

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Innere Medizin,
I. Medizinische Klinik und Poliklinik

Direktor: Prof. Dr. Ansgar W. Lohse

Das „Metabolovirus“ HBV: Auswirkungen einer chronischen Hepatitis B-Infektion auf den hepatozellulären Lipid-, Cholesterin- und Gallensäuremetabolismus

Dissertation

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

vorgelegt von:

Nicola Oehler
aus Bobingen

Hamburg 2015

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 16.02.2016**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. M. Dandri

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. J. Heeren

Binding of Hepatitis B Virus to Its Cellular Receptor Alters the Expression Profile of Genes of Bile Acid Metabolism

Nicola Oehler,^{1*} Tassilo Volz,^{1*} Oliver D. Bhadra,¹ Janine Kah,^{1,2} Lena Allweiss,¹ Katja Giersch,¹ Jeanette Bierwolf,³ Kristoffer Riecken,⁴ Jörg M. Pollok,³ Ansgar W. Lohse,^{1,5} Boris Fehse,⁴ Joerg Petersen,⁶ Stephan Urban,^{5,7} Marc Lütgehetmann,^{1,8} Joerg Heeren,^{9**} and Maura Dandri^{1,5**}

Chronic hepatitis B virus (HBV) infection has been associated with alterations in lipid metabolism. Moreover, the Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP), responsible for bile acid (BA) uptake into hepatocytes, was identified as the functional cellular receptor mediating HBV entry. The aim of the study was to determine whether HBV alters the liver metabolic profile by employing HBV-infected and uninfected human liver chimeric mice. Humanized urokinase plasminogen activator/severe combined immunodeficiency mice were used to establish chronic HBV infection. Gene expression profiles were determined by real-time polymerase chain reaction using primers specifically recognizing transcripts of either human or murine origin. Liver biopsy samples obtained from HBV-chronic individuals were used to validate changes determined in mice. Besides modest changes in lipid metabolism, HBV-infected mice displayed a significant enhancement of human cholesterol 7 α -hydroxylase (human [h]CYP7A1; median 12-fold induction; $P < 0.0001$), the rate-limiting enzyme promoting the conversion of cholesterol to BAs, and of genes involved in transcriptional regulation, biosynthesis, and uptake of cholesterol (human sterol-regulatory element-binding protein 2, human 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, and human low-density lipoprotein receptor), compared to uninfected controls. Significant hCYP7A1 induction and reduction of human small heterodimer partner, the corepressor of hCYP7A1 transcription, was also confirmed in liver biopsies from HBV-infected patients. Notably, administration of Myrcludex-B, an entry inhibitor derived from the pre-S1 domain of the HBV envelope, provoked a comparable murine CYP7A1 induction in uninfected mice, thus designating the pre-S1 domain as the viral component triggering such metabolic alterations. **Conclusion:** Binding of HBV to NTCP limits its function, thus promoting compensatory BA synthesis and cholesterol provision. The intimate link determined between HBV and liver metabolism underlines the importance to exploit further metabolic pathways, as well as possible NTCP-related viral-drug interactions. (HEPATOLOGY 2014;60:1483-1493)

See Editorial on Page 1458

Infection with the hepatitis B virus (HBV) still represents a major health burden, with approximately

350 million individuals chronically infected worldwide who are at risk of developing liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Although HBV is not directly cytopathic, the establishment of a complex network of virus-host interactions permits the virus to meet its

Abbreviations: AAT, alpha-antitrypsin; Ab, antibody; APO, apolipoprotein; BA, bile acid; b.w., body weight; cDNA, complementary DNA; CHB, chronic hepatitis B; CoA, coenzyme A; CYP7A1, cholesterol 7 α -hydroxylase; DMSO, dimethyl sulfoxide; FA, fatty acid; FAS, fatty acid synthase; FXR, farnesoid X receptor; h, human; HBV, hepatitis B virus; HBsAG, hepatitis B surface antigen; HBx, HBV X protein; HDV, hepatitis delta virus; HMG, 3-hydroxy-3-methylglutaryl; HMGCR, hydroxymethylglutaryl-CoA reductase; HNF, hepatocyte nuclear factor; HSA, human serum albumin; IF, immunofluorescence; IP, intraperitoneal; LDL, low-density lipoprotein; LDLr, LDL receptor; LRH-1, liver receptor homolog 1; LXR, liver X receptor; m, murine; mRNA, messenger RNA; NTCP, Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; RT-PCR, real-time polymerase chain reaction; SHP, small heterodimer partner; SMV, simvastatin; SREBP, sterol-regulatory element-binding protein; TC, sodium taurocholate; Tg, transgenic.

replication requirements and persist within infected hepatocytes.¹ Previous studies indicated that transcription factors involved in activation of hepatic metabolic processes, such as hepatocyte nuclear factors (HNFs), farnesoid X receptor (FXR), cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein, and peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), can be recruited to the HBV genome,² whereas studies in transgenic (Tg) mice have shown that the viral regulatory protein, HBV X protein (HBx), can induce activation of lipogenic genes and fatty acid (FA) accumulation, which, in turn, could contribute to disease progression by promoting steatosis, generation of oxidative stress, and liver inflammation.^{3,4} Although patient studies indicated an association between chronic hepatitis B (CHB) and hepatic steatosis,^{5,6} knowledge about the effect of HBV infection on metabolic profiles, and on the molecular processes that may be involved in the alteration of lipid and cholesterol pathways in the course of infection, remains limited.

