional sehr unterschiedlicher HBV Genotypen vermuten wir, dass es noch einige Jahre dauern wird, bis mehr oder weniger vollständige Erkenntnisse darüber vorliegen, ob vielleicht bestimmte Individuen oder ethnische Gruppen resistent oder weniger empfänglich für HBV sind. Eine aktuelle Studie deutet drauf hin, dass Polymorphismen im *SLC10A1* Gen mit unterschiedlicher Empfänglichkeit für HBV und/oder Entwicklung der Infektion korrelieren (Wang et al. 2007). Generell sind die ersten epidemiologischen Studien zu diesem Thema jedoch kritisch zu hinterfragen und die aufgestellten Thesen müssen in geeigneten Modellen überprüft werden, um die wirklich zu Grunde liegenden Kausalzusammenhänge aufzuklären. Endgültige Klarheit zu diesem Thema wird erst in einigen Jahren erwartet.

Aber auch jedes *in vitro* System hat seine Grenzen, derer sich der Experimentator bewusst sein muss. Auch für die von uns identifizierte Ntcp 158R Variante in Altweltaffen mag gelten, dass unsere Ergebnisse nicht zu 100 Prozent in die Wildnis übertragbar sind, auch wenn dies durch die aktuelle Datenlage als sehr wahrscheinlich anzusehen ist. Die Frage hierbei ist, welchen mechanistischen Gesetzmäßigkeiten die für die jeweilige Mutation beobachteten Ergebnisse in Wahrheit folgen. In diesem Punkt treffen sich, wie in dieser Arbeit, Pharmakologie und Virologie am Rezeptor NTCP:

Betrachtet man die Interaktion des Virus mit seinem Rezeptor pharmakologisch, ist diese Interaktion gleichzusetzen mit der Affinität eines Liganden (HBV) an seinem Rezeptor (NTCP). Mutationen im NTCP können sich auf die Ligandenbindung und Internalisierung des Virus-Rezeptor-Komplexes auf mechanistisch sehr unterschiedliche Arten und Weisen auswirken. So kann eine Mutation von NTCP die Affinität des Liganden (HBV) unter



Umständen so weit vermindern, dass es *in vitro* oder *in vivo* nicht mehr zu einem messbaren Effekt kommt, natürlich abhängig von der Genauigkeit der jeweiligen Test- oder Messmethode. Dies erklärt möglicherweise die widersprüchlichen Daten zu der HBV-Suszeptibilität der NTCP S267F Variante. Diese wurde zunächst mit bestimmten Methoden als „vollständig resistent“ gegen HBV Infektion angesehen, später bei genauerer Untersuchung jedoch nur noch als „weniger empfänglich“. Dies bedeutet auf mechanistischer Ebene, dass die Prozesse von Virus-Bindung und -Internalisierung in ihrer Kinetik nur stark vermindert sind, jedoch grundsätzlich noch möglich bleiben.

Für die von uns gefundene Ntcp 158R Variante, die den Altweltaffen gemein ist, vermuten wir jedoch eine andere Mechanistik. So ist es auch möglich, dass die Veränderung im NTCP-Rezeptor durch diese Mutation so gestaltet ist, dass die Bindestelle des Liganden (HBV) überhaupt nicht mehr zugänglich ist. Dies würde bedeuten, dass auch der Internalisierungsprozess nicht mehr stattfinden kann, weil die wesentliche Interaktion zwischen Ligand (HBV) und Rezeptor (NTCP) nicht mehr hergestellt werden kann.

Eine dritte Möglichkeit wäre, dass der Ligand (HBV) seine Bindestelle am Rezeptor (NTCP) zwar noch erreicht, wie beispielsweise für den Ntcp von *Mus musculus* beschrieben, jedoch der Internalisierungsprozess nicht mehr ausgelöst werden kann. Dies ist möglich, wenn durch Mutation oder Sequenzvariation die Ligandenbindung selbst nicht beeinträchtigt ist, aber durch die veränderte Aminosäure die räumliche Struktur des Rezeptors so verändert ist, dass für die Internalisierung wichtige Konformationsänderungen nicht mehr ausgelöst werden können (Ni et al. 2014).

#### **3.5.4 Aktuelles Bild der Evolutionsgeschichte von HBV**

Unsere beiden Veröffentlichungen werfen neues Licht auf die Wirt-Parasit-Beziehung und die Evolutionsgeschichte der Hepadnaviren. Wie oben bereits erwähnt, schließen wir aus der aktuellen Datenlage, dass HBV mindestens schon einige Jahrtausende in der Spezies Mensch parasitiert und vermutlich auch schon deren Vorläuferspezies befallen hat.

Die molekularbiologischen Methoden entwickeln sich zurzeit mit einer hohen Geschwindigkeit weiter. Die Sequenzierung des Vollgenoms einer Spezies war noch vor wenigen Jahren ein Großprojekt, wie beispielsweise das Human Genome Project (von 1990 bis 2003). Mittlerweile ist der zeitliche und finanzielle Aufwand für Genomsequenzierung

jedoch massiv gesunken, während gleichzeitig die Nachweisgrenzen und Anforderungen an das Ausgangsmaterial immer weiter absinken. So konnten in einer Studie, an welcher unser direkter Kooperationspartner Prof. Glebe aus der medizinischen Virologie mitgewirkt hat, HBV in Proben von 200-7100 Jahre alten menschlichen Überresten nachgewiesen werden (Muehlemann et al. 2018). Diese Studie zeigt, dass menschliche Individuen verteilt über ganz Eurasien bereits seit mehreren tausend Jahren mit HBV infiziert sind. Diese Beobachtung zeigt klar, dass HBV kein Virus ist, welches den Sprung in den Menschen erst in der Neuzeit oder auch jüngeren Vergangenheit gemacht hat, wie dies einige ältere Theorien angenommen hatten, sondern schon lange in der Population vorhanden ist. Die Studie zeigt auch den bisher ältesten Nachweis viraler DNA Spuren aus konservierter DNA aus menschlichen Überresten und demonstriert die Machbarkeit solcher Projekte.

Angesichts dieser neuen Möglichkeiten werden vermutlich sowohl die Paleoanthropologie als auch die Paleovirologie in den nächsten Jahren und Jahrzehnten wesentliche Fortschritte erzielen. Dies bedeutet, dass sich unser aktuelles Bild zur Entwicklungsgeschichte des modernen Menschen und seines Parasiten HBV hoffentlich in der Zukunft noch wesentlich differenzierter darstellen wird.

Angesichts unserer Erkenntnisse zu Hepadnaviren in Neu- und Altweltaffen wäre es auch sehr spannend, konservierte DNA von historischen Affenüberresten zu untersuchen, sofern sich solche finden lassen. So könnte ein Bild der Verteilung der Genotypen in der Vergangenheit entstehen und die Fragen zum Ursprung der verschiedenen Genotypen in Menschen und Affen weiter aufgeklärt werden.

## 4 Zusammenfassung (Deutsch)

Das „Na<sup>+</sup>/Taurocholate Cotransporting Polypeptide“ (NTCP, *SLC10A1*) ist in seiner physiologischen Rolle von wesentlicher Bedeutung für die Aufrechterhaltung der enterohepatischen Zirkulation der Gallensäuren. NTCP transportiert Gallensäuren aus dem Blut in die Leberzellen hinein. NTCP wird exklusiv nur von Leberzellen exprimiert und ist dort in der dem Blut zugewandten Membran der Hepatozyten lokalisiert. Seine gewebespezifische Expression und physiologische Bedeutung als Membrantransporter für Gallensäuren machen NTCP zu einem geeigneten Ziel an der Zelloberfläche für Substanzen und Lebensformen, die spezifisch die Leber als Ziel haben. Vermutlich genau deshalb hat es sich für das Hepatitis B Virus (HBV) und das Hepatitis Delta Virus (HDV) im Laufe der Evolution bewährt, NTCP als Rezeptor für den Viruseintritt zu kapern. Durch die Entdeckung der hochspezifischen Rezeptorfunktion von NTCP für HBV und HDV wurde die Grundlage für die Forschung an neuen Therapiemöglichkeiten für HBV gelegt. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Gallensäuren und bekannte Inhibitoren der Transportfunktion von NTCP mit der HBV-Infektion interagieren können und es schien zunächst, dass eine Blockade der HBV Infektion stets mit der Blockade der physiologischen Transportfunktion einhergeht. Um die Mechanistik dieser Virus-Rezeptor-Bindung besser zu verstehen, wurden in dieser Arbeit die NTCP/Ntcps verschiedener nahe verwandter Spezies kloniert, verglichen und auf ihre Funktion als Rezeptoren für HBV, HDV und WMHBV (Woolly Monkey Hepatitis B Virus) untersucht.

Das WMHBV wurde in die Untersuchungen mit einbezogen, weil durch die Klonierung von Ntcps aus Alt- und Neuweltaffen naheliegend war, auch die Wirtsspezifität eines Neuwelt-Hepadnavirus zu untersuchen. In unseren Studien zeigte sich, dass die Aminosäure an der Position 158 des Ntcps der entscheidende Faktor für die Wirtsspezifität aller untersuchten Viren war und die Gruppe der Altweltaffen klar abgrenzt. Alle Altweltaffen tragen die Variante 158R und sind infektionsresistent, während die anderen Gruppen mit der Variante 158G empfänglich sind. Durch diese Entdeckung konnten wir gezielte Mutationen am humanen NTCP an der Stelle 158 untersuchen und kamen zu dem Ergebnis, dass NTCP durch Mutation von lediglich einer Aminosäure resistent gegenüber HBV-, HDV- und WMHBV-Infektion gemacht werden kann. Gleichzeitig jedoch blieb die Transportfunktion für Gallensäuren weitestgehend unberührt. Wir schließen daraus, dass es möglich ist, Arzneistoffe zu entwickeln, welche diesen Effekt nachahmen und dadurch die physiologische Transportfunktion von NTCP unberührt lassen, während sie effektiv Schutz gegenüber HBV oder HDV Infektion bieten.



## 5 Summary (English)

The "Na<sup>+</sup>/Taurocholate Cotransporting Polypeptide" (NTCP, *SLC10A1*) plays an essential physiological role in maintaining the enterohepatic circulation of bile acids. NTCP transports bile acids from the blood into the liver cells. NTCP is exclusively expressed by liver cells and inserted into the hepatocyte membrane facing the blood. Its tissue-specific expression and physiological importance as a membrane transporter for bile acids make NTCP a suitable target at the cell surface for substances and life forms that specifically target the liver. This is probably the reason why NTCP has proven itself as a receptor for the hepatitis B virus (HBV) and the hepatitis delta virus (HDV) in the course of evolution. The discovery of the highly specific receptor function of NTCP for HBV and HDV laid the foundation for research into new therapeutic options for HBV. Preliminary work has shown that bile acids and known inhibitors of the transport function of NTCP can interact with HBV infection; it seemed at first that a blockade of HBV infection is always accompanied by a blockade of the physiological transport function. To better understand the mechanistic of this virus-receptor-binding, the NTCP/Ntcp of various closely related species were cloned, compared and examined for their function as receptors for HBV, HDV and WMHBV (woolly monkey hepatitis B virus). The WMHBV was included in the investigations because the cloning of Ntcp from Old and New World apes made it obvious to investigate the host-specificity of a New World hepadnavirus. Our studies showed that the amino acid at position 158 in the Ntcp was a decisive factor for the host specificity of all investigated viruses and that the group of Old World monkeys clearly differs from the other groups. The Old World monkeys all carry the variant 158R and are infection resistant while the other groups with 158G are susceptible. This discovery enabled us to investigate specific mutations in human NTCP at site 158 and concluded that NTCP can be made resistant to HBV, HDV and WMHBV infections by mutating only one amino acid. At the same time, however, the transport function for bile acids remained largely unaffected. We conclude that it is possible to develop drugs that mimic this effect, leaving the physiological transport function of NTCP largely unaffected, while they effectively protect against HBV or HDV infection.

## 6 Literaturverzeichnis

- Alam K, Crowe A, Wang X, Zhang P, Ding K, Li L, Yue W (2018) Regulation of Organic Anion Transporting Polypeptides (OATP) 1B1- and OATP1B3-Mediated Transport: An Updated Review in the Context of OATP-Mediated Drug-Drug Interactions. *Int J Mol Sci* 19(3):855. doi: 10.3390/ijms19030855
- Alfaiate D, Dény P, Durantel D (2015) Hepatitis delta virus: From biological and medical aspects to current and investigational therapeutic options. *Antiviral Res* 122:112–129. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.08.009
- Alvarado-Mora MV, Botelho-Lima LS, Santana RA, Sitnik R, Ferreira PA, do Amaral Mello F, Manguiera CP, Carrilho FJ, Rebello Pinho JR (2013) Distribution of hepatitis B virus subgenotype F2a in São Paulo, Brazil. *BMC Res Notes* 6:423. doi: 10.1186/1756-0500-6-423
- Ananthanarayanan M, Ng OC, Boyer JL, Suchy FJ (1994) Characterization of cloned rat liver Na(+)-bile acid cotransporter using peptide and fusion protein antibodies. *Am J Physiol* 267(4 Pt 1). doi: 10.1152/ajpgi.1994.267.4.G637
- Anwer MS, Stieger B (2014) Sodium-dependent bile salt transporters of the SLC10A transporter family: More than solute transporters. *Pflugers Arch* 466:77–89. doi: 10.1007/s00424-013-1367-0
- Appelman MD, Chakraborty A, Protzer U, McKeating JA, van de Graaf SFJ (2017) N-Glycosylation of the Na<sup>+</sup>-Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP) Determines Its Trafficking and Stability and Is Required for Hepatitis B Virus Infection. *PLoS ONE* 12:e0170419. doi: 10.1371/journal.pone.0170419
- Barrera A, Guerra B, Notvall L, Lanford RE (2005) Mapping of the hepatitis B virus pre-S1 domain involved in receptor recognition. *J Virol* 79:9786–9798. doi: 10.1128/JVI.79.15.9786-9798.2005
- Bijsmans ITGW, Bouwmeester RAM, Geyer J, Faber KN, van de Graaf SFJ (2012) Homo- and hetero-dimeric architecture of the human liver Na<sup>+</sup>-dependent taurocholate co-transporting protein. *Biochem J* 441:1007–1015. doi: 10.1042/BJ20111234
- Blank A, Eidam A, Haag M, Hohmann N, Burhenne J, Schwab M, van de Graaf S, Meyer MR, Maurer HH, Meier K, Weiss J, Bruckner T, Alexandrov A, Urban S, Mikus G, Haefeli WE (2018) The NTCP-inhibitor Myrcludex B: Effects on Bile Acid Disposition and Tenofovir Pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 103:341–348. doi: 10.1002/cpt.744
- Blank A, Markert C, Hohmann N, Carls A, Mikus G, Lehr T, Alexandrov A, Haag M, Schwab M, Urban S, Haefeli WE (2016) First-in-human application of the novel hepatitis B and hepatitis D virus entry inhibitor myrcludex B. *J Hepatol* 65:483–489. doi: 10.1016/j.jhep.2016.04.013

- Blitz L, Pujol FH, Swenson PD, Porto L, Atencio R, Araujo M, Costa L, Monsalve DC, Torres JR, Fields HA, Lambert S, van Geyt C, Norder H, Magnusius LO, Echevarría JM, Stuyver L (1998) Antigenic diversity of hepatitis B virus strains of genotype F in Amerindians and other population groups from Venezuela. *J Clin Microbiol* 36:648–651
- Blumberg BS, Gerstley BJ, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI (1967) A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med* 66:924–931
- Bond M, Tejedor MF, Campbell KE, Chornogubsky L, Novo N, Goin F (2015) Eocene primates of South America and the African origins of New World monkeys. *Nature* 520:538–541. doi: 10.1038/nature14120
- Bonvicino CR, Moreira MA, Soares MA (2014) Hepatitis B virus lineages in mammalian hosts: Potential for bidirectional cross-species transmission. *World J Gastroenterol* 20:7665–7674. doi: 10.3748/wjg.v20.i24.7665
- Bukh J, Lanford RE, Purcell RH (2013) Persistent human hepatitis B virus infection in cynomolgus monkeys: A novel animal model in the search for a cure? *Hepatology* 58:1533–1536. doi: 10.1002/hep.26560
- Chouteau P, Le Seyec J, Cannie I, Nassal M, Guguen-Guillouzo C, Gripon P (2001) A short N-proximal region in the large envelope protein harbors a determinant that contributes to the species specificity of human hepatitis B virus. *J Virol* 75:11565–11572. doi: 10.1128/JVI.75.23.11565-11572.2001
- Dane DS, Cameron CH, Briggs M (1970) Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1:695–698
- Davies TJ, Pedersen AB (2008) Phylogeny and geography predict pathogen community similarity in wild primates and humans. *Proc Biol Sci* 275:1695–1701. doi: 10.1098/rspb.2008.0284
- Donkers JM, Zehnder B, van Westen GJP, Kwakkenbos MJ, IJzerman AP, Oude Elferink RPJ, Beuers U, Urban S, van de Graaf SFJ (2017) Reduced hepatitis B and D viral entry using clinically applied drugs as novel inhibitors of the bile acid transporter NTCP. *Sci Rep* 7:15307. doi: 10.1038/s41598-017-15338-0
- Döring B, Lütteke T, Geyer J, Petzinger E (2012) The SLC10 Carrier Family: Transport Functions and Molecular Structure. *Curr Top Membr* 70:105-165. doi: 10.1016/B978-0-12-394316-3.00004-1
- Drexler JF, Geipel A, König A, Corman VM, van Riel D, Leijten LM, Bremer CM, Rasche A, Cottontail VM, Maganga GD, Schlegel M, Müller MA, Adam A, Klose SM, Carneiro AJB, Stöcker A, Franke CR, Gloza-Rausch F, Geyer J, Annan A, Adu-Sarkodie Y, Oppong S, Binger T, Vallo P, Tschapka M, Ulrich RG, Gerlich WH, Leroy E, Kuiken T, Glebe D, Drosten C (2013) Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:16151–16156. doi: 10.1073/pnas.1308049110

- Dupinay T, Gheit T, Roques P, Cova L, Chevallier-Queyron P, Tasahsu S-i, Le Grand R, Simon F, Cordier G, Wakrim L, Benjelloun S, Trépo C, Chemin I (2013) Discovery of naturally occurring transmissible chronic hepatitis B virus infection among *Macaca fascicularis* from Mauritius Island. *Hepatology* 58:1610–1620. doi: 10.1002/hep.26428
- Fares MA, Holmes EC (2002) A revised evolutionary history of hepatitis B virus (HBV). *J Mol Evol* 54:807–814. doi: 10.1007/s00239-001-0084-z
- Fragaszy DM, Adams-Curtis LE (1998) Growth and reproduction in captive tufted capuchins (*Cebus apella*). *Am J Primatol* 44:197–203. doi: 10.1002/(SICI)1098-2345(1998)44:3<197:AID-AJP2>3.0.CO;2-R
- Friesema EC1, Docter R, Moerings EP, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ, Krenning EP, Hennemann G, Visser TJ (1999) Identification of Thyroid Hormone Transporters. *Biochem Biophys Res Commun* 254(2):497-501. DOI: 10.1006/bbrc.1998.9974
- Frimmer M, Ziegler K (1988) The transport of bile acids in liver cells. *Biochim Biophys Acta* 947(1):75-99. doi: 10.1016/0304-4157(88)90020-2
- Galibert F, Chen TN, Mandart E (1982) Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome: Comparison with the hepatitis B virus sequence. *J Virol* 41:51–65
- Gerlich WH (2013) Medical Virology of Hepatitis B: how it began and where we are now. *Virology* Jul 20;10:239. doi: 10.1186/1743-422X-10-239
- Geyer J, Wilke T, Petzinger E (2006) The solute carrier family SLC10: More than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 372:413–431. doi: 10.1007/s00210-006-0043-8
- Geyer J, Döring B, Meerkamp K, Ugele B, Bakhiya N, Fernandes CF, Godoy JR, Glatt H, Petzinger E (2007) Cloning and functional characterization of human sodium-dependent organic anion transporter (SLC10A6). *J Biol Chem* 282:19728–19741. doi: 10.1074/jbc.M702663200
- Glebe D, Urban S (2007) Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *WJG* 13:22. doi: 10.3748/wjg.v13.i1.22
- Glebe D, Bremer CM (2013) The molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis* 33:103–112. doi: 10.1055/s-0033-1345717
- Glebe D, Urban S, Knoop EV, Çağ N, Krass P, Grün S, Bulavaite A, Sasnauskas K, Gerlich WH (2005) Mapping of the Hepatitis B Virus Attachment Site by Use of Infection-Inhibiting preS1 Lipopeptides and Tupaia Hepatocytes. *Gastroenterology* 129:234–245. doi: 10.1053/j.gastro.2005.03.090
- GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators (2015) Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 385(9963):117-71. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61682-2



- Godoy JR, Fernandes C, Döring B, Beuerlein K, Petzinger E, Geyer J (2007) Molecular and phylogenetic characterization of a novel putative membrane transporter (SLC10A7), conserved in vertebrates and bacteria. *Eur J Cell Biol* 86:445–460. doi: 10.1016/j.ejcb.2007.06.001
- Hagenbuch B, Meier PJ (1994) Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter. *J Clin Invest* 93:1326–1331. doi: 10.1172/JCI117091
- Hagenbuch B, Stieger B, Foguet M, Lübbert H, Meier PJ (1991) Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na<sup>+</sup>/bile acid cotransport system. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 88:10629–10633
- Hofmann AF, Hagey LR (2008) Bile acids: Chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 65:2461–2483. doi: 10.1007/s00018-008-7568-6
- Hofmann AF, Hagey LR (2014) Key discoveries in bile acid chemistry and biology and their clinical applications: History of the last eight decades. *J Lipid Res* 55:1553–1595. doi: 10.1194/jlr.R049437
- Hopkins ME, Nunn CL (2007) A global gap analysis of infectious agents in wild primates. *Diversity and Distributions* 13:561–572. doi: 10.1111/j.1472-4642.2007.00364.x
- Hu N-J, Iwata S, Cameron AD, Drew D (2011) Crystal structure of a bacterial homologue of the bile acid sodium symporter ASBT. *Nature* 478:408–411. doi: 10.1038/nature10450
- Kahila Bar-Gal G, Kim MJ, Klein A, Shin DH, Oh CS, Kim JW, Kim T-H, Kim SB, Grant PR, Pappo O, Spigelman M, Shouval D (2012) Tracing hepatitis B virus to the 16th century in a Korean mummy. *Hepatology* 56:1671–1680. doi: 10.1002/hep.25852
- Kaneko M, Watashi K, Kamisuki S, Matsunaga H, Iwamoto M, Kawai F, Ohashi H, Tsukuda S, Shimura S, Suzuki R, Aizaki H, Sugiyama M, Park S-Y, Ito T, Ohtani N, Sugawara F, Tanaka Y, Mizokami M, Sureau C, Wakita T (2015) A Novel Tricyclic Polyketide, Vanitaracin A, Specifically Inhibits the Entry of Hepatitis B and D Viruses by Targeting Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide. *J Virol* 89:11945–11953. doi: 10.1128/JVI.01855-15
- König A, Döring B, Mohr C, Geipel A, Geyer J, Glebe D (2014) Kinetics of the bile acid transporter and hepatitis B virus receptor Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) in hepatocytes. *J Hepatol* 61:867–875. doi: 10.1016/j.jhep.2014.05.018
- Kramer W, Stengelin S, Baringhaus KH, Enhsen A, Heuer H, Becker W, Corsiero D, Girbig F, Noll R, Weyland C (1999) Substrate specificity of the ileal and the hepatic Na<sup>(+)</sup>/bile acid cotransporters of the rabbit. I. Transport studies with membrane vesicles and cell lines expressing the cloned transporters. *J Lipid Res* 40:1604–1617
- Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ (2004) Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* 126:322–342. doi: 10.1053/j.gastro.2003.06.005

- Kuntz RE, Myers BJ, Moore JA, Huang TC (1971) *Schistosoma haematobium*: Experimental Infection in Capuchin Monkey, *Cebus apella*. *Exp Parasitol* 29(1):33-41. doi: 10.1016/0014-4894(71)90007-5
- Lanford RE, Chavez D, Brasky KM, Burns RB, Rico-Hesse R (1998) Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 95:5757–5761. doi: 10.1073/pnas.95.10.5757
- Lempp FA, Wiedtke E, Qu B, Roques P, Chemin I, Vondran FWR, Le Grand R, Grimm D, Urban S (2017) Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is the limiting host factor of hepatitis B virus infection in macaque and pig hepatocytes. *Hepatology* 66:703–716. doi: 10.1002/hep.29112
- Littlejohn M, Locarnini S, Yuen L (2016) Origins and Evolution of Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6:a021360. doi: 10.1101/cshperspect.a021360
- Liu C, Xu G, Gao Z, Zhou Z, Guo G, Li D, Jing Z, Sui J, Li W (2018) The p.Ser267Phe variant of sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) supports HBV infection with a low efficiency. *Virology* 522:168–176. doi: 10.1016/j.virol.2018.07.006
- MacDonald DM, Holmes EC, Lewis JC, Simmonds P (2000) Detection of hepatitis B virus infection in wild-born chimpanzees (*Pan troglodytes verus*): Phylogenetic relationships with human and other primate genotypes. *J Virol* 74:4253–4257
- Makuwa M, Souquière S, Telfer P, Bourry O, Rouquet P, Kazanji M, Roques P, Simon F (2006) Hepatitis viruses in non-human primates. *J Med Primatol* 35:384–387. doi: 10.1111/j.1600-0684.2006.00163.x
- Mickleburgh S, Waylen K, Racey P (2009) Bats as bushmeat: A global review. *Oryx* 43:217–234. doi: 10.1017/S0030605308000938
- Molina H, Azocar L, Ananthanarayanan M, Arrese M, Miquel JF (2008) Localization of the Sodium-Taurocholate cotransporting polypeptide in membrane rafts and modulation of its activity by cholesterol in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1778:1283–1291. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.01.020
- Mühlemann B, Jones TC, Damgaard PdB, Allentoft ME, Shevnina I, Logvin A, Usmanova E, Panyushkina IP, Boldgiv B, Bazartseren T, Tashbaeva K, Merz V, Lau N, Smrčka V, Voyakin D, Kitov E, Epimakhov A, Pokutta D, Vicze M, Price TD, Moiseyev V, Hansen AJ, Orlando L, Rasmussen S, Sikora M, Vinner L, Osterhaus ADME, Smith DJ, Glebe D, Fouchier RAM, Drosten C, Sjögren K-G, Kristiansen K, Willerslev E (2018) Ancient hepatitis B viruses from the Bronze Age to the Medieval period. *Nature* 557:418–423. doi: 10.1038/s41586-018-0097-z
- Müller SF, König A, Döring B, Glebe D, Geyer J (2018) Characterisation of the hepatitis B virus cross-species transmission pattern via Na<sup>+</sup>/taurocholate co-transporting polypeptides from 11 New World and Old World primate species. *PLoS ONE* 13:e0199200. doi: 10.1371/journal.pone.0199200

