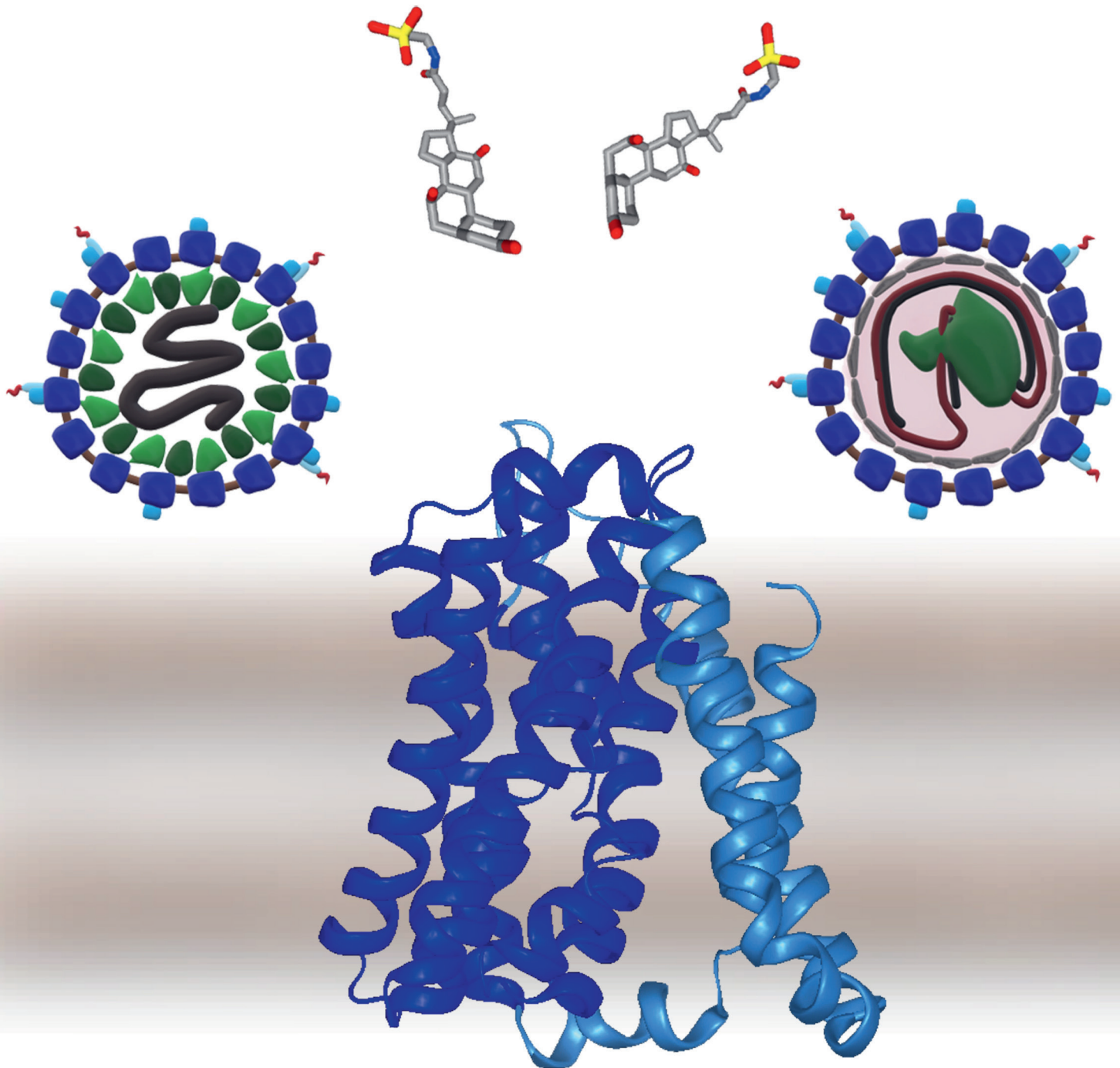


Interaktion des Hepatitis D Virus (HDV) mit seinem Rezeptor NTCP in einem *in vitro* Infektionssystem

Kira Alessandra Alicia Theresa Lowjaga



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>

© 2021 by Verlag:

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH, Gießen
Printed in Germany

Grafik Titelseite:

Chemische Strukturen der Gallensäuren wurden mittels PubChem generiert (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA). Das 3D-Modell des NTCPs wurde mit SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) und die farbige Darstellung mit Protean (DNASTAR, Madison, Vereinigte Staaten) erstellt.

ISBN 978-3-86345-569-9

1. Auflage 2021

Verlag:

DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
Tel.: 0641/24466
info@dv.de
www.dv.de

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Joachim Geyer

Interaktion des Hepatitis D Virus (HDV) mit seinem Rezeptor NTCP in einem *in vitro* Infektionssystem

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

Eingereicht von:

Kira Alessandra Alicia Theresa Lowjaga

Tierärztin aus Frankfurt am Main

Gießen 2021

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. Benjamin Lamp

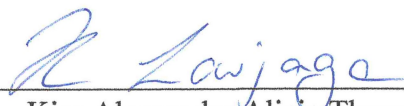
Tag der Disputation: 13.07.2021

Prüfungskommission: Prof. Dr. Joachim Geyer
Prof. Dr. Benjamin Lamp
Prof. Dr. Christiane Herden

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation

**„Interaktionen des Hepatitis D Virus (HDV) mit seinem
Rezeptor NTCP in einem *in vitro* Infektionssystem“**

selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, 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.



Kira Alessandra Alicia Theresa Lowjaga

*Die Wissenschaft geht nicht immer vorwärts. Es ist ein bisschen wie ein Zauberwürfel.
Manchmal musst du mit einem Zauberwürfel mehr Chaos anrichten, bevor du es richtig
machen kannst.*

Jocelyn Bell Burnell (Radioastronomin)

Du kannst etwas verändern – jeden Tag und zu jeder Zeit!

Jane Goodall (Verhaltensforscherin)

Man merkt nie, was schon getan wurde, man sieht immer nur, was noch zu tun bleibt.

Marie Curie (Physikerin und Chemikerin)

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-----------|--|-----------|
| I. | ABKÜRZUNGEN | V |
| 1 | LITERATURÜBERSICHT | 1 |
| 1.1 | <i>NA⁺-TAUROCHOLATE COTRANSPORTING POLYPEPTIDE (NTCP, SLC10A1)</i> | 1 |
| 1.1.1 | <i>SLC10-Transporterfamilie</i> | 1 |
| 1.1.2 | <i>NTCP: Entdeckung, Lokalisation und Struktur</i> | 3 |
| 1.1.3 | <i>Gallensäuren, weitere Substrate und Inhibitoren</i> | 5 |
| 1.1.4 | <i>Regulation des NTCPs</i> | 7 |
| 1.2 | HEPADNAVIREN UND DAS HEPATITIS DELTA VIRUS (HDV) | 10 |
| 1.2.1 | <i>Taxonomie und Epidemiologie des Hepatitis B Virus (HBV)</i> | 10 |
| 1.2.2 | <i>Morphologie und Infektionszyklus von HBV</i> | 11 |
| 1.2.3 | <i>Hepatitis Delta Virus (HDV)</i> | 13 |
| 1.2.4 | <i>Klinische Aspekte</i> | 15 |
| 1.3 | NTCP ALS REZEPTOR FÜR HBV/HDV | 17 |
| 1.4 | IN VITRO MODELLE DER HBV/HDV-FORSCHUNG | 19 |
| 2 | PUBLIKATIONEN UND EIGENANTEIL | 21 |
| 2.1 | PUBLIKATION I | 21 |
| 2.1.1 | <i>Eigenanteil - Publikation I</i> | 22 |
| 2.2 | PUBLIKATION II | 24 |
| 2.2.1 | <i>Eigenanteil - Publikation II</i> | 24 |
| 2.3 | PUBLIKATION III | 26 |
| 2.3.1 | <i>Eigenanteil - Publikation III</i> | 26 |
| 3 | DISKUSSION | 28 |
| 3.1 | HBV – SPEZIESABHÄNGIGKEIT UND SUSZEPTIBILITÄT | 28 |
| 3.2 | THERAPIEOPTIONEN BEI HBV – STRATEGIEN | 32 |
| 3.3 | TLC ALS TRANS-INHIBITOR DES NTCPs | 37 |
| 3.4 | AUSBlicKE | 41 |
| 3.4.1 | <i>In vivo Modelle von HBV/HDV</i> | 41 |
| 3.4.2 | <i>Betuline als neue, selektive HBV/HDV-Inhibitoren?!</i> | 47 |
| 3.4.3 | <i>Strukturaufklärung von NTCP als Schlüssel für die Entry-Inhibitor-Entwicklung</i> | 48 |
| 4 | ZUSAMMENFASSUNG | 52 |
| 5 | SUMMARY | 53 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS | 54 |
| 7 | DANKSAGUNG | 69 |
| 8 | ANHANG | 70 |

I. ABKÜRZUNGEN

| | |
|----------------------|--|
| μM | Mikromolar |
| ASBT, <i>SLC10A2</i> | <i>Apical sodium-dependent bile acid transporter</i> |
| ASBT _{NM} | ASBT von <i>Neisseria meningitis</i> |
| ASBT _{Yf} | ASBT von <i>Yersinia frederiksenii</i> |
| BSEP | <i>Bile Salt Export Pump</i> |
| cAMP | Cyclisches Adenosinmonophosphat |
| cccDNA | <i>Covalently closed circular DNA</i> |
| CMHBV | <i>Capuchin monkey hepatitis B virus</i> , Kapuzineraffen Hepatitis B Virus |
| CsA | Cyclosporin A |
| CSHBV | <i>Crowned shrew hepatitis B virus</i> , Schabrackenspitzmaus Hepatitis B Virus |
| DHEAS | Dehydroepiandrosteron-Sulfat |
| DHBV | <i>Duck hepatitis B virus</i> , Enten Hepatitis B Virus |
| DNA | <i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure |
| EMA | European Medicines Agency |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| FXR | Farnesoid X Rezeptor |
| GSHV | <i>Ground squirrel hepatitis virus</i> , Erdhörnchen Hepatitis Virus |
| GUDC | Glycoursodeoxycholsäure, Glycoursodeoxycholat (Salz) |
| h | Stunde |
| HBc/ HBcAg | Hepatitis B Core Antigen |
| HBe/ HBeAg | Hepatitis B e-Antigen |
| HBs/ HBsAg | Hepatitis B Surface Antigen |
| HBV | Hepatitis B Virus |
| HBx/ HBxAg | Hepatitis B x-Antigen |
| HCC | hepatozelluläres Karzinom |
| HCV | Hepatitis C Virus |
| HDAg | Hepatitis Delta Antigen |
| HDV | Hepatitis D Virus; Hepatitis Delta Virus |
| IC ₅₀ | Mittlere Inhibitorkonzentration |
| HSPG | Heparan Sulfat Proteoglykane |
| Kryo-EM | Kryoelektronenmikroskopie |
| LDH | Laktatdehydrogenase |
| LHBs | <i>Large HBV surface antigen</i> |
| LHDAg | <i>Large hepatitis delta antigen</i> |
| M | Molarität (mol/l) |
| MHBs | <i>Middle HBV surface antigen</i> |
| min | Minute |
| mRNA | Messenger Ribonukleinsäure |
| MSHBV | <i>Musk shrew hepatitis B virus</i> , Moschusspitzmaus Hepatitis B Virus |

| | |
|----------------------|---|
| MTS | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) |
| Myr-PreS1-Peptid | Myristoyliertes PreS1-Peptid (Aminosäuren 2-48) des LHBsAgs |
| Na ⁺ | Natriumion |
| NBD-TC | 4-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole-taurocholat |
| NMR-Spektroskopie | Kernspinresonanzspektroskopie |
| NTCP, <i>SLC10A1</i> | <i>Na⁺-Taurocholat Cotransporting Polypeptide</i> |
| OATP | <i>Organic Anion Transporting Polypeptide</i> |
| ORF | <i>Open Reading Frame</i> , offener Leserahmen |
| PI3K | Phosphatidylinositol-3-kinase |
| PKC | Proteinkinase C |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| SHBs | <i>Small HBV surface antigen</i> |
| SHDAg | <i>Small hepatitis delta antigen</i> |
| SHP-1 | <i>Small Heterodimer Partner</i> |
| SLC | <i>Solute Carrier</i> |
| <i>SLC10</i> | <i>Solute carrier family 10</i> |
| SOAT, <i>SLC10A6</i> | <i>Sodium-dependent organic anion transporter</i> |
| SVP | Subvirale Partikel |
| TBHBV | <i>Tent-making bat hepatitis B virus</i> , Gelbohr-Fledermaus Hepatitis B Virus |
| TC | Taurocholsäure, Taurocholat (Salz) |
| TCDC | Taurochenodeoxycholsäure, Taurochenodeoxycholat (Salz) |
| TLC | Taurolithocholsäure, Taurolithocholat (Salz) |
| TMD | Transmembrandomäne |
| TUDC | Tauroursodeoxycholsäure, Tauroursodeoxycholat (Salz) |
| WHO | World Health Organisation |
| WHV | <i>Woodchuck hepatitis virus</i> , Waldmurmeltier Hepatitis Virus |
| WMHBV | <i>Woolly monkey hepatitis B virus</i> , Wollaffen Hepatitis B Virus |
| ³ H | Tritium |

1 LITERATURÜBERSICHT

1.1 *Na⁺-Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP, SLC10A1)*

1.1.1 SLC10-Transporterfamilie

Die SLC-Familien beinhalten passive Transporter, Ionen-gekoppelte Symporter und Antiporter in Zellmembranen oder anderen membranösen Zellkompartimenten (Hediger et al. 2004). Aktuell sind 65 *Solute Carrier* Familien (SLC) und 458 verschiedene humane Transportergene bekannt.

Die SLC10 Familie gehört zu den Ionen-gekoppelten Symportern und wird nach ihren zuerst entdeckten Vertretern, dem *Na⁺/Taurocholate Cotransporting Polypeptide* (NTCP; *SLC10A1*) und dem *Apical Sodium-Dependent Bile Acid Transporter* (ASBT; *SLC10A2*), als Natrium/Gallensäure-Cotransporter-Familie bezeichnet (Geyer et al. 2006). Aufgrund von Sequenzhomologien besteht die SLC10-Familie mittlerweile aus sieben Mitgliedern: zwei Gallensäure-Transportern (NTCP und ASBT), dem *Sodium-dependent Organic Anion Transporter* (SOAT, *SLC10A6*), welcher dafür bekannt ist Steroidsulfate zu transportieren, und vier in ihrer Funktion noch nicht vollständig charakterisierten „*Orphan Carrier*“ (*SLC10A3*, *SLC10A4*, *SLC10A5* und *SLC10A7*) (Geyer et al. 2006; Geyer et al. 2007; Godoy et al. 2007; Döring et al. 2012; Karakus et al. 2020).

In der SLC10-Nomenklatur ist festgelegt, dass humane Gene und Proteine in Großbuchstaben (z.B.: NTCP, Gensymbol: *SLC10A1*) und nicht humane mit kleinen Buchstaben zu schreiben sind (z.B.: Ntcp, Gensymbol: *Slc10a1*) (Geyer et al. 2006).

NTCP und ASBT sind natriumabhängige, sekundär aktive Gallensäure-Natrium-Symporter, die Natriumionen und Gallensäuren in das intrazelluläre Kompartiment der Zelle transportieren (Craddock et al. 1998; Stieger 2011). Gallensäuren liegen bei physiologischem pH-Wert hauptsächlich in ionisierter Form vor, weshalb man diese als Gallensalze bezeichnet (Hofmann et al. 2008). In dieser Arbeit wird jedoch der Begriff „Gallensäure“ verwendet.

NTCP wird *in vivo* prädominant in der basolateralen Membran von Hepatozyten exprimiert, während ASBT in der apikalen Enterozytenmembran des Ileums zu finden ist (Ananthanarayanan et al. 1994; Stieger et al. 1994; Craddock et al. 1998; Döring et al. 2012). Beide weisen eine höhere Affinität zu mit Taurin oder Glycin konjugierten Gallensäuren, als zu unkonjugierten Gallensäuren auf (Ho et al. 2011; Döring et al. 2012).

NTCP und ASBT sind essentiell für die Aufrechterhaltung der Zirkulation von Gallensäuren zwischen Darm und Leber, auch bezeichnet als enterohepatischer Kreislauf der Gallensäuren (Anwer et al. 2014). Aus dem Darmlumen werden Gallensäuren natriumabhängig über den ASBT im terminalen Ileum aufgenommen und in das Blutsystem transportiert. Über die *Vena portae* gelangen die im Blut negativ geladenen Gallensäuren zur Leber, wo sie über NTCP aus dem Portalblut extrahiert und in die Hepatozyten aufgenommen werden. Von dort werden sie über ATP-abhängige Gallensäuren Exportpumpen, wie die Gallensäuren Exportpumpe BSEP (*ABCB11*) an der apikalen Hepatozytenmembran in die Gallenkanäle befördert und gelangen anschließend in die Gallenblase. Bei Bedarf werden die Gallensäuren von dort in den Darm abgegeben, wo sie Lipide in der Nahrung emulgieren und somit für den Darm resorbierbar machen. Damit schließt sich der enterohepatische Kreislauf der Gallensäuren (Stieger 2011). Durch diesen Kreislauf können ca. 95 % der Gallensäuren recycelt werden (Dawson et al. 2009).

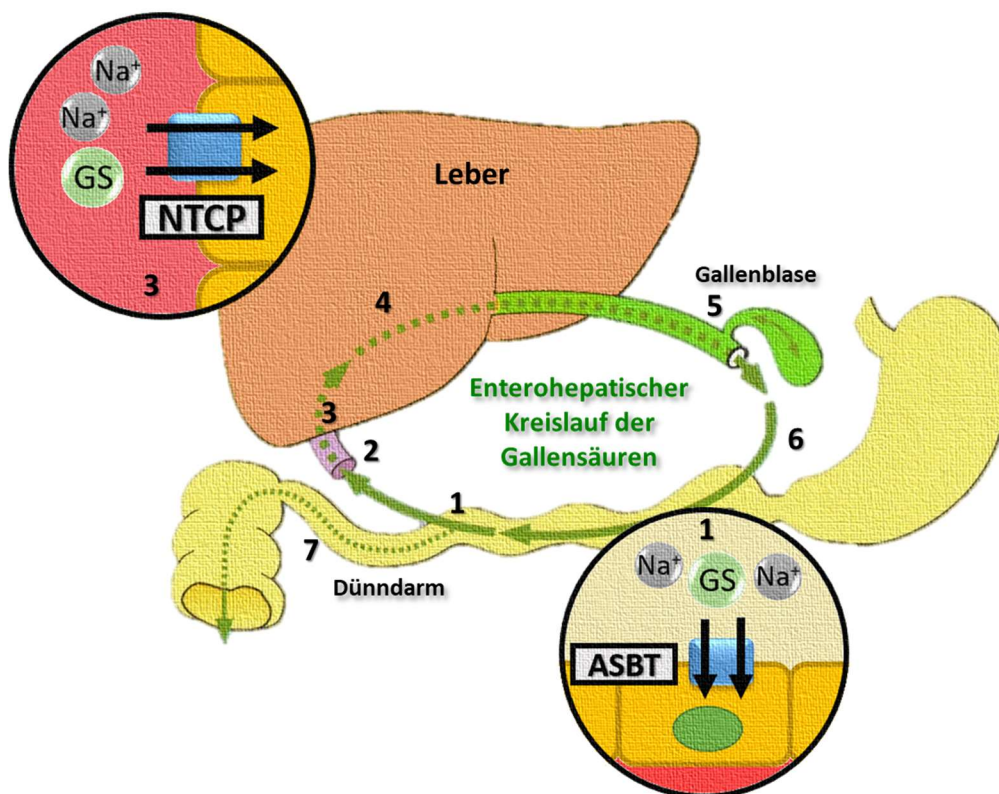


Abb.1.1 Schema des enterohepatischen Kreislaufs der Gallensäuren

Aus dem Darmlumen werden Gallensäuren (GS) zusammen mit Natriumionen (Na^+) über ASBT in der apikalen Enterozytenmembran aufgenommen (1). Anschließend werden die Gallensäuren in das Blut abgegeben und über die Portalvene zur Leber geführt (2). NTCP transportiert je Gallensäuremolekül mindestens zwei Natriumionen in die Hepatozyten (3). In den Hepatozyten können die Gallensäuren modifiziert (Kopplung mit Taurin/Glycin) oder auch unter hohem Energieaufwand neu synthetisiert werden. Über Gallensäure-Efflux-Transporter werden die Gallensäuren in die Gallenkanälchen sekretiert (4). Von dort aus gelangen die Gallensäuren über den Gallengang in die Gallenblase (5). In

der Gallenblase werden Gallensäuren gespeichert, bis sie z.B. in der postprandialen Phase in den Darm entlassen werden (6), wo sie für die Emulsion von Lipiden und die Aufnahme von fettlöslichen Vitaminen zuständig sind. Anschließend werden die überschüssigen, energetisch wertvollen Gallensäuren resorbiert, wodurch sich der enterohepatische Kreislauf schließt. Nur ein sehr kleiner Teil der Gallensäuren wird nicht resorbiert, sondern über den Faeces ausgeschieden (7).

Während ASBT bei Expression in COS- oder CHO-Zellen spezifisch Gallensäuren transportiert, vermittelt NTCP in transfizierten COS-Zellen nicht nur den Transport von Gallensäuren, sondern auch von Estron-3-Sulfat, einem sulfatierten Steroidhormon (Craddock et al. 1998). Jedoch ist die Transportrate von sulfatierten Steroiden im Vergleich zu Taurocholsäure (TC) über NTCP als eher gering zu bezeichnen (Geyer et al. 2006). SOAT-transfizierte HEK293-Zellen zeigten keinen Gallensäuretransport, aber einen strikt natriumabhängigen Transport von Steroidsulfaten, wie Estron-3-Sulfat und DHEAS (Geyer et al. 2007). Soat/SOAT konnte unter anderem in den Reproduktionsorganen von Mäusen und Ratten sowie in einem Screening von humanem Gewebe mittels quantitativer PCR im menschlichen Hoden nachgewiesen werden (Geyer et al. 2006; Fietz et al. 2013). Zusätzlich wurde bei Hodenbiopsien von Patienten mit beeinträchtigter Spermatogenese eine verminderte mRNA-Expression von SOAT festgestellt, weshalb die Hypothese aufgestellt wurde, SOAT könne durch den Transport von Steroidsulfaten wie Estron-3-Sulfat Einfluss auf die Regulation von Steroiden nehmen (Geyer et al. 2006; Fietz et al. 2013).

1.1.2 NTCP: Entdeckung, Lokalisation und Struktur

Anfang der 1990er Jahre wurden zunächst der Ratten-Ntcp und wenig später der humane NTCP kloniert und charakterisiert (Hagenbuch et al. 1990; Hagenbuch et al. 1991; Hagenbuch et al. 1994). Der humane NTCP besteht aus 349 Aminosäuren und sieben oder neun Transmembrandomänen (TMD), bei welchen sich der N-Terminus extrazellulär und der C-Terminus intrazellulär befindet (Hallen et al. 2002; Mareninova et al. 2005). Unter physiologischen Bedingungen ist NTCP maßgeblich an der Wiederaufnahme von Gallensäuren aus dem portalen Blut beteiligt (Hagenbuch et al. 1996; Geyer et al. 2006). NTCP transportiert mit einer Stöchiometrie von 1:2 pro Transportzyklus ein Gallensäuremolekül und zwei Natriumionen. Folglich wird bei jedem Transportvorgang einer einfach negativ geladenen Gallensäure eine zusätzliche positive Ladung nach intrazellulär verschoben, weshalb der Transport als elektrogen zu werten ist (Hagenbuch et al. 1996; Weinman 1997; Weinman et al. 1998). Sowohl der Ratten-Ntcp als auch der humane NTCP weisen zwei Glykosylierungsstellen am N-Terminus auf (Aminosäuren N7 und N11) (Hagenbuch et al. 1994; Lee et al. 2018).

NTCP befindet sich in der basolateralen Membran von Hepatozyten, die dem Portalblut zugewandt ist. Zusätzlich besitzen Hepatozyten durch ihre Polarisierung eine laterale

Membran, welche sich an benachbarte Hepatozyten über *tight junctions* anschmiegt, und eine apikale Membran, welche den Gallekanälchen zugewandt ist. *Tight junctions* verschließen die Zwischenräume zwischen den Hepatozyten, wodurch ein dichter, für hydrophile Substanzen undurchdringlicher Verbund entsteht. Der Transport in die Zelle wird über Transporter wie NTCP vermittelt. NTCP in der Leber sowie ASBT im Darm befinden sich in Plasmamembranbereichen mit einem hohen Cholesterolgehalt, den *lipid rafts*. Dieser hohe Cholesterolgehalt der Zellmembran soll Einfluss auf die Funktion des NTCPs ausüben (Annaba et al. 2008; Molina et al. 2008).

Die Struktur von NTCP ist noch nicht aufgeklärt. Jedoch konnten drei Kristallstrukturen von Bakterienhomologen des ASBTs von *Neisseria meningitidis* (ASBT_{NM}) und *Yersinia frederiksenii* (ASBT_{Yf}) erstellt werden (Hu et al. 2011; Zhou et al. 2014; Wang et al. 2021).

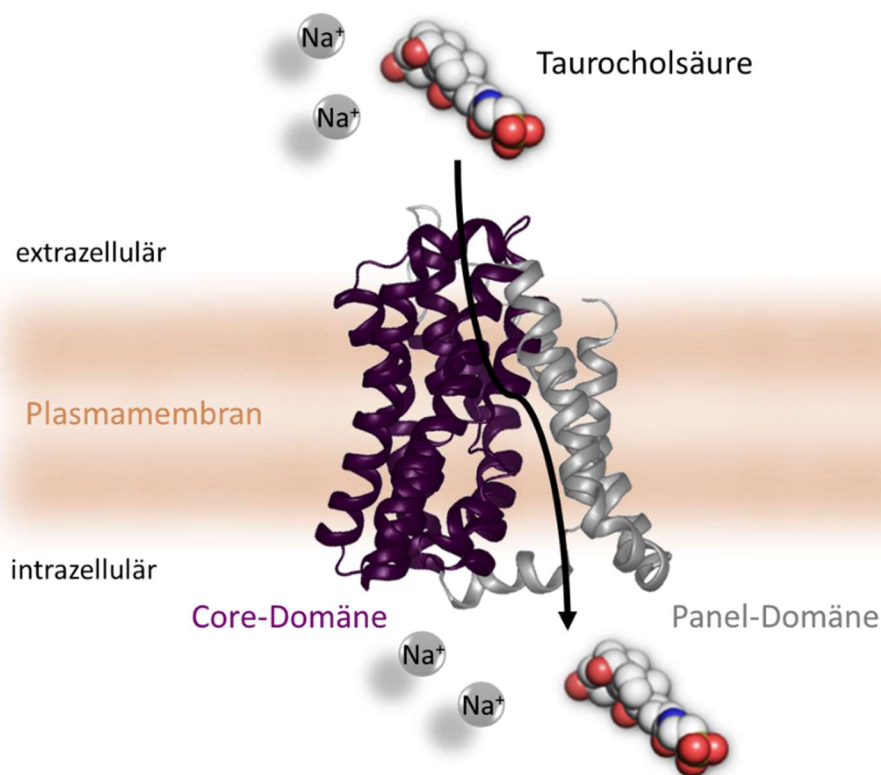


Abb. 1.2 Homologiemodell von NTCP auf Basis der ASBT-Kristallstruktur von *Yersinia frederiksenii*

Dargestellt wird der in der Zellmembran befindliche NTCP mit seiner Core-Domäne (lila) und seiner Panel-Domäne (grau). Mit Hilfe des schwarzen Pfeils wird der Transportweg von Gallensäuren, hier von Taurocholsäure, zwischen flexibler Panel-Domäne und starrer Core-Domäne angedeutet. Bei jedem Transportvorgang wird ein Gallensäuremolekül zusammen mit mindestens zwei Natriumionen nach intrazellulär transportiert. 3D-Modell-Erstellung mit SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) und farbige Darstellung mit Protean (DNASTAR).

Mit Hilfe dieser Strukturen können für den NTCP 3D-Homologiemodelle generiert werden, wobei die Sequenz des NTCPs über die jeweilige, vorhandene ASBT-Kristallstruktur gelegt wird. Aufgrund konservierter Bereiche in der Aminosäuresequenz an den Natriumbindungsstellen und einem hydrophoben Hohlraum innerhalb des Proteins (Hu et al. 2011) wurde eine Hypothese über den Transportmechanismus des NTCPs aufgestellt. So wurden durch die Homologiemodelle des NTCPs auf Basis der Kristallstrukturen von ASBT_{NM} und ASBT_{Yf} sechs Helices als Core-Domäne (TMD 2-4, 7-9) und drei als Panel-Domäne (TMD 1, 5, 6) identifiziert (Zhou et al. 2014). Die flexiblere Panel-Domäne soll sich nach der Hypothese so gegen die starre Core-Domäne verschieben, dass zwei Konformationen entstehen können: eine nach intrazellulär geöffnete (*inward open*) und eine nach extrazellulär offene (*outward open*) Konformation. Durch die Bindung der Substrate wird eine Konformationsänderung des nach extrazellulär offenen NTCPs ausgelöst, in dessen Verlauf das Substrat durch den hydrophoben Hohlraum zwischen Core- und Panel-Domäne transportiert und durch die Öffnung des NTCPs nach intrazellulär abgegeben wird. NTCP kehrt anschließend zu seiner ursprünglichen Konformation, der *outward open* Konformation, zurück und ist für eine weitere Substratbindung bereit. Aufgrund einer geringen Sequenzhomologie des humanen NTCPs zu den bakteriellen Homologen des ASBTs (nahe 26 % Sequenzidentität von NTCP zu ASBT_{Yf}) sollten diese Hypothesen jedoch noch durch eine strukturelle Aufklärung des NTCPs bestätigt werden (Hu et al. 2011; Noinaj et al. 2014; Zhou et al. 2014). NTCP bildet Homodimere, wobei separate NTCP-Monomere weiterhin Gallensäuren transportieren können. Die Formation zu Homodimeren scheint für den Transport der NTCPs zur Plasmamembran und für die richtige Insertion in diese relevant zu sein (Bijsmans et al. 2012; Noppes et al. 2019).

Seit 2012 ist bekannt, dass NTCP als spezifischer Rezeptor für das Hepatitis B und das Delta-Virus fungiert (Yan et al. 2012). Nähere Informationen in Kapitel 1.3 „NTCP als Rezeptor für HBV/HDV“.

1.1.3 Gallensäuren, weitere Substrate und Inhibitoren

Der größte Bestandteil der gelösten Festsubstanzen in der Galle sind Gallensäuren. Gallensäuren, die physiologischen Hauptsubstrate des NTCPs, bestehen aus einer Grundstruktur von vier Steroidringen mit einer konvexen, hydrophoben und einer konkaven, hydrophilen Seite. Durch diese amphipatische Natur der Gallensäuren können sie Aufgaben erfüllen, wie das Emulgieren von Lipiden und fettlöslichen Vitaminen (Vitamin A, D, E, K) oder das Lösen von Cholesterol in der Galle, wodurch sie die Gallensteinbildung vermeiden

(Claudel et al. 2011; de Aguiar Vallim et al. 2013). Außerdem wird der Hauptanteil des Cholesterols über die Gallensäuren ausgeschieden, wodurch Gallensäuren einen großen Einfluss auf die Sterol-Homöostase des Körpers haben. In den letzten Jahren wurden Gallensäuren vermehrt als Signalmoleküle mit para- und endokriner Funktion im Glukose-, Fett- und Energiestoffwechsel beschrieben (Houten et al. 2006; de Aguiar Vallim et al. 2013; Ahmad et al. 2019).

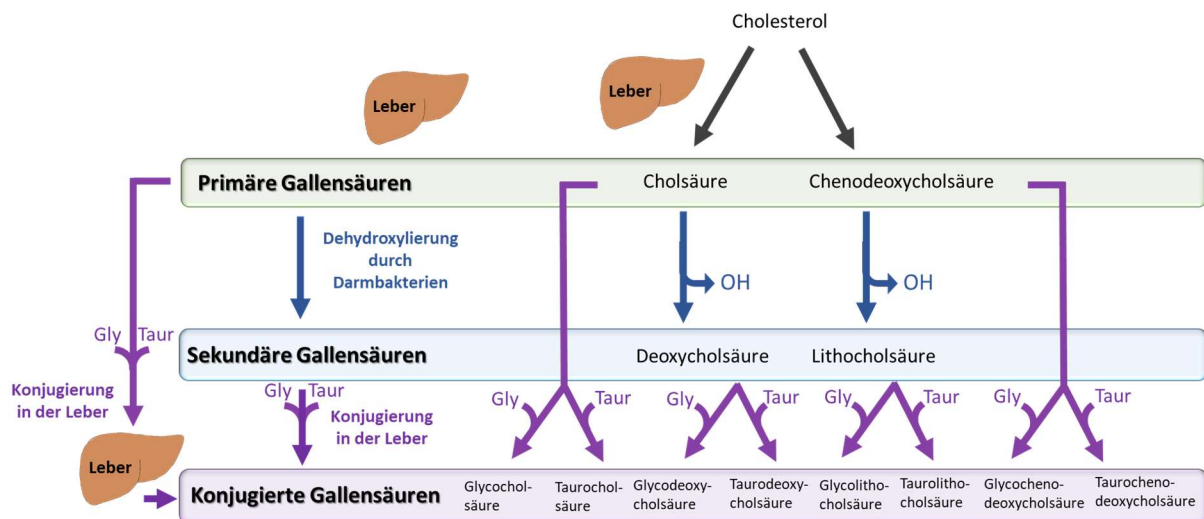


Abb.1.3 Einteilung der Gallensäuren

Gallensäuren werden in der Leber in einem energieaufwändigen Prozess aus Cholesterol gebildet. Die im ersten Schritt entstehenden Gallensäuren, Cholsäure und Chenodeoxycholsäure, werden als primäre Gallensäuren bezeichnet. Sobald die Gallensäuren den Darm über den enterohepatischen Kreislauf erreichen, können diese durch aerobe Darmbakterien dehydroxyliert und somit zu sekundären Gallensäuren umgewandelt werden. Durch Resorption der sekundären Gallensäuren und anschließender Aufnahme in das Blut sowie die Leber, können die Gallensäuren in der Leber über Konjugation mit Taurin oder Glycin zu sekundär, konjugierten Gallensäuren transformiert werden. Durch die Konjugation werden die Gallensäuren hydrophiler und weniger toxisch. Gallensäuren können auch direkt nach der Synthese in der Leber konjugiert werden, dann werden sie als primär konjugierte Gallensäuren bezeichnet.

Gallensäuren werden in der Leber in einem komplexen Vorgang unter Beteiligung vieler Enzyme aus Cholesterol gebildet (Monte et al. 2009). Die daraus resultierenden primären Gallensäuren, Cholsäure und Chenodeoxycholsäure, können mit Taurin oder Glycin konjugiert und anschließend in die Galle sekretiert werden. Konjugierte Gallensäuren sind hydrophiler und weniger zytotoxisch. Sie können aber die Lipiddoppelmembran der Zellen über Transporter überwinden und ins Zellinnere gelangen (Hofmann 2009). Sobald die Gallensäuren im Darm ankommen, können Bakterien diese zu sekundären Gallensäuren, Deoxycholsäure und Lithocholsäure, umsetzen. Die Bildung von Gallensäuren ist sehr energieaufwändig, weshalb große Mengen an Gallensäuren über den enterohepatischen Kreislauf wiedergewonnen werden.

Eine Störung des Gallensäuremetabolismus kann, aufgrund der vielfältigen Funktionen dieser Substanzen, zu ernsthaften Krankheiten führen (de Aguiar Vallim et al. 2013).

NTCP hat, wie schon beschrieben, ein breites Substratspektrum. Einige vom NTCP transportierte Gallensäurederivate verfügen über raumeinnehmende Modifikationen. Ein in dieser Arbeit verwendetes fluoreszierendes Gallensäurederivat ist das 4-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-Taurocholat (NBD-TC), welches für die mikroskopische Darstellung, Verifizierung und Messung der physiologischen Funktion des NTCPs eingesetzt wurde (Petzinger et al. 1999). Die Substrate des NTCPs besitzen meist ein Steroidgerüst und unterscheiden sich sowohl in Größe und Struktur als auch in ihrer Affinität zum NTCP. Substrate mit höherer Affinität zum NTCP können als kompetitive Inhibitoren eingesetzt werden. Zusätzlich gibt es einige Inhibitoren des NTCPs, welche nicht transportiert werden (Stieger 2011; Döring et al. 2012). Eine Hemmung des NTCPs durch Inhibitoren, kann eine (teilweise) Blockade des enterohepatischen Kreislaufs der Gallensäuren mit erhöhten Gallensäurewerten im peripheren Blut nach sich ziehen. Des Weiteren können durch das breite Substratspektrum des NTCPs *in vivo* Arzneimittelwechselwirkungen auftreten (Anwer et al. 2014). Neben Gallensäuren wurde der Transport von an Gallensäuren gekoppelte Wirkstoffe wie Chlorambucil-Taurocholat über NTCP in *Xenopus laevis* Oozyten nachgewiesen (Kullak-Ublick et al. 1997). Zusätzlich zum Transport von sulfatierten Steroiden wie Estron-3-Sulfat wurde der Transport von sulfatierten Thyroidhormonen und T4 in NTCP exprimierenden HEK293 und COS1-Zellen, der Transport von Bromsulphthalein in *Xenopus laevis* Oozyten und von Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) in HEK293-Zellen gezeigt (Meier et al. 1997; Craddock et al. 1998; Visser et al. 2010; Schweigmann et al. 2014). Auch Ntcp der Ratte transportierte DHEAS in humanen Hepatomzellen, Thyroid- und Steroidhormone sowie Bromsulphthalein in *Xenopus laevis* Oozyten und Estron-3-Sulfat in CHO-Zellen (Stieger 2011).

Jedoch wurden Speziesunterschiede im Substrat- und Inhibitorspektrum der NTCPs/Ntcp verschiedener Spezies beschrieben (Leslie et al. 2007). So wird Rosuvastatin durch den humanen NTCP transportiert, jedoch nicht durch den Ratten-Ntcp (Ho et al. 2006). Dies sollte besonders in Bezug auf die Übertragung experimenteller Ergebnisse zwischen verschiedenen Spezies beachtet werden.

1.1.4 Regulation des NTCPs

NTCP wird über ein komplexes System von Liganden-aktivierten Rezeptoren und hepatischen Transkriptionsfaktoren auf genetischer Ebene reguliert. Bei cholestatischen Zuständen wird sowohl der humane NTCP als auch der Ratten-Ntcp, wahrscheinlich aufgrund der Gefahr von

Akkumulation zytotoxischer Gallensäuren in den Zellen, in seiner Expression gehemmt (Potter 1998; Chai et al. 2012). Dies geschieht vor allem über negative Feedback-Schleifen der Gallensäuren auf Kernrezeptoren wie dem *Farnesoid X Rezeptor* (FXR). Der FXR wird durch die Bindung von Gallensäuren aktiviert und inhibiert im Zusammenspiel mit dem *Small Heterodimer Partner* (SHP-1), einem Transkriptionsfaktor, die Expression von Gallensäure-Aufnahmetransportern, wie NTCP und ASBT. Des Weiteren wird die Neubildung von Gallensäure-Effluxtransportern aktiviert und die Neusynthese von Gallensäuren gehemmt (Eloranta et al. 2008). Über andere Kernrezeptoren, wie den Glukokortikoidrezeptor, wird die Neubildung des NTCPs gefördert (Claudel et al. 2011; Claro da Silva et al. 2013).

Aufgrund der Komplexität der Vorgänge ist die Regulation des humanen NTCPs nur lückenhaft bekannt. Zudem war in vielen Untersuchungen nicht der humane NTCP, sondern der Ratten-Ntcp Gegenstand der Forschung. Durch eine große Speziesvariabilität in der Regulation des NTCPs/Ntcps sind Ergebnisse aus Studien, welche den Ratten-Ntcp untersuchten, nur unter Vorbehalt auf den humanen NTCP übertragbar (Jung et al. 2004).

Da die Regulation über Kernrezeptoren langsam und langfristig auf veränderte Umstände reagieren kann, existieren zusätzlich kurzfristige, posttranskriptionale Regulationen des NTCPs. Beispielsweise in der postprandialen Phase können diese kurzfristigen Regulierungen der Aufnahme potentiell zytotoxischer Gallensäuren und eine Feinabstimmung der Gallensäurehomöostase besonders wichtig sein.

Auch bezüglich der Aufklärung der posttranslationalen Regulation haben die meisten Studien den Ratten-Ntcp untersucht. Der Ratten-Ntcp ist ein Serin/Threonin-Phosphoprotein und sein Phosphorylierungsstatus reguliert dessen Ein- und Ausbau in die basolaterale Hepatozytenmembran (Mukhopadhyay et al. 1998a; Mukhopadhyay et al. 1998b). An Serin-226 dephosphorylierte Ratten-Ntcps werden in die Membran eingebaut und phosphorylierte Ntcps bilden einen intrazellulären Pool in Speichervesikeln (Anwer et al. 2005; Anwer et al. 2014). Die Insertion des Ratten-Ntcps in die Zellmembran wird durch cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) in Rattenhepatozyten und in humanen Hepatomzellen mit stabil exprimierten Ratten-Ntcps beeinflusst (Mukhopadhyay et al. 1997; Mukhopadhyay et al. 1998b; McConkey et al. 2004). Cyclisches AMP senkt die Phosphorylierungsrate der Ntcps und erhöht die Membranexpression des Ntcps in Rattenhepatozyten und folglich die Gallensäureaufnahme (Grüne et al. 1993; Mukhopadhyay et al. 1997; Mukhopadhyay et al. 1998b). Cyclisches AMP agiert über zwei Wege: über die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) oder über eine Erhöhung des intrazellulären Calciums.

Der PI3K-Aktivierung folgt die Phosphorylierung von Proteinkinasen (Akt, PKC δ , und PKC ζ), welche den vesikulären Transport des dephosphorylierten Ratten-Ntcps aus intrazellulären Speichervesikeln zur Plasmamembran initiieren (Dranoff et al. 1999; Webster et al. 1999; Webster et al. 2000; McConkey et al. 2004; Schonhoff et al. 2008; Park et al. 2012). Der PI3K/Akt Weg kann durch Zellschwellung stimuliert werden (Webster et al. 2000; Webster et al. 2002b). Bei der zweiten genannten Route aktivieren vermehrte intrazelluläre Calciumionen in der Zelle Ca²⁺-abhängige Phosphatasen, welche den Ratten-Ntcp dephosphorylieren und somit den Transport zur Plasmamembran auslösen (Grüne et al. 1993; Webster et al. 2002a).

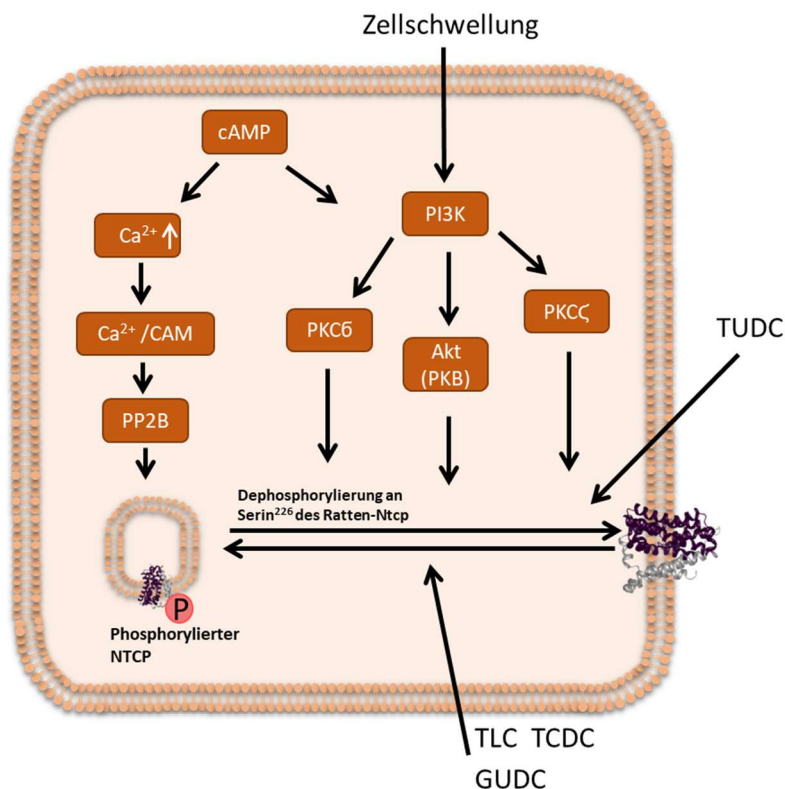


Abb. 1.4 Posttranskriptionale Regulation des NTCPs/Ntcps

Cholestatische Gallensäuren, wie Taurochenodeoxycholsäure (TCDC), Tauroolithocholsäure (TLC) und Glycoursodeoxycholsäure (GUDC), initiieren eine verminderte TC-Aufnahme in die Zellen über humanen NTCP und Ratten-Ntcp (Schwenk et al. 1977; Mühlfeld et al. 2012) und den Ratten-Ntcp betreffend zusätzlich eine verminderte Membranexpression (Schonhoff et al. 2009; Mühlfeld et al. 2012). Während anticholestatische Gallensäuren wie Tauroursodeoxycholsäure (TUDC) den Effekt der Internalisierung des Ratten-Ntcps rückgängig machen können (Sommerfeld et al. 2015; Mayer et al. 2019).

Substanzen, wie bakterielle Lipopolysaccharide und Entzündungsmediatoren (Interleukin-1 β , Tumornekrosefaktor α , Interleukin-6), haben zusätzlich einen Einfluss auf die NTCP-Membranexpression (Le Vee et al. 2008; Le Vee et al. 2009; Klein et al. 2015; Yan et al. 2019)

Zusätzlich wirkt sich neben dem Stadium der Phosphorylierung des NTCPs auch dessen Glykosylierungszustand auf dessen Membranexpression aus. So zeigte Appelman, dass HepG2-Zellen mit stabil exprimierten, an beiden Glykosylierungsstellen mutierten NTCPs, im Vergleich zur Wildtypkontrolle, eine geringere Membranexpression aufwiesen, weniger TC transportierten und nicht für HBV empfänglich waren. Während einfach glykosylierte NTCPs weiterhin in der Plasmamembran exprimiert wurden, TC transportierten und eine HBV-Infektion vermittelten, was die Bedeutung von zumindest einem Glykanrest an NTCP belegt (Appelman et al. 2017).

1.2 Hepadnaviren und das Hepatitis Delta Virus (HDV)

1.2.1 Taxonomie und Epidemiologie des Hepatitis B Virus (HBV)

Hepadnaviridae sind kleine, behüllte DNA-Viren, welche für ihren Hepatotropismus sowie ihre hohe Wirtsspezifität bekannt sind. Die Familie der *Hepadnaviridae* wird in zwei Gattungen eingeteilt: in Vögel infizierende *Avihepadnaviren* und in Säugetiere infizierende *Orthohepadnaviren*. Sie können akute, persistierende oder chronische Infektionen hervorrufen. Das Hepatitis B Virus (HBV) des Menschen wird als das Prototypvirus der Familie betrachtet. 1963 trat HBV zum ersten Mal unter der Bezeichnung des „Australia Antigens“ in Erscheinung, als Blumberg ein bis dato noch nicht bekanntes Antigen im Blut eines australischen Aborigines entdeckte (Blumberg et al. 1967). Sieben Jahre später konnte Dane schließlich ein HBV-Partikel unter dem Elektronenmikroskop nachweisen und bezeichnete es als „Dane-Partikel“ (Dane et al. 1970). Heute sind zehn Genotypen A-J und zahlreichen Subgenotypen des HBV beschrieben (Littlejohn et al. 2016). HBV-Infektionen sind weltweit ein großes Problem und werden von der World Health Organisation (WHO) als große Gefahr für die öffentliche Gesundheit eingestuft (World Health Organization 2017). Bis zu 291 Millionen Menschen weltweit sind aktuell chronisch mit HBV infiziert (Chen et al. 2019). Jedoch variiert die Prävalenz weltweit sehr stark, von unter 2 % im zentraleuropäischen/amerikanischen Raum zu ca. 6 % in Afrika und der Pazifik-Region. 887.000 Todesfälle werden jährlich mit dem HBV in Verbindung gebracht. Des Weiteren werden die meisten Fälle von hepatozellulären Karzinomen (HCC) und Leberkrebs durch HBV hervorgerufen (World Health Organization 2017).

1.2.2 Morphologie und Infektionszyklus von HBV

HBV ist ein teilweise doppelsträngiges, behülltes DNA-Virus. Es ist ca. 52 nm groß und von sphärischer Struktur (Glebe et al. 2013). Das HBV-Genom und eine virale Polymerase sind von einem Kapsid aus Hepatitis B Core-Proteinen (HBc) umgeben, welche zusammen ein Nukleokapsid bilden. Dieses Nukleokapsid wird von einer Doppellipidmembranhülle mit drei verschiedenen großen Oberflächenproteinen umschlossen.

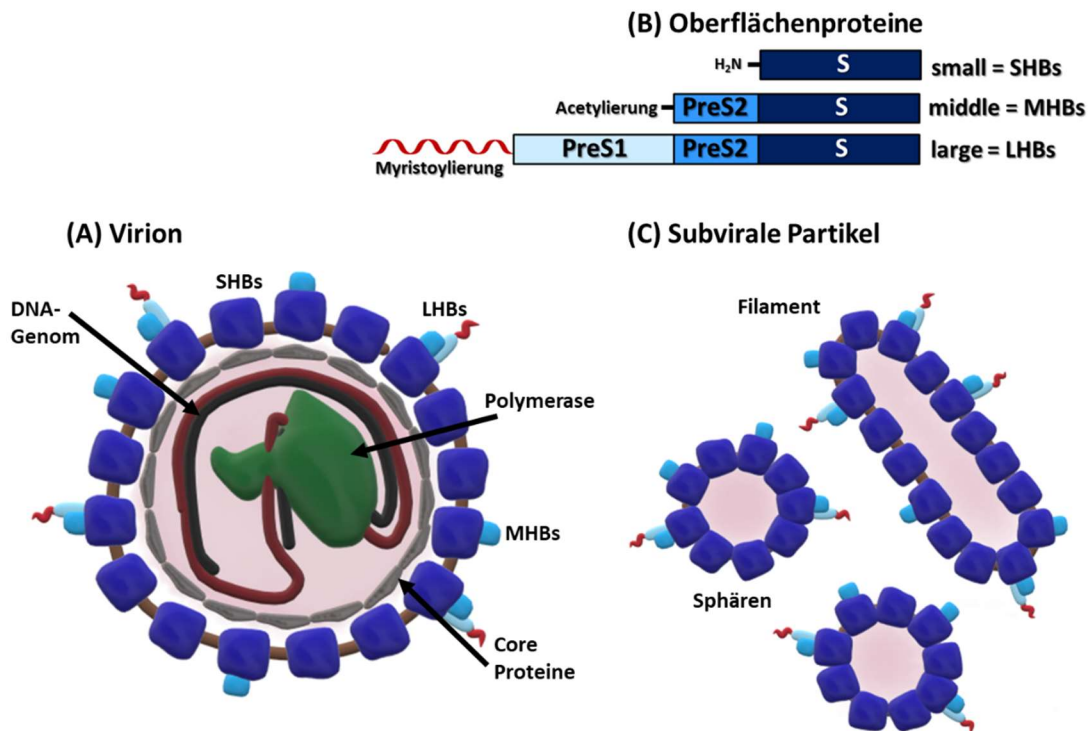


Abb. 1.5 Schematische Morphologie von HBV-Virionen und subviralen Partikeln

(A) HBV besitzt ein teilweise doppelsträngiges DNA-Genom, an welches eine virale Polymerase gekoppelt ist. Das Genom wird von 180/240 Core-Proteinen umschlossen (Cotelesage et al. 2011). Die Hülle des Virions besteht aus einer Lipiddoppelschicht mit darin integrierten Oberflächenproteinen, dem großen (LHBs), mittleren (MHBs) und kleinen (SHBs) Protein. (A, B) Alle drei Oberflächenproteine bestehen aus der S-Domäne (dunkelblau). Die PreS2-Domäne (mittelblau) ist Bestandteil von MHBs und LHBs. Das LHBs besitzt zusätzlich eine PreS1-Domäne (hellblau). (C) Die subviralen Partikel sind sphärisch oder filamentös geformte Virushüllen ohne Nukleinsäuren und sind daher nicht infektiös.

Bei einer HBV-Infektion gelangen die Virionen über das Blut zur Leber. Nachdem das HBV vermutlich über Endozytose in die Hepatozyten gelangt ist, wird das Nukleokapsid nach Entfernung der Virushülle in den Zellkern transportiert. Im Zellkern der Wirtszelle wird das partiell doppelsträngige Genom durch zelluläre DNA-Reparaturmechanismen zu einem kovalent geschlossenen doppelsträngigen DNA-Ring, der *covalently closed circular DNA* (cccDNA), vervollständigt. Die cccDNA ist eine, bakteriellen Plasmiden ähnliche, episomale stabile Dauerform und dient als Matrize für die Synthese von *messenger RNAs* (mRNAs) und pregenomischer RNA (Nassal 2015). Alle RNAs werden aus dem Kern transportiert. Die

mRNAs werden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) zu Oberflächenproteinen (HBs) translatiert und von der pregenomischen RNA ausgehend werden Core-Proteine (HBc) und die virale Polymerase gebildet. 120 Dimere der Core-Proteine formen eine Kapsidhülle und bilden zusammen mit der pregenomischen RNA und der viralen Polymerase unreife Nukleokapside. Während der Nukleokapsidreifung beginnt die virale Polymerase mit der reversen Transkription der pregenomischen DNA. Anschließend können die gereiften Nukleokapside wieder in den Zellkern transportiert werden, um neue cccDNA zu bilden oder sie werden mit Oberflächenproteinen umhüllt und durch multivesikulären Transport aus der Zelle geschleust. Des Weiteren entstehen nicht nur reife HBV-Partikel, sondern, durch eine Überproduktion an Oberflächenproteinen, zusätzliche ca. 22 nm große subvirale Partikel (SVP). Diese bestehen aus der Virushülle, also einer Lipiddoppelmembran mit darin integrierten Oberflächenproteinen. Sie können eine spheroidale oder filamentöse Form annehmen und sind, durch das Fehlen eines Nukleokapsids, nicht infektiös. Die SVP kommen im Blut von hoch virämischen Patienten in großem Überschuss von 1.000 bis 10.000-fachen Mengen im Vergleich zu virushaltigen Partikeln vor (Chai et al. 2008). Sie agieren wahrscheinlich als „Schutzschilde“ und fangen Antikörper ab, damit die Virionen die Hepatozyten unbehelligt erreichen und infizieren können (Rydell et al. 2017). Diese SVP hatte Blumberg 1963 entdeckt und als „*Australia Antigen*“ beschrieben (Blumberg et al. 1967).

Das ca. 3 kb große HBV-Genom besteht aus einer zirkulären, nicht kovalent geschlossenen DNA. Sie ist partiell doppelsträngig mit einem kompletten Minusstrang, aber einem unvollständigen Plusstrang. Die Unvollständigkeit des Plusstrangs ist darin begründet, dass das Virus aus der Zelle ausgeschleust wird, bevor die Plusstrang-Synthese abgeschlossen ist. Die virale Polymerase ist kovalent an den vollständigen Minusstrang gebunden. Das HBV-Genom ist aus vier teilweise überlappenden Leserastern, *open reading frames* (ORFs), zusammengesetzt. Es codiert die virale Polymerase, die Core-Proteine, das HBe-Antigen (HBe), das HBx-Protein (HBx) und die drei HBs-Antigene (Wang et al. 2020).

Das HBe-Antigen hat, soweit bekannt, keine eigenständige Funktion im HBV-Replikationszyklus. Es ist allerdings ein Immunmodulator, der eine Immuntoleranz der T-Zellen gegen HBc bewirkt (Kramvis et al. 2018). Es spielt eine Rolle in der Chronifizierung von HBV-Infektionen und ist ein klinischer Marker für eine hohe Infektiosität. HBx ist ein Nichtstrukturprotein, ein Aktivator der viralen Transkription und wird für die durch HBV-induzierte Kanzerogenese verantwortlich gemacht (Glebe et al. 2013; Wang et al. 2020).

Die drei unterschiedlich großen Oberflächenproteine werden aus einem ORF gebildet. Sie besitzen alle den gleichen C-Terminus, die S-Domäne. Das kleinste Oberflächenprotein (small HBs, SHBs) besteht nur aus dieser Domäne. Das mittlere (middle HBs, MHBs) ist um eine PreS2-Domäne und das große Oberflächenprotein (large HBs, LHBs) ist um eine PreS2-Domäne und eine myristoylierte PreS1-Domäne verlängert. Die 2-48 Aminosäuren der PreS1-Domäne des LHBs und ihre Myristoylierung sind essentiell für die Bindung und den Eintritt in die Hepatozyten und somit für eine erfolgreiche HBV-Infektion (Gripon et al. 1995; Glebe et al. 2005; Glebe et al. 2013).

1.2.3 Hepatitis Delta Virus (HDV)

Das Hepatitis Delta Virus ist ein ca. 35 nm kleines RNA Virus mit einem zirkulären, einzelsträngigen RNA-Genom negativer Polarität. Es ist aktuell noch der einzige Vertreter der Gattung Deltavirus mit acht HDV-Genotypen (Littlejohn et al. 2016; Lucifora et al. 2020). Dies wird sich wahrscheinlich bald ändern, da dem Deltavirus ähnliche Virus-Sequenzen in Oropharyngeal- und Kloakenproben von Enten, in Gewebeproben von Boas und einem Wasserpython, in Blutproben von Stachelratten und cDNAs von Fischen, Amphibien und verschiedenen Invertebraten und in weiteren Spezies gefunden wurden (Wille et al. 2018; Chang et al. 2019; Hetzel et al. 2019; Paraskevopoulou et al. 2020; Bergner et al. 2021; Iwamoto et al. 2021).