The infectious HBV particle consists of a small DNA-containing enveloped particle, which is characterized by a very high tissue and species specificity. The viral membrane contains three envelope proteins that are named, according to their size, pre-S1 (or large), pre-S2 (or middle), and S (or small). All three proteins share the same C-terminal S domain, which contains the hepatitis B surface antigen (HBsAg), whereas the pre-S2 and pre-S1 proteins display progressive N-terminal extensions. Characteristic of HBV infection is the presence of noninfectious subviral particles, exclusively composed of viral envelope proteins, which are typically secreted in large excess into the blood of infected individuals. The myristoylation and integrity of the first 77 amino acids of the

pre-S1 domain of the large envelope protein were shown to be essential for infectivity.⁷ Notably, the entry of both HBV and hepatitis delta virus (HDV), which also needs the HBV envelope for infection and propagation, was shown to be blocked by a myristoylated lipopeptide (Myrcludex-B) derived from the pre-S1 domain of the large envelope protein.⁸⁻¹⁰ Previous studies indicated that cell polarization, in addition to the differentiation status of hepatocytes, plays a fundamental role in the infection process.¹¹ Recently, Li et al. could identify the Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) as the functional cellular receptor permitting HBV and HDV to enter the primary human liver cells,¹² a finding that was confirmed by other groups.¹⁴ These studies revealed that viral binding to NTCP is mediated by the pre-S1 domain of the HBV envelope protein. NTCP is a transmembrane transporter localized to the basolateral membrane of highly differentiated primary hepatocytes, which mediates most of the hepatocellular Na⁺-dependent uptake of bile salts.¹³ Notably, recent *in vitro* studies showed that Myrcludex-B binding to NTCP inhibits uptake of bile salts.¹⁴⁻¹⁶ These discoveries attribute new importance to possible HBV-mediated changes in bile acid (BA), cholesterol, and lipid metabolism.

We employed immune-deficient (severe combined immunodeficiency [SCID]/beige) urokinase plasminogen activator (uPA) Tg mice harboring livers partially reconstituted with human hepatocytes to investigate whether HBV infection can affect the metabolic profile of human hepatocytes. We found that humanized mice stably infected with HBV displayed remarkable alterations in key genes of cholesterol and BA metabolism and provided evidence that these changes are mostly triggered by the binding of HBV to its cellular receptor.

From the ¹Department of Medicine, Center for Internal Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; ²Institute of Immunology and Experimental Hepatology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; ³Department for General, Visceral, Thoracic, and Vascular Surgery, University Hospital Bonn, Bonn, Germany; ⁴Research Department Cell and Gene Therapy, Clinic for Stem Cell Transplantation, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; ⁵German Center for Infection Research (DZIF), Hamburg and Heidelberg sites, Germany; ⁶IFI Institute for Interdisciplinary Medicine at Asklepios Clinic St. Georg, Hamburg, Germany; ⁷Department of Infectious Diseases, Molecular Virology, University Hospital Heidelberg, Heidelberg, Germany; ⁸Institute of Microbiology, Virology and Hygiene, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; and ⁹Department of Biochemistry and Molecular Cell Biology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany.

Received December 4, 2013; accepted April 2, 2014.

The study was supported by the German Research Foundation (DFG) by a grant to M.D., J.H., and B.F. (SFB 841: A5; B6; SP2) and to S.U. (UR72-5-1/2). M.D. and S.U. also received funding from the German Center for Infection Research (DZIF-BMBF; TTU05.804).

*N.O. and T.V. contributed equally to this work.

**J.H. and M.D. share senior authorship.

Address reprint requests to: Maura Dandri, Ph.D., Department of Internal Medicine, Center for Internal Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, D-20246 Hamburg, Germany. E-mail: m.dandri@uke.de; fax: + 49-40-7410 57232.

Copyright © 2014 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at wileyonlinelibrary.com.