- Ni Y-H, Chang M-H, Wu J-F, Hsu H-Y, Chen H-L, Chen D-S (2012) Minimization of hepatitis B infection by a 25-year universal vaccination program. *J Hepatol* 57:730–735. doi: 10.1016/j.jhep.2012.05.021
- Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, Nkongolo S, Kaufman C, Fälth M, Stindt J, Königer C, Nassal M, Kubitz R, Sültmann H, Urban S (2014) Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology* 146:1070–1083. doi: 10.1053/j.gastro.2013.12.024
- Nielsen R, Akey JM, Jakobsson M, Pritchard JK, Tishkoff S, Willerslev E (2017) Tracing the peopling of the world through genomics. *Nature* 541:302–310. doi: 10.1038/nature21347
- Nkongolo S, Ni Y, Lempp FA, Kaufman C, Lindner T, Esser-Nobis K, Lohmann V, Mier W, Mehrle S, Urban S (2014) Cyclosporin A inhibits hepatitis B and hepatitis D virus entry by cyclophilin-independent interference with the NTCP receptor. *J Hepatol* 60:723–731. doi: 10.1016/j.jhep.2013.11.022
- Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, Wiersma ST (2012) Global epidemiology of hepatitis B virus infection: New estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine* 30:2212–2219. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.12.116
- Paraskevis D, Angelis K, Magiorkinis G, Kostaki E, Ho SYW, Hatzakis A (2015) Dating the origin of hepatitis B virus reveals higher substitution rate and adaptation on the branch leading to F/H genotypes. *Mol Phylogenet Evol* 93:44–54. doi: 10.1016/j.ympev.2015.07.010
- Paraskevis D, Magiorkinis G, Magiorkinis E, Ho SYW, Belshaw R, Allain J-P, Hatzakis A (2013) Dating the origin and dispersal of hepatitis B virus infection in humans and primates. *Hepatology* 57:908–916. doi: 10.1002/hep.26079
- Petersen J, Dandri M, Mier W, Lütgehetmann M, Volz T, Weizsäcker F von, Haberkorn U, Fischer L, Pollok J-M, Erbes B, Seitz S, Urban S (2008) Prevention of hepatitis B virus infection in vivo by entry inhibitors derived from the large envelope protein. *Nat Biotechnol* 26:335–341. doi: 10.1038/nbt1389
- Petzinger E, Wickboldt A, Pagels P, Starke D, Kramer W (1999) Hepatobiliary transport of bile acid amino acid, bile acid peptide, and bile acid oligonucleotide conjugates in rats. *Hepatology* 30:1257–1268. doi: 10.1002/hep.510300529
- Rasche A, Souza BFdCD, Drexler JF (2016) Bat hepadnaviruses and the origins of primate hepatitis B viruses. *Curr Opin Virol* 16:86–94. doi: 10.1016/j.coviro.2016.01.015
- Sargiacomo C, El-Kehdy H, Pourcher G, Stieger B, Najimi M, Sokal E (2018) Age-dependent glycosylation of the sodium taurocholate cotransporter polypeptide: From fetal to adult human livers. *Hepatol Commun* 2:693–702. doi: 10.1002/hep4.1174
- Seeger C, Mason WS (2015) Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology* 479-480:672–686. doi: 10.1016/j.virol.2015.02.031

- Shimura S, Watashi K, Fukano K, Peel M, Sluder A, Kawai F, Iwamoto M, Tsukuda S, Takeuchi JS, Miyake T, Sugiyama M, Ogasawara Y, Park S-Y, Tanaka Y, Kusuhara H, Mizokami M, Sureau C, Wakita T (2017) Cyclosporin derivatives inhibit hepatitis B virus entry without interfering with NTCP transporter activity. *J Hepatol* 66:685–692. doi: 10.1016/j.jhep.2016.11.009
- Simmonds P (2001) The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. *J Gen Virol* 82:693–712. doi: 10.1099/0022-1317-82-4-693
- Slijepcevic D, Kaufman C, Wichers CGK, Gilgioni EH, Lempp FA, Duijst S, Waart DR de, Elferink RPJO, Mier W, Stieger B, Beuers U, Urban S, van de Graaf SFJ (2015) Impaired uptake of conjugated bile acids and hepatitis b virus pres1-binding in na(+)-taurocholate cotransporting polypeptide knockout mice. *Hepatology* 62:207–219. doi: 10.1002/hep.27694
- Souza BFdCD, König A, Rasche A, Oliveira Carneiro I de, Stephan N, Corman VM, Roppert PL, Goldmann N, Kepper R, Müller SF, Völker C, Souza AJS de, Gomes-Gouvêa MS, Moreira-Soto A, Stöcker A, Nassal M, Franke CR, Rebello Pinho JR, Soares MdCP, Geyer J, Lemey P, Drosten C, Netto EM, Glebe D, Drexler JF (2018) A novel hepatitis B virus species discovered in capuchin monkeys sheds new light on the evolution of primate hepadnaviruses. *J Hepatol* 68:1114–1122. doi: 10.1016/j.jhep.2018.01.029
- Stieger B, Hagenbuch B, Landmann L, Höchli M, Schroeder A, Meier PJ (1994) In situ localization of the hepatocytic Na<sup>+</sup>/Taurocholate cotransporting polypeptide in rat liver. *Gastroenterology* 107:1781–1787
- Sureau C, Negro F (2016) The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. *J Hepatol* 64:S102-S116. doi: 10.1016/j.jhep.2016.02.013
- Takeuchi JS, Fukano K, Iwamoto M, Tsukuda S, Suzuki R, Aizaki H, Muramatsu M, Wakita T, Sureau C, Watashi K (2018) A Single Adaptive Mutation in Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide Induced by Hepadnaviruses Determines Virus Species-specificity. doi: 10.1101/391490 (Preprint posted August 10, 2018 on www.biorxiv.org)
- Torres LB, Silva Araujo BH, Gomes de Castro PH, Romero Cabral F, Sarges Marruaz K, Silva Araujo M, Gomes da Silva S, Muniz JAPC, Cavalheiro EA (2010) The use of new world primates for biomedical research: An overview of the last four decades. *Am J Primatol* 72:1055–1061. doi: 10.1002/ajp.20864
- Trauner M, Boyer JL (2003) Bile salt transporters: Molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 83:633–671. doi: 10.1152/physrev.00027.2002
- Trauner M, Wagner M, Fickert P, Zollner G (2005) Molecular regulation of hepatobiliary transport systems: Clinical implications for understanding and treating cholestasis. *J Clin Gastroenterol* 39:S111-24
- Vaz FM, Huidekoper HH, Paulusma CC (2017) Extended Abstract: Deficiency of Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide (SLC10A1): A New Inborn Error of Metabolism with an Attenuated Phenotype. *Dig Dis* 35:259–260. doi: 10.1159/000450984

- Vaz FM, Paulusma CC, Huidekoper H, Ru M de, Lim C, Koster J, Ho-Mok K, Bootsma AH, Groen AK, Schaap FG, Oude Elferink RPJ, Waterham HR, Wanders RJA (2015) Sodium taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) deficiency: Conjugated hypercholanemia without a clear clinical phenotype. *Hepatology* 61:260–267. doi: 10.1002/hep.27240
- Wallen WC, Neubauer RH, Rabin H (1975) Evidence for suppressor cell activity associated with induction of Herpesvirus saimiri-induced lymphoma. *Clin Exp Immunol* 22(3):468-72
- Wang P, Mo R, Lai R, Xu Y, Lu J, Zhao G, Liu Y, Cao Z, Wang X, Li Z, Lin L, Zhou H, Cai W, Wang H, Bao S, Xiang X, Xie Q (2017) Genetic variations of NTCP are associated with susceptibility to HBV infection and related hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 8:105407–105424. doi: 10.18632/oncotarget.22211
- Weinman SA (1997) Electrogenicity of Na(+)-coupled bile acid transporters. *Yale J Biol Med* 70:331–340
- World Health Organization. Global hepatitis report 2017. Geneva 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- Wong MH, Oelkers P, Dawson PA (1995) Identification of a Mutation in the Ileal Sodium-dependent Bile Acid Transporter Gene That Abolishes Transport Activity. *J Biol Chem* 270:27228–27234. doi: 10.1074/jbc.270.45.27228
- Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H, Fu L, Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J, Li W (2012) Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* 1:e00049. doi: 10.7554/eLife.00049
- Yu Y, Li S, Liang W (2018) Bona fide receptor for hepatitis B and D viral infections: Mechanism, research models and molecular drug targets. *Emerg Microbes Infect* 7:134. doi: 10.1038/s41426-018-0137-7
- Zhou X, Levin EJ, Pan Y, McCoy JG, Sharma R, Kloss B, Bruni R, Quick M, Zhou M (2014) Structural basis of the alternating-access mechanism in a bile acid transporter. *Nature* 505:569–573. doi: 10.1038/nature12811

## 7 Danksagungen

Ich danke meiner Familie für ihren Beistand und die Unterstützung auf dem langen Weg zur Fertigstellung dieser Arbeit. Besonders meinen Eltern Gisela und Franz, die mir mein Studium und den Beginn der Doktorarbeit überhaupt erst ermöglicht haben.

Dem lieben Fräulein Dr. med. vet. Martina Alexandra Irrgang danke ich herzlich, dass sie den Großteil, dieser oft schwierigen Zeit, mit mir gemeinsam verbracht hat.

Allen meinen Freunden, die stets ein offenes Ohr hatten, danke ich sehr. Besonders jedoch Peter Klotz, ohne dessen Praktikum im Primatenzentrum, wären wir wahrscheinlich nicht auf die Idee gekommen, dort nach Proben zu fragen. Unsere Freundschaft ist ein Beispiel, dass die Freude an der Wissenschaft einen kann, was ansonsten vielleicht durch politische und religiöse Ansichten getrennt wäre.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Joachim Geyer danke ich sehr für die Chance meine Doktorarbeit am Institut anfertigen zu dürfen. Insbesondere danke ich für die bereitwillige Unterstützung und Förderung bei zahlreichen Kongressen und Fortbildungen. Auch durfte ich stets eigene Ideen im Labor verwirklichen.

Frau Dr. Barbara Döring danke ich sehr für die leider nur kurze, aber sehr schöne gemeinsame Zeit in Büro und Labor und für alles was sie mir beigebracht hat. Sie war mir der Post-Doc, den jeder Doktorand haben sollte.

Auch Herrn Dr. Jörg Alber danke ich sehr für die lustige gemeinsame Zeit im Büro und dass er als wandelndes Lexikon der Molekularbiologie immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Dr. Gary Grosser danke ich für seine herzliche und lustige Art und dass er stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Dr. Alexander König danke ich sehr für die gemeinsame Zeit, die vielen wissenschaftlichen und politischen Diskussionen und alles was er mir beigebracht hat.

Herrn Prof. Dr. Dieter Glebe danke ich sehr für die unkomplizierte und freundliche Kooperation mit unserem Institut. Auch stand er mir stets als virologischer Berater und Lehrer zur Seite. Es war immer eine Freude wissenschaftliche Ideen und Probleme mit ihm zu diskutieren.

Meinen lieben Kollegen Matthias Holtemeyer und Dr. Josefine Bennien danke ich herzlichst für die gemeinsame Zeit am Institut und auch in unserer gemeinsamen Freizeit. Es ist mir eine Freude mit Euch zu Arbeiten und befreundet zu sein.

Nun zuletzt aber am wichtigsten, denn ohne sie läuft an den Instituten nichts, möchte ich unserem technischen Personal danken.

Der lieben Sigrun „Siggi“ Broehl danke ich für die freundliche Unterstützung in der medizinischen Virologie.

Unserem lieben Pommologen Klaus Schuh, der es nun schon vor mir in den Ruhestand geschafft hat, danke ich für gute und herzliche Zusammenarbeit in der Zellkultur.

Birgit Kaus, unserem lieben Mädchen für alles, danke ich sehr für all die vielen Dinge, die sie jeden Tag für uns erledigt, in Schuss hält und die Unmengen an Paketen, die sie mir schon gebracht hat.

Ganz wesentlich bei meiner Arbeit unterstützt haben mich unsere beiden lieben Chef-TAs Regina Leidolf und Anita Neubauer, herzlichen Dank dafür!

Regina danke ich noch besonders für ihre beruhigende und liebe und Anita für ihrer umso feurigere und strenge Art. Es ist stets eine lehrreiche Freude mit Euch zu arbeiten.

Ich danke dem ganzen Institut für Pharmakologie und Toxikologie mit all den Menschen, die in meiner Zeit dort gekommen und gegangen sind.

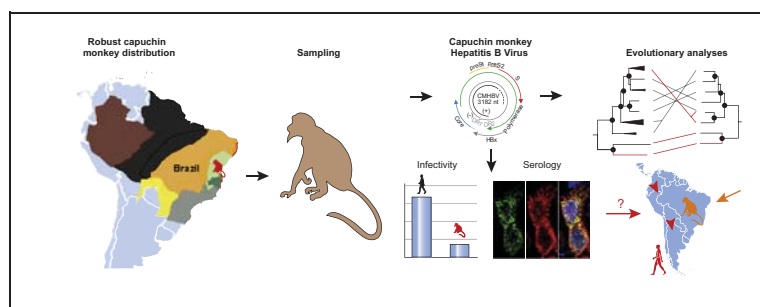
## **8 Anhang**

Es folgen Publikationen I und II als Anhang.



# A novel hepatitis B virus species discovered in capuchin monkeys sheds new light on the evolution of primate hepadnaviruses

## Graphical abstract



## Authors

Breno Frederico de Carvalho Dominguez Souza, Alexander König, Andrea Rasche, ..., Eduardo Martins Netto, Dieter Glebe, Jan Felix Drexler

## Correspondence

Dieter.Glebe@viro.med.uni-giessen.de  
(D. Glebe) felix.drexler@charite.de  
(J.F. Drexler)

## Highlights

- A divergent HBV species termed CMHBV was discovered in Brazilian capuchin monkeys.
- CMHBV and the related WMHBV use the same receptor as HBV to infect human cells.
- CMHBV may cause chronic hepatitis B, potentially enabling new animal models.
- Primates may have been carrying HBV-related viruses for millions of years.
- New World HBV genotypes were likely introduced during the peopling of the Americas.

## Lay summary

The origins of HBV are unclear. The new orthohepadnavirus species from Brazilian capuchin monkeys resembled HBV in elicited infection patterns and could infect human liver cells using the same receptor as HBV. Evolutionary analyses suggested that primate HBV-related viruses might have emerged in African ancestors of New World monkeys millions of years ago. HBV was associated with hominoid primates, including humans and apes, suggesting evolutionary origins of HBV before the formation of modern humans. HBV genotypes found in American natives were divergent from those found in American monkeys, and likely introduced along prehistoric human migration. Our results elucidate the evolutionary origins and dispersal of primate HBV, identify a new orthohepadnavirus reservoir, and enable new perspectives for animal models of hepatitis B.



# A novel hepatitis B virus species discovered in capuchin monkeys sheds new light on the evolution of primate hepadnaviruses

Breno Frederico de Carvalho Dominguez Souza<sup>1,2,†</sup>, Alexander König<sup>3,4,†</sup>, Andrea Rasche<sup>1,4,5,†</sup>,  
Ianei de Oliveira Carneiro<sup>6</sup>, Nora Stephan<sup>3,4</sup>, Victor Max Corman<sup>1,4,5</sup>, Pia Luise Roppert<sup>3,4</sup>,  
Nora Goldmann<sup>3,4</sup>, Ramona Kepper<sup>3,4</sup>, Simon Franz Müller<sup>7</sup>, Christof Völker<sup>8</sup>,  
Alex Junior Souza de Souza<sup>9,10</sup>, Michele Soares Gomes-Gouvêa<sup>11</sup>, Andrés Moreira-Soto<sup>1,5</sup>,  
Andreas Stöcker<sup>2</sup>, Michael Nassal<sup>12</sup>, Carlos Roberto Franke<sup>6</sup>, João Renato Rebello Pinho<sup>11,13</sup>,  
Manoel do Carmo Pereira Soares<sup>9</sup>, Joachim Geyer<sup>7</sup>, Philippe Lemey<sup>14</sup>, Christian Drosten<sup>1,4,5</sup>,  
Eduardo Martins Netto<sup>2</sup>, Dieter Glebe<sup>3,4,\*</sup>, Jan Felix Drexler<sup>1,4,5,\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Virology, University of Bonn Medical Centre, Bonn, Germany; <sup>2</sup>University Hospital Prof. Edgard Santos, Infectious Diseases Research Laboratory, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil; <sup>3</sup>Institute of Medical Virology, National Reference Center for Hepatitis B and D Viruses, Justus Liebig University, Giessen, Germany; <sup>4</sup>German Centre for Infection Research (Deutsches Zentrum für Infektionsforschung), Berlin, Germany; <sup>5</sup>Charité-Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Institute of Virology, Berlin, Germany; <sup>6</sup>School of Veterinary Medicine, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil; <sup>7</sup>Institute of Pharmacology and Toxicology, Justus Liebig University Giessen, Biomedical Research Center Seltersberg, Giessen, Germany; <sup>8</sup>Institute for Biochemistry and Molecular Biology, University of Bonn, Bonn, Germany; <sup>9</sup>Evandro Chagas Institute, Hepatology Section, Belém, Brazil; <sup>10</sup>Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; <sup>11</sup>Institute of Tropical Medicine and School of Medicine, LIM07, Department of Gastroenterology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; <sup>12</sup>Department of Internal Medicine II/Molecular Biology, University Hospital Freiburg, Freiburg, Germany; <sup>13</sup>Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil; <sup>14</sup>Department of Microbiology and Immunology, Rega Institute, KU Leuven, Leuven, Belgium

**Background & Aims:** All known hepatitis B virus (HBV) genotypes occur in humans and hominoid Old World non-human primates (NHPs). The divergent woolly monkey HBV (WMHBV) forms another orthohepadnavirus species. The evolutionary origins of HBV are unclear.

**Methods:** We analysed sera from 124 Brazilian monkeys collected during 2012–2016 for hepadnaviruses using molecular and serological tools, and conducted evolutionary analyses.

**Results:** We identified a novel orthohepadnavirus species in capuchin monkeys (capuchin monkey hepatitis B virus [CMHBV]). We found CMHBV-specific antibodies in five animals and high CMHBV concentrations in one animal. Non-inflammatory, probably chronic infection was consistent with an intact preCore domain, low genetic variability, core deletions in deep sequencing, and no elevated liver enzymes. Cross-reactivity of antisera against surface antigens suggested antigenic relatedness of HBV, CMHBV, and WMHBV. Infection-determining CMHBV surface peptides bound to the human HBV receptor (human sodium taurocholate co-transporting polypeptide), but preferentially interacted with the capuchin monkey receptor homologue. CMHBV and WMHBV pseudotypes infected human hepatoma cells via the human sodium

taurocholate co-transporting polypeptide, and were poorly neutralised by HBV vaccine-derived antibodies, suggesting that cross-species infections may be possible. Ancestral state reconstructions and sequence distance comparisons associated HBV with humans, whereas primate hepadnaviruses as a whole were projected to NHP ancestors. Co-phylogenetic analyses yielded evidence for co-speciation of hepadnaviruses and New World NHP. Bayesian hypothesis testing yielded strong support for an association of the HBV stem lineage with hominoid ancestors. Neither CMHBV nor WMHBV was likely the ancestor of the divergent human HBV genotypes F/H found in American natives.

**Conclusions:** Our data suggest ancestral co-speciation of hepadnaviruses and NHP, and an Old World origin of the divergent HBV genotypes F/H. The identification of a novel primate hepadnavirus offers new perspectives for urgently needed animal models of chronic hepatitis B.

**Lay summary:** The origins of HBV are unclear. The new orthohepadnavirus species from Brazilian capuchin monkeys resembled HBV in elicited infection patterns and could infect human liver cells using the same receptor as HBV. Evolutionary analyses suggested that primate HBV-related viruses might have emerged in African ancestors of New World monkeys millions of years ago. HBV was associated with hominoid primates, including humans and apes, suggesting evolutionary origins of HBV before the formation of modern humans. HBV genotypes found in American natives were divergent from those found in American monkeys, and likely introduced along prehistoric human migration. Our results elucidate the evolutionary origins and dispersal of primate HBV, identify a new orthohepadnavirus reservoir, and enable new perspectives for animal models of hepatitis B.

Keywords: Hepatitis B virus; Viral evolution; New World; Primate; Human dispersal. Received 31 March 2017; received in revised form 19 January 2018; accepted 27 January 2018; available online 8 February 2018

\* Corresponding authors. Address: Institute of Medical Virology, National Reference Center for Hepatitis B and D Viruses, Justus Liebig University, 35392 Giessen, Germany (D. Glebe), or Helmut-Ruska-Haus, Institute of Virology, Campus Charité Mitte, Charitéplatz 1, 10098 Berlin, Germany (J.F. Drexler). E-mail addresses: [Dieter.Glebe@viro.med.uni-giessen.de](mailto:Dieter.Glebe@viro.med.uni-giessen.de) (D. Glebe), [felix.drexler@charite.de](mailto:felix.drexler@charite.de) (J.F. Drexler).

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.



© 2018 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introduction

The hepatitis B virus (HBV) is one of the most important human pathogens, causing at least 680,000 deaths each year globally caused by chronic infection resulting in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma.<sup>1</sup> HBV is the prototype species of the genus *Orthohepadnavirus* in the family *Hepadnaviridae*. In humans, HBV comprises 10 genotypes named A–J.<sup>2</sup> Additional HBV genotypes infect Old World non-human primates (NHPs), including chimpanzees, gorillas, orangutans, and gibbons.<sup>3</sup> Infection of humans with HBV genotypes from NHPs has not been described yet. By contrast, NHPs can carry human HBV genotypes and HBV genotypes from other NHP species, illustrating the potential of primate HBV to cross the species barrier.<sup>3</sup> Different from other major blood-borne viruses, such as HIV, there is no evidence for an evolutionary origin of human HBV from viruses carried by Old World NHPs.<sup>4</sup> Similarly, the evolutionary origins of the divergent human HBV genotypes F and H associated with American natives inhabiting Alaska and Latin America are unknown.<sup>5</sup>

In the absence of known animal reservoirs for human HBV strains, the eradication of hepatitis B through universal vaccination and antiviral treatment might be possible.<sup>6</sup> We recently described a New World bat hepadnavirus that could infect human hepatocytes and was not neutralised by hepatitis B vaccine-induced antibodies.<sup>7</sup> Whether this bat virus may infect humans remains open, because direct contact between humans and bats (e.g. from hunting of bats as bushmeat) is rare in the New World.<sup>8</sup> By contrast, contact between indigenous American populations and NHP is more intense, including consumption of NHP, their keeping as pets, and the encroachment of NHP to human dwellings because of destruction of their natural habitats.<sup>9</sup> Additionally, the genetic relatedness of humans and NHP facilitates cross-species infections.<sup>10</sup>

The only other known primate hepadnavirus species beyond HBV, termed woolly monkey HBV (WMHBV), was described in 1998 from captive woolly monkeys (*Lagothrix lagotricha*).<sup>11</sup> Although the WMHBV forms a phylogenetic sister species to HBV, its description in a confined setting challenged definitive assertions on the role of New World NHPs for the evolutionary origins of HBV. Sampling of NHPs is difficult for ethical and technical reasons, and in consequence, South American NHPs are among the most understudied primate populations in terms of the infectious agents they may carry.<sup>12</sup> There are only four studies on HBV in New World NHPs that collectively analysed only about 100 animals.<sup>3</sup>

Here, we screened New World NHPs for hepadnaviruses and identified a novel HBV species in capuchin monkeys, which was highly divergent from WMHBV. Evolutionary and functional analyses enabled new hypotheses for primate HBV evolution, showed important similarities between the infection patterns of the novel hepadnavirus and HBV, and pointed at potential transmissibility of the novel HBV to humans.

## Materials and methods

Screening for hepadnaviruses, cloning, and infection assays were done, as described previously.<sup>7</sup> Evolutionary analyses

were done in a maximum likelihood and Bayesian framework using MEGA6 and BEAST.<sup>13,14</sup> Co-phylogenetic analyses were done using PACo, ParaFit, and CoRe-PA.<sup>15–17</sup> Ethical approval was obtained from Brazilian and German authorities.

For further details regarding the materials used, please refer to the [CTAT table](#) and [supplementary information](#).