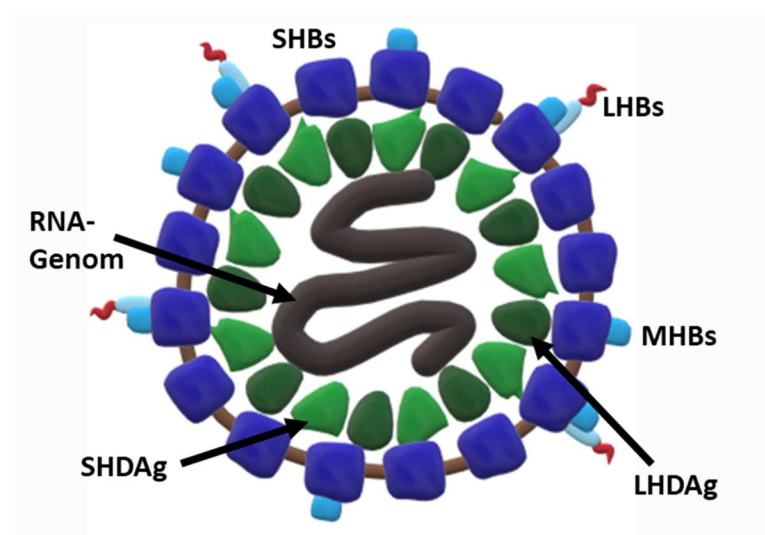


Abb. 1.6 Schema der HDV Morphologie

HDV bildet mit seinem RNA-Genom zwei Proteine. Das große (*large*; LHDAg) und das kleine (*small*; SHDAg) Delta-Antigen (HDAg). Es benötigt für seine Vermehrung, Sekretion und Infektion die Oberflächenproteine des HBV (SHBs, MHBs, LHBs).

Das aus 1,7 kb bestehende einzelsträngige HDV-Genom hat einen hohen Grad an intramolekularer Basenpaarung und erscheint deshalb stabförmig. Es enthält einen ORF, welcher für zwei Antigene, das *small hepatitis delta antigen* (SHDAg) und das *large hepatitis delta antigen* (LHDAg), codiert.

Aus dem HDV-Genom können keine eigenen Hüllproteine gebildet werden. Deshalb ist das HDV für eine erfolgreiche Vermehrung, Sekretion und Infektion neuer Zellen auf HBV-Hüllproteine angewiesen. HDV wird aufgrund dessen auch als „mangelhaftes“ Virus oder als Satellitenvirus von HBV bezeichnet und kommt klinisch nur in Koinfektion mit HBV vor (Hughes et al. 2011; Sureau et al. 2016). Kürzlich wurde herausgefunden, dass HDV *in vitro* auch Hüllproteine anderer Viren wie des Hepatitis C Virus (HCV), des Vesikulären Stomatitis-Virus oder des Dengue-Virus für die Zusammenstellung und Sekretion von behüllten, infektiösen HDV-Partikeln nutzen kann (Perez-Vargas et al. 2019). Zusätzlich konnten HDV-HCV-Infektionen in leberhumanisierten Mäusen über mehrere Monate aufrechterhalten werden (Perez-Vargas et al. 2019). Auch bei den in Vertebraten und Invertebraten gefundenen Deltavirusinfektionen konnten keine *Hepadnavirus*-Koinfektionen nachgewiesen werden, was auf eine Beteiligung anderer Helferviren schließen lässt (Wille et al. 2018; Chang et al. 2019; Hetzel et al. 2019; Paraskevopoulou et al. 2020; Szivovicza et al. 2020). Des Weiteren existiert auf dem HDV-Genom ein viroid-ähnlicher Sequenzbereich, welcher Ribozyme oder „*self-cleaving RNA sequences*“ beinhaltet. Dies sind Nukleinsäuren, welche den RNA Strang, auf dem sie sich selbst befinden, schneiden können (Alfaiate et al. 2015).

Da HDV sich der Oberflächenproteine von HBV bedient, ist der Mechanismus der Anheftung an Hepatozyten der gleiche wie der des HBV. Nach dem Eintritt von HDV in die Zelle wird das Ribonukleoprotein, bestehend aus HDV-RNA und HDAGs, durch eine Kernlokalisierungssequenz in den Zellkern der Wirtszelle verbracht. Dort wird das Genom im viroidtypischen „*double rolling circle*“-Mechanismus, unter Zuhilfenahme der wirtseigenen RNA-Polymerase(n), amplifiziert (Sureau et al. 2016). Dabei werden aus dem zirkulären Genom viele antigenomische RNAs gebildet, welche anschließend durch die Ribozyme in Monomere gespalten werden. Diese werden nach einer Rezirkularisierung als Matrize für die Vermehrung der genomischen RNA verwendet. Von der genomischen RNA ausgehend werden die mRNAs der HDAGs gebildet. Zunächst erfolgt die Bildung der SHDAg-mRNA, danach wird das Stoppcodon des SHDAgs durch einen RNA-Editing-Schritt zu einem Tryptophan umgewandelt. Somit können weitere 19 Aminosäuren abgelesen und LHDAg mRNAs gebildet werden (Alfaiate et al. 2015).

LHDAg ist wichtig für die Umhüllung des HDV-Ribonukleoproteins und wirkt als Inhibitor der Virusreplikation, während das kleine Delta-Antigen für die Replikation von Bedeutung ist (Mentha et al. 2019). Durch Einfluss des LHDAgs wird der Ribonukleoproteinkomplex am ER in eine Lipiddoppelschicht mit integrierten HBV-Oberflächenproteinen umhüllt und anschließend als fertige HDV-Virionen in die Blutbahn sekretiert (Alfaiate et al. 2015; Gilman et al. 2019).

1.2.4 Klinische Aspekte

HBV ist, wie schon erwähnt, ein globales Problem. Weltweit sind 12 Millionen der chronischen HBV-Träger zusätzlich mit HDV infiziert (Chen et al. 2019). Eine HBV/HDV-Koinfektion induziert bei 70-90 % der Fälle einen schwereren Krankheitsverlauf, das heißt eine noch schnellere Entwicklung von HCC und Leberzirrhose und eine erhöhte Mortalitätsrate im Vergleich zur HBV-Monoinfektion (Sureau et al. 2016; Asselah et al. 2020). Eine zusätzliche HDV-Infektion von HBV-Trägern (Superinfektion) nimmt deutlich häufiger einen fulminanten Verlauf, während eine simultane Infektion mit HBV und HDV häufig ähnlich einer akuten HBV-Monoinfektion abläuft (Negro 2014).

HBV/HDV werden von Mensch zu Mensch übertragen. Da HBV und HDV vorrangig im Blut und in anderen Sekreten des Körpers, wie Samen- und Vaginalflüssigkeit, vorkommen, erfolgt die Ansteckung mit HBV/HDV perinatal, über Blutkontakt (Tattoos, Piercings, unreine Nadeln) oder über sexuelle Kontakte (MacLachlan et al. 2015). Die Inkubationszeit von HBV beträgt ca. 75 Tage. Bei den meisten immunkompetenten Erwachsenen verläuft eine HBV-Infektion inapparent und induziert eine anschließende Immunität. Das Virus verbleibt in Form der cccDNA im Zellkern der Leberzellen, jedoch wird die Virusvermehrung durch das Immunsystem des Wirts unterdrückt (okkulte Form). Bei einer HBV-Infektion mit hohen Virusmengen kommt es gehäuft zu einer akuten Hepatitis mit Schmerzen im Bauchraum und Ikterus. Die Symptome kommen durch die Reaktion des Immunsystems auf das Virus und damit verbundenem Zelluntergang und Gewebsschädigung der Leber zu Stande. In einigen Fällen kommt es durch eine extrem starke Reaktion des Immunsystems zu fulminanten Verlaufsformen, bei welchen die Leber so stark geschädigt wird, dass Leberversagen, Enzephalopathie und eine Störung des Gerinnungssystems die Folge sind. Bei ca. 5 % der adulten HBV-Infizierten erfolgt eine chronische Verlaufsform, welche mittels HBsAg-Nachweis im Blut des Patienten detektierbar ist (Paganelli et al. 2012). Das Alter und der Immunstatus der Infizierten sowie die Infektionsdosis spielen eine große Rolle bei der

Chronifizierung von HBV. In schätzungsweise 15-40 % der Fälle resultiert aus einer chronischen HBV-Infektion eine HCC, Leberzirrhose oder Leberversagen (Lok 2002).

HBV ist grundsätzlich sehr gut an seinen Wirt angepasst, weshalb viele Infektionen inapparent verlaufen. Der Körper des Wirtes wird durch subvirale Partikel des HBV, auch Täuschkörperchen genannt, überschwemmt (Glebe et al. 2007). Das Immunsystem ist mit der Abwehr dieser Massen an Antigenen dauerhaft beschäftigt und kommt nach einiger Zeit in einen „Erschöpfungszustand“ (Smolders et al. 2020; Zeyen et al. 2020).

Seit 1982 existiert ein wirksamer Impfstoff gegen HBV, jedoch kein Heilmittel für eine schon bestehende HBV-Infektion. Daher sind präventive Maßnahmen wie Impfungen und hohe Hygienestandards sehr wichtig. Im meist verwendeten HBV-Impfstoff befindet sich rekombinant aus Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) hergestelltes SHBs des HBV-Genotyps A2 (Valenzuela et al. 1982). Das Immunsystem bildet in Reaktion auf die Antigene im Impfstoff neutralisierende Antikörper, die einen Schutz gegen HBV und HDV bieten. Auch nach einer Exposition mit HBV kann mit Hilfe des Einsatzes von Impfstoffen eine Ansteckung verhindert werden (Zhao et al. 2020; World Health Organization 2017).

Derzeit existierende Therapeutika können den Krankheitsverlauf einer bestehenden HBV-Infektion meist lediglich verlangsamen. Aktuell werden pegyliertes Interferon α und Nukleos(t)idanaloga verwendet (Wang et al. 2020). Interferone agieren über eine Reihe von Wirkmechanismen gegen das Virus, wie z.B. eine Inhibition der Umhüllung und immunmodulatorische Aktivität in Form von Aktivierung von Lymphozyten. Jedoch ist diese Therapie nur bei ca. 30 % erfolgreich und Nebeneffekte wie grippeähnliche Symptome können die Behandlung begleiten. Nukleos(t)idanaloga z.B. Lamivudin, Tenofoviridisoproxil, Tenofovirafenamid oder Entecavir blockieren die HBV-DNA-Synthese und können die Virusausscheidung sehr schnell senken (Suk-Fong Lok 2019). Während frühe Vertreter der Klasse der Nukleos(t)idanaloga wie Lamivudin hohe Resistenzraten aufwiesen, zeigen neuere Nukleos(t)idanaloga, wie Tenofoviridisoproxil oder Entecavir, in Studien eine geringe Resistenzentwicklung (Lai et al. 2003; Tenney et al. 2009; Liu et al. 2017). Durch die noch vorhandene cccDNA in den Leberzellen persistiert das Virus in den Zellen, wodurch keine vollständige Vernichtung und damit Heilung von HBV erfolgt (Suk-Fong Lok 2019). Zusätzlich werden Spätfolgen der HBV/HDV-Infektion, wie die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms, nicht verhindert. Leberkrebs entsteht häufig als Folge der beständigen HBV/HDV-bedingten Aktivierung des Immunsystems und der damit einhergehenden Belastung des Gewebes mit Erhöhung von Zelluntergängen und Zellteilung.

Des Weiteren kann die teilweise auftretende Integration von HBV-DNA in das Wirtsgenom eine onkogene Wirkung haben (Seeger et al. 2015).

Im Replikationszyklus der beiden Viren gibt es jedoch viele mögliche Angriffspunkte, um Inhibitoren zu entwickeln und unter Umständen eine Heilung zu erwirken. Aktuell sind Modulatoren der Nukleokapsidbildung, Inhibitoren der Virionen/ Subvirale Partikel-Sekretion, Hemmstoffe der RNA-Transkription, Inhibitoren der Anheftung von HBV/HDV (Entry-Inhibitoren) und viele weitere in der Entwicklung (Martinez et al. 2020; Smolders et al. 2020).

1.3 NTCP als Rezeptor für HBV/HDV

Nahezu ein halbes Jahrhundert nach der Erstbeschreibung des Australia Antigens durch Blumberg wurde 2012 NTCP als Rezeptor des HBV/HDV entdeckt (Yan et al. 2012; König et al. 2014). Mittlerweile ist bekannt, dass HBV/HDV, die durch die Verwendung der gleichen Oberflächenproteine den gleichen Anheftungsmechanismus teilen, erst eine niedrig affine Bindung mit Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPGs) eingehen. Diese Bindung wird virusseitig durch die Antigenschleife der S-Domäne in der Virushülle vermittelt (Sureau et al. 2013). Anschließend erfolgt eine spezifische Bindung der PreS1-Domäne des LHBs-Proteins mit dem NTCP, welcher schließlich am Eintritt des HBV/HDV beteiligt ist. Nach bisherigem Kenntnisstand erfolgt dieser Eintritt in die Zelle durch eine Mischung aus Clathrin- und Caveolae-vermittelter Endozytose (Macovei et al. 2010; Huang et al. 2012; Herrscher et al. 2020).

Die Bindung an den NTCP ist hochaffin, was die hohe Wirtsspezifität und den Hepatotropismus von HBV/HDV erklärt (Yan et al. 2012; König et al. 2014). Auch der Ntcp der Menschen- und mancher Neuweltaffen kann eine erfolgreiche Bindung und anschließende Infektion der Hepatozyten vermitteln. Müller et al. konnten zeigen, dass ein einziger Austausch der Aminosäure Arginin an Position 158 gegen Glycin (wie im Menschen) für eine Bindung des HBV an den eigentlich nicht empfänglichen Altweltaffen-Ntcp (natürlicherweise Arginin 158) ausreichend ist, um einen funktionellen Rezeptor für HBV zu erzeugen (Müller et al. 2018).

Weitere essentielle Aminosäuren für die Bindung von HBV/HDV am NTCP sind die Aminosäuren 157 bis 165 (rund um die Aminosäure 158). Die Arbeitsgruppe um Yan konnte bei der Rezeptorerstbeschreibung 2012 feststellen, dass durch ein Ersetzen der Aminosäuren 157 bis 165 im humanen NTCP mit den korrespondierenden Aminosäuren des Ntcp von *Macaca fascicularis*, eine Infektion verhindert werden kann (Yan et al. 2012; König et al. 2014). In einer weiteren Publikation konnten sie darlegen, dass Ntcp von *Mus musculus*,

welcher eine Bindung von HBV/HDV, aber keine HBV/HDV-Infektion vermittelt, durch den Austausch der Aminosäuren 84 bis 87 des humanen NTCPs in den Ntcp der Maus mit HDV infiziert werden kann (Yan et al. 2013; Ni et al. 2014).

Ferner gibt es Hinweise, dass die Oligomerisierung des NTCPs für die Rezeptorfunktion bzw. Internalisierung wichtig ist und eine Störung der Oligomer-Bildung des NTCPs eine geringere HBV-Infektionsrate zur Folge haben kann (Fukano et al. 2018).

Die für die spezifische Bindung wichtigsten Aminosäuren sind virusseitig die Aminosäuren 2 bis 48 am N-Terminus der PreS1-Domäne des LHBs und deren Myristoylierung (Gripon et al. 1995; Wang et al. 2020). Myr-PreS1-Lipopeptide, welche aus dieser kurzen myristoylierten Aminosäuresequenz bestehen, können an NTCP binden (Glebe et al. 2005). Das Myr-PreS1-Peptid kann den Eintritt von HBV/HDV-Virionen in Leberzellen hemmen. Seit August 2020 ist dieses synthetische Peptid als erster Entry-Inhibitor unter dem Namen Hepcludex[®] von der EMA (European Medicines Agency) als Therapeutikum gegen HDV-Infektionen zugelassen worden (Blank et al. 2016; Loglio et al. 2019; EMA 2020; MYR-Pharmaceuticals 2020). Jedoch zeigt das Myr-PreS1-Peptid auch eine Hemmung des physiologischen Gallensäuretransports über NTCP und greift somit in den enterohepatischen Kreislauf der Gallensäuren und in die Gallensäure-Homöostase ein (Yan et al. 2012; König et al. 2014). Dies könnte durch erhöhte Gallensäurespiegel im peripheren Blut zu weitreichenden Erkrankungen führen (de Aguiar Vallim et al. 2013; Vaz et al. 2015). Ntcp-Knockout-Mäuse mit einer reduzierten Transportkapazität von Gallensäuren und erhöhten peripheren Gallensäurespiegeln zeigten jedoch keine Anzeichen von Cholestase, Entzündung oder hepatozellulärem Schaden (Slijepcevic et al. 2015). Dennoch reicht die in Fallberichten dargestellte Bandbreite der Symptome von Gelbsucht, Hyperbilirubinämie und leichter chronischer Hepatitis bei heterozygoter NTCP-Mutation bis zum kompletten Funktionsverlust des NTCPs mit extrem erhöhten Plasmagallensäurespiegeln, milder Hypertonie sowie Verzögerungen im Wachstum und in der motorischen Entwicklung bei homozygoten NTCP-Mutationen (Vaz et al. 2015; Dong et al. 2019; van de Peppel et al. 2020). Wünschenswert wäre dementsprechend ein HBV/HDV-Entry-Inhibitor, der die Interaktion von HBV/HDV mit NTCP spezifisch hemmt, aber den physiologischen Gallensäurekreislauf nicht beeinflusst, so wie dies kürzlich für einige Derivate der pflanzlichen Substanz Betulin beschrieben wurde (Kirstgen et al. 2020).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Myr-PreS1-Peptide zur Visualisierung und Messung der spezifischen Virusbindung und somit der Darstellung des ersten Schritts der Infektion verwendet. Des Weiteren wurden Myr-PreS1-Peptide während Infektionsversuchen zur

Verifizierung der spezifisch über NTCP verlaufenden Infektion eingesetzt. Dabei wurden Fluorophor-markierte oder Tritium (^3H)-markierte Peptide genutzt.

1.4 *In vitro* Modelle der HBV/HDV-Forschung

Durch die Entdeckung des HBV/HDV-Rezeptors NTCP ist es möglich humane Hepatomzelllinien, wie HepG2- oder Huh7-Zellen, durch stabile Insertion des humanen NTCPs in das Genom der Zellen für eine HBV/HDV-Infektion empfänglich zu machen. Diese Zelllinien können normalerweise nicht mit HBV/HDV infiziert werden, da sie eine sehr geringe endogene NTCP-Expression besitzen (Yan et al. 2012).

Vor der Entdeckung des HBV/HDV-Rezeptors waren aufgrund der hohen Wirtsspezifität nur wenige *in vitro* Modelle für die HBV/HDV-Forschung verfügbar. So wurden primäre Hepatozytenkulturen von Menschen und von den ebenfalls empfänglichen *Tupaia belangeri* verwendet (Glebe et al. 2005). In letzteren wurde der NTCP als HBV/HDV-Rezeptor identifiziert (Yan et al. 2012).

Die Arbeit mit primären Hepatozyten ist mit spezifischen Schwierigkeiten verbunden. Sie sind schwer erhältlich, sie sind teuer und besonders humane Hepatozyten haben eine hohe Variabilität von Spender zu Spender und zwischen einzelnen Chargen (Zeisel et al. 2015; Verrier et al. 2016). Ferner sind sie schwer zu kultivieren und haben nur eine Lebensspanne von einigen Wochen, da sie in Zellkultur nicht proliferieren. Eine erfolgreiche Infektion ist eng an den Differenzierungsstand der Hepatozyten gebunden, weshalb sie nach einigen Tagen durch den Verlust der Polarisierung, Differenzierung und NTCP-Expression nicht mehr für HBV/HDV-Infektionen empfänglich sind (Gripon et al. 1988; Thomas et al. 2016; Ni et al. 2017). Primäre Hepatozyten spiegeln jedoch die physiologischen Gegebenheiten in der Leber am besten wider und sie sind sehr gut geeignet, um immunologische und metabolische Reaktionen der Wirtszellen auf die Infektion zu untersuchen (Verrier et al. 2016).

HepaRG, eine hepatische Progenitorzelllinie, kann durch Redifferenzierung für HBV/HDV empfänglich gemacht werden (Gripon et al. 2002; Hantz et al. 2009; König et al. 2014). Dabei differenzieren die HepaRG zu Zellen mit Hepatozyten- und Gallenepithelzellähnlichkeit und reagieren auf Interferone ähnlich wie Hepatozyten (Shen et al. 2018). Dieser Differenzierungsprozess ist allerdings sehr kosten- und zeitintensiv.

In vitro Modelle, wie stabil mit dem humanen NTCP transfizierte Hepatomzelllinien, proliferieren in der Zellkultur und sind leichter zu kultivieren als primäre Hepatozyten oder HepaRG-Zellen. Sie polarisieren jedoch nicht vollständig und bilden nur in geringem Maße

vergleichbare Immunantworten wie humane Hepatozyten. Sie sind jedoch für Untersuchungen an frühen Stadien im HBV/HDV-Replikationszyklus, wie Virusbindung, Internalisierung und cccDNA-Bildung, aber auch der Replikation, unerlässlich. Des Weiteren sind sie besonders wertvoll für die Suche nach HBV/HDV-Entry-Inhibitoren.

Keines dieser Modelle für sich genommen ist ideal für alle Studien und Fragestellungen, jedoch können sich die Erkenntnisse aus unterschiedlichen Modellen ergänzen. Alle *in vitro* Modelle sind in ihren Infektionsraten limitiert und reichen nicht an solche von humanen Hepatozyten im Körper heran. Dies ist ein Hinweis auf weitere, für eine effiziente Infektion wichtige, (Co-)Faktoren oder Rezeptoren (Anwer et al. 2014; Verrier et al. 2016). Jüngste Veröffentlichungen in HepG2-NTCP-Zellen deuten an, dass der Epidermal Growth Faktor Rezeptor eine wichtige Rolle als Co-Faktor während der Internalisierung von HBV/HDV spielen könnte (Iwamoto et al. 2019; Iwamoto et al. 2020).

2 PUBLIKATIONEN UND EIGENANTEIL

Dieser kumulativen Dissertationsschrift liegen folgende Publikationen zu Grunde (Volltext siehe Anhang):

2.1 Publikation I

„Highly diversified shrew hepatitis B viruses corroborate ancient origins and divergent infection patterns of mammalian hepadnaviruses”

Rasche A, Lehmann F, König A, Goldmann N, Corman VM, Moreira-Soto A, Geipel A, van Riel D, Vakulenko YA, Sander AL, Niekamp H, Kepper R, Schlegel M, Akoua-Koffi C, Souza BFGD, Sahr F, Olayemi A, Schulze V, Petraityte-Burneikiene R, Kazaks A, **Lowjaga KAAT**, Geyer J, Kuiken T, Drosten C, Lukashev AN, Fichet-Calvet E, Ulrich RG, Glebe D, Drexler JF
Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Aug 20;116(34):17007-17012. doi: 10.1073/pnas.1908072116.
Epub 2019 Aug 1

Abstract:

Shrews, insectivorous small mammals, pertain to an ancient mammalian order. We screened 693 European and African shrews for hepatitis B virus (HBV) homologs to elucidate the enigmatic genealogy of HBV. Shrews host HBVs at low prevalence (2.5 %) across a broad geographic and host range. The phylogenetically divergent shrew HBVs comprise separate species termed crowned shrew HBV (CSHBV) and musk shrew HBV (MSHBV), each containing distinct genotypes. Recombination events across host orders, evolutionary reconstructions, and antigenic divergence of shrew HBVs corroborated ancient origins of mammalian HBVs dating back about 80 million years. Resurrected CSHBV replicated in human hepatoma cells, but human- and tupaia-derived primary hepatocytes were resistant to hepatitis D viruses pseudotyped with CSHBV surface proteins. Functional characterization of the shrew sodium taurocholate cotransporting polypeptide (Ntcp), CSHBV/MSHBV surface peptide binding patterns, and infection experiments revealed lack of Ntcp-mediated entry of shrew HBV. Contrastingly, HBV entry was enabled by the shrew Ntcp. Shrew HBVs universally showed mutations in their genomic preCore domains impeding hepatitis B e antigen (HBeAg) production and resembling those observed in HBeAg-negative human HBV. Deep sequencing and in situ hybridization suggest that HBeAg-negative shrew HBVs cause intense

hepatotropic monoinfections and low within-host genomic heterogeneity. Geographical clustering and low MSHBV/CSHBV-specific seroprevalence suggest focal transmission and high virulence of shrew HBVs. HBeAg negativity is thus an ancient HBV infection pattern, whereas Ntcp usage for entry is not evolutionarily conserved. Shrew infection models relying on CSHBV/MSHBV revertants and human HBV will allow comparative assessments of HBeAg-mediated HBV pathogenesis, entry, and species barriers.

2.1.1 Eigenanteil - Publikation I

Bei der Publikation „Highly diversified shrew hepatitis B viruses corroborate ancient origins and divergent infection patterns of mammalian hepadnaviruses“ war die Autorin dieser Dissertationsschrift als Coautorin beteiligt. Der Eigenanteil entspricht der Darstellung aus der Veröffentlichung, welche hier wiedergegeben wird:

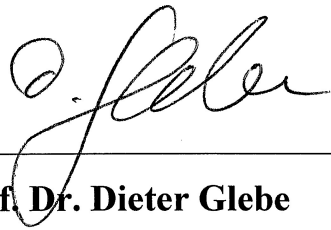
Authors' contributions:

„D.G. and J.F.D. designed research; A.R., F.L., A. König, N.G., V.M.C., A.M.-S., A.G., D.v.R., Y.A.V., A.-L.S., H.N., R.K., M.S., C.A.-K., B.F.C.D.S., F.S., A.O., V.S., **K.A.A.T.L.**, E.F.-C., and R.G.U. performed research; R.P.-B., A. Kazaks, J.G., and C.D. contributed new reagents/analytic tools; A.R., T.K., and A.N.L. analyzed data; and A.R., D.G., and J.F.D. wrote the paper.“

Die Autorin hat Experimente in dieser Publikation geplant, durchgeführt und analysiert. Im Speziellen waren dies die Testung der Aufnahme von 5 μ M NBD-Taurocholsäure und der Bindung von 50 nM humanen und Sorex Myr-PreS1-Peptiden in HepG2-Zellen mit transient transfizierten humanen NTCPs oder Sorex-Ntcps.

Bescheinigung der Richtigkeit der Angaben durch den Seniorautor

Die *authors' contributions* wurden von allen Autoren der Publikation durch ihre Unterschrift bestätigt, daher wird hier auf eine Unterschrift aller Coautoren verzichtet. Der Seniorautor Prof. Dr. Dieter Glebe bescheinigt stellvertretend Frau Kira Alessandra Alicia Theresa Lowjaga den aufgeführten Eigenanteil an der Publikation.



Prof. Dr. Dieter Glebe

Institute of Medical Virology

National Reference Center for Hepatitis B Viruses and Hepatitis D Viruses

Biomedical Research Center Seltersberg

Justus Liebig University, Giessen, Germany

2.2 Publikation II

„Selective hepatitis B and D virus entry inhibitors from the group of pentacyclic lupane-type betulin-derived triterpenoids”

Kirstgen M, Lowjaga KAAT, Müller SF, Goldmann N, Lehmann F, Alakurtti S, Yli-Kauhaluoma J, Glebe D, Geyer J

Sci Rep. 2020 Dec 10;10(1):21772. doi: 10.1038/s41598-020-78618-2

Abstract:

Current treatment options against hepatitis B and D virus (HBV/HDV) infections have only limited curative effects. Identification of Na⁺ /taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) as the highaffinity hepatic receptor for both viruses in 2012 enables target-based development of HBV/HDV cell-entry inhibitors. Many studies already identified appropriate NTCP inhibitors. However, most of them interfere with NTCP’s physiological function as a hepatic bile acid transporter. To overcome this drawback, the present study aimed to find compounds that specifically block HBV/HDV binding to NTCP without affecting its transporter function. A novel assay was conceptualized to screen for both in parallel; virus binding to NTCP (measured via binding of a preS1-derived peptide of the large HBV/ HDV envelope protein) and bile acid transport via NTCP. Hits were subsequently validated by in vitro HDV infection studies using NTCP-HepG2 cells. Derivatives of the birch-derived pentacyclic lupanetype triterpenoid betulin revealed clear NTCP inhibitory potency and selectivity for the virus receptor function of NTCP. Best performing compounds in both aspects were 2, 6, 19, and 25. In conclusion, betulin derivatives show clear structure-activity relationships for potent and selective inhibition of the HBV/HDV virus receptor function of NTCP without tackling its physiological bile acid transport function and therefore are promising drug candidates.

2.2.1 Eigenanteil - Publikation II

Bei der Publikation „Selective hepatitis B and D virus entry inhibitors from the group of pentacyclic lupane type betulin derived triterpenoids” war die Autorin dieser Dissertationsschrift als Coautorin beteiligt. Der Eigenanteil entspricht der Darstellung aus der Veröffentlichung, welche hier wiedergegeben wird:








Authors' contributions:

„M.K., S.F.M., **K.A.A.T.L.** and J.G. conceived the experiments, M.K., S.F.M. and **K.A.A.T.L.** performed the experiments, M.K., S.F.M., **K.A.A.T.L.** and J.G. analyzed and interpreted the results, N.G., F.L. and D.G. provided materials and laboratories for infection studies, S.A. and J.Y.K. provided derivatives of betulin, M.K., S.F.M., **K.A.A.T.L.** and J.G. wrote the manuscript.”

Die Autorin hat HDV-Infektionsexperimente mit den Entry-Inhibitoren 2 und 17 in den Konzentrationen 5 µM, 50 µM, 150 µM, 300 µM und 600 µM und mit den Entry-Inhibitoren 4 und 19 in den Konzentrationen 5 µM, 50 µM, 150 µM und 300 µM geplant, durchgeführt, analysiert und interpretiert (Abbildung 5 a-d). Zusätzlich hat die Autorin HDV-Infektionsexperimente mit aufsteigenden Konzentrationen an Myr-PreS1 Peptid (von 0,005 nM bis 5 µM) geplant, durchgeführt, analysiert und interpretiert (Abbildung 5 g).

Bescheinigung der Richtigkeit der Angaben durch die Autoren

Mit meiner Unterschrift bestätige ich die Richtigkeit der von Kira Alessandra Alicia Theresa Lowjaga oben aufgeführten Beiträge zur Publikation „Selective hepatitis B and D virus entry inhibitors from the group of pentacyclic lupane type betulin derived triterpenoids“:

| | |
|-------------------------------|---|
| Prof. Dr. Joachim Geyer |  |
| Prof. Dr. Dieter Glebe |  |
| Prof. Dr. Jari Yli-Kauhaluoma |  |
| Dr. Simon Franz Müller |  |
| Michael Kirstgen |  |
| Sami Alakurtti | |
| Nora Goldmann |  |
| Felix Lehmann |  |

2.3 Publikation III

„Long-term *trans*-inhibition of the hepatitis B and D virus receptor NTCP by taurolithocholic acid”

Lowjaga KAAT, Kirstgen M, Müller SF, Goldmann N, Lehmann F, Glebe D, Geyer J

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2020 Nov 11; doi: 10.1152/ajpgi.00263.2020

Abstract:

Human hepatic bile acid transporter Na⁺/taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) represents the liver-specific entry receptor for the hepatitis B and D Viruses (HBV/HDV). Chronic hepatitis B and D affect several million people worldwide, but treatment options are limited. Recently, HBV/HDV entry inhibitors targeting NTCP have emerged as promising novel drug candidates. Nevertheless, the exact molecular mechanism that NTCP uses to mediate virus binding and entry into hepatocytes is still not completely understood. It is already known that human NTCP mRNA expression is down-regulated under cholestasis. Furthermore, incubation of rat hepatocytes with the secondary bile acid taurolithocholic acid (TLC) triggers internalization of the rat Ntcp protein from the plasma membrane. In the present study, the long-term inhibitory effect of TLC on transport function, HBV/HDV receptor function and membrane expression of human NTCP were analyzed in HepG2 and HEK293 cells stably overexpressing NTCP. Even after short pulse preincubation, TLC had a significant long-lasting inhibitory effect on the transport function of NTCP, but the NTCP protein was still present at the plasma membrane. Furthermore, binding of the HBV/HDV myr-preS1 peptide and susceptibility for in vitro HDV infection were significantly reduced by TLC preincubation. We hypothesize that TLC rapidly accumulates in hepatocytes and mediates long-lasting *trans*-inhibition of the transport and receptor function of NTCP via a particular TLC binding site at an intracellularly accessible domain of NTCP. Physiologically, this *trans*-inhibition might protect hepatocytes from toxic overload of bile acids. Pharmacologically, it provides an interesting novel NTCP target site for potential long-acting HBV/HDV entry inhibitors.

2.3.1 Eigenanteil - Publikation III

Bei der Publikation „Long-term *trans*-inhibition of the hepatitis B and D virus receptor NTCP by taurolithocholic acid” war die Autorin dieser Dissertationsschrift als Hauptautorin beteiligt.

Der Eigenanteil entspricht der Darstellung aus der Veröffentlichung, welche hier wiedergegeben wird:



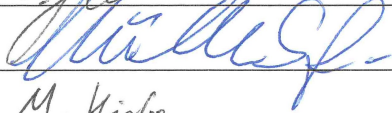
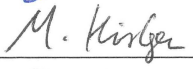
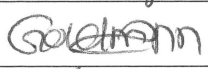

Authors' contributions:

„K.A.L., M.K., S.F.M., and J.G. conceived and designed research; K.A.L., M.K., and S.F.M. performed experiments; K.A.L., M.K., S.F.M., and J.G. analyzed data; K.A.L., M.K., S.F.M., and J.G. interpreted results of experiments; K.A.L., M.K., and S.F.M. prepared figures; N.G., F.L. and D.G. provided materials and laboratories for infection studies; K.A.L., M.K., S.F.M., and J.G. drafted manuscript; K.A.L., M.K., S.F.M., N.G., F.L., D.G., and J.G. edited and revised manuscript; K.A.L., M.K., S.F.M., N.G., F.L., D.G., and J.G. approved final version of manuscript.”

Die Autorin hat alle in dieser Publikation gezeigten Experimente geplant, durchgeführt, analysiert und interpretiert bis auf die Experimente, welche radioaktiv-markierte Substanzen oder Oberflächenbiotinylierung beinhalteten (Abbildungen 2 A-D, 3 C, 4 A, B, D).

Bescheinigung der Richtigkeit der Angaben durch die Autoren

Mit meiner Unterschrift bestätige ich die Richtigkeit der von Kira Alessandra Alicia Theresa Lowjaga oben aufgeführten Beiträge zur Publikation „Long-term trans-inhibition of the hepatitis B and D virus receptor NTCP by tauroithocholic acid“:

| | |
|-------------------------|--|
| Prof. Dr. Joachim Geyer |  |
| Prof. Dr. Dieter Glebe |  |
| Dr. Simon Franz Müller |  |
| Michael Kirstgen |  |
| Nora Goldmann |  |
| Felix Lehmann |  |

3 DISKUSSION

3.1 HBV – Speziesabhängigkeit und Suszeptibilität

Für eine erfolgreiche Infektion benötigt HBV eine spezifische Bindung an den humanen NTCP. Abgesehen vom humanen NTCP können Ntcps der Menschen- und Neuweltaffen in humanen Hepatomzelllinien sowie Ntcps von *Tupaia belangeri* eine erfolgreiche Bindung und anschließende Infektion mit HBV vermitteln. Die HBV-Speziespezifität scheint nur durch einige wenige essentielle Aminosäuren bestimmt zu werden. So zeigt Müller et al., wie schon beschrieben, dass ein einziger Austausch der Aminosäure 158 Arginin gegen Glycin im eigentlich nicht empfänglichen Altweltaffen-Ntcp nötig ist, um einen funktionellen Rezeptor für HBV zu erzeugen (Müller et al. 2018). Ferner lässt die Mutation einer Aminosäure an der Stelle 263 von Isoleucin zu Valin den Waldmurmeltier-Ntcp für HBV empfänglicher werden. Während der korrespondierende Austausch von Valin zu Isoleucin im humanen NTCP eine Minderung der HBV-Infektion in transient transfizierten Hepatomzellen nach sich zog (Fu et al. 2017).

Frühere Mutagenesestudien haben zwei für die Bindung und den Eintritt von HBV/HDV in die Zelle wichtige Motive im NTCP gefunden: die Aminosäuren 157 bis 165, sowie 84 bis 87 (siehe Abbildung Abb.3.1). Das Ersetzen der Aminosäuren 157 bis 165 im humanen NTCP durch die korrespondierenden Aminosäuren des *Macaca fascicularis* konnte eine HBV-Infektion verhindern. Während der für HBV/HDV unempfindliche Makaken Ntcp durch Einsatz der humanen Aminosäuren an dieser Stelle für HBV und HDV suszeptibel wurde (Yan et al. 2012; König et al. 2014). Der nicht für HBV/HDV empfängliche *Mus musculus* Ntcp konnte durch das Substituieren mit den humanen Aminosäuren an Stelle 84 bis 87 eine HDV-Infektion sowohl *in vitro* als auch *in vivo* vermitteln (Yan et al. 2013; Ni et al. 2014; He et al. 2016). Diese Stellen im humanen NTCP scheinen von Bedeutung, jedoch nicht essentiell für eine HBV/HDV-Infektion zu sein, da der Ntcp des *Tupaia belangeri* andere Aminosäuresequenzen an beiden Motiven aufweist und dennoch suszeptibel für HBV und HDV ist. Zusätzlich können an Position 84 bis 87 humanisierte Maus-Ntcps als Rezeptor für eine HDV-Infektion, aber keine HBV-Infektion fungieren (He et al. 2016). Auch können Schweine- und Makakenhepatozyten durch Expression des humanen NTCPs mit HBV infiziert werden, während Hepatozyten der Ratte, der Maus und des Hundes trotz Expression des humanen NTCPs keine Suszeptibilität für HBV erlangen (Lempp et al. 2017). Dies lässt den Schluss zu, dass weitere, bis dato nicht bekannte, Wirts(co)faktoren für einen erfolgreichen HBV/HDV-Eintritt in die Hepatozyten und eine erfolgreiche Infektion wichtig sind. Diese Cofaktoren und essentiellen Motive für eine

HBV/HDV-Infektion scheinen in Hepatozyten von *Tupaia belangeri* vorhanden zu sein. Des Weiteren scheint HBV weitere wirtsspezifische Faktoren, die nach der Bindung des Virus zum Tragen kommen, zu benötigen, da einige Wirte eine HDV, aber keine HBV-Infektion zulassen. Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass NTCP ein wirtslimitierender Hauptfaktor einer HBV/HDV-Infektion darstellt und das enge Wirtsspektrum von HBV/HDV dadurch bedingt ist.

Abgesehen von humanen Hepatitis Viren wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl von nicht-humanen Hepatitis Viren entdeckt (Rasche et al. 2019). So wurden nicht-humane Hepatitis Viren im amerikanischen Waldmurmeltier (*woodchuck hepatitis virus*, WHV) (Summers et al. 1978), im Erdhörnchen (*ground squirrel hepatitis virus*, GSHV) (Marion et al. 1980), in Enten (*duck hepatitis B virus*, DHBV) (Mason et al. 1980), in Menschenaffen (Vaudin et al. 1988) und in Wollaffen (*woolly monkey hepatitis B virus*, WMHBV) (Lanford et al. 1998) identifiziert. Durch Fortschritte in der Sequenzierung von DNA-Proben und dem Fokus auf zoonotische Potentiale nicht-humaner Hepatitis Viren wurden mit HBV verwandte Viren in Fledermäusen, Antilopen, Reptilien, Fischen, Amphibien und domestizierten Katzen gefunden (Drexler et al. 2013; Suh et al. 2014; Hahn et al. 2015; He et al. 2015; Dill et al. 2016; Lauber et al. 2017; Aghazadeh et al. 2018; Gogarten et al. 2019; Piewbang et al. 2020). In Kapuzineraffen wurde 2018 ein weiterer Vertreter der nicht-humanen Hepatitis B Viren entdeckt (*capuchin monkey hepatitis B virus*, CMHBV) (de Carvalho Dominguez Souza et al. 2018). HBV und nicht-humane Hepatitis B Viren ähneln sich in der genomischen Struktur der Nukleinsäuren, der Einteilung des ORF, der Länge des Genoms und/oder dem Vorhandensein und der Art von regulatorische Regionen. Vergleiche von humanen und nicht-humanen Hepatitis Viren können Aufschlüsse über notwendige Eigenschaften der Viren, welche für eine erfolgreiche Infektion nötig sind, liefern. Des Weiteren könnte man durch nähere Untersuchungen von nicht-humanen Hepatitis B Viren die Kanzerogenese der HCC-Bildung ergründen und eventuell Rückschlüsse auf HBV ziehen.

Aufgrund einer hohen genetischen Diversität der Fledermaus-*Hepadnaviren*, könnten diese Viren einen großen Einfluss auf die Evolution von *Hepadnaviren* haben (Rasche et al. 2016; Rasche et al. 2019). Evolutionär älter sind jedoch die Insektenfresser wie Spitzmäuse (*Sorex*), welche Wirte für eine Vielzahl von nicht-humanen Hepatitis Viren darstellen (Foley et al. 2016) und dadurch einen bisher unterschätzten Einfluss auf die Evolution von *Orthohepadnaviren* ausgeübt haben könnten.

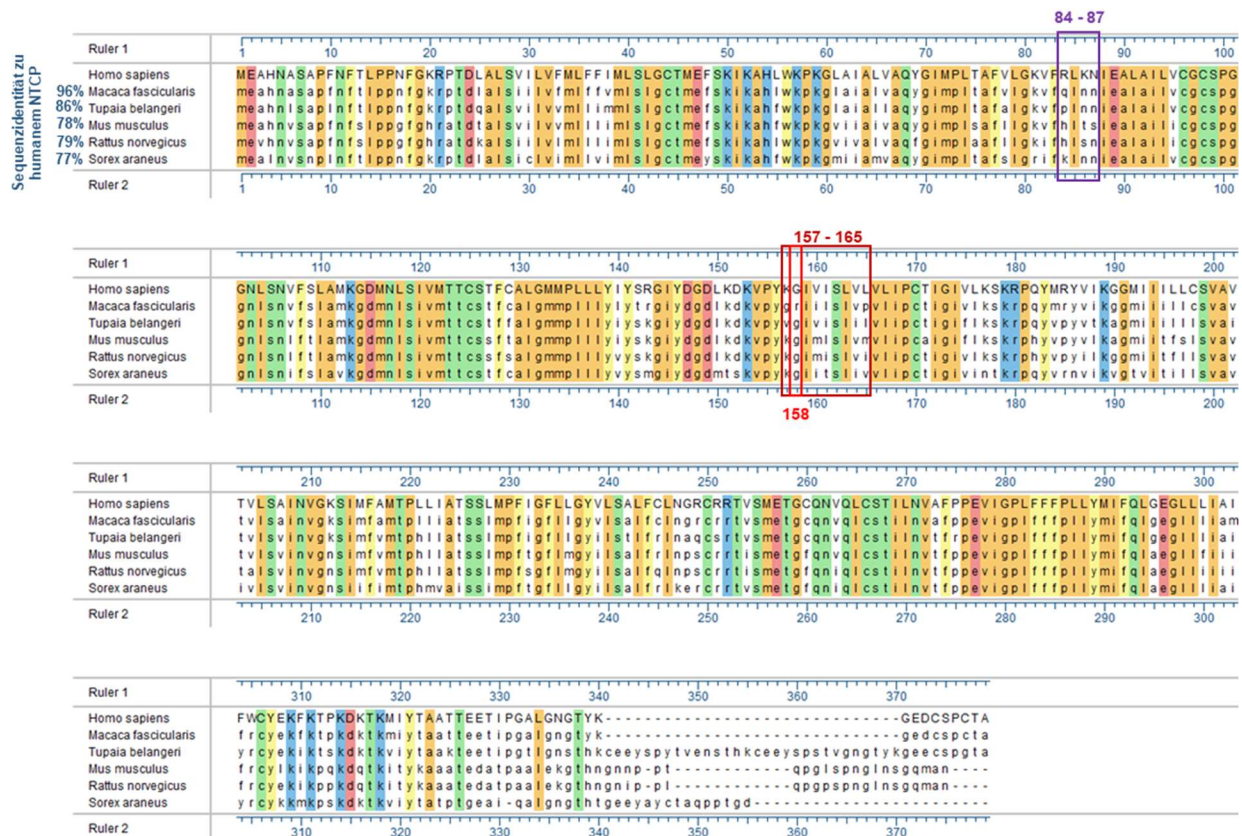


Abb.3.1 Multispeziesalignment mit Markierung der wichtigsten Stellen für die Bindung von HBV/HDV bzw. für den HBV/HDV-Entry

Für Ntcp-Homologe der Nager und Primaten wurde eine Evolution durch positive Selektion von neun HBV-Bindungsstellen propagiert. Für den Spitzmaus-Ntcp (*Sorex-Ntcp*) wurde jedoch nur eine der neun Bindungsstellen vorhergesagt. Des Weiteren wurde eine geringe Sequenzidentität der PreS1-Domäne von CSHBV (*crowned shrew HBV*, Schabrackenspitzmaus HBV) und MSHBV (*musk shrew HBV*, Moschusspitzmaus HBV) im Vergleich zu den korrespondierenden humanen und primaten Sequenzen festgestellt. Aufgrund dessen war eine Beteiligung des *Sorex-Ntcp* als Rezeptor und Eintrittspforte für CSHBV oder MSHBV in die *Sorex*-Hepatozyten unwahrscheinlich. Durch Fehlen der Bindungsfähigkeit des Myr-PreS1-Peptids von CSHBV und MSHBV an den *Sorex-Ntcp* sowie fehlender Infektionen in Hepatomzelllinien mit transfiziertem *Sorex-Ntcp*, welche mit Pseudotyp HDV mit CSHBV oder MSHBV umhüllten Oberflächenproteinen infiziert wurden, wurde der *Sorex-Ntcp* als Rezeptor für CSHBV und MSHBV ausgeschlossen. Des Weiteren konnte durch die CSHBV- bzw. MSHBV-Pseudotyp-Infektion eine Beteiligung von anderen für die Interaktion mit *Sorex-Ntcp* wichtigen Oberflächenstrukturen als die der PreS1-Domäne ausgeschlossen werden. Die physiologische Gallensäuretransporter-Funktion des *Sorex-Ntcp* wurde durch den Transport von NBD-TC bestätigt. Anders als CSHBV oder MSHBV kann humanes HBV *Sorex-Ntcp* in

transient transfizierten Hepatomzellen als Eintrittspforte nutzen. Dies ist durch das konservierte Glycin an Position 158 im *Sorex*-Ntcp zu erklären, welches für die Bindung der PreS1-Domäne von HBV wichtig ist (siehe Abbildung Abb.3.1) (Müller et al. 2018). Dies deutet darauf hin, da Spitzmäuse evolutionär älter als der Mensch sind, dass die Nutzung des Ntcp in der Evolution nicht konserviert ist (Foley et al. 2016). Des Weiteren könnten Spitzmäuse *in vivo* empfänglich für HBV sein und somit ein Reservoir für humanes HBV darstellen. Die Aufdeckung und Ausmerzung von Reservoiren des HBV ist insbesondere in Bezug auf die Zielsetzung der WHO, eine Eliminierung von HBV zu erreichen, von hoher Bedeutung. Diese Eradikation kann erreicht werden, wenn keine tierischen Reservoire, die die Gefahr eines Wiedereintrags in die menschliche Population bergen, bestehen. Auch homologe Hepatitis Viren in nicht-humanen Wirten könnten diese auf den Menschen übertragen. So nutzt beispielsweise das *tent-making bat HBV* (TBHBV) den humanen NTCP als Eintrittspforte in Hepatozyten, infiziert diese und könnte demzufolge eine zoonotische Bedeutung haben (Drexler et al. 2013). Da weder CSHBV noch MSHBV den humanen NTCP als Rezeptor nutzen, *in vitro* humane NTCPs exprimierende Hepatomzellen nicht infizieren konnten und der Eintritt in die Zelle als größte Speziesbarriere gesehen wird, scheinen beide Spitzmausviren kein zoonotisches Potential zu besitzen, obwohl sich CSHBV in Hepatomzellen bei transienter Transfektion replizieren konnte.

Für die *in vivo* HBV Forschung könnte ein Spitzmaus Hepatitis B Virus-Modell eine Schlüsselrolle in der Aufklärung der Pathogenese von HBV darstellen. CSHBV und MSHBV bilden aufgrund einer *Nonsense*-Mutation und eines daraus resultierenden vorzeitigen Stopp-Codons kein HBeAg. Dieses wird im Menschen für die Chronifizierung der HBV-Infektion verantwortlich gemacht, da es eine immunmodulatorische Funktion erfüllt und die Immunantwort des Wirtes auf das HBcAg hemmt (Kramvis et al. 2018). Das Spitzmausmodell wäre eine Alternative zu den ethisch nicht vertretbaren Studien an Primaten, den schlecht mit HBV zu infizierenden *Tupaia belangeri* und den schwierig zu haltenden Waldmurmeltieren. Spitzmäuse könnten genutzt werden, um die Pathogenese der chronischen HBV-Infektion zu entschlüsseln und eine noch fehlende effektive Therapie der HBV-Infektion zu entwickeln.

Zudem kann die Untersuchung von Infektionsmustern humaner Viren in nicht-humanen Wirten Aufschluss über Infektionshergänge im Menschen liefern. So wurde eine positive Korrelation zwischen der Chronifizierung einer viralen Infektion in tierischen Reservoiren und der Mensch zu Mensch Übertragbarkeit nach zoonotischem Eintrag in die menschliche Population gefunden (Geoghegan et al. 2016).

Auf der Rezeptorseite bieten verschiedene Ntcp-Homologe mit ihren unterschiedlichen Empfänglichkeiten für HBV/HDV eine gute Möglichkeit, um die für die Interaktion zwischen NTCP und HBV wichtigen Strukturen besser untersuchen und verstehen zu können.

3.2 Therapieoptionen bei HBV – Strategien

Durch die Entdeckung von NTCP als HBV/HDV-Rezeptor und die Etablierung von NTCP-überexprimierenden humanen Hepatomzelllinien, welche sich mit HBV/HDV infizieren lassen, konnten viele neue Strategien der Therapie von HBV/HDV entwickelt und untersucht werden. Um den Eintritt oder „Entry“ von HBV/HDV zu hemmen sind viele Inhibitionsstrategien, die NTCP bzw. die Interaktion von HBV/HDV mit NTCP als Ziel haben, entstanden. Eine Strategie betrifft die Herunterregulierung der NTCP-Expression in Hepatozyten durch z.B. den Tumor Nekrose Faktor- α oder das Interleukin-6 (Bouezzedine et al. 2015; Fukano et al. 2019). Sie folgt dem Prinzip: Kein (oder weniger) NTCP in der Plasmamembran bedeutet keine (oder weniger) Infektion. Außerdem wird versucht, die virale Infektion durch Induktion der Clathrin- oder Caveolae-abhängigen Endozytose und damit verbundenen Internalisierung des HBV/HDV-Rezeptors NTCP aus der Plasmamembran zu hemmen (Macovei et al. 2010; Huang et al. 2012; Miyakawa et al. 2018). Ein weiterer Ansatz fokussiert sich auf die Inhibition der Andockstelle, der PreS1-Domäne des HBV, welche den Viruseintritt, z.B. durch eine Hemmung mittels Antikörpern, auf viraler Seite verhindern soll (Tsukuda et al. 2017; Fukano et al. 2019).

Die gängigste Inhibitionsstrategie betrifft die Hemmung der von extrazellulär zugänglichen Seite des NTCPs, der *Cis*-Seite, um das Andocken von HBV/HDV via der PreS1-Domäne des großen Oberflächenproteins (LHBs) zu verhindern. Diese Hemmstoffe der Virusbindung werden als Entry- oder *Cis*-Inhibitoren bezeichnet. Durch den Hepatotropismus und die spezifischen viralen und zellulären Faktoren während des Andockens an die Hepatozyten scheinen HBV und HDV ideale Kandidaten für eine spezifische Blockierung durch Entry-Inhibitoren zu sein. Entry-Inhibitoren könnten Neuinfektionen von Hepatozyten während einer chronischen HBV/HDV-Infektion verhindern (Fukano et al. 2019).

Der klinisch bedeutendste und seit August 2020 von der EMA als HDV-Therapeutikum zugelassene *Cis*-Inhibitor ist Bulevirtide (Myrcludex B, Handelsname: Hepcludex®). Bulevirtide besteht aus dem myristoylierten Lipopeptid der 2 bis 48 Aminosäuren der N-terminalen PreS1-Region des LHBs. Diese PreS1-Region im LHBs und die Myristoylierung sind essentiell für die Virusbindung an NTCP in der Hepatozytenmembran (Glebe et al. 2005). Da das Myr-PreS1-Lipopeptid den Eintritt und die Infektion von HBV/HDV-Virionen dosisabhängig mit einer mittleren Inhibitorkonzentration (IC₅₀) im nanomolaren Bereich

hemmen kann, ist es als HBV/HDV-Entry-Inhibitor in den Fokus gerückt (Gripon et al. 2005). Das Lipopeptid scheint eine starke und langlebige Bindung zu NTCP aufzubauen und sich selbst nach der Degradierung von NTCP durch Turnover, an neu gebildete NTCPs in NTCP-überexprimierenden U2OS-Zellen docken zu können (Donkers et al. 2019). In den zurückliegenden Phase-Ib/IIa-Studien hat Bulevirtide in Kombination mit pegyliertem Interferon α synergistische Effekte, verringerte HDV-RNA und HBV-DNA-Werte in chronisch mit HBV und HDV infizierten Patienten gezeigt (Bogomolov et al. 2016).

Ein weiterer HBV-Inhibitor ist Cyclosporin A (CsA) aus der Gruppe der Immunsuppressiva. Unter anderem inhibiert CsA den HBV/HDV-Eintritt in die Zelle und wird durch NTCP sowohl in ausdifferenzierten, NTCP-exprimierenden HepaRG-Zellen als auch in primären Hepatozyten und in mit NTCP transfizierten humanen Hepatomzellen transportiert (Nkongolo et al. 2014). Zusätzlich behindert CsA die HBV-Replikation in HepG2.2.15-Zellen dosisabhängig (Xie et al. 2007).

Neben CsA und Bulevirtide sind niedermolekulare Entry-Inhibitoren, wie Ezetimib (König et al. 2014), Irbesartan (Wang et al. 2015), Ritonavir (Blanchet et al. 2014), (-)-Epigallocatechin-3-gallate (Huang et al. 2014) und viele weitere, in heptomzellbasierten *in vitro* Assays gefunden worden. Da NTCP physiologischerweise ein Gallensäuretransporter ist, der hauptsächlich konjugierte Gallensäuren transportiert und einen großen Beitrag in der Aufrechterhaltung des enterohepatischen Kreislaufs der Gallensäuren spielt, kann es problematisch sein, NTCP in seiner Transporterfunktion zu blockieren. Diese Blockade kann zu erhöhten Gallensäurespiegeln im peripheren Blut und zu weitreichenden Erkrankungen führen (de Aguiar Vallim et al. 2013; Vaz et al. 2015; van de Peppel et al. 2020). Leider interferieren alle der oben genannten Substanzen sowohl mit der HBV/HDV-Rezeptorfunktion als auch mit der Gallensäure-Transporterfunktion des NTCPs (König et al. 2014; Oehler et al. 2014; Blank et al. 2018). Aufgrund dessen wurde die Frage aufgeworfen, ob die beiden Funktionen grundsätzlich voneinander trennbar sind oder ob sich die NTCP-Domänen, welche die Myr-PreS1-Peptidbindung und den Gallensäuretransport vermitteln, überlappen. Diesbezüglich interessant ist die natürlich vorkommende Mutation im *SLC10A1*-Gen, welche zu einem Aminosäureaustausch von Serin zu Phenylalanin an Position 267 führt. Dieser Polymorphismus tritt beim Menschen vorrangig in der asiatischen Population auf und ist in seiner homozygoten Form mit einer Erhöhung von peripheren Gallensäuren verbunden (Deng et al. 2016). Zusätzlich geht dieser Polymorphismus mit einer geringeren HBV-Infektionsinzidenz und im Falle einer HBV-Infektion mit einer geringeren Entwicklung von

Leberzirrhose oder HCC einher (Peng et al. 2015, Hu et al. 2016, Liu et al. 2018). Auch *in vitro* zeigte diese Variante des NTCPs eine geringere HBV-Infektionsrate (Yan et al. 2014). Interessanterweise zeigt diese Variante des NTCPs eine geringere Transportkapazität für TC, kann jedoch andere Substrate, wie Rosuvastatin und Estrone-3-sulfat, weiterhin transportieren (Ho et al. 2004; Pan et al. 2011). Diese spontane Mutante könnte darauf hindeuten, dass die HBV/HDV-Rezeptor- und Transporterfunktion nicht voneinander trennbar sind und die Hemmung der einen Funktion die andere beeinträchtigt. Doch konnte mit Hilfe einer Mutation des Glycin-158 im humanen NTCP gezeigt werden, dass eine HBV/HDV-Resistenz bei erhaltenem Gallensäuretransport, somit eine selektive Hemmung der viralen Bindung, möglich ist. Dabei wurde diskutiert, ob der Aminosäureaustausch des „kleinen“ Glycin gegen eine beliebige Aminosäure mit einer Seitenkette eine sterische Behinderung für die Myr-PreS1-Peptidbindung auslöst, während niedermolekulare Gallensäuren ihre Bindungstasche für den Transport durch NTCP weiterhin erreichen können (Müller et al. 2018). Durch die Generierung von Cyclosporin-Analoga, welche die HBV/HDV-Bindung an NTCP blockieren, aber nicht bzw. nur in geringem Maße den Gallensäuretransport beeinflussen, wurde ein weiterer Hinweis für eine mögliche funktionelle Separierung und gezielte ansteuerbare Hemmung der beiden Funktionen von NTCP erbracht (Shimura et al. 2017).

Der ideale Kandidat einer *Cis*-Inhibition von NTCP wäre selektiv für den NTCP und würde die HBV/HDV-Interaktion am NTCP irreversibel blockieren. Er würde, um Nebenwirkungen zu reduzieren, die Gallensäurehomöostase unbeeinflusst lassen. Weiterhin sollte die Substanz eine möglichst geringe Zytotoxizität aufweisen und eine möglichst stabile Formulierung besitzen, damit eine einfache Lagerung und ein leichtes Handling des Medikaments möglich sind. Zusätzlich sollte die Applikation des Inhibitors oral erfolgen können. Bulevirtide beispielsweise muss aktuell *subkutan* appliziert werden (MYR-Pharmaceuticals 2020). Ebenso wäre eine lange Wirkdauer wünschenswert, um einen langanhaltenden Schutz zu gewährleisten und die Compliance des Medikaments durch die Patienten zu erhöhen. Um neben dem kürzlich zugelassenen peptidalen Entry-Inhibitor Hepcludex® einen Inhibitor zu finden, der möglichst alle der aufgeführten Kriterien erfüllt, aber vor allem den enterohepatischen Kreislauf der Gallensäuren unbeeinträchtigt lässt, wurde die Klasse der pentazyklischen Betuline untersucht.