DOI 10.1002/hep.27159

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Materials and Methods

Generation of Human Chimeric Mice, HBV Infection, and Treatments. Generation of humanized mice was conducted as previously described.¹⁷ Briefly, 3-week-old homozygous uPA/SCID/beige mice (USB for short) were anesthetized with isofluran and injected intrasplenically with 1 million viable thawed human hepatocytes that were obtained from four different donors. Animals were housed and maintained under specific pathogen-free conditions, according to institutional guidelines under authorized protocols. All procedures were approved by the ethical committee of the city and state of Hamburg and accorded with the principles of the Declaration of Helsinki. Human hepatocyte repopulation levels were determined by measuring human serum albumin (HSA) in mouse serum with the human Albumin ELISA Quantitation Kit (Bethyl Laboratories, Biomol GmbH, Hamburg, Germany). Human chimeric mice displaying HSA concentrations between 1 and 4 mg/mL, corresponding to levels of human chimerism ranging from 30% to 70% were employed for the study. To establish HBV infection, animals received a single intraperitoneal (IP) injection of HBV-infectious serum (5×10^7 HBV DNA copies per mouse; genotype D). Four different human hepatocyte donors were used for transplantation. Thirteen stably HBV-infected animals (>10 weeks post-HBV injection) and 13 uninfected control animals were employed to analyze gene expression profiles, so that each group contained at least 3 mice reconstituted with the same human donor. As indicated in the Results, mice were subcutaneously injected with 2 μ g/g body weight (b.w.) of Myrcludex-B and sacrificed either 8 or 24 hours after receiving one single drug injection, or after 6 weeks of daily treatment.¹⁰ Uninfected mice received an IP injection of 12.5 ng/g b.w. of simvastatin (SMV; Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI) dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and were sacrificed after 6 hours. Control mice received injections with the same DMSO-containing buffer.

Virological Measurements and Analysis of Gene Expression. Extraction of HBV DNA from serum samples was conducted with the QiAmp MinElute Virus Spin kit (Qiagen, Hilden, Germany). For quantification, real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using a Lightcycler (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) and HBV-specific probes,¹⁷ whereas cloned HBV-DNA references were amplified in parallel to establish a standard curve for quantification. Viral RNA was extracted from mouse liver samples

using the RNeasy RNA purification kit (Qiagen)¹⁷ and was reverse transcribed from 1 μ g of total RNA using oligo-dT primers and the Transkriptor kit (Roche Applied Science). To determine gene expression levels, human- and mouse-specific primers from the TaqMan Gene Expression Assay System were used and samples were analyzed in the ViiATM 7 Real-Time PCR System (both Life Technologies, Carlsbad, CA). The mean of the human housekeeping genes, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and ribosomal protein L30, was used for normalization. The same protocols were also used to determine gene expression in NTCP-transduced HepG2 cells (see also the Supporting Information). Mouse gene expression levels were normalized using primers specifically recognizing the murine β -actin transcripts. To validate the species specificity of the primers, reverse-transcribed complementary DNAs (cDNAs) from murine, human, and human chimeric samples were employed.¹⁷

Analysis of Human Liver Biopsies. Human liver tissues were obtained from needle liver biopsy specimens taken from 6 HBV chronically infected patients and 6 uninfected individuals, which were observed in the outpatient clinic of the University Medical Center Hamburg-Eppendorf and underwent biopsy to determine grading and staging of liver disease.¹⁸ All HBV-infected patients were HBsAg positive, negative for HCV, human immunodeficiency virus, and HDV serological markers of infection, and were not receiving antiviral treatments. A small piece of tissue not needed for histological examination was immediately frozen in liquid nitrogen, stored at -80°C , and utilized for nucleic acid extraction. The protocol for the study was performed according to the principles of the Declaration of Helsinki and approved by the ethical committee of the city and state of Hamburg (OB-042/06 and PV4081). RNA extraction, reverse transcription, and gene expression analysis were conducted as described above.

Protein Analysis and Immunofluorescence Staining in Humanized Mice. Total proteins (280 μ g) extracted from liver tissue of HBV-infected and uninfected humanized mice were used for immunoprecipitation following the manufacturer's instructions (Dynabeads Protein G Kit; Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany). Precipitates of polyacrylamide gel electrophoresis (CYP7A1) and alpha-antitrypsin (AAT) were further analyzed by western blotting on 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and blotted onto a nitrocellulose membrane (Hybond ECL Nitrocellulose Membrane; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Both the rabbit anti-CYP7A1 (C-terminal; precipitation, 1:250; detection,

1:1000; Abcam, Cambridge, UK) and the mouse AAT antibody (Ab; precipitation, 1:10; detection, 1:1,000; Biotrend Chemikalien GmbH, Cologne, Germany) used for immunoprecipitation and detection do not exhibit cross-reactivity with mouse proteins. Immunofluorescence (IF) staining was performed on acetone-fixed cryostat liver sections from humanized mouse livers using a human-specific FXR mouse Ab (1:100 dilution; NR1H4, clone 1B10; Abnova, Taipei City, Taiwan). Nuclear staining was achieved by Hoechst 33258 (Invitrogen, Eugene, OR). Stained sections were analyzed by fluorescence microscopy (Bioevo BZ-9000; Keyence, Osaka, Japan) using the same settings for all groups.