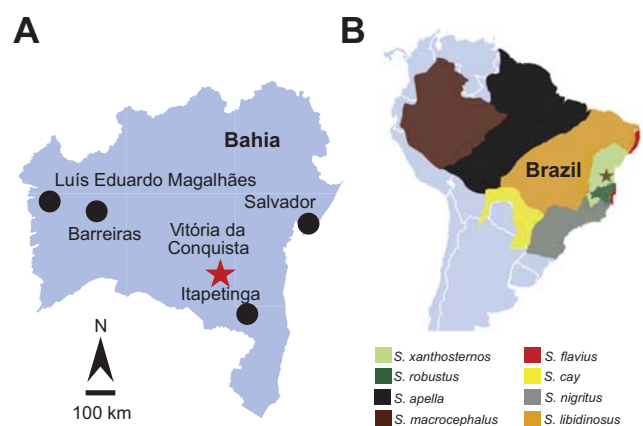
## Results

### Identification of a novel primate HBV

During 2012–2016, sera were sampled from 124 NHPs belonging to at least 10 species in three zoos and two shelters receiving confiscated animals from illegal trafficking in the state of Bahia, north-eastern Brazil (Fig. 1A). As shown in [Table S1](#), most sampled animals were robust capuchin monkeys (genus *Sapajus*, family Cebidae). Because of frequent hybridisation events between different *Sapajus* species (Fig. 1B) and because of animal trafficking over long distances, not all species could be unambiguously identified.<sup>18</sup> An adult female capuchin monkey kept in an animal shelter for about 1 year before sampling tested positive in a broadly reactive and highly sensitive *Hepadnaviridae* PCR assay,<sup>7</sup> whereas all other animals were PCR negative. The hepadnavirus-positive animal belonged to the species *Sapajus xanthosternos* (Table 1). This animal showed unspecific signs of disease, including thinness, lethargy, and mild dehydration, and died about 6 months after sampling. Unfortunately, no follow-up specimens were available. *Sapajus xanthosternos* is classified as “critically endangered” because of severe population decline and habitat loss,<sup>19</sup> and can currently only be found in small protected areas that overlap with our sampling sites (Fig. 1B).

### Genomic characterisation of the novel hepadnavirus

The full genome of the virus termed capuchin monkey HBV (CMHBV; GenBank accession number KY703886) was amplified by sets of overlapping PCRs directly from serum, as described previously,<sup>7</sup> and sequenced. The CMHBV genome spanned 3,182 nucleotides, and showed the typical length and organisation of an orthohepadnavirus genome, including four overlapping open reading frames encoding the predicted surface (S),



**Fig. 1. Sampling sites and *Sapajus* distribution.** (A) Bahia state with sampling sites. (B) Distribution of *Sapajus* species according to the Red List of Threatened Species from the International Union for Conservation of Nature. Red star, positive site.

Table 1. Virological and clinical findings in animals with signs of current or past hepadnavirus infection.\*

ID	Morphological species designation/mitochondrial DNA closest relative <sup>†</sup>	Weight (kg)/ Temperature (°C)/ Heart rate <sup>‡</sup>	PCR (DNA copies/ml)	Antibody status (end-point IFA titer)			Observations
				α HBV	α CMHBV	α HBV CMHBV LHBS	
M-05	<i>Sapajus xanthosternos</i> /S. xanthosternos	4.3/38.6/220	-	+	+	-	Adult; male; healthy; 1 year in shelter; sampled 2012
M-12	<i>S. xanthosternos</i> /S. xanthosternos	2.0/36.9/168	+ (9.2 × 10 <sup>6</sup> )	-	-	-	Adult; female; thinness, lethargy, mild dehydration; 1 year in shelter; sampled 2012
M-39	<i>Sapajus</i> sp./ <i>Sapajus robustus</i>	2.1/36.4/196	-	-	+	-	Adult; female; healthy; 1 year in shelter; sampled 2012
09	<i>Sapajus</i> sp./ <i>Sapajus apella</i>	1.8/37.9/230	-	-	+	-	Senile; female; very slim, multifocal alopecia in body; captured in 'Poco Escuro'; 2 years in shelter; sampled 2016
10	<i>Sapajus</i> sp./S. apella	1.8/37.8/234	-	-	+	-	Senile; female; very slim, multifocal alopecia in tail, enlarged submandibular lymph node; captured in 'Poco Escuro'; 2 years in shelter; sampled 2016
22	<i>Sapajus</i> sp./S. apella	2.5/37.7/258	-	+	+	-	Adult; female; lives in the wild in 'Poco Escuro'; sampled 2016

\* CMHBV, capuchin monkey hepatitis B virus; HBV, hepatitis B virus.

<sup>†</sup>Inherited only from the mother, thus not excluding hybridisation with different paternal species. COI reference entries were not available for all *Sapajus* species; cytochrome B reference entries from previous studies were conflicting, suggesting caution needs to be taken with definite species designations.

<sup>‡</sup>Beats per minute.

polymerase (Pol), core (C), and X proteins; conserved direct repeats; and the conserved RNA secondary structure epsilon involved in hepadnavirus replication (Fig. 2A and Fig. S1A). The CMHBV was equidistant from all other primate hepadnaviruses with a sequence distance averaged over the whole genome ranging between 20.4% (HBV genotype C) and 22.3% (HBV genotype F; Table 2). CMHBV was not significantly closer to WMHBV than to human and ape HBV (Fig. 2B). It significantly resembled WMHBV only in the preS1 and X domains. No evidence for genomic recombination involving the novel CMHBV was found using recombination detection tools. In sum, sequence distances exceeding the 20% threshold separating the primate hepadnavirus species WMHBV and HBV and the typical genome organisation confirmed the CMHBV as a new orthohepadnavirus species.

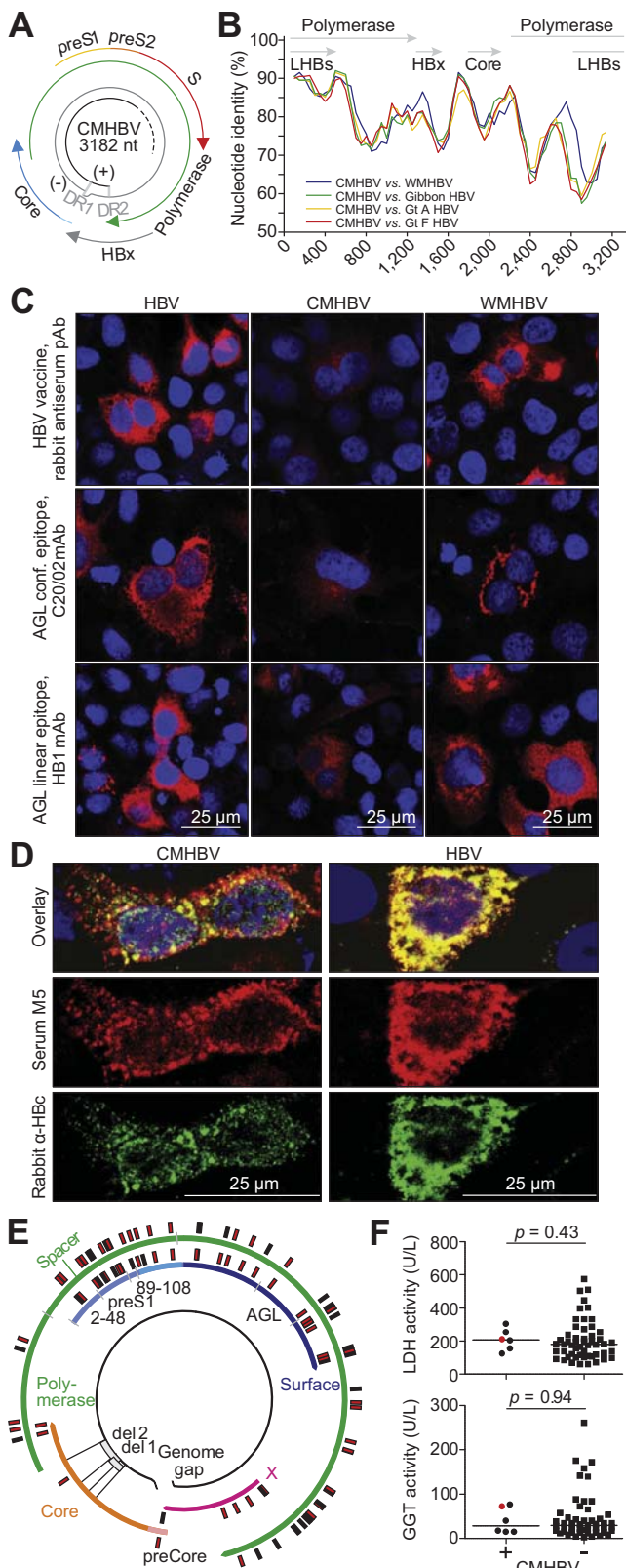
**Antigenic relatedness of HBV and New World monkey hepadnaviruses**

The predicted antigenic loop of CMHBV showed conserved location and length compared to HBV and WMHBV, including eight cysteine residues that are essential for the stability of the conformational surface epitopes (Fig. S1B). To confirm the antigenic relatedness among CMHBV, WMHBV, and HBV, we comparatively analysed the reactivity of different antisera with the S proteins of these hepadnaviruses. As expected, a polyclonal rabbit antiserum (pAb) against the conventional HBV vaccine (HBvaxPRO) and two monoclonal (mAb) anti-HBs antibodies showed reactivity against the three hepadnavirus S proteins in an immunofluorescence assay (IFA) (Fig. 2C). Compared to the HBV S antigen (HBsAg), the WMHBsAg showed similar reactivity with the antisera, whereas a weaker signal was observed for the CMHBsAg. Consistent with the low reactivity against HBV antisera, a diagnostic quantitative HBsAg assay showed strongly reduced reactivity with secreted CMHBsAg (Fig. S1C).

**Resurrection of the CMHBV for serological investigation**

The full CMHBV genome was cloned into an overlength expression vector, as described previously,<sup>7</sup> and used to transfect hepatoma cell lines expressing CMHBV proteins for serological analyses in an IFA. Whereas the CMHBV DNA-positive animal tested negative for CMHBV antibodies, five DNA-negative capuchin monkeys from the same sampling site tested positive for antibodies, showing IFA endpoint titres between 1:40 and 1:5,120 (Table 1). Comparative testing of all sera using cell cultures expressing overlength HBV constructs revealed only two HBV IFA-positive animals, and anti-HBV titres were at least two-fold and up to 64-fold lower than anti-CMHBV titres, consistent with cleared CMHBV infections in these animals. The cellular location of the IFA reactivity pattern was consistent with the typical anti-core reactivity pattern involving the nucleus and cytoplasm, and its specificity was confirmed by co-localisation using control antisera (exemplified in Fig. 2D). No animal tested positive in IFA using expression constructs for the CMHBV or HBV S antigen, which is comparable to the low production of anti-S antibodies frequently observed in HBV-infected humans after HBsAg clearance.<sup>20</sup> The occurrence of CMHBV antibody-positive animals during the whole observation period (2012–2016), including a free-ranging monkey, suggest maintenance of CMHBV in the location. According to morphological and genomic characteristics, CMHBV antibody-positive animals belonged to at least three different capuchin monkey species,





including *Sapajus robustus*, *S. apella*, and *S. xanthosternus* (Table 1).

**CMHBV infection patterns**

All five CMHBV antibody-positive animals were apparently healthy. Whether the signs of disease in the DNA-positive animal were caused by infection with the CMHBV, and whether it had an acute or chronic CMHBV infection status remain unknown. In any case, the virus had an intact preCore domain, suggesting production of hepadnaviral e-antigen (eAg). In human HBV, the eAg-positive, non-inflammatory phase is characterised by a high viral load and low mutation rate in the intra-patient quasispecies correlating with limited immune pressure.<sup>21</sup> Comparable to HBV, the CMHBV load was high with  $9.2 \times 10^8$  genome copies per millilitre. A total of 57 genomic sites were identified with at least 1% variation in deep sequencing, which is comparable to humans chronically infected with HBV (Fig. 2E and detailed in Table S2).<sup>22</sup> Almost all non-synonymous substitutions (d<sub>N</sub>) in the Pol mapped to the predicted spacer region, which may be partially dispensable for hepadnavirus replication,<sup>23</sup> implying limited impact of these d<sub>N</sub> on CMHBV replication efficiency. In agreement with limited antibody-mediated pressure, only two d<sub>N</sub> occurred in the antigenic loop at CMHBV SHBs residues 111 (P/S) and 160 (A/V) at low frequencies of 1–2% (Fig. S1B). Several reads containing two large deletions of up to 78 and 150 nucleotides were observed in the C open reading frame (Fig. 2E). The occurrence, location, and size of these C deletions were consistent with the deletion patterns found in chronic hepadnavirus infections of humans and woodchucks.<sup>24,25</sup> In summary, genomic patterns were consistent with a non-recent chronic replicative infection. Lack of anti-C antibodies may appear in conflict with a chronic infection status, and instead suggest an acute infection preceding seroconversion. However, absence of a detectable anti-C antibody response has been described in vertically infected chronic HBV carriers caused by foetal exposure to the immunomodulatory eAg,<sup>26</sup> pointing at a potential vertical infection. Finally, biochemical markers of systemic infection (lactate dehydrogenase) and liver damage (gamma-glutamyltransferase) were compared between the five CMHBV antibody- and the single CMHBV DNA-positive, as well as 53 CMHBV-negative animals, for which sufficient sample volumes were available. Lactate dehydrogenase and gamma-glutamyltransferase levels were within the range described for capuchin monkeys,<sup>27</sup> and no significant differences were

**Fig. 2. CMHBV infection patterns.** (A) CMHBV genomic organisation. (B) Genomic identity between the CMHBV and reference hepadnaviruses. (C) Staining of primate hepadnavirus small surface p+roteins expressed in Huh7 cells by anti-HBs sera. (D) Co-localisation of signals of rabbit control serum and monkey serum (animal M5). (E) Polymorphisms in the CMHBV near-full genome; red, non-synonymous; black, synonymous. Del, deletion (del 1, C positions 219–296; del 2, C positions 244–393). (F) LDH and GGT activity in units (U/L; n=6 for CMHBV-positive and n=53 for CMHBV-negative animals; red, CMHBV DNA-positive animal; line, median; p-values refer to Mann Whitney-U tests. AGL, antigenic loop; CMHBV, capuchin monkey hepatitis B virus; GGT, gamma-glutamyltransferase; HBV, hepatitis B virus; LDH, lactate dehydrogenase; WMHBV, woolly monkey hepatitis B virus.

**Table 2. Percentage sequence distance between CMHBV, WMHBV, and other primate hepadnaviruses.**

	CMHBV core (aa)	CMHBV LHBs (aa)	CMHBV Pol (aa)	CMHBV X (aa)	CMHBV complete genome (nt)	WMHBV complete genome (nt)
CMHBV						<b>20.5</b>
WMHBV	7.7–8.1	20.3	26.4–26.6	<b>28.7–29.3</b>	20.5	
ChHBV	8.1–12.9	21.1–23.1	26.9–28.4	30.7–34.0	21.1–21.8	21.5–22.5
GoHBV	8.6–9.5	21.1–21.3	27.4–27.9	30.1–31.6	21.2–21.7	21.6–22.0
OrHBV	<b>7.1–8.6</b>	21.1–22.6	27.0–28.1	29.4–31.4	20.6–20.9	21.2–21.9
GbHBV	<b>7.1–12.4</b>	<b>19.8–26.0</b>	<b>25.8–28.4</b>	30.1–35.9	20.5–21.8	21.3–23.1
HBV						
A	9.5–12.4	22.1–24.7	26.6–28.1	34.6– <b>37.9</b>	20.6–21.5	21.8–22.2
B	9.5–14.8	23.4–24.7	26.2–27.9	28.8–32.0	20.6–21.3	21.4–22.4
C	9.0–12.4	21.1–23.1	27.5–28.6	30.7–35.3	<b>20.4–21.1</b>	21.3–22.5
D	10.5–14.3	23.9–24.9	27.5– <b>29.0</b>	30.7–34.0	21.2–21.7	21.5–22.6
E	<b>16.2</b>	23.9	28.6	32.7	22.0	22.1–22.2
F	10.0–10.5	25.2– <b>26.5</b>	27.2–28.1	33.3–37.3	21.7– <b>22.3</b>	22.7–23.4
G	9.5	22.9	26.7	34.0	21.5	22.0–22.1
H	11.0	25.2	27.6	32.7	21.7	23.1–23.2
I	9.5–10.0	23.1–23.4	26.9–27.5	32.0–33.3	20.5–20.8	22.0–22.2
J	8.6	23.4	26.9	35.9	21.6	22.6–22.8
[A–J]	8.6–16.2	21.1–26.5	26.2–29.0	28.8–37.9	20.4–22.3	21.3– <b>23.4</b>
Overall	7.1–16.2	19.8–26.5	25.8–29.0	28.7–37.9	20.4–22.3	20.5–23.4
Mean (SD)	9.2 (1.8)	22.5 (1.3)	27.5 (0.6)	32.9 (1.9)	21.6 (0.4)	22.1 (0.4)

\* Highlighted in bold: lowest and highest distances (i.e. non-identity) within each column. Core open reading frame included the preCore domain. aa, amino acid; CMHBV, capuchin monkey hepatitis B virus; nt, nucleotide; WMHBV, woolly monkey hepatitis B virus.

observed between groups (Fig. 2F), which is compatible with a non-inflammatory CMHBV infection predicted by genomic comparisons.

**CMHBV receptor interactions**

Attachment to the HBV receptor, sodium taurocholate (TC) co-transporting polypeptide (NTCP), and entry into hepatocytes are mediated by two subdomains of the hepadnaviral preS1 domain.<sup>28</sup> The NTCP-interacting preS1 domains of CMHBV, WMHBV, and HBV were highly conserved (Fig. 3A), suggesting similarities of cellular entry processes between these primate orthohepadnaviruses. Hepatitis delta virus (HDV) pseudotyped with the CMHBV and WMHBV S proteins (HDV<sub>CMHBV</sub> and HDV<sub>WMHBV</sub>) could infect human hepatocytes expressing NTCP from either human (hNTCP) or *Tupaia* origin (*Tupaia* is a surrogate animal model for HBV infection), albeit less efficient than HDV<sub>HBV</sub> (Fig. 3B). The addition of high amounts of HBV vaccine-induced anti-HBs IgG blocked the HDV<sub>HBV</sub> infection efficiently (>99.5%), whereas HDV<sub>CMHBV</sub> and HDV<sub>WMHBV</sub> infections were only reduced by about 40% (Fig. 3C). The fact that even very high amounts of anti-HBs could not efficiently neutralise HDV<sub>CMHBV</sub> and HDV<sub>WMHBV</sub> was consistent with the antigenic differences between the S proteins of CMHBV and WMHBV compared to the HBV vaccine strain (Fig. S1B) and with suboptimal vaccine-induced protection against heterologous serotypes in humans infected with HBV.<sup>29–31</sup>

The capuchin monkey NTCP homologue was unknown before this study. To assess the host associations of CMHBV comparatively, we characterised the NTCP homologue of a capuchin monkey (*Sapajus* Ntcp [sNtcp]). The sNtcp and the hNTCP differed by 29 aminoacid residues (8.3%, Fig. S2). Since viral binding and entry compete with NTCP-mediated bile-acid transport,<sup>32</sup> we investigated the ability of sNtcp to mediate TC transportation. The sNtcp showed similar transport activity of TC compared to the hNTCP (Fig. 3D). Binding of HBV and WMHBV preS1 peptides to the hNTCP correlates with reduced TC transport in a quantitative manner.<sup>32,33</sup> Consistent with the host association of CMHBV, the CMHBV myr-preS1 peptide showed significantly stronger inhibition of TC transport by the

sNtcp compared to the hNTCP ( $p < 0.05$ ; Fig. 3E). Of note, the CMHBV myr-preS1 peptide-mediated reduction of TC transport by the hNTCP was still within the nanomolar range (Fig. 3E). This was consistent with the ability of CMHBV surface proteins to confer infection of human cells via the hNTCP (Fig. 3B).

**Phylogenetic relationships of the novel CMHBV**

In a maximum likelihood (ML) phylogenetic reconstruction of the full genomes of primate hepadnaviruses, CMHBV clustered with WMHBV with high statistical support, forming a basal sister lineage to the HBV genotypes (Fig. 4A and Fig. S3). The same topology was observed upon inclusion of non-primate orthohepadnaviruses into the phylogenetic analysis (Fig. S4A). These phylogenetic relations corroborated the existence of an expanded primate hepadnavirus clade containing HBV and relatively more diversified viruses from New World NHPs.

**Co-segregation of hepadnaviruses and their hosts**

Recent evidence suggests that orthohepadnaviruses may have co-evolved with their hosts.<sup>34</sup> Indeed, formal co-phylogenetic analyses comparing the overall agreement between virus and host trees<sup>15,16</sup> yielded statistically significant evidence ( $p < 0.005$ ) for co-segregation between primate hepadnaviruses and their hosts. However, of the 19 individual host–virus associations within the co-phylogenetic analysis, only the associations of CMHBV and WMHBV with their hosts were highly significant ( $p = 0.005$  and  $p = 0.014$ , respectively; red lines in Fig. 4B). For hominoid primates (apes and humans) and their hepadnaviruses, only a clade composed of HBV strains infecting *Nomascus* gibbons showed statistically significant co-segregation ( $p < 0.05$ ; Fig. 4B). In a confirmatory event-based co-phylogenetic reconstruction,<sup>17</sup> co-speciation was consistently observed for CMHBV and WMHBV and their hosts. By contrast, host-independent virus evolution was predominant among HBV. This included numerous duplication events (i.e. host-independent virus speciations) and sorting events (i.e. following host speciation, viruses remain on only one of the resulting species [Fig. 4C]). In sum, evidence for co-evolution was found chiefly for deep-branching hepadnaviruses from New

World NHPs, but less so for HBV strains infecting humans and hominoid primates. Therefore, co-evolution does not provide a likely explanation for the current phylogenetic relationships of HBV in hominoid primates.

### Reconstruction of ancestral host associations

Based on host associations in a Bayesian phylogeny, ancestral state reconstruction (ASR) at tree nodes was conducted. The most recent common ancestor (MRCA) of HBV was projected to a human host, rather than an NHP (posterior probability, 0.84) (Fig. 4D). This reconstruction was consistent with a higher patristic distance of HBV strains infecting humans (15.0%) than those infecting hominoid NHPs (10.9%). Only upon inclusion of CMHBV and WMHBV, hepadnavirus patristic distance was higher in NHPs than in humans with 23.1% (Fig. 4E). This was consistent with the projection of a NHP at the root of the primate hepadnavirus tree in ASR, albeit with lower statistical support (posterior probability, 0.72). Without the CMHBV, ASR yielded equal probability for a human or a NHP host at the root of the primate hepadnavirus tree (Fig. S4B), illustrating the relevance of CMHBV for the understanding of primate hepadnavirus origins. In sum, primate orthohepadnaviruses were projected to NHP ancestors, but less so to the HBV stem lineage.

### Hypothesis testing of HBV origins

To assess at what time HBV ancestors may have arisen within Old World primates (the Catarrhini), hypothesis testing was done in a time-calibrated Bayesian framework. In brief, the MRCA of HBV was calibrated by five different priors describing the origin of diverse primate ancestors. These priors included the origin of the Catarrhini (25.1 million years ago [mya];<sup>35</sup> Node 1 in Fig. 5A), of the Hominoidea (17.4 mya;<sup>35</sup> Node 2), of the genera *Homo* and *Pan* (5.54 mya;<sup>36</sup> Node 3), of the genus *Homo* (2.9 mya;<sup>37</sup> Node 4), and of anatomically modern humans (AMHs; 0.124 mya;<sup>38</sup> Node 5). Details of all calibrations are provided in the Supplementary methods.

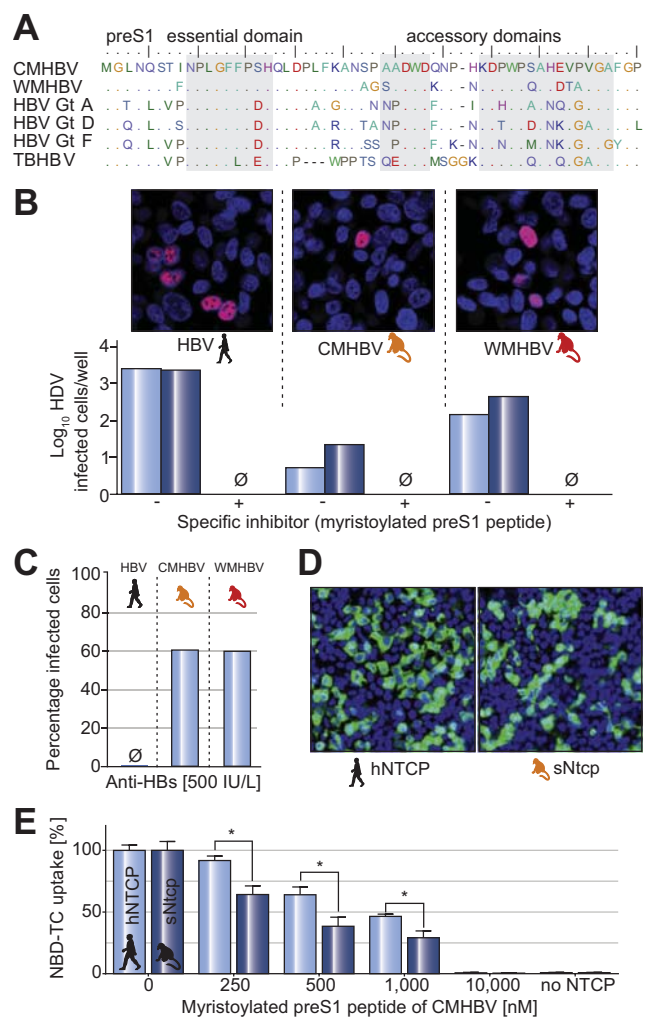
A relatively recent origin of HBV in AMH was not supported by these analyses, since all calibrations assigning MRCAs of primate ancestors were supported by significantly higher Bayes factors (BFs; commonly expressed as twice the natural logarithm [2 ln BF] in probabilistic theory;<sup>39</sup> Fig. 5A). The strongest support was found for an origin of HBV ancestors in Hominoidea (2 ln BF, 9.6–87.4 compared to all priors). Several confirmatory analyses using identical settings without the novel CMHBV also opposed an origin of HBV in AMH, but yielded considerably lower statistical support by up to five orders of magnitude for different calibrations (Fig. S4D), highlighting the importance of CMHBV for reconstructions of HBV origins.