Im Screening wurden die Substanzen auf ihre Selektivität bezüglich der HBV/HDV-Blockade überprüft. Dies wurde durch die Messung der mittleren Inhibitorkonzentration (IC_{50}) der PreS1-Peptid-Bindung an NTCP mit Tritium markierten Myr-PreS1-Peptiden und der Hemmung des [3H]TC-Gallensäuretransports realisiert. Sofern Substanzen einen geringeren IC_{50} -Wert für die

Hemmung der Myr-PreS1-Peptidbindung als für den TC-Transport aufgewiesen hatten, wurden sie als selektiv für die Hemmung der viralen Bindung eingestuft. Diese Substanzen wurden, um die Hemmungseigenschaft auf vollständige Virionen zu testen, im HDV-Infektionsexperiment mit stabil exprimierenden NTCP-HepG2-Zellen überprüft. Die zusätzliche Bestätigung der Hemmung in der Infektion ist essentiell, da es sich bei dem Myr-PreS1-Peptid lediglich um ein kleines Peptid des großen Oberflächenproteins von HBV handelt und nicht um ein großes Virion mit vielen verschiedenen Oberflächenproteinen und PreS1-Domänen, welche sterische und physikalische Wechselwirkungen durch unterschiedlich große, geladene und bewegliche Peptide miteinander und mit einem oder mehreren NTCP-Molekülen eingehen. Ferner kann vermutet werden, dass für eine erfolgreiche Bindung und anschließende Internalisierung des Virions mehrere NTCPs mit mehreren PreS1-Domänen eines Virions in Kontakt treten, was nicht durch Inkubation von freien Myr-PreS1-Peptiden darstellbar ist. Zusätzlich könnten ca. 50 nm große HBV-Virionen eine andere Internalisierungsrouten in die Zelle nehmen als kleine 48 Aminosäuren lange Myr-PreS1-Peptide. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Bindung von freien Myr-PreS1-Peptiden einen ersten Hinweis auf eine mögliche erfolgreiche Bindung des Virions an NTCP gibt. Das Myr-PreS1-Peptid im Bindungsassay ist als Stellvertreter für HBV/HDV in einem Screening geeignet, da aktuell HBV/HDV-Infektionen als Screening mit *in vitro* produzierten Viren eine zu zeit- und kostenintensive Vorgehensweise darstellen würde.

Grundsätzlich weist das Myr-PreS1-Peptid eine fast 100-fach größere Potenz der Inhibition von NTCP als TC auf, was mit den Daten von Donkers et al. über eine starke, langlebige Bindung an NTCP übereinstimmt (Donkers et al. 2019). Zur Validierung des Screening-Ansatzes wurden bekannte HBV/HDV-Inhibitoren, unter anderem Cyclosporin A (Nkongolo et al. 2014; Watashi et al. 2014; Shimura et al. 2017) und Rapamycin (Saso et al. 2018), auf ihre Selektivität der HBV/HDV-Hemmung getestet. Im Screening der Substanzen wurde neben der Selektivität auch die Potenz der Inhibition von NTCP betrachtet. Drei von 30 Betulin-Derivaten zeigten im Screening eine selektive und relativ potente Hemmung von NTCP. Diese Hemmung ließ sich konzentrationsabhängig bei HDV-Infektionen von NTCP-HepG2-Zellen reproduzieren. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Betulin-Derivate mit mindestens einer sauren Seitengruppe, welche bei saurem pH von 5,5 protoniert vorliegt, ihre Hemmung auf den TC-Transport im Vergleich zur Hemmungsleistung im physiologischen pH von 7,4 verlieren, während die Bindung des Myr-PreS1-Peptids weiterhin gehemmt wird. Diese Beobachtung könnte zusätzlich auf eine mögliche Trennung der Rezeptor- von der Transporterfunktion des NTCPs hinweisen. Konjugierte Gallensäuren sowie Betulin-Derivate mit mindestens einer sauren

Seitengruppe liegen bei physiologischem pH hauptsächlich in deprotonierter und negativ geladener Form vor (Kim et al. 1999; Kouzuki et al. 2000; Greupink et al. 2012). Folglich könnte vermutet werden, dass diese Betulin-Derivate, wie konjugierte Gallensäuren, durch NTCP transportiert werden. Ferner könnte die bei pH 7,4 durch die Betulin-Derivate ausgeübte Hemmung des TC-Transports eine kompetitive Hemmung darstellen. Zusätzlich könnte dies darauf hinweisen, dass eine negative Ladung für die Bindung an die Gallensäurebindungsstelle bedeutsam sein könnte, jedoch nicht für die Bindung des Myr-PreS1-Peptids. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des TC-Transports bzw. der Myr-PreS1-Peptidbindung nicht durch eine Internalisierung des NTCPs hervorgerufen werden kann, da der Hemmeffekt der Betulin-Derivate auf die Myr-PreS1-Peptidbindung durch Mediumwechsel und Waschen reversibel ist. Dies deutet zusätzlich darauf hin, dass die Betulin-Derivate keine irreversible Hemmung auf die Rezeptorfunktion des NTCPs haben, so wie es wünschenswert wäre.

In einer anderen Studie wurde eine Hemmung der HBV-Replikation durch Beeinträchtigung der Manganese Superoxid Dismutase (SOD2) und folgender Überproduktion der mitochondrialen Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Betulinsäure nachgewiesen (Yao et al. 2009). Aufgrund dessen könnte es sein, dass Betulin-Derivate neben der Inhibition des HBV/HDV-Eintritts in die Zelle auch weitere intrazelluläre, hemmende Effekte auf den HBV- oder HDV-Zyklus haben.

Grundsätzlich scheinen Betulin-Derivate gute Kandidaten für HBV/HDV-Entry-Inhibitoren zu sein. Jedoch müssten diese strukturell modifiziert werden, damit sie die HBV/HDV-Bindung an NTCP noch potenter hemmen.

In *in vitro* Modellen und *in vivo* Modellen mit Mäusen und Ratten wurde Betulinsäure als sichere Substanz mit geringer Toxizität eingestuft (Pisha et al. 1995; Zuco et al. 2002; Cichewicz et al. 2004). Trotz unbeeinträchtigten *in vitro* Laktatdehydrogenase (LDH)-Zytotoxizitätsassays in NTCP-HepG2-Zellen müssten, um eine gesicherte Aussage über die Toxizität der Betulin-Derivate zu treffen, weitere *in vivo* Experimente gemacht werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass nach weiteren Optimierungen bezüglich der Potenz und einer weiteren Steigerung der Selektivität die Substanzklasse der Betuline einen guten, für die Hemmung der NTCP-Rezeptorfunktion selektiven, Entry-Inhibitor hervorbringen könnte. Jedoch sollte vorher die genaue Art der HBV/HDV-Hemmung, d.h. ob eine reversible oder irreversible Blockade des NTCPs vorliegt, untersucht werden, auch in Bezug auf alle wichtigen HBV-Genotypen.

3.3 TLC als *Trans*-Inhibitor des NTCPs

Die Regulation der Membranexpression des Ratten-Ntcp ist, anders als die des humanen NTCPs, relativ gut aufgeklärt. So wird der Ratten-Ntcp über Phosphorylierung und Dephosphorylierung an Serin-226 in seinem Ein- und Abbau in die basolaterale Hepatozytenmembran beeinflusst (Anwer et al. 2005; Anwer et al. 2014). Cyclisches AMP verringert die Phosphorylierung und erhöht die Membranexpression der Ratten-Ntcp in Rattenhepatozyten (Grüne et al. 1993; Mukhopadhyay et al. 1997; Mukhopadhyay et al. 1998b). Genauer induziert cAMP eine Dephosphorylierung der Ratten-Ntcp an Serin-226 über Phosphatasen oder über eine Erhöhung der intrazellulären Calciumionen und initiiert so den Transport der Ntcp von den intrazellulären, vesikulären Speichern zur basolateralen Membran in Rattenhepatozyten oder transient mit Ratten-Ntcp transfizierten HepG2-Zellen (Dranoff et al. 1999; Webster et al. 2002a; Anwer et al. 2005; Anwer et al. 2014). Die Mutation von Serin-226 zu Alanin im Ratten-Ntcp führte zu einer Reduktion der Phosphorylierung von Ntcp und einer erhöhten Menge an Ntcp in der Plasmamembran sowie einer gesteigerten TC-Aufnahme in transient exprimierenden Ratten-Ntcp-Ser-226-Ala-Huh7-Zellen. Zusätzlich konnte cAMP bei Expression dieser Mutante weder eine Reduktion der Phosphorylierung noch eine Erhöhung der TC-Aufnahmerate erwirken. Dies deutet darauf hin, dass der Ratten-Ntcp durch cAMP über eine Dephosphorylierung an Serin-226 reguliert wird (Anwer et al. 2005). In einer Publikation von Stross et al. zeigte sich, dass Serin-226 zusammen mit Threonin-225 und dem Dileucin-Motiv Leucin-222 und Leucin-223 zusätzlich für die Clathrin-abhängige Endozytose des Ratten-Ntcp in HepG2-Zellen, welche die Ratten-Ntcp-Mutanten transient exprimierten, von Bedeutung ist (Stross et al. 2013).

Wie der Ratten-Ntcp erhöhte der humane NTCP die Plasmamembranexpression und Transportrate von TC unter Einfluss von cAMP in stabil überexprimierenden NTCP-Huh7-Zellen (Schonhoff et al. 2009; Park et al. 2012). Auch unter Cholestase, einem Zustand, bei dem die enterohepatische Zirkulation von Gallensäuren unterbrochen oder behindert ist und Gallensäuren in der Leber akkumulieren, werden sowohl der Ratten-Ntcp als auch der humane NTCP über transkriptionale Regulation in ihrer Expression gehemmt (Chai et al. 2012; Döring et al. 2012; Beaudoin et al. 2020). Eine mögliche Erklärung ist die Verhütung einer Akkumulation von hepatotoxischen Gallensäuren und daraus resultierenden Schäden an Hepatozyten. Bei Inkubation mit cholestatischen Gallensäuren, wie TCDC und TLC, wurde eine Verringerung der Plasmamembranexpression von Ratten-Ntcp und des TC-Transports in Rattenhepatozyten und Ratten-Ntcp exprimierende HepG2-Zellen beschrieben (Schonhoff et

al. 2009; Mühlfeld et al. 2012). Auch der humane NTCP wies unter Einfluss von TLC eine Reduktion der TC-Transportrate in NTCP-Huh7-Zellen auf. Jedoch zeigte die Oberflächenbiotinylierung dieser NTCP-Huh7-Zellen, dass diese Reduktion, anders als beim Ratten-Ntcp, nicht durch eine Internalisierung des humanen NTCPs hervorgerufen wurde (Schonhoff et al. 2009). Schonhoff et al. untersuchten, ob diese Transporthemmung des humanen NTCPs die Aktivierung der PI3K-abhängigen Proteinkinase PKC ϵ , wie für die TLC-induzierte Internalisierung von Mrp2 gezeigt, beinhaltet (Beuers et al. 2001; Schonhoff et al. 2009). Es konnte jedoch kein Hinweis auf eine Beteiligung des PI3K/PKB-Wegs gefunden werden. In unserer Studie konnten wir die Inhibition des TC-Transports nach kurzer Präinkubation von TLC in NTCP-HepG2- und NTCP-HEK293-Zellen reproduzieren und zusätzlich aufzeigen, dass diese Inhibition innerhalb von Sekunden und langfristig (bis zu 8 h) nach der TLC-Inkubation auftritt. Da dieser Hemmeffekt nicht grundsätzlich bei Präinkubation mit Gallensäuren auftritt, scheint er substanzspezifisch zu sein.

Den Befunden von Schonhoff et al. entsprechend konnten wir NTCP nach Präinkubation mit TLC in der Plasmamembran von HA-NTCP-FLAG-HEK293 und NTCP-FLAG-HepG2-Zellen detektieren (Schonhoff et al. 2009). Dies geschah mittels unpermeabilisierter Immunfluoreszenz, welche das extrazelluläre, c-terminale HA-Tag des HA-NTCP-FLAG, das heißt membranständigen NTCP, visualisierte. Zusätzlich wurde die Plasmamembranexpression von NTCP durch Oberflächenbiotinylierung unter Verwendung eines nicht-membrangängigen Biotinylierungsreagenz nachgewiesen. Aufgrund dessen kann ausgeschlossen werden, dass die beobachteten TLC-Effekte durch eine wesentliche Verminderung von membranständigem NTCP geschieht, wie dies für den Ratten-Ntcp nachgewiesen wurde (Schonhoff et al. 2009).

Für TLC und für weitere Gallensäuren wurde eine kompetitive Hemmung der TC-Transportfunktion des NTCPs bei gleichzeitiger Inkubation von TLC als „Hemmstoff“ und [^3H]TC als Substrat gezeigt (Schonhoff et al. 2009; König et al. 2014). Diese Hemmung entsteht an der Außenseite der Zelle und wird deshalb als *Cis*-Inhibition bezeichnet. In unserer Studie jedoch fand eine Präinkubation mit TLC statt. Anschließend wurde TLC mit Hilfe von intensiven Waschvorgängen mit PBS oder DMEM aus dem extrazellulären Raum entfernt und erst darauffolgend wurde die Transporterfunktion der NTCPs durch Inkubation mit radioaktiv- oder fluoreszenz-markierten Substraten TC oder DHEAS überprüft. Eine Hemmung der TC-Transportrate lässt in diesem Fall auf eine aus dem intrazellulären Raum ausgeübte Hemmung von TLC auf den TC-Transport schließen. So könnte TLC, während der Phase der TLC-Präinkubation, über NTCP in die Zellen gelangen, intrazellulär akkumulieren und anschließend

weitgehend unbeeinträchtigt durch extrazelluläre Waschvorgänge im intrazellulären Raum verbleiben. Bei der darauffolgenden Inkubation mit markierten Substraten wie TC oder DHEAS könnte TLC nun von der Innenseite der Zelle die Aufnahme weiterer Substrate als *Trans*-Inhibitor hemmen. Auch Schonhoff et al. diskutierten in ihrer Publikation die Möglichkeit einer intrazellulären TLC-Bindung und einer *Trans*-Hemmung von der cytosolischen Seite des NTCPs (Schonhoff et al. 2009).

Eine weitere Erklärung der Hemmung durch präinkubiertes TLC könnte sein, dass die Präinkubation und intrazelluläre Akkumulation der hepatotoxischen Gallensäure TLC zu einer Beeinträchtigung der Zelle führt und die Zellen daraufhin eine längere Zeit benötigen, um sich zu regenerieren. Dies konnte mit Hilfe von MTS-Zytotoxizitätsassays, welche keine Beeinträchtigung des Zellstoffwechsels detektieren konnten, weitgehend ausgeschlossen werden. Ferner konnte in NTCP-HEK293-Zellen nach Präinkubation von TLC weiterhin eine nahezu unbeeinträchtigte Transportrate von TLC festgestellt werden, während TC und DHEAS signifikant weniger transportiert wurden. Dies deutet daraufhin, dass die NTCP-Proteine in der Plasmamembran erstens vorhanden und zweitens funktionsfähig sind. NTCP scheint durch TLC-Präinkubation selektiv inhibiert zu sein, da NTCP nach TLC-Präinkubation in seiner TC und DHEAS-Transportrate beeinträchtigt ist, aber TLC weitgehend unbeeinträchtigt transportierte. Deshalb nehmen wir an, dass TLC eine andere Bindungsstelle und/oder Transportroute durch den NTCP nehmen muss als andere Gallensäuren wie TC oder steroidale Substrate wie DHEAS.

Zusätzlich konnten wir eine Hemmung der NTCP-Rezeptorfunktion durch eine Hemmung der Myr-PreS1-Peptidbindung in NTCP-HEK293-Zellen und der HDV-Infektion in NTCP-HepG2-Zellen beobachten. Da nach Präinkubation mit TLC und anschließendem Waschen eine sechsstündige Infektionsphase mit HDV-Partikeln im Medium angeschlossen ist, gingen wir der Frage nach, ob das intrazellulär akkumulierte TLC aus den Zellen in das Medium refluxen und so HDV-Partikel von extrazellulär als *Cis*-Inhibitoren an der Infektion der Zellen hemmen könnte. Messungen mit radioaktiv-markiertem und intrazellulär akkumuliertem TLC erreichten bei einer zweistündigen Präinkubation mit 250 μM TLC mit anschließendem Waschen und einer sechsstündigen „Releasephase“ nur ca. 10 μM TLC im Medium. 10 μM TLC zeitgleich mit HDV-Partikeln inkubiert zeigten kaum Hemmung der HDV-Infektion, während die Präinkubationen von 250 μM TLC eine HDV-Infektion fast vollständig hemmte. Dies beweist, dass *Cis*-Inhibitionseffekte nicht allein für die starke, durch die TLC-Präinkubation

hervorgerufene, Infektionshemmung verantwortlich sein können und bestärkt die Hypothese der *Trans*-Inhibition durch TLC.

Bei Gegenüberstellung der intrazellulären Akkumulation von [³H]TLC durch eine [³H]TLC-Präinkubation und des TC-Transports bzw. dessen Hemmung, konnte bei Erhöhung der intrazellulären [³H]TLC-Konzentration eine verringerte TC-Transportrate in NTCP-HEK293-Zellen festgestellt werden. Zusätzlich konnte TLC nur seine Hemmung entfalten, wenn es mit natriumhaltigem Puffer vorinkubiert wurde. Wenn Zellen mit TLC in Medium ohne Natriumgehalt präinkubiert wurden, verlor TLC größtenteils seine inhibitorische Wirkung auf die NTCP-Transportrate. Da Natriumionen für einen erfolgreichen Transport von Gallensäuren über NTCP benötigt werden, scheint eine intrazelluläre Akkumulation von TLC eine Voraussetzung für die *trans*-inhibitorischen Effekte zu sein.

Nach TLC-Präinkubation und -Akkumulation in den NTCP-HEK293-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass TLC die Bindungs- und Hemmungsfähigkeit von *Cis*-Inhibitoren auf den NTCP unbeeinträchtigt lässt. Dies weist darauf hin, dass TLC einen nicht-kompetitiven *Trans*-Inhibitor der Transporter- und HBV/HDV-Rezeptorfunktion darstellt.

In früheren Publikationen wurde für Transporter verschiedener Klassen eine *Trans*-Inhibition propagiert (Marzluf 1973; Gerber et al. 2008; Johnson et al. 2012; Zollmann et al. 2015; Barth et al. 2018); darunter Gallensäuretransporter der *Organic Anion Transporting Polypeptide*-Familie (OATP-Familie), für welche eine *Trans*-Inhibition durch Cyclosporin A beschrieben wurde (Shitara et al. 2017). Da CsA wie TLC eine *cis*-inhibitorische Wirkung aufweist, wurde in ihrem Studiendesign, wie in unserer Studie zu TLC, nach der Präinkubation gewaschen, um Auswirkungen einer *Cis*-Inhibition auszuschließen. CsA als *Trans*-Inhibitor zeigte eine konzentrationsabhängige und langanhaltende inhibitorische Wirkung auf OATP1B1/3 (Shitara et al. 2012; Shitara et al. 2017). Auch Stieger et al. berichteten von einer *Trans*-Inhibition des Ratten-ABC-Transporters Bsep durch den cholestatischen Östrogenmetaboliten Estradiol-17 β -Glucuronid (Stieger et al. 2000; Vallejo et al. 2006). Die meisten *Trans*-Inhibitoren dieser Publikationen zeigten eine sehr schnelle, langanhaltende sowie zeit- und dosisabhängige Hemmung. Die *Trans*-Inhibitoren wiesen eine hohe Bindungsaffinität zur *Trans*-Bindungsstelle ihres Transporters auf. In unserer Studie bewies TLC als *Trans*-Inhibitor alle diese genannten Eigenschaften. Da sich auch acht Stunden nach der TLC-Präinkubation und weiterer Kultivierung der Zellen ohne Gallensäuren der Hemmeffekt auf die Transporterfunktion des NTCPs in ähnlicher Ausprägung wie direkt nach der TLC-Inkubation zeigte, könnte dies auf eine hohe Bindungsaffinität zur intrazellulären Bindungsstelle des NTCPs seitens TLC

hindeuten. Anhand unserer Daten nehmen wir an, dass TLC einen schnell eintretenden, langanhaltenden Hemmeffekt von intrazellulär auf NTCP ausübt, der durch eine für TLC hochaffine *Trans*-Bindungsstelle am NTCP erklärt werden könnte. Diese *Trans*-Inhibition könnte bei Cholestase eine Akkumulation von hepatotoxischen Gallensäuren und eine Schädigung der Hepatozyten verhindern. Als pharmakologisches Ziel könnte die *Trans*-Bindungsstelle durch geeignete Substanzen adressiert werden und eine weitere, langanhaltende HBV/HDV-Inhibitionsstrategie darstellen. *Cis*-Inhibitoren sollten nicht durch NTCP transportiert werden, da andernfalls hohe Mengen der Substanz erforderlich wären, um einen wirksamen Medikamentenspiegel zu erreichen (Veloso Alves Pereira et al. 2015). Für *Trans*-Inhibitoren könnte die große Transportkapazität des NTCPs vorteilhaft sein, da sie dadurch sehr schnell an ihren Zielort gelangen und dort langanhaltend wirken könnten. Jedoch muss genau untersucht werden, ob diese Substanzen durch ihren intrazellulären Mode-of-Action weitere Zellprozesse beeinträchtigen. TLC als cholestatische und hepatotoxische Substanz ist keine geeignete Substanz, um als Medikament weiterentwickelt zu werden. Andere Stoffe jedoch könnten diese *Trans*-Bindungsstelle nutzen und schnell wirkende sowie langanhaltende Hemmungen der HBV/HDV-Infektion erwirken.

Um diese propagierte *Trans*-Bindungsstelle zu finden und geeignetere *Trans*-Inhibitoren in *In Silico Docking* Studien entwickeln zu können, wäre es wichtig, Strukturinformationen zum humanen NTCP zu haben.

Einschränkend muss erwähnt werden, dass alle unsere Experimente dieser Studie in einer NTCP-überexprimierenden Leberzellkarzinom-Zelllinie oder in humanen embryonalen Nierenzellen durchgeführt wurden. Diese Zelllinien besitzen andere Stoffwechselwege als Hepatozyten, weisen nur eine teilweise Polarisierung der Zellen auf und exprimieren nicht alle Gallensäuretransporter in vergleichbarer Weise wie Hepatozyten (Török et al. 2020). Deshalb wäre es zusätzlich interessant, diese Experimente in humanen Hepatozyten durchzuführen. Trotz aller Limitationen könnten unsere Daten auf eine noch nicht bekannte intrazelluläre Hemmstelle des NTCPs hinweisen.

3.4 Ausblicke

3.4.1 *In vivo* Modelle von HBV/HDV

Wie schon in der Einleitung erwähnt, gibt es aufgrund der hohen Wirtsspezifität von HBV/HDV große Probleme geeignete Modelle für die Erforschung von HBV/HDV zu finden. Dies erstreckt sich nicht nur auf den *in vitro* Bereich, sondern vor allem auf die HBV/HDV-

Forschung im lebenden Organismus. Aktuell bekannte natürliche Wirte von HBV sind der Mensch, Schimpanse, Gorilla, Gibbon und Orang-Utan. Das nördliche Spitzhörnchen (*Tupaia belangeri*) ist ebenfalls für HBV empfänglich. Tiermodelle sollen grundsätzlich komplexe biologische Prozesse und menschliche Krankheiten simulieren. Sie sind unerlässlich, um die Mechanismen von Krankheiten zu verstehen und, um Therapeutika auf ihre Wirksamkeit zu testen. In keiner Forschungsrichtung existiert ein perfektes Modell, an welchem alle Vorgänge untersucht und alle Therapien getestet werden können. Jedes (Tier)modell hat seine Vor- und Nachteile, je nach Fragestellung und Forschungsschwerpunkt muss das geeignete Modell gefunden und verwendet werden. In der HBV-Forschung wurde in der Vergangenheit aufgrund der nahen Verwandtschaft zum Menschen der Schimpanse als Modell verwendet. Ein Schimpanse erlaubt eine sehr genaue Simulation der humanen Physiologie und Immunantwort und kann, wie der Mensch, durch lediglich ein Genomäquivalent mit HBV infiziert werden, während *in vitro* meist tausende Genomäquivalente eingesetzt werden müssen, um Zellen erfolgreich zu infizieren (Asabe et al. 2009; Xiao et al. 2017). Schimpansen entwickeln ebenso häufig chronische HBV-Infektionen wie der Mensch, jedoch nur sehr selten HCC. Infolge der Beobachtung, dass Schimpansen unter Einfluss des HBsAg eine langfristige, protektive Immunantwort bilden, wurden HBV-Impfungen erst ermöglicht (Trepo et al. 1975). Ein erheblicher Vorteil eines großen Tiers als HBV-Modell ist, dass man während des Versuchs immer wieder Leberbiopsien entnehmen kann, ohne das Tier töten zu müssen. Trotz aller Vorteile, die der Schimpanse als HBV-Modell mit sich bringt, wird aufgrund ethischer Beschränkungen weitgehend auf Schimpansen als Forschungsmodell verzichtet. Ersatzweise versuchte man andere HBV-Primates-Modelle in Gorillas, Orang-Utans und Makaken zu etablieren (Ortega-Prieto et al. 2019). Jedoch sind viele für HBV empfängliche Arten als bedroht eingestuft (C. Y. Chen et al. 2020) oder nicht für HBV empfänglich (Makaken). Daher wurden z.B. *in vivo* HBV-Infektionsversuche mit Rhesusaffen durchgeführt, welche durch Induktion der Expression von humanem NTCP für HBV suszeptibel wurden (Burwitz et al. 2017).

Tupaia belangeri, das nördliche Spitzhörnchen, ist abgesehen von den Primaten das einzige Tier, welches *in vivo* und *in vitro* für HBV empfänglich ist (Walter et al. 1996). In Studien mit *Tupaia*hepatozyten wurde NTCP als HBV-Rezeptor entdeckt (Yan et al. 2012). *Tupaia belangeri* weist einen höheren Verwandtschaftsgrad zum Menschen als zu Nagetieren auf. In der genomischen Sequenzierung chinesischer Spitzhörnchen zeigte sich, dass das metabolische System, das Nerven- und Immunsystem von Spitzhörnchen sehr eng mit den menschlichen verwandt sind (Xiao et al. 2017). Während einer chronischen Infektion bilden Spitzhörnchen,

der menschlichen Verlaufsform ähnliche, histopathologische Veränderungen in der Leber und anders als Schimpansen, können sie an HBV-bedingter HCC erkranken (Ortega-Prieto et al. 2019). Durch ihre kurzen Reproduktions- und Lebenszyklen, ihre hohe Reproduktivität, ihre geringe Größe und ihre vergleichsweise leichte Haltung, sind nördliche Spitzhörnchen sehr attraktive Versuchsmodelle für verschiedene Studien humaner Krankheiten. So wird das *Tupaia* auch für andere Krankheiten, wie zum Beispiel für andere Hepatitis Viren, bakterielle Infektionen, für verschiedene Krebsarten, wie HCC und Brustkrebs, metabolische Krankheiten, wie Diabetes, und psychologische Krankheiten, wie Depressionen, als Modell verwendet. Jedoch existieren für Spitzhörnchen nur wenige Forschungsmaterialien, wie beispielsweise spitzhörnchen-spezifische Antikörper. Trotz der Anstrengungen verschiedener Wissenschaftler konnte noch keine Spitzhörnchenlinie mit einem einheitlichen genetischen Hintergrund erstellt werden (Xiao et al. 2017). Zusätzlich erreichen *in vivo* HBV-infizierte *Tupaia*s in der chronischen Form nur geringe HBV-Replikationslevel, weshalb HBV-Infektionen in Spitzhörnchen optimiert werden müssten. Aufgrund dessen hat sich die HBV-Forschung mittels *Tupaia belangeri* trotz ihrer Vorteile nicht flächendeckend durchgesetzt.

Um den Schimpansen als ethisch nicht vertretbares Modelltier zu ersetzen wurde in den letzten Jahren viel geforscht. Ein in der Forschung gerne verwendetes Modelltier, die Maus, rückte in den Fokus der Wissenschaftler. Mäuse sind klein, vergleichsweise weniger aufwändig in der Haltung und es sind viele Forschungsreagenzien wie z.B. Antikörper und Equipment für Käfige und Untersuchungsmaterialien erhältlich. Weiterhin sind die in der Wissenschaft verwendeten Mauslinien genetisch gut charakterisiert. Allerdings sind Mäuse aufgrund wesentlicher genetischer Unterschiede zum Menschen meist keine zufriedenstellenden HBV-Modelle und diese sind zudem nicht natürlicherweise für HBV/HDV empfänglich (Xiao et al. 2017). Für die Untersuchung von Funktion und Lokalisation der Proteine einzelner HBV-Gene wurden transgene Mäuse, welche einzelne HBV-Proteine exprimieren, erstellt. Zudem wurden transgene Mäuse mit Expression des kompletten HBV-Genoms generiert, um Wirtsreaktionen auf eine HBV-Virionen-Produktion zu erforschen und antivirale Substanzen zu testen. Bei letzterem Modell konnte festgestellt werden, dass die Mäuse keinen Leberschaden zeigten, folglich löst die HBV-Produktion für sich genommen keinen zytopathischen Effekt aus. Erst der Transfer von HBV-spezifischen, zytotoxischen T-Zellen induzierte Schäden in der Leber (Guo et al. 2018). Transgene Mäuse können zur Untersuchung einiger Schritte im HBV-Zyklus, der viralen Pathogenese und der Bildung von HCC verwendet werden. Diese Modelle lassen jedoch keine Studien bezüglich des Eintritts in die Hepatozyten, des Kernimports und der cccDNA-Bildung zu. Da das HBV-Genom bzw. einzelne HBV-Gene bei der Etablierung von

transgenen Mäusen in das Wirtsgenom eingebaut und keine cccDNA erstellt wird, kann in diesem Modell keine virale Clearance, charakterisiert durch das Verschwinden der cccDNA, erforscht werden. Da die HBV-Gene konstitutiv oder durch gewebspezifische und nicht durch virale Promotoren reguliert werden, ist die Expression der daraus resultierenden Proteine meist höher als bei HBV-infizierten Menschen. Zusätzlich sind diese Mäuse immuntolerant und bilden keine Hepatitis oder andere HBV-bedingte Leberkrankheiten (Ortega-Prieto et al. 2019).

Nach der Entdeckung des NTCPs als HBV/HDV-Rezeptor wurden NTCP-exprimierende transgene Mäuse erzeugt. Obwohl humane NTCPs in den Maushepatozyten exprimiert wurden, konnten diese Mäuse nur mit HDV infiziert werden. Demgegenüber konnten Hybriden einer Maushepatozyten-Zelllinie und humanen HepG2-Zellen bei *in vitro* Studien mit HBV infiziert werden. Dies deutet darauf hin, dass die Abwesenheit von essentiellen Wirtsfaktoren für fehlende HBV-Empfänglichkeit von Maushepatozyten verantwortlich ist und nicht die Bildung von restriktiven Wirtsfaktoren (Li et al. 2014; Ni et al. 2014; Lempp et al. 2016). Ferner konnte in einer immundefizienten Maus mit Expression des humanen NTCPs zwar eine HBV-Infektion beobachtet werden, jedoch keine HBV-Replikation. Dies deutet auf weitere Faktoren hin, die nach dem HBV-Eintritt in die Zelle bis zur cccDNA-Synthese und bei der HBV-Replikation eine Rolle spielen und die nicht in diesen Mäusen vorhanden sind (Winer et al. 2018).

Für die Untersuchung von HBV-induzierten Immunantworten mussten immunkompetente Mausmodelle etabliert werden. Dies wurde 2002 mithilfe einer hydrodynamischen Injektion eines großen Bolus mit HBV-DNA enthaltenden Plasmiden in die Schwanzvene von Mäusen erreicht. Dabei wird das HBV-Genom über kurzzeitigen, hohen Blutdruck in die Hepatozyten der Mäuse gepresst und vom Plasmid abgelesen und gebildet (Budker et al. 1996; Yang et al. 2002). Es wird jedoch keine cccDNA gebildet. Diese Methode wird durch die Mäuse grundsätzlich gut toleriert, jedoch ist die Generierung eines solchen Mausmodells sehr aufwändig, erfordert einen erfahrenen Experimentator und beinhaltet eine sehr geringe intrahepatische Transfektionseffizienz von lediglich 5 % (Li et al. 2020). Zusätzlich werden die Plasmide durch ihr bakterielles Grundgerüst schnell, innerhalb von ein bis zwei Wochen, vom Immunsystem der Maus erkannt und eliminiert (Yang et al. 2002; Li et al. 2020). Eine weitere Methode, um Plasmide in Maushepatozyten zu transportieren, ist die virale-vektorassoziierte Methode. Der erfolgreichste Vektor nutzt ein adeno-assoziiertes virales (AVV) Grundgerüst, welches nur ein kleines Genom besitzt und für keine eigenen AAV-Proteine codiert. Somit können alle Immunantworten des Wirtes auf das HBV zurückgeführt werden und es müssen kaum Reaktionen auf das AAV befürchtet werden. Diese Methode führt zur Entstehung von

cccDNA und resultiert in einer beständigen HBV-Virionen-Bildung bis zu ungefähr einem Jahr (Dion et al. 2013). So können virale Clearance und therapeutische Impfungen an diesem Modell untersucht werden.

Zur Abbildung des kompletten HBV-Lebenszyklus *in vivo* können humanisierte Mäuse ein geeignetes Modell darstellen. Humanisierte Mäuse werden aus immuninkompetenten Mauslinien mit induzierbaren, hepatozellulären Schäden, welche von transplantierten, humanen Hepatozyten besiedelt werden, generiert (Ortega-Prieto et al. 2019). Bei dieser von einem bis drei Monate dauernden Prozedur kann ein Anteil von bis zu 97 % an humanen Hepatozyten in der „Mausleber“ erreicht werden, welche anschließend mit HBV infiziert werden kann (Bissig et al. 2007). 10^4 bis 10^8 HBV-Genomäquivalente werden für die Infektion der Mäuse verwendet, cccDNA wird in den humanen Hepatozyten gebildet und hohe HBV-Replikationsraten können erreicht werden. Je nachdem, welche Mauslinie verwendet wird, kann es aufgrund von Infertilität Probleme mit der Nachzucht geben. Weiterhin kann die Erstellung des Chimärismus problembehaftet sein, da sehr junge und kleine Mäuse mit humanen Hepatozyten besiedelt werden müssen und diese eine hohe Blutungsneigung aufweisen, was eine hohe Mortalitätsrate nach sich ziehen kann. Da leberhumanisierte Mäuse eine für HBV/HDV artifizielle Wirtsumgebung darstellen, können keine Studien zur wirtsseitigen Beeinflussung auf und durch die Viren durchgeführt werden. Zusätzlich können die in diesem Modell gewonnenen experimentellen Ergebnisse von Infektionen durch das mauseigene Immunsystem verfälscht werden. Vor diesem Hintergrund können die neusten Entwicklungen in humanisierten Mausmodellen als bahnbrechend bezeichnet werden. Dabei werden Mäusen sowohl humane Hepatozyten als auch humane hämatopoetische Stammzellen transplantiert. Die humanen Hepatozyten besiedeln die Lebern der Mäuse und die humanen hämatopoetischen Stammzellen das Knochenmark, wobei letztere humane Leukozyten ausbilden. Diese zweifach humanisierten Mäuse können nicht nur den Lebenszyklus von HBV/HDV abbilden, sondern auch die Reaktion des humanen Immunsystems auf die Viren und den Einfluss des Immunsystems auf HBV/HDV (Ortega-Prieto et al. 2019).

Neben den Tiermodellen, in welchen HBV untersucht wird, existieren Tiermodelle, welche verwandte, tierische Vertreter des HBV wie beispielsweise das Enten Hepatitis B Virus analysieren, um weitere Aspekte bezüglich Replikation, Chronizität, Pathogenese und Kanzerogenese der *Hepadnaviren* aufzuklären.

Das wohl bekannteste tierische Hepatitis B Virus Modell ist das *Woodchuck hepatitis virus* (WHV) im amerikanischen Waldmurmeltier. Es weist eine hohe Homologie zum HBV auf und

eine WHV-Infektion kann in Waldmurmeltieren sowohl akut als auch chronisch verlaufen (Ortega-Prieto et al. 2019). Zusätzlich ähnelt die Immunantwort auf die WHV-Infektion jener des Menschen auf HBV (Cote et al. 2000). Die Chronizitätsraten sind denen menschlicher HBV-Infektionen sehr ähnlich. Je jünger die Tiere sind, desto häufiger bilden sich chronische Infektionen und nahezu alle Infektionen führen beim Murmeltier zu HCC (Kulkarni et al. 2007). WHV im Waldmurmeltier wurde vor allem im Hinblick auf die Pathogenese chronischer Verlaufsformen der *Hepadnaviren* und die HCC-Entwicklung untersucht. Ferner bilden Waldmurmeltiere in Reaktion auf WHV eine starke, zytotoxische T-Zell-Immunantwort, weshalb sie unter anderem als geeignetes Modell für die Testung und Entwicklung therapeutischer und prophylaktischer Impfungen angesehen werden (Lu et al. 2008). Da amerikanische Waldmurmeltiere Winterschlaf halten, können saisonale Veränderungen im Metabolismus der Tiere Ergebnisse von Studien z.B. die Pharmakokinetik einer Substanz beeinflussen (Zheng et al. 2020). Zusätzlich ist es schwierig amerikanische Waldmurmeltiere in Gefangenschaft zu züchten und das Handling mit diesen Tieren erfordert Erfahrung.

Ein weiteres tierisches Hepatitis B Virus ist das Enten Hepatitis B Virus (DHBV), welches eine geringe Sequenzhomologie (40 %) zu HBV besitzt und die Carboxypeptidase D anstatt NTCP für den Eintritt in die Leberzelle verwendet. DHBV stellt aufgrund der Entstehung großer Mengen an cccDNA (Zhang et al. 2003), welche in infizierten Enten gebildet wird, ein gutes Modell für chronische *Hepadnavirus*-Infektionen dar. Zusätzlich sind die Raten der Entwicklung des chronischen Verlaufs an DHBV mit dem von HBV vergleichbar, Enten bilden jedoch kein HCC (Jilbert et al. 1996). Primäre Entenhepatozyten sowie Küken sind leicht zu erwerben und unproblematisch im Handling. Dieses Modell hat einen großen Beitrag in der Aufklärung der Replikation der *Hepadnaviren* und in der Testung antiviraler Medikamente geleistet (Ortega-Prieto et al. 2019).

Wie schon in der Diskussion erwähnt, könnte ein Spitzmaus-HBV-Modell bei der Aufklärung der Pathogenese der Chronifizierung von HBV helfen, da sowohl CSHBV als auch MSHBV das für die Chronifizierung der HBV-Infektion verantwortliche HBeAg nicht bilden (Kramvis et al. 2018). Spitzmäuse sind kostengünstig in der Unterbringung und die Betreuung sowie das Handling von Spitzmäusen ist leicht. Auch wenn die Erforschung der Spitzmausviren durch ihr hohes evolutionäres Alter grundsätzlich einen interessanten Aspekt in die HBV-Forschung bringen könnte, wird sich das Spitzmaus-Modell in der HBV-Forschung wahrscheinlich nicht flächendeckend durchsetzen, da keine spezifischen Forschungsreagenzien erhältlich sind und

die Vorteile anderer, bereits etablierter Maus-Chimären oder Spitzhörnchenmodelle vielversprechender sind und in kürzerer Zeit Ergebnisse liefern könnten.

Bei der Erforschung aller tierischer Hepatitis Viren ist zu beachten, dass diese Stellvertreter für HBV darstellen und ihre Wirte andere genetische Hintergründe und Immunantworten aufweisen als der Mensch, weshalb Forschungsergebnisse vor der Übertragung auf den Menschen bzw. HBV genau überprüft werden müssen (Ortega-Prieto et al. 2019).

3.4.2 Betuline als neue, selektive HBV/HDV-Inhibitoren?!

In Publikation II konnten Betulinanaloga in NTCP-überexprimierenden humanen Hepatomzellen eine HDV-Infektion konzentrationsabhängig blockieren, während der Gallensäuretransport, repräsentiert durch die TC-Aufnahme in die Zellen, in deutlich geringerem Maße beeinträchtigt wurde. Im Screening erreichten die Betulinanaloga in den IC₅₀-Werten der HDV-Infektionen dreistellig mikromolare Bereiche, während für die Hemmung des radioaktiv-markierten Myr-PreS1-Peptids nur einstellig mikromolare Mengen nötig waren, um 50 % der Proteinbindung an NTCPs zu hemmen. Dies könnte durch die Proteinbindung von Betulinen an das im Infektionsmedium enthaltene Bovine Serum Albumin bedingt sein, welches schon bei anderen Studien mit Betulinen diskutiert wurde (Oh et al. 2018). Darüber hinaus besitzt ein HDV-Virion mehrere große Oberflächenproteine mit PreS1-Domäne, welche mit NTCP interagieren könnten. Daraus resultierend müssten mehrere dieser Regionen an einem Virion blockiert werden, um nicht in Verbindung mit NTCP treten zu können. Dieser Umstand könnte zusätzlich eine Erhöhung der benötigten Inhibitormenge nach sich ziehen. Ungeachtet dessen wäre es ein wichtiger Schritt bei der Entwicklung zum Arzneistoff eine Hemmung mit möglichst geringen Mengen an Inhibitor zu erreichen. Dies könnte man durch chemische Modifizierung und Verbesserung der Betulinanaloga gewährleisten. Diese modifizierten Analoga sollten auf eine spezifische Hemmung von NTCP und eine selektive Inhibition der NTCP-Rezeptorfunktion untersucht werden. So könnten Betulinanaloga weitere Transporter im enterohepatischen Kreislauf der Gallensäuren, wie OST α/β und OATP in der Leber oder ASBT im Dünndarm, beeinträchtigen. Beispielsweise ist für OATP1B1/3 eine Hemmung durch Betulinsäure gezeigt worden (Oh et al. 2018). Zusätzlich wäre es interessant zu überprüfen, ob die Betulinanaloga, wie schon für Betulinsäure beschrieben (Yao et al. 2009), weitere Wirkmechanismen der HBV/HDV-Hemmung aufweisen. Nachdem alle Betulinanaloga die *in vitro* Toxizitätsstudien bestanden haben, müssen weitere Sicherheitsbewertungen und Studien der Verstoffwechslung, unter zur Hilfenahme von Tiermodellen, erstellt werden. Bei der Pharmakokinetik im Tier kann das Zusammenspiel von

Galle, Blutfluss und die sich gegenseitig beeinflussende Regulation von Gallensäuretransportern untersucht werden. Zusätzlich müssen die Resorption, Metabolisierung und Exkretion, d.h. die Pharmakokinetik des Betulins im Organismus, betrachtet werden. Dabei ist von besonderer Relevanz, dass die Betuline im Körper bei oraler Gabe lange genug unverändert bleiben, um wirken zu können. Wenn sich das nicht erweisen sollte, könnten die für den Abbau von Enzymen empfänglichen Stellen im Molekül chemisch verändert werden.

Neben Betulinen, welche eine interessante Inhibitorengruppe darstellen, ist nun schon mit Hepcludex[®] der erste Entry-Inhibitor des NTCPs gegen HDV zugelassen. Die zukünftigen klinischen Daten von Hepcludex[®] werden Aufschluss über das Maß der Beeinflussung des enterohepatischen Kreislaufs der Gallensäuren und deren Folgen liefern. Es wäre nicht unwahrscheinlich, dass andere Gallensäuretransporter in ihrer Bildung hochreguliert werden, um den enterohepatischen Kreislauf der Gallensäuren aufrechtzuerhalten (Slijepcevic et al. 2017). Es könnte auch sein, dass eine antivirale Hemmung schon bei Dosierungen erreicht wird, in welchen der Ausfall der NTCP-Transporterfunktion für Gallensäuren noch durch weitere Transporter, wie OATPs übernommen werden könnte, und so keine klinischen Symptome entstünden. Wenn jedoch langfristig erhöhte Gallensäurespiegel erreicht werden, stellt sich die Frage, wie lange der Körper dies kompensieren kann. Zusätzlich wäre es interessant zu wissen, wie lange Entry-Inhibitoren eingenommen werden müssen, damit eine Heilung mit Unterstützung anderer Medikamente wie Interferon α erreicht wird, und ob diese überhaupt erzielt werden kann. Weiterhin könnte es bei Absetzen der Entry-Inhibitoren zu viralen Rebound-Effekten mit einer Wiederkehr der HBV/HDV-Infektion kommen. Viele offene Fragen, deren Antworten durch viele zukünftige Entry-Inhibitor-Studien geklärt werden müssten.

3.4.3 Strukturaufklärung von NTCP als Schlüssel für die Entry-Inhibitor-Entwicklung

Da die Struktur von NTCP noch nicht aufgeklärt ist, können in Ermangelung dessen die drei bekannten Kristallstrukturen von Bakterienhomologen des ASBTs von *Neisseria meningitidis* (ASBT_{NM}) und *Yersinia frederiksenii* (ASBT_{YF}) und die Aminosäuresequenz von NTCP für ein 3D-Homologiemodell verwendet werden (Hu et al. 2011; Zhou et al. 2014; Wang et al. 2021). Dabei wurde aufgrund von konservierten Bereichen in NTCP und ASBT eine Hypothese zum Transportmechanismus aufgestellt, nach der NTCP drei seiner neun Helices als flexible Panel-Domäne gegen die sechs starren Helices der Core-Domäne bewegt (siehe Literaturübersicht Kapitel 1.1.2 „NTCP: Entdeckung, Lokalisation und Struktur“). Dies ist

lediglich eine Annäherung an die tatsächliche Struktur des NTCPs, da NTCP beispielsweise nur 26 % Sequenzidentität zu ASBT_{Yf} aufweist (Hu et al. 2011; Noinaj et al. 2014; Zhou et al. 2014). Die Struktur eines Membranproteins suggeriert, wie es zur Lipiddoppelschicht der Plasmamembran orientiert ist und wie der Transportmechanismus ablaufen könnte (Vinothkumar et al. 2010).

Für die Aufklärung der Strukturen von Membranproteinen wurden in den letzten Jahren hauptsächlich die Röntgenkristallographie, die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) und die Kryoelektronenmikroskopie (Kryo-EM) angewendet (Almeida et al. 2017). Dabei müssen Membranproteine in großer Menge gebildet, aufgereinigt und anschließend mittels einer der drei oben genannten Methoden analysiert werden. Die Produktion der Membranproteine erfolgt meist in Bakterien, da diese ohne Probleme z.B. durch zytoplasmatische Aggregationen, große Mengen an Proteinen erzeugen können. Dabei kann jedoch eine unterschiedliche Prozessierung der Membranproteine in Bakterien zu einer anderen Faltung als in Eukaryoten Zellen führen. Bei der Röntgenkristallographie werden Proteine durch Beugung von Strahlen am Kristallgitter in ihrer atomaren Struktur aufgeklärt. In der NMR-Spektroskopie wird das zu untersuchende Membranprotein einem Magnetfeld ausgesetzt und die Drehimpulse der Atome, welche sich gegenseitig beeinflussen können, gemessen. Die Kryoelektronenmikroskopie wird verwendet, um Proteine, welche nicht kristallisiert werden können, zu untersuchen.

Grundsätzlich ist es schwieriger flexible Strukturen, wie Membranproteine, als starre Konstrukte abzubilden. Membranproteine müssen flexibel sein, um ihre physiologische Funktion zu erfüllen. Zusätzlich sind sie einer schnellen Synthese, Turnover sowie Degradierung unterworfen, um sich umgehend an veränderte Gegebenheiten anpassen zu können, wie beispielsweise an eine Erhöhung des Gallensäurespiegels im Blut. Ferner transportieren Membrantransporter, wie NTCP, verschiedene Substrate, zum Beispiel Gallensäuren, weshalb sie einen sehr hohen Grad an Flexibilität aufweisen müssen. Bei der Röntgenkristallographie können Membranproteine beispielsweise durch starre Antikörper stabilisiert werden, um auswertbare Kristalle zu erzeugen. Durch diese Stabilisierung der Membranproteine könnte ihre natürliche Struktur verändert werden. Eine Strukturaufklärung mittels Röntgenkristallographie ist sehr aufwändig. Für die Aufklärung der Struktur des humanen G-Protein-gekoppelten β 2-Adrenozeptors wurden beispielsweise 15 Jahre benötigt (Cherezov et al. 2007). Auch eine Aspartatprotease musste in 160.000 Konditionen behandelt werden, um einen analysierbaren Kristall zu erzeugen (Li et al. 2013).

Zusätzlich wird die Strukturaufklärung der Membranproteine durch ihre Lokalisation in der Plasmamembran behindert. So werden die Membranproteine durch die Plasmamembran, im Besonderen durch ihren Cholesterolgehalt und die Dicke der hydrophoben Schicht der Plasmamembran, beeinflusst (Lee 2004; Grouleff et al. 2015). Auch NTCP ist in der basolateralen Membran vorrangig in sogenannten *lipid rafts*, in Plasmamembranbereichen mit einem hohen Cholesterolgehalt, zu finden. Dabei soll der Cholesterolgehalt der Membran einen Einfluss auf die Funktion des NTCPs haben (Annaba et al. 2008; Molina et al. 2008). Würde man im Zuge einer Aufreinigung NTCP aus seiner cholesterolhaltigen Membran und in Detergenzien lösen, so könnte sich die Struktur des NTCPs deformieren und die daraus folgenden Informationen könnten fehlerhaft sein. Da die Membranproteine selbst aus hydrophoben und hydrophilen Anteilen bestehen, ist es problematisch diese vollständig in Detergenzien zu lösen, um sie anschließend analysieren zu können. Um die physiologische Struktur der Membranproteine zu erhalten, können membranartige Strukturen, welche mit Polymeren oder Proteinen stabilisiert sind, sogenannte Nanodisks, verwendet werden (Almeida et al. 2017). Diese Nanodisks sollen Membranproteine löslich machen und in ihrer natürlichen Struktur stabilisieren (Denisov et al. 2011).

Neuere Ansätze versuchen wasserunlösliche Membranproteine mittels eines Austausches von hydrophoben durch hydrophile Aminosäuren in Detergenzien löslich werden zu lassen, ohne jedoch ihre Struktur zu verändern (Zhang et al. 2018). Eine weitere Entwicklung ist der Versuch, Membranproteine über Ultraschall aus ihrer Membran zu lösen und sie über ein elektrisches Feld in das Massenspektrometer zur Analyse zu leiten (Chorev et al. 2018; Hirst et al. 2019).

Durch viele weitere neue Methoden in der Strukturanalyse von Proteinen scheint es an der Zeit zu sein, die Struktur von NTCP endlich vollständig aufzuklären. Diese würde die *Trans*-Bindungsstelle des TLC und die genaue extrazelluläre Bindungsstelle des Myr-PreS1-Peptids sowie deren verschiedener Gallensäuren aufklären können. Dabei könnten sowohl auf der *Cis*- als auch auf der *Trans*-Seite Entry-Inhibitoren zur Entwicklung eines besseren anti-HBV/HDV-Wirkstoffs strukturbasiert entwickelt werden. Außerdem könnte geklärt werden, warum und wie die Rezeptor- und die Transporterfunktion des NTCPs miteinander interferieren. Bis dahin kann, um neue *Cis*-Inhibitoren zu generieren, die Strategie des *ligand-based drug design* verfolgt werden. Dabei werden Substanzen wie beispielsweise das Myr-PreS1-Peptid oder andere bekannte Inhibitoren verwendet, um ihre Form für einen Wirkstoff nachzuahmen.

Mit Hilfe der Struktur des NTCPs könnten auch Co-Faktoren, welche mit NTCP interagieren und den Eintritt und die Internalisierung von HBV/HDV beeinflussen, gefunden werden. Vor allem in NTCP-überexprimierenden Hepatomzelllinien sind trotz des Einsatzes von hunderten bis tausenden Virionen *in vitro* nur geringe Infektionsraten zu beobachten. So können bei *in vitro* HDV-Infektionen mit hohen Mengen an Virus und weiteren Zusätzen, wie Polyethylenglycol oder Dimethylsulfoxid, meist nur Infektionsquoten von 30-40 % erreicht werden (Paran et al. 2001; Choijilsuren et al. 2017). Dies weist darauf hin, dass in diesen Modellen weitere für eine effiziente Infektion wichtige Co-Faktoren oder Rezeptoren fehlen (Anwer et al. 2014; Verrier et al. 2016). Jüngste Veröffentlichungen deuten an, dass der Epidermal Growth Faktor Rezeptor eine Rolle während der HBV-Infektion spielen könnte (Iwamoto et al. 2019; Iwamoto et al. 2020). So soll die kleine Menge an Epidermal Growth Faktor eine HBV-Infektion fördern, während eine größere Menge die Infektion hemmt (S. W. Chen et al. 2020). Es wird jedoch vermutet, dass der Eintritt von HBV/HDV ein Prozess ist, der viele Schritte und Co-Faktoren benötigt, wie es bereits hinsichtlich des hepatotropischen Hepatitis C Virus bekannt ist (Li et al. 2016).

4 ZUSAMMENFASSUNG

Weltweit leiden mehrere Millionen Menschen unter chronischen Hepatitis B/D Virus-Infektionen, jedoch existieren zurzeit nur eingeschränkte Therapiemöglichkeiten. Dies ist darin begründet, dass Hepatitis B und D Viren (HBV/HDV) einen engen Wirts- und Speziestropismus aufweisen und deshalb lange Zeit nur wenige *in vitro* und *in vivo* Modelle zur Erforschung beider Viren vorhanden waren. Infolgedessen wurden HBV-verwandte tierische Hepatitis B Viren, wie das Spitzmaus Hepatitis Virus, zur Aufklärung von fehlenden Bausteinen im Verständnis des HBV/HDV-Lebenszyklus und der Interaktion mit seinem Wirt, untersucht. Seit im Jahr 2012 der hepatische Gallensäure-Transporter NTCP (*Na⁺/taurocholate co-transporting polypeptide*) als leberspezifischer Entry-Rezeptor von HBV/HDV entdeckt wurde, konnten erstmals geeignete *in vitro* Infektionsmodelle für die HBV/HDV-Forschung auf Grundlage NTCP-exprimierender Hepatomzellen etabliert werden. An diesen NTCP-exprimierenden Zellen können nun auch mögliche Virus-Entry-Inhibitoren, welche den NTCP adressieren, getestet und weiterentwickelt werden. Die meisten HBV/HDV-Entry-Inhibitoren beeinflussen zusätzlich den physiologischen Gallensäuretransport des NTCPs und beeinträchtigen so die Gallensäurehomöostase. Vorteilhafter wäre jedoch selektiv die Virusbindung an NTCP zu blockieren. Dies ist z.B. mit einigen Derivaten der pflanzlichen Substanz Betulin gelungen. Bei mehreren Betulin-Derivaten konnten klare Struktur-Wirkungs-Beziehung für eine potente und selektive Hemmung von NTCP identifiziert werden. Zusätzlich wurde die hemmende Wirkung von Taurocholsäure (TLC) auf den NTCP näher untersucht. Anders als in Rattenhepatocyten führt eine TLC-Inkubation von Hepatomzellen, welche den humanen NTCP überexprimieren, nicht zu einer Verringerung der Membranexpression von NTCP. Jedoch wird TLC effektiv von NTCP transportiert, reichert sich schnell intrazellulär an und bindet dann an eine vermutete intrazelluläre Bindungsdomäne. Hierdurch kommt es zu einer effektiven *trans*-Inhibition des NTCP, sodass eine *in vitro* HDV Infektion von NTCP-Hepatomzellen nach Vorbehandlung mit TLC signifikant niedriger ausfällt. Möglicherweise eignet sich diese intrazelluläre TLC-Bindungsdomäne auch als Target für die Entwicklung weiterer HBV/HDV Entry-Inhibitoren.