Statistical Analysis. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Mann-Whitney's *U* test was performed for nonparametric pair-wise comparisons. Kruskal-Wallis' nonparametric test was applied using Dunn's test to compare group-wise as a posttest *P* values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Effect of HBV Infection on the Expression Profile of Genes of the Lipid, Cholesterol, and BA Metabolism in Human Hepatocytes. To determine the expression profile of human hepatocytes within mouse liver, primers specifically recognizing human transcripts and not cross-reacting with murine genes were validated by RT-PCR using artificial mixtures of human and mouse cDNAs, as previously reported on.¹⁷ We assessed whether persistent HBV infection altered the steady-state expression of genes involved in lipid, cholesterol, and BA metabolism in human liver-chimeric mice by comparing intrahepatic RNA expression levels of the human apolipoproteins, sterol-regulatory element-binding protein (hSREBP), FA synthase (hFAS), and PPARs (hPPARs) in 13 HBV stably infected versus 13 uninfected animals (Table 1). Although HBV-infected mice displayed only modest changes in genes regulating FA and lipoprotein metabolism at the transcriptional level, our analysis revealed a significant enhancement of human apolipoprotein (hAPO) A1 (*P* = 0.005) and hPPAR- γ (*p* = 0.01) genes, whereas expression levels of other human apolipoproteins (hAPO B, hAPO C, and hAPO E), hPPAR- α , and hSREBP1c remained unchanged or differences did not reach statistical significance (human liver X receptor [hLXR]- α , hLXR- β , and hFAS). Notably, we found that various human genes involved in transcriptional regulation, biosyn-

Table 1. Expression Profile of Genes Involved in Lipid, Cholesterol, and Bile Acid Metabolism

Gene	Fold Difference (Median/Median)	<i>P</i> Value
Genes of lipid metabolism		
hPPAR α	1.217	NS
hPPAR γ	2.074 \uparrow	0.0120*
hLXR α	1.412	NS
hLXR β	1.499	NS
hFASN	1.991	NS
hSREBP1c	0.434	NS
hAPO A1	1.643 \uparrow	0.0056**
hAPO A5	0.765 \downarrow	0.0355*
hAPO B	1.512	NS
hAPO C3	1.384	NS
hAPO E	1.030	NS
Genes of cholesterol metabolism		
hSREBP2	2.912 \uparrow	0.0001***
hLDLr	2.360 \uparrow	0.0015**
hHMGCR	4.007 \uparrow	0.0009***
hABCA1	0.972	NS
hABCG5	1.465 \uparrow	0.0313*
hABCG8	1.060	NS
hSRB-1	0.880	NS
Genes of bile acid metabolism		
hCYP7A1	12.134 \uparrow	<0.0001***
hFXR	1.830 \uparrow	0.0018**
hSHP	0.624 \downarrow	0.0355*
hLRH-1	1.502 \uparrow	0.0240*
hNTCP	1.401	NS
hBSEP	1.086	NS

Determined by quantitative RT-PCR in uninfected (*n* = 13) versus HBV stably infected (*n* = 13) humanized mice. *P* values reaching significance are shown as bolded terms; **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001.

Abbreviation: NS, not significant.

thesis, and uptake of cholesterol, such as hSREBP2 (*P* = 0.0001), hydroxymethylglutaryl-coenzyme A (CoA) reductase (hHMGCR; *P* = 0.0009), and low-density lipoprotein receptor (hLDLr; *P* = 0.001) were significantly enhanced in infected mice, compared to uninfected controls (Fig. 1A-C).

The most striking change regarded the strong induction of hCYP7A1 (median, 12-fold; *P* = 0.0001), the rate-limiting enzyme converting cholesterol into BAs in hepatocytes (Fig. 2A). The clear enhancement of hCYP7A1 in HBV-infected mice could be appreciated also when the four different groups of mice harboring distinct human donor hepatocytes were analyzed separately (Supporting Fig. 1). The hCYP7A1 increase determined at the transcription level could be confirmed also at the protein level (Fig. 2B). Further gene expression alterations regarded a reduction (*P* = 0.0355) of the expression levels of the nuclear receptor, small heterodimer partner (hSHP), the corepressor of hCYP7A1 transcription (Table 1; Fig. 2C-E), as well as a modest enhancement of human hFXR (*P* = 0.0018) and of liver receptor homolog 1 (hLRH-1; *P* = 0.0240) among the HBV-infected group.