In sum, evolutionary analyses supported an ancient and potentially co-evolutionary relationship between primate hepadnaviruses and NHP hosts, and strongly suggested an origin of HBV ancestors in Hominoid Old World primates, preceding the formation of the human stem lineage.

### Discussion

We discovered a new primate hepadnavirus species termed CMHBV from capuchin monkeys, and investigated its infection patterns and evolutionary history.

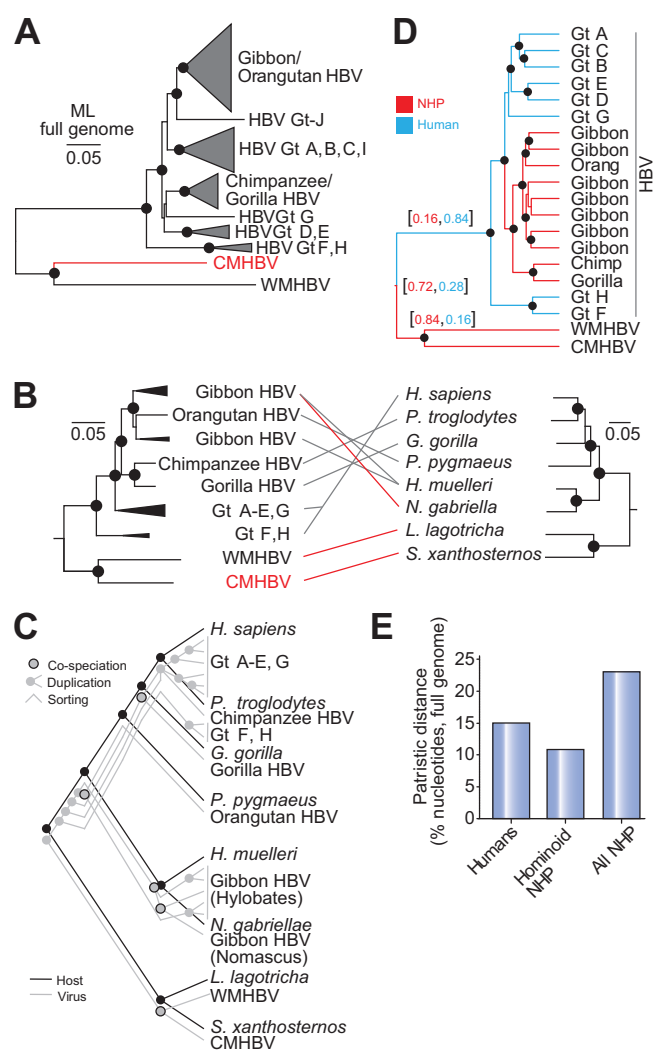
Our data suggest that catarrhine and platyrrhine primates have been carrying hepadnaviruses for millions of years, which disfavours a previous hypothesis assuming a split between



**Fig. 3. CMHBV-receptor interactions.** (A) PreS1 residues relevant for primate hepadnavirus entry. (B) Hepadnavirus LHB-mediated entry of HDV pseudotypes into human (light blue) or *Tupaia* (dark blue) NTCP-expressing hepatoma cells as detected by IFA for HDV antigen. (C) Neutralisation of pseudotypes by vaccine-induced antibodies (rabbit serum) relative to untreated inocula set as 100%. (D) NBD-TC (green) transport by human NTCP (hNTCP) and *Sapajus* NTCP (sNtcp) transiently expressed in HEK293 cells. Blue, nuclei. (E) Inhibition of hNTCP- and sNtcp-mediated transport of NBD-TC by myr-preS1-peptide of CMHBV relative to untreated controls (*t*-test, \**p* < 0.05). CMHBV, capuchin monkey hepatitis B virus; HBV, hepatitis B virus; hNTCP, human sodium taurocholate co-transporting polypeptide; NBD-TC, 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-taurocholate; sNtcp, *Sapajus* sodium taurocholate co-transporting polypeptide; WMHBV, woolly monkey hepatitis B virus.

hominoid HBV and hepadnaviruses from New World NHPs only several thousand years ago.<sup>40</sup> Similarly, an origin of all primate hepadnaviruses in New World monkeys is not supported by our results. A recent analysis consolidated an African origin of Platyrrhini and their arrival in South America at least 36 mya.<sup>41</sup> Our phylogenetic evidence is thus compatible with the existence of ancestral hepadnaviruses in African pre-platyrrhines introduced into South America during its transatlantic colonisation<sup>42</sup> (Fig. 5B). The strong evidence for an association of the HBV stem lineage with hominoid ancestors is compatible with the apparent absence of divergent HBV genotypes in cercopithecoid Old World primates.<sup>43</sup> Whether other hepadnavirus species may exist in extant cercopithecoid monkeys requires further





**Fig. 4. Evolutionary analyses including the novel hepadnavirus.** (A) Phylogenetic tree including NHP hepadnavirus complete genomes<sup>3</sup> and human HBV complete genomes.<sup>58</sup> (B) Co-phylogeny of primate hepadnaviruses and hosts; red lines, significant host-virus associations using ParaFit.<sup>16</sup> (C) Event-based co-phylogenetic reconstruction (CoRe-PA17). (D) Bayesian ancestral state reconstruction; filled circles in A, B, and E; bootstrap/posterior probability support >75%/>0.9; scale bar, substitutions per site. (E) Maximum sequence distances of complete hepadnavirus genomes from humans, hominoid NHPs, and all NHPs. CMHBV, capuchin monkey hepatitis B virus; Gt, genotype; HBV, hepatitis B virus; NHP, non-human primate; WMHBV, woolly monkey hepatitis B virus.

investigation, since the vast majority of primate species has not been investigated for hepadnaviruses.<sup>3</sup>

Whether indeed extant HBV genotypes infecting hominoid apes are the result of human-to-NHP transmission events,<sup>44</sup> as predicted in our analyses, or whether this apparent association with humans resulted from incomplete lineage sorting of HBV genotypes within hominoid NHPs remains to be determined in studies investigating whether divergent hepadnaviruses exist in hominoid NHPs.

One of the major obstacles to reconcile the evolutionary history of humans and HBV has been the enigmatic origin of the

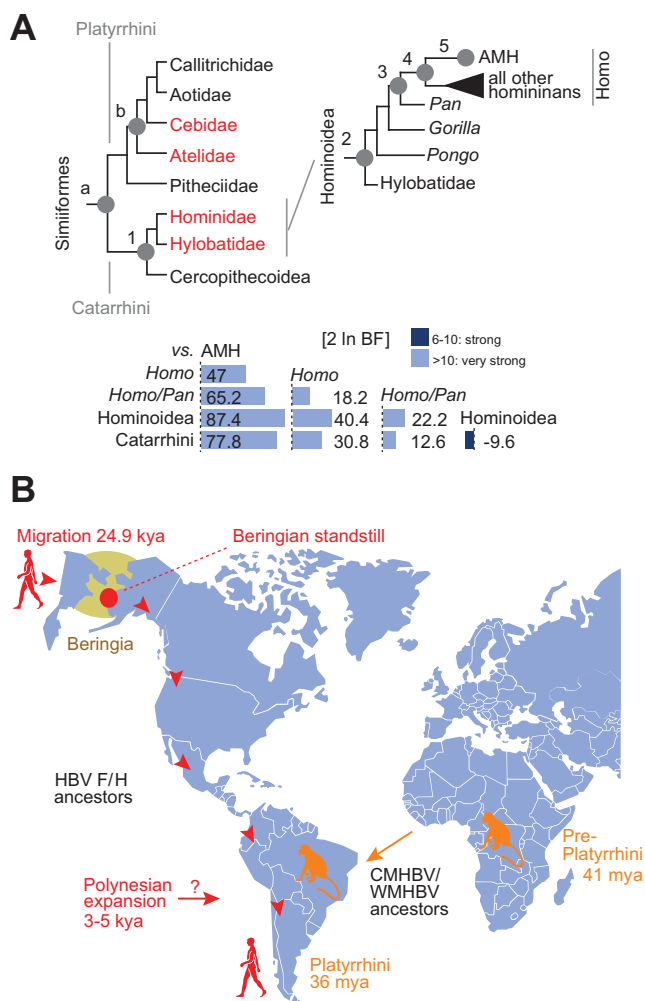
New World genotypes F and H.<sup>2</sup> Contrary to previous reconstructions,<sup>45</sup> neither the CMHBV nor the WMHBV appear to be direct evolutionary ancestors of HBV genotypes F and H. Our data thus suggest non-American origins of these divergent HBV genotypes. Recent evidence supports that human ancestors populating America were geographically isolated on the Beringian land bridge for about 9,000 years during the past glacial maximum.<sup>46</sup> It is conceivable that this relatively small group of people may have carried ancestors of HBV genotype F/H. The latter split into genotypes F and H<sup>47</sup> might have taken place during the rapid southward dispersal into the Americas<sup>46</sup> (Fig. 5B). HBV genotype F/H precursors in the Old World may have disappeared because of extinction events during the human dispersal history, as illustrated by the disappearance of HBV genotype C in Western Asia.<sup>2</sup>

Of note, recent evidence supports a potential pre-Columbian contact between Polynesians and South American natives about 3–5 thousand years ago,<sup>46</sup> which may be compatible with the occurrence of genotype F in Polynesia.<sup>48</sup> However, a hypothetical introduction of F/H ancestors into the Americas via the Polynesian route fails to explain the occurrence of genotype F in Alaska, and implies a relatively short time for the split into genotypes F and H and into four distinct F sub-genotypes. The slow long-term evolutionary rate of HBV challenging rapid speciation of genotypes F and H is best illustrated by the detection of a near-contemporary HBV genotype C sequence in a Korean mummy from the 16th century.<sup>2,49</sup> However, more than one introduction of genotype F/H ancestors into the Americas cannot be excluded at the current knowledge of the human dispersal history.

Our data on entry of viral pseudotypes into human hepatocytes and on interaction of CMHBV peptides with the human HBV receptor may imply a zoonotic potential of hepadnaviruses circulating in New World NHPs. However, infection experiments relying on full hepadnaviruses and primary human liver cells will be required to permit definite conclusions on the zoonotic potential of CMHBV. Of note, third-generation HBV vaccines containing preS1 epitopes<sup>50</sup> might be more potent to neutralise divergent hepadnaviruses, like CMHBV, efficiently, highlighting an additional value of newer vaccine generations.

Chronic hepatitis B infection remains a major human disease with no effective cure. Despite recent advances using transgenic mice,<sup>51</sup> research on hepatitis B cure is hampered by the lack of suitable animal models for persistent HBV infection.<sup>52</sup> Challenges to develop primate models for persistent hepatitis B infection include ethical constraints on the usage of chimpanzees, the endangered status of woolly monkeys, and non-persistent infection with WMHBV in spider monkeys.<sup>52</sup> Whether macaques may prove useful animal models for chronic hepatitis B remains to be confirmed.<sup>53</sup> Capuchin monkeys easily breed in captivity<sup>54</sup> and are among the most widely used New World primates in biomedical research.<sup>55</sup> Even though capuchin monkeys have not been widely used as animal models in recent infectious-disease research, pivotal studies on schistosomes and herpesviruses illustrate the technical usability of these animals for controlled infections.<sup>56,57</sup> The novel CMHBV showed preliminary evidence for the capacity to cause chronic infections and for a broad host range potentially facilitating infection studies in non-endangered capuchin monkey species. Our findings thus enable new perspectives to investigate HBV pathogenesis and cure.





**Fig. 5. Reconstructions of HBV origins.** (A) Cladogram of primates according to Springer *et al.*<sup>35</sup> Letters and numbers along primate cladograms represent nodes calibrated for hypothesis testing and results of Bayes factor tests (details provided in the Supplementary methods); strength of evidence from Bayes factor (BF) tests given as twice the natural logarithm (2 ln) according to Kass and Raftery.<sup>39</sup> (B) Biogeographic origins of American primates and potential hepadnavirus dispersal routes. Red, human origins and putative introduction of HBV genotypes F and H; orange, New World NHP origins and those of CMHBV and WMHBV ancestors. CMHBV, capuchin monkey hepatitis B virus; HBV, hepatitis B virus; kya, thousand years ago; mya, million years ago; NHP, non-human primate; WMHBV, woolly monkey hepatitis B virus.

### Financial support

This study was supported by funding from the German Research Foundation (DFG., DR 810/1-1 and GL 595/4-1 to J.F.D. and D.G.; SFB 1021/2, B08 to D.G. and J.G.), the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme through the COMPARE (grant agreement number 643476) and ZIKAlliance projects (grant agreement number 734548) to C.D. and J.F.D., and a University of Bonn Medical Centre intramural programme (BONFOR) to J.F.D. The funders had no role in study design; collection, analysis, and interpretation of data; writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

### Conflict of interest

The authors do not declare any conflict of interest.

Please refer to the accompanying ICMJE disclosure forms for further details.

### Authors' contributions

B.F.C.D.S., A.K., A.R.: acquisition, analysis, and interpretation of data. I.D.O.C.: design and execution of field work. V.M.C., N.S., P.L.R., N.G., R.K., S.F.M., C.V., A.M.S., A.J.S.D.S., M.S.G.G., A.S., M. N., C.R.F., J.R.R.P., M.D.C.P.S., J.G., P.L., C.D., E.M.N.: acquisition and analysis of data. D.G., J.F.D.: study concept, design, and supervision, and writing of the article.

### Acknowledgements

The authors thank Monika Eschbach-Bludau, Tobias Bleicker, Sebastian Brünink, Simon Käfer, Sigrun Broehl, Fernanda de Azevedo Liborio, Aderbal Azevedo, André Pereira Rodrigues, Lourdes Marina Bezerra Pessoa, Robert Lemos, Alberto Vinicius Dantas Oliveira, Gerson de Oliveira Norberto, Mila Hughes, Maria Isabel Magalhães, Mariana Cedraz, Célia Pedroso, Diana Andrade, Indira Trüeb, and the Federal Agency for Nature Conservation (BfN, Stefan Raths) for assistance and advice, and Wolfram Gerlich for critical reading of the manuscript.

### Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.01.029>.

### References

Author names in bold designate shared co-first authorship

- [1] GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015;385:117–171.
- [2] Littlejohn M, Locarnini S, Yuen L. Origins and evolution of hepatitis B virus and hepatitis D virus. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016;6:1–20.
- [3] Rasche A, Souza BF, Drexler JF. Bat hepadnaviruses and the origins of primate hepatitis B viruses. *Curr Opin Virol* 2016;16:86–94.
- [4] Simmonds P. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. *J Gen Virol* 2001;82:693–712.
- [5] Alvarado-Mora MV, Pinho JR. Distribution of HBV genotypes in Latin America. *Antivir Ther* 2013;18:459–465.
- [6] Alter HJ. To have B or not to have B: vaccine and the potential eradication of hepatitis B. *J Hepatol* 2012;57:715–717.
- [7] **Drexler JF, Geipel A, König A, Corman VM, van Riel D, Leijten LM, et al.** Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:16151–16156.
- [8] Mickleburgh S, Waylen K, Racey P. Bats as bushmeat: a global review. *Oryx* 2009;43:217–234.
- [9] Anonymous. Going to pot: The neotropical bushmeat crisis and its impact on primate populations: care for the wild, Kingsfold, United Kingdom & pro wildlife, Munich, Germany. [https://www.prowildlife.de/wp-content/uploads/2016/03/Going-to-pot\\_2007\\_klein.pdf](https://www.prowildlife.de/wp-content/uploads/2016/03/Going-to-pot_2007_klein.pdf) Accessed 2 January 2017.
- [10] Davies TJ, Pedersen AB. Phylogeny and geography predict pathogen community similarity in wild primates and humans. *Proc Biol Sci* 2008;275:1695–1701.
- [11] Lanford RE, Chavez D, Brasky KM, Burns 3rd RB, Rico-Hesse R. Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:5757–5761.
- [12] Hopkins ME, Nunn CL. A global gap analysis of infectious agents in wild primates. *Divers Distrib* 2007;13:561–572.
- [13] Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol* 2012;29:1969–1973.
- [14] Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30:2725–2729.
- [15] Balbuena JA, Miguez-Lozano R, Blasco-Costa I. PACo: a novel procrustes application to cophylogenetic analysis. *PLoS One* 2013;8:e61048.

- [16] Legendre P, Desveives Y, Bazin E. A statistical test for host-parasite coevolution. *Syst Biol* 2002;51:217–234.
- [17] Merkle D, Middendorf M, Wieseke N. A parameter-adaptive dynamic programming approach for inferring cophylogenies. *BMC Bioinform* 2010;11:S60.
- [18] Lynch Alfaro JW, Izar P, Ferreira RG. Capuchin monkey research priorities and urgent issues. *Am J Primatol* 2014;76:705–720.
- [19] Kierulff MCM, Mendes SL, Rylands AB. *Sapajus xanthosternos*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: eT4074A70615251 <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-1.RLTS.T4074A70615251.en>. Downloaded on 30 September 2016.
- [20] Aragri M, Alteri C, Battisti A, Di Carlo D, Minichini C, Sagnelli C, et al. Multiple hepatitis B virus (HBV) quasispecies and immune-escape mutations are present in HBV surface antigen and reverse transcriptase of patients with acute hepatitis B. *J Infect Dis* 2016;213:1897–1905.
- [21] Bertoletti A, Hong M. Age-dependent immune events during HBV infection from birth to adulthood: an alternative interpretation. *Front Immunol* 2014;5:441.
- [22] Lin YY, Liu C, Chien WH, Wu LL, Tao Y, Wu D, et al. New insights into the evolutionary rate of hepatitis B virus at different biological scales. *J Virol* 2015;89:3512–3522.
- [23] Radziwill G, Tucker W, Schaller H. Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J Virol* 1990;64:613–620.
- [24] Botta A, Lu M, Zhen X, Kemper T, Roggendorf M. Naturally occurring woodchuck hepatitis virus (WHV) deletion mutants in chronically WHV-infected woodchucks. *Virology* 2000;277:226–234.
- [25] Tsubota A, Kumada H, Takaki K, Chayama K, Kobayashi M, Kobayashi M, et al. Deletions in the hepatitis B virus core gene may influence the clinical outcome in hepatitis B e antigen-positive asymptomatic healthy carriers. *J Med Virol* 1998;56:287–293.
- [26] Ni YH, Hsu HY, Chang MH, Chen DS, Lee CY. Absence or delayed appearance of hepatitis B core antibody in chronic hepatitis B surface antigen carrier children. *J Hepatol* 1993;17:150–154.
- [27] Nunez H, Araya M, Cisternas F, Arredondo M, Mendez M, Pizarro F, et al. Blood biochemical indicators in young and adult *Cebus apella* of both sexes. *J Med Primatol* 2008;37:12–17.
- [28] Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife* 2012;1:e00049.
- [29] Stramer SL, Wend U, Candotti D, Foster GA, Hollinger FB, Dodd RY, et al. Nucleic acid testing to detect HBV infection in blood donors. *N Engl J Med* 2011;364:236–247.
- [30] Tacke F, Amini-Bavil-Olyae S, Heim A, Luedde T, Manns MP, Trautwein C. Acute hepatitis B virus infection by genotype F despite successful vaccination in an immune-competent German patient. *J Clin Virol* 2007;38:353–357.
- [31] Wen WH, Chen HL, Ni YH, Hsu HY, Kao JH, Hu FC, et al. Secular trend of the viral genotype distribution in children with chronic hepatitis B virus infection after universal infant immunization. *Hepatology* 2011;53:429–436.
- [32] Konig A, Doring B, Mohr C, Geipel A, Geyer J, Glebe D. Kinetics of the bile acid transporter and hepatitis B virus receptor Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) in hepatocytes. *J Hepatol* 2014;61:867–875.
- [33] Lempp FA, Wiedtke E, Qu B, Roques P, Chemin I, Vondran FW, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is the limiting host factor of hepatitis B virus infection in macaque and pig hepatocytes. *Hepatology* 2017;66:703–716.
- [34] Lauber C, Seitz S, Mattei S, Suh A, Beck J, Herstein J, et al. Deciphering the origin and evolution of hepatitis B viruses by means of a family of non-enveloped fish viruses. *Cell Host Microbe* 2017;22:387–399.
- [35] Springer MS, Meredith RW, Gatesy J, Emerling CA, Park J, Rabosky DL, et al. Macroevolutionary dynamics and historical biogeography of primate diversification inferred from a species supermatrix. *PLoS One* 2012;7:e49521.
- [36] Foley NM, Springer MS, Teeling EC. Mammal madness: is the mammal tree of life not yet resolved? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2016;371:1–11.
- [37] Gomez-Robles A, Smaers JB, Holloway RL, Polly PD, Wood BA. Brain enlargement and dental reduction were not linked in hominin evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:468–473.
- [38] Poznik GD, Henn BM, Yee MC, Sliwerska E, Euskirchen GM, Lin AA, et al. Sequencing Y chromosomes resolves discrepancy in time to common ancestor of males vs. females. *Science* 2013;341:562–565.
- [39] Kass RE, Raftery AE. Bayes factors. *J Am Stat Assoc* 1995;90:773–795.
- [40] Fares MA, Holmes EC. A revised evolutionary history of hepatitis B virus (HBV). *J Mol Evol* 2002;54:807–814.
- [41] Bond M, Tejedor MF, Campbell Jr KE, Chornogubsky L, Novo N, Goin F. Eocene primates of South America and the African origins of New World monkeys. *Nature* 2015;520:538–541.
- [42] Houle A. The origin of platyrrhines: an evaluation of the Antarctic scenario and the floating island model. *Am J Phys Anthropol* 1999;109:541–559.
- [43] Makuwa M, Souquiere S, Telfer P, Bourry O, Rouquet P, Kazanji M, et al. Hepatitis viruses in non-human primates. *J Med Primatol* 2006;35:384–387.
- [44] Paraskevis D, Magiorkinis G, Magiorkinis E, Ho SY, Belshaw R, Allain JP, et al. Dating the origin and dispersal of hepatitis B virus infection in humans and primates. *Hepatology* 2013;57:908–916.
- [45] Grethe S, Heckel JO, Rietschel W, Hufert FT. Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates. *J Virol* 2000;74:5377–5381.
- [46] Nielsen R, Akey JM, Jakobsson M, Pritchard JK, Tishkoff S, Willerslev E. Tracing the peopling of the world through genomics. *Nature* 2017;541:302–310.
- [47] Paraskevis D, Angelis K, Magiorkinis G, Kostaki E, Ho SY, Hatzakis A. Dating the origin of hepatitis B virus reveals higher substitution rate and adaptation on the branch leading to F/H genotypes. *Mol Phylogenet Evol* 2015;93:44–54.
- [48] Blitz L, Pujol FH, Swenson PD, Porto L, Atencio R, Araujo M, et al. Antigenic diversity of hepatitis B virus strains of genotype F in Amerindians and other population groups from Venezuela. *J Clin Microbiol* 1998;36:648–651.
- [49] Kahila Bar-Gal G, Kim MJ, Klein A, Shin DH, Oh CS, Kim JW, et al. Tracing hepatitis B virus to the 16th century in a Korean mummy. *Hepatology* 2012;56:1671–1680.
- [50] Shouval D, Roggendorf H, Roggendorf M. Enhanced immune response to hepatitis B vaccination through immunization with a Pre-S1/Pre-S2/S vaccine. *Med Microbiol Immunol* 2015;204:57–68.
- [51] Tian Y, Kuo CF, Akbari O, Ou JH. Maternal-derived hepatitis B virus e antigen alters macrophage function in offspring to drive viral persistence after vertical transmission. *Immunity* 2016;44:1204–1214.
- [52] Bukh J, Lanford RE, Purcell RH. Persistent human hepatitis B virus infection in cynomolgus monkeys: a novel animal model in the search for a cure? *Hepatology* 2013;58:1533–1536.
- [53] Dupinay T, Gheit T, Roques P, Cova L, Chevallier-Queyron P, Tasahsu SI, et al. Discovery of naturally occurring transmissible chronic hepatitis B virus infection among *Macaca fascicularis* from Mauritius Island. *Hepatology* 2013;58:1610–1620.
- [54] Fragaszy DM, Adams-Curtis LE. Growth and reproduction in captive tufted capuchins (*Cebus apella*). *Am J Primatol* 1998;44:197–203.
- [55] Torres LB, Silva Araujo BH, Gomes de Castro PH, Romero Cabral F, Sarges Marruaz K, Silva Araujo M, et al. The use of new world primates for biomedical research: an overview of the last four decades. *Am J Primatol* 2010;72:1055–1061.
- [56] Kuntz RE, Myers BJ, Moore JA, Huang TC. *Schistosoma haematobium*: experimental infection in capuchin monkey, *Cebus apella*. *Exp Parasitol* 1971;29:33–41.
- [57] Rabin H, Pearson GR, Wallen WC, Neubauer RH, Cicmanec JL, Orr TW. Infection of capuchin monkeys (*Cebus albifrons*) with Herpesvirus saimiri. *J Natl Cancer Inst* 1975;54:673–677.
- [58] Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyae S, Kurbanov F, Van Ranst M, Tacke F. Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes: revised classification hurdles and updated resolutions. *World J Gastroenterol* 2014;20:7152–7168.