5 SUMMARY

Several million people worldwide suffer from chronic hepatitis B/D virus infection, but currently only limited therapeutic options exist. This is due to the fact that hepatitis B and D viruses (HBV/HDV) have a narrow host and species tropism. Therefore, appropriate *in vitro* and *in vivo* models to study these viruses were highly limited. Consequently, HBV-related hepatitis B viruses in animals such as the shrew hepatitis virus in our study were used to elucidate missing links in the understanding of the HBV/HDV life cycle and interaction with its host. Since the discovery of the hepatic bile acid transporter NTCP (*Na⁺/taurocholate co-transporting polypeptide*) as a liver-specific entry receptor of HBV/HDV in 2012, suitable *in vitro* infection models for HBV/HDV research based on NTCP-expressing hepatoma cells could be established. These NTCP-expressing cells can now be used to test and further develop potential viral entry inhibitors that address NTCP. Most HBV/HDV entry inhibitors additionally affect the physiological bile acid transport function of NTCP and thereby impair bile acid homeostasis. However, it would be more advantageous to selectively block virus binding to NTCP. This has been achieved with some derivatives of the plant-derived compound betulin. For several betulin derivatives, clear structure-activity relationships for potent and selective inhibition of NTCP could be identified. In addition, the inhibitory effect of taurocholic acid (TLC) on NTCP was further investigated. Unlike in rat hepatocytes, TLC incubation of hepatoma cells overexpressing human NTCP does not decrease plasma membrane expression of NTCP. However, TLC is effectively transported by NTCP, rapidly accumulates in the intracellular compartment and binds afterwards to a suspected intracellular binding domain. This results in an effective *trans*-inhibition of NTCP, leading to significantly lower *in vitro* HDV infection rates of NTCP hepatoma cells after pretreatment with TLC. This intracellular TLC-binding domain is possibly also suitable as a target site for novel HBV/HDV entry inhibitors.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Aghazadeh M, Shi M, Barrs VR, McLuckie AJ, Lindsay SA, Jameson B, Hampson B, Holmes EC, Beatty JA.** (2018). A Novel Hepadnavirus Identified in an Immunocompromised Domestic Cat in Australia. *Viruses*, 10.
- Ahmad TR, Haeusler RA.** (2019). Bile acids in glucose metabolism and insulin signalling - mechanisms and research needs. *Nat Rev Endocrinol*, 15: 701-12.
- Alfaiate D, Deny P, Durantel D.** (2015). Hepatitis delta virus: From biological and medical aspects to current and investigational therapeutic options. *Antiviral Res*, 122: 112-29.
- Almeida JG, Preto AJ, Koukos PI, Bonvin A, Moreira IS.** (2017). Membrane proteins structures: A review on computational modeling tools. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1859: 2021-39.
- 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: G637-43.
- Annaba F, Sarwar Z, Kumar P, Saksena S, Turner JR, Dudeja PK, Gill RK, Alrefai WA.** (2008). Modulation of ileal bile acid transporter (ASBT) activity by depletion of plasma membrane cholesterol: association with lipid rafts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294: G489-97.
- Anwer MS, Gillin H, Mukhopadhyay S, Balasubramaniyan N, Suchy FJ, Ananthanarayanan M.** (2005). Dephosphorylation of Ser-226 facilitates plasma membrane retention of Ntcp. *J Biol Chem*, 280: 33687-92.
- Anwer MS, Stieger B.** (2014). Sodium-dependent bile salt transporters of the SLC10A transporter family: more than solute transporters. *Pflugers Arch*, 466: 77-89.
- Appelman MD, Chakraborty A, Protzer U, McKeating JA, van de Graaf SF.** (2017). N-Glycosylation of the Na⁺-Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP) Determines Its Trafficking and Stability and Is Required for Hepatitis B Virus Infection. *PLoS One*, 12: e0170419.
- Asabe S, Wieland SF, Chattopadhyay PK, Roederer M, Engle RE, Purcell RH, Chisari FV.** (2009). The size of the viral inoculum contributes to the outcome of hepatitis B virus infection. *J Virol*, 83: 9652-62.
- Asselah T, Loureiro D, Tout I, Castelnau C, Boyer N, Marcellin P, Mansouri A.** (2020). Future treatments for hepatitis delta virus infection. *Liver Int*, 40 Suppl 1: 54-60.
- Barth K, Hank S, Spindler PE, Prisner TF, Tampé R, Joseph B.** (2018). Conformational Coupling and trans-Inhibition in the Human Antigen Transporter Ortholog TmrAB Resolved with Dipolar EPR Spectroscopy. *J Am Chem Soc*, 140: 4527-33.
- Beaudoin JJ, Brouwer KLR, Malinen MM.** (2020). Novel insights into the organic solute transporter alpha/beta, OSTalpha/beta: From the bench to the bedside. *Pharmacol Ther*, 211: 107542.
- Bergner LM, Orton RJ, Broos A, Tello C, Becker DJ, Carrera JE, Patel AH, Biek R, Streicker DG.** (2021). Diversification of mammalian deltaviruses by host shifting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118.
- Beuers U, Bilzer M, Chittattu A, Kullak-Ublick GA, Keppler D, Paumgartner G, Dombrowski F.** (2001). Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver. *Hepatology*, 33: 1206-16.
- Bijsmans IT, Bouwmeester RA, Geyer J, Faber KN, van de Graaf SF.** (2012). Homo- and hetero-dimeric architecture of the human liver Na(+)-dependent taurocholate co-transporting protein. *Biochem J*, 441: 1007-15.

- Bissig KD, Le TT, Woods NB, Verma IM.** (2007). Repopulation of adult and neonatal mice with human hepatocytes: a chimeric animal model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 20507-11.
- Blanchet M, Sureau C, Labonté P.** (2014). Use of FDA approved therapeutics with hNTCP metabolic inhibitory properties to impair the HDV lifecycle. *Antiviral Res*, 106: 111-5.
- 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: 341-48.
- 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: 483-9.
- 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: 924-31.
- Bogomolov P, Alexandrov A, Voronkova N, Macievich M, Kokina K, Petrachenkova M, Lehr T, Lempp FA, Wedemeyer H, Haag M, Schwab M, Haefeli WE, Blank A, Urban S.** (2016). Treatment of chronic hepatitis D with the entry inhibitor myrcludex B: First results of a phase Ib/IIa study. *J Hepatol*, 65: 490-8.
- Bouezzedine F, Fardel O, Gripon P.** (2015). Interleukin 6 inhibits HBV entry through NTCP down regulation. *Virology*, 481: 34-42.
- Budker V, Zhang G, Knechtle S, Wolff JA.** (1996). Naked DNA delivered intraportally expresses efficiently in hepatocytes. *Gene Ther*, 3: 593-8.
- Burwitz BJ, Wettengel JM, Mück-Häusl MA, Ringelhan M, Ko C, Festag MM, Hammond KB, Northrup M, Bimber BN, Jacob T, Reed JS, Norris R, Park B, Moller-Tank S, Esser K, Greene JM, Wu HL, Abdulhaqq S, Webb G, Sutton WF, Klug A, Swanson T, Legasse AW, Vu TQ, Asokan A, Haigwood NL, Protzer U, Sacha JB.** (2017). Hepatocytic expression of human sodium-taurocholate cotransporting polypeptide enables hepatitis B virus infection of macaques. *Nat Commun*, 8: 2146.
- Chai J, He Y, Cai SY, Jiang Z, Wang H, Li Q, Chen L, Peng Z, He X, Wu X, Xiao T, Wang R, Boyer JL, Chen W.** (2012). Elevated hepatic multidrug resistance-associated protein 3/ATP-binding cassette subfamily C 3 expression in human obstructive cholestasis is mediated through tumor necrosis factor alpha and c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase-signaling pathway. *Hepatology*, 55: 1485-94.
- Chai N, Chang HE, Nicolas E, Han Z, Jarnik M, Taylor J.** (2008). Properties of subviral particles of hepatitis B virus. *J Virol*, 82: 7812-7.
- Chang WS, Pettersson JH, Le Lay C, Shi M, Lo N, Wille M, Eden JS, Holmes EC.** (2019). Novel hepatitis D-like agents in vertebrates and invertebrates. *Virus Evol*, 5: vez021.
- Chen CY, Winer BY, Chavez D, Guerra B, Brasky KM, Eng S, Salas E, Tam D, Simmons JH, Abee CR, Delaney WE, Ploss A, Lanford RE, Voitenleitner C.** (2020). Woolly Monkey-HBV Infection in Squirrel Monkeys as a Surrogate Nonhuman Primate Model of HBV Infection. *Hepatol Commun*, 4: 371-86.
- Chen HY, Shen DT, Ji DZ, Han PC, Zhang WM, Ma JF, Chen WS, Goyal H, Pan S, Xu HG.** (2019). Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis. *Gut*, 68: 512-21.
- Chen SW, Himeno M, Kouji Y, Sugiyama M, Nishitsuji H, Mizokami M, Shimotohno K, Miyajima A, Kido T.** (2020). Modulation of hepatitis B virus infection by epidermal growth factor secreted from liver sinusoidal endothelial cells. *Sci Rep*, 10: 14349.
- Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK, Stevens RC.** (2007). High-resolution crystal

- structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*, 318: 1258-65.
- Choijsuren G, Zhou RS, Chou SF, Chang CJ, Yang HI, Chen YY, Chuang WL, Yu ML, Shih C.** (2017). Heparin at physiological concentration can enhance PEG-free in vitro infection with human hepatitis B virus. *Sci Rep*, 7: 14461.
- Chorev DS, Baker LA, Wu D, Beilsten-Edmands V, Rouse SL, Zeev-Ben-Mordehai T, Jiko C, Samsudin F, Gerle C, Khalid S, Stewart AG, Matthews SJ, Grünewald K, Robinson CV.** (2018). Protein assemblies ejected directly from native membranes yield complexes for mass spectrometry. *Science*, 362: 829-34.
- Cichewicz RH, Kouzi SA.** (2004). Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. *Med. Res. Rev.*, 24: 90-114.
- Claro da Silva T, Polli JE, Swaan PW.** (2013). The solute carrier family 10 (SLC10): beyond bile acid transport. *Mol Aspects Med*, 34: 252-69.
- Claudiel T, Zollner G, Wagner M, Trauner M.** (2011). Role of nuclear receptors for bile acid metabolism, bile secretion, cholestasis, and gallstone disease. *Biochim Biophys Acta*, 1812: 867-78.
- Cote PJ, Korba BE, Miller RH, Jacob JR, Baldwin BH, Hornbuckle WE, Purcell RH, Tennant BC, Gerin JL.** (2000). Effects of age and viral determinants on chronicity as an outcome of experimental woodchuck hepatitis virus infection. *Hepatology*, 31: 190-200.
- Cotelesage JJ, Osioy C, Lawrence C, DeVarenes SL, Teow S, Beniac DR, Booth TF.** (2011). Hepatitis B Virus Genotype G forms core-like particles with unique structural properties. *J Viral Hepat*, 18: 443-8.
- Craddock AL, Love MW, Daniel RW, Kirby LC, Walters HC, Wong MH, Dawson PA.** (1998). Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am J Physiol*, 274: G157-69.
- Dane DS, Cameron CH, Briggs M.** (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*, 1: 695-8.
- Dawson PA, Lan T, Rao A.** (2009). Bile acid transporters. *J Lipid Res*, 50: 2340-57.
- de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Edwards PA.** (2013). Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metab*, 17: 657-69.
- 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 M, 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: 1114-22.
- Denisov IG, Sligar SG.** (2011). Cytochromes P450 in nanodiscs. *Biochim Biophys Acta*, 1814: 223-9.
- Dill JA, Camus AC, Leary JH, Di Giallonardo F, Holmes EC, Ng TF.** (2016). Distinct Viral Lineages from Fish and Amphibians Reveal the Complex Evolutionary History of Hepadnaviruses. *J Virol*, 90: 7920-33.
- Dion S, Bourguine M, Godon O, Levillayer F, Michel ML.** (2013). Adeno-associated virus-mediated gene transfer leads to persistent hepatitis B virus replication in mice expressing HLA-A2 and HLA-DR1 molecules. *J Virol*, 87: 5554-63.
- Dong C, Zhang BP, Wang H, Xu H, Zhang C, Cai ZS, Wang DW, Shu SN, Huang ZH, Luo XP.** (2019). Clinical and histopathologic features of sodium taurocholate cotransporting polypeptide deficiency in pediatric patients. *Medicine (Baltimore)*, 98: e17305.

- Donkers JM, Appelman MD, van de Graaf SFJ.** (2019). Mechanistic insights into the inhibition of NTCP by myrcludex B. *JHEP Rep*, 1: 278-85.
- Döring B, Lütteke T, Geyer J, Petzinger E.** (2012). The SLC10 carrier family: transport functions and molecular structure. *Curr Top Membr*, 70: 105-68.
- Dranoff JA, McClure M, Burgstahler AD, Denson LA, Crawford AR, Crawford JM, Karpen SJ, Nathanson MH.** (1999). Short-term regulation of bile acid uptake by microfilament-dependent translocation of rat ntcp to the plasma membrane. *Hepatology*, 30: 223-9.
- 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 AJ, 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: 16151-6.
- Eloranta JJ, Kullak-Ublick GA.** (2008). The role of FXR in disorders of bile acid homeostasis. *Physiology (Bethesda)*, 23: 286-95.
- EMA.** (2020). <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/hepcludex>.
- Fietz D, Bakhaus K, Wapelhorst B, Grosser G, Günther S, Alber J, Döring B, Kliesch S, Weidner W, Galuska CE, Hartmann MF, Wudy SA, Bergmann M, Geyer J.** (2013). Membrane transporters for sulfated steroids in the human testis--cellular localization, expression pattern and functional analysis. *PLoS One*, 8: e62638.
- Foley NM, Springer MS, Teeling EC.** (2016). Mammal madness: is the mammal tree of life not yet resolved? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 371.
- Fu L, Hu H, Liu Y, Jing Z, Li W.** (2017). Woodchuck sodium taurocholate cotransporting polypeptide supports low-level hepatitis B and D virus entry. *Virology*, 505: 1-11.
- Fukano K, Tsukuda S, Oshima M, Suzuki R, Aizaki H, Ohki M, Park SY, Muramatsu M, Wakita T, Sureau C, Ogasawara Y, Watashi K.** (2018). Troglitazone Impedes the Oligomerization of Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide and Entry of Hepatitis B Virus Into Hepatocytes. *Front Microbiol*, 9: 3257.
- Fukano K, Tsukuda S, Watashi K, Wakita T.** (2019). Concept of Viral Inhibitors via NTCP. *Semin Liver Dis*, 39: 78-85.
- Geoghegan JL, Senior AM, Di Giallonardo F, Holmes EC.** (2016). Virological factors that increase the transmissibility of emerging human viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113: 4170-5.
- Gerber S, Comellas-Bigler M, Goetz BA, Locher KP.** (2008). Structural basis of trans-inhibition in a molybdate/tungstate ABC transporter. *Science*, 321: 246-50.
- 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: 19728-41.
- 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 Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 372: 413-31.
- Gilman C, Heller T, Koh C.** (2019). Chronic hepatitis delta: A state-of-the-art review and new therapies. *World J Gastroenterol*, 25: 4580-97.
- Glebe D, Bremer CM.** (2013). The molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis*, 33: 103-12.
- Glebe D, Urban S.** (2007). Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol*, 13: 22-38.
- Glebe D, Urban S, Knoop EV, Cag 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: 234-45.
- Godoy JR, Fernandes C, Doring 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: 445-60.
- Gogarten JF, Ulrich M, Bhuvu N, Garcia J, Jain K, Lee B, Löhrich T, Oleynik A, Couacy-Hymann E, Fuh Neba T, Mishra N, Briese T, Calvignac-Spencer S, Lipkin WI, Leendertz FH.** (2019). A Novel Orthohepadnavirus Identified in a Dead Maxwell's Duiker (*Philantomba maxwellii*) in Tai National Park, Cote d'Ivoire. *Viruses*, 11.
- Greupink R, Nabuurs SB, Zarzycka B, Verweij V, Monshouwer M, Huisman MT, Russel FG.** (2012). In silico identification of potential cholestasis-inducing agents via modeling of Na(+)-dependent taurocholate cotransporting polypeptide substrate specificity. *Toxicol Sci*, 129: 35-48.
- Gripon P, Cannie I, Urban S.** (2005). Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. *J Virol*, 79: 1613-22.
- Gripon P, Diot C, Theze N, Fourel I, Loreal O, Brechot C, Guguen-Guillouzo C.** (1988). Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. *J Virol*, 62: 4136-43.
- Gripon P, Le Seyec J, Rumin S, Guguen-Guillouzo C.** (1995). Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity. *Virology*, 213: 292-9.
- Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C.** (2002). Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 15655-60.
- Grouleff J, Irudayam SJ, Skeby KK, Schiott B.** (2015). The influence of cholesterol on membrane protein structure, function, and dynamics studied by molecular dynamics simulations. *Biochim Biophys Acta*, 1848: 1783-95.
- Grüne S, Engelking LR, Anwer MS.** (1993). Role of intracellular calcium and protein kinases in the activation of hepatic Na⁺/taurocholate cotransport by cyclic AMP. *J Biol Chem*, 268: 17734-41.
- Guo WN, Zhu B, Ai L, Yang DL, Wang BJ.** (2018). Animal models for the study of hepatitis B virus infection. *Zool Res*, 39: 25-31.
- Hagenbuch B, Lubbert H, Stieger B, Meier PJ.** (1990). Expression of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem*, 265: 5357-60.
- Hagenbuch B, Meier PJ.** (1994). Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. *J Clin Invest*, 93: 1326-31.
- Hagenbuch B, Meier PJ.** (1996). Sinusoidal (basolateral) bile salt uptake systems of hepatocytes. *Semin Liver Dis*, 16: 129-36.
- Hagenbuch B, Stieger B, Foguet M, Lubbert H, Meier PJ.** (1991). Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 10629-33.
- Hahn CM, Iwanowicz LR, Cornman RS, Conway CM, Winton JR, Blazer VS.** (2015). Characterization of a Novel Hepadnavirus in the White Sucker (*Catostomus commersonii*) from the Great Lakes Region of the United States. *J Virol*, 89: 11801-11.
- Hallen S, Mareninova O, Branden M, Sachs G.** (2002). Organization of the membrane domain of the human liver sodium/bile acid cotransporter. *Biochemistry*, 41: 7253-66.
- Hantz O, Parent R, Durantel D, Gripon P, Guguen-Guillouzo C, Zoulim F.** (2009). Persistence of the hepatitis B virus covalently closed circular DNA in HepaRG human hepatocyte-like cells. *J Gen Virol*, 90: 127-35.

- He B, Zhang F, Xia L, Hu T, Chen G, Qiu W, Fan Q, Feng Y, Guo H, Tu C.** (2015). Identification of a novel Orthohepadnavirus in pomona roundleaf bats in China. *Arch Virol*, 160: 335-7.
- He W, Cao Z, Mao F, Ren B, Li Y, Li D, Li H, Peng B, Yan H, Qi Y, Sun Y, Wang F, Sui J, Li W.** (2016). Modification of Three Amino Acids in Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide Renders Mice Susceptible to Infection with Hepatitis D Virus In Vivo. *J Virol*, 90: 8866-74.
- Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA.** (2004). The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction. *Pflugers Arch*, 447: 465-8.
- Herrscher C, Pastor F, Burlaud-Gaillard J, Dumans A, Seigneuret F, Moreau A, Patient R, Eymieux S, de Rocquigny H, Hourieux C, Roingeard P, Blanchard E.** (2020). Hepatitis B virus entry into HepG2-NTCP cells requires clathrin-mediated endocytosis. *Cell Microbiol*: e13205.
- Hetzl U, Szivovics L, Smura T, Pr hauser B, Vapalahti O, Kipar A, Hepojoki J.** (2019). Identification of a Novel Deltavirus in Boa Constrictors. *mBio*, 10.
- Hirst J, Kunji ERS, Walker JE.** (2019). Comment on "Protein assemblies ejected directly from native membranes yield complexes for mass spectrometry". *Science*, 366.
- Ho RH, Leake BF, Roberts RL, Lee W, Kim RB.** (2004). Ethnicity-dependent polymorphism in Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) reveals a domain critical for bile acid substrate recognition. *J Biol Chem*, 279: 7213-22.
- Ho RH, Leake BF, Urquhart BL, Gregor JC, Dawson PA, Kim RB.** (2011). Functional characterization of genetic variants in the apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT; SLC10A2). *J Gastroenterol Hepatol*, 26: 1740-8.
- Ho RH, Tirona RG, Leake BF, Glaeser H, Lee W, Lemke CJ, Wang Y, Kim RB.** (2006). Drug and bile acid transporters in rosuvastatin hepatic uptake: function, expression, and pharmacogenetics. *Gastroenterology*, 130: 1793-806.
- Hofmann AF.** (2009). The enterohepatic circulation of bile acids in mammals: form and functions. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14: 2584-98.
- Hofmann AF, Hagey LR.** (2008). Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell Mol Life Sci*, 65: 2461-83.
- Houten SM, Watanabe M, Auwerx J.** (2006). Endocrine functions of bile acids. *EMBO J*, 25: 1419-25.
- Hu NJ, Iwata S, Cameron AD, Drew D.** (2011). Crystal structure of a bacterial homologue of the bile acid sodium symporter ASBT. *Nature*, 478: 408-11.
- Huang HC, Chen CC, Chang WC, Tao MH, Huang C.** (2012). Entry of hepatitis B virus into immortalized human primary hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *J Virol*, 86: 9443-53.
- Huang HC, Tao MH, Hung TM, Chen JC, Lin ZJ, Huang C.** (2014). (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits entry of hepatitis B virus into hepatocytes. *Antiviral Res.*, 111: 100-11.
- Hughes SA, Wedemeyer H, Harrison PM.** (2011). Hepatitis delta virus. *Lancet*, 378: 73-85.
- Iwamoto M, Saso W, Nishioka K, Ohashi H, Sugiyama R, Ryo A, Ohki M, Yun JH, Park SY, Ohshima T, Suzuki R, Aizaki H, Muramatsu M, Matano T, Iwami S, Sureau C, Wakita T, Watashi K.** (2020). The machinery for endocytosis of epidermal growth factor receptor coordinates the transport of incoming hepatitis B virus to the endosomal network. *Journal of Biological Chemistry*, 295: 800-07.
- Iwamoto M, Saso W, Sugiyama R, Ishii K, Ohki M, Nagamori S, Suzuki R, Aizaki H, Ryo A, Yun JH, Park SY, Ohtani N, Muramatsu M, Iwami S, Tanaka Y, Sureau C, Wakita T, Watashi K.** (2019). Epidermal growth factor receptor is a host-entry

- cofactor triggering hepatitis B virus internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116: 8487-92.
- Iwamoto M, Shibata Y, Kawasaki J, Kojima S, Li YT, Iwami S, Muramatsu M, Wu HL, Wada K, Tomonaga K, Watashi K, Horie M.** (2021). Identification of novel avian and mammalian deltaviruses provides new insights into deltavirus evolution. *Virus Evol*, 7: veab003.
- Jilbert AR, Miller DS, Scougall CA, Turnbull H, Burrell CJ.** (1996). Kinetics of duck hepatitis B virus infection following low dose virus inoculation: one virus DNA genome is infectious in neonatal ducks. *Virology*, 226: 338-45.
- Johnson E, Nguyen PT, Yeates TO, Rees DC.** (2012). Inward facing conformations of the MetNI methionine ABC transporter: Implications for the mechanism of transinhibition. *Protein Sci*, 21: 84-96.
- Jung D, Hagenbuch B, Fried M, Meier PJ, Kullak-Ublick GA.** (2004). Role of liver-enriched transcription factors and nuclear receptors in regulating the human, mouse, and rat NTCP gene. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 286: G752-61.
- Karakus E, Wannowius M, Müller SF, Leiting S, Leidolf R, Noppes S, Oswald S, Diener M, Geyer J.** (2020). The orphan solute carrier SLC10A7 is a novel negative regulator of intracellular calcium signaling. *Sci Rep*, 10: 7248.
- Kim RB, Leake B, Cvetkovic M, Roden MM, Nadeau J, Walubo A, Wilkinson GR.** (1999). Modulation by drugs of human hepatic sodium-dependent bile acid transporter (sodium taurocholate cotransporting polypeptide) activity. *J Pharmacol Exp Ther*, 291: 1204-9.
- Kirstgen M, Lowjaga KAAT, Müller SF, Goldmann N, Lehmann F, Alakurtti S, Yli-Kauhalauma J, Glebe D, Geyer J.** (2020). Selective hepatitis B and D virus entry inhibitors from the group of pentacyclic lupane-type betulin-derived triterpenoids. *Sci Rep*, 10: 21772.
- Klein M, Thomas M, Hofmann U, Seehofer D, Damm G, Zanger UM.** (2015). A systematic comparison of the impact of inflammatory signaling on absorption, distribution, metabolism, and excretion gene expression and activity in primary human hepatocytes and HepaRG cells. *Drug Metab Dispos*, 43: 273-83.
- 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⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) in hepatocytes. *J Hepatol*, 61: 867-75.
- Kouzuki H, Suzuki H, Stieger B, Meier PJ, Sugiyama Y.** (2000). Characterization of the transport properties of organic anion transporting polypeptide 1 (oatp1) and Na⁽⁺⁾/taurocholate cotransporting polypeptide (Ntcp): comparative studies on the inhibitory effect of their possible substrates in hepatocytes and cDNA-transfected COS-7 cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 292: 505-11.
- Kramvis A, Kostaki EG, Hatzakis A, Paraskevis D.** (2018). Immunomodulatory Function of HBeAg Related to Short-Sighted Evolution, Transmissibility, and Clinical Manifestation of Hepatitis B Virus. *Front Microbiol*, 9: 2521.
- Kulkarni K, Jacobson IM, Tennant BC.** (2007). The role of the woodchuck model in the treatment of hepatitis B virus infection. *Clin Liver Dis*, 11: 707-25, vii.
- Kullak-Ublick GA, Glasa J, Boker C, Oswald M, Grutzner U, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ, Beuers U, Kramer W, Wess G, Paumgartner G.** (1997). Chlorambucil-taurocholate is transported by bile acid carriers expressed in human hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology*, 113: 1295-305.
- Lai CL, Dienstag J, Schiff E, Leung NW, Atkins M, Hunt C, Brown N, Woessner M, Boehme R, Condreay L.** (2003). Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis*, 36: 687-96.

- Lanford RE, Chavez D, Brasky KM, Burns RB, 3rd, Rico-Hesse R.** (1998). Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 5757-61.
- Lauber C, Seitz S, Mattei S, Suh A, Beck J, Herstein J, Börold J, Salzburger W, Kaderali L, Briggs JAG, Bartenschlager R.** (2017). Deciphering the Origin and Evolution of Hepatitis B Viruses by Means of a Family of Non-enveloped Fish Viruses. *Cell Host Microbe*, 22: 387-99 e6.
- Le Vee M, Gripon P, Stieger B, Fardel O.** (2008). Down-regulation of organic anion transporter expression in human hepatocytes exposed to the proinflammatory cytokine interleukin 1beta. *Drug Metab Dispos*, 36: 217-22.
- Le Vee M, Lecureur V, Stieger B, Fardel O.** (2009). Regulation of drug transporter expression in human hepatocytes exposed to the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha or interleukin-6. *Drug Metab Dispos*, 37: 685-93.
- Lee AG.** (2004). How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1666: 62-87.
- Lee J, Zong L, Krotow A, Qin Y, Jia L, Zhang J, Tong S, Li J.** (2018). N-Linked Glycosylation Is Not Essential for Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide To Mediate Hepatitis B Virus Infection In Vitro. *J Virol*, 92.
- Lempp FA, Mutz P, Lipps C, Wirth D, Bartenschlager R, Urban S.** (2016). Evidence that hepatitis B virus replication in mouse cells is limited by the lack of a host cell dependency factor. *J Hepatol*, 64: 556-64.
- 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: 703-16.
- Leslie EM, Watkins PB, Kim RB, Brouwer KL.** (2007). Differential inhibition of rat and human Na⁺-dependent taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP/SLC10A1) by bosentan: a mechanism for species differences in hepatotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther*, 321: 1170-8.
- Li F, Wang Z, Hu F, Su L.** (2020). Cell Culture Models and Animal Models for HBV Study. *Adv Exp Med Biol*, 1179: 109-35.
- Li H, Zhuang Q, Wang Y, Zhang T, Zhao J, Zhang Y, Zhang J, Lin Y, Yuan Q, Xia N, Han J.** (2014). HBV life cycle is restricted in mouse hepatocytes expressing human NTCP. *Cell Mol Immunol*, 11: 175-83.
- Li Q, Sodroski C, Lowey B, Schweitzer CJ, Cha H, Zhang F, Liang TJ.** (2016). Hepatitis C virus depends on E-cadherin as an entry factor and regulates its expression in epithelial-to-mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113: 7620-5.
- Li X, Dang S, Yan C, Gong X, Wang J, Shi Y.** (2013). Structure of a presenilin family intramembrane aspartate protease. *Nature*, 493: 56-61.
- 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.
- Liu Y, Corsa AC, Buti M, Cathcart AL, Flaherty JF, Miller MD, Kitrinis KM, Marcellin P, Gane EJ.** (2017). No detectable resistance to tenofovir disoproxil fumarate in HBeAg⁺ and HBeAg⁻ patients with chronic hepatitis B after 8 years of treatment. *J Viral Hepat*, 24: 68-74.
- Loglio A, Ferenci P, Uceda Renteria SC, Tham CYL, van Bömmel F, Borghi M, Holzmann H, Perbellini R, Trombetta E, Giovanelli S, Greco L, Porretti L, Prati D, Ceriotti F, Lunghi G, Bertoletti A, Lampertico P.** (2019). Excellent safety and effectiveness of high-dose myrcludex-B monotherapy administered for 48 weeks in HDV-related compensated cirrhosis: A case report of 3 patients. *J Hepatol*, 71: 834-39.
- Lok AS.** (2002). Chronic hepatitis B. *N Engl J Med*, 346: 1682-3.

- Lu M, Yao X, Xu Y, Lorenz H, Dahmen U, Chi H, Dirsch O, Kemper T, He L, Glebe D, Gerlich WH, Wen Y, Roggendorf M.** (2008). Combination of an antiviral drug and immunomodulation against hepadnaviral infection in the woodchuck model. *J Virol*, 82: 2598-603.
- Lucifora J, Delphin M.** (2020). Current knowledge on Hepatitis Delta Virus replication. *Antiviral Res*, 179: 104812.
- MacLachlan JH, Cowie BC.** (2015). Hepatitis B virus epidemiology. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 5: a021410.
- Macovei A, Radulescu C, Lazar C, Petrescu S, Durantel D, Dwek RA, Zitzmann N, Nichita NB.** (2010). Hepatitis B virus requires intact caveolin-1 function for productive infection in HepaRG cells. *J Virol*, 84: 243-53.
- Mareninova O, Shin JM, Vagin O, Turdikulova S, Hallen S, Sachs G.** (2005). Topography of the membrane domain of the liver Na⁺-dependent bile acid transporter. *Biochemistry*, 44: 13702-12.
- Marion PL, Oshiro LS, Regnery DC, Scullard GH, Robinson WS.** (1980). A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77: 2941-5.
- Martinez MG, Villeret F, Testoni B, Zoulim F.** (2020). Can we cure hepatitis B virus with novel direct-acting antivirals? *Liver Int*, 40 Suppl 1: 27-34.
- Marzluf GA.** (1973). Regulation of sulfate transport in neurospora by transinhibition and by inositol depletion. *Arch Biochem Biophys*, 156: 244-54.
- Mason WS, Seal G, Summers J.** (1980). Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol*, 36: 829-36.
- Mayer PGK, Qvartskhava N, Sommerfeld A, Görg B, Häussinger D.** (2019). Regulation of Plasma Membrane Localization of the Na⁽⁺⁾-Taurocholate Co-Transporting Polypeptide by Glycochenodeoxycholate and Tauroursodeoxycholate. *Cell Physiol Biochem*, 52: 1427-45.
- McConkey M, Gillin H, Webster CR, Anwer MS.** (2004). Cross-talk between protein kinases Czeta and B in cyclic AMP-mediated sodium taurocholate co-transporting polypeptide translocation in hepatocytes. *J Biol Chem*, 279: 20882-8.
- Meier PJ, Eckhardt U, Schroeder A, Hagenbuch B, Stieger B.** (1997). Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. *Hepatology*, 26: 1667-77.
- Mentha N, Clément S, Negro F, Alfaiate D.** (2019). A review on hepatitis D: From virology to new therapies. *J Adv Res*, 17: 3-15.
- Miyakawa K, Matsunaga S, Yamaoka Y, Dairaku M, Fukano K, Kimura H, Chimuro T, Nishitsuji H, Watashi K, Shimotohno K, Wakita T, Ryo A.** (2018). Development of a cell-based assay to identify hepatitis B virus entry inhibitors targeting the sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *Oncotarget*, 9: 23681-94.
- 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: 1283-91.
- Monte MJ, Marin JJ, Antelo A, Vazquez-Tato J.** (2009). Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol*, 15: 804-16.
- Mühlfeld S, Domanova O, Berlage T, Stross C, Helmer A, Keitel V, Häussinger D, Kubitz R.** (2012). Short-term feedback regulation of bile salt uptake by bile salts in rodent liver. *Hepatology*, 56: 2387-97.
- Mukhopadhyay S, Ananthanarayanan M, Stieger B, Meier PJ, Suchy FJ, Anwer MS.** (1997). cAMP increases liver Na⁺-taurocholate cotransport by translocating transporter to plasma membranes. *Am J Physiol*, 273: G842-8.

- Mukhopadhyay S, Ananthanarayanan M, Stieger B, Meier PJ, Suchy FJ, Anwer MS.** (1998a). Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a serine, threonine phosphoprotein and is dephosphorylated by cyclic adenosine monophosphate. *Hepatology*, 28: 1629-36.
- Mukhopadhyay S, Webster CR, Anwer MS.** (1998b). Role of protein phosphatases in cyclic AMP-mediated stimulation of hepatic Na⁺/taurocholate cotransport. *J Biol Chem*, 273: 30039-45.
- Müller SF, König A, Döring B, Glebe D, Geyer J.** (2018). Characterisation of the hepatitis B virus cross-species transmission pattern via Na⁺/taurocholate co-transporting polypeptides from 11 New World and Old World primate species. *PLoS One*, 13: e0199200.
- MYR-Pharmaceuticals.** (2020). <http://myr-pharma.com/>.
- Nassal M.** (2015). HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut*, 64: 1972-84.
- Negro F.** (2014). Hepatitis D virus coinfection and superinfection. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4: a021550.
- Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, Nkongolo S, Kaufman C, Falth M, Stindt J, Koniger C, Nassal M, Kubitz R, Sultmann H, Urban S.** (2014). Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology*, 146: 1070-83.
- Ni Y, Urban S.** (2017). Stem cell-derived hepatocytes: A promising novel tool to study hepatitis B virus infection. *J Hepatol*, 66: 473-75.
- 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: 723-31.
- Noinaj N, Buchanan SK.** (2014). Structural insights into the transport of small molecules across membranes. *Curr Opin Struct Biol*, 27: 8-15.
- Noppes S, Müller SF, Bennien J, Holtmeyer M, Palatini M, Leidolf R, Alber J, Geyer J.** (2019). Homo- and heterodimerization is a common feature of the solute carrier family SLC10 members. *Biol Chem*, 400: 1371-84.
- Oehler N, Volz T, Bhadra OD, Kah J, Allweiss L, Giersch K, Bierwolf J, Riecken K, Pollok JM, Lohse AW, Fehse B, Petersen J, Urban S, Lütgehetmann M, Heeren J, Dandri M.** (2014). Binding of hepatitis B virus to its cellular receptor alters the expression profile of genes of bile acid metabolism. *Hepatology*, 60: 1483-93.
- Oh Y, Jeong YS, Kim MS, Min JS, Ryoo G, Park JE, Jun Y, Song YK, Chun SE, Han S, Bae SK, Chung SJ, Lee W.** (2018). Inhibition of Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 and 1B3 by Betulinic Acid: Effects of Preincubation and Albumin in the Media. *J Pharm Sci*, 107: 1713-23.
- Ortega-Prieto AM, Cherry C, Gunn H, Dorner M.** (2019). In Vivo Model Systems for Hepatitis B Virus Research. *ACS Infect Dis*, 5: 688-702.
- Paganelli M, Stephenne X, Sokal EM.** (2012). Chronic hepatitis B in children and adolescents. *J Hepatol*, 57: 885-96.
- Pan W, Song IS, Shin HJ, Kim MH, Choi YL, Lim SJ, Kim WY, Lee SS, Shin JG.** (2011). Genetic polymorphisms in Na⁺-taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) and ileal apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT) and ethnic comparisons of functional variants of NTCP among Asian populations. *Xenobiotica*, 41: 501-10.
- Paran N, Geiger B, Shaul Y.** (2001). HBV infection of cell culture: evidence for multivalent and cooperative attachment. *EMBO J*, 20: 4443-53.
- Paraskevopoulou S, Pirzer F, Goldmann N, Schmid J, Corman VM, Gottula LT, Schroeder S, Rasche A, Muth D, Drexler JF, Heni AC, Eibner GJ, Page RA, Jones**

- TC, Müller MA, Sommer S, Glebe D, Drosten C.** (2020). Mammalian deltavirus without hepadnavirus coinfection in the neotropical rodent *Proechimys semispinosus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117: 17977-83.
- Park SW, Schonhoff CM, Webster CR, Anwer MS.** (2012). Protein kinase Cdelta differentially regulates cAMP-dependent translocation of NTCP and MRP2 to the plasma membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 303: G657-65.
- Perez-Vargas J, Amirache F, Boson B, Mialon C, Freitas N, Sureau C, Fusil F, Cosset FL.** (2019). Enveloped viruses distinct from HBV induce dissemination of hepatitis D virus in vivo. *Nat Commun*, 10: 2098.
- 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: 1257-68.
- Piewbang C, Wardhani SW, Chaiyasak S, Yostawonkul J, Chai-In P, Boonrungsiman S, Kasantikul T, Techangamsuwan S.** (2020). Insights into the genetic diversity, recombination, and systemic infections with evidence of intracellular maturation of hepadnavirus in cats. *PLoS One*, 15: e0241212.
- Pisha E, Chai H, Lee IS, Chagwedera TE, Farnsworth NR, Cordell GA, Beecher CW, Fong HH, Kinghorn AD, Brown DM, et al.** (1995). Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat. Med.*, 1: 1046-51.
- Potter GD.** (1998). Bile acid diarrhea. *Dig Dis*, 16: 118-24.
- Rasche A, Sander AL, Corman VM, Drexler JF.** (2019). Evolutionary biology of human hepatitis viruses. *J Hepatol*, 70: 501-20.
- Rasche A, Souza B, Drexler JF.** (2016). Bat hepadnaviruses and the origins of primate hepatitis B viruses. *Curr Opin Virol*, 16: 86-94.
- Rydell GE, Prakash K, Norder H, Lindh M.** (2017). Hepatitis B surface antigen on subviral particles reduces the neutralizing effect of anti-HBs antibodies on hepatitis B viral particles in vitro. *Virology*, 509: 67-70.
- Saso W, Tsukuda S, Ohashi H, Fukano K, Morishita R, Matsunaga S, Ohki M, Ryo A, Park SY, Suzuki R, Aizaki H, Muramatsu M, Sureau C, Wakita T, Matano T, Watashi K.** (2018). A new strategy to identify hepatitis B virus entry inhibitors by AlphaScreen technology targeting the envelope-receptor interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
- Schonhoff CM, Thankey K, Webster CR, Wakabayashi Y, Wolkoff AW, Anwer MS.** (2008). Rab4 facilitates cyclic adenosine monophosphate-stimulated bile acid uptake and Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide translocation. *Hepatology*, 48: 1665-70.
- Schonhoff CM, Yamazaki A, Hohenester S, Webster CR, Bouscarel B, Anwer MS.** (2009). PKC ϵ -dependent and -independent effects of tauro lithocholate on PI3K/PKB pathway and taurocholate uptake in HuH-NTCP cell line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 297: G1259-67.
- Schweigmann H, Sánchez-Guijo A, Ugele B, Hartmann K, Hartmann MF, Bergmann M, Pfarrer C, Döring B, Wudy SA, Petzinger E, Geyer J, Grosser G.** (2014). Transport of the placental estriol precursor 16 α -hydroxy-dehydroepiandrosterone sulfate (16 α -OH-DHEAS) by stably transfected OAT4-, SOAT-, and NTCP-HEK293 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 143: 259-65.
- Schwenk M, Schwarz LR, Greim H.** (1977). Tauro lithocholate inhibits taurocholate uptake by isolated hepatocytes at low concentrations. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 298: 175-9.
- Seeger C, Mason WS.** (2015). Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology*, 479-480: 672-86.

- Shen F, Li Y, Wang Y, Sozzi V, Revall PA, Liu J, Gao L, Yang G, Lu M, Sutter K, Dittmer U, Chen J, Yuan Z.** (2018). Hepatitis B virus sensitivity to interferon-alpha in hepatocytes is more associated with cellular interferon response than with viral genotype. *Hepatology*, 67: 1237-52.
- 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 SY, Tanaka Y, Kusahara H, Mizokami M, Sureau C, Wakita T.** (2017). Cyclosporin derivatives inhibit hepatitis B virus entry without interfering with NTCP transporter activity. *J Hepatol*, 66: 685-92.
- Shitara Y, Sugiyama Y.** (2017). Preincubation-dependent and long-lasting inhibition of organic anion transporting polypeptide (OATP) and its impact on drug-drug interactions. *Pharmacol Ther*, 177: 67-80.
- Shitara Y, Takeuchi K, Nagamatsu Y, Wada S, Sugiyama Y, Horie T.** (2012). Long-lasting inhibitory effects of cyclosporin A, but not tacrolimus, on OATP1B1- and OATP1B3-mediated uptake. *Drug Metab Pharmacokinet*, 27: 368-78.
- Slijepcevic D, Kaufman C, Wichers CG, Gilgioni EH, Lempp FA, Duijst S, de Waart DR, Elferink RP, Mier W, Stieger B, Beuers U, Urban S, van de Graaf SF.** (2015). Impaired uptake of conjugated bile acids and hepatitis b virus pres1-binding in na(+)-taurocholate cotransporting polypeptide knockout mice. *Hepatology*, 62: 207-19.
- Slijepcevic D, Roscam Abbing RLP, Katafuchi T, Blank A, Donkers JM, van Hoppe S, de Waart DR, Tolenaars D, van der Meer JHM, Wildenberg M, Beuers U, Oude Elferink RPJ, Schinkel AH, van de Graaf SFJ.** (2017). Hepatic uptake of conjugated bile acids is mediated by both sodium taurocholate cotransporting polypeptide and organic anion transporting polypeptides and modulated by intestinal sensing of plasma bile acid levels in mice. *Hepatology*, 66: 1631-43.
- Smolders EJ, Burger DM, Feld JJ, Kiser JJ.** (2020). Review article: clinical pharmacology of current and investigational hepatitis B virus therapies. *Aliment Pharmacol Ther*, 51: 231-43.
- Sommerfeld A, Mayer PG, Cantore M, Häussinger D.** (2015). Regulation of plasma membrane localization of the Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (Ntcp) by hyperosmolarity and tauroursodeoxycholate. *J Biol Chem*.
- Stieger B.** (2011). The role of the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) and of the bile salt export pump (BSEP) in physiology and pathophysiology of bile formation. *Handb Exp Pharmacol*: 205-59.
- Stieger B, Fattinger K, Madon J, Kullak-Ublick GA, Meier PJ.** (2000). Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology*, 118: 422-30.
- Stieger B, Hagenbuch B, Landmann L, Höchli M, Schroeder A, Meier PJ.** (1994). In situ localization of the hepatocytic Na⁺/Taurocholate cotransporting polypeptide in rat liver. *Gastroenterology*, 107: 1781-7.
- Stross C, Kluge S, Weissenberger K, Winands E, Häussinger D, Kubitz R.** (2013). A dileucine motif is involved in plasma membrane expression and endocytosis of rat sodium taurocholate cotransporting polypeptide (Ntcp). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 305: G722-30.
- Suh A, Weber CC, Kehlmaier C, Braun EL, Green RE, Fritz U, Ray DA, Ellegren H.** (2014). Early mesozoic coexistence of amniotes and hepadnaviridae. *PLoS Genet*, 10: e1004559.
- Suk-Fong Lok A.** (2019). Hepatitis B Treatment: What We Know Now and What Remains to Be Researched. *Hepatol Commun*, 3: 8-19.

- Summers J, Smolec JM, Snyder R.** (1978). A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75: 4533-7.
- Sureau C, Negro F.** (2016). The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. *J Hepatol*, 64: S102-16.
- Sureau C, Salisse J.** (2013). A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus a-determinant. *Hepatology*, 57: 985-94.
- Szirovicza L, Hetzel U, Kipar A, Martinez-Sobrido L, Vapalahti O, Hepojoki J.** (2020). Snake Deltavirus Utilizes Envelope Proteins of Different Viruses To Generate Infectious Particles. *mBio*, 11.
- Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ, Pokornowski KA, Eggers BJ, Fang J, Wichroski MJ, Xu D, Yang J, Wilber RB, Colonno RJ.** (2009). Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naive patients is rare through 5 years of therapy. *Hepatology*, 49: 1503-14.
- Thomas E, Liang TJ.** (2016). Experimental models of hepatitis B and C - new insights and progress. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 13: 362-74.
- Török G, Erdei Z, Lilienberg J, Apáti A, Homolya L.** (2020). The importance of transporters and cell polarization for the evaluation of human stem cell-derived hepatic cells. *PLoS One*, 15: e0227751.
- Trepo C, Vnek J, Prince AM.** (1975). Delayed hypersensitivity and Arthus reaction to purified hepatitis B surface antigen (HBsAg) in immunized chimpanzees. *Clin Immunol Immunopathol*, 4: 528-37.
- Tsukuda S, Watashi K, Hojima T, Isogawa M, Iwamoto M, Omagari K, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Saito A, Tanaka Y, Mizokami M, Sureau C, Wakita T.** (2017). A new class of hepatitis B and D virus entry inhibitors, proanthocyanidin and its analogs, that directly act on the viral large surface proteins. *Hepatology*, 65: 1104-16.
- Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, Ammerer G, Hall BD.** (1982). Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature*, 298: 347-50.
- Vallejo M, Briz O, Serrano MA, Monte MJ, Marin JJ.** (2006). Potential role of trans-inhibition of the bile salt export pump by progesterone metabolites in the etiopathogenesis of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Hepatol*, 44: 1150-7.
- van de Peppel IP, Verkade HJ, Jonker JW.** (2020). Metabolic consequences of ileal interruption of the enterohepatic circulation of bile acids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.
- Vaudin M, Wolstenholme AJ, Tsiquaye KN, Zuckerman AJ, Harrison TJ.** (1988). The complete nucleotide sequence of the genome of a hepatitis B virus isolated from a naturally infected chimpanzee. *J Gen Virol*, 69 (Pt 6): 1383-9.
- Vaz FM, Paulusma CC, Huidekoper H, de Ru M, Lim C, Koster J, Ho-Mok K, Bootsma AH, Groen AK, Schaap FG, Oude Elferink RP, Waterham HR, Wanders RJ.** (2015). Sodium taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) deficiency: conjugated hypercholanemia without a clear clinical phenotype. *Hepatology*, 61: 260-7.
- Veloso Alves Pereira I, Buchmann B, Sandmann L, Sprinzl K, Schlaphoff V, Döhner K, Vondran F, Sarrazin C, Manns MP, Pinto Marques Souza de Oliveira C, Sodeik B, Ciesek S, von Hahn T.** (2015). Primary biliary acids inhibit hepatitis D virus (HDV) entry into human hepatoma cells expressing the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). *PLoS One*, 10: e0117152.
- Verrier ER, Colpitts CC, Schuster C, Zeisel MB, Baumert TF.** (2016). Cell Culture Models for the Investigation of Hepatitis B and D Virus Infection. *Viruses*, 8.

- Vinothkumar KR, Henderson R.** (2010). Structures of membrane proteins. *Q Rev Biophys*, 43: 65-158.
- Visser WE, Wong WS, van Mullem AA, Friesema EC, Geyer J, Visser TJ.** (2010). Study of the transport of thyroid hormone by transporters of the SLC10 family. *Mol Cell Endocrinol*, 315: 138-45.
- Walter E, Keist R, Niederöst B, Pult I, Blum HE.** (1996). Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo. *Hepatology*, 24: 1-5.
- Wang J, Huang H, Liu Y, Chen R, Yan Y, Shi S, Xi J, Zou J, Yu G, Feng X, Lu F.** (2020). HBV Genome and Life Cycle. *Adv Exp Med Biol*, 1179: 17-37.
- Wang X, Lyu Y, Ji Y, Sun Z, Zhou X.** (2021). An engineered disulfide bridge traps and validates an outward-facing conformation in a bile acid transporter. *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 77: 108-16.
- Wang XJ, Hu W, Zhang TY, Mao YY, Liu NN, Wang SQ.** (2015). Irbesartan, an FDA approved drug for hypertension and diabetic nephropathy, is a potent inhibitor for hepatitis B virus entry by disturbing Na(+)-dependent taurocholate cotransporting polypeptide activity. *Antiviral Res.*, 120: 140-6.
- Watashi K, Sluder A, Daito T, Matsunaga S, Ryo A, Nagamori S, Iwamoto M, Nakajima S, Tsukuda S, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y, Kanai Y, Kusuhara H, Mizokami M, Wakita T.** (2014). Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter, sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). *Hepatology*, 59: 1726-37.
- Webster CR, Anwer MS.** (1999). Role of the PI3K/PKB signaling pathway in cAMP-mediated translocation of rat liver Ntcp. *Am J Physiol*, 277: G1165-72.
- Webster CR, Blanch C, Anwer MS.** (2002a). Role of PP2B in cAMP-induced dephosphorylation and translocation of NTCP. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 283: G44-50.
- Webster CR, Blanch CJ, Phillips J, Anwer MS.** (2000). Cell swelling-induced translocation of rat liver Na(+)/taurocholate cotransport polypeptide is mediated via the phosphoinositide 3-kinase signaling pathway. *J Biol Chem*, 275: 29754-60.
- Webster CR, Srinivasulu U, Ananthanarayanan M, Suchy FJ, Anwer MS.** (2002b). Protein kinase B/Akt mediates cAMP- and cell swelling-stimulated Na+/taurocholate cotransport and Ntcp translocation. *J Biol Chem*, 277: 28578-83.
- Weinman SA.** (1997). Electrogenicity of Na(+)-coupled bile acid transporters. *Yale J Biol Med*, 70: 331-40.
- Weinman SA, Carruth MW, Dawson PA.** (1998). Bile acid uptake via the human apical sodium-bile acid cotransporter is electrogenic. *J Biol Chem*, 273: 34691-5.
- Wille M, Netter HJ, Littlejohn M, Yuen L, Shi M, Eden JS, Klaassen M, Holmes EC, Hurt AC.** (2018). A Divergent Hepatitis D-Like Agent in Birds. *Viruses*, 10.
- Winer BY, Shirvani-Dastgerdi E, Bram Y, Sellau J, Low BE, Johnson H, Huang T, Hrebikova G, Heller B, Sharon Y, Giersch K, Gerges S, Seneca K, Pais MA, Frankel AS, Chiriboga L, Cullen J, Nahass RG, Lutgehetmann M, Toettcher JE, Wiles MV, Schwartz RE, Ploss A.** (2018). Preclinical assessment of antiviral combination therapy in a genetically humanized mouse model for hepatitis delta virus infection. *Sci Transl Med*, 10.
- World Health Organization W.** (2017). Global hepatitis report 2017. *Licence:CC BY-NC-SA 3.0 IGO*.
- Xiao J, Liu R, Chen CS.** (2017). Tree shrew (*Tupaia belangeri*) as a novel laboratory disease animal model. *Zool Res*, 38: 127-37.
- Xie HY, Xia WL, Zhang CC, Wu LM, Ji HF, Cheng Y, Zheng SS.** (2007). Evaluation of hepatitis B virus replication and proteomic analysis of HepG2.2.15 cell line after cyclosporine A treatment. *Acta Pharmacol Sin*, 28: 975-84.

- Yan H, Peng B, He W, Zhong G, Qi Y, Ren B, Gao Z, Jing Z, Song M, Xu G, Sui J, Li W.** (2013). Molecular determinants of hepatitis B and D virus entry restriction in mouse sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *J Virol*, 87: 7977-91.
- 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.
- Yan Y, Allweiss L, Yang D, Kang J, Wang J, Qian X, Zhang T, Liu H, Wang L, Liu S, Sui J, Chen X, Dandri M, Zhao J, Lu F.** (2019). Down-regulation of cell membrane localized NTCP expression in proliferating hepatocytes prevents hepatitis B virus infection. *Emerg Microbes Infect*, 8: 879-94.
- Yang PL, Althage A, Chung J, Chisari FV.** (2002). Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 13825-30.
- Yao D, Li H, Gou Y, Zhang H, Vlessidis AG, Zhou H, Evmiridis NP, Liu Z.** (2009). Betulinic acid-mediated inhibitory effect on hepatitis B virus by suppression of manganese superoxide dismutase expression. *FEBS J.*, 276: 2599-614.
- Zeisel MB, Lucifora J, Mason WS, Sureau C, Beck J, Levrero M, Kann M, Knolle PA, Benkirane M, Durantel D, Michel ML, Autran B, Cosset FL, Strick-Marchand H, Trépo C, Kao JH, Carrat F, Lacombe K, Schinazi RF, Barré-Sinoussi F, Delfraissy JF, Zoulim F.** (2015). Towards an HBV cure: state-of-the-art and unresolved questions--report of the ANRS workshop on HBV cure. *Gut*, 64: 1314-26.
- Zeyen L, Döring T, Stieler JT, Prange R.** (2020). Hepatitis B subviral envelope particles use the COPII machinery for intracellular transport via selective exploitation of Sec24A and Sec23B. *Cell Microbiol*: e13181.
- Zhang S, Tao F, Qing R, Tang H, Skuhersky M, Corin K, Tegler L, Wassie A, Wassie B, Kwon Y, Suter B, Entzian C, Schubert T, Yang G, Labahn J, Kubicek J, Maertens B.** (2018). QTY code enables design of detergent-free chemokine receptors that retain ligand-binding activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115: E8652-E59.
- Zhang YY, Zhang BH, Theele D, Litwin S, Toll E, Summers J.** (2003). Single-cell analysis of covalently closed circular DNA copy numbers in a hepadnavirus-infected liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 12372-7.
- Zhao H, Zhou X, Zhou YH.** (2020). Hepatitis B vaccine development and implementation. *Hum Vaccin Immunother*: 1-12.
- Zheng J, Balsitis S, Santos R, Smith BJ, Subramanian R.** (2020). Characterization of Seasonal Pharmacokinetic Variability in Woodchucks. *Drug Metab Dispos*, 48: 1199-209.
- 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: 569-73.
- Zollmann T, Moiset G, Tumulka F, Tampé R, Poolman B, Abele R.** (2015). Single liposome analysis of peptide translocation by the ABC transporter TAPL. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: 2046-51.
- Zuco V, Supino R, Righetti SC, Cleris L, Marchesi E, Gambacorti-Passerini C, Formelli F.** (2002). Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett.*, 175: 17-25.

7 DANKSAGUNG

„Eine der Lektionen, die ich in den verschiedenen Phasen meiner Karriere gelernt habe, ist, dass Wissenschaft nicht alleine gemacht wird. Fortschritte werden erst durch Gespräche und den Austausch mit anderen erzielt.“

Carol W. Greider (Molekularbiologin)

In diesem Sinne möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die zu dem Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben. Die letzten Jahre waren eine sehr schöne und prägende Zeit bei der ich viel gelernt habe, aber auch sehr viel Spaß hatte. Vor allem in etwas schwierigeren Phasen, die wohl eine Promotionszeit ausmachen, konnte ich auf die Unterstützung meiner Familie, Freunde und Kollegen zählen und dafür möchte ich mich bei allen herzlichst bedanken.

Meinen Eltern Ramona und Ekkehart möchte ich danken, dass sie mir diesen Grad der Ausbildung ermöglicht haben. Sie haben mich und meine Schwester dazu erzogen, dass man alles erreichen kann, wenn man an sich glaubt und stetig an seinem Erfolg arbeitet. Ihr wart mir stets große Vorbilder!

Meiner Schwester Valeska, meiner besten Freundin Nora und meinem Mann Andreas danke ich sehr, da sie mich immer mit Essen und guten Ratschlägen unterstützt und an mich geglaubt haben und welchen ich jederzeit von den (Miss-)Erfolgen meiner Arbeit berichten konnte.

Herrn Prof. Dr. Joachim Geyer meinem Doktorvater möchte ich für die Möglichkeit der Mitarbeit an diesem großartigen SFB-Projekt in Kooperation mit der medizinischen Virologie danken. Seine stets offene Tür symbolisierte sein ebenso stets offenes Ohr für jegliche Probleme.

Meinem Postdoc Herrn Dr. Simon Franz Müller möchte ich einen besonderen Dank aussprechen, welcher mit seinem Blick fürs Detail jede Schwachstelle in Versuchsplanungen und Paper-Manuskripten finden konnte. Er hatte auch in frustrierenden Phasen, wenn wieder nichts funktionieren wollte, immer sehr gute Ideen wie es dann doch noch gelang.

Herrn Prof. Dr. Dieter Glebe möchte ich für die unkomplizierte und gute Kooperation mit der medizinischen Virologie danken. Er wusste auf jede meiner virologischen Fragen eine sehr kluge Antwort.

Unseren Virologen Nora Goldmann und Felix Lehmann möchte ich für die Hilfe bei den gefühlt abertausend Infektionsexperimenten und für die inspirierenden Gespräche danken.

Den „Boys“ Michael Kirstgen und Massimo Palatini sowie Dajana Gräfe und Dr. Josefine Bennien möchte ich für ein überaus schönes, arbeitsames Büroklima und witziges Beisammensein danken.

Vielen Dank auch an Birgit Kaus und ihre Nachfolgerin Marion Wagner, die durch ihre Arbeit am Institut so vielen den Rücken freigehalten haben und durch welche wir uns nie über das Spitzenstecken Gedanken machen mussten.

Für das Gelingen dieser Arbeit unerlässlich war die Unterstützung unserer lieben und unglaublich erfahrenen technischen Assistentinnen Anita Neubauer, Regina Leidolf, Silke Leiting, Bärbel Fühler und Sigrun Broehl, ohne welche nichts laufen würde!

Bei allen Mitgliedern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie möchte ich mich für das wunderbare Arbeitsklima, die legendären Mittagspausen und Feiern (in Prä-Coronazeiten) sowie die Unterstützung während meiner Zeit am Institut bedanken. Ich werde Euch vermissen!

8 ANHANG

Es folgen Publikationen I, II und III im Anhang.