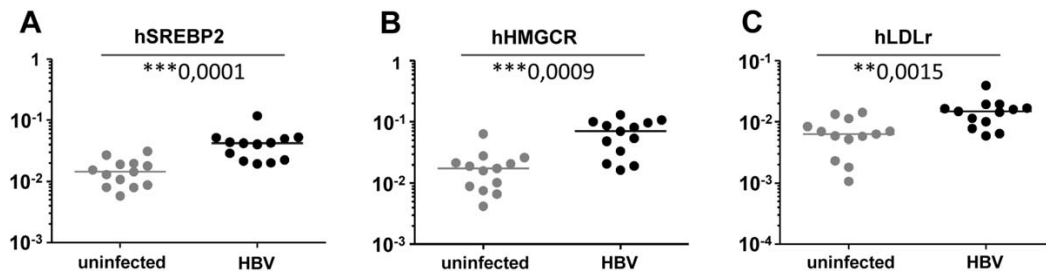


Fig. 1. Enhancement of human genes involved in transcriptional regulation, biosynthesis, and uptake of cholesterol in HBV-infected versus uninfected control mice. (A) Significant up-regulation of hSREBP2 ($P = 0.0001$), (B) hHMGCR ($p = 0.0009$), and (C) hLDLr ($P = 0.0015$).

Taking into account the crucial role played by NTCP in mediating both viral entry and uptake of BAs in hepatocytes, we determined whether HBV altered steady-state transcript levels of human NTCP. Our measurements indicated that HBV infection did not affect hNTCP at the RNA level (Supporting Fig. 2). Also, expression levels of hBSEP (Table 1), which regulates the canalicular efflux of bile salts from the infected human hepatocytes, did not differ between HBV-infected and uninfected humanized mice, indicating that HBV did not alter, at least at the transcriptional level, the total amounts of the two important bile salt transporters required for bile salt homeostasis.

Importantly, hCYP7A1 was also found significantly induced ($P = 0.0022$) in liver biopsy samples obtained from patients chronically infected with HBV. Intrahepatic messenger RNA (mRNA) expression of hCYP7A1 was comparatively analyzed by RT-PCR in 6 uninfected and 6 high-HBV chronic carriers (median, 5×10^9 HBV-DNA/mL; range, 8×10^7 – 4×10^9 ; Fig. 3). A significant enhancement of CYP7A1 expression was also determined in a small group of patients displaying low viremia (data not shown), suggesting that even lower amounts of circulating virions and/or HBsAg may affect NTCP function. The greater than 1 log induction of hCYP7A1 and significant reduction of the repressor,

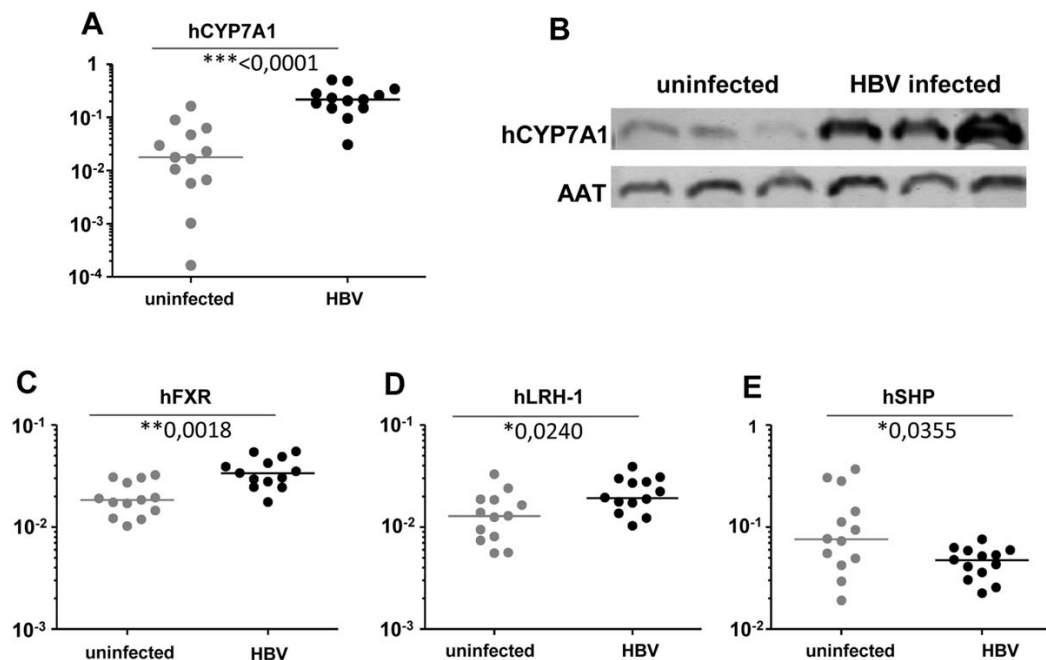


Fig. 2. HBV-infected mice displayed a strong induction of human CYP7A1 ($P = 0.0001$), the enzyme converting cholesterol into bile. Enhancement was demonstrated both at the transcriptional (A) and protein level (B). Further gene expression alterations regarded the enhancement of the hFXR ($P = 0.0018$) (C) and of hLRH-1 ($P = 0.0240$) (D), as well as the reduction of the CYP7A1 corepressor, hSHP ($P = 0.0355$) (E) in infected human hepatocytes.