RESEARCH ARTICLE

# Characterisation of the hepatitis B virus cross-species transmission pattern via Na<sup>+</sup>/taurocholate co-transporting polypeptides from 11 New World and Old World primate species

Simon F. Müller<sup>1</sup>, Alexander König<sup>2</sup>, Barbara Döring<sup>1</sup>, Dieter Glebe<sup>2</sup>, Joachim Geyer<sup>1\*</sup>

**1** Institute of Pharmacology and Toxicology, Biomedical Research Center Seltersberg, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany, **2** Institute of Medical Virology, Biomedical Research Center Seltersberg, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany

\* [Joachim.M.Geyer@vetmed.uni-giessen.de](mailto:Joachim.M.Geyer@vetmed.uni-giessen.de)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Müller SF, König A, Döring B, Glebe D, Geyer J (2018) Characterisation of the hepatitis B virus cross-species transmission pattern via Na<sup>+</sup>/taurocholate co-transporting polypeptides from 11 New World and Old World primate species. PLoS ONE 13(6): e0199200. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199200>

**Editor:** Haitao Guo, Indiana University, UNITED STATES

**Received:** March 13, 2018

**Accepted:** June 4, 2018

**Published:** June 18, 2018

**Copyright:** © 2018 Müller et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files. All newly cloned sequences were deposited at the DDBJ/ENA/GenBank database with the Accession numbers given in the manuscript.

**Funding:** The study was supported in part by funding from the Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG (<http://www.dfg.de>), Sonderforschungsbereich SFB1021/2 "RNA viruses: RNA metabolism, host response and

## Abstract

The hepatic Na<sup>+</sup>/taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP in man, Ntcp in animals) is the high-affinity receptor for the hepatitis B (HBV) and hepatitis D (HDV) viruses. Species barriers for human HBV/HDV within the order Primates were previously attributed to Ntcp sequence variations that disable virus-receptor interaction. However, only a limited number of primate Ntcps have been analysed so far. In the present study, a total of 11 Ntcps from apes, Old and New World monkeys were cloned and expressed *in vitro* to characterise their interaction with HBV and HDV. All Ntcps showed intact bile salt transport. Human NTCP as well as the Ntcps from the great apes chimpanzee and orangutan showed transport-competing binding of HBV derived myr-preS1-peptides. In contrast, all six Ntcps from the group of Old World monkeys were insensitive to HBV myr-preS1-peptide binding and HBV/HDV infection. This is basically predetermined by the amino acid arginine at position 158 of all studied Old World monkey Ntcps. An exchange from arginine to glycine (as present in humans and great apes) at this position (R158G) alone was sufficient to achieve full transport-competing HBV myr-preS1-peptide binding and susceptibility for HBV/HDV infection. New World monkey Ntcps showed higher sequence heterogeneity, but in two cases with 158G showed transport-competing HBV myr-preS1-peptide binding, and in one case (*Saimiri sciureus*) even susceptibility for HBV/HDV infection. In conclusion, amino acid position 158 of NTCP/Ntcp is sufficient to discriminate between the HBV/HDV susceptible group of humans and great apes (158G) and the non-susceptible group of Old World monkeys (158R). In the case of the phylogenetically more distant New World monkey Ntcps amino acid 158 plays a significant, but not exclusive role.

pathogenesis", project B08 to JG and DG. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

The hepatic Na<sup>+</sup>/taurocholate co-transporting peptide (NTCP in man, Ntcp in animals, gene name: *SLC10A1/Slc10a1*) together with the closely related intestinal apical sodium-dependent bile acid transporter ASBT/Asbt are essential drivers of the enterohepatic circulation of bile salts in mammals [1]. However, only NTCP is exploited by the human hepatitis B (HBV) and hepatitis D (HDV) viruses as high-affinity binding and entry receptor for productive infection of hepatocytes [2–4]. Since NTCP/Ntcp is mainly expressed in hepatocytes [5], the strict liver tropism of HBV and HDV can mainly be explained by organ-specific expression of this receptor protein.

HBV is considered to be a major global health problem with ~250 million chronic HBV carriers and ~1 million HBV-associated human deaths per year [6]. Within the viral family of *Hepadnaviridae* HBV represents the prototype species of the genus *Orthohepadnavirus* infecting mammals. Related hepadnaviruses have been isolated from nonhuman primates, including chimpanzee, gorilla, orangutan, and gibbon [7]. Whereas in the closely related primate family of *Cercopithecoidea* (Old World monkeys, OWM, i.e. macaques and baboons) a specific endogenous hepadnavirus has not been identified so far (despite the sporadic finding of HBV in a *Macaca fascicularis* colony from Mauritius, see below), two hepadnavirus species have been detected in more distantly related families of *Platyrrhini*, representing New World monkeys (NWM). Woolly monkey HBV (WMHBV) was originally isolated from a captive woolly monkey (*Lagothrix lagotricha*, family *Atelidae*) with fulminant hepatitis [8] and very recently capuchin monkey HBV (CMHBV) was identified in *Sapajus xanthosternos* (family *Cebidae*) during systematic screening of NWM for novel hepadnaviruses in Brasil [9].

HBV is a small enveloped DNA virus. The partially double-stranded genome of approximately 3.2 kb is coding for large (LHBs), middle (MHBs) and small (SHBs) HBV surface proteins [10]. Among them, the myristoylated preS1-peptide (myr-preS1), comprising the 2–48 N-terminal amino acids of the LHBs, is most relevant for the species-specific infection of hepatocytes [11]. HDV is an enveloped RNA virus and is only found in humans. HDV is a defective virus and requires HBV surface proteins for envelopment, secretion into blood, and infection of hepatocytes via NTCP [12]. Based on the current knowledge, the following factors are relevant for the early entry phase of HBV/HDV infection: (I) low affinity attachment to hepatic heparan sulfate proteoglycans [10], (II) myr-preS1-mediated high-affinity binding to NTCP/Ntcp [2], and (III) viral entry via internalisation of the virus/receptor complex [13]. Whereas the precise sequence of the viral preS1-peptide seems to be only relevant for (II), separate domains of the host NTCP/Ntcp receptor allow or reject virus binding (II) and entry (III) [2,3,14].

Several interspecies transmissions between man and closely-related genera of *Hominoidea* (*Pan*, *Gorilla*, *Pongo*, and *Hylobates*) have been reported, e.g. evidence of HBV from gibbon and human origin in chimpanzees [7]. Although the Ntcp receptor sequence from the apes has not been explicitly investigated so far, this finding is most likely based on high sequence homology among the viral preS1-peptides as well as the NTCP/Ntcp receptor proteins of apes and humans.

In contrast, macaques and baboons were generally regarded as unsusceptible to HBV infection. But, sporadic detection of HBV in these OWMs was reported, e.g. presence of a specific human HBV subgenotype in a *Macaca fascicularis* colony from Mauritius Island [15]. In this study the authors claim that hepatocytes from these Mauritius macaques could not be infected with wild type human HBV, but only with the special HBV isolate from the infected Mauritius macaques [15]. In contrast, in another study hepatocytes and Ntcp from *Macaca fascicularis* and *Macaca mulatta* were neither able to bind the HBV myr-preS1-peptide nor mediate HBV



infection [2,16]. This might indicate that the mutations found within the preS1 sequence of the Mauritius HBV isolate adapted to the otherwise HBV insensitive macaque Ntcp. However, this hypothesis could not be confirmed since neither the experimentally reconstructed Mauritius macaque HBV strain nor HBV wild type strains could infect hepatocytes from Mauritian cynomolgus macaques *in vivo* or *in vitro* [17].

For the NWM hepadnavirus from woolley monkey (WMHBV) interspecies transmission was clearly demonstrated. Apart from woolley monkey, also spider monkey (*Ateles geoffroyi*) and primary hepatocytes from the more distant *Tupaia belangeri* (asian treeshrew) are susceptible to WMHBV infection as well as primary chimpanzee and human hepatocytes *in vitro*, but with much lower efficiencies [8,18,19]. The molecular determinants relevant for the interspecies transmission between the *Hominoidea* primates and the NWMs were not completely elucidated so far, in particular as only limited information is available for OWM and NWM Ntcp.

In order to more systematically investigate potential species barriers for viral transmission in primates, 11 Ntcp from representative species of different primate families (apes, OWM, NWM) were cloned and characterised for bile salt transport function. Furthermore, their susceptibility for virus binding and infection was investigated with two representative orthohepadnavirus species circulating in the families of *Hominoidea* (human HBV) and NWM (WMHBV).

## Materials and methods

### Cloning of primate Ntcp cDNAs

RNA extraction from primate liver tissue (commercially obtained from the German Primate Center, Göttingen) was performed with the trizol method after rotor-stator homogenization. Based on a sequence alignment of known and predicted monkey Ntcp cDNAs, primers were selected for full-length PCR amplification of the entire monkey Ntcp ORFs (see Table 1).

Touch-down PCR with Fast Start high-fidelity polymerase (Roche) consisted of an initial denaturation of 95°C for 2 min, followed by ten loops of a touch-down circle consisting of denaturation (95°C, 30 s), annealing (58°C—0.5°C per step, 30 s), and elongation (72°C, 80s). After the touch-down phase 20 cycles with an annealing temperature of 53°C were performed, followed by final elongation at 72°C for 6 min. All amplified Ntcp ORFs were cloned into the pcDNA5/FRT/TO vector (Thermo Fisher Scientific) and subjected to DNA sequencing. Site-directed mutagenesis was performed on the cloned human NTCP and monkey Ntcp cDNAs, with the primers listed in Table 2. Correct constructs were selected based on DNA sequencing and were used for transfection into HepG2 and HEK293 cells.

### Cell culture of HEK293 and HepG2 cells and transfection

GripTite 293 MSR cells (further referred to as HEK293 cells, Invitrogen), a modified HEK293 cell line expressing human macrophage scavenger receptor for stronger adhesion, were maintained at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidity in DMEM/F-12 medium (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma), 4 mM L-glutamine (PAA) and penicillin/streptomycin (PAA). HepG2 cells (Clontech) were cultivated under the same conditions in DMEM medium with all supplements listed above, except for L-glutamine. HEK293 cells were transiently transfected with human NTCP and monkey Ntcp constructs for all transport and peptide binding assays. Transfection was performed with Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific). NTCP/Ntcp-transfected HepG2 cells were used for all HBV/HDV infection experiments as reported before [4]. They were transfected using X-tremeGENE (Sigma-Aldrich).

**Table 1. Primers used for *de novo* cloning of monkey Ntcp.**

Species abbr.	GenBank Accession No.*	Dir.	Primer sequence (5' → 3')**
S.spe	KT326157	for rev	TGT CCT GAG AGG TGA TTA AAG AAG TTT TGC TGC TCT CTS TAG TTK ACC
P.ham	KT382283	for rev	TGT CCT GAG AGG TGA TTA AAG AAG TTT TGC TGC TCT CTS TAG TTK ACC
C.aet	KT382281	for rev	TGT CCT GAG AGG TGA TTA AAG AAG TTT TGC TGC TCT CTS TAG TTK ACC
M.mul	KT382282	for rev	TGT CCT GAG AGG TGA TTA AAG AAG TTT TGC TGC TCT CTS TAG TTK ACC
M.sil	KT326156	for rev	TGT CCT GAG AGG TGA TTA AAG AAG TTT TGC TGC TCT CTS TAG TTK ACC
M.fas	KT382286	for rev	TGT CCT GAG AGG TGA TTA AAG AAG TTT TGC TGC TCT CTS TAG TTK ACC
S.sci	KR153328	for rev	TGT CCT GAG AGG TGA TTA AAG AAG TTT TGC TGC TCT CTS TAG TTK ACC
C.jac	KT382285	for rev	TGT CCT GAG AGG TGA TTA AAG AAG GGC CAA GGC TTG ATG ATT GC
S.oed	KT382284	for rev	TGT CCT GAG AGG TGA TTA AAG AAG CAC AAA ACT TGA AAT GGG ATT TGG G

\* All cloned sequences were deposited into the DDBJ/ENA/GenBank database with the indicated Accession numbers.

\*\*In part degenerated primers were used with S representing G or C and K representing G or T.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199200.t001>

### Bile salt transport assays

Qualitativ transport experiments were performed in NTCP/Ntcp-transfected HepG2 cells with the fluorescent bile salt 4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole taurocholate [20] (NBD-TC) in DMEM. Nuclei were stained with Hoechst33342 and transport was assessed on Leica DMI6000 B inverted fluorescent microscope. Quantitative transport measurements were performed with [<sup>3</sup>H]taurocholate ([<sup>3</sup>H]TC, Perkin Elmer) in HEK293 cells as reported before [21]. N-terminally myristoylated peptides consisting of amino acids 2–48 of the preS1 domain of HBV or WMHBV with additional C-terminal strep-tag (further referred to as myr-preS1-peptide) were purchased from Biosynthesis (Lewisville, Texas, USA) and used for [<sup>3</sup>H]TC transport inhibition as reported before [4].

### HBV and WMHBV myr-preS1-Al633-peptide binding

HBV and WMHBV myr-preS1-peptides C-terminally labelled with AlexaFluor633 (further referred to as myr-preS1-Al633, Biosynthesis) were used for direct binding assays in NTCP/Ntcp-transfected HEK293 cells as described before [4]. The sodium-dependent organic anion transporter (SOAT), unable to transport TC [21] and unable to bind the myr-preS1-peptide [4], served as negative control. HEK293 cells were plated in 24-well plates and incubated for 20 min with 250 ml of DMEM containing 10 nM of the HBV or WMHBV myr-preS1-Al633-peptides at 37°C. After a washing step with 300 µl DMEM at 37°C for 2 min, cells were covered with 300 µl DMEM and plates were scanned at room temperature with a Typhoon FLA 7000 fluorescence reader (GE Healthcare Life Sciences) with the following settings: fluorescence mode with normal detection, 633 nm laser for excitation, focus level +3 mm, 100 µm resolution, 700 V currency of the photomultiplier tube and 670 ± 30 nm band-pass emission filter. The total signal per area was determined by Image Quant Software.

Table 2. Primers used for mutagenesis of human NTCP and monkey NtcpS.

Species abbr.	Mutation	GenBank Acc. No.*	Dir.	Primer sequence (5' → 3')
H.sap	G158R	NM_003049	for	CAA GGT GCC CTA TAA ACG CAT CGT GAT ATC ACT G
			rev	CAG TGA TAT CAC GAT GCG TTT ATA GGG CAC CTT G
H.sap	G158D	NM_003049	for	GAC AAG GTG CCC TAT AAA GAC ATC GTG ATA TCA CTG
			rev	CAG TGA TAT CAC GAT GTC TTT ATA GGG CAC CTT GTC
H.sap	G158N	NM_003049	for	GAC AAG GTG CCC TAT AAA AAC ATC GTG ATA TCA CTG G
			rev	CCA GTG ATA TCA CGA TGT TTT TAT AGG GCA CCT TGT C
H.sap	G158V	NM_003049	for	CAA GGT GCC CTA TAA AGT CAT CGT GAT ATC ACT GG
			rev	CCA GTG ATA TCA CGA TGA CTT TAT AGG GCA CCT TG
H.sap	G158S	NM_003049	for	GAA GGA CAA GGT GCC CTA TAA AAG CAT CGT GAT ATC
			rev	GAT ATC ACG ATG CTT TTA TAG GGC ACC TTG TCC TTC
P.abe	A6V	NM_003049	for	GAG GCC CAC AAC GTG TCT GCC CCA TTC
			rev	GAA TGG GGC AGA CAC GTT GTG GGC CTC
P.abe	I303M	NM_003049	for	GGC TTC TCC TCA TTG CCA TGT TTT GGT GCT ATG AG
			rev	CTC ATA GCA CCA AAA CAT GGC AAT GAG GAG AAG CC
P.abe	I320T	NM_003049	for	CCA AGG ATA AAA CAA AAA TGA CCT ACA CAG CTG CCA C
			rev	GTG GCA GCT GTG TAG GTC ATT TTT GTT TTA TCC TTG G
P.tro	K157R	NM_003049	for	GAA GGA CAA GGT GCC CTA TAG AGG CAT CGT G
			rev	CAC GAT GCC TCT ATA GGG CAC CTT GTC CTT C
P.tro	I303M	NM_003049	for	GGC TTC TCC TCA TTG CCA TGT TTT GGT GCT ATG AG
			rev	CTC ATA GCA CCA AAA CAT GGC AAT GAG GAG AAG CC
P.tro	I315G	NM_003049	for	GAG AAA TTC AAG ACT CCC AAG GGT AAA ACA AAA ATG ATC TAC AC
			rev	GTG TAG ATC ATT TTT GTT TTA CCC TTG GGA GTC TTG AAT TTC TC
S.spe	R158G	KT326157	for	CAA GGT GCC CTA TGG AGG CAT CAT ATT ATC ACT G
			rev	CAG TGA TAA TAT GAT GCC TCC ATA GGG CAC CTT G
P.ham	R158G	KT382283	for	CAA GGT GCC CTA TGG AGG CAT CAT ATT ATC ACT G
			rev	CAG TGA TAA TAT GAT GCC TCC ATA GGG CAC CTT G
C.aet	R158G	KT382281	for	CAA GGT GCC CTA TGG AGG CAT CAT ATT ATC ACT G
			rev	CAG TGA TAA TAT GAT GCC TCC ATA GGG CAC CTT G
M.mul	R158G	KT382282	for	CAA GGT GCC CTA TGG AGG CAT CAT ATT ATC ACT G
			rev	CAG TGA TAA TAT GAT GCC TCC ATA GGG CAC CTT G
M.sil	R158G	KT326156	for	CAA GGT GCC CTA TGG AGG CAT CAT ATT ATC ACT G
			rev	CAG TGA TAA TAT GAT GCC TCC ATA GGG CAC CTT G
M.fas	R158G	KT382286	for	CAA GGT GCC CTA TGG AGG CAT CAT ATT ATC ACT G
			rev	CAG TGA TAA TAT GAT GCC TCC ATA GGG CAC CTT G
S.sci	G158R	KR153328	for	CAA GGT GCC CTA TGG ACG CAT CAT GAT ATC ACT G
			rev	CAG TGA TAT CAT GAT GCG TCC ATA GGG CAC CTT G
S.sci	G158S	KR153328	for	CAA GGT GCC CTA TGG AAG CAT CAT GAT ATC ACT G
			rev	CAG TGA TAT CAT GAT GCT TCC ATA GGG CAC CTT G
C.jac	G158R	KT382285	for	GAC AAG GTG CCC TAT AAA CGC ATC ATG AGA TCG C
			rev	GCG ATC TCA TGA TGC GTT TAT AGG GCA CCT TGT C
C.jac	G158S	KT382285	for	GAC AAG GTG CCC TAT AAA AGC ATC ATG AGA TCG C
			rev	GCG ATC TCA TGA TGC TTT TAT AGG GCA CCT TGT C
S.oed	S158G	KT382284	for	GAA GGA CAA GGT GCC CTA TAA AGG CAT CAT GAT ATC
			rev	GAT ATC ATG ATG CCT TTA TAG GGC ACC TTG TCC TTC

\*Reference sequence that was used for mutagenesis.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199200.t002>

## Infection of HepG2 cells with HBV/HDV

NTCP/Ntcp-transfected HepG2 cells were inoculated for 16 h with similar genome equivalents/cell of HDV particles pseudotyped with HBV or WMHBV envelopes (HDVpsHBV/HDVpsWMHBV). HBV was produced *in vitro* as described [4]. Infection was done in hepatocyte growth medium (HGM) supplemented with 2% DMSO and 4% polyethylenglycol as reported before [4]. Thereafter, cells were washed twice with HGM and cultured until day 10 post infection in HGM supplemented with 2% DMSO and 2% FCS. Fixation was performed at 10 days post infection with 3.7% formaldehyde and 1% methanol at 4°C for 30 min. Cells were permeabilized with 0.2% Triton X100 in phosphate buffered saline (PBS, containing 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4) for 20 min at room temperature. Unspecific binding epitopes were blocked by incubation with 10% fetal calf serum in PBS for 45 min at 37°C. For detection of HBV core (HBc) protein expression, cells were incubated for 2 h at 37°C with a polyclonal rabbit anti-HBcAg antiserum (1:500 dilution, Dako, Hamburg, Germany) in PBS and thereafter with anti-rabbit IgG AlexaFluor594 (1:200 dilution in PBS, Immuno Jackson) for 1 h at 37°C. For detection of the HDV antigen (HDAg) as a marker for HDV infection, cells were incubated with a 1:100 dilution of purified IgG preparation of an HDV/HBV coinfecting person, followed by incubation with anti-human IgG AlexaFluor594 (Immuno Jackson) diluted 1:200 in PBS for 1 h at 37°C. Nuclei were stained with DAPI (10 µg/ml) in PBS.

## Homology modelling

For 3D homology modelling the human NTCP and *Macaca mulatta* Ntcp protein sequences were used as queries for the SWISS-MODEL tool (<https://swissmodel.expasy.org>). Models were calculated based on the template of ASBT from *Yersinia frederiksenii* (ASBT<sub>Yf</sub>, PDB 4n7w, sequence identity to NTCP/Ntcp of 26%) [22]. The original structure of the bacterial protein demonstrates 10 transmembrane segments, however with an extended N-terminus forming transmembrane segment 1, which is not present in the human NTCP protein. Therefore, based on sequence alignment the sequence homologous transmembrane segments were allocated (ASBT<sub>Yf</sub> → NTCP) as follows: 2→1, 3→2, 4→3, 5→4, 6→5, 7→6, 8→7, 9→8, and 10→9. Overall, localisation of the transmembrane segments also fits very well with the *de novo* predictions of several algorithms, including HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>) and MEMSAT3 ([http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/software\\_downloads/memsat/](http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/software_downloads/memsat/)). The N-terminus of NTCP/Ntcp was oriented to the outside and the C-terminus to the intracellular site. The N-termini (amino acids 1 to 26 for NTCP and amino acids 1 to 27 for M.mul Ntcp) and the C-termini (amino acids 309 to 349 for both) could not be structurally predicted and so are not shown in the 3D models. Therefore, the models represent amino acids 27 to 308 (out of 349) for human NTCP and amino acids 28 to 308 (out of 349) for M.mul Ntcp.

## Results

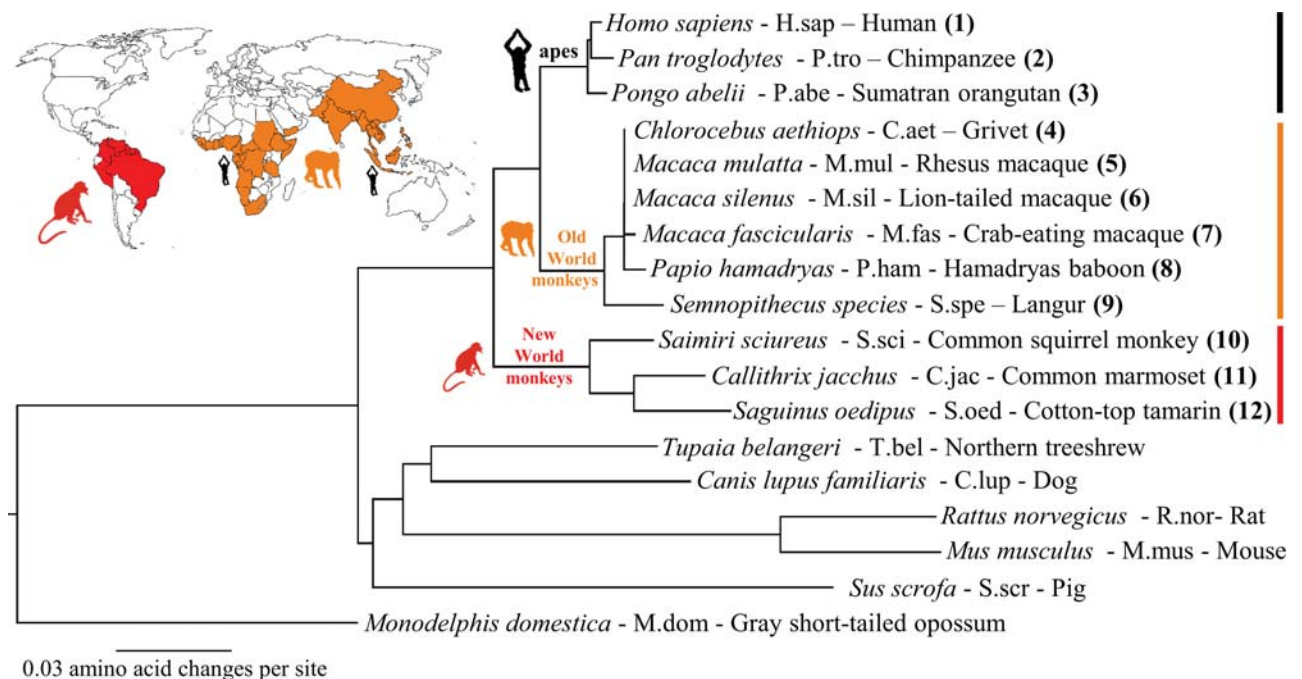
### Cloning of NWM and OWM Ntcp

A GenBank/ENA/DDBJ database search performed at the beginning of this project revealed cloned monkey Ntcp transcripts only for *Macaca fascicularis* (GenBank Accession No. AK240619.1). A small number of other primate Ntcp sequences were only available as predicted sequences, e.g. from *Papio anubis* (GenBank Accession No. XM\_003901980.2). At this date there was no experimentally cloned Ntcp sequence available from any NWM. Thus, Ntcp transcripts were *de novo* cloned from a series of liver samples, derived from six species with habitats in the Old World (*Macaca mulatta*, M.mul; *Macaca fascicularis*, M.fas; *Macaca silenus*, M.



sil; *Semnopithecus sp.*, *S.sp.*; *Papio hamadryas*, *P.ham*; and *Chlorocebus aethiops*, *C.aet*) and three monkeys with habitats in the New World (*Saimiri sciureus*, *S.sci*; *Callithrix jacchus*, *C.jac*; and *Saguinus Oedipus*, *S.oed*) (Fig 1). Liver samples of apes were not available and those Ntcps were generated by mutagenesis based on the available genetic sequence information for chimpanzee (*Pan troglodytes*, *P.tro*, GenBank Accession No. XM\_510035) and orangutan (*Pongo abelii*, *P.abe*, GenBank Accession No. XM\_002824890) with human NTCP as the template sequence. All *de novo* cloned monkey Ntcp sequences were deposited into the GenBank/ENA/ DDBJ database (Table 3). A full sequence alignment of all cloned monkey Ntcps with human NTCP is provided in S1 Fig. OWM Ntcps showed a length of 349 amino acids with high sequence identities of >95% compared to human NTCP (Table 3). NWM Ntcps also showed high sequence identity to human NTCP of 90–91%, but in two cases (*C.jac* and *S.oed*) revealed elongated C-terminal ends due to frameshift mutation at amino acid position 345. These elongated C-termini do not have any sequence similarity to one of the other (even non-primate) Ntcps at all (see S1 Fig). As expected, the phylogenetic analysis revealed clusters for the NWM Ntcps (red in Fig 1) and the OWM Ntcps (orange in Fig 1). The ape Ntcps clustered with human NTCP. Higher sequence distance was seen for the Ntcps from other non-primate species such as *Tupaia belangeri*, pig, dog, mouse, and rat.