Highly diversified shrew hepatitis B viruses corroborate ancient origins and divergent infection patterns of mammalian hepadnaviruses

Andrea Rasche^{a,b}, Felix Lehmann^c, Alexander König^c, Nora Goldmann^c, Victor M. Corman^{a,b}, Andres Moreira-Soto^a, Andreas Geipel^c, Debby van Riel^d, Yulia A. Vakulenko^e, Anna-Lena Sander^a, Hauke Niekamp^c, Ramona Kepper^{c,f}, Mathias Schlegel^g, Chantal Akoua-Koffi^h, Breno F. C. D. Souzaⁱ, Foday Sahr^j, Ayodeji Olayemi^k, Vanessa Schulze^g, Rasa Petraityte-Burneikiene^l, Andris Kazaks^m, Kira A. A. T. Lowjagaⁿ, Joachim Geyerⁿ, Thijs Kuiken^d, Christian Drosten^{a,b}, Alexander N. Lukashev^e, Elisabeth Fichet-Calvet^o, Rainer G. Ulrich^g, Dieter Glebe^{c,f,1,2}, and Jan Felix Drexler^{a,b,e,1,2}

^aInstitute of Virology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, 10117 Berlin, Germany; ^bGerman Centre for Infection Research, Partner Site Charité, 10117 Berlin, Germany; ^cInstitute of Medical Virology, National Reference Center for Hepatitis B and D Viruses, Biomedical Research Center Seltersberg (BFS), Justus Liebig University Giessen, 35392 Giessen, Germany; ^dDepartment of Viroscience, Erasmus MC, 3000 CA Rotterdam, The Netherlands; ^eTropical and Vector-Borne Diseases, Martsinovskiy Institute of Medical Parasitology, Sechenov University, 119435 Moscow, Russia; ^fGerman Centre for Infection Research, Partner Site Giessen-Marburg-Langen, 35392 Giessen, Germany; ^gInstitute of Novel and Emerging Infectious Diseases, Friedrich-Loeffler-Institut, 17493 Greifswald-Insel Riems, Germany; ^hCentre de Recherche pour le Développement, Alassane Ouattara University of Bouaké, BP V1801 Bouaké, Côte d'Ivoire; ⁱInfectious Diseases Research Laboratory, Federal University of Bahia, University Hospital Prof. Edgard Santos, 40.110-060 Salvador, Brazil; ^jCollege of Medicine and Allied Health Sciences, University of Sierra Leone, FQQ6+3M Freetown, Sierra Leone; ^kNatural History Museum, Obafemi Awolowo University, GG8H+JC Ile-Ife, Nigeria; ^lInstitute of Biotechnology, Vilnius University Life Sciences Center Institute of Biotechnology, LT-10257 Vilnius, Lithuania; ^mLatvian Biomedical Research and Study Centre, University of Latvia, LV-1067 Riga, Latvia; ⁿInstitute of Pharmacology and Toxicology, Biomedical Research Center Seltersberg (BFS), Justus Liebig University Giessen, 35392 Giessen, Germany; and ^oDepartment of Virology, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, 20359 Hamburg, Germany

Edited by Ding-Shinn Chen, National Taiwan University College of Medicine, Taipei, Taiwan, and approved July 1, 2019 (received for review May 13, 2019)

Shrews, insectivorous small mammals, pertain to an ancient mammalian order. We screened 693 European and African shrews for hepatitis B virus (HBV) homologs to elucidate the enigmatic genealogy of HBV. Shrews host HBVs at low prevalence (2.5%) across a broad geographic and host range. The phylogenetically divergent shrew HBVs comprise separate species termed crowned shrew HBV (CSHBV) and musk shrew HBV (MSHBV), each containing distinct genotypes. Recombination events across host orders, evolutionary reconstructions, and antigenic divergence of shrew HBVs corroborated ancient origins of mammalian HBVs dating back about 80 million years. Resurrected CSHBV replicated in human hepatoma cells, but human- and tupaia-derived primary hepatocytes were resistant to hepatitis D viruses pseudotyped with CSHBV surface proteins. Functional characterization of the shrew sodium taurocholate cotransporting polypeptide (Ntcp), CSHBV/MSHBV surface peptide binding patterns, and infection experiments revealed lack of Ntcp-mediated entry of shrew HBV. Contrastingly, HBV entry was enabled by the shrew Ntcp. Shrew HBVs universally showed mutations in their genomic preCore domains impeding hepatitis B e antigen (HBeAg) production and resembling those observed in HBeAg-negative human HBV. Deep sequencing and in situ hybridization suggest that HBeAg-negative shrew HBVs cause intense hepatotropic monoinfections and low within-host genomic heterogeneity. Geographical clustering and low MSHBV/CSHBV-specific seroprevalence suggest focal transmission and high virulence of shrew HBVs. HBeAg negativity is thus an ancient HBV infection pattern, whereas Ntcp usage for entry is not evolutionarily conserved. Shrew infection models relying on CSHBV/MSHBV revertants and human HBV will allow comparative assessments of HBeAg-mediated HBV pathogenesis, entry, and species barriers.

hepatitis B virus | viral evolution | zoonosis | shrew | E antigen

The hepatitis B virus (HBV, genus *Orthohepadnavirus*) is a ubiquitous pathogen that causes 887,000 deaths annually, predominantly due to cirrhosis and hepatocellular carcinoma after chronic hepatitis B (CHB) (1). Distantly related hepadnaviruses were identified recently in animals other than humans and apes (1). The newly discovered animal viruses revealed that prototypic properties of HBV such as envelopment (2) and presence of an X gene (3) emerged de novo during orthohepadnavirus evolution.

Hepadnaviruses are ancient pathogens, likely infecting vertebrates for over 200 million years (3). Placental mammals evolved ~99 million years ago (mya) and form 2 major clades termed Laurasiatheria and Euarchontoglires (4). The known laurasiatherian HBV hosts belong to several species within the orders Chiroptera (bats) and to one species each within the orders Carnivora (cat) and Artiodactyla (duiker). HBV hosts within the Euarchontoglires include

Significance

Hepatitis B viruses (HBVs) have existed for millions of years. We describe divergent HBV species in shrews, which are ancient insectivorous mammals. The shrew viruses corroborated ancient origins of mammalian HBV and showed mutations in genomic domains required for production of the hepatitis B e antigen, crucial for vertical transmission and chronicity of HBV in humans. Shrew HBV infection patterns showed important similarities with human HBV, and shrews might be susceptible to human HBV. In contrast, shrew HBVs could neither infect human cells nor use the canonical HBV receptor molecule for cellular entry. The discovery and characterization of shrew HBVs allow conceptualizing urgently needed new animal models relying on engineered shrew and human HBV homologs to elucidate HBV pathogenesis.

Author contributions: D.G. and J.F.D. designed research; A.R., F.L., A. König, N.G., V.M.C., A.M.-S., A.G., D.v.R., Y.A.V., A.-L.S., H.N., R.K., M.S., C.A.-K., B.F.C.D.S., F.S., A.O., V.S., K.A.A.T.L., E.F.-C., and R.G.U. performed research; R.P.-B., A. Kazaks, J.G., and C.D. contributed new reagents/analytic tools; A.R., T.K., and A.N.L. analyzed data; and A.R., D.G., and J.F.D. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Published under the PNAS license.

Data deposition: Sequence data have been submitted to GenBank, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank> (accession nos. MK345460–MK345476 and MN170823–MN170825).

¹D.G. and J.F.D. contributed equally to this work.

²To whom correspondence may be addressed. Email: dieter.glebe@viro.med.uni-giessen.de or felix.drexler@charite.de.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1908072116/-DCSupplemental.

Published online August 1, 2019.

humans and several nonhuman primate species within the order Primates and 3 closely related species within the order Rodentia (rodents) (1, 5). Bats may play an important role for *Orthohepadnavirus* evolution because they host a relatively higher genetic diversity of orthohepadnaviruses than other mammals (1, 6). However, bats are not the oldest laurasiatherian order. Predating the rise of bats, the order Eulipotyphla emerged ~80 mya (4). This order comprises small insectivorous animals such as moles, hedgehogs, and shrews. After decades at the periphery of the life sciences, diverse homologs of major human viruses have been found in eulipotyphlan hosts, suggesting they may play an underestimated role in the evolution of mammalian viruses (7–10). Very recently, a divergent hepadnavirus sequence was detected in Chinese shrews (11). Shrews represent about 90% of all eulipotyphlan species (12). Scarce virological data on shrews are partly due to difficulties in sampling these solitary animals that rapidly decay in traps due to their high metabolic rate (13).

Because hepadnaviruses may coevolve with their hosts (14) and because infection patterns in animal reservoirs can inform pathogenesis in humans (15), HBV homologs from shrews may provide important insights into the genealogy of HBV. Here, we conducted a systematic study into hepadnavirus genetic diversity and infection patterns in European and African shrews.

Results

Shrews Carry HBVs across a Broad Geographic and Host Range. Shrews originated in Eurasia from where they populated Africa

(Fig. 1A) (16). To investigate shrews for HBV along their geographic dispersal history, we sampled 693 animals pertaining to the genera *Sorex* and *Crocidura* from Europe and Western Africa during 2004–2016 (SI Appendix, Table S1). Liver specimens were tested for HBV DNA using a broadly reactive and highly sensitive nested PCR assay (17). In total, 17 animals were PCR-positive, including 1 common shrew (*Sorex araneus*) and 12 crowned shrews (*Sorex coronatus*) sampled in Germany during 2008–2009 and 4 African giant shrews (*Crocidura olivieri*) sampled in Ivory Coast in 2004 and 1 large-headed shrew (*Crocidura grandiceps*) sampled in Sierra Leone in 2014. The detection rate in European shrews (3.7%, 95% confidence interval [CI], 2.1–6.5) was not significantly higher than in African shrews (1.4%, 95% CI, 0.5–3.2; Fisher exact, $P = 0.05$). While the overall detection rate was low at 2.5% (95% CI, 1.5–3.9), it did not differ significantly from bat HBV detection rates in natural habitats (2.2%; Fisher exact, $P = 1.0$) (18) and may thus be representative of diverse HBV animal reservoirs. The discovery of shrew HBVs expands the mammalian orders known to be infected by orthohepadnaviruses to six (SI Appendix, Fig. S1A).

Shrew HBVs Form Separate Species and Genotypes. To determine the genomic structure of shrew HBVs, we characterized 7 complete genome sequences by sets of nested PCR assays as described previously (17). Complete genomes were recovered from 5 HBVs hosted by *S. coronatus*, 1 HBV hosted by *S. araneus*, and 4 HBVs hosted by *C. olivieri*. An additional shrew HBV hosted by *C. grandiceps* was partially characterized in a genomic region encompassing 1,433 nucleotides within the surface/polymerase and X/preC/core open reading frames (ORFs) (GenBank accession nos. MK345460–MK345467, MK345470, MK345474, and MK345475; SI Appendix, Fig. S1B). The genomes encompassed 3,089 nucleotides for the crowned shrew HBV from Germany (CSHBV) and 3,172 nucleotides for the musk shrew HBV from Ivory Coast (MSHBV_{CIV}). All shrew viruses comprised 4 predicted ORFs encoding the polymerase, surface, X, and core proteins, comparable to other HBVs (SI Appendix, Table S2). Averaged over the full genome, CSHBV, MSHBV_{CIV}, and the recently described Chinese musk shrew HBV variant (MSHBV_{CHN}) showed 22.9–28.9% mutual nucleotide sequence distances and 39.0–43.7% compared with other orthohepadnaviruses (SI Appendix, Table S3). MSHBV_{CHN}, MSHBV_{CIV}, and CSHBV thus formed 3 *Orthohepadnavirus* species (19). The CSHBV comprised 2 divergent lineages that differed from one another by 11.6–12.0% genomic sequence distance. Because primate HBV genotypes differ by at least 8% over the full genomes, these 2 lineages represent distinct genotypes. CSHBV genotype A was recovered only from *S. coronatus*, whereas genotype B was recovered from both *S. araneus* and *S. coronatus*, likely representing spillover infections into *S. araneus* in sympatric animals, resembling those observed in ape-associated HBV infecting gorillas and chimpanzees (20) (SI Appendix, Fig. S1B). The partially characterized MSHBV_{CIV} from Sierra Leone differed from the fully characterized MSHBV_{CIV} from Ivory Coast by 8.4% within the characterized genomic region. The 2 mutually most closely related HBV genotypes from orangutans and gibbons differ by 6.0% in the homologous genomic region. The 2 MSHBV_{CIV} lineages thus likely also correspond to distinct genotypes. Similarly, MSHBV_{CHN} formed 2 genotypes with 8.5–8.7% genomic distance (11). In sum, shrews host at least 3 HBV species and 6 genotypes, equaling primates in HBV species richness.

Shrew HBVs Are Phylogenetically and Antigenically Divergent. In an unrooted full genome phylogeny comprising the complete genetic diversity of the genus *Orthohepadnavirus*, shrew HBVs formed a distinct clade in distant sister relationship with the tent-making bat HBV (TBHBV) found in Central American bats (17, 18) (SI Appendix, Fig. S1C). The long branches segregating both bat-borne and shrew-borne HBVs in phylogenetic reconstructions relying on the full genomes and the translated ORFs suggest

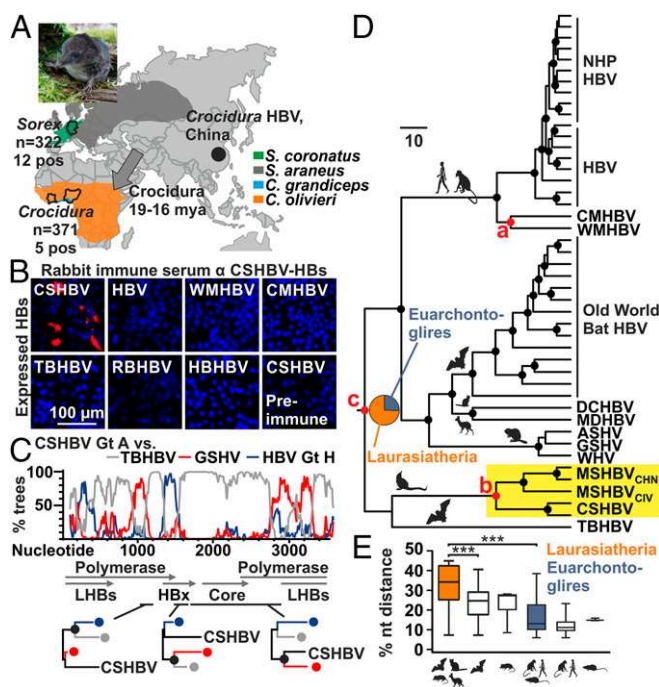


Fig. 1. Evolutionary and antigenic characteristics of shrew HBVs. (A) HBV-positive shrew species, sample. Gray arrows, Soricidae dispersion routes (16). *Sorex* picture, Ulrike Rosenfeld. (B) Antigenic divergence of CSHBV. (C) Bootscan analysis with maximum likelihood (ML) phylogenies of highlighted genomic regions. Filled circles in A, B, and D, bootstrap support >90% (black) and >80% (gray). (D) Bayesian ancestral state reconstruction and hypothesis testing (42). Pie charts, posterior probabilities for ancestral traits. Filled circles at nodes, posterior probability >0.95. Red nodes, priors used for hypothesis testing (Scale bars, genetic distance). (E) Pairwise HBV nucleotide sequence distance comparisons per host order. Boxplots, interquartile range and median; whiskers, minimum to maximum. Gt, genotype; AA, amino acid; WMHBV, woolly monkey HBV; RBHBV, roundleaf bat HBV; HBHBV, horseshoe bat HBV; LHBs, large HBV surface protein; HBx, HBV X protein; NHP, nonhuman primates; DCHBV, domestic cat HBV; MDHBV, Maxwell's duiker HBV; ASHV, arctic squirrel hepatitis virus; GSHV, ground squirrel hepatitis virus.

ancient evolutionary relationships for both host orders with HBVs. In the surface ORF, shrew HBVs clustered in basal relationship to all other orthohepadnaviruses at high statistical support (*SI Appendix, Fig. S1D*). To assess whether the evolutionary divergence was consistent with antigenic divergence, we expressed subviral shrew hepatitis B surface (HBs) particles in yeast and generated CSHBV-specific rabbit antisera (*SI Appendix, Fig. S1E*). Serological analyses confirmed complete lack of reactivity of CSHBV antisera with other orthohepadnavirus HBs (Fig. 1*B*). This was consistent with only 33% sequence conservation within the HBs antigenic loop, a major immunogenic region of HBV (*SI Appendix, Fig. S1F*). These data together suggested ancient evolutionary origins of shrew HBVs.

Recombination Events Shaped the Genealogy of Shrew HBVs. Shrew HBVs were about equidistant from other orthohepadnaviruses along the complete genome (*SI Appendix, Table S3*), whereas relatively higher similarity with the TBHBV was observed in a genome region encoding the N-terminal part of the polymerase ORF (cyan line, *SI Appendix, Fig. S1G*). The sequence distance comparisons and the divergent topology of shrew HBVs in phylogenetic reconstructions of individual ORFs (*SI Appendix, Fig. S1D*) jointly suggested recombination events during the genealogy of shrew HBVs, similar to other orthohepadnaviruses (21, 22). Formal bioinformatic analyses strongly supported ancient recombination events between shrew HBVs and bat-, rodent- and primate-associated HBV ancestors (Fig. 1*C*) and within shrew viruses (*SI Appendix, Fig. S1H*).

Shrew HBVs Support Ancient Orthohepadnavirus Origins. Next, we used the shrew HBVs to reconstruct the *Orthohepadnavirus* evolution. Bats are major reservoirs of mammalian viruses, likely including HBVs (6, 23). To investigate the origins of orthohepadnaviruses in light of the shrew HBVs, we compared different evolutionary hypotheses in a Bayesian framework. Under the assumption of a long-term association of shrew HBVs and their hosts resembling that of New World primate HBVs and their host (24), we calibrated the most recent common ancestors (MRCA) of the monkey-associated HBV species (24) (Fig. 1*D*, node a) and the MRCA of shrew-associated HBV species (node b) by the MRCAs of their hosts. We then compared whether calibration of the overall *Orthohepadnavirus* MRCA (node c) by a prior describing the rise of the order Chiroptera about 66 mya or by a prior describing the rise of the clade Laurasiatheria about 81 mya was most compatible with the data. Calibration of the root with a laurasiatherian prior yielded strong statistical support over a calibration with a chiropteran prior, expanding the *Orthohepadnavirus* origins beyond bats (Bayes factor [BF], 2.63; ref. 25). Control runs excluding the shrew-associated calibration also favored a laurasiatherian MRCA, but yielded lower statistical support (BF, 1.75), highlighting the importance of including shrew HBVs in reconstructions of the *Orthohepadnavirus* origins. Of note, the MRCA of MSHBV_{CIV} and MSHBV_{CHN} was projected to 18.4 mya (95% highest posterior density, 13.3–24.1), which was consistent with the time of dispersal of the genus *Crocodylus* to the African continent (Fig. 1*A*), suggesting robustness of our calibrations. Next, we conducted ancestral state reconstructions (ASR) in a Bayesian framework to confirm the relevance of laurasiatherian hosts for HBV evolution. ASRs yielded substantial evidence for a laurasiatherian host over a rodent or primate host (those HBV hosts belonging to the Euarchontoglires) at the *Orthohepadnavirus* root (BF, 2.91) (Fig. 1*D*). Finally, recombination events within the dataset may influence our phylogenetic reconstructions. Therefore, we generated 3 different subgenomic datasets without reliably supported evidence for recombination (*SI Appendix, Fig. S1I*) and repeated all evolutionary reconstructions. A laurasiatherian host at the root of orthohepadnaviruses was confirmed independently in all 3 nonrecombinant datasets at similar or stronger statistical support (*SI Appendix, Fig. S1J*). This interpretation was consistent with

significantly higher HBV genetic diversity in laurasiatherian hosts compared with hosts representing Euarchontoglires and Chiroptera (Fig. 1*E*). In sum, our analyses suggest an ancient laurasiatherian origin of orthohepadnaviruses.

Laurasiatherian Hosts Share Selection Pressure Signatures. In human HBV, hepatotropism and host range are determined by specific binding of preS1 surface domains to the cellular receptor sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP in humans, Ntcp in animals) (26). Recent data suggest that Ntcp homologs from rodents and primates, but not those from bats, evolved under positive selection at HBV binding sites (27). This might hint at differences in receptor usage among HBVs infecting Euarchontoglires and Laurasiatheria. Only 3 eulipotyphlan Ntcp sequences were available in public databases, including the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*), the star-nosed mole (*Condylura cristata*), and the common shrew (*S. araneus*). Therefore, we characterized 3 additional eulipotyphlan Ntcp sequences (24) from the European mole (*Talpa europaea*), the crowned shrew (*S. coronatus*), and the African giant shrew (*C. olivieri*) (GenBank accession nos. MN170823–MN170825). Only 1 of 9 sites under positive selection was predicted within the canonical HBV binding site in the eulipotyphlan Ntcp (K/L157; red arrows, Fig. 2*A* and *SI Appendix, Table S4*), suggesting similarities between the interactions of HBVs hosted by bats and shrews and their Ntcp orthologs. Notably, the prevalence of both shrew and bat HBV is low, and whether other factors than HBV infection may shape Ntcp evolution remains to be determined. Until now, NTCP usage is known only for primate HBVs and the zoonotic TBHBV (17, 24, 28). Because shrew HBVs strongly differed from primate HBVs in the NTCP-binding preS1 domains (*SI Appendix, Fig. S2A*), the potential interaction of shrew HBV surface proteins with Ntcp orthologs required experimental assessments.

Shrew HBV Surface Peptides Do Not Interact with NTCP Orthologs. In a first step, the functionality of the *Sorex* Ntcp was proven by

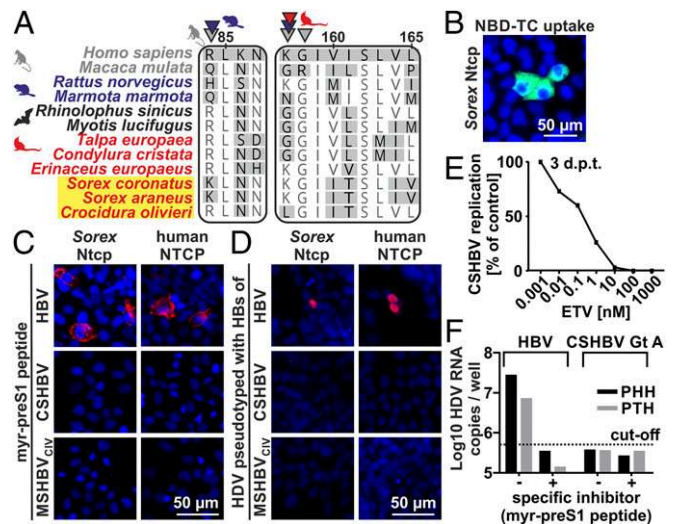


Fig. 2. NTCP usage and zoonotic potential of shrew HBVs. (A) NTCP/Ntcp-preS1 binding sites. Arrows, sites under positive selection for primates (gray), rodents (blue) (27), and Eulipotyphla (red). Yellow background, shrew HBV hosts. (B) Taurocholate (NBD-TC) uptake (green) by *Sorex* Ntcp. Blue, nuclei. (C) Myristoylated preS1 peptide binding (red) to human or *Sorex* NTCP/Ntcp. (D) Infection of HDV pseudotypes via human or *Sorex* NTCP/Ntcp. Red, newly produced Delta antigen. Blue, nuclei. (E) Inhibition of CSHBV Gt A replication. ETV, Entecavir. (F) Infection of primary human/tupaia hepatocytes by HDV pseudotypes. d.p.t, days posttransfection; GE, genome equivalents; Gt, genotype.

taurocholate transport assay after transfection into human hepatoma cells (Fig. 2B). Myristoylated (myr) peptides comprising the 48 N-terminal preS1 residues (SI Appendix, Fig. S2A) are sufficient for highly specific NTCP binding and interfering with HBV infection (29). While the human HBV myr-preS1 peptide could bind efficiently to the human NTCP and, to a lesser extent, to the *Sorex* Ntcp (Fig. 2C), the homologous peptides of CSHBV and MSHBV_{CIV} were unable to bind to either the human NTCP or the shrew Ntcp. Next, we successfully pseudotyped human hepatitis delta virus (HDV) with the surface proteins of HBV, MSHBV_{CIV}, and CSHBV (SI Appendix, Fig. S2B). Infection experiments with pseudotyped HDV (psHDV) were performed to rule out that other domains of the surface proteins of shrew HBVs are important for *Sorex* Ntcp interaction and infection. These experiments confirmed that in contrast to primate HBV, shrew HBV does not use the Ntcp as a primary portal for infection. In contrast, human HBV constructs were able to enter and infect cells both via the human NTCP and via the *Sorex* Ntcp (Fig. 2D). These results were consistent with the sequence analysis of NTCP orthologs, as the *Sorex* Ntcp has a conserved glycine at position 158 (Fig. 2A), which is essential for preS1 binding of HBV (28). The *Sorex* Ntcp thus seems to be sufficient for HBV infection in the background of human hepatoma cells.

Zoonotic Potential of Shrew HBVs. The bat-borne TBHBV can infect human hepatocytes (17). The genetic relationship of shrew HBVs with TBHBV in some genomic domains prompted us to investigate the zoonotic potential of shrew HBVs. First, we resurrected overlength CSHBV resembling the HBV pregenomic mRNA. The CSHBV was replication-competent in human hepatoma cells and could be blocked by the reverse transcriptase inhibitor Entecavir (Fig. 2E). Reverse transcription of the HBV genome only takes place in a complex formed by the viral polymerase and the pregenomic mRNA encapsidated by the core protein. Therefore, proof of reverse transcription is also proof of successful pregenomic CSHBV mRNA transcription and of the translation of functional polymerase and core gene products. Next, we used pseudotyped viruses to infect primary hepatocytes from humans (PHH) and *Tupaia belangeri* (PTH), which are susceptible to human HBV. Notably, tupaia, commonly termed tree shrews, are not closely related to shrews (4). Unlike the TBHBV and HDV_{HBV}, HDV_{CSHBV} was unable to infect PHH and PTH (Fig. 2F). Because entry is a major species barrier preventing HBV host switches, these data speak against a zoonotic potential of shrew HBVs despite the ability of CSHBV to replicate within human-derived cells.

Unusual Genomic Signature of the Shrew HBV PreCore. In HBV, the nonstructural hepatitis B e antigen (HBeAg) comprises an N-terminal portion translated from a 5'-extension of the core ORF termed preC (preC) and a core ORF-derived C terminus that is posttranslationally cleaved. The existence of the preC-encoding region is conserved among distantly related hepadnaviruses, such as the duck HBV (DHBV) (Fig. 3A). Strikingly, both CSHBV and MSHBV_{CHN} lack a methionine to initiate preC translation. However, alternative start codons hypothetically allowing translation initiation by leaky ribosomal scanning occurred (Fig. 3B, gray). The MSHBV_{CIV} may contain a methionine, but the resulting preC would be unusually long (Fig. 3B, green). We confirmed lack of a canonical preC start codon in all 6 additional CSHBV-positive animals for which full genomes had not been generated (GenBank accession nos. MK345468, MK345469, MK345471–MK345473, and MK345476), irrespective of host genus, sampling year, and site. Primary HBeAg negativity is mainly known from HBV genotype G, due to a conserved nonsense G to A mutation at genome position 1896 that creates a stop codon within the preC and an additional nonsense mutation creating a stop codon immediately after the preC start codon. The same nonsense mutations can occur at late stages of CHB caused by diverse HBV genotypes. Interestingly, all 17 shrew HBVs characterized in this study and the MSHBV_{CHN}

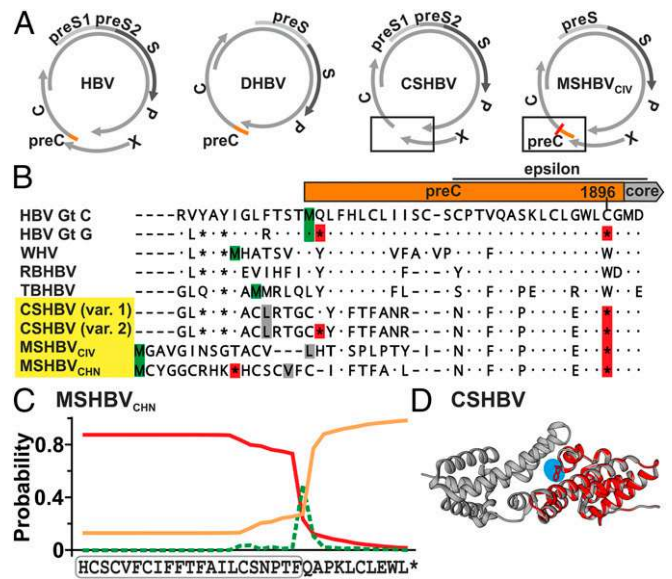


Fig. 3. Shrew HBV HBeAg. (A) Genome structures. (B) Translated preC and N-terminal core domains. Red, stop codons; green, methionine; gray, alternative start codons. Var. 1/2, HTS minority variants (25–30% occurrence). (C) Signal peptide prediction (red line) of MSHBV_{CHN}. Green, cleavage site; orange line, no signal peptide; boxed, predicted signal sequence. (D) CSHBV HBeAg monomer (cyan, reverted G1896A) modeled on the HBV HBeAg dimer (43). Gt, genotype; RBHBV, roundleaf bat HBV.

showed the G1896A nonsense mutation. One CSHBV genotype also showed the nonsense mutation following the preC start codon (SI Appendix, Fig. S3A). Additional similarities between human and shrew HBV HBeAg-encoding regions included the prediction of a signal sequence in the preC region of MSHBV_{CHN} (Fig. 3C and SI Appendix, Fig. S3B) and the conservation of a C-terminal arginine-rich region, both of which are characteristic for posttranslational cleavage of the premature HBeAg (SI Appendix, Fig. S3C), and the conservation of the RNA encapsidation signal epsilon located at the 3' end of the preC domain (SI Appendix, Fig. S3D). In addition, despite low amino acid identity of 54.1–55.3% between predicted HBeAg sequences of shrew and human HBVs, their 3D structures were closely related (Fig. 3D and SI Appendix, Fig. S3E). Finally, ASR supported the existence of a conserved preC-encoding region at the *Orthohepadnavirus* MRCA (BF, 2.67), jointly suggesting loss of HBeAg coding capacity during the genealogy of extant shrew HBVs (SI Appendix, Fig. S3F).

HBeAg-Negative Shrew HBVs Cause Monoinfections. In human HBV, genotype G infections usually occur as coinfections with another HBV genotype providing HBeAg in trans (30). To exclude that unrecognized coinfection with a putative HBeAg-positive shrew HBV variant occurred, high-throughput sequencing (HTS) was conducted on a broadly reactive and highly sensitive nested PCR amplicon (17). HTS of 10 CSHBV-positive and 5 MSHBV_{CIV}-positive samples did not detect any additional divergent shrew HBV sequence in any sample.

Low Within-Host Genomic Variability of Shrew HBVs. In CHB, HBeAg loss is associated with increased HBV genomic variability within infected individuals. To analyze within-host genomic variability in shrew HBV, single-nucleotide polymorphisms (SNP) in surface/polymerase and X/preC/core genomic domains were analyzed in liver tissue by HTS. The overall genomic variability was low with a mean of 0.5 SNPs (occurring in >2% of reads) per 100 nucleotides. For comparison, the HBeAg-positive capuchin monkey HBV (CMHBV) showed significantly more SNPs in serum (1.8 SNPs per

100 nucleotides; χ^2 , $P < 0.0001$) (24). This difference is noteworthy because liver contains the covalently closed circular DNA reservoir showing relatively higher virus diversity than the relaxed circular DNA found in circulating virions (31). Of note, significant differences in SNP occurrence rates were observed neither between coding nor noncoding shrew HBV genomic regions, nor between single or overlapping ORFs, nor between the different shrew genera (*SI Appendix, Table S5*). Importantly, there was no detectable minority variant reverting the lack of methionine codons in both CSHBV genotypes and the presence of preC stop codons in both CSHBV and MSHBV_{CTV}. Low within-host variability of HBeAg-negative shrew HBV thus surprisingly resembled the immunotolerant phase of HBeAg-positive CHB in humans (32).

Shrew HBVs Cause Intense Hepatotropic Infections. In humans, infections with HBeAg-negative HBV are associated with severe hepatitis (30). Infections with primarily HBeAg-negative HBV strains are associated with high viral loads, whereas HBeAg loss during CHB is commonly associated with low viral loads. To assess shrew HBV tropism and infection intensities, we used a strain-specific qPCR assay to quantify CSHBV concentrations in different tissues of 12 individual shrews. CSHBV concentrations were generally high. The highest mean concentrations occurred in the liver at 10×10^9 CSHBV copies per gram, significantly exceeding those in other solid organs (t test, $P = 0.043$), whose similar virus concentrations likely originate from high viremia (Fig. 4A). In situ hybridization with an RNA probe directed against CSHBV nucleic acid confirmed infection of hepatocytes by shrew HBVs (red; Fig. 4B).

Low Shrew HBV Seroprevalence. Next, we conducted serological analyses relying on resurrected full-length CSHBV and MSHBV to optimize test sensitivity and specificity (24). Using an immunofluorescence assay adapted for shrews, we tested 86 sera from *Sorex* and 57 sera from *Crocidura*. Strikingly, antibodies were only detected in 1 German and 1 African shrew (Germany, 1.2%, 95% CI 0.0–6.9; Sierra Leone, 1.8%, 95% CI 0.0–10.2, Fig. 4C). Both antibody-positive animals were also PCR-positive. All other 11 PCR-positive shrews were seronegative, suggesting either sampling before seroconversion or chronic infections without detectable anti-HBc, similar to the monkey-associated CMHBV, but different from bat HBVs (17, 18, 24). Hypothetically, shrew hepatitis B may lead to death of the infected animals, thereby explaining the low seroprevalence. However, the sample amenable for serological investigation was small and it was not possible to conduct histopathological analyses due to advanced stages of decay after trapping.

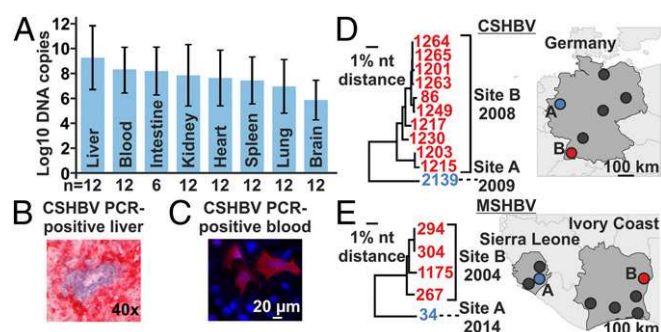


Fig. 4. Shrew HBV infection patterns. (A) Mean CSHBV concentrations in solid organs (grams) and blood (milliliters), SDs. (B) In situ hybridization of CSHBV. (C) Shrew serum reacting with CSHBV proteins. Red, antibody binding; blue, nuclei. (D and E) Major sampling sites in Germany, Sierra Leone, and Ivory Coast; neighbor-joining phylogenies. Trees encompass 773 (CSHBV) and 1,432 (MSHBV) nucleotides. One CSHBV strain for which only a smaller fragment was characterized is not shown.

Geographical Clustering of Shrew HBVs. In Germany, 6 areas were sampled over 8 y. All 11 animals infected with CSHBV genotype B originated from one site only and were sampled in the same year (site B; Fig. 4D). The detection rate in animals from that site was significantly higher compared with all other German sampling sites (Fisher exact, $P < 0.0001$). Similarly, all 4 *Crocidura* infected with MSHBV_{CTV} from Ivory Coast originated from one site only, sampled in the same year (site B; Fig. 4E). Again, the detection rate from this site was significantly higher compared with all other Ivorian sites (Fisher exact, $P < 0.0001$). Likewise, all 4 MSHBV_{CHN} Gt A-positive samples originated from the same site (11). Notably, the Ivorian MSHBV strains sampled in 2004 differed by up to 1.9% of their complete genomes and the German CSHBV strains sampled in site B in 2008 differed by up to 4.1% of their partial genomes (Fig. 4D and E). High between-host genomic diversity is not necessarily at odds with focal transmission chains suggested by low molecular and serological detection rates, because a genomic diversity of up to 4.6% was observed in HBeAg-negative HBV strains during outbreaks in humans (33). Finally, information on sex was available for 320 shrews from Germany. No significant differences of shrew HBV detection rates were observed between male (4 of 161) and female (8 of 159) shrews (Fisher exact, $P = 0.26$), speaking against a sex bias potentially associated with shrew HBV transmission. In sum, regionally increased incidence and low seroprevalence jointly suggest focal transmission of shrew HBV and may hint at intense infections of HBeAg-negative shrew HBV.

Discussion

We identified previously undescribed shrew HBVs, revealed their distinct infection patterns, and reconstructed the genealogy of mammalian hepadnaviruses.

Hepadnaviruses as a family are phylogenetically much older than previously thought (1, 3), yet the origins of mammalian hepadnaviruses remain enigmatic. Our study projects the rise of mammalian hepadnaviruses toward the origins of the Laurasiatheria, 1 of the 2 large clades of placental mammals. Notably, many laurasiatherian species are insectivorous. Hypothetically, ancient insect-associated hepadnaviruses (34) may have been acquired by small insectivorous mammals like bats and shrews and further diversified within the mammalian lineage by complex macroevolutionary patterns likely including both long-term host–virus associations and host switches (1).

Ancient origins of shrew and bat HBVs are consistent with the evidence for recombination events between shrew HBVs and the TBHBV, a New World bat HBV. The ancestors of the Noctilionoidea, the bat superfamily to which the TBHBV host *Uroderma bilobatum* belongs, likely immigrated about 52 mya from the Old World into the New World (35), while shrews immigrated into the New World much later, about 13 mya (16). Targeted investigations of Old World bats for TBHBV-related hepadnaviruses and of New World shrews for CSHBV/MSHBV-related hepadnaviruses may allow reconstructions of host and hepadnavirus dispersal history at an unprecedented depth in time.

Given the ancient hepadnavirus origins, it may not be surprising that some hallmarks of human HBV are not evolutionarily conserved (1). Within the HBV species infecting primates, Ntcp usage seems to be conserved (24, 26). In contrast, our experimental and evolutionary data strongly support differences of receptor usage among distantly related mammalian hepadnaviruses. A different set of receptors or coreceptors for shrew HBV and potentially other HBV species may thus exist.

Another hallmark of human HBV is the HBeAg, which is essential for the development of CHB. HBeAg functions as an immunomodulatory tolerogen, which down-regulates the immune response to HBcAg and, thereby, promotes chronicity (30). Additionally, antigen-presenting cells are conditioned in utero by the HBeAg to suppress the cytotoxic T lymphocyte response in vertically infected offspring by up-regulation of the

inhibitory ligand PD-L1 (36). In humans, HBeAg negativity represents the wild type in HBV genotype G only, whereas HBeAg negativity can develop during the late phase of CHB in many genotypes. Our discovery of diverse HBV species completely lacking HBeAg in wild shrews is therefore surprising. In contrast, some characteristics of HBeAg-negative HBVs seem to be conserved between humans and shrews, including (i) the position and type of nonsense mutations precluding HBeAg production (30), (ii) intense infections with high virus concentrations such as in patients acutely infected with primary HBeAg-negative HBV strains or occasionally during reactivation in CHB (33), and (iii) potentially high virulence.

At first glance, it seems odd that shrew HBVs may persist on the population level without relying on a viral protein supporting chronically infected offspring as continuous sources of secondary infections. However, differences in viral infection patterns between humans and animal reservoirs are well documented, including persistent infection of rodents with arenaviruses and hantaviruses, and long-term population-level shedding of bat morbillivirus-related pathogens compared with predominantly acute human infections (37, 38). In shrews, territorial behavior leading to blood contact during fights may contribute to efficient horizontal transmission and population-level maintenance of HBeAg-negative HBVs (12). Hypothetically, the long-term evolutionary association between shrews and HBeAg-negative HBVs suggested by our data may have allowed for relatively decreased virulence despite an HBeAg-negative phenotype, reminiscent of the decreased virulence of rabbit myxoma virus over time (39), thereby supporting shrew HBV population-level survival.

Finally, lack of an effective therapy for CHB demands a suitable animal model. Experimental HBV infection of chimpanzees is restricted due to ethical concerns. HBV infection efficacy in tupaia is low, and autochthonous tupaia hepadnaviruses are unknown. Woodchuck hepatitis virus (WHV) models are generally suitable to study CHB (1), but keeping woodchucks is costly and naturally occurring HBeAg-negative WHV variants are unknown (40). Shrews are small and tractable animals that can be housed and experimentally infected, e.g., with bornaviruses (41). Our data suggest that a shrew HBV model to investigate HBeAg-mediated chronicity and HBV species barriers relying on shrew and human HBV mutants and revertants may be attainable.

Materials and Methods

National authorities approved sampling. Hepadnavirus screening, genomic characterization, evolutionary analysis, generation of pseudotypes and infectious clones, receptor characterizations, high-throughput sequencing, and *in situ* hybridization were done as described previously (17, 24) and detailed in *SI Appendix*.

ACKNOWLEDGMENTS. This study was supported by funding from German Research Foundation Grants B08/5FB 1021/2, BO 3790/1-1, DR 810/1-1, FI 1781/1-1, GL 595/4-1; European INCO-DEV program Grant ICA4-CT2002-10050; European Foundation Initiative for African Research into Neglected Tropical Diseases Grant 1/85/022; and German Federal Ministry of Education and Research through the German Research Platform for Zoonoses Grants 01KI1018 and 01KI1303. The National Reference Center for Hepatitis B and D Viruses is supported by the German Ministry of Health via the Robert Koch Institute. We thank M. Eschbach-Bludau, S. Brünink, T. Bleicker, J. Schneider, S. Broehl, B. Allali, S. Kouassi Kan, R. Ansumana, D. Sondufu, J. Buanie, J. Lamin, M. Dawson, A. Oyeyiola, A. Obadare, J. Igboke, and numerous persons of the network "Rodent-borne pathogens" for technical assistance.

1. A. Rasche, A. L. Sander, V. M. Corman, J. F. Drexler, Evolutionary biology of human hepatitis viruses. *J. Hepatol.* **70**, 501–520 (2019).
2. C. Lauber *et al.*, Deciphering the origin and evolution of hepatitis B viruses by means of a family of non-enveloped fish viruses. *Cell Host Microbe* **22**, 387–399.e6 (2017).
3. A. Suh *et al.*, Early mesozoic coexistence of amniotes and hepadnaviridae. *PLoS Genet.* **10**, e1004559 (2014).
4. N. M. Foley, M. S. Springer, E. C. Teeling, Mammal madness: Is the mammal tree of life not yet resolved? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **371**, 20150140 (2016).
5. J. F. Gogarten *et al.*, A novel orthohepadnavirus identified in a dead Maxwell's Duiker (*Philantomba maxwellii*) in Tai National Park, Côte d'Ivoire. *Viruses* **11**, E279 (2019).
6. A. Rasche, B. F. C. D. Souza, J. F. Drexler, Bat hepadnaviruses and the origins of primate hepatitis B viruses. *Curr. Opin. Virol.* **16**, 86–94 (2016).
7. J. F. Drexler *et al.*, Hepatovirus Ecology Consortium, Evolutionary origins of hepatitis A virus in small mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 15190–15195 (2015).
8. V. M. Corman *et al.*, Characterization of a novel betacoronavirus related to middle East respiratory syndrome coronavirus in European hedgehogs. *J. Virol.* **88**, 717–724 (2014).
9. M. Hilbe *et al.*, Shrews as reservoir hosts of borna disease virus. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 675–677 (2006).
10. W. P. Guo *et al.*, Phylogeny and origins of hantaviruses harbored by bats, insectivores, and rodents. *PLoS Pathog.* **9**, e1003159 (2013).
11. F. Y. Nie *et al.*, Discovery of a highly divergent hepadnavirus in shrews from China. *Virology* **531**, 162–170 (2019).
12. F. S. Szalay, Walker's mammals of the World. Ronald M. Nowak. *Q. Rev. Biol.* **75**, 71–72 (2000).
13. D. Ochocińska, J. R. Taylor, Living at the physiological limits: Field and maximum metabolic rates of the common shrew (*Sorex araneus*). *Physiol. Biochem. Zool.* **78**, 808–818 (2005).
14. J. L. Geoghegan, S. Duchêne, E. C. Holmes, Comparative analysis estimates the relative frequencies of co-divergence and cross-species transmission within viral families. *PLoS Pathog.* **13**, e1006215 (2017).
15. J. L. Geoghegan, A. M. Senior, F. Di Giallonardo, E. C. Holmes, Virological factors that increase the transmissibility of emerging human viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 4170–4175 (2016).
16. S. Dubey, N. Salamin, S. D. Ohdachi, P. Barrière, P. Vogel, Molecular phylogenetics of shrews (Mammalia: Soricidae) reveal timing of transcontinental colonizations. *Mol. Phylogenet. Evol.* **44**, 126–137 (2007).
17. J. F. Drexler *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.* **110**, 16151–16156 (2013).
18. T. Hiller *et al.*, Host biology and anthropogenic factors affect hepadnavirus infection in a neotropical bat. *EcoHealth* **16**, 82–94 (2019).
19. S. Schaefer, Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J. Gastroenterol.* **13**, 14–21 (2007).
20. S. E. Starkman, D. M. MacDonald, J. C. Lewis, E. C. Holmes, P. Simmonds, Geographic and species association of hepatitis B virus genotypes in non-human primates. *Virology* **314**, 381–393 (2003).
21. S. Locarnini, M. Littlejohn, M. N. Aziz, L. Yuen, Possible origins and evolution of the hepatitis B virus (HBV). *Semin. Cancer Biol.* **23**, 561–575 (2013).
22. B. Mühlemann *et al.*, Ancient hepatitis B viruses from the bronze age to the medieval period. *Nature* **557**, 418–423 (2018).
23. K. J. Olival *et al.*, Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. *Nature* **546**, 646–650 (2017).
24. B. F. de Carvalho Dominguez Souza *et al.*, A novel hepatitis B virus species discovered in capuchin monkeys sheds new light on the evolution of primate hepadnaviruses. *J. Hepatol.* **68**, 1114–1122 (2018).
25. H. Jeffreys, *The Theory of Probability* (Clarendon Press, Oxford, 1961).
26. H. Yan *et al.*, Sodium taurocholate co-transporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife* **1**, e00049 (2012).
27. S. Jacquet *et al.*, Evolution of hepatitis B virus receptor NTCP reveals differential pathogenicities and species specificities of hepadnaviruses in primates, rodents, and bats. *J. Virol.* **93**, e01738-18 (2019).
28. S. F. Müller, A. König, B. Döring, D. Glebe, J. Geyer, Characterisation of the hepatitis B virus cross-species transmission pattern via Na⁺/taurocholate co-transporting polypeptides from 11 New World and Old World primate species. *PLoS One* **13**, e0199200 (2018).
29. D. Glebe *et al.*, Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes. *Gastroenterology* **129**, 234–245 (2005).
30. A. Kramvis, E. G. Kostaki, A. Hatzakis, D. Paraskevis, Immunomodulatory function of HBeAg related to short-sighted evolution, transmissibility, and clinical manifestation of hepatitis B virus. *Front. Microbiol.* **9**, 2521 (2018).
31. M. Rybicka *et al.*, Differences in sequences between HBV-relaxed circular DNA and covalently closed circular DNA. *Emerg. Microbes Infect.* **6**, e55 (2017).
32. H. Y. Wang *et al.*, Distinct hepatitis B virus dynamics in the immunotolerant and early immunoclearance phases. *J. Virol.* **84**, 3454–3463 (2010).
33. P. L. Seiz *et al.*, Studies of nosocomial outbreaks of hepatitis B in nursing homes in Germany suggest a major role of hepatitis B e antigen expression in disease severity and progression. *Int. J. Med. Microbiol.* **305**, 663–672 (2015).
34. Z. Gong, G. Z. Han, Insect retroelements provide novel insights into the origin of hepatitis B viruses. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 2254–2259 (2018).
35. B. K. Lim, Review of the origins and biogeography of bats in South America. *Chiropt. Neotrop.* **15**, 391–410 (2009).
36. Y. Tian, C. F. Kuo, O. Akbari, J. H. Ou, Maternal-derived hepatitis B virus e antigen alters macrophage function in offspring to drive viral persistence after vertical transmission. *Immunity* **44**, 1204–1214 (2016).
37. R. N. Charrel *et al.*, Arenaviruses and hantaviruses: From epidemiology and genomics to antivirals. *Antiviral Res.* **90**, 102–114 (2011).
38. J. F. Drexler *et al.*, Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nat. Commun.* **3**, 796 (2012). Erratum in: *Nat. Commun.* **5**, 3032 (2014).
39. P. J. Kerr *et al.*, Next step in the ongoing arms race between myxoma virus and wild rabbits in Australia is a novel disease phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, 9397–9402 (2017).
40. H. S. Chen *et al.*, The precore gene of the woodchuck hepatitis virus genome is not essential for viral replication in the natural host. *J. Virol.* **66**, 5682–5684 (1992).
41. D. Nobach *et al.*, Shedding of infectious borna disease virus-1 in living bicolor white-toothed shrews. *PLoS One* **10**, e0137018 (2015).
42. A. J. Drummond, M. A. Suchard, D. Xie, A. Rambaut, Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* **29**, 1969–1973 (2012).
43. E. Eren *et al.*, Structures of hepatitis B virus core- and e-antigen immune complexes suggest multi-point inhibition. *Structure* **26**, 1314–1326.e4 (2018).



OPEN

Selective hepatitis B and D virus entry inhibitors from the group of pentacyclic lupane-type betulin-derived triterpenoids

Michael Kirstgen¹, Kira Alessandra Alicia Theresa Lowjaga¹, Simon Franz Müller¹, Nora Goldmann², Felix Lehmann², Sami Alakurtti^{3,4}, Jari Yli-Kauhaluoma³, Dieter Glebe² & Joachim Geyer¹✉

Current treatment options against hepatitis B and D virus (HBV/HDV) infections have only limited curative effects. Identification of Na⁺/taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) as the high-affinity hepatic receptor for both viruses in 2012 enables target-based development of HBV/HDV cell-entry inhibitors. Many studies already identified appropriate NTCP inhibitors. However, most of them interfere with NTCP's physiological function as a hepatic bile acid transporter. To overcome this drawback, the present study aimed to find compounds that specifically block HBV/HDV binding to NTCP without affecting its transporter function. A novel assay was conceptualized to screen for both in parallel; virus binding to NTCP (measured via binding of a preS1-derived peptide of the large HBV/HDV envelope protein) and bile acid transport via NTCP. Hits were subsequently validated by in vitro HDV infection studies using NTCP-HepG2 cells. Derivatives of the birch-derived pentacyclic lupane-type triterpenoid betulin revealed clear NTCP inhibitory potency and selectivity for the virus receptor function of NTCP. Best performing compounds in both aspects were 2, 6, 19, and 25. In conclusion, betulin derivatives show clear structure–activity relationships for potent and selective inhibition of the HBV/HDV virus receptor function of NTCP without tacking its physiological bile acid transport function and therefore are promising drug candidates.

Infections with the Hepatitis B (HBV) and D (HDV) viruses are the main cause of hepatocellular carcinoma (HCC) and liver cirrhosis as consequences of chronic hepatitis. Although vaccination is possible, more than 250 million people worldwide suffer from chronic hepatitis based on HBV/HDV infections, and 887,000 deaths can be traced back to this every year¹. The genome of the enveloped DNA virus HBV consists of 3.2 kb which encode for three envelope proteins, referred to as small (SHBs), middle (MHBs), and large (LHBs)². The 2–48 N-terminal amino acids of the myristoylated preS1 domain (myr-preS1₂₋₄₈ lipopeptide) of the LHBs are essential for virus binding to hepatocytes^{3,4}. As HDV is a satellite virus of HBV and bears identical envelope proteins, it also shares this myr-preS1₂₋₄₈ lipopeptide⁵. About 5% of all chronic HBV carriers are additionally infected with HDV¹. This co-infection causes more rapid disease progression, increased mortality rates, and increased incidence of HCC and liver cirrhosis⁶. To date, there are only few treatment options for HBV and HDV infections available. Chronic hepatitis can usually be controlled by antiviral therapy with nucleoside reverse transcriptase inhibitors and interferon. This is, however, rarely curative. Furthermore, interferon therapy is highly prone to adverse drug reactions and nucleoside reverse transcriptase inhibitors have to be given life-long^{7,8}.

A promising novel drug target to block HBV/HDV virus entry into hepatocytes is represented by the Na⁺/taurocholate co-transporting polypeptide NTCP (gene symbol *SLC10A1*), which has been identified as the bona fide hepatic receptor for HBV/HDV^{9,10}. It is generally accepted that HBV/HDV entry into hepatocytes essentially involves attachment of the virus particles to heparan sulfate proteoglycans¹¹, followed by high-affinity binding of

¹Biomedical Research Center Seltersberg (BFS), Institute of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Justus Liebig University Giessen, Schubertstr. 81, 35392 Giessen, Germany. ²National Reference Center for Hepatitis B Viruses and D Viruses, Institute of Medical Virology, Justus Liebig University Giessen, 35392 Giessen, Germany. ³Drug Research Program, Division of Pharmaceutical Chemistry and Technology, Faculty of Pharmacy, University of Helsinki, Viikinkaari 5 E, P.O. Box 56, 00014 Helsinki, Finland. ⁴VTT Technical Research Centre of Finland, Biologinkuja 7, P.O. Box 1000, 02044 Espoo, Finland. ✉email: Joachim.M.Geyer@vetmed.uni-giessen.de

the myr-preS1 domain of the large envelope protein to certain domains of NTCP that finally triggers subsequent steps such as endocytosis of the virus-receptor complex¹².

It is known for long that an artificial myr-preS1₂₋₄₈ lipopeptide itself can block in vitro HBV/HDV infection in a dose-dependent manner with inhibitory constants (IC₅₀) in the low nanomolar range⁴. Based on this, a synthetic analogue of the myr-preS1₂₋₄₈ lipopeptide, called bulevirtide (generic name, formerly known as Myrcludex B), was developed as a therapeutic agent against HBV and HDV infections. Several clinical studies have been successfully completed and very recently, bulevirtide was approved as a new drug to treat hepatitis D in Europe and Russia and will be marketed under the brand name Hepcludex¹³. Furthermore, it was demonstrated that viral DNA (HBV) and RNA (HDV) levels can be reduced significantly in chronically infected patients with a combination of bulevirtide and pegylated interferon alpha (PEG-IFNα)¹⁴. These data clearly indicate that NTCP is an appropriate drug target to control hepatic HBV/HDV levels. In addition, an HBV/HDV entry inhibitor addressing NTCP might be beneficial to prevent new infections of hepatocytes during chronic infection with HBV/HDV¹².

Physiologically, NTCP is expressed dominantly at the basolateral membrane of hepatocytes and acts as a sodium-dependent uptake carrier of bile salts to enable their enterohepatic recirculation¹⁵⁻¹⁷. Thus, NTCP has a dual function as bile salt transporter and virus receptor. It is already known that both functions interfere with each other. The myr-preS1₂₋₄₈ lipopeptide can block the bile salt transport in primary human hepatocytes and NTCP-overexpressing HepG2 hepatoma cells in a concentration-dependent manner. Vice versa, bile salts can prevent myr-preS1₂₋₄₈ lipopeptide binding to NTCP as well as in vitro HBV infection^{10,18}. Based on this, it was expected that in clinical trials using bulevirtide as a therapeutic agent, the total plasma bile salt levels would increase significantly. In a current study on healthy volunteers who received 10 mg bulevirtide, which is above the therapeutic dose, total plasma bile salt levels indeed increased 19.2-fold, and single bile salts even higher (e.g. 124-fold in the case of taurocholic acid, further referred to as TC)¹⁹. This data can be interpreted as dysregulation of the bile acid homeostasis under bulevirtide treatment.

On the basis of the therapeutically used effects of bulevirtide, a promising second strategy for the development of HBV/HDV entry inhibitors targeting NTCP would be to (I) investigate small molecules with oral bioavailability which (II) block virus binding to NTCP, but (III) without tackling its physiologically important bile salt transporter activity at relevant therapeutic drug concentrations. Currently, several studies identified novel chemical entry inhibitors for HBV and HDV by screening for bile salt transport inhibitors²⁰ or by screening for inhibitors of myr-preS1₂₋₄₈ lipopeptide attachment and/or in vitro HBV/HDV infection²¹ in appropriate cell culture models overexpressing NTCP. However, none of these studies addressed and fulfilled all of the criteria outlined above. In contrast, the present study aimed to find small molecular HBV/HDV entry inhibitors that specifically block myr-preS1₂₋₄₈ lipopeptide binding to NTCP without affecting its bile salt transport function. We analyzed a set of derivatives of the pentacyclic lupane-type triterpenoid betulin, and indeed found individual compounds that were quite potent and selective for myr-preS1₂₋₄₈ lipopeptide binding inhibition and significantly blocked in vitro HDV infection of NTCP-expressing HepG2 cells. These compounds now can be further optimized for increased potency and then can be forwarded for in vivo infection experiments.

Results

Screening assay for bile acid transport and myr-preS1₂₋₄₈ lipopeptide binding. The major goal of the present study was to analyze in parallel the effect of inhibitors on both, bile acid transport via NTCP and myr-preS1₂₋₄₈ lipopeptide binding to NTCP in a cell culture system. This was achieved by plating NTCP-HEK293 cells onto 96-well plates and by using tritium-labelled analytes, being [³H]taurocholic acid ([³H]TC) and [³H]myr-preS1₂₋₄₈ lipopeptide ([³H]preS1), which were analyzed in a microplate scintillation counter. For validation of this assay, transport of 1 μM [³H]TC first was inhibited by increasing concentrations of TC (concentrations ranging from 0.1 to 1,000 μM) itself and by myr-preS1₂₋₄₈ lipopeptide (concentrations ranging from 0.001 to 10 μM). In addition, binding of 5 nM [³H]preS1 was inhibited by myr-preS1₂₋₄₈ lipopeptide itself (concentrations ranging from 0.001 to 10 μM) and by TC (concentrations ranging from 0.1 to 1,000 μM). As shown in Fig. 1a, TC showed nearly equipotent inhibition of the [³H]TC transport with IC₅₀ of 30 μM and of the [³H]preS1 binding with IC₅₀ of 42 μM. The same was true for myr-preS1₂₋₄₈ lipopeptide as the inhibitor that revealed IC₅₀ of 0.35 μM for [³H]TC transport inhibition and IC₅₀ of 0.55 μM for [³H]preS1 binding inhibition (Fig. 1b). These data clearly confirm the previously shown interference of the transport and receptor function of NTCP^{10,18} and demonstrate the functionality of this screening assay. Furthermore, these data indicate that the myr-preS1₂₋₄₈ lipopeptide has an about 100-fold higher inhibitory potency (IC₅₀ = 0.35 μM / 0.55 μM) in both assays compared to the physiological transport substrate TC (IC₅₀ = 30 μM / 42 μM). Four reference compounds were analyzed (concentrations ranging from 0.1 to 1,000 μM) which had shown inhibition of the transporter and receptor function of NTCP before, namely ciglitazone²², troglitazone²², cyclosporine A²³⁻²⁵, and rapamycin²⁶. Interestingly, all compounds showed comparable inhibition of [³H]TC uptake and [³H]preS1 binding with IC₅₀ values of 1 μM and 1.3 μM for ciglitazone (Fig. 1c), 1.9 μM and 2.5 μM for troglitazone (Fig. 1d), 14 μM and 26 μM for cyclosporine A (Fig. 1e), as well as 34 μM and 21 μM for rapamycin (Fig. 1f), respectively. These compounds therefore can be classified as inhibitors, non-selective for one of the two measured functions of NTCP. Among them, ciglitazone and troglitazone had a tenfold higher inhibitory potency compared to cyclosporine A and rapamycin, demonstrating that diverse compounds differ in their potency as NTCP inhibitors. Cyclosporine A, rapamycin and TC showed comparable inhibitory pattern and potency in both assays, as shown by similar IC₅₀ values.