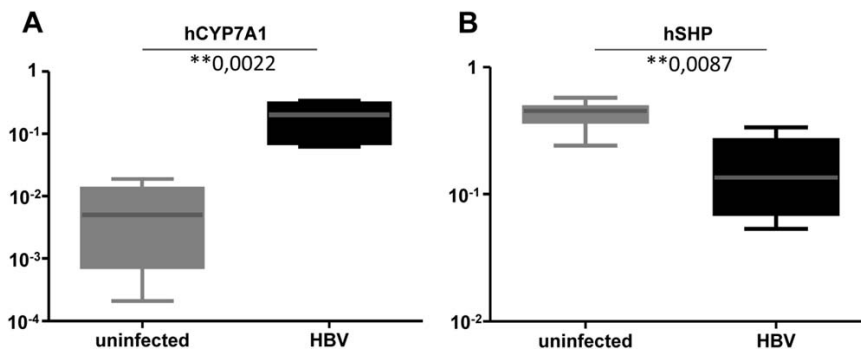


Fig. 3. Strong hCYP7A1 enhancement and significant hSHP down-regulation were also determined in liver biopsy samples from patients chronically infected with HBV. Intrahepatic RNA levels of hCYP7A1 (A) and hSHP (B) were comparatively analyzed in 6 uninfected and 6 HBV chronic carriers.

hSHP ($P = 0.009$), determined in infected patients strongly support the findings obtained in human-liver chimeric mice.

Effect of HBV on Expression of Mouse Genes in Humanized Mice. To assess whether HBV infection, or rather the presence of circulating virions and subviral particles in mouse blood, could also alter the expression pattern of murine genes involved in BAs and cholesterol metabolism, we employed mouse-specific primers not recognizing human transcripts and the same two groups of animals (13 HBV-infected vs. 13 uninfected) were analyzed. These analyses revealed significant up-regulation of murine (m)CYP7A1 ($P = 0.0002$), mLDLr ($P = 0.0002$), mHMGR ($P = 0.0003$), and mSREBP2 ($P = 0.0056$; Supporting Fig. 3). The observation that the induction of genes involved in the synthesis of BAs and cholesterol provision occurred also in murine hepatocytes, which are not susceptible to HBV infection, but were shown to permit the binding of the pre-S1-derived lipopeptide to the mNTCP receptor,¹⁹ suggested that the binding of HBV to mNTCP, rather than intracellular viral replication, may trigger the alterations observed in cholesterol and BA metabolism.

The HBV Pre-S1-Derived Lipopeptide, Myrcludex-B, Induces CYP7A1 Expression in Humanized Mice. To narrow down the viral components responsible for the described expression profile shift in metabolic genes, we assessed whether treatment of uninfected humanized mice ($n = 6$) with the HBV pre-S1-derived peptide, Myrcludex-B, which can bind both to human and with lower affinity also to murine NTCP,^{19,20} could induce similar alterations. A strong enhancement of human CYP7A1 expression (median, 35-fold) could be induced after one single administration of the HBV entry inhibitor, Myrcludex-B, both 8 and 24 hours posttreatment (Fig. 4A; $P = 0.0238$), whereas mCYP7A1 appeared to be induced to a lesser extent (Fig. 4B; $P =$ not sig-

nificant). Moreover, in agreement with previous studies showing remarkable stability in serum and accumulation of Myrcludex-B in mouse liver,¹⁹ hCYP7A1 mRNA levels appeared even higher after 24 hours ($n = 3$). Notably, repeated administration of Myrcludex-B in HBV-infected mice (3 weeks; daily injection: 2 mg/kg) did not induce further alterations in hCYP7A1 mRNA expression, because hCYP7A1 levels determined in Myrcludex-B-treated, HBV-infected mice were comparable to levels found in untreated HBV-infected littermates (Fig. 4C). In line with the results presented here, expression levels of hSHP, hSREBP2, and hLDLr were also affected upon Myrcludex-B administration (Supporting Fig. 4). But, again, these changes were comparable to those detected in HBV-infected animals.