The myr-preS1-peptide sequences of HBV and WMHBV are shown in Fig 2A. The peptides are supposed to interact with the extracellular part of NTCP/Ntcp via their main binding domains (black box), which are highly conserved between both peptides. In contrast, the domains within the NTCP/Ntcp receptor protein, that were previously identified to be critical for HBV binding and infection (amino acids 84–87 [3,14] and 157–165 [2]), revealed few but significant Ntcp sequence differences between the groups of monkeys. Amino acid position 158 was one of the most prominent distractors between the clusters of apes, OWMs and



**Fig 1. Phylogenetic classification of the cloned monkey Ntcps.** Phylogenetic relationship of monkey Ntcps with their habitats in the Old World (orange) or New World (red). Abbreviations, given after the species names, are used instead of the full species names throughout the manuscript. NTCP/Ntcps from non-primate species are included for comparison. Tree-outgroup: *Monodelphis domestica* (M.dom).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199200.g001>

Table 3. *De novo* cloned monkey Ntcps.

Species	Species abbr.	Name	Protein length	% aa identity to human NTCP	GenBank Accession No.
<i>Semnopithecus sp.</i> (OWM)	S.spe	Langur	349 aa	95.4	KT326157
<i>Papio hamadryas</i> (OWM)	P.ham	Hamadryas baboon	349 aa	95.7	KT382283
<i>Chlorocebus aethiops</i> (OWM)	C.aet	Grivet	349 aa	96.3	KT382281
<i>Macaca mulatta</i> (OWM)	M.mul	Rhesus macaque	349 aa	96.3	KT382282
<i>Macaca silenus</i> (OWM)	M.sil	Lion-tailed macaque	349 aa	96.3	KT326156
<i>Macaca fascicularis</i> (OWM)	M.fas	Crab-eating macaque	349 aa	96.0	KT382286
<i>Saimiri sciureus</i> (NWM)	S.sci	Common squirrel monkey	349 aa	92.0	KR153328
<i>Callithrix jacchus</i> (NWM)	C.jac	Common marmoset	387 aa*	90.3** / 91.3***	KT382285
<i>Saguinus oedipus</i> (NWM)	S.oed	Cotton-top tamarin	371 aa*	89.4** / 90.4***	KT382284

\*Frameshift variant at amino acid 345 of the C-terminal end (see S1 Fig)

\*\*Including the c-terminal frameshift sequence

\*\*\*Excluding the c-terminal frameshift sequence

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199200.t003>

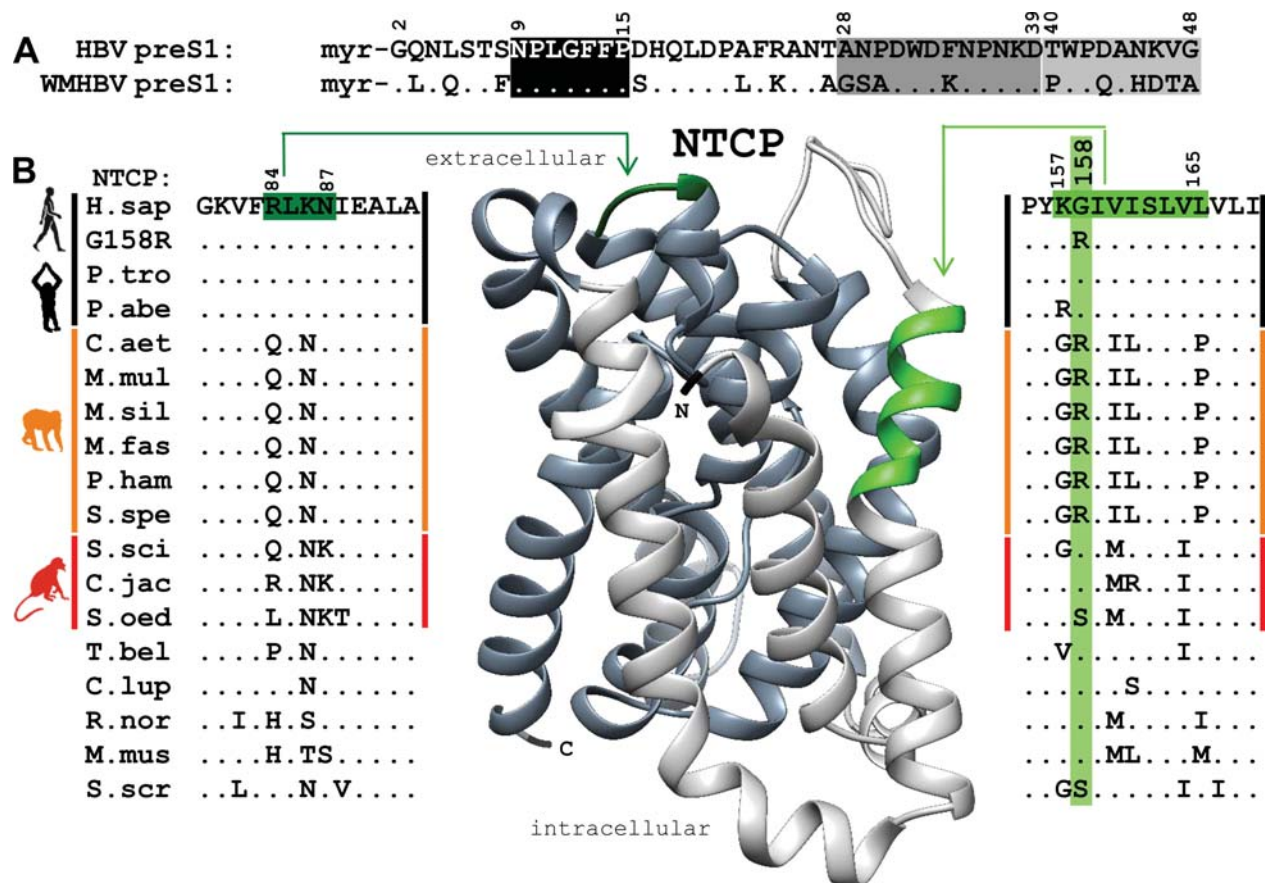


Fig 2. Ntcp regions critical for HBV/WMHBV binding. (A) PreS1<sub>2-48</sub> peptide sequences of human HBV, genotype D, and of woolly monkey HBV (WMHBV). The following domains are supposed to interact with NTCP/Ntcp: main binding domain (black, amino acids 9–15), accessory binding domains I (dark grey, amino acids 28–39) and II (light grey, amino acids 40–48). (B) Alignment of Ntcps from apes (black), Old World monkeys (orange), and New World monkeys (red). The alignment is restricted to the regions known to be critical for HBV binding (light green, 84–87) and infection (dark green, 157–165). Both regions are highlighted at a homology model of NTCP.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199200.g002>

NWMs. Whereas, glycine (158G) is present in human NTCP and the known ape Ntcp, arginine (158R) is found in all OWM Ntcp. The NWM Ntcp were heterogeneous at this position, with 158G being present in *S.sci* and *C.jac*, and with serine (158S) in *S.oed* (Fig 2B). To analyse the impact of this single amino acid for HBV binding and infection, we generated a series of mutants (G158R, R158G, and some others) on the various NTCP/Ntcp.

### Bile salt transport-competing myr-preS1-peptide binding

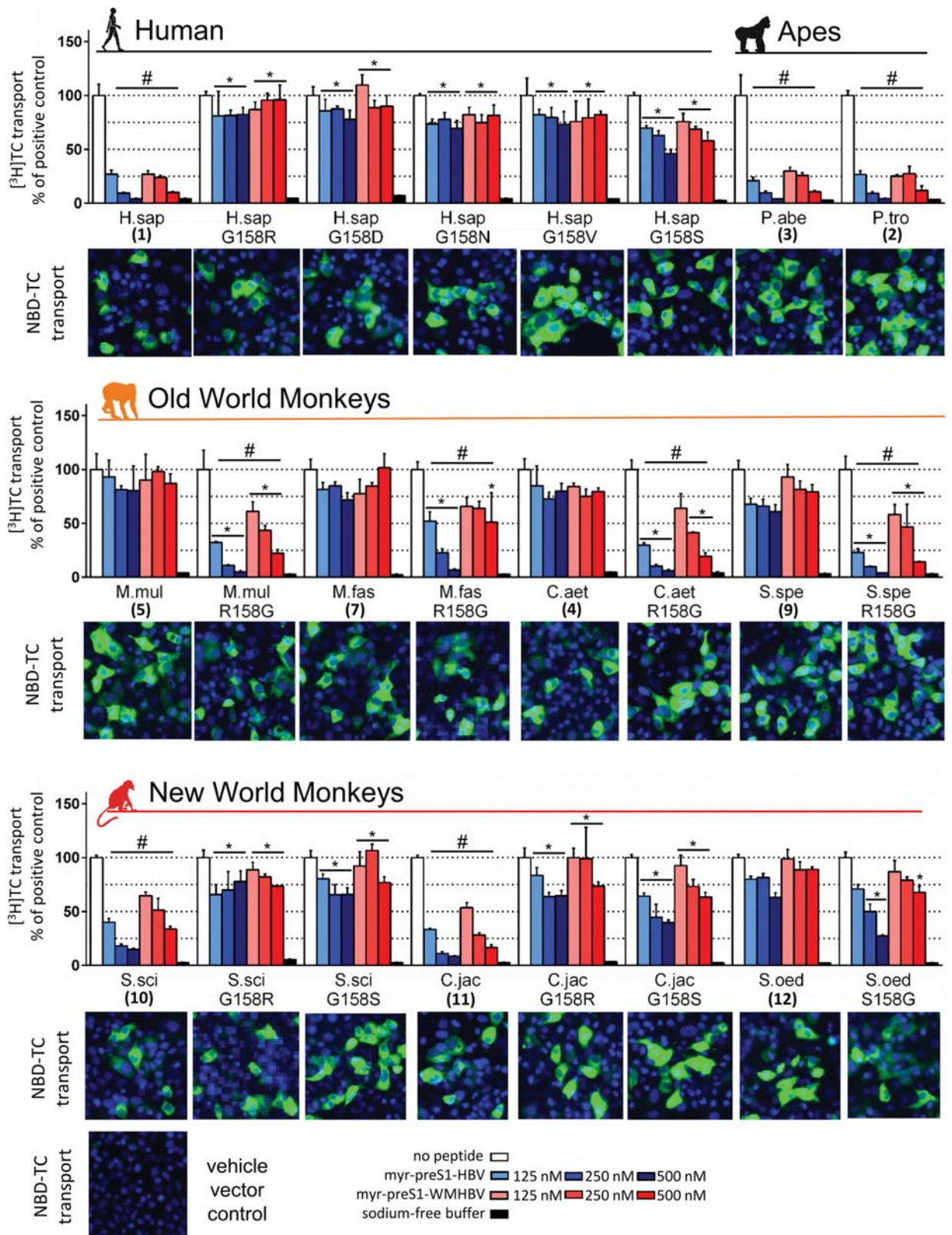
All expressed wild type and mutant NTCP/Ntcp clones qualitatively demonstrated uptake and accumulation of the green fluorescent bile salt NBD-TC (Fig 3), indicating intact transporter function. For quantification, transport assays were additionally performed with [<sup>3</sup>H]TC. All wild type and mutant NTCPs/Ntcp showed comparable transport rates and strictly sodium-dependent transport activity (open bars vs. black bars), and thereby also proved their functional localization at the plasma membrane (Figs 3 and S2).

Specific binding of the HBV myr-preS1-peptide (amino acids 2–48, see Fig 2) to human NTCP is essential for HBV entry and infection, but effective myr-preS1-peptide binding also blocks the physiological bile salt transport activity of NTCP in a concentration-dependent manner [3,4]. Thus, the specificity of viral-host interaction at the level of the receptor NTCP/Ntcp can be indirectly demonstrated by bile salt transport-competing myr-preS1-peptide binding. Therefore, we systematically screened all wild type and mutant NTCP/Ntcp for their TC transport activity at increasing concentrations of the HBV (blue bars) and WMHBV (red bars) myr-preS1-peptides. Interestingly, besides human NTCP, only the two ape Ntcp (*P.tro*, No.2, and *P.abe*, No.3) as well as the NWM Ntcp from *S.sci* (No.10) and *C.jac* (No.11) showed a pronounced dose-dependent transport inhibition (Fig 3). Of note, all of them have a glycine at position 158. In contrast, TC transport of all OWM Ntcp (Nos.4-9) was not affected by the HBV and WMHBV myr-preS1-peptides at all (Figs 3 and S2). Surprisingly, by swapping of the amino acids 158G and 158R (G158R and *vice versa* R158G), all relevant monkey Ntcp completely inverted their myr-preS1-peptide susceptibility pattern. All OWM R158G Ntcp mutants became susceptible to TC transport inhibition by the myr-preS1-peptides. In contrast, the G158R Ntcp mutants from the NWM *S.sci* (No.10) and *C.jac* (No.11) as well as the G158R mutant of human NTCP (No.1) became insensitive against the hepadnaviral myr-preS1-peptides. In order to evaluate if this phenotype conversion is specific for the amino acid exchange from glycine to arginine, a series of further G158X substitutions was analysed, including G158D, G158N, G158V, and G158S. Comparable to G158R mutation, human NTCP lost its susceptibility to myr-preS1-peptide transport inhibition by each of these mutations, indicating that this effect is not specific for arginine (Fig 3, upper panel). Closer analysis of the role of amino acid 158 was also performed for the Ntcp from *S.oed* (No.12). In this case a serine (158S) is present and the wild type *S.oed* Ntcp showed to be insensitive against myr-preS1-peptide transport inhibition. However, this sensitivity could be significantly increased by S158G mutation, but not to the level of the other 158G bearing monkey Ntcp.

### Direct binding of HBV and WMHBV myr-preS1-Al633-peptides

In order to directly analyse the specific interaction of HBV and WMHBV with the different NTCP/Ntcp, we quantified binding of HBV and WMHBV myr-preS1-peptides to surface-expressed NTCP/Ntcp using peptides covalently labelled with Alexa633 (Al633) (see Fig 4). Both myr-preS1-Al633 peptides significantly bound to wild type NTCP/Ntcp from human and apes, respectively. The human NTCP mutants G158R, G158D, G158N, and G158V completely lost their HBV (blue columns) and WMHBV (red columns) myr-preS1-peptide binding capacity and were comparable to the unspecific binding control SOAT, which is





**Fig 3. Transport-competing HBV myr-preS1-peptide binding to monkey Ntcps.** HEK293 cells were transiently transfected with human/monkey NTCP/Ntcp wild type or mutant constructs. Transport activity was qualitatively verified with NBD-TC (green fluorescence, nuclei blue fluorescence) and was quantitatively measured with [<sup>3</sup>H]TC. Absence of myr-preS1 served as positive control (scaled to 100%, open bars). HBV (blue bars) or WMHBV (red bars) myr-preS1-peptides served as inhibitors at increasing concentrations. Negative control: uptake in sodium-free buffer (black bars). Data represent means ± SD of n = 3 determinations. #Significant transport inhibition compared to positive control,  $p < 0.0001$ . \*Significantly different from the corresponding value of the wild type NTCP/Ntcp,  $p < 0.001$  (two-way ANOVA).

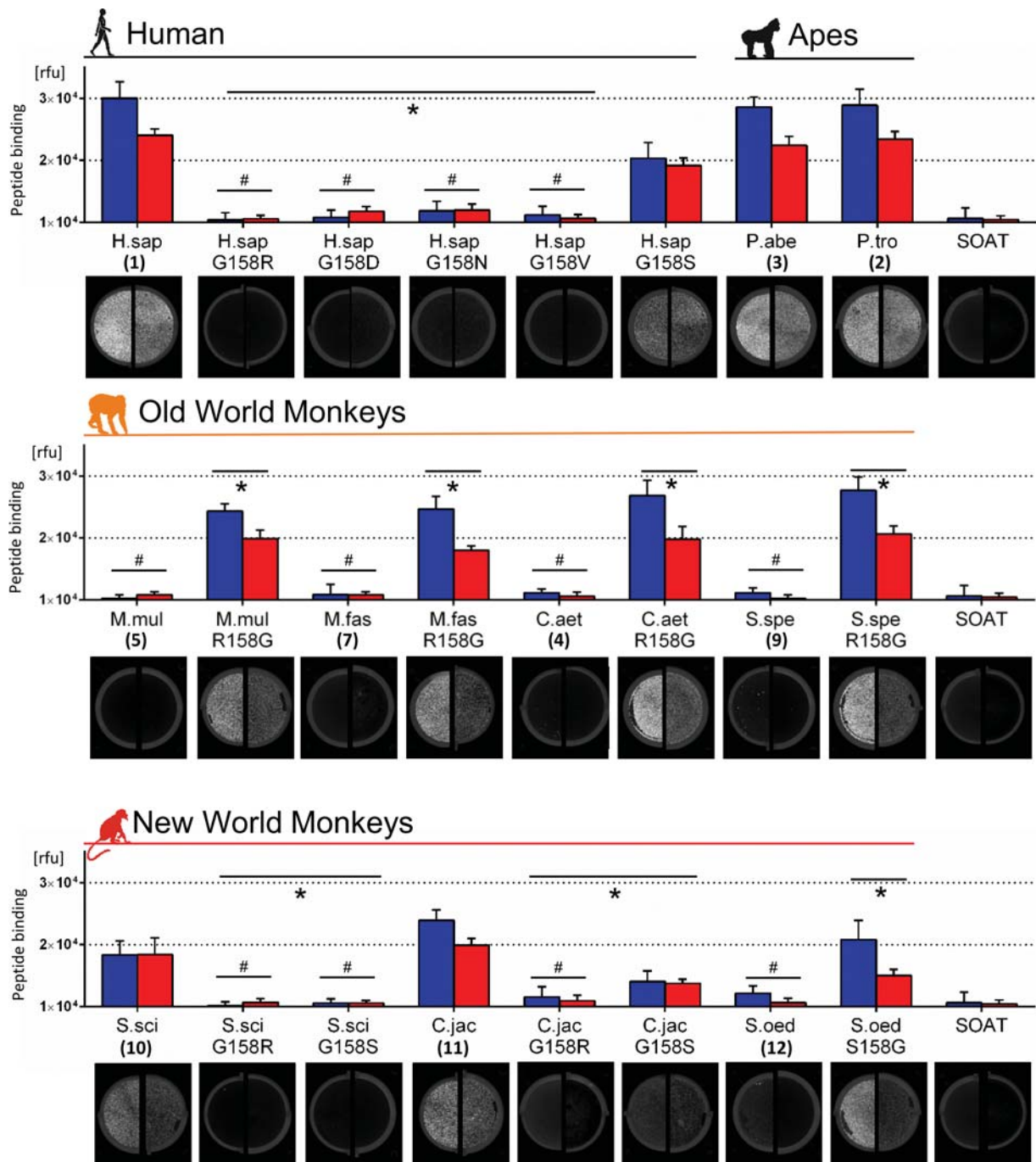
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199200.g003>

insensitive to specific myr-preS1-peptide binding and HBV infection [4]. However, G158S mutation of human NTCP revealed an intermediate state, with significant myr-preS1-peptide binding, but at a lower level compared to wild type NTCP. All wild type Ntcps of the OWM (Nos.4-9) did not support any binding of the HBV and WMHBV myr-preS1-peptides at all. In contrast, all R158G mutants gained full HBV and WMHBV myr-preS1-peptide binding capacity to the level of human NTCP and ape Ntcps (Figs 4 and S2). Interestingly, comparable with human NTCP and ape Ntcps, these OWM R158G mutants generally showed higher binding capacity for the HBV-derived myr-preS1-peptide compared to the WMHBV-derived peptide.

In the group of NWMs, data from the transport-competing myr-preS1-peptide binding experiments could be fully confirmed by the direct peptide binding assay. Only the Ntcps from S.sci (No.10) and C.jac (No.11) showed binding capacity for the HBV and WMHBV myr-preS1-Al633 peptides. Of note, Ntcp from S.sci was the only one who showed comparable binding for the myr-preS1-peptides from HBV and WMHBV. In contrast, Ntcp from S.oed (No.12) revealed myr-preS1-Al633-peptide binding at the level of the negative control. Both G158R mutants of the Ntcps from S.sci and C.jac reacted as expected and completely lost their myr-preS1-peptide binding ability. However, there was discrepancy for the G158S mutants: G158S from S.sci did not react, while G158S from C.jac showed significant myr-preS1-peptide binding, but at a lower level compared to wild type C.jac Ntcp (with 158G). In the case of Ntcp from S.oed, S158G mutation significantly increased the myr-preS1-peptide binding levels compared to the wild type (with 158S).

### Infection with HBV or pseudotyped HDV particles

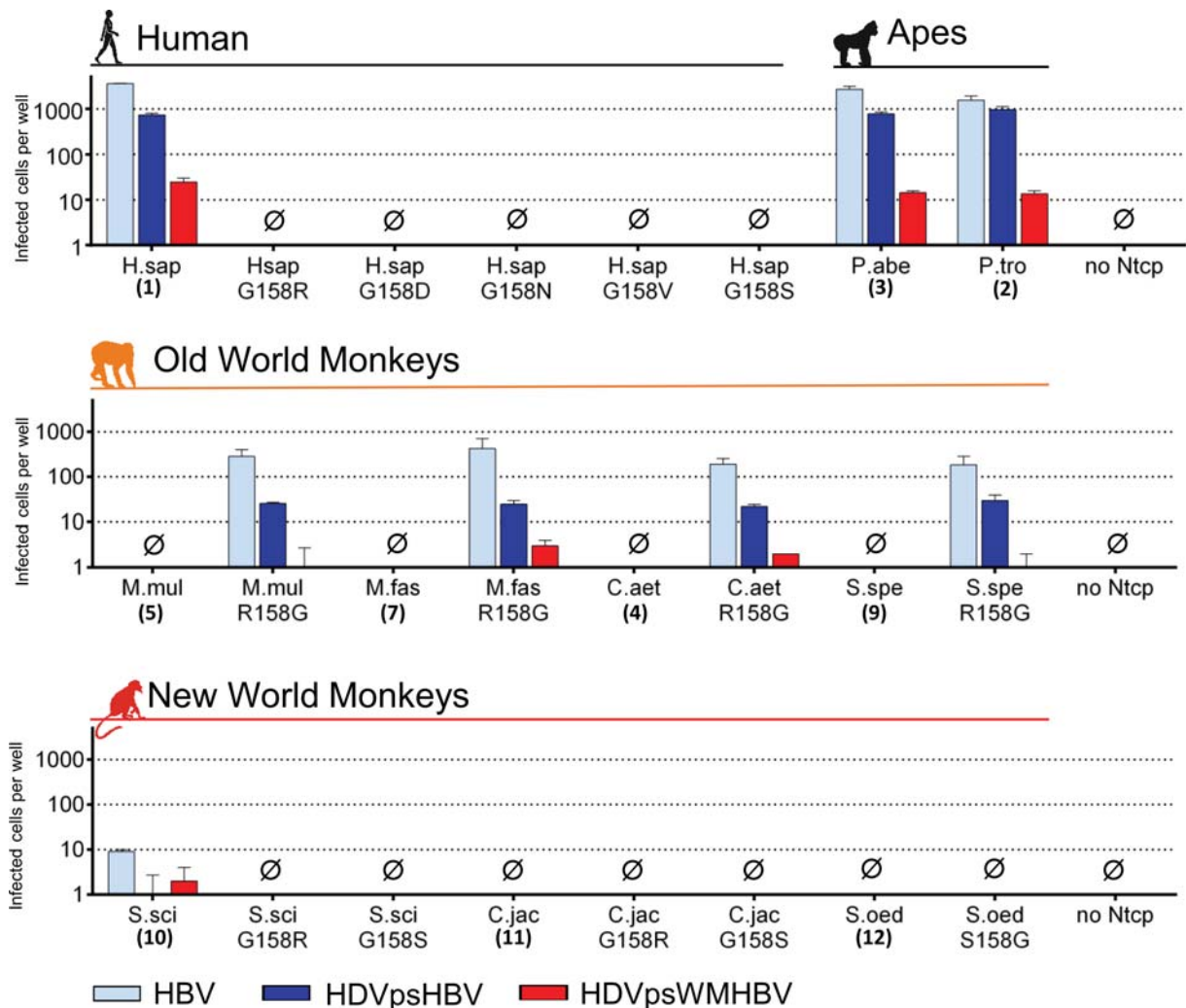
Finally, the ability of the wild type and mutant Ntcps to support infection with HBV or HDV particles pseudotyped with HBV or WMHBV envelopes (HDVpsHBV/HDVpsWMHBV) was analysed in transiently Ntcp-transfected HepG2 cells (Figs 5 and S2). HBV infection was detected by immunofluorescence against newly produced HBcAg, which increased from day 7 to day 10 post infection (S3 Fig). In contrast, at day 4 post infection, no specific anti-HBcAg immunofluorescence could be detected, demonstrating productive HBV infection of the NTCP-transfected cells. HBV could efficiently infect all cells expressing wild type NTCP and ape Ntcps, while HDV infection generally resulted in lower yield. Of note, HDVpsWMHBV showed up to 100-fold reduced infection rates compared to HDVpsHBV. No infection was observed for any of the NTCP mutants. As expected, HepG2 cells expressing any of the OWM Ntcps (Nos.4-9) were not susceptible for HBV/HDV infection at all. But remarkably, susceptibility to infection was gained with all OWM Ntcps after R158G mutation (Figs 5 and S2). Of note, the infection patterns of HBV, HDVpsHBV and HDVpsWMHBV occurred similar to human NTCP and ape Ntcps, although at an about 10-fold lower rate. Thus, infection with HDVpsWMHBV dropped to the border of detectability and was in some cases either not detectable or below the cut-off level. Interestingly, as the only representative from the group of NWM, Ntcp of S.sci (No.10) revealed a very low, but reproducible susceptibility for HBV infection (Fig 5). In contrast, the two other NWM Ntcps and all of their mutants were unable to support HBV and HDV infection, even not with HDV particles pseudotyped with the envelopes from the NWM WMHBV.