Screening of betulin derivatives for bile acid transport and [³H]preS1 binding inhibition. Next, 30 derivatives of betulin were tested in both assays and IC₅₀ values were determined for [³H]TC transport inhibition and [³H]preS1 binding inhibition. Chemical structures of all compounds are depicted in Table 1. All derive

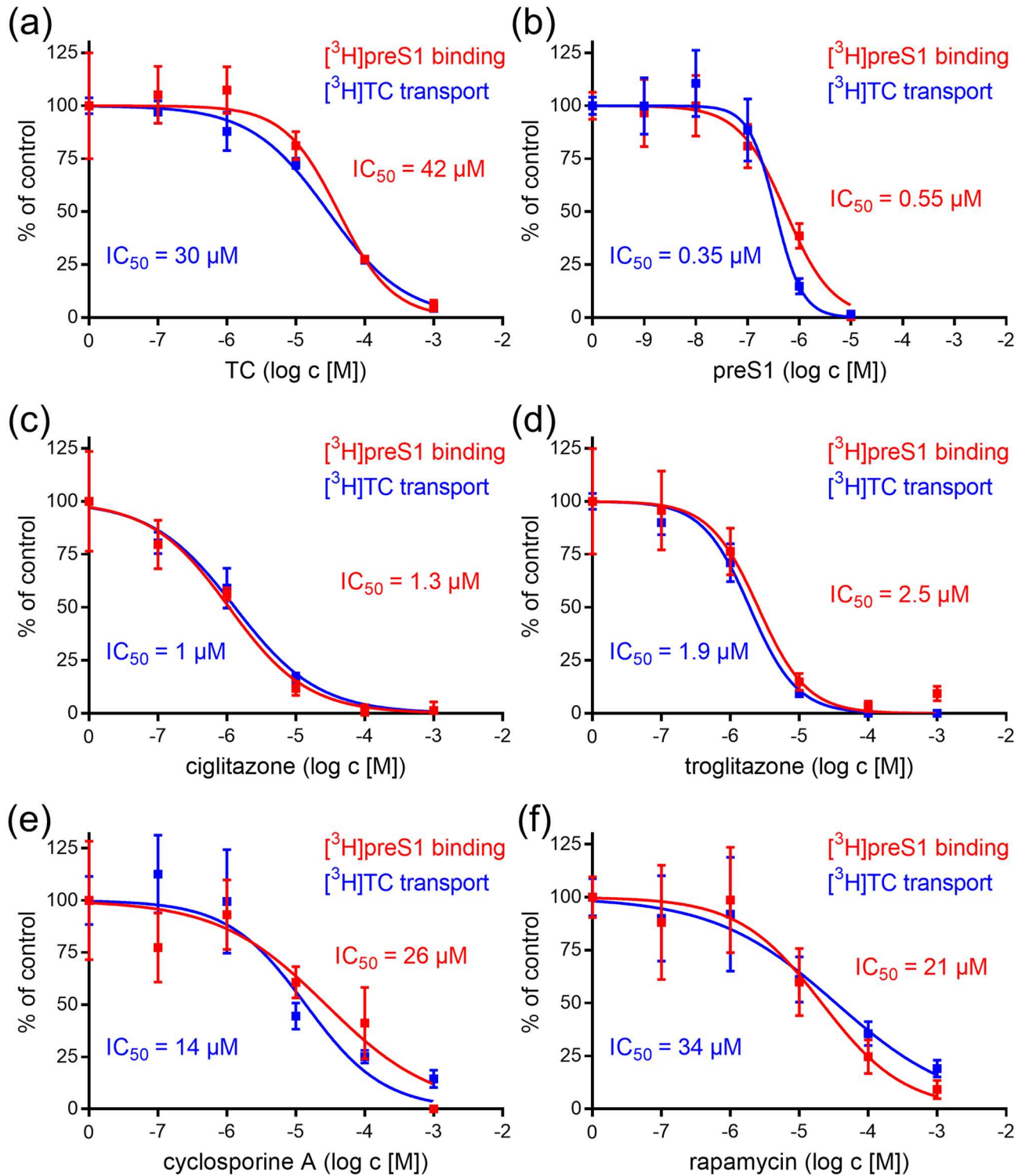
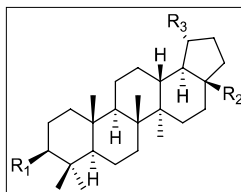

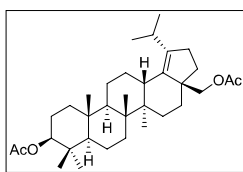


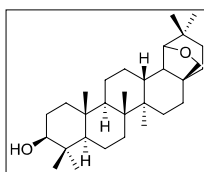
Figure 1. $[^3\text{H}]$ TC transport and $[^3\text{H}]$ preS1 binding screening assay. NTCP-HEK293 cells were seeded onto 96-well plates and were incubated with tetracycline in order to induce expression of the human NTCP protein. Cells without tetracycline treatment were used as 0% controls of $[^3\text{H}]$ TC uptake and $[^3\text{H}]$ preS1 binding, respectively. Cells were subjected to bile acid transport experiments with $1\ \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]$ TC and myr-preS1₂₋₄₈ lipopeptide binding experiments with $5\ \text{nM}$ $[^3\text{H}]$ preS1, each over 10 min at $37\ ^\circ\text{C}$. Experiments were performed with solvent alone (set to 100%) and with increasing concentrations of the indicated inhibitors. The mean of the 0% control was subtracted to calculate net $[^3\text{H}]$ TC transport rates (shown in blue) as well as net $[^3\text{H}]$ preS1 binding rates (shown in red), which are depicted in the diagrams (expressed as % of control at the y-axis). Half maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) were calculated by nonlinear regression analysis using the equation $\log(\text{inhibitor})$ versus response (GraphPad Prism). In order to validate the assay, (a) TC and (b) myr-preS1₂₋₄₈ lipopeptide were used as inhibitors. Furthermore, the already established NTCP inhibitors (c) ciglitazone, (d) troglitazone, (e) cyclosporine A, and (f) rapamycin were analyzed for $[^3\text{H}]$ TC transport inhibition and $[^3\text{H}]$ preS1 binding inhibition. Data represent means \pm SD of quadruplicate determinations of representative experiments.



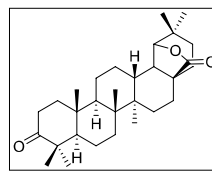
| No | Compound | R ₁ | R ₂ | R ₃ |
|----|---|--|--|---|
| 1 | Betulin | OH | CH ₂ OH | CH ₃ -C=CH ₂ |
| 2 | 20,29-Dihydrobetulin | OH | CH ₂ OH | CH ₃ -CH-CH ₃ |
| 3 | Lupeol | OH | Me | CH ₃ -C=CH ₂ |
| 4 | Betulinic acid | OH | CO ₂ H | CH ₃ -C=CH ₂ |
| 5 | Methyl betulinatate | OH | CO ₂ Me | CH ₃ -C=CH ₂ |
| 6 | Betulin aldehyde oxime | OH | CH=NOH | CH ₃ -C=CH ₂ |
| 7 | 28- <i>O</i> -(Bromoacetyl)betulin | OH | CH ₂ O ₂ CCH ₂ Br | CH ₃ -C=CH ₂ |
| 8 | 28- <i>O</i> -Succinoylbetulin | OH | CH ₂ O ₂ C(CH ₂) ₂ CO ₂ H | CH ₃ -C=CH ₂ |
| 9 | 3,28-Di- <i>O</i> -succinoylbetulin | O ₂ C(CH ₂) ₂ CO ₂ H | CH ₂ O ₂ C(CH ₂) ₂ CO ₂ H | CH ₃ -C=CH ₂ |
| 10 | 28- <i>O</i> -(3,3-Dimethylglutaroyl)betulin | OH | CH ₂ O ₂ C(CH ₂)CMe ₂ (CH ₂)CO ₂ H | CH ₃ -C=CH ₂ |
| 11 | 3- <i>O</i> -(3,3-Dimethylglutaroyl)betulinic acid | O ₂ C(CH ₂)CMe ₂ (CH ₂)CO ₂ H | CO ₂ H | CH ₃ -C=CH ₂ |
| 12 | 3,28-Di- <i>O</i> -(3,3-dimethylglutaroyl)betulin | O ₂ C(CH ₂)CMe ₂ (CH ₂)CO ₂ H | CH ₂ O ₂ C(CH ₂)CMe ₂ (CH ₂)CO ₂ H | CH ₃ -C=CH ₂ |
| 13 | 28-(Tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)betulin | OH | CH ₂ O(THP) | CH ₃ -C=CH ₂ |
| 14 | 28- <i>O</i> -Nicotinoylbetulin | OH | CH ₂ O ₂ C(3-Pyr) | CH ₃ -C=CH ₂ |
| 15 | 28- <i>O</i> -Cinnamoylbetulin | OH | CH ₂ O ₂ C(CH=CH)Ph-(<i>E</i>) | CH ₃ -C=CH ₂ |
| 16 | 3,28-Di- <i>O</i> -(dihydrocinnamoyl)betulin | O ₂ C(CH ₂) ₂ Ph | CH ₂ O ₂ C(CH ₂) ₂ Ph | CH ₃ -C=CH ₂ |
| 17 | Lupenone | O= | Me | CH ₃ -C=CH ₂ |
| 18 | Betulon aldehyde | O= | CHO | CH ₃ -C=CH ₂ |
| 19 | Betulonoyl dimethyl-L-aspartate | O= | CO[Asp(OMe)-OMe] | CH ₃ -C=CH ₂ |
| 20 | 20,29-Dihydrobetulonic acid | O= | CO ₂ H | CH ₃ -CH-CH ₃ |
| 21 | 3- <i>O</i> -Acetylbetulinic acid | OAc | CO ₂ H | CH ₃ -C=CH ₂ |
| 22 | 3- <i>O</i> -Acetylbetulin | OAc | CH ₂ OH | CH ₃ -C=CH ₂ |
| 23 | 3- <i>O</i> -Acetyl-28-(tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)betulin | OAc | CH ₂ O(THP) | CH ₃ -C=CH ₂ |
| 24 | 3,28-Di- <i>O</i> -acetylbetulin | OAc | CH ₂ OAc | CH ₃ -C=CH ₂ |
| 25 | 3,28-Di- <i>O</i> -acetyl-29-hydroxybetulin | OAc | CH ₂ OAc | HOCH ₂ -C=CH ₂ |
| 26 | 3,28-Di- <i>O</i> -acetyl-20,30-epoxybetulin | OAc | CH ₂ OAc |  |
| 27 | 3- <i>O</i> -Caffeoylbetulin | O ₂ C(CH=CH)(3,4-di-OH-C ₆ H ₃)-(E) | CH ₂ OH | CH ₃ -C=CH ₂ |



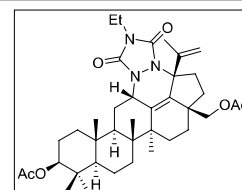
28 3,28-Di-*O*-acetyl-18,19-dehydro-20,29-dihydrobetulin



29 Allobetulin



30 3-Oxoallobetulin



31 4'-Ethyl-1',2',4'-triazoline-3',5'-dione-fused 3,28-di-*O*-acetylbetulin

Table 1. Structures of the betulin derivatives that were used for [³H]TC transport inhibition and [³H]preS1 binding inhibition experiments. These compounds derived from a TargoSet (Adipogen AG) or were synthesized as outlined elsewhere⁵²⁻⁵⁴. Ac, acetyl; Asp, aspartate; Et, ethyl; Me, methyl; Ph, phenyl; Pyr, pyridinyl; THP, 2*H*-tetrahydropyran.

| Compound | IC ₅₀ ([³ H]TC uptake) [μM] ^a | IC ₅₀ ([³ H]preS1 binding) [μM] ^b | Selectivity index ^c |
|--|---|---|--------------------------------|
| Betulinic acid (4) | 0.65–1.08 | 1.57–2.93 | 1 |
| 20,29-Dihydrobetulonic acid (20) | 2.74–5.46 | 2.95–7.66 | 1 |
| 3,28-Di- <i>O</i> -succinoylbetulin (9) | 3.11–5.02 | 2.94–10.15 | 1 |
| 28- <i>O</i> -(3,3-Dimethylglutaroyl)betulin (10) | 3.00–5.91 | 2.48–7.02 | 1 |
| 3- <i>O</i> -(3,3-Dimethylglutaroyl)betulinic acid (11) | 3.08–4.53 | 3.00–5.21 | 1 |
| 3,28-Di- <i>O</i> -(3,3-dimethylglutaroyl)betulin (12) | 4.17–10.71 | 4.97–10.14 | 1 |
| 3- <i>O</i> -Acetylbetulin (22) | 36.47–151.80 | 20.64–87.35 | 2 |
| Methyl betulinate (5) | 47.05–99.97 | 12.66–83.46 | 2 |
| 28- <i>O</i> -Succinoylbetulin (8) | 5.35–10.60 | 1.61–4.11 | 3 |
| Betulonaldehyde (18) | 88.53–175.00 | 25.98–52.00 | 3 |
| 28- <i>O</i> -Nicotinoylbetulin (14) | 185.40–531.50 | 36.48–109.10 | 5 |
| 3- <i>O</i> -Acetylbetulinic acid (21) | 7.19–30.33 | 1.81–5.31 | 5 |
| 3,28-Di- <i>O</i> -acetylbetulin (24) | > 1,000 | 52.55–756.00 | > 5 |
| 3,28-Di- <i>O</i> -(dihydrocinnamoyl)betulin (16) | 176.20–1232.00 | 24.79–229.20 | 6 |
| 4'-Ethyl-1',2',4'-triazoline-3',5'-dione-fused 3,28-di- <i>O</i> -acetylbetulin (31) | 614.20–1286.00 | 89.71–224.60 | 6 |
| Betulin (1) | 568.80–983.40 | 48.29–247.10 | 7 |
| 28- <i>O</i> -Cinnamoylbetulin (15) | 72.39–235.50 | 10.89–31.75 | 7 |
| 3- <i>O</i> -Acetyl-28-(tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)betulin (23) | 119.00–947.20 | 10.95–113.70 | 10 |
| Lupenone (17) | 145.70–396.70 | 13.10–35.45 | 11 |
| 28- <i>O</i> -(Bromoacetyl)betulin (7) | 63.53–126.00 | 5.28–11.14 | 11 |
| 3,28-Di- <i>O</i> -acetyl-20,30-epoxybetulin (26) | 331.80–891.20 | 26.46–72.96 | 12 |
| 3,28-Di- <i>O</i> -acetyl-18,19-dehydro-20,29-dihydrobetulin (28) | > 1,000 | 29.95–132.80 | > 16 |
| Lupeol (3) | > 1,000 | 26.93–97.94 | > 19 |
| 28-(Tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)betulin (13) | 115.80–628.00 | 9.34–19.54 | 19 |
| 3- <i>O</i> -Caffeoylbetulin (27) | 84.98–195.00 | 3.35–10.00 | 22 |
| Allobetulin (29) | 212.30–674.80 | 9.67–20.80 | 27 |
| Betulonoyl dimethyl-L-aspartate (19) | 297.60–1430.00 | 21.84–202.60 | 28 |
| 3-Oxoallobetulin (30) | > 1,000 | 17.87–54.43 | > 32 |
| Betulinaldehyde oxime (6) | 359.80–759.00 | 6.61–18.29 | 48 |
| 20,29-Dihydrobetulin (2) | 157.80–428.90 | 1.74–7.14 | 65 |
| 3,28-Di- <i>O</i> -acetyl-29-hydroxybetulin (25) | > 1,000 | 5.29–13.04 | > 125 |

Table 2. The indicated 31 betulin derivatives were analyzed for [³H]TC transport inhibition and [³H]preS1 binding inhibition in NTCP-HEK293 cells. IC₅₀ values were calculated from a range of five inhibitor concentrations (0.1–1,000 μM) and are listed with their 95% confidence intervals. Selectivity indices for [³H]TC transport inhibition/[³H]preS1 binding inhibition were calculated from the IC₅₀ means. The higher this index, the more selective the respective inhibitor. ^a Inhibition of 1 μM [³H]TC uptake; ^b inhibition of 5 nM [³H]preS1 binding; ^c calculated from mean IC₅₀ TC:preS1.

from the betulin core structure by chemical modifications. These include methyl, succinyl, acetyl, bromoacetyl, dimethylglutaryl, caffeoyl, oxime, tetrahydropyranyl, cinnamoyl, nicotinoyl, L-aspartyl- or 1,2,4-triazoline-3,5-dione conjugations mostly at positions 3' and/or 28', as well as oxidations of the hydroxyl groups at positions 3' and/or 28'. Compound **29** represents allobetulin and compound **30** 3-oxoallobetulin. All IC₅₀ values for [³H]TC transport and [³H]preS1 binding are listed in Table 2 with their 95% confidence intervals, and selected diagrams are shown in Fig. 2. In the case of [³H]TC uptake inhibition, the IC₅₀ values ranged from 1 μM (**4**) up to values > 1,000 μM with very low, if any transport inhibition (**3**, **24**, **25**, **28** and **30**). This clearly indicates structure–activity relationships over three orders of magnitude. Most of the betulin derivatives showed quite potent inhibition of [³H]preS1 binding with IC₅₀ values ranging from 2–3 μM (**4**, **8**, **21**) up to 199 μM (**24**), also demonstrating clear structure–activity relationships over a broad inhibitor concentration range.

In addition, ratios between the IC₅₀ values for [³H]TC transport inhibition and the IC₅₀ values for [³H]preS1 binding inhibition were calculated and are further referred to as selectivity index. The higher this index, the more selective the respective compound for myr-preS1₂₋₄₈ lipopeptide inhibition. Therefore, the data listed in Table 2 are not only helpful to identify potent myr-preS1₂₋₄₈ lipopeptide binding inhibitors but also to assess their selectivity. These values ranged from an index of 1, including more potent (e.g. **4**) and less potent (e.g. **12**) non-selective inhibitors, up to an index of > 60, including the highly selective and potent inhibitors **2** and **25**. Figure 2 depicts selected diagrams which show the inhibitory curves for the [³H]TC transport inhibition (in blue) and [³H]preS1 binding inhibition (in red). This panel shows compounds with different characteristics. Within the group of potent [³H]preS1 binding inhibitors (IC₅₀ < 10 μM), there were (I) non-selective inhibitors

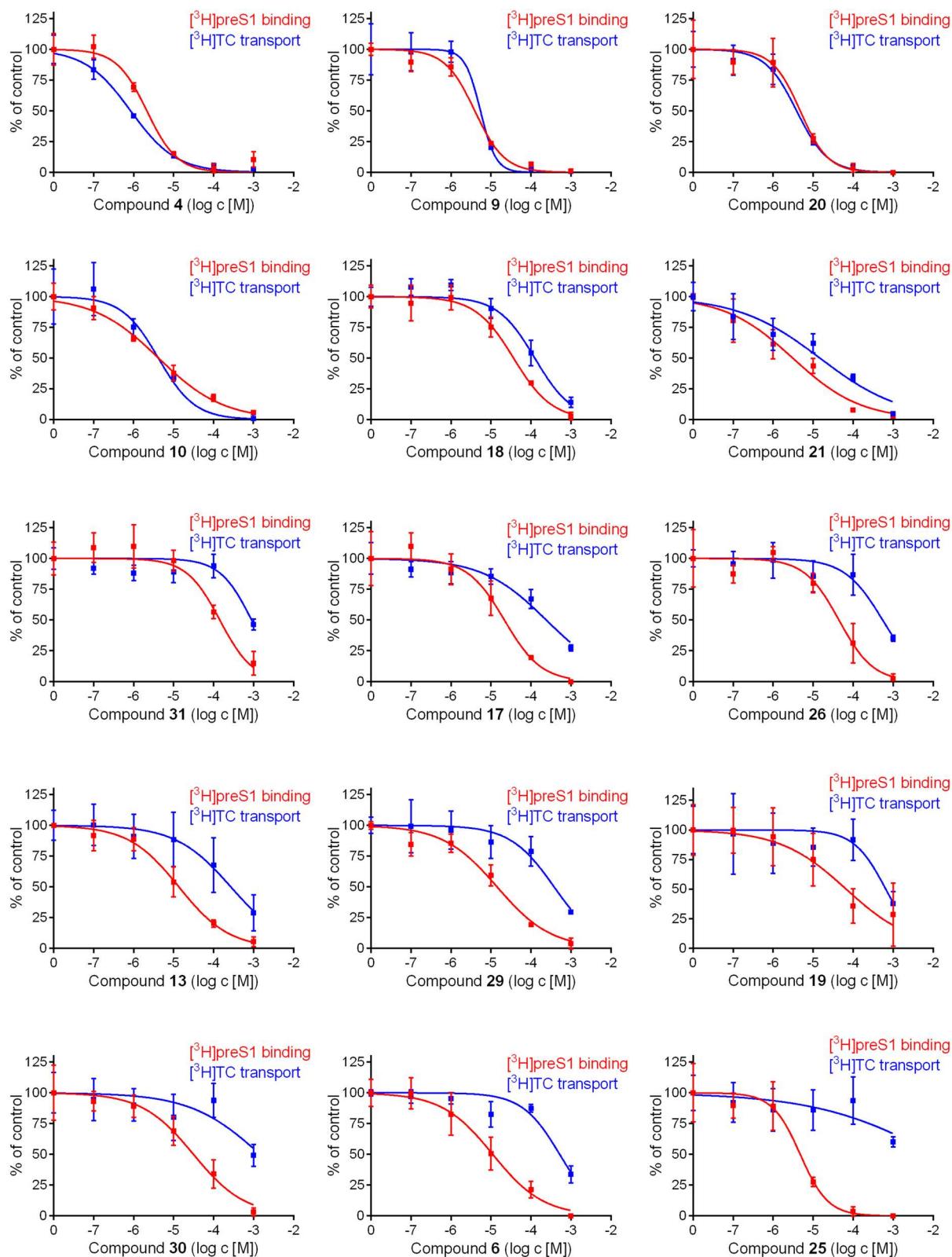


Figure 2. Inhibition of $[^3\text{H}]$ preS1 peptide binding and $[^3\text{H}]$ TC transport by betulin derivatives. NTCP-HEK293 cells were incubated with tetracycline in order to induce NTCP expression and were used for bile acid transport experiments with $1\ \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]$ TC and for myr-preS1₂₋₄₈ lipopeptide binding experiments with $5\ \text{nM}$ $[^3\text{H}]$ preS1, each over 10 min at $37\ ^\circ\text{C}$. Cells without tetracycline treatment were used as 0% controls of $[^3\text{H}]$ TC uptake and $[^3\text{H}]$ preS1 binding, respectively. Experiments were performed with solvent alone (set to 100%) and with increasing concentrations of the indicated inhibitor. The mean of the 0% control was subtracted to calculate net $[^3\text{H}]$ TC transport rates (shown in blue) as well as net $[^3\text{H}]$ preS1 binding rates (shown in red), both expressed as % of control at the y-axis. Half maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) were calculated by nonlinear regression analysis using the equation $\log(\text{inhibitor})$ vs. response (GraphPad Prism). The figure shows selected diagrams. Chemical structures of the compounds are depicted in Table 1, the respective IC_{50} values are listed in Table 2. Data represent means \pm SD of quadruplicate determinations ($n=4$).

(4, 9, 10, and 20), (II) poorly selective inhibitors (e.g. 21), and highly selective inhibitors, being 2 and 25. Also, from the group of less potent [³H]preS1 binding inhibitors (IC₅₀ = 11–50 μM), some were poorly selective (e.g. 18) and others were highly selective (e.g. 13, 17, 19 and 30). Taken together, these data clearly indicate structure–activity relationships of the betulin derivatives for both, bile acid transport inhibition and myr-preS1₂₋₄₈ lipopeptide binding inhibition.

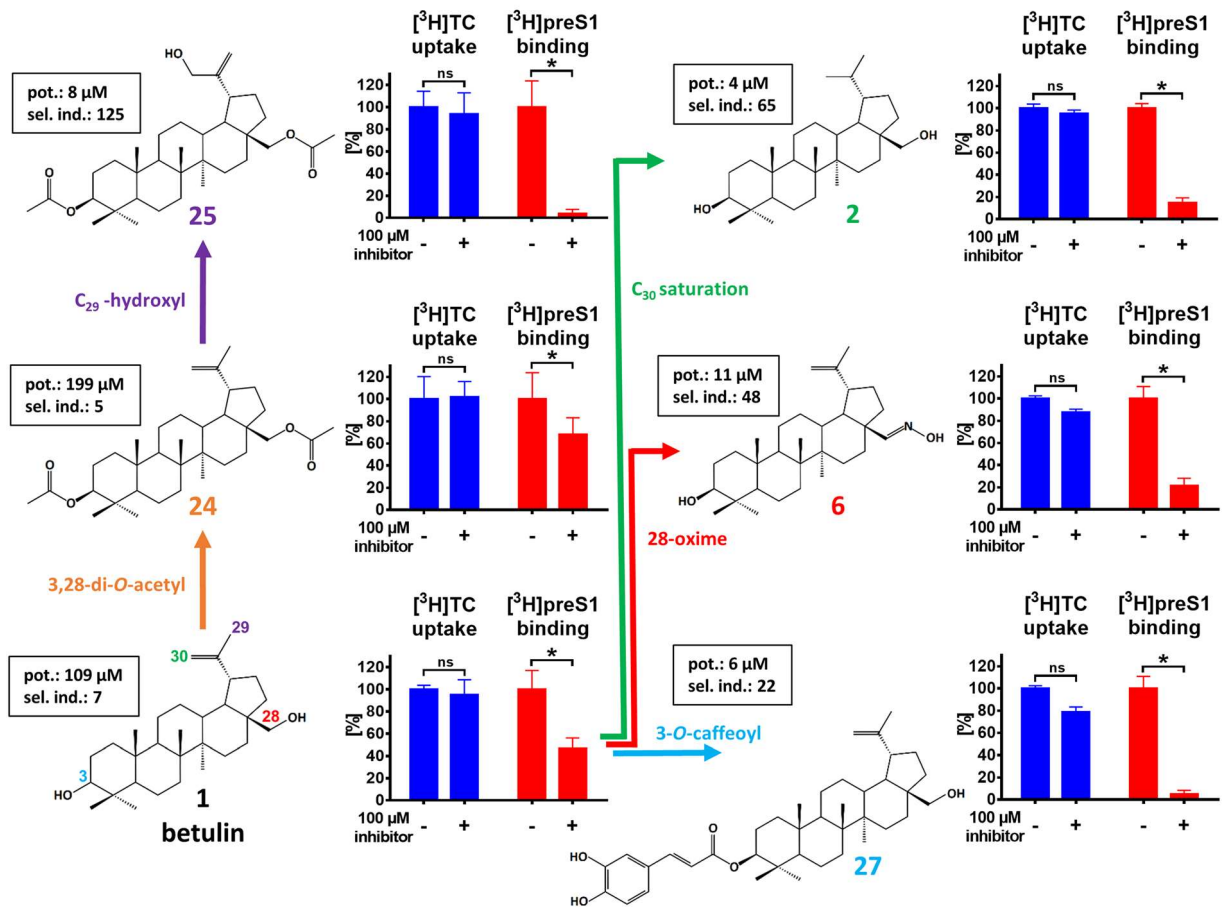
Most relevant modifications for structure–activity relationships. Closer analysis of the structure–activity relationships of the betulin derivatives revealed several interesting patterns that can be used to further optimize the potency and selectivity index of these compounds in order to end up with an even more suitable HBV/HDV entry inhibitor from the class of betulin derivatives. Of note, betulin (1) itself showed relatively low inhibitory potency for bile acid transport inhibition (IC₅₀ = 748 μM) and [³H]preS1 binding inhibition (IC₅₀ = 109 μM) resulting in a selectivity index of 7. However, relatively moderate modifications at the betulin core structure revealed significantly improved potency and selectivity index of the individual compounds. Some of these modifications are depicted in more detail in Fig. 3a/3b and involve modifications at positions 3', 28', 29', and 30'. While the diacetylated betulin derivative 3,28-di-*O*-acetylbetulin (24) itself has a relatively low potency for [³H]preS1 binding inhibition (IC₅₀ = 199 μM) and poor selectivity (selectivity index: 5) (Fig. 3, shown in orange), additional C₂₉ hydroxylation (25) improved the potency for [³H]preS1 binding inhibition to IC₅₀ = 8 μM and increased the selectivity index to 125 (Fig. 3, shown in purple). 3-*O*-caffeoyl (27) conjugation of betulin (1) also reduced the IC₅₀ value for [³H]preS1 binding inhibition to 6 μM and increased the selectivity index to 22 (Fig. 3, shown in light blue). Replacement of the 28-hydroxyl group of betulin by an oxime group (6) increased the inhibitory potency for [³H]preS1 binding by one order of magnitude (109 μM vs. 11 μM) and also improved the selectivity index (7 vs. 48) (Fig. 3, shown in red). The most successful modification, however, was the saturation of the double bond between C₂₀ and C₃₀, which increased the potency for [³H]preS1 binding inhibition to IC₅₀ of 4 μM, while maintaining the low degree of interference with the bile acid transport with IC₅₀ of 260 μM (selectivity index: 65) (Fig. 3, shown in green).

Acidic betulin derivatives are potent, but non-selective inhibitors of NTCP. All potent (IC₅₀ preS1 binding < 10 μM) and non-selective (selectivity index < 10) NTCP inhibitors from the group of betulin derivatives bear at least one acidic group. This applies to compounds 4, 8–12, 20, and 21 (Tab. 1). Based on their pK_a values, these compounds are predominantly deprotonated and negatively charged at pH 7.4, similar to bile acids. In order to investigate the role of the pH-dependent negative charge of these compounds, the acidic derivatives 4 (pK_a = 4.8) and 8 (pK_a = 4.1) were tested for [³H]TC uptake inhibition and [³H]preS1 binding inhibition at pH 7.4 and pH 5.5. Betulin (1) was included as a non-acidic compound for control. In the case of compound 4 a shift of the IC₅₀ value for [³H]TC uptake inhibition from 0.8 to 103 μM was observed (Fig. 4, upper panel). Compound 8 also showed an IC₅₀ shift from 8 to 200 μM by lowering the pH from 7.4 to 5.5. Interestingly, the IC₅₀ values for [³H]preS1 binding inhibition did not change at lower pH (Fig. 4, lower panel). Apart from this effect on the inhibition pattern, acidification of the incubation medium also affected the absolute [³H]TC uptake and [³H]preS1 binding rates (Fig. 4, bar graphs). Both functions of NTCP were significantly lower at pH of 5.5, most likely due to pH sensitive amino acid residues at the sites of substrate/preS1 binding.

Betulin derivatives inhibit HDV infection. Selected betulin derivatives were investigated for their inhibitory potency of in vitro HDV infection of NTCP-expressing HepG2 hepatoma cells. These experiments were of particular interest as in the [³H]preS1 assays, [³H]preS1 peptide binding is just used as a surrogate parameter for virus binding to NTCP. Of note, these infection experiments were performed in a different cell line as the screening assays and the betulin inhibitors had to be incubated much longer for the in vitro infection experiments (6 h) compared to the [³H]preS1 binding assay (15 min). While NTCP-HepG2 cells without inhibitor were used as control (set to 100% infection rate), co-incubation with 0.5 μM of the myr-preS1₂₋₄₈ lipopeptide completely abolished infection of the cells (set to 0% infection rate). As inhibitors for in vitro HDV infection, betulinic acid (4) was used as a potent but non-selective inhibitor, 20,29-dihydrobetulin (2) as a potent and highly selective inhibitor, as well as lupenone (17) and betulonoyl dimethyl-L-aspartate (19) as less potent but still selective inhibitors. All four compounds significantly blocked in vitro HDV infection of the NTCP-HepG2 cells in a concentration-dependent manner (Fig. 5), clearly indicating that betulin derivatives represent an interesting novel compound class of HBV/HDV entry inhibitors. Of note, none of the compounds induced toxicity in the cells even after long term incubation at high (300 μM/600 μM) inhibitor concentrations (Fig. 5h).

Inhibition of HDV infection cannot be attributed to drug-induced internalization of NTCP. Compounds 4 and 17 underwent further investigations to clarify, whether their inhibitory effects on in vitro HDV infection may have been attributed to drug-induced internalization of NTCP. Therefore, NTCP-expressing HepG2 hepatoma cells were pretreated with 600 μM of the respective compound for 15 min or 6 h, respectively (Fig. 5e,f). Subsequently, cells were washed three times with tempered PBS, before [³H]TC (1 μM) uptake and [³H]preS1 (5 nM) binding were analyzed for 10 min at 37 °C. Cells pretreated with solvent (DMEM) alone served as 100% controls. Data from HepG2 cells without NTCP expression were set to 0%. Even after three intense washing steps, [³H]TC uptake was significantly reduced after short (15 min) and long (6 h) term preincubation with compound 4. In contrast, [³H]preS1 binding did not change, clearly confirming plasma membrane localization of NTCP even after long term preincubation with high inhibitor concentrations of 600 μM. In the case of compound 17, no differences were observed after short term (15 min) preincubation, while [³H]TC uptake and [³H]preS1 binding slightly changed in opposite directions after long term (6 h) preincuba-

(a)



(b)

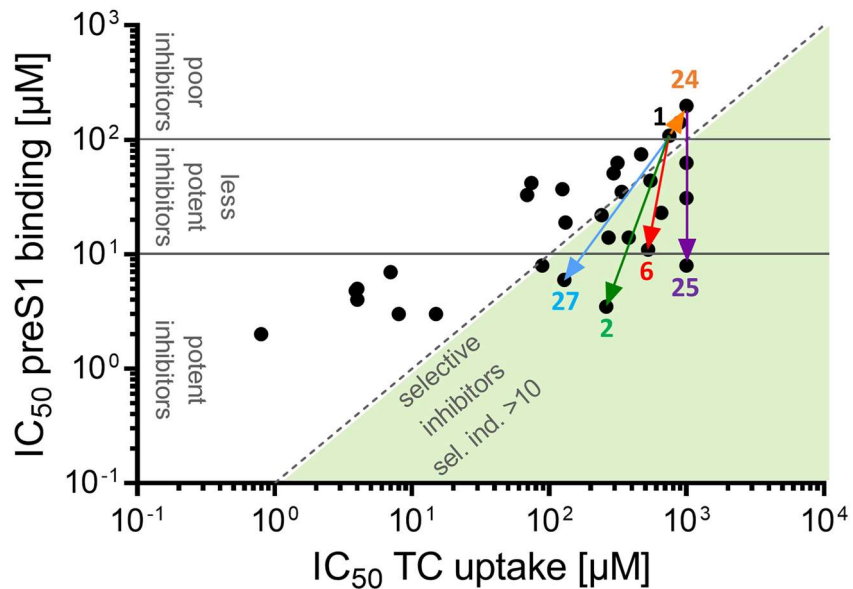


Figure 3. Structure–activity relationships of betulin derivatives for [³H]TC transport inhibition and [³H]preS1 binding inhibition. Chemical modifications at the lupane skeleton of betulin revealed clear structure–activity relationships for the potency (pot., IC₅₀ of [³H]preS1 binding inhibition) and virus selectivity index (sel. ind., ratio IC₅₀ [³H]TC transport inhibition / IC₅₀ [³H]preS1 binding inhibition). (a) 3,28-di-*O*-acetylation (shown in orange), additional C₂₉-hydroxylation (shown in purple), 3-*O*-modification with caffeoyl (shown in light-blue), 28-oxime generation (shown in red), and C₃₀ saturation (shown in green) of the betulin core structure improve the potency and/or selectivity index of the respective compounds. The respective inhibition pattern are illustrated by bar graphs for [³H]TC uptake (shown in dark-blue) and [³H]preS1 peptide binding (shown in red), respectively, in the presence or absence of a fix concentration (100 μM) of the respective betulin derivative. Graphs show means ± SD of quadruplicate determinations. *Significantly different with $p < 0.01$ (two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison test); ns, not significant. (b) The diagram shows all IC₅₀ values for [³H]TC uptake inhibition and [³H]preS1 binding inhibition of the respective compounds. Effects (IC₅₀ shifts) of the structural modifications are illustrated by arrows, starting from the core structure betulin (compound 1). Compounds can be divided into three groups regarding their potency to inhibit [³H]preS1 binding: potent inhibitors (IC₅₀ ≤ 10 μM), less potent inhibitors (10 μM < IC₅₀ < 100 μM) and poor inhibitors (IC₅₀ ≥ 100 μM). Compounds with a selectivity index of > 10 are classified as selective inhibitors.

tion. These data confirm that also after preincubation with compound 17, NTCP remained at the plasma membrane.

Discussion

The identification of the hepatic bile acid transporter NTCP as the high-affinity receptor for HBV and HDV was the basis for the development of a novel class of anti-HBV/anti-HDV drugs, being cell-entry inhibitors targeting NTCP⁹. Since then, many studies have identified compounds that are capable to inhibit the virus receptor function of NTCP: Hepcludex¹³, cyclosporine A and other cyclosporine derivatives^{23–25}, ezetimibe¹⁰, irbesartan²⁷, ritonavir²⁸, (-)-epigallocatechin-3-gallate²⁹, vanitaracin A³⁰, Ro41-5253³¹, proanthocyanidin³², zafirlukast³³, sulfasalazine³³, and Chicago Sky Blue 6B (an azo dye)³³. Among them, Hepcludex is a peptide-based drug and cannot be administered orally¹³. Furthermore, it has correspondingly complex manufacturing, storage, and distribution requirements. Therefore, it is still desirable to develop a small molecular drug with HBV/HDV cell-entry inhibitor activity that can be orally applied and would be easier to handle.

Many of the other mentioned compounds, e.g. cyclosporine A, were previously known to inhibit the bile acid transport function of NTCP¹⁷. Others were identified as novel HBV/HDV inhibitors and later revealed their interference with the physiological bile acid transport function of NTCP. Overall, this interference indicates that NTCP domains relevant for substrate binding and transport overlap with the domains mediating myr-preS1_{2–48} lipopeptide / virus binding to NTCP. However, there are also some hints that both functions can be separated. In a previous study, we identified amino acid G158 of the human NTCP as absolutely essential for myr-preS1_{2–48} lipopeptide binding and in vitro HBV and HDV infection. This amino acid is located at a domain (amino acids 157–165) that previously was shown to be involved in myr-preS1_{2–48} binding to human NTCP^{9,18}. Accordingly, G158R NTCP mutants were completely insusceptible for in vitro HBV/HDV infection, but still supported transport of bile acids. It was discussed that the larger amino acid side chain of arginine compared to glycine might sterically preclude myr-preS1 peptide binding, while bile acids can still bind to their respective binding pocket³⁴. Furthermore, Shimura et al.²⁵ showed for the cyclosporine derivative SCY995 higher potency against in vitro HBV infection (IC₅₀ < 8 μM) than for bile acid transport inhibition (IC₅₀ > 25 μM).

Based on this, the present study was designed to enable the identification of a selective HBV/HDV cell-entry inhibitor from the group of small molecules. Therefore, all test compounds were a priori tested for both, inhibition of [³H]preS1 binding to NTCP as a surrogate parameter for HBV/HDV infection and inhibition of [³H]TC transport via NTCP. In the present study, a novel chemical class of promising HBV/HDV cell-entry inhibitors was identified, represented by derivatives of the natural pentacyclic lupane-type triterpenoid betulin. Betulin can be isolated from various plant species, belonging to a variety of families such as Betulaceae, Platanaceae, Dilleniaceae, Rhamnaceae, Rosaceae, and Fagaceae^{35,36}. Characteristics of the lupane skeleton of betulin are the five-membered E ring and the isopropylidene group³⁷. Interestingly, nearly all betulin derivatives tested in the present study significantly inhibited [³H]TC transport and [³H]preS1 binding. However, the ratios between the IC₅₀ values for transport inhibition and for [³H]preS1 binding inhibition were quite different and the resulting selectivity indices ranged from 1 up to 65. The latter was the case for compound 2 with an IC₅₀ of 4 μM for [³H]preS1 binding inhibition and an IC₅₀ of 260 μM for bile acid transport inhibition. Some other compounds showed no transport inhibition at all, being 24, 25, 28, and 30, but at least in the case of 25, potent inhibition of [³H]preS1 peptide binding with IC₅₀ of 8 μM. This data clearly indicate structure–activity relationships for both NTCP functions. Of note, only small changes in the molecular structure of the betulin derivatives significantly changed their potency and selectivity index. Moreover, hydroxylation of compound 24 to compound 25, as an example, improved both factors in parallel: potency for [³H]preS1 binding inhibition and the selectivity index. Also other modifications of the betulin molecule (1) such as 3-*O*-caffeoyl conjugation (compound 27) or C₂₀–C₃₀ saturation (compound 2) significantly improved both factors simultaneously.

Inhibition studies at pH 5.5 revealed additional structure–activity relationships regarding the charge of the tested compounds. All potent but non-selective inhibitors (Fig. 3b) bear at least one acidic group at R1 and/or R2 (see Tab. 1) and show pK_a values between 4–5. Therefore, compounds from this group are predominantly deprotonated and negatively charged at physiological pH of 7.4, representing the standard condition in the inhibition assays. For comparison, also conjugated bile acids (pK_a = 1–4) are predominantly deprotonated and negatively charged at physiological pH^{38–40}. Based on this it can be speculated that acidic betulin derivatives may not only be

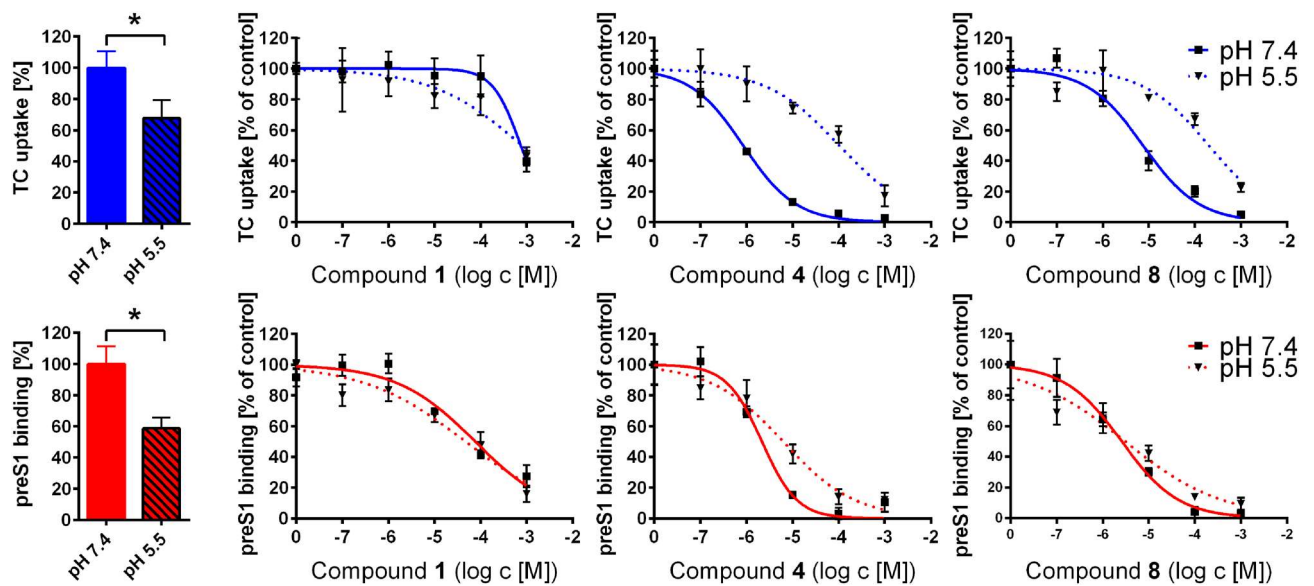


Figure 4. Influence of pH on the inhibition pattern of acidic betulin derivatives. NTCP-HEK293 cells were incubated with tetracycline in order to induce NTCP expression and were used for bile acid transport experiments with $1 \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]\text{TC}$ and for myr-preS1₂₋₄₈ lipopeptide binding experiments with 5 nM $[^3\text{H}]\text{preS1}$, each over 10 min at 37°C . Cells without tetracycline treatment served as control (set to 0%). Experiments were performed with solvent alone (set to 100%) and with increasing concentrations of the indicated inhibitors in the range of 0.1 to $1,000 \mu\text{M}$ at pH 7.4 and pH 5.5, respectively. Diagrams show inhibition curves at pH 7.4 (solid lines) and pH 5.5 (dashed lines). The mean of the 0% control was subtracted to calculate net $[^3\text{H}]\text{TC}$ transport rates (shown in blue) as well as net $[^3\text{H}]\text{preS1}$ binding rates (shown in red), both expressed as % of control at the y-axis. Bar graphs show the relative $[^3\text{H}]\text{TC}$ uptake rates (blue bars) and $[^3\text{H}]\text{preS1}$ binding rates (red bars) at pH 7.4 (filled bars) and pH 5.5 (striped bars), respectively, expressed as pmol/10 min/well. Half maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) were calculated by nonlinear regression analysis using the equation $\log(\text{inhibitor})$ vs. response (GraphPad Prism). Data represent means \pm SD of quadruplicate determinations ($n=4$). *Significantly different with $p < 0.01$ (unpaired t-test with Welch's correction).

inhibitors but also transporter substrates of NTCP. This would explain, why these compounds (representatively shown for compounds **4** and **8**) largely lost their $[^3\text{H}]\text{TC}$ uptake inhibitory potency when the pH was reduced to 5.5 and, thereby reducing the relative charge of the molecules. In contrast, the $[^3\text{H}]\text{preS1}$ binding inhibitory potency was insensitive to this pH shift and only showed little differences between pH 7.4 and pH 5.5 conditions. This again indicates that the transporter and the receptor function of NTCP can be separated under certain experimental conditions and that blocking of the preS1 peptide binding site of NTCP does not require negative charge of the inhibitor. In contrast to compounds **4** and **8**, betulin itself (compound **1**) does not bear any acidic group. Consequently, betulin could be less active at the bile acid binding site, what would explain the relatively low potency for TC uptake inhibition ($\text{IC}_{50} = 748 \mu\text{M}$) at neutral and acidic pH values. However, no uniform legality could be established for the other chemical modifications of betulin, which would precisely predict the potency and selectivity pattern of the respective betulin derivative. Nevertheless, based on the structure–activity relationships described in the present study it is most likely that even more potent betulin derivatives can be identified, while sparing the cross-reactivity on the bile acid transport function of NTCP.

Among the betulin derivatives, betulinic acid (**4**) particularly underwent intensive toxicological assessment^{35,41–43}. In vitro and in vivo model systems consistently categorized betulinic acid (**4**) as a safe compound with low toxicity. More precisely, no toxic effects were observed in rats that obtained single i.p. application of 400 mg/kg or in mice receiving 100 mg/kg i.p. every 3–4 days for a total of six treatments, or 500 mg/kg i.p. once^{35,42,43}. Unfortunately, betulinic acid (**4**), although potent in $[^3\text{H}]\text{preS1}$ binding inhibition ($\text{IC}_{50} = 2 \mu\text{M}$), is not selective and showed equipotent inhibition of the bile acid transport function of NTCP at least at physiological pH. Therefore, betulinic acid (**4**) is not regarded as the optimal HBV/HDV entry inhibitor candidate from the betulin class of compounds. Apart from betulinic acid (**4**), betulin (**1**) also has a good safety profile. Betulin (**1**) is approved for medical use in humans and is currently available as a betulin containing gel (Oleogel-S10, Episalvan). It was authorized in 2016 by the European Medicines Agency (EMA) for treatment of partial thickness wounds in adults. This gel contains an extract from birch bark of *Betula pendula* Roth, *Betula pubescens* Ehrh., and hybrids of both species, obtained with *n*-heptane as the extraction solvent. The resulting betulin (**1**) concentrations are in the range of 72–88 mg betulin (**1**) per 100 mg extract. The gel itself is composed of 10% birch bark extract in 90% sunflower oil. Moreover, Episalvan is currently undergoing a phase III efficacy and safety study in patients with inherited epidermolysis bullosa (EB) that started in 2017 with an estimated enrollment of 250 participants (NCT03068780). Based on this good safety profile and the established use in human medicine, betulin (**1**) is an attractive early lead candidate for selective HBV/HDV cell-entry inhibition. However, despite its superior selectivity in comparison to betulinic acid (**4**), the potency for $[^3\text{H}]\text{preS1}$ binding inhibition is relatively

low ($IC_{50} = 109 \mu\text{M}$). Nevertheless, the present study clearly demonstrates that even small modifications of the lupane skeleton can improve the potency and selectivity of the respective compounds significantly. Therefore, it seems likely that advanced rational drug design can further improve this compound class to end up with a potent and selective HBV/HDV cell-entry inhibitor.

Apart from the above-mentioned clinical application, several previous studies showed that betulin (**1**) and betulin derivatives have a broad spectrum of pharmacological effects, including anti-cancer, anti-viral, anti-microbial, anti-inflammatory, and anti-fibrotic effects^{44–48}. Interestingly, betulinic acid (**4**) was also used in HBV infection studies before, which showed inhibition of HBV replication by suppression of manganese superoxide dismutase (SOD2) expression with subsequent mitochondrial reactive oxygen species (ROS) over-generation⁴⁹. Based on this and the results from the present study, betulinic acid (**4**) might have additive HBV/HDV antiviral properties by addressing different cellular targets involved in cell-entry (NTCP) and replication (SOD2). Therefore, further studies with betulin derivatives should take selective NTCP inhibition and potential suppression of SOD2 into account, which was beyond the scope of the present study.

Our [³H]preS1 binding assay successfully predicted the inhibitory effect of the betulin derivatives on in vitro HDV infection. A minor but expected limitation is that absolute IC_{50} values varied between both experimental setups. While the qualitative activity pattern of the betulin derivatives remained the same between the two assays, the absolute IC_{50} values for in vitro HDV infection inhibition were about one to two orders of magnitude higher than predicted from the [³H]preS1 binding experiments. Most likely, several factors contribute to this effect. One factor could be the different incubation times for [³H]preS1 binding (minutes) and in vitro HDV infection experiments (hours). Another factor might be the use of different cell lines and incubation media. Whereas, the [³H]preS1 binding assays were performed in NTCP-HEK293 cells in pure DMEM, the infection experiments needed to be performed with NTCP-HepG2 cells in HGM containing significant amounts of bovine serum albumin (BSA) as well as polyethylene glycol (PEG). The latter medium conditions potentially alter free drug concentrations due to protein binding. Lowering of the inhibitory potency of betulinic acid (**4**) due to protein binding has already been identified in a previous study, where this compound was used as inhibitor for the organic anion transporting polypeptide OATP1B3⁵⁰. A further factor could be the different stoichiometry of the single preS1 peptide molecule and the multitude of preS1 domains of the large envelope proteins of HBV/HDV virions. The latter one could need a higher degree of blocked NTCP receptors for successful virus binding and cell-entry inhibition. On this background, it could be beneficial if an NTCP inhibitor would not only be selective, but would also irreversibly block the preS1/virus binding sites at NTCP. However, this was not achieved with the betulin derivatives analyzed in the present study. The data obtained on compounds **4** and **17** more suggest a reversible mode of inhibition for myr-preS1_{2–48} peptide binding to NTCP. Their inhibitory effect on [³H]preS1 binding was completely abrogated by washing the cell surface with inhibitor-free medium (see Fig. 5e,f). But, these observations clearly indicate that the inhibitory effects of compounds **4** and **17** on HDV infection cannot be attributed to drug-induced internalization of NTCP.

Of interest are also the long-term effects of compounds **4** and **17** on the transporter and receptor function of NTCP. In the case of compound **4** preincubation with 600 μM significantly and selectively reduced the transporter function of NTCP, while NTCP still was completely preS1 peptide binding competent. As compound **4** (betulinic acid) belongs to the group of acidic betulin derivatives one can speculate that betulinic acid is transported by NTCP, accumulates inside the cell during preincubation and so by *trans*-inhibition blocks substrate binding but not preS1 peptide binding to the outer surface of the NTCP protein. This again would support the idea that bile acid and preS1 peptide binding to NTCP occur at separate, but overlapping domains. In contrast, compound **17** showed a paradoxical effect after long term preincubation and increased the capacity for [³H]preS1 peptide binding to approximately 130%, while the [³H]TC uptake rate was slightly reduced. This could be explained by longer lasting allosteric effects of this compound that differently affects the transport and receptor function of NTCP. The mechanism behind these effects could not be clarified in the present study and needs further investigation, including LC–MS/MS supported direct transport experiments with key betulin derivatives.

In conclusion, betulin derivatives show clear structure–activity relationships for potent and selective inhibition of the HBV/HDV virus receptor function of NTCP without tackling its physiological bile acid transport function. Therefore, betulin derivatives are promising candidates for further development of HBV/HDV cell-entry inhibitors. Further studies with this compound class should additionally focus on the mode of inhibition (reversible vs. irreversible) and should be extended to all relevant HBV genotypes.

Methods

NTCP-expressing cell lines. Human embryonic kidney (HEK293) cells were stably transfected with human NTCP, C-terminally tagged with the FLAG epitope (further referred to as NTCP-HEK293 cells) as reported before⁵¹. Cells were maintained at 37 °C, 5% CO₂ and 95% humidity in DMEM/F-12 medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 4 mM L-glutamine (PAA, Cölbe, Germany) and penicillin/streptomycin (PAA). HepG2 cells stably transfected with NTCP-FLAG (further referred to as NTCP-HepG2¹⁰) were cultured under the same conditions in DMEM with all supplements listed above, except for L-glutamine. For induction of the transgene, the medium was supplemented with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tetracycline (Roth, Karlsruhe, Germany) in the case of the NTCP-HEK293 cells or with 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doxycycline (Sigma-Aldrich) in the case of the NTCP-HepG2 cells.

Inhibitory concentrations (IC_{50}) for [³H]preS1 binding and [³H]TC transport. Bile acid transport measurements were performed in the NTCP-HEK293 cells with [³H]TC (20 Ci/mmol, 0.09 mCi/ml, Perkin Elmer, Waltham, USA) as reported before⁵¹. In parallel, [³H]preS1 peptide binding experiments were performed with a tritium-labelled myr-preS1_{2–48} lipopeptide -HBV subgenotype D3- that was purchased from Pharmaron

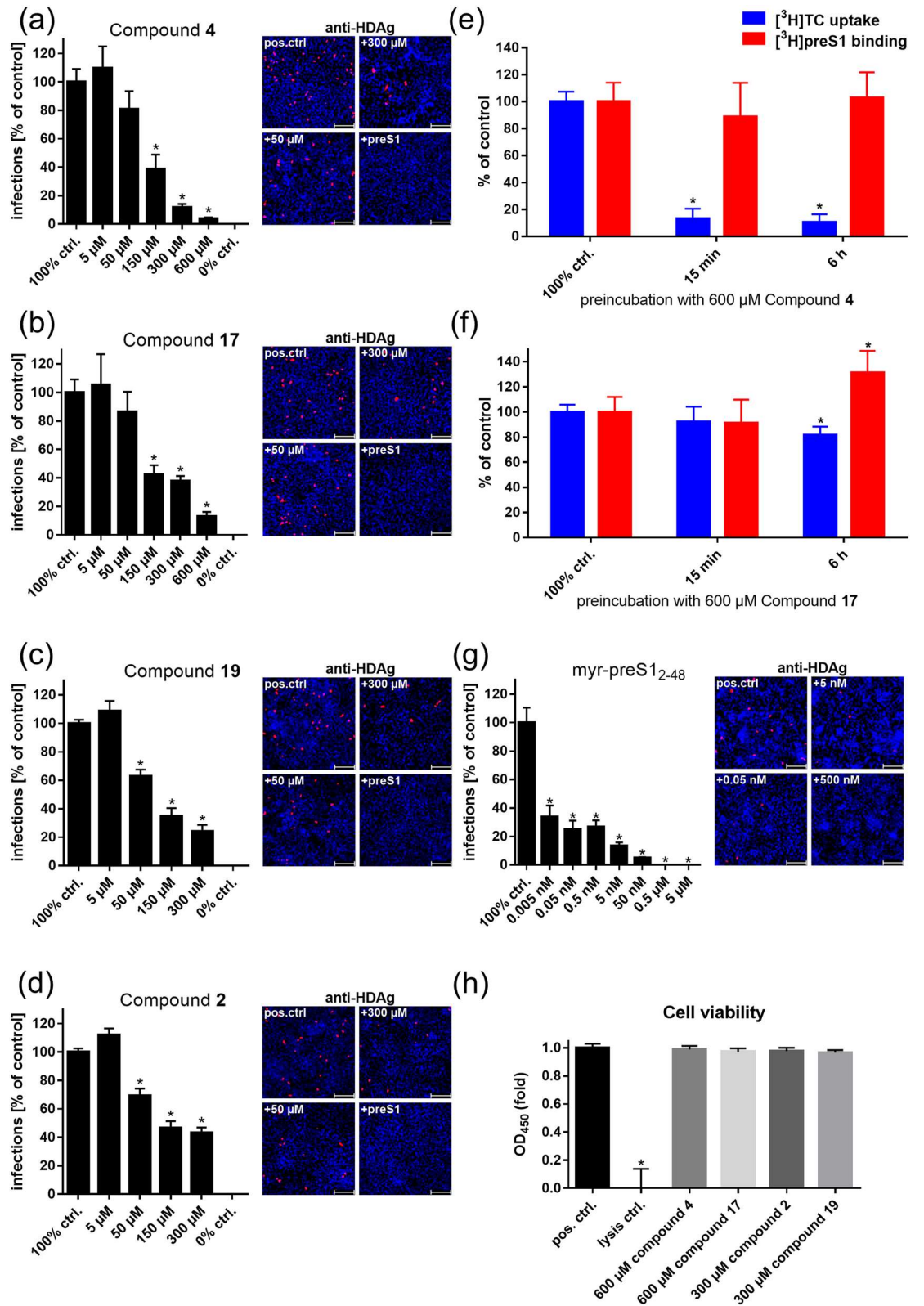


Figure 5. Selected betulin derivatives were used for HDV infection inhibition of NTCP-HepG2 cells. NTCP-HepG2 cells were preincubated for 5 min with the indicated concentrations of (a) betulinic acid (compound **4**), (b) lupenone (compound **17**), (c) betulonoyl dimethyl-L-aspartate (compound **19**), (d) 20,29-dihydrobetulin (compound **2**), and (g) the myr-preS1₂₋₄₈ peptide in DMEM at 37 °C. Then, cells were additionally inoculated with 700 genome equivalents/cell of HDV particles at 37 °C. After 6 h, cells were washed and further incubated with inhibitor- and virus-free medium, and medium was changed every 3–4 days. At day 9 post infection, cells were fixed and an immunostaining against the HDV Ag was performed, as a marker of HDV infection. The number of infected cells per well was determined by fluorescence microscopy. NTCP-HepG2 cells incubated without inhibitor were used as control (set to 100% infection rate). Infection experiments in the presence of 0.5 μM myr-preS1₂₋₄₈ peptide served as control for the 0% infection rate. Scale bars: 100 μm. Data represent means ± SEM of three independent experiments each with triplicate determinations (n = 9). (e, f) Cells were preincubated with 600 μM of compound **4** and compound **17**, respectively, for intervals of 15 min and 6 h at 37 °C. Cells treated with solvent (DMEM) alone served as control (set to 100%) and data from cells without induction of NTCP expression were set to 0%. Subsequently, cells were washed three times with tempered PBS and [³H]TC (1 μM) uptake as well as [³H]preS1 (5 nM) binding were analyzed, respectively. Means of the 0% controls were subtracted and net [³H]TC transport rates and net [³H]preS1 binding rates are expressed as % of control at the y-axis. Data were combined from two independent experiments, each with quadruplicate determinations (n = 8). (h) Cell viability was determined with an LDH cytotoxicity assay. HepG2 cells treated with HGM w/o test compound were used as positive control and lysed cells as negative control. Data show means ± SD of three independent experiments each with triplicate determinations (n = 9). *Significantly different from control with *p* < 0.01 (two-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test).