To assess whether a limited bile salt uptake, mediated by the binding of the pre-S1 domain to NTCP, may lead to up-regulation of hCYP7A1, we also analyzed CYP7A1 expression levels *in vitro* after incubating NTCP-transduced HepG2 cells with Myrcludex-B or sodium taurocholate (TC). Despite the generally low expression levels of this hepatocyte-specific enzyme in hepatoma cells, CYP7A1 expression was enhanced upon Myrcludex-B administration and further reduced after incubating cells with TC (Supporting Fig. 5). Altogether, these results provide evidence that binding of the pre-S1 domain of HBV envelope to its cellular receptor, NTCP, can trigger gene expression changes in bile acid metabolism.

Several U.S. Food and Drug Administration-approved drugs, including simvastatin (SMV), were shown to limit NTCP-mediated uptake of bile salts.²¹ To explore whether binding of SMV to NTCP in humanized mice may also induce metabolic gene alterations resembling those determined in HBV stably infected mice, we administered SMV to 2 uninfected humanized mice and sacrificed them 6 hours after injection. Gene expression analysis showed that SMV administration also increased hCYP7A1 expression (Fig. 4D),

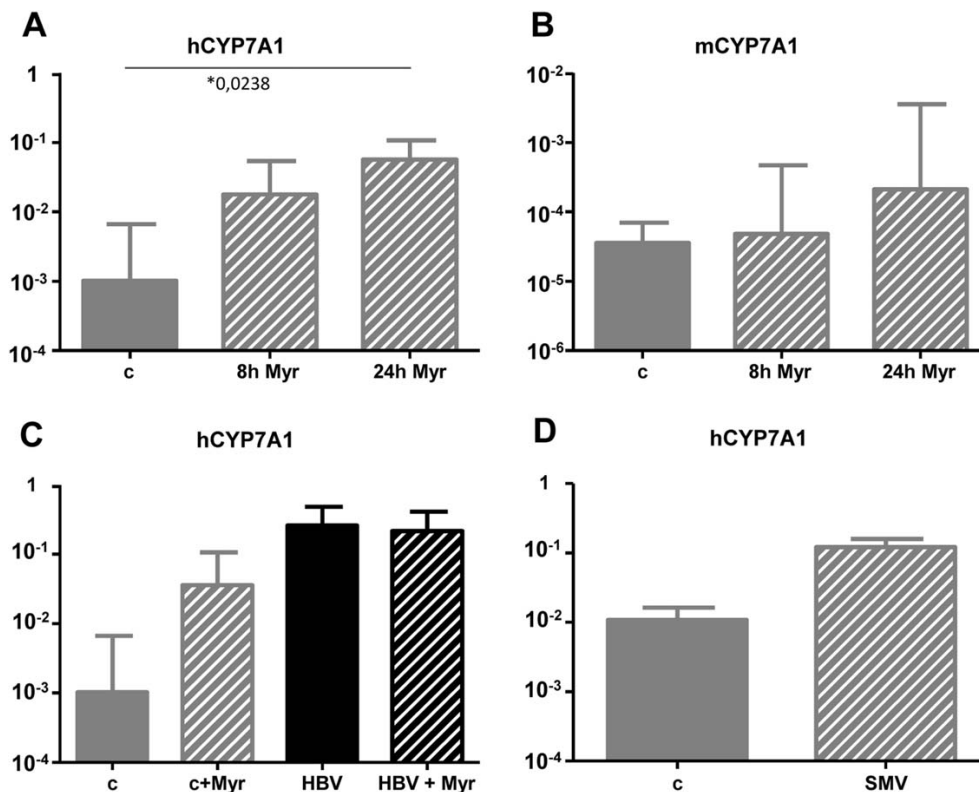


Fig. 4. Administration of the HBV entry inhibitor, Myrcludex-B. CYP7A1 induction was determined 8 and 24 hours after one single Myrcludex-B administration both in human (A; $P = 0.0238$) and murine hepatocytes (B). hCYP7A1 induction determined in untreated HBV-infected mice was comparable to the levels determined after repeated administration of Myrcludex-B in HBV chronic infected mice (C). Induction of hCYP7A1 was also found upon administration of SMV, which is known to inhibit NTCP function (D).

suggesting that binding of the pre-S1 component of HBV to NTCP induces effects resembling, at least in part, those observed after administration of compounds that were shown to act as NTCP inhibitors.

Human FXR Cellular Distribution Differs in HBV-Infected Humanized Mouse Liver. BAs also serve as intracellular sensor molecules that can activate FXR transcription factor. Upon nuclear translocation, activated FXR was shown to induce SHP expression, the suppressor of CYP7A1 transcription.²² To assess whether HBV-mediated reduction of NTCP function may also lead to a decreased FXR activation and hence nuclear localization, we analyzed, by IF, the intracellular distribution of hFXR in liver tissues of HBV-infected and uninfected humanized mice. We observed a clear decrease of FXR amounts in human hepatocyte nuclei of HBV-infected mice (Fig. 5C), in comparison to uninfected controls (Fig. 5A). However, no clear differences could be appreciated in uninfected mice upon one single Myrcludex-B administration (Fig. 5B), indicating that repeated exposure to the pre-S1 peptide may be needed to detect a clear localization shift at protein level, by IF

techniques. Moreover, the FXR cellular distribution pattern in HBV-infected and Myrcludex-B-treated mice was similar to the pattern observed in untreated HBV-infected animals (data not shown).