**Fig 4. Direct HBV myr-preS1-peptide binding to monkey Ntcps.** Human or monkey NTCP/Ntcp-transfected HEK293 cells were incubated with the fluorescently labelled myr-preS1-HBV-Al633 (blue columns) or myr-preS1-WMHBV-Al633 (red columns) peptides (10 nM, 20 min, 37°C). After washing, cells were analysed for Al633 fluorescence. Data represent means ± SD of three combined independent experiments each with triplicate determinations. Representative fluorescence scans are shown for myr-preS1-HBV-Al633 (left half) and myr-preS1-WMHBV-Al633 (right half). SOAT-expressing HEK293 cells served as negative control. \*Statistically different from the wild type clone,  $p < 0.001$ . #No significant difference to negative control,  $p < 0.001$  (two-way ANOVA). Rfu, relative fluorescence units.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199200.g004>





**Fig 5. HBV/HDV infection via human and monkey NTCP/Ntcp.** HepG2 cells were transiently transfected with human/monkey NTCP/Ntcp wild type or mutant constructs in 96 well plates and inoculated with 10,000 genome equivalents of pseudotyped HDV particles (HDVpsHBV/HDVpsWMHBV) or 2,000 HBV genome equivalents per cell. Cells were cultured for 10 days post infection and then immunostained against HDAg or HBcAg. Infected cells per well were manually counted by fluorescence microscopy. Cell counts are depicted as means ± SD of one representative experiment performed in triplicate.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199200.g005>

### Discussion

While primate hepadnaviruses are known for the *Hominoidea* superfamily (including human, ape, and gibbon HBV), and the *Platyrrhini* (WMHBV and CMHBV), no endogenous hepadnavirus was isolated from the *Cercopithecoidea* superfamily of OWM so far [7] (despite the above mentioned sporadic detection of HBV in Mauritian cynomolgus macaques [15]). Interspecies transmissions have been described within the *Hominoidea* and *Platyrrhini* *in vivo*, but are also possible between these groups and beyond *in vitro*, including e.g. infection of human hepatocytes with WMHBV [2,4]. On this background it is surprising that OWM, that are phylogenetically closer to the hominoids than the NWM, seem to be insensitive against HBV and WMHBV binding and infection, at least under experimental conditions [2,16]. This insensitivity was previously attributed to a specific domain of *Macaca fascicularis* Ntcp, representing

amino acids 157–165 [2]. But it is not known so far if this domain is present in all OWM Ntcp and if it is also relevant for virus-receptor interaction of the largely unknown NWM Ntcp.

The most striking observation of the present study was that a single amino acid at position 158 of NTCP/Ntcp is sufficient to discriminate between the HBV/HDV susceptible group of humans and apes (all having 158G) and the non-susceptible group of OWM (all having 158R). This amino acid is located within the above mentioned domain [2]. In our experiments, the exchange from 158R to 158G alone was sufficient to achieve full transport-competing myr-preS1-peptide binding and susceptibility for HBV/HDV infection in all analysed R158G Ntcp mutants from OWM. *Vice versa* G158R mutation made human and ape NTCP/Ntcp completely insensitive for myr-preS1-peptide binding and HBV/HDV infection. Of note, NTCP/Ntcp transport activity remained completely unaffected by G158R or R158G mutation. This is a relevant fact, as mutations at receptor or transporter proteins may affect proper membrane insertion or folding, what than would hamper subsequent functional assays. Our experimental setup included three subsequent steps. First, preS1-peptides from HBV and WMHBV were used at increasing concentrations to inhibit the bile salt transport by NTCP/Ntcp. This assay only indirectly measures myr-preS1-peptide binding to NTCP/Ntcp, but allows to verify functional transporter expression in the plasma membrane within the same assay [4]. Second, direct myr-preS1-peptide binding experiments were performed with fluorescently labelled peptides of HBV and WMHBV and, finally infection experiments were added with HBV as well as HDV particles pseudotyped with the surface proteins of HBV and WMHBV. Based on these experiments on six different OWM Ntcp, arginine at position 158 can be regarded as the main source for hepadnavirus insensitivity of the *Cercopithecoidea* (S4 Fig). This conclusion is supported by findings from another recent study, showing that Ntcp as well as primary hepatocytes from *M.fas* and *M.mul* are insensitive against myr-preS1-peptide binding and HBV/HDV infection [16]. However, transduction of human NTCP into primary hepatocytes from these macaques made them fully susceptible for HBV and HDV infection, indicating that Ntcp is the only restricting factor for HBV/HDV infection of macaque hepatocytes.

The significant role of arginine 158 in providing HBV/HDV insensitivity gives reason to further speculation. As this arginine is conserved among all analysed OWM Ntcp it could have been occurred by mutation early in the branch of *Cercopithecoidea*. One can speculate that this mutation was a chance event. On the other hand G158R mutation might have occurred in answer to a particular selection pressure, probably due to endemic hepadnavirus infection with pathological significance in a more ancient *Cercopithecoidea* population. Apart from this evolutionary aspect our findings can be of relevance for the development of HBV/HDV entry inhibitors that specifically block the virus attachment site of NTCP without hampering the bile salt transport function. As it is known that the bile salt transport and the myr-preS1 receptor functions of NTCP are linked to each other [4], preS1-peptide-derived HBV/HDV entry inhibitors such as Myrcludex B are expected to interfere with the bile salt homeostasis due to their mode of action. Indeed, recent application of Myrcludex B to healthy human volunteers dramatically increased the serum levels of conjugated bile salts by two orders of magnitude [23]. Therefore, specific blocking of the virus attachment site with a small(er) molecule might be beneficial. Following this direction, our data clearly show that a relatively small steric mass at position 158, irrespective of formed by the side chains of arginine, aspartate, asparagine, or valine, is sufficient to completely block myr-preS1-peptide binding to NTCP and HBV infection (Figs 3–5). If this space can be occupied by a small molecule targeting amino acid 158, it should be possible to block viral binding via its myr-preS1-peptide domain without interfering with the bile salt transport. Based on a 3D homology model of human NTCP, amino acid 158 is located at an extracellular accessible site of NTCP, directly preceding membrane insertion of transmembrane domain 5 (Fig 6). It was suggested that bile salt transport is facilitated by



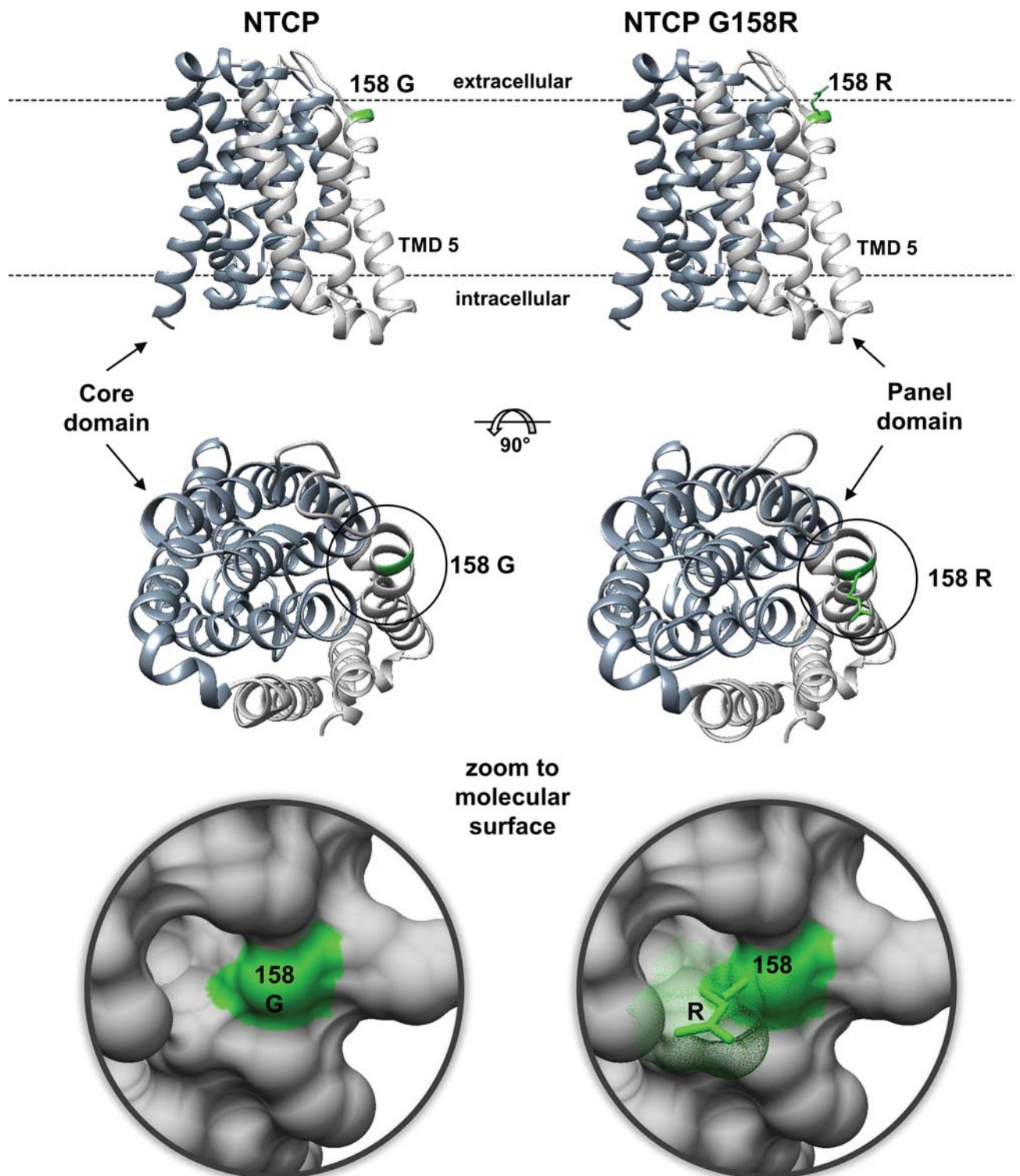
movement of a flexible panel domain (TMDs 1, 5, 6) against a more rigid core domain (TMDs 2–4 and 7–9) [5]. Interestingly, amino acid 158 is located near the proposed entry site for bile salts, what would structurally explain, why bile salts block myr-preS1-peptide binding to Ntcp [4]. Furthermore, it can be hypothesised that myr-preS1-binding clamps NTCP in the depicted inward open conformation (Fig 6) by attachment to amino acid 158 and additional less-specific binding sites at the core domain. So, the myr-preS1-peptide would block the flexible movements necessary for the bile salt transport. In contrast, a small specific inhibitor of the viral attachment site at amino acid 158 of Ntcp would allow such flexible movements and so would not interfere with bile salt transport. This hypothesis is supported by recent findings with the cyclic peptide cyclosporine A that blocks myr-preS1-peptide binding and bile salt transport function of NTCP [24]. But a KG157-158GR mutant of NTCP became preS1-binding deficient, but still supported bile salt transport, similar to the G158R mutants of the present study. This transport of the mutant was insensitive to cyclosporine A, indicating that amino acids 157–158 represent the target site of cyclosporine A. Other cyclosporine derivatives (SCY450 and SCY995) were even unreactive at the bile salt transport of wild type NTCP, although they blocked myr-preS1-peptide binding and HBV infection [25]. These data are encouraging that further small molecules can be identified that fit the proposed profile.

Interestingly, the myr-preS1-peptide binding capability of the R158G OWM Ntcp mutants reached values similar to the wild type NTCP/Ntcp of *Hominidae* (Fig 4). However, the ability of these R158G mutants to support HBV/HDV infection was 10 times lower (Fig 5). This most likely is determined by sequence variations in further domains of Ntcp. Amino acids 84–87 are candidates in this regard as they were previously identified to be critical for internalisation of the virus/receptor complex and subsequent HBV/HDV infection [3,14]. Compared to the sequence of human NTCP (being “RLKN”), OWM Ntcp all bear a “QLNN” sequence at the corresponding position (Fig 2). In contrast, amino acid position 263, which was recently described to be crucial for viral entry [26] is highly conserved among all analysed NTCP/Ntcp (except for *S.sci*) and so seems not to be of relevance here.

In the group of cloned NWM Ntcp, three different susceptibility pattern were detected: the Ntcp of *S.sci* and *C.jac*, both with glycine at position 158, showed clear binding of the HBV/WMHBV myr-preS1 peptides. Only *S.sci* Ntcp-transfected HepG2 cells showed faint susceptibility for HBV infection, while the Ntcp from *S.oed* was completely insensitive for myr-preS1-peptide binding and HBV infection. This heterogeneous susceptibility pattern needs further investigation that should include even more Ntcp from different *Platyrrhini* families and species. Phylogenetically, there are five *Platyrrhini* families: *Callitrichidae*, *Cebidae*, *Aotidae*, *Pitheciidae*, and *Atelidae*. Hepadnaviruses have been isolated so far from woolley monkey [8] (family *Atelidae*) and very recently from capuchin monkey [9] (family *Cebidae*), while Ntcp have been cloned in the present study from the families *Callitrichidae* (*C.jac* and *S.oed*) as well as *Cebidae* (*S.sci*). Despite of this limited knowledge, the present study showed for the first time *in vitro* infection of HBV via Ntcp from the NWM *Saimiri sciureus*, demonstrating the potential for transmission of HBV to certain, but probably not all NWM.

## Conclusions

Amino acid position 158 of NTCP/Ntcp is sufficient to discriminate between the HBV/HDV susceptible group of humans and great apes (158G) and the non-susceptible group of OWM (158R). Thus, at the level of viral binding and entry via Ntcp, the observed species barriers do not appear as large as it was generally assumed. In the group of NWMs, Ntcp exhibit higher sequence variability and more heterogenous HBV/WMHBV susceptibility pattern that needs further systematic investigation and inclusion of even more Ntcp from *Ceboidea* species to



**Fig 6. Localization of amino acid 158 at human NTCP.** Homology model of human NTCP based on the crystal structure of ASBT<sub>Yf</sub> [22]. The model represents amino acids 27–308 of NTCP. The panel domain is depicted in light and the core domain in dark grey. Localisation of the protein within the plasma membrane is indicated by dashed lines and was calculated based on transmembrane domain predictions performed with HMMTOP and MEMSAT3. Amino acid 158 is highlighted in green. Replacement of glycine 158 with the more bulky arginine abolished myr-preS1-peptide binding and *in vitro* infection, probably by sterically blocking the virus attachment site of NTCP.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199200.g006>

better understand the virus-host determinants in this branch of nonhuman primates. Cloning of Ntcp from NWM in the present study facilitated for the first time *in vitro* infection of HBV via Ntcp from a NWM, the common squirrel monkey (*Saimiri sciureus*).

## Supporting information

**S1 Fig. Full sequence alignment of the cloned monkey Ntcp.** The deduced amino acid sequences of all cloned monkey Ntcp from apes (black, 1–3), Old World monkeys (orange, 4–9), and New World monkeys (red, 10–12) were aligned with the EBI Clustal Omega algorithm (<https://www.ebi.ac.uk>), and the alignment was visualised by BOXshade (<https://embnet.vital-it.ch>). Amino acid identity is displayed with black shading, and amino acid similarities are highlighted in grey. Gaps (-) are introduced to optimise the alignment. All cloned sequences were deposited into the DDBJ/ENA/GenBank database with the Accession numbers listed in Table 1. Full species names are given in Table 3. NTCP/Ntcp from non-primate species are included for comparison. Regions critical for HBV binding (light green) and infection (dark green) are indicated. Amino acid position 158 is additionally marked by “X”. Highly conserved N-glycosylation sites in the N-terminus of all NTCP/Ntcp are indicated by “Y”. Localisation of the transmembrane domains, derived from the homology model of human NTCP (see Figs 2 and 6), are marked by TMD-I to TMD-IX. Whereas most monkey Ntcp have a highly conserved C-terminal end, the C-termini from C.jac and S.oed are elongated by frameshift at amino acid position 345. These elongated C-termini have no sequence similarity with any of the non-primate Ntcp sequences at all. (DOCX)

**S2 Fig. *Papio hamadryas* (8) and *Macaca silenus* (6) Ntcp: Transport, peptide binding and infection data.** (A) HEK293 cells were transiently transfected with P.ham and M.sil Ntcp wild type or R158G mutant constructs. Transport activity was verified with NBD-TC (green fluorescence, nuclei blue fluorescence) and [<sup>3</sup>H]TC. Absence of myr-preS1 served as positive control (scaled to 100%, open bars). HBV or WMHBV myr-preS1-peptides served as inhibitors at increasing concentrations. Negative control: uptake in sodium-free buffer (black bars). Data represent means ± SD of n = 3 determinations. #Significant transport inhibition compared to positive control,  $p < 0.0001$ . \*Significantly different from the corresponding value of the wild type Ntcp,  $p < 0.001$  (two-way ANOVA). (B) Transfected HEK293 cells were incubated with the fluorescently labelled myr-preS1-HBV-Al633 (blue columns) or myr-preS1-WMHBV-Al633 (red columns) peptides (10 nM, 20 min, 37°C). After washing, cells were analysed for Al633 fluorescence. Data represent means ± SD of three combined independent experiments each with triplicate determinations. Representative fluorescence scans are shown for myr-preS1-HBV-Al633 (left half) and myr-preS1-WMHBV-Al633 (right half). SOAT-expressing HEK293 cells served as negative control, as they are unable to bind the myr-preS1-peptide [4]. \*Statistically different from the wild type clone with  $p < 0.001$  (two-way ANOVA). #No significant difference to negative control with  $p < 0.001$ . Rfu, relative fluorescence units. (C) HepG2 cells were transiently transfected with the P.ham and M.sil Ntcp wild type or R158G mutant constructs in 96 well plates and inoculated with 10,000 genome equivalents of pseudotyped HDV particles (HDVpsHBV/HDVpsWMHBV) or 2,000 HBV genome equivalents per cell. Cells were cultured for 10 days post infection and then immunostained against HDAg or HBcAg. Infected cells per well were manually counted by fluorescence microscopy. Cell counts are depicted as means ± SD of one representative experiment performed in triplicate. (TIF)

**S3 Fig. Time course of anti-HBcAg immunostaining signals after HBV infection in NTCP-transfected HepG2 cells.** HepG2 cells were transiently transfected with human NTCP in 96 well plates and inoculated with 2,000 HBV genome equivalents per cell. Cells were cultured and immunostaining against the HBcAg (red fluorescence) was performed at days 4, 7, and 10 post infection. Nuclei were counterstained with DAPI (blue fluorescence). Bars represent 20  $\mu\text{m}$ . While no specific anti-HBcAg immunofluorescence could be detected at day 4, there were significant signals at day 7, which further increased in intensity at day 10.

(TIF)

**S4 Fig. Localisation of amino acid 158 at *Macaca mulatta* Ntcp.** Homology model of M.mul Ntcp based on the crystal structure of ASBT<sub>Yf</sub> (PDB 4n7w [22]). The model covers amino acids 28 to 308 of the M.mul Ntcp protein with an outward orientation of the N-terminus and an intracellular localisation of the C-terminus. The panel domain is depicted in light and the core domain in dark grey. The native amino acid arginine 158 is highlighted in green in the M. mul Ntcp. Mutation to glycine with its small hydrogen side chain seems to reopen the sterically blocked HBV binding domain and so M.mul Ntcp again becomes sensitive for myr-preS1-peptide binding and susceptible for HBV/HDV infection. Interestingly, amino acid 158 is located near the proposed entry site for bile salts, which pass through the NTCP most likely at the interface between the core and the panel domains. This would structurally explain, why bile salts block myr-preS1-peptide binding to Ntcp and *vice versa* (see [4]). Based on this model Old World monkeys could have become unsusceptible for HBV/HDV infection by a relatively small structural modification at the viral attachment site of Ntcp.

(TIF)

## Acknowledgments

The authors thank Anita Neubauer, Klaus Schuh, Regina Leidolf, and Sigrun Broehl for technical help. The study was supported in part by funding from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Sonderforschungsbereich SFB1021/2 “RNA viruses: RNA metabolism, host response and pathogenesis”, project B08 to JG and DG.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Simon F. Müller, Joachim Geyer.

**Formal analysis:** Simon F. Müller, Alexander König, Barbara Döring, Dieter Glebe.

**Funding acquisition:** Dieter Glebe, Joachim Geyer.

**Investigation:** Simon F. Müller, Alexander König, Barbara Döring.

**Methodology:** Simon F. Müller, Alexander König, Barbara Döring, Dieter Glebe.

**Project administration:** Joachim Geyer.

**Resources:** Dieter Glebe, Joachim Geyer.

**Software:** Simon F. Müller.

**Supervision:** Dieter Glebe, Joachim Geyer.

**Validation:** Simon F. Müller.

**Visualization:** Simon F. Müller.

**Writing – original draft:** Simon F. Müller, Joachim Geyer.



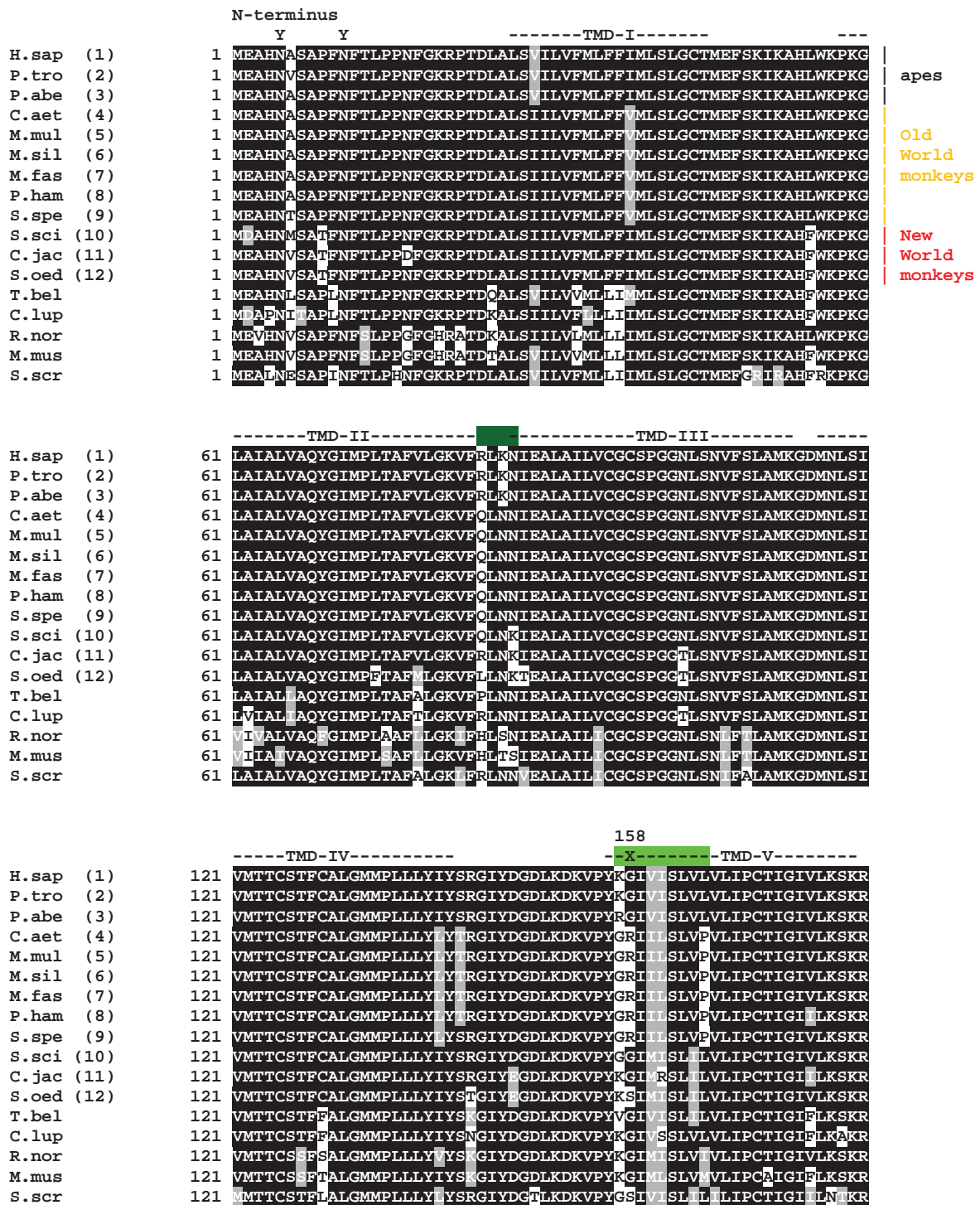
**Writing – review & editing:** Dieter Glebe, Joachim Geyer.