(120 Ci/mmol, 1 mCi/ml, Cardiff, UK). Briefly, cells were seeded onto polylysine-coated 96-well plates, induced with 1 μg tetracycline per ml, and grown to confluence over 72 h at 37 °C. Then, cells were washed once with tempered phosphate buffered saline (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 7.3 mM Na₂HPO₄, pH 7.4) at 37 °C and preincubated with 80 μl DMEM for 5 min at 37 °C. The medium was replaced by 80 μl DMEM containing the respective betulin derivative (concentrations ranging from 0.1 to 1,000 μM) or solvent alone (100% uptake/binding control), and cells were further incubated for 5 min at 37 °C. After this preincubation, bile acid transport experiments were started by adding 20 μl DMEM containing 5 μM [³H]TC (final concentration: 1 μM). Binding of [³H]preS1 was initiated by adding 20 μl DMEM containing 25 nM [³H]preS1 (final concentration: 5 nM). Experiments were stopped after 10 min by two-times washing with ice-cold PBS. For 0% uptake/binding control, the NTCP-HEK293 cells were not induced with tetracycline (-tet). Cell-associated radioactivity of [³H]TC or [³H]preS1 was quantified by liquid scintillation counting in a Packard Microplate Scintillation Counter TopCount NXT (Packard Instrument Company, Meriden, USA). Transport rates and [³H]preS1 binding were determined in counts per minute (cpm). The mean of the 0% control was subtracted and the net [³H]TC transport rates and net [³H]preS1 binding rates, respectively, were expressed as % of control. Experiments at pH 5.5 were performed the same way, using DMEM acidified with hydrochloric acid (32%, Roth). A set of betulin derivatives was purchased from Adipogen AG (Liestal, Switzerland), including the compounds betulin (**1**), betulinic acid (**4**), lupeol (**3**), betulonaldehyde (**18**), lupenone (**17**), 3-*O*-caffeoylbetulin (**27**), 3,28-di-*O*-acetylbetulin (**24**), 28-*O*-(3,3-dimethylglutaroyl)betulin (**10**), 3,28-di-*O*-(3,3-dimethylglutaroyl)betulin (**12**), 28-*O*-succinoylbetulin (**8**), 3,28-di-*O*-succinoylbetulin (**9**), 3-*O*-(3,3-dimethylglutaroyl)betulinic acid (**11**), and 3-*O*-acetylbetulinic acid (**21**) (TargoSet). All other betulin derivatives were synthesized as outlined elsewhere^{52–54}. IC₅₀ values were calculated from quadruplicate determinations by GraphPad Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

HDV infection experiments. For infection experiments NTCP-HepG2 cells were cultured in 96-well plates in Hepatocyte Growth Medium (HGM) consisting of William's E Medium (Thermo Fisher Scientific) containing 2% bovine serum albumin (BSA, Roth), 2 mM L-Glutamin (Thermo Fisher Scientific), 100 μg/ml gentamicin (Thermo Fisher Scientific), 10 nM dexamethasone (Sigma-Aldrich), 1 mM sodium pyruvate (Thermo Fisher Scientific), 1 × Insulin-Transferrin-Selen (Thermo Fisher Scientific), 2% DMSO (Merck, Darmstadt, Germany), 4% polyethylene glycol (Sigma-Aldrich) and 2 μg/ml doxycycline (Sigma-Aldrich) as reported¹⁰. Subsequently, cells were washed with DMEM and cultured in HGM supplemented with 2% DMSO, 2% BSA and 2 μg/ml doxycycline. NTCP-HepG2 cells were preincubated for 5 min with inhibitors solved in 80 μl HGM per well in concentrations ranging from 5 μM to 300 μM (compounds **2** and **19**) or from 5 μM to 600 μM (compounds **4** and **17**). HDV stock solved in 20 μl HGM per well was added for infection and cells were incubated for 6 h with final concentration of 700 genome equivalents/cell of HDV particles. HDV production was done in vitro as described before^{55,56}. RT-qPCR was performed to determine genome equivalents. Every three days medium was changed until cells were fixed at 9 days post infection with 3% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) in PBS, for 30 min at room temperature (RT). Cells were permeabilized with 0.2% Triton X 100 (Roth) in PBS for 30 min at RT, and blocked by incubation with 5% bovine serum albumin (Roth) in PBS, for 30 min at RT. Then, cells were immunostained with purified human anti-HDV-positive serum at 37 °C for 1 h (1:400 dilution). Goat anti-human IgG secondary antibody coupled to Alexa Fluor fluorophore (1:400 dilution, Thermo Fisher Scientific) was added for 1 h at 37 °C for detection of Hepatitis Delta antigen (HDV Ag) as described before³⁴. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (1 μg/ml, Thermo Fisher Scientific).

Preincubation studies in NTCP-HepG2 cells. NTCP-expressing HepG2 hepatoma cells were seeded onto rat tail collagen coated 24-well plates, induced with 2 μg doxycycline per ml, and grown to confluence over 72 h at 37 °C. For experiments, cells were preincubated with a fix concentration (600 μM) of compound **4** and

compound **17**, respectively, solved in 300 μ l DMEM for intervals of 15 min or 6 h at 37 °C. Cells treated with solvent alone (DMEM) were used as 100% controls. Cells without induction of NTCP expression by doxycycline were used as 0% controls. Subsequently, cells were washed three times with tempered PBS. Then, [3 H]TC uptake and [3 H]preS1 binding experiments were started by adding 300 μ l of 1 μ M [3 H]TC or 5 nM [3 H]preS1, respectively. After 10 min, experiments were stopped by washing the cells 5 times with ice-cold PBS. Cell-associated radioactivity was quantified by liquid scintillation counting as described above. [3 H]TC uptake and [3 H]preS1 binding rates were determined in pmol/mg protein/10 min. Means of the 0% controls were subtracted and the net [3 H]TC uptake and net [3 H]preS1 binding rates, respectively, were expressed as % of control. Data were calculated from two independent experiments, each with quadruplicate determinations by GraphPad Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

Cytotoxicity assay. Pierce lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity assay (Thermo Fisher Scientific) was performed according to the manufacturer's protocol. Briefly, NTCP-HepG2 cells were incubated with 300 μ M or 600 μ M of the respective betulin derivatives over 6 h at 37 °C. 45 min before the end of incubation, lysis buffer was added to the maximal LDH control. After 6 h, 50 μ l of each sample and control medium were transferred to a new well plate, 50 μ l of the reaction mixture were added and incubation was performed over 30 min at room temperature. Finally, the reaction was stopped by adding 50 μ l of stop solution and samples were measured by ELISA reader (GloMax-Multi Detection System, Promega, Madison, WI, USA).

Structure modeling and pKa determination. 2D compound structures were generated using the MAESTRO 12.2 Molecular Modeling Interface of SCHRÖDINGER, Inc. (New York City, NY, USA). The Jaguar pKa prediction module of the SCHRÖDINGER software was used to calculate pKa values of compounds **4** and **8**.

Statistics. Determination of IC₅₀ values was done by nonlinear regression analysis using the equation log(inhibitor) vs. response settings of the GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad). Data of bile acid transport and [3 H]preS1 binding are expressed as means \pm SD from quadruplicate determinations. IC₅₀ values are listed with their 95% confidence intervals in Table 2. In addition, mean IC₅₀ values were calculated for each experiment. Infection studies show data from three independent experiments, each with triplicate determinations represented as means \pm SEM. Statistical analyses of the HDV infection experiments and NTCP-HepG2 preincubation studies were performed by two-way ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparison test by GraphPad Prism 6.0, considering $p < 0.01$ as statistically significant.

Data availability

Obtained and analyzed data of this study are available from the corresponding author on request.

Received: 15 July 2020; Accepted: 27 November 2020

Published online: 10 December 2020

References

- World Health Organization. Global hepatitis report 2017. Geneva 2017. Licence:CC BY-NC-SA 3.0 IGO. (2017).
- Glebe, D. & Bremer, C. M. The molecular virology of hepatitis B virus. *Semin. Liver Dis.* **33**, 103–112. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1345717> (2013).
- Glebe, D. *et al.* Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes. *Gastroenterology* **129**, 234–245. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.03.090> (2005).
- Gripon, P., Canine, I. & Urban, S. Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. *J. Virol.* **79**, 1613–1622. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.3.1613-1622.2005> (2005).
- Hughes, S. A., Wedemeyer, H. & Harrison, P. M. Hepatitis delta virus. *Lancet* **378**, 73–85. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61931-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61931-9) (2011).
- Sureau, C. & Negro, F. The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. *J. Hepatol.* **64**, S102–S116. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.013> (2016).
- Martinez, M. G., Villeret, E., Testoni, B. & Zoulim, F. Can we cure hepatitis B virus with novel direct-acting antivirals?. *Liver Int.* **40**(Suppl 1), 27–34. <https://doi.org/10.1111/liv.14364> (2020).
- World Health Organization. Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis b infection. (2015).
- Yan, H. *et al.* Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife* <https://doi.org/10.7554/eLife.00049>.
- König, A. *et al.* Kinetics of the bile acid transporter and hepatitis B virus receptor Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) in hepatocytes. *J. Hepatol.* **61**, 867–875. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.05.018> (2014).
- Lamas Longarela, O. *et al.* Proteoglycans act as cellular hepatitis delta virus attachment receptors. *PLoS ONE* **8**, e58340. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058340> (2013).
- Fukano, K., Tsukuda, S., Watashi, K. & Wakita, T. Concept of Viral Inhibitors via NTCP. *Semin. Liver Dis.* **39**, 78–85. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1676804> (2019).
- MYR Pharmaceuticals. <http://myr-pharma.com/>. (2020).
- Bogomolov, P. *et al.* Treatment of chronic hepatitis D with the entry inhibitor myrcludex B: first results of a phase Ib/IIa study. *J. Hepatol.* **65**, 490–498. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.04.016> (2016).
- Geyer, J., Wilke, T. & Petzinger, E. The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Arch. Pharmacol.* **372**, 413–431. <https://doi.org/10.1007/s00210-006-0043-8> (2006).
- Stieger, B. The role of the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) and of the bile salt export pump (BSEP) in physiology and pathophysiology of bile formation. *Handb. Exp. Pharmacol.* https://doi.org/10.1007/978-3-642-14541-4_5 (2011).
- Döring, B., Lütke, T., Geyer, J. & Petzinger, E. The SLC10 carrier family: transport functions and molecular structure. *Curr. Top. Membr.* **70**, 105–168. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394316-3.00004-1> (2012).
- Ni, Y. *et al.* Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology* **146**, 1070–1083. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.12.024> (2014).

19. Blank, A. *et al.* The NTCP-inhibitor Myrcludex B: effects on Bile Acid Disposition and Tenofovir Pharmacokinetics. *Clin. Pharmacol. Ther.* **103**, 341–348. <https://doi.org/10.1002/cpt.744> (2018).
20. Goh, B. *et al.* Development of a mass spectrometric screening assay for hepatitis B virus entry inhibitors. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **178**, 112959. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112959> (2020).
21. Iwamoto, M. *et al.* Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **443**, 808–813. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.12.052> (2014).
22. Fukano, K. *et al.* Troglitazone impedes the oligomerization of sodium taurocholate cotransporting polypeptide and entry of hepatitis B virus into hepatocytes. *Front. Microbiol.* **9**, 3257. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03257> (2018).
23. Wataishi, K. *et al.* Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter, sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). *Hepatology* **59**, 1726–1737. <https://doi.org/10.1002/hep.26982> (2014).
24. Nkongolo, S. *et al.* Cyclosporin A inhibits hepatitis B and hepatitis D virus entry by cyclophilin-independent interference with the NTCP receptor. *J. Hepatol.* **60**, 723–731. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.11.022> (2014).
25. Shimura, S. *et al.* Cyclosporin derivatives inhibit hepatitis B virus entry without interfering with NTCP transporter activity. *J. Hepatol.* **66**, 685–692. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.11.009> (2017).
26. Saso, W. *et al.* A new strategy to identify hepatitis B virus entry inhibitors by AlphaScreen technology targeting the envelope-receptor interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.187> (2018).
27. Wang, X. J. *et al.* Irbesartan, an FDA approved drug for hypertension and diabetic nephropathy, is a potent inhibitor for hepatitis B virus entry by disturbing Na(+)-dependent taurocholate cotransporting polypeptide activity. *Antiviral Res.* **120**, 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.06.007> (2015).
28. Blanchet, M., Sureau, C. & Labonte, P. Use of FDA approved therapeutics with hNTCP metabolic inhibitory properties to impair the HDV lifecycle. *Antiviral Res.* **106**, 111–115. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.03.017> (2014).
29. Huang, H. C. *et al.* (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits entry of hepatitis B virus into hepatocytes. *Antiviral Res.* **111**, 100–111. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.09.009> (2014).
30. Kaneko, M. *et al.* 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. <https://doi.org/10.1128/JVI.01855-15> (2015).
31. Tsukuda, S. *et al.* Dysregulation of retinoic acid receptor diminishes hepatocyte permissiveness to hepatitis B virus infection through modulation of sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) expression. *J. Biol. Chem.* **290**, 5673–5684. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.602540> (2015).
32. Tsukuda, S. *et al.* A new class of hepatitis B and D virus entry inhibitors, proanthocyanidin and its analogs, that directly act on the viral large surface proteins. *Hepatology* **65**, 1104–1116. <https://doi.org/10.1002/hep.28952> (2017).
33. Donkers, J. M. *et al.* Reduced hepatitis B and D viral entry using clinically applied drugs as novel inhibitors of the bile acid transporter NTCP. *Sci. Rep.* **7**, 15307. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15338-0> (2017).
34. Müller, S. F., König, A., Döring, B., Glebe, D. & Geyer, J. Characterisation of the hepatitis B virus cross-species transmission pattern via Na⁺/taurocholate co-transporting polypeptides from 11 New World and Old World primate species. *PLoS ONE* **13**, e0199200. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199200> (2018).
35. Cichewicz, R. H. & Kouzi, S. A. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. *Med. Res. Rev.* **24**, 90–114. <https://doi.org/10.1002/med.10053> (2004).
36. Moghaddam, M. G., Ahmad, F. B., Samzadeh-Kermani, A. Biological Activity of Betulinic Acid: A Review. *Pharmacol. Pharm.* **03**, 119–123. <https://doi.org/10.4236/pp.2012.32018> (2012).
37. Zhang, D. M. *et al.* Betulinic acid and its derivatives as potential antitumor agents. *Med. Res. Rev.* **35**, 1127–1155. <https://doi.org/10.1002/med.21353> (2015).
38. Greupink, R. *et al.* In silico identification of potential cholestasis-inducing agents via modeling of Na(+)-dependent taurocholate cotransporting polypeptide substrate specificity. *Toxicol. Sci.* **129**, 35–48. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs188> (2012).
39. Kim, R. B. *et al.* Modulation by drugs of human hepatic sodium-dependent bile acid transporter (sodium taurocholate cotransporting polypeptide) activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **291**, 1204–1209 (1999).
40. Kouzuki, H., Suzuki, H., Stieger, B., Meier, P. J. & Sugiyama, Y. Characterization of the transport properties of organic anion transporting polypeptide 1 (oatp1) and Na(+)/taurocholate cotransporting polypeptide (Ntcp): comparative studies on the inhibitory effect of their possible substrates in hepatocytes and cDNA-transfected COS-7 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **292**, 505–511 (2000).
41. Kessler, J. H., Mullauer, F. B., de Roo, G. M. & Medema, J. P. Broad in vitro efficacy of plant-derived betulinic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types. *Cancer Lett.* **251**, 132–145. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.11.003> (2007).
42. Zuco, V. *et al.* Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett.* **175**, 17–25. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(01\)00718-2](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(01)00718-2) (2002).
43. Pisha, E. *et al.* Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat. Med.* **1**, 1046–1051. <https://doi.org/10.1038/nm1095-1046> (1995).
44. Zhan, X. K., Li, J. L., Zhang, S., Xing, P. Y. & Xia, M. F. Betulinic acid exerts potent antitumor effects on paclitaxel-resistant human lung carcinoma cells (H460) via G2/M phase cell cycle arrest and induction of mitochondrial apoptosis. *Oncol. Lett.* **16**, 3628–3634. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9097> (2018).
45. Chen, Y. *et al.* The design, synthesis and structure-activity relationships associated with C28 amine-based betulinic acid derivatives as inhibitors of HIV-1 maturation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **28**, 1550–1557. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.03.067> (2018).
46. Adeleke, G. E. & Adaramoye, O. A. Betulinic acid protects against N-nitrosodimethylamine-induced redox imbalance in testes of rats. *Redox Rep.* **22**, 556–562. <https://doi.org/10.1080/13510002.2017.1322750> (2017).
47. Laavola, M. *et al.* Betulin derivatives effectively suppress inflammation in vitro and in vivo. *J. Nat. Prod.* **79**, 274–280. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00709> (2016).
48. Wan, Y. *et al.* The anti-fibrotic effect of betulinic acid is mediated through the inhibition of NF-kappaB nuclear protein translocation. *Chem. Biol. Interact.* **195**, 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.01.002> (2012).
49. Yao, D. *et al.* Betulinic acid-mediated inhibitory effect on hepatitis B virus by suppression of manganese superoxide dismutase expression. *FEBS J.* **276**, 2599–2614. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06988.x> (2009).
50. Oh, Y. *et al.* Inhibition of organic anion transporting polypeptide 1B1 and 1B3 by betulinic acid: effects of preincubation and albumin in the media. *J. Pharm. Sci.* **107**, 1713–1723. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.02.010> (2018).
51. Geyer, J. *et al.* Cloning and functional characterization of human sodium-dependent organic anion transporter (SLC10A6). *J. Biol. Chem.* **282**, 19728–19741. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702663200> (2007).
52. Alakurtti, S. *et al.* Synthesis and anti-leishmanial activity of heterocyclic betulin derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 1573–1582. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.01.003> (2010).
53. Pohjala, L., Alakurtti, S., Ahola, T., Yli-Kauhala, J. & Tammela, P. Betulin-derived compounds as inhibitors of alphavirus replication. *J. Nat. Prod.* **72**, 1917–1926. <https://doi.org/10.1021/np9003245> (2009).
54. Salin, O. *et al.* Inhibitory effect of the natural product betulin and its derivatives against the intracellular bacterium Chlamydia pneumoniae. *Biochem. Pharmacol.* **80**, 1141–1151. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.06.051> (2010).
55. Rasche, A. *et al.* Highly diversified shrew hepatitis B viruses corroborate ancient origins and divergent infection patterns of mammalian hepadnaviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 17007–17012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1908072116> (2019).

56. de Carvalho Dominguez Souza, B. F. *et al.* A novel hepatitis B virus species discovered in capuchin monkeys sheds new light on the evolution of primate hepadnaviruses. *J. Hepatol.* **68**, 1114–1122, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.01.029> (2018).

Acknowledgements

The authors want to acknowledge Edda Wacker for critical reading of the manuscript and Anita Neubauer for her competent support in carrying out the experiments. We also thank Dr. Gary Grosser for his excellent scientific support regarding the setup of inhibition studies. This study was supported by Flex Funds from the LOEWE-Center DRUID (Novel Drug Targets against Poverty-related and Neglected Tropical Infectious Diseases) and in part by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) – Projektnummer 197785619 – SFB 1021 and the Foundation for Research of Natural Resources in Finland, Marjatta ja Eino Kollin Säätiö, and the COST Action CM-0801 (New drugs for neglected diseases).

Author contributions

M.K., S.F.M., K.A.A.T.L. and J.G. conceived the experiments, M.K., S.F.M. and K.A.A.T.L. performed the experiments, M.K., S.F.M., K.A.A.T.L. and J.G. analyzed and interpreted the results, N.G., F.L. and D.G. provided materials and laboratories for infection studies, S.A. and J.Y.K. provided derivatives of betulin, M.K., S.F.M., K.A.A.T.L. and J.G. wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.G.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

RESEARCH ARTICLE

Liver and Biliary Tract Physiology/Pathophysiology

Long-term *trans*-inhibition of the hepatitis B and D virus receptor NTCP by tauroolithocholic acid

Kira A. A. T. Lowjaga,¹ Michael Kirstgen,¹ Simon F. Müller,¹ Nora Goldmann,² Felix Lehmann,² Dieter Glebe,² and  Joachim Geyer¹

¹Faculty of Veterinary Medicine, Institute of Pharmacology and Toxicology, Justus Liebig University, Giessen, Germany; and

²Institute of Medical Virology, National Reference Center for Hepatitis B Viruses and Hepatitis D Viruses, Justus Liebig University, Giessen, Germany

Abstract

Human hepatic bile acid transporter Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) represents the liver-specific entry receptor for the hepatitis B and D viruses (HBV/HDV). Chronic hepatitis B and D affect several million people worldwide, but treatment options are limited. Recently, HBV/HDV entry inhibitors targeting NTCP have emerged as promising novel drug candidates. Nevertheless, the exact molecular mechanism that NTCP uses to mediate virus binding and entry into hepatocytes is still not completely understood. It is already known that human NTCP mRNA expression is downregulated under cholestasis. Furthermore, incubation of rat hepatocytes with the secondary bile acid tauroolithocholic acid (TLC) triggers internalization of the rat Ntcp protein from the plasma membrane. In the present study, the long-term inhibitory effect of TLC on transport function, HBV/HDV receptor function, and membrane expression of human NTCP were analyzed in HepG2 and human embryonic kidney (HEK293) cells stably overexpressing NTCP. Even after short-pulse preincubation, TLC had a significant long-lasting inhibitory effect on the transport function of NTCP, but the NTCP protein was still present at the plasma membrane. Furthermore, binding of the HBV/HDV myr-preS1 peptide and susceptibility for in vitro HDV infection were significantly reduced by TLC preincubation. We hypothesize that TLC rapidly accumulates in hepatocytes and mediates long-lasting *trans*-inhibition of the transport and receptor function of NTCP via a particular TLC-binding site at an intracellularly accessible domain of NTCP. Physiologically, this *trans*-inhibition might protect hepatocytes from toxic overload of bile acids. Pharmacologically, it provides an interesting novel NTCP target site for potential long-acting HBV/HDV entry inhibitors.

NEW & NOTEWORTHY The hepatic bile acid transporter NTCP is a high-affinity receptor for hepatitis B and D viruses. This study shows that TLC rapidly accumulates in NTCP-expressing hepatoma cells and mediates long-lasting *trans*-inhibition of NTCP's transporter and receptor function via an intracellularly accessible domain, without substantially affecting its membrane expression. This domain is a promising novel NTCP target site for pharmacological long-acting HBV/HDV entry inhibitors.

entry inhibitor; HBV; NTCP; tauroolithocholic acid; trans-inhibition

INTRODUCTION

Although an effective vaccine is available, hepatitis B virus (HBV) and hepatitis D virus (HDV) infections remain a major global health problem. More than 250 million people worldwide are chronically infected with HBV, and thousands of them suffer from hepatocellular carcinoma (HCC) or develop terminal liver cirrhosis. About 5% of chronic HBV carriers are coinfecting with HDV, a situation often associated with disease progression and increased mortality rates (1). The hepatitis D virus is an HBV satellite virus, and both share identical envelope proteins (2). Current standard therapies include nucleoside reverse transcriptase inhibitors

and interferon. However, both of these are not curative in the majority of cases (3–5).

In 2012, Yan et al. (6) identified the liver bile acid transporter Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP, gene symbol *SLC10A1*) as the high-affinity hepatic entry receptor for HBV and HDV. NTCP belongs phylogenetically to the solute carrier family SLC10 and is typically expressed at the basolateral membrane of hepatocytes (7, 8), explaining the clear hepatotropism of HBV and HDV. NTCP, together with other bile acid carriers (including ASBT, OST α/β , and BSEP), is essential for the maintenance of the enterohepatic circulation of bile acids between liver and gut (9). In detail, NTCP mediates a sodium-dependent reuptake of mostly



conjugated bile acids from portal blood back into hepatocytes (7).

It is already known that HBV and HDV attach to NTCP via their myristoylated preS1 domain comprising the NH₂-terminal amino acids 2–48 of the large HBV surface protein, briefly called myr-preS1 lipopeptide (10, 11). To date, it is generally accepted that myr-preS1-mediated HBV/HDV binding to NTCP represents the mandatory high-affinity attachment step of viral entry into hepatocytes (12, 13). Previously, we showed that HBV/HDV myr-preS1-mediated viral binding to NTCP directly interferes with the physiological bile acid transport function of NTCP (14). Briefly, the myr-preS1 peptide blocked the bile acid transport in primary human hepatocytes and NTCP-overexpressing HepG2 hepatoma cells in a concentration-dependent manner. Vice versa, bile acids significantly inhibited myr-preS1 binding to NTCP as well as in vitro HBV infection (14). This effect most likely occurs via *cis*-inhibition at overlapping binding sites for bile acids and the myr-preS1 peptide at respective extracellular accessible domains of NTCP. In support of this assumption, we have recently shown that mutation of amino acid G158 at the second extracellular loop of human NTCP completely abolished myr-preS1 peptide binding to NTCP without affecting the bile acid transport function of NTCP (15). Other amino acids of NTCP, such as S267, which is located within transmembrane domain 8 (TMD8) in proximity to the extracellular loop connecting TMD8 and TMD9, proved to be essential for the binding of both bile acids and myr-preS1 peptide (16, 17). Interestingly, the naturally occurring NTCP variant S267F showed reduced transport activity for taurocholic acid (TC) but maintained transport of other substrates such as rosuvastatin and estrone-3-sulfate (16, 18). Patients bearing this S267F variant were less susceptible to chronic HBV infection and showed decreased risk for HCC and liver cirrhosis under chronic HBV infection (19–23). Overall, these data indicate that the extracellular NTCP-binding sites for its transport substrates and for the myr-preS1 peptide overlap, but both can be separated by mutation (14, 15, 17).

In contrast to this *cis*-inhibitory effect, pulse preincubation with the secondary bile acid tauroolithocholic acid (TLC) followed by intensive washout had a long-lasting inhibitory effect on the transport function of NTCP, which cannot be explained by *cis*-inhibition (14, 24). Interestingly, this effect was not observed after preincubation with other bile acids such as TC, glycocholic acid (GC), or tauroursodeoxycholic acid (TUDC) (14). It was shown that NTCP mRNA expression is downregulated in patients with cholestasis, probably due to signals induced by bile acid overload (25). While long-term incubation with TLC in rat hepatocytes significantly decreased the plasma membrane expression of rat Ntcp, plasma membrane expression of human NTCP remained unaffected under comparable conditions (24). However, it is currently unclear how TLC mediates this long-term inhibitory effect on human NTCP without affecting substantially its membrane expression. Furthermore, it is of interest if and how this effect influences the susceptibility of hepatocytes for HBV/HDV infection. To address these questions, we analyzed the effect of pulse preincubation of TLC on the transport function, membrane expression, myr-preS1 peptide binding, and in vitro HDV infection in NTCP-overexpressing HepG2 and HEK293 cells. We found a long-lasting inhibitory

effect of TLC on the NTCP transporter and receptor function as well as on in vitro HDV infection that might be explained by *trans*-inhibition of NTCP via a particular TLC-binding site at an intracellularly accessible domain of NTCP.

MATERIALS AND METHODS

Cell Lines and Induction

Human embryonic kidney (HEK293; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) cells, stably expressing the human NTCP protein, NH₂-terminally tagged with the HA-epitope and COOH-terminally with FLAG-tag were maintained at 37°C, 5% CO₂, and 95% humidity in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)/Ham's F12 medium (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany), 4 mM L-glutamine (PAA, Cölbe, Germany), and penicillin/streptomycin (PAA). Human hepatoma HepG2 cells, stably transfected with NTCP-FLAG [see more detailed description in (14)], and HepG2-tet-on cells (BD Clontech, Heidelberg, Germany) were cultured under the same conditions in DMEM with all supplements listed above, except for L-glutamine. For induction of the transgene, the medium was supplemented with 1 µg/mL tetracycline (Roth, Karlsruhe, Germany) for HA-NTCP-FLAG-HEK293 cells (further referred to as NTCP-HEK293 cells) or 2 µg/mL doxycycline (Sigma-Aldrich) for NTCP-FLAG-HepG2 cells (further referred to as NTCP-HepG2 cells). NTCP-HepG2 cells were used for all HDV infection experiments as reported before (14). HepG2-tet-on cells were transiently transfected using XtremeGENE 9 (Roche Diagnostics, Basel, Germany) with a pcDNA5-FRT-TO plasmid (Thermo Fisher Scientific) containing HA-NTCP-FLAG for plasma membrane expression studies. All cell lines were tested negatively for mycoplasma contamination according to the protocol of Uphoff and Drexler (26).

Synthesis of [³H]Tauroolithocholic Acid

[³H]Taurine conjugation of lithocholic acid (LC) was done via a modified protocol of Kramer et al. (27), which represents an adapted Norman's method (28). Briefly, 1 mg (2.7 µM) LC (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan) was dissolved in 80 µL of anhydrous dioxane. To this solution, 10 µL of triethylamine (Sigma-Aldrich) was added, followed by incubation for 10 min at 23°C. Then, 10 µL of 1% ethyl chloroformate (Thermo Fisher Scientific) solved in dioxane was added and incubated for additional 30 min at 23°C. In a second cup, 200 µL of a 50 µM [³H]taurine hydrochloride solution (Bio Trend, Cologne, Germany; 20 Ci/mmol, 1 mCi/mL, 0.0225 fmol/dpm) was evaporated, and 40 µL of a 10 mM aqueous NaOH solution (Roth) and 40 µL of anhydrous dioxane were added. Finally, 15 µL of the LC-containing solution was added to the [³H]taurine solution and incubated for 24 h at 23°C. The resulting solution was cleaned up by thin-layer chromatography (Gina-Star, Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt, Germany) to a purity of 90%. Pre-coated plates with silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Germany) were used in the solvent system butanol-acetic acid-water 5:2:3 (vol/vol). [³H]Tauroolithocholic acid ([³H]TLC) was eluted with methanol (Roth) from the silica gel.

Bile Acid Transport Assays

Qualitative and quantitative transport experiments were performed in NTCP-HEK293 cells with the fluorescent bile acid 4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole taurocholic acid (NBD-TC) in DMEM (29). Nuclei were stained with Hoechst33342 (Thermo Fisher Scientific), and qualitative transport was analyzed on a DMI6000 B inverted fluorescent microscope (Leica, Wetzlar, Germany). Quantification of relative fluorescence was assessed by fluorescence reader GloMax (Promega, Madison, WI). Additional quantitative transport measurements were performed with [³H]taurocholic acid ([³H]TC, 20 Ci/mmol, 0.09 mCi/mL, PerkinElmer, Waltham, MA), [³H]TLC (see above), and [³H]dehydroepiandrosterone sulfate ([³H]DHEAS, 81.3 Ci/mmol, 1 mCi/mL, PerkinElmer) in NTCP-HEK293 cells by liquid scintillation counting on liquid scintillation analyzer Tri-Carb 2910 TR (PerkinElmer) as reported (30).

Determination of the Inhibitory Concentrations for [³H]TC Uptake

Bile acid transport measurements were performed in NTCP-HEK293 cells with [³H]TC as reported before (30). Briefly, cells were seeded onto polylysine-coated 96-well plates, induced with 1 μg/mL tetracycline, and grown to 100% confluence over 72 h at 37°C. After preincubation with TLC, cells were washed three times with tempered DMEM. Then, medium was replaced by 80 μL DMEM containing the respective inhibitor or solvent alone (positive control), and cells were further incubated for 5 min at 37°C. Bile acid transport experiments were started by adding 20 μL DMEM containing 25 μM [³H]TC (final concentration: 5 μM). Experiments were stopped after 10 min by washing twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 7.3 mM Na₂HPO₄, pH 7.4). For negative control, the NTCP-HEK293 cells were not induced with tetracycline (-tet). Cell-associated radioactivity of [³H]TC was quantified by liquid scintillation counting in a Packard Microplate Scintillation Counter TopCount NXT (Packard Instrument Company, Meriden, CT). Transport rates were determined in disintegrations per minute (dpm). The mean of the negative control was subtracted, and the net transport was expressed as % of positive control. Irbesartan was purchased from Sigma-Aldrich. Inhibitory concentrations (IC₅₀) were calculated using GraphPad Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA).

Qualitative and Quantitative Myr-PreS1 Peptide Binding Assays

An NH₂-terminally myristoylated and COOH-terminally AlexaFluor 568-coupled fluorescent myr-preS1₂₋₄₈ peptide, consisting of amino acids 2–48 of the large HBV subgenotype D3 surface protein was purchased from Biosynthesis (Lewisville, TX) and will further be referred to as myr-preS1-AX568 peptide. Furthermore, a tritium-labeled myr-preS1₂₋₄₈ peptide (myr-GQN-[4,5-³H-Leu]-STSNPLGFFPDHQLDPAFR-ANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVG) was purchased from Pharmaron (Cardiff, UK) and will further be referred to as [³H]myr-preS1 peptide (120 Ci/mmol, 1 mCi/mL). Following bile acid preincubation, cells were washed three times with

DMEM and incubated with 50 nM myr-preS1-AX568 peptide in DMEM at 37°C. After another step of washing, myr-preS1-AX568 peptide binding was assessed on Leica DMI6000 B fluorescent microscope and quantified using ImageJ software (National Institutes of Health). In addition, quantitative binding measurements were performed with 5 nM [³H]myr-preS1 peptide under the same experimental conditions, and detection was performed using liquid scintillation counting.

HDV Infection Experiments

NTCP-HepG2 cells were inoculated with 700 genome equivalents of HDV particles per cell for 6 h. HDV was produced in vitro as reported before (31, 32). Genome equivalents were determined by RT-qPCR. Infection was performed in hepatocyte growth medium (HGM) consisting of William's E medium (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 2% bovine serum albumin (BSA; Roth), 2 mM L-glutamine (Thermo Fisher Scientific), 100 μg/mL gentamicin (Thermo Fisher Scientific), 10 nM dexamethasone (Sigma-Aldrich), 1 mM sodium pyruvate (Thermo Fisher Scientific), and 1× insulin-transferrin-selenium (Thermo Fisher Scientific). For the 6-h infection period, HGM was additionally supplemented with 2% DMSO (Merck), 4% polyethylene glycol 8000 (Sigma-Aldrich), and 2 μg/mL doxycycline (Sigma-Aldrich) as described (14). Subsequently, cells were washed with DMEM and further cultured in HGM supplemented with 2% DMSO and 2 μg/mL doxycycline. Medium was changed every 3–4 days until cells were fixed at *days 9–11* post infection with 3% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) in PBS for 30 min at room temperature (RT). Cells were permeabilized with 0.2% Triton X 100 (Roth) in PBS for 30 min at RT, and blocked by incubation with 5% BSA in PBS for 30 min at RT. For HDV antigen (HDAg) detection, as a marker of HDV infection, cells were immunostained using purified human anti-HDV-positive serum at 37°C for 1 h (1:400 dilution) and goat anti-human IgG secondary antibody coupled to Alexa Fluor 568 (1:400 dilution, Thermo Fisher Scientific, Cat. No. A-21090, Lot No. 2126795) for 1 h at 37°C as described (31,32). Nuclei were stained with Hoechst33342 (1 μg/mL, Thermo Fisher Scientific).

Nonpermeabilized Immunofluorescence Assay

After bile acid incubation, NTCP-HEK293 as well as HepG2-tet-on cells, transiently expressing the HA-NTCP-FLAG protein, were fixed with 3% paraformaldehyde (Roth) and blocked with 5% BSA (Sigma-Aldrich) in PBS for 30 min at RT. Subsequently, monoclonal mouse anti-HA antibody (1:400 dilution for HEK293 and 1:800 for HepG2 cells, Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 32–6700, Lot No. QL217972) was incubated for 1 h at 37°C, followed by goat anti-Mouse IgG Alexa Fluor 488 (1:800 dilution, Thermo Fisher Scientific, Cat. No. A-11001, Lot No. 1907294) and nuclear staining with Hoechst 33342 (1 μg/mL). NTCP-HEK293 cells were qualitatively analyzed on Leica DMI6000 B inverted fluorescent microscope or quantitatively measured using multimode microplate reader Spark 10 M (Tecan, Männedorf, Switzerland) as reported before (33), with the following settings: fluorescence mode with bottom detection, 488 ± 20 nm bandwidth monochromator for excitation, optimal gain, 4 × 4 reads per well, and 535 ± 25 nm bandwidth

emission filter. For quantification of relative fluorescence of HepG2-tet-on transiently expressing the HA-NTCP-FLAG protein, samples were assessed on Leica DMI6000 B fluorescent microscope and analyzed using LAS-X imaging software (Leica). Cell-based fluorescence was determined by defined regions of interest (ROI), and data are presented as the mean background-subtracted fluorescence intensity of nontransfected HepG2 cells.

Lactate Dehydrogenase Release Cytotoxicity Assay

Pierce lactate dehydrogenase release (LDH) cytotoxicity assay (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 88954) was performed according to the manufacturer's protocol. Briefly, NTCP-HEK293 and NTCP-HepG2 cells were incubated with bile acids over 2 h or 6 h at 37°C. After 2 h, 50 µL of each sample and control medium was transferred to a new well plate, 50 µL of reaction mixture were added, and incubated for 30 min at RT. Finally, the reaction was stopped by adding 50 µM of stop solution and measured by ELISA reader (PHoMo, anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld, Germany). Lysis control (maximal LDH-control) was incubated 45 min with lysis buffer at 37°C.

MTS Cytotoxicity Assay

The CellTiter 96 Aqueous MTS colorimetric cell viability assay (Promega, Cat. No. G3581) was performed according to the manufacturer's protocol. NTCP-HEK293 and NTCP-HepG2 cells were incubated 2 h with 100 µL DMEM without phenolred (Thermo Fisher Scientific) containing bile acids at 37°C and 5% CO₂ atmosphere. Thereafter, 20 µL of CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent were added and incubated 1 h at 37°C and 5% CO₂. Using fluorescence reader GloMax (Promega) absorbance was recorded at 450 nm.

Surface Biotinylation and Western Blotting

NTCP-HepG2 cells were seeded onto six-well plates, were induced (NTCP-FLAG expression) or not induced (paternal cells without NTCP-FLAG expression), and were cultured for 3 days to reach confluence. For biotinylation, cells were rinsed three times with PBS. Then, cells were incubated at 4°C on a rocking shaker at 30 rpm for 60 min with 0.5 mg EZ-Link NHS-PEG₁₂-Biotin solved in 1,000 µL PBS per well. Biotinylation was stopped by rinsing three times with culture medium and then two times with PBS. Cells of the respective wells were harvested in 1 mL lysis buffer (PBS containing 1.2% Triton X100, Sigma-Aldrich) and 10 µL of protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 87785). The lysate was centrifuged at 10,000 g for 2 min to remove debris and DNA. Protein concentration of the supernatant was determined by bicinchoninic acid (BCA) assay following the manufacturer's protocol (Novagen, Darmstadt, Germany, Cat. No. 71285-3) and was measured with NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific) photometer in BCA assay application. Cell lysates were adjusted to 400 ng/mL by dilution with lysis buffer. For each cell lysate, 50 µL streptavidin magnetic beads (Pierce, Cat. No. 88817) were equilibrated with lysis buffer. For pull down, 50 µL equilibrated beads were incubated at 4°C overnight with 900 µL of lysate within 1.5 mL Eppendorf tubes on rotating stand. On

the next day, beads were adsorbed to the tube wall by a magnetic stand, surplus buffer was withdrawn, 900 µL fresh buffer was added, and beads were resuspended and rotated for 10 min at 4°C. This washing process was repeated three times. To prepare for Western blotting, beads were adsorbed by a magnetic stand and the surplus was removed. Then, the beads were resuspended in 65 µL Laemmli buffer and incubated at 80°C and 1,200 rpm for 10 min. After centrifugation, 20 µL of the obtained supernatant per well was separated on 10% SDS gel followed by Western blotting. The nitrocellulose membrane was blocked for 1 h at RT in 5% milk powder (Sigma-Aldrich) in tris-buffered saline-Tween 20 [TBS-T; 137 mM NaCl, 10 mM Tris (Roth), pH 8.0, 0.05% Tween-20 (Roth)] and then stained with primary anti-FLAG antibody (anti-FLAG rabbit antibody, 1:2,000 dilution, Sigma-Aldrich, Cat. No. F7425, Lot No. 0000099715) overnight in 5% milk powder in TBS-T at 4°C. The membrane was washed three times in TBS-T and incubated at RT with secondary anti-rabbit-HRP antibody (anti-rabbit-HRP goat, 1:4,000 dilution, Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 31460, Lot No. UK293475). Both antibodies were widely used before (34, 35). After final washing in TBS-T, the membrane was rinsed with Roti-Lumin substrate (Roth, Cat. No. P078.1), transferred to an imager, and exposed for 20 min (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Germany). Image analysis was done with Image Lab 6.1 (Bio-Rad Laboratories, CA).

Statistics

Data are shown as means ± SD. Prism software (GraphPad Prism 6.0) was used for data presentation and statistical analysis. Statistical analysis was performed by one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's multiple comparison post hoc test as indicated in the figure legends. For IC₅₀ calculations, statistical analysis was done by two-way ANOVA and Sidak's multiple comparisons post hoc test.

Graphical Abstract

Chemical structures of bile acids and DHEAS were generated using PubChem (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD).

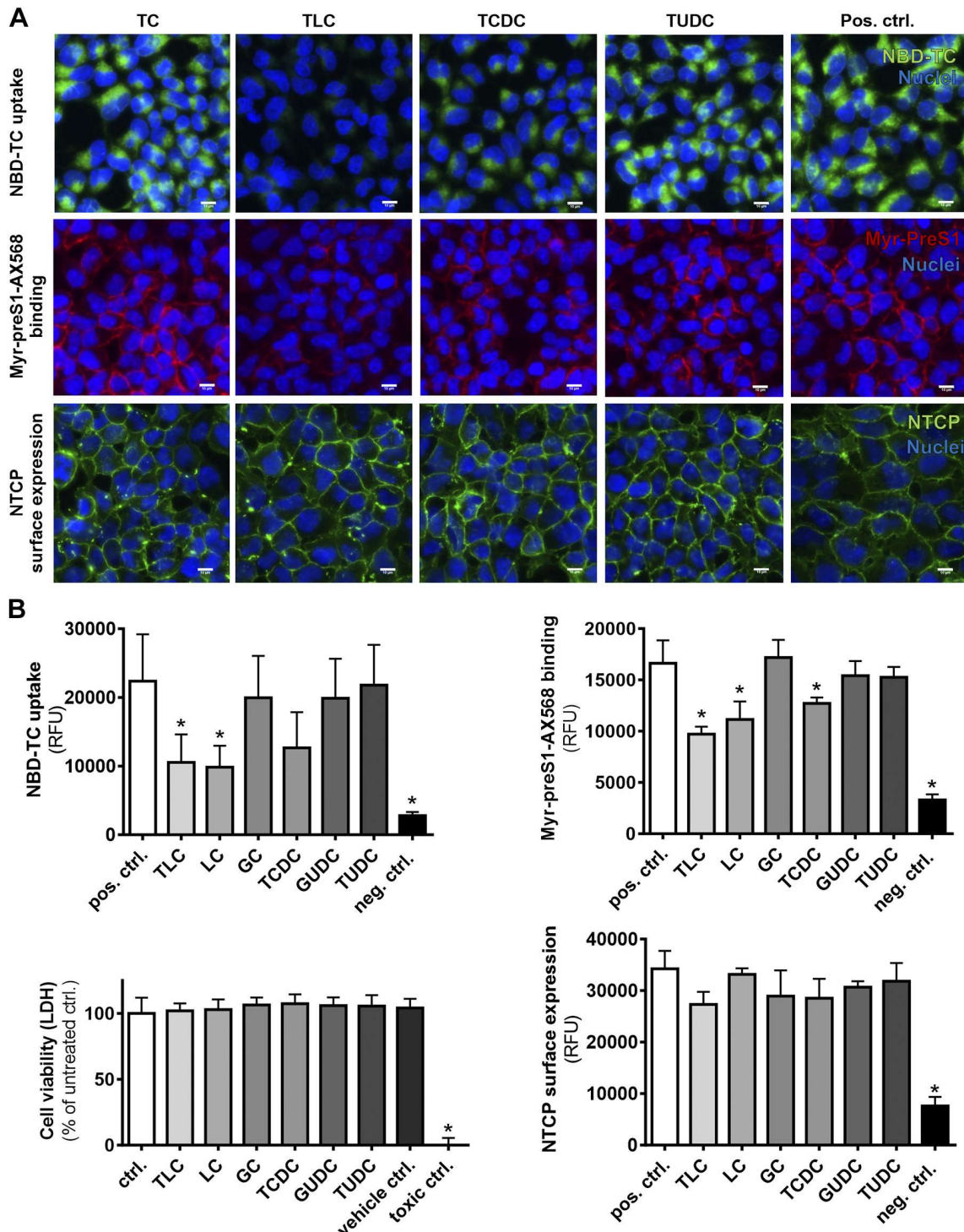
RESULTS

TLC-Induced Inhibition of NTCP's Transporter and Receptor Function

To analyze the effect of bile acid preincubation on the transporter and virus receptor function of NTCP, NTCP-HEK293 cells were used for transport experiments with the fluorescent bile acid NBD-TC and for binding experiments with the red fluorescent myr-preS1-AX568 peptide. In addition, anti-HA immunofluorescence was performed to detect the HA-NTCP-FLAG protein. Because the HA-coupled NH₂-terminus of NTCP is outward oriented and these experiments were performed under nonpermeabilized conditions, fluorescence signals indicate plasma membrane expression of NTCP under these experimental conditions. As expected, positive control cells without bile acid preincubation showed strong accumulation of NBD-TC and significant binding of

the myr-preS1-AX568 peptide to the surface of the cells (Fig. 1A). In addition, clear fluorescence staining of NTCP was detected at the plasma membrane of nearly all cells. This pattern was not much different, when NTCP-HEK293 cells were preincubated with 25 μ M TC or TUDC for 30 min followed by thorough washout before the respective experiments. As both bile acids demonstrated a potential for NTCP *cis*-inhibition of bile acid transport and myr-preS1 peptide

binding in our previous study (14), this indicates that the washout of the preincubated bile acids was sufficient to avoid such a *cis*-inhibition. In the case of taurochenodeoxycholic acid (TCDC), NBD-TC and myr-preS1-AX568 peptide showed a trend for lower relative fluorescence, but NTCP expression was still clearly detected at the plasma membrane. In contrast, preincubation of 25 μ M TLC nearly abolished NBD-TC transport and myr-preS1-AX568 peptide



binding, but plasma membrane expression of NTCP was apparently not changed (Fig. 1A). The latter indicates that the drop in NTCP transport and receptor function was not caused by internalization or degradation of NTCP in these experiments. These qualitative data were verified by quantification of the relative fluorescence units for NBD-TC transport, myr-preS1-AX568 peptide binding, and anti-HA immunofluorescence (Fig. 1B). Most bile acids had no significant effect on the NBD-TC transport and myr-preS1 binding functions of NTCP. TCDC again showed a trend for lower NBD-TC transport and significantly reduced myr-preS1-AX568 peptide binding compared with the solvent-treated NTCP-HEK293 cells. Even more pronounced, 25 μ M TLC and also lithocholic acid (LC) significantly reduced the NBD-TC transport via NTCP and the myr-preS1-AX568 peptide binding to levels of \sim 50% compared with the positive control. Of note, none of these bile acids induced any cytotoxic effect in the LDH cytotoxicity assay after preincubation even with 50 μ M, indicating full cell viability in this experimental setup. NTCP cell surface expression detected by anti-HA immunofluorescence was also not significantly altered by preincubation with any of the bile acids used.

TLC Preincubation Does Not Abolish Transport of [³H]TLC via NTCP

During these experiments, the question arose whether the inhibitory effect of TLC on the transporter and receptor function of NTCP is limited only to the substrate NBD-TC. Because this is not a physiological bile acid, the effect of bile acid preincubation on the transporter and receptor function of NTCP was also investigated with the radiolabeled bile acid [³H]TC (Fig. 2A), as well as with [³H]DHEAS (Fig. 2C) and [³H]TLC itself (Fig. 2B) as additional substrates of NTCP. Bile acid preincubation was performed in sodium-containing buffer supporting active transport via NTCP (filled bars) or under sodium-free buffer conditions preventing bile acid transport (open bars). These assays were complemented by binding experiments with the [³H]myr-preS1 peptide lacking the covalently coupled fluorophore of the myr-preS1-AX568 peptide (Fig. 2D). TLC preincubation over 2 h induced a dramatic decline of the [³H]TC transport and [³H]myr-preS1 peptide binding (Fig. 2, A and D). In contrast, 2-h preincubation with GC had only moderate effects on both functions of NTCP. Interestingly, [³H]DHEAS behaved quite similarly to [³H]TC. Its transport was drastically blocked by TLC preincuba-

tion, while preincubation with GC only moderately, but significantly, reduced the [³H]DHEAS transport rate via NTCP (Fig. 2C). Of note, the inhibitory effect of TLC preincubation was only effective when the preincubation was performed in sodium-containing buffer, meaning that the sodium-dependent TLC uptake via NTCP during the preincubation phase is a prerequisite for this effect. Finally, the transport of [³H]TLC via NTCP was analyzed after 2-h preincubation with 25 μ M TLC itself and with 25 μ M GC (Fig. 2B). Remarkably, TLC preincubation did not alter its own ([³H]TLC) transport and basically behaved like GC preincubation only in the case of [³H]TLC as transport substrate. These data indicate that TLC preincubation retains not only plasma membrane expression of NTCP but also its principal transport function, at least for TLC. Therefore, it is unlikely that NTCP is just inactivated, for example, by phosphorylation, or dislocated from the plasma membrane by TLC preincubation. To verify that these effects are not just caused by cytotoxic side effects of the preincubated bile acids, additional MTS cytotoxicity assay was performed with TLC and GC under comparable experimental conditions (Fig. 2E). We found no cytotoxic effect for bile acid preincubation that could explain the specific long-term inhibitory effect of TLC.

Inhibitory Effect of TLC Depends on Its Intracellular Concentration

Next, speed and duration of the inhibitory effect of TLC preincubation on the transport function of NTCP were analyzed. For these experiments, NTCP-HEK293 cells were preincubated with 25 μ M TLC over time periods ranging from 10 s up to 6 h (Fig. 3, A and C). In these experiments, the TC transport activity of NTCP started to decrease significantly after 2 min of TLC preincubation and reached the nadir already at 20 min (Fig. 3C). Longer preincubation times of up to 6 h did not further decrease the transport activity (Fig. 3A). Again, this effect was specific for [³H]TC as the tested transport substrate of NTCP, whereas TLC preincubation had no significant effect on its own ([³H]TLC) transport activity via NTCP even over longer periods of time (Fig. 3C, right). Furthermore, it was analyzed how long this inhibitory effect of TLC may last and if NTCP's transport activity for TC would recover at any time. To address this question, NTCP-HEK293 cells were preincubated with 25 μ M TLC over 2 h. After intensive washing, cells were further incubated in bile acid-free DMEM over time periods of 2 h up to 8 h at 37°C. As clearly

Figure 1. Qualitative and quantitative effects of bile acid preincubation on NTCP's transporter function, receptor function, and surface expression. **A:** HEK293 cells, stably expressing the HA-NTCP-FLAG protein were seeded and induced with 1 μ g/mL tetracycline. Cells were incubated over 30 min with 25 μ M TC, TLC, TCDC, TUDC, or solvent alone (positive control), respectively. After intensive washing, NBD-TC transport, myr-preS1-AX568 peptide binding, and anti-HA immunofluorescence under nonpermeabilized conditions were analyzed. NTCP transport was verified with 5 μ M NBD-TC for 30 min at 37°C. Myr-preS1 peptide binding was analyzed with 50 nM of the myr-preS1-AX568 peptide for 20 min at 37°C. For detection of NTCP surface expression, nonpermeabilized cells were incubated with the anti-HA antibody for 1 h at 37°C. All assays were qualitatively assessed by fluorescence microscopy (green: NBD-TC and anti-HA fluorescence; red: myr-preS1-AX568 peptide fluorescence; blue: nuclei). Scale bars: 10 μ m. **B:** for quantification of these effects, NTCP-HEK293 cells were induced with 1 μ g/mL tetracycline (negative control: cells without tetracycline induction) and were preincubated with 25 μ M of the indicated bile acids or solvent alone (positive control) for 2 h. After intensive washing with DMEM the following was analyzed: 5 μ M NBD-TC uptake for 10 min at 37°C, 50 nM myr-preS1-AX568 peptide binding for 20 min at 37°C, and anti-HA immunofluorescence on nonpermeabilized cells. Cell viability was assessed under comparable experimental conditions with 50 μ M of the indicated bile acids. Vehicle control represents cells incubated with solvent (DMSO) alone, and toxic control represents cells lysed with lysis buffer. RFU, relative fluorescent units. Data represent means \pm SD of minimum triplicate determinations of representative experiments. *Significantly different from positive control, $P < 0.05$ (one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison post hoc test). DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; GC, glycocholic acid; GUDC, glyoursodeoxycholic acid; HA, HA tag; HEK293, human embryonic kidney cells; LC, lithocholic acid; NBD-TC, 4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole taurocholic acid; neg. ctrl., negative control; NTCP, Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide; pos. ctrl., positive control; TC, taurocholic acid; TCDC, taurochenodeoxycholic acid; TLC, tauroolithocholic acid; TUDC, taoursodeoxycholic acid.

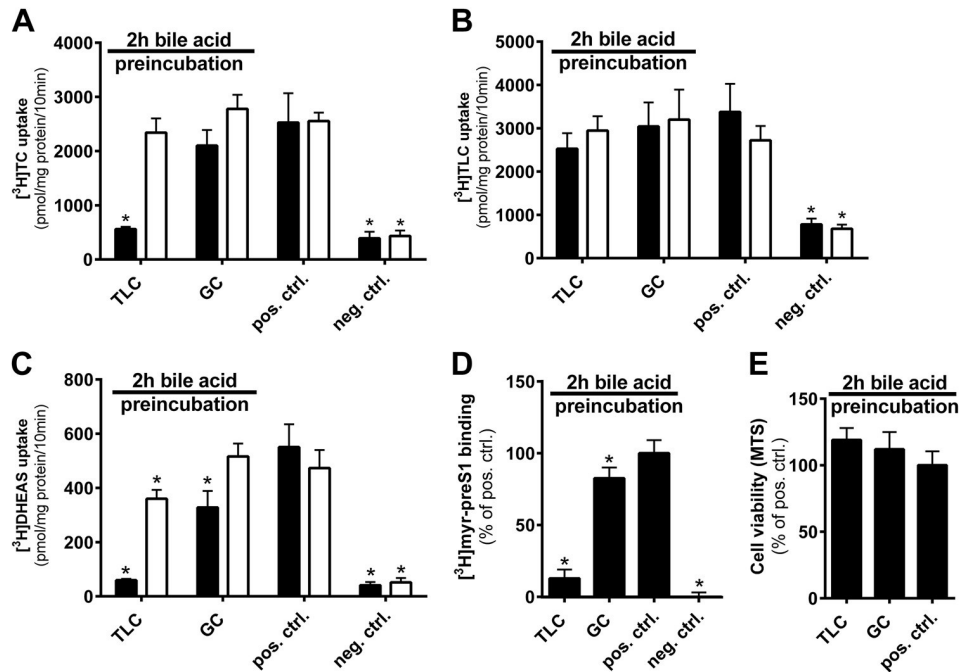


Figure 2. Effect of TLC on NTCP's transporter and receptor function. The effect of TLC on the transporter and receptor function of NTCP was analyzed in NTCP-HEK293 cells. NTCP expression was induced by tetracycline (except for the negative control) for 72 h. A–E: cells were preincubated with 25 μM TLC, 25 μM GC or solvent alone (positive control) solved in sodium-containing (black columns) or sodium-free (white columns) transport buffer over 2 h at 37°C. Then, cells were rinsed three times with sodium-free buffer. For uptake experiments, cells were incubated at 37°C for 10 min with 10 μM [³H]TC (A), 10 μM [³H]TLC (B), or 10 μM [³H]DHEAS (C), respectively, solved in sodium-containing transport buffer. D: binding of 5 nM [³H]myr-preS1 peptide was analyzed for 10 min at 37°C in DMEM after preincubation with the respective bile acid at 25 μM also solved in DMEM. To determine transport and myr-preS1 binding rates, cell-associated radioactivity was assessed using liquid scintillation counting. E: following 2-h preincubation with 25 μM bile acids, MTS cytotoxicity assay was performed. Data represent means ± SD of two independent experiments, each with quadruplicate determinations (n = 8). *Significantly different from positive control with P < 0.001 (two-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison post hoc test). DHEAS, dehydroepiandrosterone sulfate; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; GC, glycocholic acid; HEK293, human embryonic kidney cells; MTS, MTS tetrazolium; neg. ctrl., negative control; NTCP, Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide; pos. ctrl., positive control; TC, taurocholic acid; TLC, tauroolithocholic acid.

indicated in Fig. 3B, the inhibitory effect of TLC preincubation on the transport activity of NTCP remained relatively constant at its low level, even in the absence of TLC over 8 h post incubation. This indicates that TLC preincubation induced a long-lasting inhibitory effect on the TC transport activity of NTCP. Interestingly, the NTCP surface expression remained constant, even for very long periods of preincubation (up to 6 h) and postincubation (up to 8 h) (Fig. 3, A and B, bottom). Finally, parallel to the transport experiments with NBD-TC and [³H]TC after TLC preincubation, intracellularly accumulated [³H]TLC was quantified. Remarkably, [³H]TLC started to accumulate in the NTCP-HEK293 cells already at 10 s of incubation with 25 μM [³H]TLC. This accumulation then increased in a sigmoidal manner reaching a peak concentration at 60 min. These experiments clearly demonstrate that the inhibitory effect of TLC on the [³H]TC transport function of NTCP increased in the same manner as [³H]TLC accumulated inside the cells and, therefore, most likely occurred by *trans*-inhibition.