## References

- Geyer J, Wilke T, Petzinger E. The solute carrier family SLC10: More than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2006; 372:413–431.
- Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife* 2012; 1:e00049. <https://doi.org/10.7554/eLife.00049> PMID: 23150796
- Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, Nkongolo S, Kaufman C, Fälth M et al. Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology* 2014; 146:1070–1083. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.12.024> PMID: 24361467
- König A, Döring B, Mohr C, Geipel A, Geyer J, Glebe D. Kinetics of the bile acid transporter and hepatitis B virus receptor Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) in hepatocytes. *J Hepatol* 2014; 61:867–875. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.05.018> PMID: 24845614
- Döring B, Lütke T, Geyer J, Petzinger E. The SLC10 Carrier Family: Transport Functions and Molecular Structure. In: Bevenssee M (editor) *Co-Transport Systems*. Academic Press 2012:105–168.
- World Health Organization. *Global hepatitis report 2017*. Geneva 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Bonvicino CR, Moreira MA, Soares MA. Hepatitis B virus lineages in mammalian hosts: Potential for bidirectional cross-species transmission. *World J Gastroenterol* 2014; 20:7665–7674. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i24.7665> PMID: 24976704
- Lanford RE, Chavez D, Brasky KM, Burns RB, Rico-Hesse R. Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:5757–5761. PMID: 9576957
- De Carvalho Dominguez Souza BF, König A, Rasche A, de Oliveira Carneiro I, Stephan N, Max Corman V et al. A novel hepatitis B virus species discovered in capuchin monkeys sheds new light on the evolution of primate hepadnaviruses. *J Hepatol* 2018, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.01.029> PMID: 29428874
- Glebe D, Bremer CM. The molecular virology of hepatitis B virus. *Seminars in liver disease* 2013; 33:103–112. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1345717> PMID: 23749666
- Glebe D, Urban S, Knoop EV, Çağ N, Krass P, Grün S et al. Mapping of the Hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and Tupaia hepatocytes. *Gastroenterology* 2005; 129:234–245. PMID: 16012950
- Sureau C, Negro F. The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. *J Hepatol* 2016; 64:S102–S116. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.013> PMID: 27084031
- Li W, Urban S. Entry of hepatitis B and hepatitis D virus into hepatocytes: Basic insights and clinical implications. *J Hepatol* 2016; 64:S32–S40. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.011> PMID: 27084034
- Yan H, Peng B, He W, Zhong G, Qi Y, Ren B et al. Molecular determinants of hepatitis B and D virus entry restriction in mouse sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *J Virol* 2013; 87:7977–7991. <https://doi.org/10.1128/JVI.03540-12> PMID: 23678176
- Dupinay T, Gheit T, Roques P, Cova L, Chevallier-Queyron P, Tasahsu SI et al. Discovery of naturally occurring transmissible chronic hepatitis B virus infection among *Macaca fascicularis* from Mauritius Island. *Hepatology* 2013; 58:1610–1620. <https://doi.org/10.1002/hep.26428> PMID: 23536484
- Lempp FA, Wiedtke E, Qu B, Roques P, Chemin I, Vondran FWR et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is the limiting host factor of hepatitis B virus infection in macaque and pig hepatocytes. *Hepatology* 2017; 66:703–716. <https://doi.org/10.1002/hep.29112> PMID: 28195359
- Burwitz BJ, Wettengel JM, Mück-Häusl MA, Ringelhan M, Ko C, Festag MM et al. Hepatocytic expression of human sodium-taurocholate cotransporting polypeptide enables hepatitis B virus infection of macaques. *Nat Commun* 2017; 8:2146. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01953-y> PMID: 29247188
- Barrera A, Guerra B, Lee H, Lanford RE. Analysis of Host Range Phenotypes of Primate Hepadnaviruses by In Vitro Infections of Hepatitis D Virus Pseudotypes. *J Virol* 2004; 78:5233–5243. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.10.5233-5243.2004> PMID: 15113905
- Zhong G, Yan H, Wang H, He W, Jing Z, Qi Y et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide mediates woolly monkey hepatitis B virus infection of Tupaia hepatocytes. *J Virol* 2013; 87:7176–7184. <https://doi.org/10.1128/JVI.03533-12> PMID: 23596296
- Petzinger E, Wickboldt A, Pagels P, Starke D, Kramer W. Hepatobiliary transport of bile acid amino acid, bile acid peptide, and bile acid oligonucleotide conjugates in rats. *Hepatology* 1999; 30:1257–1268. <https://doi.org/10.1002/hep.510300529> PMID: 10534348

21. Geyer J, Döring B, Meerkamp K, Ugele B, Bakhiya N, Fernandes CF et al. Cloning and functional characterization of human sodium-dependent organic anion transporter (SLC10A6). *J Biol Chem* 2007; 282:19728–19741. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702663200> PMID: [17491011](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17491011/)
22. Zhou X, Levin EJ, Pan Y, McCoy JG, Sharma R, Kloss B et al. Structural basis of the alternating-access mechanisms in a bile acid transporter. *Nature* 2014; 505:569–573. <https://doi.org/10.1038/nature12811> PMID: [24317697](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24317697/)
23. Blank A, Markert C, Hohmann N, Carls A, Mikus G, Lehr T et al. First-in-human application of the novel hepatitis B and hepatitis D virus entry inhibitor myrcludex B. *J Hepatol* 2016; 65:473–489. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.04.006>
24. Nkongolo S, Ni Y, Lempp FA, Kaufman C, Lindner T, Esser-Nobis K et al. Cyclosporin A inhibits hepatitis B and hepatitis D virus entry by cyclophilin-independent interference with the NTCP receptor. *J Hepatol* 2014; 60:723–731. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.11.022> PMID: [24295872](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24295872/)
25. Shimura S, Watashi K, Fukano K, Peel M, Sluder A, Kawai F et al. Cyclosporin derivatives inhibit hepatitis B virus entry without interfering with NTCP transporter activity. *J Hepatol* 2017; 66:685–692. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.11.009> PMID: [27890789](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27890789/)
26. Fu L, Hu H, Liu Y, Jing Z, Li W. Woodchuck sodium taurocholate cotransporting polypeptide supports low-level hepatitis B and D virus entry. *Virology* 2017; 505:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.02.006> PMID: [28213271](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28213271/)

S1 Fig. Full sequence alignment of the cloned monkey Ntaps.



-----TMD-VI----- TMD-VII-----

H. sap (1)	181	PQYMRVVIKGGMI I I I L L C S V A V T V L S A I N V G K S I M F A M T P L L I A T S S L M P F I G F L L G Y V L
P. tro (2)	181	PQYMRVVIKGGMI I I I L L C S V A V T V L S A I N V G K S I M F A M T P L L I A T S S L M P F I G F L L G Y V L
P. abe (3)	181	PQYMRVVIKGGMI I I I L L C S V A V T V L S A I N V G K S I M F A M T P L L I A T S S L M P F I G F L L G Y V L
C. aet (4)	181	PQYMRVVIKGGMI I I I L L C S V A V T V L S A I N V G K S I M F A M T P L L I A T S S L M P F I G F L L G Y V L
M. mul (5)	181	PQYMRVVIKGGMI I I I L L C S V A V T V L S A I N V G K S I M F A M T P L L I A T S S L M P F I G F L L G Y V L
M. sil (6)	181	PQYMRVVIKGGMI I I I L L C S V A V T V L S A I N V G K S I M F A M T P L L I A T S S L M P F I G F L L G Y V L
M. fas (7)	181	PQYMRVVIKGGMI I I I L L C S V A V T V L S A I N V G K S I M F A M T P L L I A T S S L M P F I G F L L G Y V L
P. ham (8)	181	PQYMRVVIKGGMI I I I L L C S V A V T V L S A I N V G K S I M F A M T P L L I A T S S L M P F I G F L L G Y V L
S. spe (9)	181	PQYMRVVIKGGMI I I I L L C S V A V T V L S A I N V G K S I M F A M T P L L I A T S S L M P F I G F L L G Y V L
S. sci (10)	181	PQYMRVVIKGGMI I I I L L C S V A V T V L S A I N V G K S I M F A M T P L L I A T S S L M P F I G F L L G Y V L
C. jac (11)	181	PQYMRVVIKGGMI I I I L L C S V A V T V L S A I N V G K S I M F A M T P L L I A T S S L M P F I G F L L G Y V L
S. oed (12)	181	PQYMRVVIKGGMI I I I L L C S V A V T V L S A I N V G K S I M F A M T P L L I A T S S L M P F I G F L L G Y V L
T. bel	181	PQYMRVVIKGGMI I I I L L C S V A V T V L S A I N V G K S I M F A M T P L L I A T S S L M P F I G F L L G Y V L
C. lup	181	PQYMRVVIKGGMI I I I L L C S V A V T V L S A I N V G K S I M F A M T P L L I A T S S L M P F I G F L L G Y V L
R. nor	181	PQYMRVVIKGGMI I I I L L C S V A V T V L S A I N V G K S I M F A M T P L L I A T S S L M P F I G F L L G Y V L
M. mus	181	PQYMRVVIKGGMI I I I L L C S V A V T V L S A I N V G K S I M F A M T P L L I A T S S L M P F I G F L L G Y V L
S. scr	181	PQYMRVVIKGGMI I I I L L C S V A V T V L S A I N V G K S I M F A M T P L L I A T S S L M P F I G F L L G Y V L

-----TMD-VIII----- TMD-IX-----

H. sap (1)	241	SALFCLNGRCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVAFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLGEGLLL
P. tro (2)	241	SALFCLNGRCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVAFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLGEGLLL
P. abe (3)	241	SALFCLNGRCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVAFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLGEGLLL
C. aet (4)	241	SALFCLNGRCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVAFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLGEGLLL
M. mul (5)	241	SALFCLNGRCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVAFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLGEGLLL
M. sil (6)	241	SALFCLNGRCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVAFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLGEGLLL
M. fas (7)	241	SALFCLNGRCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVAFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLGEGLLL
P. ham (8)	241	SALFCLNGRCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVAFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLGEGLLL
S. spe (9)	241	SALFCLNGRCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVAFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLGEGLLL
S. sci (10)	241	SALFCLNGRCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVAFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLGEGLLL
C. jac (11)	241	SALFCLNGRCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVAFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLGEGLLL
S. oed (12)	241	SALFCLNGRCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVAFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLGEGLLL
T. bel	241	SALFCLNGRCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVAFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLGEGLLL
C. lup	241	SALFCLNGRCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVAFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLGEGLLL
R. nor	241	SALFCLNGRCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVAFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLGEGLLL
M. mus	241	SALFCLNGRCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVAFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLGEGLLL
S. scr	241	SALFCLNGRCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVAFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLGEGLLL

C-terminus

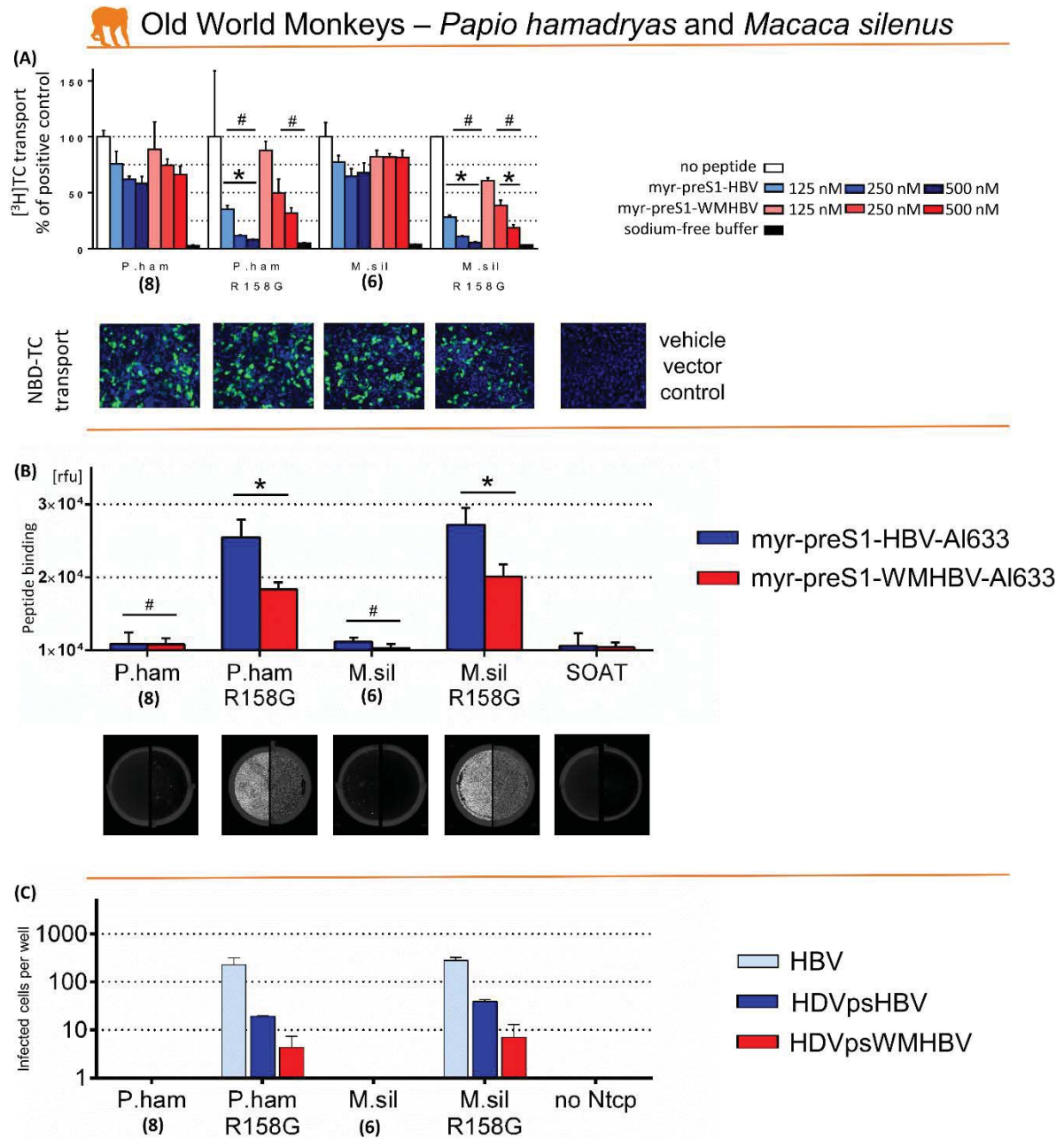
-----

H. sap (1)	301	IAMFWCYEKFKTPKDKTKMIYTAATTEETIPGALGNGTYKGEDCSPCTA-----
P. tro (2)	301	IAMFWCYEKFKTPKDKTKMIYTAATTEETIPGALGNGTYKGEDCSPCTA-----
P. abe (3)	301	IAMFWCYEKFKTPKDKTKMIYTAATTEETIPGALGNGTYKGEDCSPCTA-----
C. aet (4)	301	IAMFRCYEKFKTPKDKTKMIYTAATTEETIPGALGNGTYKGEDCSPCTA-----
M. mul (5)	301	IAMFRCYEKFKTPKDKTKMIYTAATTEETIPGALGNGTYKGEDCSPCTA-----
M. sil (6)	301	IAMFRCYEKFKTPKDKTKMIYTAATTEETIPGALGNGTYKGEDCSPCTA-----
M. fas (7)	301	IAMFRCYEKFKTPKDKTKMIYTAATTEETIPGALGNGTYKGEDCSPCTA-----
P. ham (8)	301	IAMFRCYEKFKTPKDKTKMIYTAATTEETIPGALGNGTYKGEDCSPCTA-----
S. spe (9)	301	IAMFRCYEKFKTPKDKTKMIYTAATTEETIPGALGNGTYKGEDCSPCTA-----
S. sci (10)	301	IAMFRCYEKFKTPKDKTKMIYTAATTEETIPGALGNGTYKGEDCSPCTA-----
C. jac (11)	301	IAMFRCYEKFKTPKDKTKMIYTAATTEETIPGALGNGTYKGEDCSPCTA-----
S. oed (12)	301	IAMFRCYEKFKTPKDKTKMIYTAATTEETIPGALGNGTYKGEDCSPCTA-----
T. bel	301	IAMFRCYEKFKTPKDKTKMIYTAATTEETIPGALGNGTYKGEDCSPCTA-----
C. lup	301	IAMFRCYEKFKTPKDKTKMIYTAATTEETIPGALGNGTYKGEDCSPCTA-----
R. nor	301	IAMFRCYEKFKTPKDKTKMIYTAATTEETIPGALGNGTYKGEDCSPCTA-----
M. mus	301	IAMFRCYEKFKTPKDKTKMIYTAATTEETIPGALGNGTYKGEDCSPCTA-----
S. scr	301	IAMFRCYEKFKTPKDKTKMIYTAATTEETIPGALGNGTYKGEDCSPCTA-----

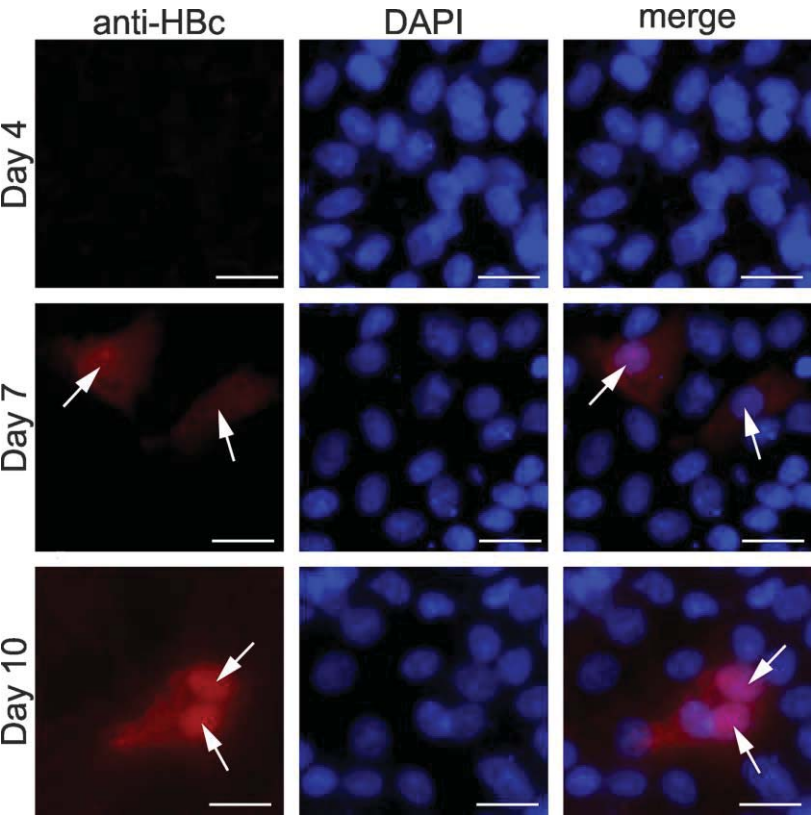


H.sap	(1)	-----
P.tro	(2)	-----
P.abe	(3)	-----
C.aet	(4)	-----
M.mul	(5)	-----
M.sil	(6)	-----
M.fas	(7)	-----
P.ham	(8)	-----
S.spe	(9)	-----
S.sci	(10)	-----
C.jac	(11)	361 KANSESQSGKLERAAKTPVLPESLQHF-----
S.oed	(12)	361 KANSKSQSGKL-----
T.bel		361 PSTVGNNGTYKGEECSPGTA-----
C.lup		361 KAIQCDQLEKAKDKRNTKEESFSSIGSSNYQN
R.nor		360 MAN-----
M.mus		360 MAN-----
S.scr		-----

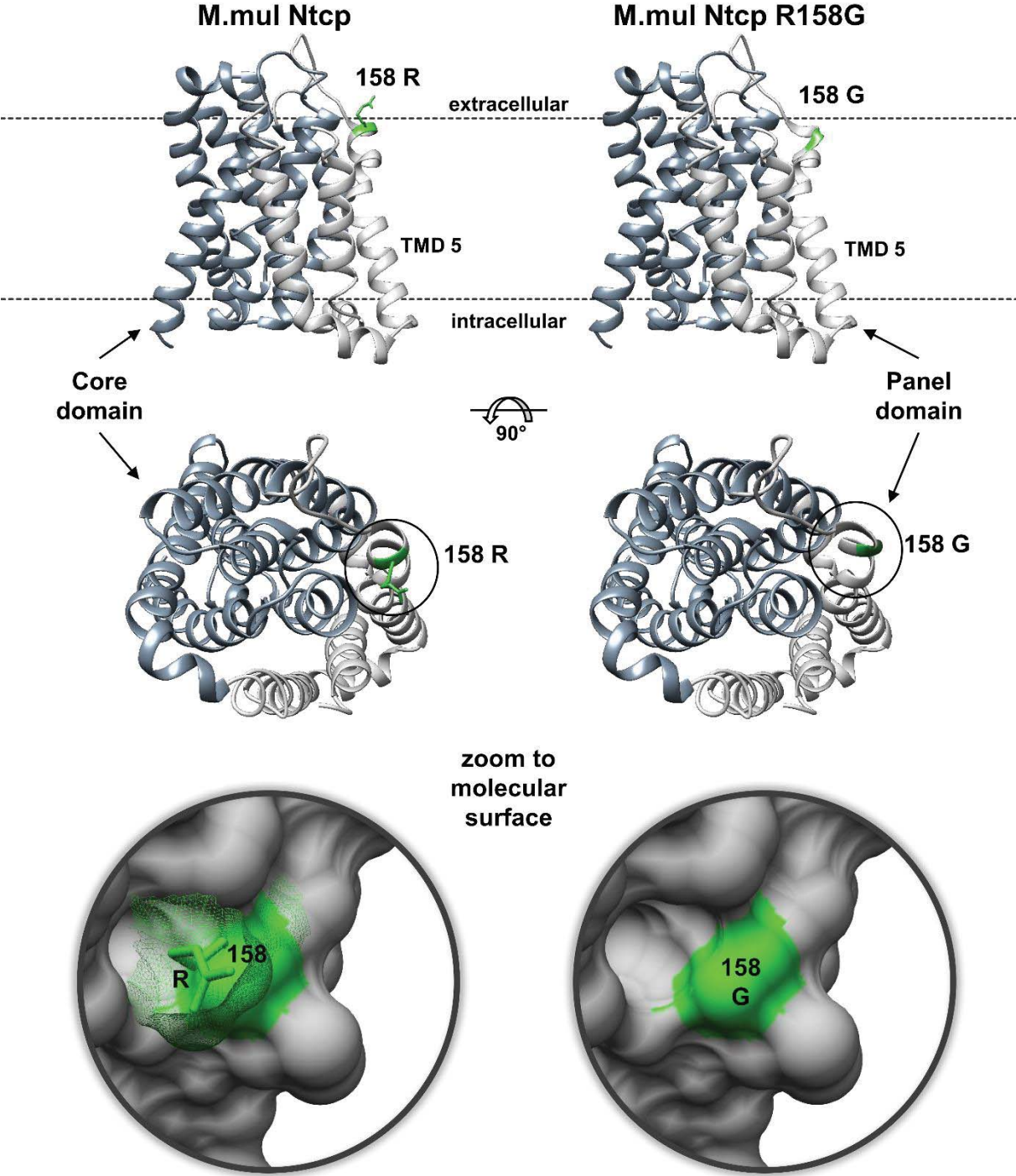
**S2 Fig. Papio hamadryas (8) and Macaca silenus (6) Ntcp: Transport, peptide binding and infection data.**



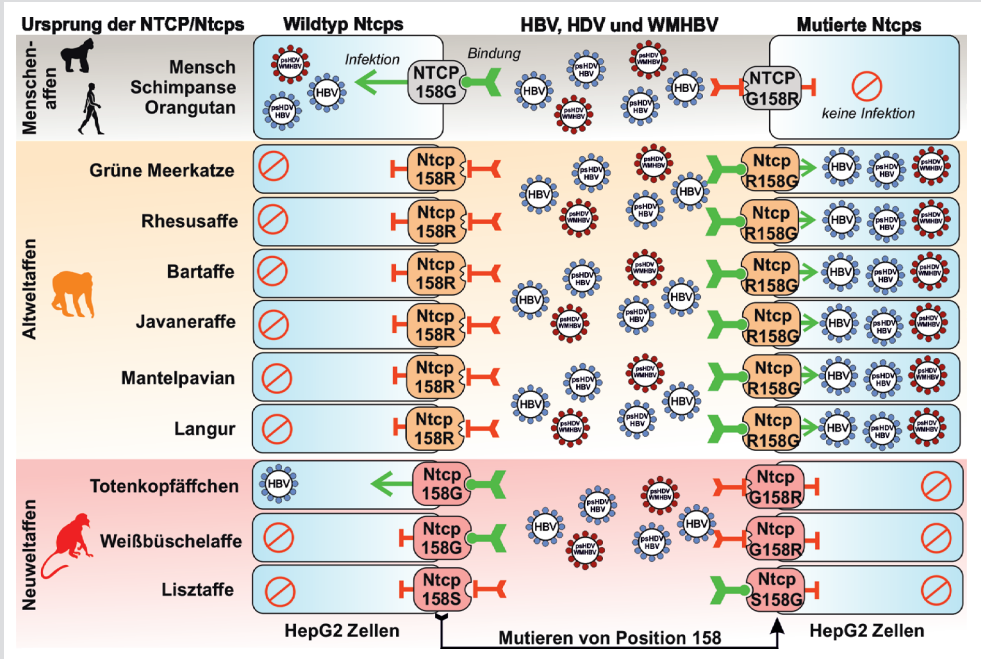
**S3 Fig. Time course of anti-HBcAg immunostaining signals after HBV infection in NTCP-transfected HepG2 cells.**



S4 Fig. Localisation of amino acid 158 at *Macaca mulatta* Ntcp.







ISBN: 978-3-86345-474-6



**Verlag der DVG Service GmbH**

Friedrichstraße 17 • 35392 Gießen

Tel.: 0641 / 24466 • Fax: 0641 / 25375

E-Mail: [info@dvg.de](mailto:info@dvg.de) • Web: [www.dvg.de](http://www.dvg.de)