TLC-Induced Inhibition of HDV Infection

Next, it was analyzed if the inhibitory effect of TLC also affects the susceptibility of NTCP-HepG2 cells for *in vitro* HDV infection. Because HDV and HBV share identical surface proteins, HDV infection can be regarded as a surrogate of HBV infection. As *in vitro* infection experiments require

incubation of the NTCP-HepG2 cells with HDV virus particles over several hours, it must be noted that only long-term effects can be monitored under these experimental conditions. NTCP-HepG2 cells were incubated with increasing concentrations of TLC or TC over 2 h, followed by intensive washing and incubation with bile acid-free HDV infection medium for 6 h (Fig. 4E). TLC significantly inhibited HDV infection in a concentration-dependent manner. With 25 μM TLC preincubation, the number of HDV-infected cells per well was reduced to ~50%. These data go in line with a strong inhibition of NBD-TC uptake that was also significantly inhibited over 6 h postincubation with 25 μM TLC (Fig. 3A). After 2-h preincubation with 250 μM TLC, the HDV infection rate even dropped to nearly zero infected cells per well. In contrast, 2-h preincubation with TC at 2.5 μM, 25 μM, and 250 μM concentrations reduced the HDV infection rate only slightly, but significantly, compared with the control (without bile acid preincubation). At the highest concentration of 250 μM TC, the infection rate still remained at 50% of the control (Fig. 4E). Of note, NTCP surface expression was mostly maintained at all bile acid preincubation conditions, with TC and TLC at least above 60% of the positive control in nonpermeabilized HepG2 cells expressing the HA-NTCP-FLAG protein (Fig. 4B, top). Additionally, cell surface biotinylated NTCP-HepG2 cells did not show any significant decrease in plasma membrane expression of NTCP after

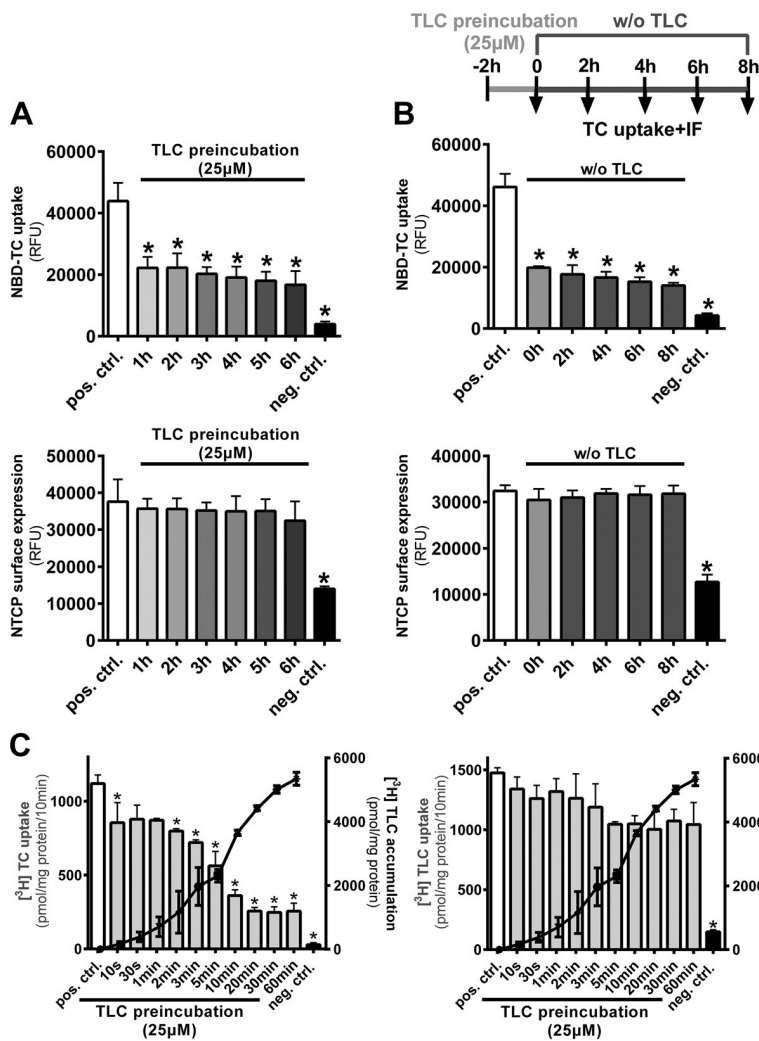


Figure 3. Time dependency of the inhibitory effect of TLC on NTCP's transporter function. NTCP-HEK293 cells were seeded and treated with tetracycline (except for negative control) to induce expression of the HA-NTCP-FLAG protein. After 72 h, cells were preincubated with 25 μM TLC or solvent alone (positive control) in DMEM over the indicated time periods (A, C) or over the fixed period of 2 h (B). A: after the preincubation period of 1 h to 6 h, cells were washed intensively with DMEM, and transport of 5 μM NBD-TC for 10 min and membrane expression of NTCP via anti-HA immunofluorescence were measured in nonpermeabilized cells. B: NTCP-HEK293 cells were preincubated with 25 μM TLC over 2 h, followed by intensive washing and further incubation for 2 h to 8 h in DMEM medium lacking any bile acid (release phase). At the indicated time points, transport of 5 μM NBD-TC was analyzed for 10 min, and anti-HA immunofluorescence was recorded under nonpermeabilized conditions. C: to assess shorter periods of preincubation with 25 μM TLC, preincubation was stopped by intensive washing at the indicated time points ranging from 10 s up to 60 min and uptake of 5 μM [³H]TC or 5 μM [³H]TLC was measured for 10 min (left y-axis, bar graph). For direct comparison of the amount of TLC that would accumulate over the indicated time period of preincubation, accumulation assays with 25 μM [³H]TLC were performed in parallel at 37°C. Data are depicted as line graph at the right y-axis. At the indicated time points, uptake was stopped by washing with ice-cold PBS for both experimental settings, and all samples were subjected to liquid scintillation counting. Data represent means ± SD of three combined independent experiments each with triplicate determinations (n = 9) (A, B), or means ± SD of two combined representative experiments each with quadruplicate determinations (n = 8) (C). *Significantly lower compared with positive control with P < 0.01 (one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison post hoc test). DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; HEK293, human embryonic kidney cells; NBD-TC, 4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole taurocholic acid; neg. ctrl., negative control; NTCP, Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide; pos. ctrl., positive control; TLC, tauroolithocholic acid.

preincubation with TLC or TC (Fig. 4B, bottom). Therefore, the decrease in HDV infection rates cannot be explained by a quantitative loss of NTCP plasma membrane expression.

For comparison, 2.5 μM, 10 μM, 25 μM, and 250 μM TLC or TC were used for *cis*-inhibition of HDV infection (Fig. 5C). In these experiments, the medium contained HDV virus particles and TLC/TC during the 6-h in vitro infection period. As expected, both bile acids had comparable potent inhibitory effects on the HDV in vitro infection rates, with only 8% infected cells per well in the presence of 250 μM TC, and hardly any infected cells per well in the presence of 250 μM TLC, compared with the control (without bile acid coincubation). Both bile acids fully maintained cell viability (measured by LDH cytotoxicity assay) after 6 h of bile acid coincubation and at 4 days postincubation even at the highest concentrations, so that toxic effects on the cells can be excluded (Fig. 5, A and B). This was basically confirmed by additional MTS cytotoxicity tests on NTCP-HepG2 cells that showed full cell viability after 2-h incubation with up to 250 μM TLC (Fig. 4C). These data clearly indicate that TC only had strong inhibitory effects on HDV infection during coincubation (*cis*-inhibition), whereas TLC showed comparable

inhibitory effects after preincubation (*trans*-inhibition) and during coincubation (*cis*-inhibition).

To analyze if parts of the *trans*-inhibitory effect may be induced by bile acid reflux from the cells during the HDV infection, bile acid concentrations were additionally determined in the supernatant at the end of the HDV infection period. Only trace amounts of bile acids refluxed from the cells after preloading with 25 μM and 250 μM of TC or TLC in the preincubation medium (Fig. 4D vs. Fig. 4A). These were determined to 7 μM for TLC and 4 μM for TC after preincubation with 250 μM of the respective bile acid. Of note, both concentrations were not sufficient to *cis*-inhibit in vitro HDV infection (see Fig. 5C) and, therefore, bile acid reflux from the cells is not a relevant factor for interpretation of the in vitro HDV infection experiments after bile acid preincubation.

TLC *Trans*-Inhibition Does Not Change the *Cis*-Binding Kinetics of NTCP

To investigate if the *trans*-inhibitory effect of TLC only affects the transport rate and the myr-preS1 peptide binding capacity of NTCP, or if *cis*-binding kinetics are additionally affected, transport experiments with [³H]TC were performed

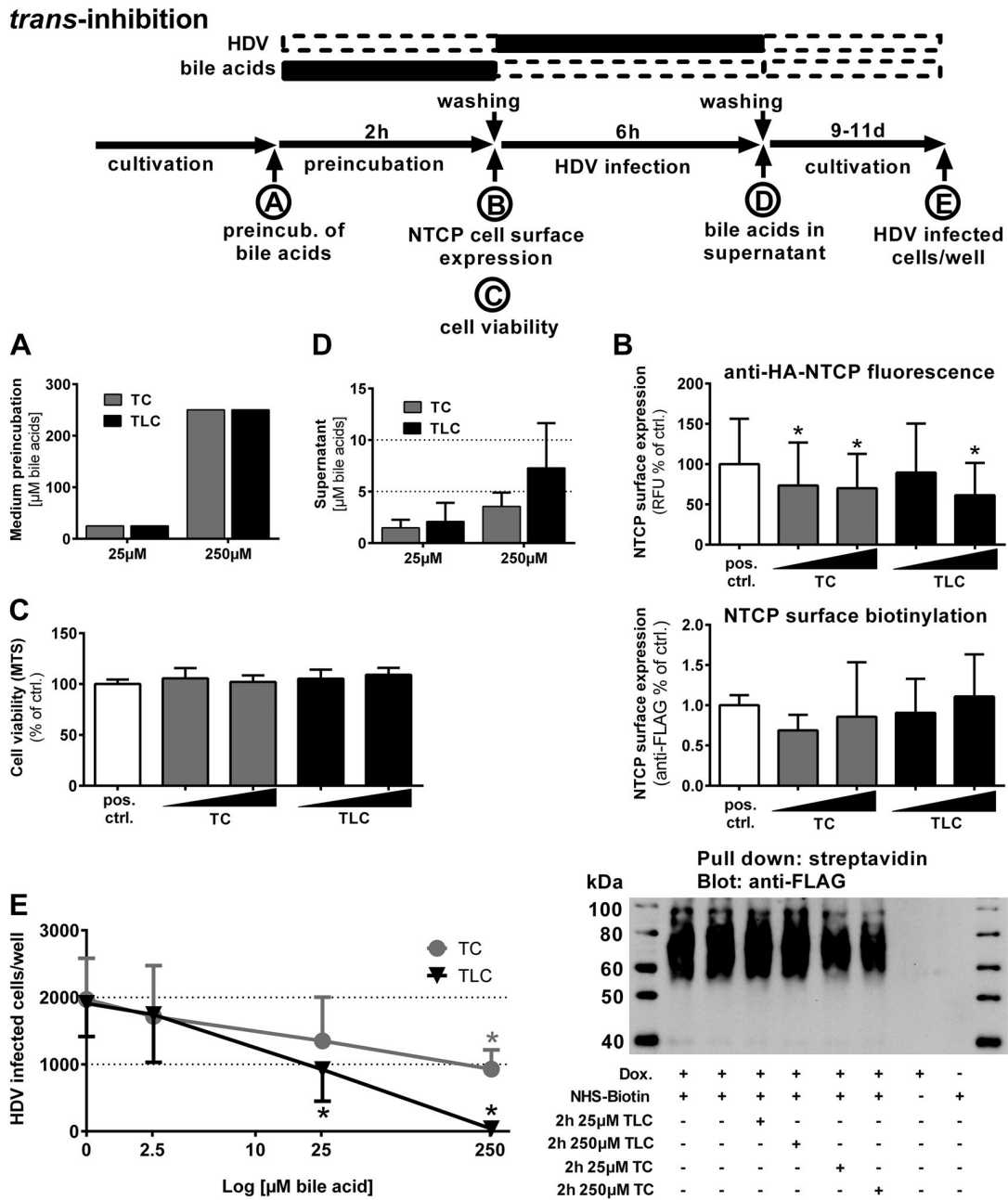


Figure 4. Trans-inhibitory effect of TLC preincubation on in vitro HDV infection. NTCP-HepG2 cells were seeded and incubated with 2 μg/mL doxycycline to induce NTCP expression. **A:** after 3 days, cells were preincubated for 2 h at 37°C with 25 μM and 250 μM of [³H]TC or [³H]TLC, followed by intensive washing. **D:** at 6-h postincubation with DMEM (without any bile acid), the amount of radiolabeled bile acids was measured in the supernatant by liquid scintillation counting. **B, top:** HepG2 cells transiently transfected with the HA-NTCP-FLAG construct were incubated for 2 h with 25 μM and 250 μM of TC or TLC, followed by anti-HA immunofluorescence detection under nonpermeabilized conditions. Samples were analyzed by the LAS-X imaging software, and cell-based fluorescence of 60 individual cells was determined by defined ROI. Data present means ± SD background-subtracted relative fluorescence of two combined experiments (n = 120). **B, bottom:** NTCP-HepG2 cells were incubated for 2 h with 25 μM and 250 μM of TC or TLC, or with solvent alone (positive control) and were subjected to surface biotinylation. The used biotinylation agent EZ-Link NHS-PEG₁₂-Biotin is highly hydrophilic due to its polyethyleneglycol₁₂ spacer arm and allows no membrane penetration. Data represent means ± SD of combined data from four independent experiments. *Significantly lower values compared with positive control with P < 0.001 (one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison post hoc test). In addition, a representative Western blot is depicted. **C:** cell viability was assessed under comparable experimental conditions with 25 μM and 250 μM of TC or TLC, or with solvent alone (positive control). Data represent means ± SD of three independent experiments each with triplicate determinations (n = 9). **E:** NTCP-HepG2 cells were preincubated for 2 h with the indicated concentrations of TC or TLC at 37°C, followed by intensive washing. Then, cells were incubated with bile acid-free HDV infection medium, containing 700 HDV genome equivalents/cell for 6 h at 37°C. Medium was changed every 3–4 days. At days 9–11 post infection, cells were fixed and immunostained against the expression of HDV antigen (HDAG), as a marker of HDV infection. The numbers of infected cells per well were counted using fluorescence microscopy. Data represent means ± SD of three independent experiments each with triplicate determinations (n = 9). *Significantly lower infection rates compared to positive control with P < 0.001 (two-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison post hoc test). DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; HDV, hepatitis D virus; HepG2, HepG2 hepatoma cells; NTCP, Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide; ROI, region of interest; TC, taurocholic acid; TLC, tauroolithocholic acid.

cis-inhibition

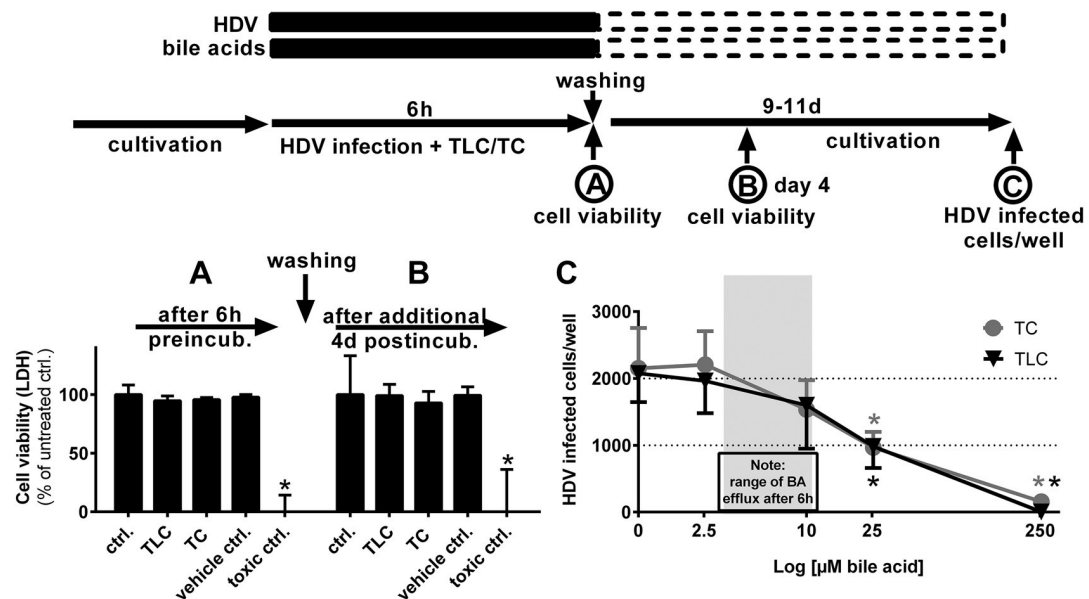


Figure 5. *Cis*-inhibitory effect of TLC coincubation on HDV in vitro infection. NTCP-HepG2 cells, induced with 2 µg/mL doxycycline for NTCP expression, were infected with 700 HDV genome equivalents/cell for 6 h at 37°C in infection medium containing 2.5 µM, 10 µM, 25 µM, or 250 µM of the respective bile acid, TC, or TLC. Cells incubated without any bile acid served as positive control. Medium was changed every 3–4 days, and at days 9–11 post infection, cells were fixed and immunostained against the HDAg. C: the numbers of infected cells per well were counted using fluorescence microscopy. Data represent means ± SD of three independent experiments each with triplicate determinations (*n* = 9). *Significantly lower infection rates compared with positive control with *P* < 0.001 (two-way ANOVA with Dunnett’s multiple comparison post hoc test). At comparable experimental conditions, cell viability of the NTCP-HepG2 cells was assessed with an LDH assay directly after 6 h of bile acid incubation with 250 µM TC or TLC (A) or at day 4 postincubation (B). Vehicle control represents cells incubated with solvent alone and toxic control represents cells lysed with lysis buffer. Data show means ± SD of three independent measurements each with triplicate determinations (*n* = 9). *Significantly lower compared with positive control with *P* < 0.001 (two-way ANOVA with Dunnett’s multiple comparison post hoc test). HDAg, HDV antigen; HDV, hepatitis D virus; LDH, Lactate dehydrogenase release; NTCP, Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide; TC, taurocholic acid; TLC, tauroolithocholic acid.

with and without TLC preincubation in the presence of increasing concentrations of different *cis*-acting ligands. Ursodeoxycholic acid (UDC) was used as a prototypic substrate of NTCP, irbesartan as a potent inhibitor of NTCP, and myr-preS1 as a surrogate parameter for HBV/HDV binding. As expected, TLC preincubation decreased the absolute [³H]TC transport rate dramatically by 79% (Fig. 6A). UDC, irbesartan, and myr-preS1, as *cis*-acting inhibitors, then reduced the transport rate beyond this value to nearly zero at the respective highest inhibitor concentrations (Fig. 6B). Interestingly, IC₅₀ values for [³H]TC transport inhibition did not differ substantially between the two experimental conditions, indicating that TLC *trans*-inhibition affects the overall transport rate of NTCP, but not its *cis*-binding kinetics for substrates, inhibitors, and myr-preS1.

DISCUSSION

Under physiological conditions, bile acids undergo an efficient enterohepatic circulation. This process consists of their continuous hepatocellular canalicular efflux, intestinal reabsorption, and hepatic reuptake. The latter process is mediated by NTCP and members of the organic anion transporting polypeptide (OATP, gene symbol *SLCO*) family (7). During cholestasis, this circulation is disrupted and bile acids start to accumulate in the liver. Via the farnesoid X receptor (FXR,

gene symbol *NRIH4*) and some other nuclear receptors, this intrahepatic bile acid increase leads to an adaptive transcriptional regulation of the hepatic bile acid transporters to prevent hepatocytes from bile acid-induced cellular toxicity (36). Consequently, NTCP is downregulated under cholestasis to reduce the hepatic bile acid uptake, and alternative basolateral efflux transporters such as OSTα/β, MRP3 (gene symbol *ABCC3*), or MRP4 (gene symbol *ABCC4*) are induced to facilitate the transport of bile acids from cholestatic hepatocytes back into the blood (7, 25, 37).

In addition, bile acid uptake via NTCP undergoes dynamic regulation at the protein level (38). In rat hepatocytes as well as in Huh7 hepatoma cells stably expressing rat Ntcp or human NTCP, the plasma membrane expression of the Ntcp/NTCP protein as well as its bile acid transport rates are stimulated by cAMP (24, 39–43). In contrast, bile acids such as TLC induced retrieval of rat Ntcp from the plasma membrane of rat hepatocytes and rat Ntcp-expressing HepG2 cells and thereby limit the bile acid uptake rate (24, 44, 45). As TLC additionally induces retrieval of Bsep and Mrp2 from the canalicular membrane of hepatocytes, this bile acid, overall, produces acute cholestasis by preventing biliary organic anion and bile acid secretion (46, 47). For rat Ntcp, this retrieval process, initiated by cholestatic bile acids, is quite well understood (38) and involves clathrin-dependent endocytosis via the dileucine motif L222/L223 (48). In contrast, short-term regulation of human NTCP has only been

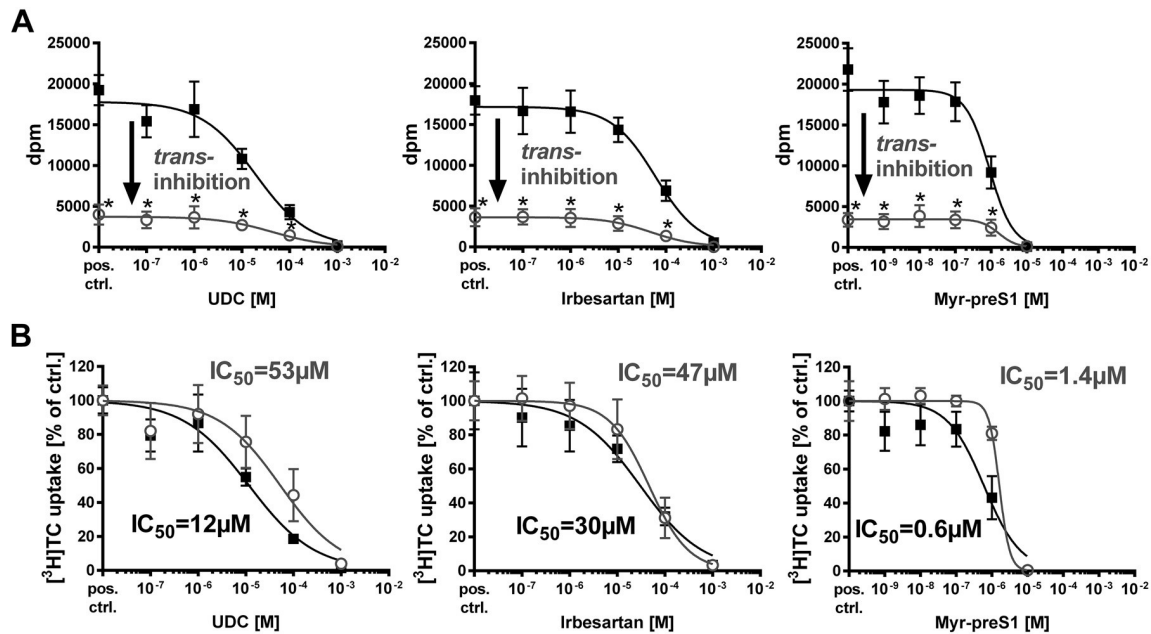


Figure 6. *Cis*-binding kinetics of NTCP at TLC *trans*-inhibition. NTCP-HEK293 cells were incubated with tetracycline to induce NTCP expression and were used for bile acid transport experiments with 5 μM [³H]TC over 10 min at 37°C. Cells without tetracycline treatment were used as negative control. Measurements were performed with solvent alone (positive control) and with increasing concentrations of ursodeoxycholic acid (UDC), irbesartan, and myr-preS1 peptide as *cis*-acting inhibitors of TC uptake in two experimental setups. For the first setup, cells were preincubated with 25 μM TLC over 1 h at 37°C in DMEM, then washed three times with DMEM before the [³H]TC uptake experiments were started (results shown in gray). For the second setup, cells were preincubated with pure DMEM over 1 h at 37°C before the same inhibition experiment was performed (results shown in black). The mean of the negative control was subtracted to calculate net [³H]TC transport rates expressed as dpm (A) or as % of control (B) at the y-axis. Half maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) were calculated from the data expressed as % of control by nonlinear regression analysis using the equation log(inhibitor) vs. response (GraphPad Prism 6). Absolute transport rates are expressed as dpm. Data represent means ± SD of two independent experiments, each with quadruplicate determinations (n = 8). *Significantly lower transport rates with P < 0.01 (two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons post hoc test). DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; HEK293, human embryonic kidney cells; NTCP, Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide; TC, taurocholic acid; TLC, tauroolithocholic acid.

sparsely analyzed so far. Interestingly, human NTCP transport rates can also be inhibited by preincubation with TLC. However, TLC did not decrease the plasma membrane expression of human NTCP in HuH cells as in the rat (24). A previous study by Schonhoff et al. (24) analyzed more closely whether this TLC-induced transport inhibition of human NTCP may involve phosphoinositide-3-kinase (PI3K)-dependent activation of protein kinase PKCε. However, as they could not find a role of the PI3K/PKB pathway, the cellular mechanism that TLC uses to inhibit the transport function of human NTCP is still unclear.

Based on the data of the present study, we suppose that TLC-induced transport inhibition of NTCP involves TLC binding to NTCP from the cytoplasmic side and, thus, can be classified as a *trans*-inhibition mode that was already discussed in a previous publication by Schonhoff et al. (24). In addition to the bile acid transport function of NTCP, its HBV/HDV virus receptor function was analyzed as well, to figure out whether *trans*-inhibition of NTCP could contribute to a better understanding of NTCP-mediated HBV/HDV entry and its pharmacological inhibition. We confirmed that preincubation with particular bile acids significantly inhibited the transport function of NTCP. TLC and LC were equally potent in this regard, whereas TCDC showed only partial inhibition (Fig. 1). In contrast, other bile acids such as TC, GC, or TUDC showed no effect on the transport function of NTCP. This clearly demonstrates that this is a compound-

specific effect and does not generally occur in the presence of bile acids. Based on the experimental setup used in the present study, it can be excluded that this inhibitory effect only occurs by competitive *cis*-inhibition at the outward-open bile acid-binding site of NTCP. Remarkably, apart from the transport function, the HBV/HDV receptor binding function of NTCP (measured by myr-preS1 peptide binding) was also significantly inhibited by TLC, LC, or TCDC preincubation. Of note, under these experimental conditions and in agreement with the previous study by Schonhoff et al. (24), NTCP was still detected at the plasma membrane (Fig. 1 and Fig. 4B). It, therefore, can be excluded that a retrieval of NTCP from the plasma membrane, which was shown for rat Ntcp under comparable experimental conditions (see earlier text in DISCUSSION), is responsible for this drop of NTCP's transporter and receptor function. An alternative explanation for the long-lasting inhibitory effect of TLC could be that the intracellular accumulation of this bile acid would induce cell stress and so cells would require longer time to fully recover their transport function. However, as the MTS cytotoxicity assays showed full cell viability after 2-h preincubation with TLC (Fig. 2E) and NTCP-HEK293 cells still showed full transport activity at least for TLC (Fig. 2B), this possibility seems unlikely.

The inhibitory effect of TLC on the NTCP transporter function occurred within seconds and reached its maximum at 20 min. This maximum could not be further increased

after prolonged preincubation up to 6 h (Fig. 3, A and C). Interestingly, TLC preincubation did not inhibit all functions of NTCP. Although the myr-preS1 binding competence as well as the transport activity for the NTCP substrates TC and DHEAS were significantly reduced, this was not the case for TLC itself (Fig. 2B). This indicates that the NTCP protein is not entirely inactivated, for example, by covalent protein modifications. NTCP is instead selectively inhibited but still active in transporting TLC as a substrate. We hypothesized that TLC does not share the typical binding site and transport route of the bile acid and steroid substrates of NTCP. Thus, TLC transport is still maintained even when TLC preincubation inhibits transport of TC and DHEAS. Another interesting observation was that the inhibitory effect of TLC on the transporter and receptor function of NTCP was long-lasting (Fig. 3B). Even under very long incubation of the NTCP-HEK293 cells in the absence of TLC for up to 8 h, the same inhibitory effect was observed as directly after preincubation and washing. Therefore, this long-lasting effect might indicate that TLC *trans*-binding to NTCP occurs with high affinity.

Another question was if reflux of TLC after the preincubation phase may be responsible for the inhibitory effect and so would only mimic a *cis*-inhibition. However, in respective control experiments, only trace amounts of TLC refluxed from the cells after washout that would not be sufficient to explain the measured effects by *cis*-inhibition alone (Fig. 4, A and D). This was most pronounced in the HDV infection experiments, where TLC concentrations below 10 μ M had only minimal effects in *cis*-inhibition experiments (Fig. 5C). These concentrations would be achieved at most in the extracellular medium after preincubation with 250 μ M TLC. In contrast, preincubation with 250 μ M TLC completely abolished HDV infection in the *trans*-inhibition approach (Fig. 4E). These findings go in line with the observation that TLC only gains its *trans*-inhibitory potential when the preincubation is performed in sodium-containing buffer, which is the prerequisite for NTCP-mediated TLC uptake and accumulation in the preincubation phase (Fig. 2). In contrast, under sodium-free preincubation conditions, TLC largely lost its inhibitory potential, because its uptake via NTCP is abolished in the absence of sodium.

Finally, the question was addressed if the *trans*-inhibition of NTCP after TLC preincubation only affects the transport rates of the extracellularly provided substrate or if, in addition, the binding kinetics of an extracellular ligand were altered. Bile acids typically show competitive inhibition at the same extracellular binding site after coincubation, that is, when both bile acids are provided from the extracellular site of the transporter (7, 24, 45). However, in the experimental setup of the present study, TLC was first accumulated in the cells and washed out from the extracellular compartment, so that TLC is supposed to bind to an intracellularly accessible domain of NTCP (*trans*), whereas the transporter substrates and the myr-preS1 peptide were provided from the extracellular site (*cis*). In addition to the extracellularly provided transporter substrate [3 H]TC, different compounds were coincubated together with [3 H]TC to verify if these still interfere competitively with the transporter function of NTCP, even under *trans*-inhibition with TLC. As shown in Fig. 6, UDC, irbesartan, and myr-preS1 all inhibited the [3 H]

TC transport rate with comparable inhibition kinetics, irrespective of TLC preincubation. Nevertheless, the absolute transport rate of [3 H]TC was reduced significantly by TLC preincubation. These data clearly indicate that TLC represents a long-lasting *trans*-acting noncompetitive inhibitor of the transporter and HBV/HDV receptor function of NTCP. Furthermore, these data demonstrate that NTCP is still functionally active, so inactivation of NTCP by posttranslational modifications or abrogation from the plasma membrane can be excluded.

Trans-inhibition of membrane transporters by their substrates has previously been reported for other carriers, including ion transporters (49), ATP-binding cassette (ABC) transporters like human TAPL (50), ModBC from *Methanosarcina acetivorans* (51), TmrAB from *Thermus thermophilus* (52), and the ABC importer MetNI from *Escherichia coli* (53). Furthermore, *trans*-inhibition has been described for various amino acid transporters (54–57). Also, bile acid transporters from the OATP family have been reported to be *trans*-inhibited, for example, by cyclosporine A (CsA) (58). Similar to the present study, CsA acted as *cis*-inhibitor during coincubation with the substrate as well as *trans*-inhibitor after preincubation and washing before the transport experiments. In the case of OATP1B1 and OATP1B3, CsA preincubation induced a concentration-dependent and long-lasting inhibitory effect on the transport function over at least 16 h (58, 59). From the group of ABC transporters, Stieger et al. showed *trans*-inhibition of rat Bsep by the cholestatic estrogen metabolite estradiol-17 β -glucuronide (E₂17G) (60,61). In addition, Akita et al. (62) observed that sulfated bile acids show *trans*-inhibition of rat Bsep. Most *trans*-inhibitors described in these publications showed similar inhibition patterns, including time- and dose dependency of the inhibitory effect, rapid and long-lasting inhibition of the respective transporter, as well as high-affinity binding of the inhibitor to the *trans*-inhibition site of the transporter. In the present study, all these characteristics were also observed for the NTCP *trans*-inhibitor TLC, which showed a time- and dose-dependent inhibition of the bile acid transport. Furthermore, *trans*-inhibition was maintained over at least 8 h after removing of TLC from the incubation medium and, therefore, was long-lasting (Fig. 3B).

Blocking of HBV/HDV infection of hepatocytes by preventing virus binding to NTCP or blocking of endocytosis of the virus/NTCP receptor complex is a promising novel treatment strategy for acute and chronic HBV/HDV infections. This might be achieved by downregulation of NTCP expression in the hepatocytes, for example, by tumor necrosis factor- α or interleukin-6 (63, 64). In addition, retrieval of NTCP from the plasma membrane by induction of clathrin- or caveolin-dependent endocytosis of NTCP might be a option (65, 66). However, most approaches focus on the *cis*-inhibition of the virus binding to NTCP, which can be achieved by peptide-based drugs such as Myrcludex B, mimicking the myr-preS1 peptide, or by small molecules that address the extracellular myr-preS1- and/or bile acids-binding site of NTCP (64, 67). Myrcludex B provided proof-of-concept that NTCP-directed inhibition can effectively suppress HBV and HDV infection and was very recently approved as the first drug treatment of HDV-infected patients in Europe and Russia

(68). Based on the data of the present study, we suggest a novel potential target site of *trans*-acting NTCP inhibitors that can block virus binding to NTCP and, thus, may prevent HBV/HDV infection. Although TLC as a cholestatic bile acid is not an appropriate candidate, other compounds could mimic this long-lasting, *trans*-inhibitory effect of TLC and could be even more effective than short-acting *cis*-inhibitors of NTCP. To define this potential *trans*-located binding site of NTCP more closely, 3-D structural information of the human NTCP protein would be needed and would provide the possibility to address this target site by docking strategies.

In conclusion, we found that even after short pulse preincubation, TLC had a potent and long-lasting inhibitory effect on the transporter function of NTCP, while NTCP was still present at the plasma membrane. Furthermore, binding of the HBV/HDV myr-preS1 peptide and susceptibility for in vitro HDV infection were significantly reduced. We hypothesize that TLC rapidly accumulates in hepatocytes and mediates long-lasting *trans*-inhibition of the transporter and receptor function of NTCP via a particular TLC-binding site at an intracellularly accessible domain of NTCP. Physiologically, this *trans*-inhibition might protect hepatocytes from toxic overload of bile acids. Pharmacologically, it provides a promising novel NTCP target site for potential long-acting HBV/HDV entry inhibitors.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Anita Neubauer, Regina Leidolf, Silke Leiting, and Sigrun Broehl for technical assistance and Edda Wacker for critical reading of the manuscript.

GRANTS

This study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation)—Projektnummer 197785619—SFB 1021.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

K.A.L., M.K., S.F.M., and J.G. conceived and designed research; K.A.L., M.K., and S.F.M. performed experiments; K.A.L., M.K., S.F.M., and J.G. analyzed data; K.A.L., M.K., S.F.M., and J.G. interpreted results of experiments; K.A.L., M.K., and S.F.M. prepared figures; N.G., F.L. and D.G. provided materials and laboratories for infection studies; K.A.L., M.K., S.F.M., and J.G. drafted manuscript; K.A.L., M.K., S.F.M., N.G., F.L., D.G., and J.G. edited and revised manuscript; K.A.L., M.K., S.F.M., N.G., F.L., D.G., and J.G. approved final version of manuscript.

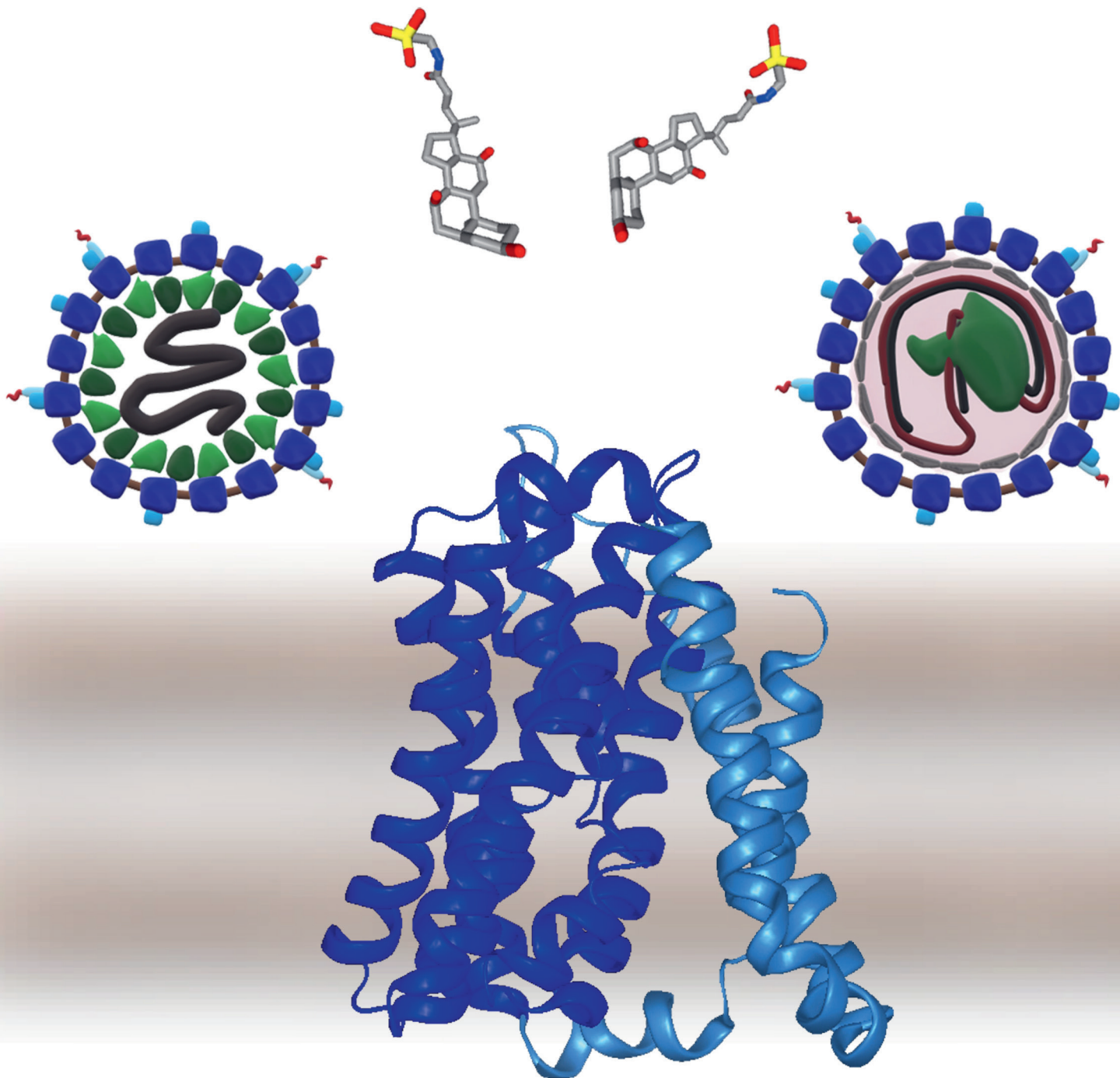
REFERENCES

1. **Sureau C, Negro F.** The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. *J Hepatol* 64: S102–S116, 2016. doi:10.1016/j.jhep.2016.02.013.
2. **Hughes SA, Wedemeyer H, Harrison PM.** Hepatitis delta virus. *Lancet* 378: 73–85, 2011. doi:10.1016/S0140-6736(10)61931-9.

3. **Asselah T, Loureiro D, Tout I, Castelnaud C, Boyer N, Marcellin P, Mansouri A.** Future treatments for hepatitis delta virus infection. *Liver Int* 40: 54–60, 2020. doi:10.1111/liv.14356.
4. **Caviglia GP, Rizzetto M.** Treatment of hepatitis D, an unmet medical need. *Clin Microbiol Infect* 26: 824–827, 2020. doi:10.1016/j.cmi.2020.02.031.
5. **Wang J, Huang H, Liu Y, Chen R, Yan Y, Shi S, Xi J, Zou J, Yu G, Feng X.** HBV genome and life cycle. *Adv Exp Med Biol* 1179: 17–37, 2020. doi:10.1007/978-981-13-9151-4_2.
6. **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.** Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* 1: e00049, 2012. doi:10.7554/eLife.00049.
7. **Döring B, Lütke T, Geyer J, Petzinger E.** The SLC10 carrier family: transport functions and molecular structure. *Curr Top Membr* 70: 105–168, 2012. doi:10.1016/B978-0-12-394316-3.00004-1.
8. **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 Schmied Arch Pharmacol* 372: 413–431, 2006. doi:10.1007/s00210-006-0043-8.
9. **Stieger B.** The role of the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) and of the bile salt export pump (BSEP) in physiology and pathophysiology of bile formation. *Handb Exp Pharmacol*: 205–259, 2011. doi:10.1007/978-3-642-14541-4_5.
10. **Glebe D, Bremer CM.** The molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis* 33: 103–112, 2013. doi:10.1055/s-0033-1345717.
11. **Glebe D, Urban S, Knoop EV, Çağ N, Krass P, Grün S, Bulavaite A, Sasnauskas K, Gerlich WH.** Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes. *Gastroenterology* 129: 234–245, 2005. doi:10.1053/j.gastro.2005.03.090.
12. **Li W, Urban S.** Entry of hepatitis B and hepatitis D virus into hepatocytes: Basic insights and clinical implications. *J Hepatol* 64: S32–40, 2016. doi:10.1016/j.jhep.2016.02.011.
13. **Yan H, Liu Y, Sui J, Li W.** NTCP opens the door for hepatitis B virus infection. *Antiviral Res* 121: 24–30, 2015. doi:10.1016/j.antiviral.2015.06.002.
14. **König A, Döring B, Mohr C, Geipel A, Geyer J, Glebe D.** Kinetics of the bile acid transporter and hepatitis B virus receptor Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) in hepatocytes. *J Hepatol* 61: 867–875, 2014. doi:10.1016/j.jhep.2014.05.018.
15. **Müller SF, König A, Döring B, Glebe D, Geyer J.** Characterisation of the hepatitis B virus cross-species transmission pattern via Na⁺/taurocholate co-transporting polypeptides from 11 New World and Old World primate species. *PLoS One* 13: e0199200, 2018. doi:10.1371/journal.pone.0199200.
16. **Ho RH, Leake BF, Roberts RL, Lee W, Kim RB.** Ethnicity-dependent polymorphism in Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) reveals a domain critical for bile acid substrate recognition. *J Biol Chem* 279: 7213–7222, 2004. doi:10.1074/jbc.M305782200.
17. **Yan H, Peng B, Liu Y, Xu G, He W, Ren B, Jing Z, Sui J, Li W.** Viral entry of hepatitis B and D viruses and bile salts transportation share common molecular determinants on sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *J Virol* 88: 3273–3284, 2014. doi:10.1128/JVI.03478-13.
18. **Pan W, Song IS, Shin HJ, Kim MH, Choi YL, Lim SJ, Kim WY, Lee SS, Shin JG.** Genetic polymorphisms in Na⁺-taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) and ileal apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT) and ethnic comparisons of functional variants of NTCP among Asian populations. *Xenobiotica* 41: 501–510, 2011. doi:10.3109/00498254.2011.555567.
19. **An P, Zeng Z, Winkler CA.** The loss-of-function S267F variant in HBV receptor NTCP reduces human risk for HBV infection and disease progression. *J Infect Dis* 218: 1404–1410, 2018. doi:10.1093/infdis/jiy355.
20. **Binh MT, Hoan NX, Van Tong H, Sy BT, Trung NT, Bock CT, Toan NL, Song LH, Bang MH, Meyer CG, Kremser PG, Velavan TP.** NTCP S267F variant associates with decreased susceptibility to HBV and HDV infection and decelerated progression of related liver diseases. *Int J Infect Dis* 80: 147–152, 2019. doi:10.1016/j.ijid.2019.01.038.

21. **Hu HH, Liu J, Lin YL, Luo WS, Chu YJ, Chang CL, Jen CL, Lee MH, Lu SN, Wang LY, You SL, Yang HI, Chen CJ.** The rs2296651 (S267F) variant on NTCP (SLC10A1) is inversely associated with chronic hepatitis B and progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B. *Gut* 65: 1514–1521, 2016. doi:10.1136/gutjnl-2015-310686.
22. **Lee HW, Park HJ, Jin B, Dezhbord M, Kim DY, Han KH, Ryu WS, Kim S, Ahn SH.** Effect of S267F variant of NTCP on the patients with chronic hepatitis B. *Sci Rep* 7: 17634, 2017. doi:10.1038/s41598-017-17959-x.
23. **Liu C, Xu G, Gao Z, Zhou Z, Guo G, Li D, Jing Z, Sui J, Li W, The P.** Ser267Phe variant of sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) supports HBV infection with a low efficiency. *Virology* 522: 168–176, 2018. doi:10.1016/j.virol.2018.07.006.
24. **Schonhoff CM, Yamazaki A, Hohenester S, Webster CR, Bouscarel B, Anwer MS.** PKC α -dependent and -independent effects of taurolithocholate on PI3K/PKB pathway and taurocholate uptake in HuH-NTCP cell line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297: G1259–67, 2009. doi:10.1152/ajpgi.00177.2009.
25. **Chai J, He Y, Cai SY, Jiang Z, Wang H, Li Q, Chen L, Peng Z, He X, Wu X, Xiao T, Wang R, Boyer JL, Chen W.** Elevated hepatic multidrug resistance-associated protein 3/ATP-binding cassette subfamily C 3 expression in human obstructive cholestasis is mediated through tumor necrosis factor alpha and c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase-signaling pathway. *Hepatology* 55: 1485–1494, 2012. doi:10.1002/hep.24801.
26. **Uphoff CC, Drexler HG.** Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 38: 79–85, 2002. doi:10.1290/1071-2690(2002)038<0079:CPAFDO>2.0.CO;2.
27. **Kramer W, Kurz G.** Photolabile derivatives of bile salts. Synthesis and suitability for photoaffinity labeling. *J Lipid Res* 24: 910–923, 1983.
28. **Norman A.** Preparation of conjugated bile acids using mixed carboxylic acid anhydrides - bile acids and steroids. *Arkiv for Kemi* 8: 331–342, 1955.
29. **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* 30: 1257–1268, 1999. doi:10.1002/hep.510300529.
30. **Geyer J, Döring B, Meerkamp K, Ugele B, Bakhiya N, Fernandes CF, Godoy JR, Glatt H, Petzinger E.** Cloning and functional characterization of human sodium-dependent organic anion transporter (SLC10A6). *J Biol Chem* 282: 19728–19741, 2007. doi:10.1074/jbc.M702663200.
31. **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 M, Geyer J, Lemey P, Drosten C, Netto EM, Glebe D, Drexler JF.** A novel hepatitis B virus species discovered in capuchin monkeys sheds new light on the evolution of primate hepadnaviruses. *J Hepatol* 68: 1114–1122, 2018. doi:10.1016/j.jhep.2018.01.029.
32. **Rasche A, Lehmann F, König A, Goldmann N, Corman VM, Moreira-Soto A, Geipel A, van Riel D, Vakulenko YA, Sander AL, Niekamp H, Kepper R, Schlegel M, Akoua-Koffi C, Souza B, Sahr F, Olayemi A, Schulze V, Petraityte-Burneikiene R, Kazaks A, Lowjaga KAA, Geyer J, Kuiken T, Drosten C, Lukashev AN, Fichet-Calvet E, Ulrich RG, Glebe D, Drexler JF.** Highly diversified shrew hepatitis B viruses corroborate ancient origins and divergent infection patterns of mammalian hepadnaviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 116: 17007–17012, 2019. doi:10.1073/pnas.1908072116.
33. **Bennien J, Fischer T, Geyer J.** Rare genetic variants in the sodium-dependent organic anion transporter SOAT (SLC10A6): Effects on transport function and membrane expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 179: 26–35, 2018. doi:10.1016/j.jsbmb.2017.09.004.
34. **Goubert E, Altwater M, Rovira MN, Khalilov I, Mazarino M, Sebastiani A, Schaefer MKE, Rivera C, Pellegrino C.** Bumetanide prevents brain trauma-induced depressive-like behavior. *Front Mol Neurosci* 12: 12, 2019. doi:10.3389/fnmol.2019.00012.
35. **Li Y, Wu K, Quan W, Yu L, Chen S, Cheng C, Wu Q, Zhao S, Zhang Y, Zhou L.** The dynamics of FTO binding and demethylation from the m(6)A motifs. *RNA Biol* 16: 1179–1189, 2019. doi:10.1080/15476286.2019.1621120.
36. **Claudel T, Zollner G, Wagner M, Trauner M.** Role of nuclear receptors for bile acid metabolism, bile secretion, cholestasis, and gallstone disease. *Biochim Biophys Acta* 1812: 867–878, 2011. doi:10.1016/j.bbadis.2010.12.021.
37. **Beaudoin JJ, Brouwer KLR, Malinen MM.** Novel insights into the organic solute transporter alpha/beta, OSTalpha/beta: From the bench to the bedside. *Pharmacol Ther* 211: 107542, 2020. doi:10.1016/j.pharmthera.2020.107542.
38. **Anwer M, Wolkoff A.** Basolateral plasma membrane organic anion transporters. In: *The Liver: Biology and Pathobiology*, (6th ed.), edited by Arias IM, Boyer JL, Cohen DE, Shafritz DA, Thorgeirsson SS, and Wolkoff AW. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2020, p. 327–336. doi:10.1002/9781119436812.ch27.
39. **Dranoff JA, McClure M, Burgstahler AD, Denson LA, Crawford AR, Crawford JM, Karpen SJ, Nathanson MH.** Short-term regulation of bile acid uptake by microfilament-dependent translocation of rat ntcp to the plasma membrane. *Hepatology* 30: 223–229, 1999. doi:10.1002/hep.510300136.
40. **Grüne S, Engelking LR, Ms A.** Role of intracellular calcium and protein kinases in the activation of hepatic Na⁺/taurocholate cotransport by cyclic AMP. *J Biol Chem* 268: 17734–17741, 1993.
41. **McConkey M, Gillin H, Webster CR, Anwer MS.** Cross-talk between protein kinases Czeta and B in cyclic AMP-mediated sodium taurocholate co-transporting polypeptide translocation in hepatocytes. *J Biol Chem* 279: 20882–20888, 2004. doi:10.1074/jbc.M309988200.
42. **Mukhopadhyay S, Ananthanarayanan M, Stieger B, Meier PJ, Suchy FJ, Anwer MS.** cAMP increases liver Na⁺-taurocholate co-transport by translocating transporter to plasma membranes. *Am J Physiol* 273: G842–G848, 1997. doi:10.1152/ajpgi.1997.273.4.G842.
43. **Park SW, Schonhoff CM, Webster CR, Anwer MS.** Protein kinase Cdelta differentially regulates cAMP-dependent translocation of NTCP and MRP2 to the plasma membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303: G657–65, 2012. doi:10.1152/ajpgi.00529.2011.
44. **Mühlfeld S, Domanova O, Berlage T, Stross C, Helmer A, Keitel V, Häussinger D, Kubitz R.** Short-term feedback regulation of bile salt uptake by bile salts in rodent liver. *Hepatology* 56: 2387–2397, 2012. doi:10.1002/hep.25955.
45. **Schwenk M, Schwarz LR, Greim H.** Taurolithocholate inhibits taurocholate uptake by isolated hepatocytes at low concentrations. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 298: 175–179, 1977. doi:10.1007/BF00508626.
46. **Beuers U, Bilzer M, Chittattu A, Kullak-Ublick GA, Keppler D, Paumgartner G, Dombrowski F.** Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver. *Hepatology* 33: 1206–1216, 2001. doi:10.1053/jhep.2001.24034.
47. **Crocenzi FA, Mottino AD, Sánchez PE, Pellegrino JM, Rodríguez GE, Milkiewicz P, Vore M, Coleman R, Roma MG.** Impaired localisation and transport function of canalicular Bsep in taurolithocholate induced cholestasis in the rat. *Gut* 52: 1170–1177, 2003. doi:10.1136/gut.52.8.1170.
48. **Stross C, Kluge S, Weissenberger K, Winands E, Häussinger D, Kubitz R.** A dileucine motif is involved in plasma membrane expression and endocytosis of rat sodium taurocholate cotransporting polypeptide (Ntcp). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305: G722–G730, 2013. doi:10.1152/ajpgi.00056.2013.
49. **Marzluf GA.** Regulation of sulfate transport in neurospora by trans-inhibition and by inositol depletion. *Arch Biochem Biophys* 156: 244–254, 1973. doi:10.1016/0003-9861(73)90362-7.
50. **Zollmann T, Moiset G, Tumulka F, Tampé R, Poolman B, Abele R.** Single liposome analysis of peptide translocation by the ABC transporter TAPL. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 2046–2051, 2015. doi:10.1073/pnas.1418100112.
51. **Gerber S, Comellas-Bigler M, Goetz BA, Locher KP.** Structural basis of trans-inhibition in a molybdate/tungstate ABC transporter. *Science* 321: 246–250, 2008. doi:10.1126/science.1156213.
52. **Barth K, Hank S, Spindler PE, Prisner TF, Tampé R, Joseph B.** Conformational coupling and trans-inhibition in the human antigen transporter ortholog TmrAB resolved with dipolar EPR spectroscopy. *J Am Chem Soc* 140: 4527–4533, 2018. doi:10.1021/jacs.7b12409.

53. **Johnson E, Nguyen PT, Yeates TO, Rees DC.** Inward facing conformations of the MetNI methionine ABC transporter: Implications for the mechanism of transinhibition. *Protein Sci* 21: 84–96, 2012. doi:10.1002/pro.765.
54. **Bracy DS, Handlogten ME, Barber EF, Han HP, Ms K.** Cis-inhibition, trans-inhibition, and repression of hepatic amino acid transport mediated by System A. Substrate specificity and other properties. *J Biol Chem* 261: 1514–1520, 1986.
55. **Fong AD, Handlogten ME, Kilberg MS.** Substrate-dependent adaptive regulation and trans-inhibition of System A-mediated amino acid transport. Studies using rat hepatoma plasma membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1022: 325–332, 1990. doi:10.1016/0005-2736(90)90281-R.
56. **Horák J, Kotyk A, Říhová L.** Specificity of trans-inhibition of amino acid transport in baker's yeast. *Folia Microbiol* 22: 360–362, 1977. doi:10.1007/BF02877671.
57. **Hunter DR, Segel IH.** Control of the general amino acid permease of *Penicillium chrysogenum* by transinhibition and turnover. *Arch Biochem Biophys* 154: 387–399, 1973. doi:10.1016/0003-9861(73)90071-4.
58. **Shitara Y, Sugiyama Y.** Preincubation-dependent and long-lasting inhibition of organic anion transporting polypeptide (OATP) and its impact on drug-drug interactions. *Pharmacol Ther* 177: 67–80, 2017. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.02.042.
59. **Shitara Y, Takeuchi K, Nagamatsu Y, Wada S, Sugiyama Y, Horie T.** Long-lasting inhibitory effects of cyclosporin A, but not tacrolimus, on OATP1B1- and OATP1B3-mediated uptake. *Drug Metab Pharmacokinet* 27: 368–378, 2012. doi:10.2133/dmpk.DMPK-11-RG-096.
60. **Stieger B, Fattinger K, Madon J, Kullak-Ublick GA, Meier PJ.** Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology* 118: 422–430, 2000. doi:10.1016/S0016-5085(00)70224-1.
61. **Vallejo M, Briz O, Serrano MA, Monte MJ, Marin JJ.** Potential role of trans-inhibition of the bile salt export pump by progesterone metabolites in the etiopathogenesis of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Hepatol* 44: 1150–1157, 2006. doi:10.1016/j.jhep.2005.09.017.
62. **Akita H, Suzuki H, Ito K, Kinoshita S, Sato N, Takikawa H, Sugiyama Y.** Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim Biophys Acta* 1511: 7–16, 2001. doi:10.1016/S0005-2736(00)00355-2.
63. **Bouezzedine F, Fardel O, Gripon P.** Interleukin 6 inhibits HBV entry through NTCP down regulation. *Virology* 481: 34–42, 2015. doi:10.1016/j.virol.2015.02.026.
64. **Fukano K, Tsukuda S, Watashi K, Wakita T.** Concept of viral inhibitors via NTCP. *Semin Liver Dis* 39: 078–085, 2019. doi:10.1055/s-0038-1676804.
65. **Huang HC, Tao MH, Hung TM, Chen JC, Lin ZJ, Huang C.** (-) Epigallocatechin-3-gallate inhibits entry of hepatitis B virus into hepatocytes. *Antiviral Res* 111: 100–111, 2014. doi:10.1016/j.antiviral.2014.09.009.
66. **Miyakawa K, Matsunaga S, Yamaoka Y, Dairaku M, Fukano K, Kimura H, Chimuro T, Nishitsuji H, Watashi K, Shimotohno K, Wakita T, Ryo A.** Development of a cell-based assay to identify hepatitis B virus entry inhibitors targeting the sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *Oncotarget* 9: 23681–23694, 2018. doi:10.18632/oncotarget.25348.
67. **Tsukuda S, Watashi K, Hojima T, Isogawa M, Iwamoto M, Omagari K, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Saito A, Tanaka Y, Mizokami M, Sureau C, Wakita T.** A new class of hepatitis B and D virus entry inhibitors, proanthocyanidin and its analogs, that directly act on the viral large surface proteins. *Hepatology* 65: 1104–1116, 2017. doi:10.1002/hep.28952.
68. **Loglio A, Ferenci P, Uceda Renteria SC, Tham CYL, van Bömmel F, Borghi M, Holzmann H, Perbellini R, Trombetta E, Giovanelli S, Greco L, Porretti L, Prati D, Ceriotti F, Lunghi G, Bertolotti A, Lampertico P.** Excellent safety and effectiveness of high-dose myrcludex-B monotherapy administered for 48 weeks in HDV-related compensated cirrhosis: A case report of 3 patients. *J Hepatol* 71: 834–839, 2019. doi:10.1016/j.jhep.2019.07.003.



Verlag der DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17 • 35392 Gießen
Tel.: 0641 / 24466 • Fax: 0641 / 25375
E-Mail: info@dvg.de • Web: www.dvg.de