Discussion

The discovery of the BA transporter, NTCP, as the functional cellular receptor mediating viral entry¹² placed new emphasis on analysis of the involvement of HBV in BA metabolism. However, the function and integrity of metabolic pathways and hepatocyte-specific transporters are known to be altered or lost in cell lines and primary human hepatocyte cultures and the narrow tissue and host tropism of HBV limited studies about interactions established by HBV in infected human hepatocytes. Thus, it is not clear to which extent HBV infection can affect cellular pathways related to host metabolism. In an attempt to overcome these limitations, we have analyzed the expression profile of human genes known to play key roles in the regulation, synthesis, and provision of FAs, cholesterol, and BAs, using four groups of mice

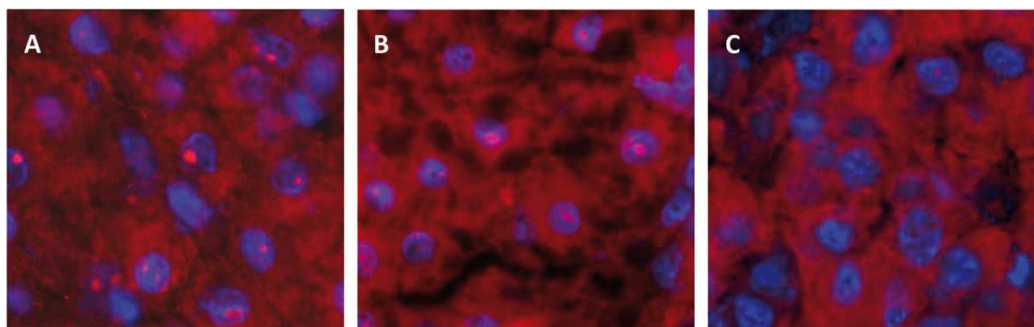


Fig. 5. Cellular distribution of FXR protein (red staining) in human hepatocytes in chimeric liver tissues obtained from uninfected mice (A), as well as from uninfected animals that were treated once with Myrcludex-B (B) or were stably infected with HBV (C). A strong reduction of nuclear FXR (red dots) is shown in the setting of HBV infection. Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole.

harboring distinct human donor hepatocytes, which were either stably infected with HBV or left untreated for comparison. The maintenance of a high differentiation status with production of hepatocyte-specific factors and transport proteins in chimeric mice has already proven valuable, both for infection studies with human hepatotropic viruses^{8,9,23} and for investigations of human liver-mediated metabolism.²⁴

Studies performed *in vitro* and in Tg mice reported that the expression of HBx protein can cause lipid accumulation by up-regulation of various lipogenic genes.^{3,4} However, our analysis shows only modest alterations of the activity of these genes in HBV-infected human hepatocytes. These differences were mainly limited to a light, but significant, enhancement of hAPO A1 ($P = 0.005$), a component of high-density lipoprotein particles that plays an important role in reverse cholesterol transport,²⁵ and of hPPAR- γ ($P = 0.01$), a nuclear receptor protein known to regulate FA storage and adipocyte differentiation.²⁶ The less pronounced induction of lipogenic genes determined in HBV-infected humanized mice could be a result of the lower concentrations of HBx protein expected in the infection setting, compared to the levels reached in HBx Tg mice. Notably, and in line with a previous study determining gene expression in HBV Tg mice,²⁷ we found that various human genes involved in transcriptional regulation (hSREBP2), biosynthesis (hHMGCR), and uptake of cholesterol (hLDLr) were up-regulated in HBV-infected mice. The observed enhancement of cholesterologenic genes suggests that HBV may alter cholesterol metabolism to meet its replication requirements, because depletion of cholesterol was shown to inhibit HBV secretion in hepatoma cells.^{28,29} Thus, promotion of cholesterol synthesis and uptake underlines the importance of these pathways in HBV infection and morphogenesis.

The most dramatic change determined in this study regarded induction of hCYP7A1 (median, 12-fold up-regulation) in HBV-infected mice, which was demonstrated both at the transcriptional and protein level. CYP7A1 is the rate-limiting enzyme of BA synthesis and is responsible for conversion of cholesterol into 7- α -hydroxycholesterol and hence into BAs within hepatocytes.³⁰ The strong enhancement of hCYP7A1, which was also observed *in vitro* upon treatment of NTCP-transduced HepG2 with Myrcludex-B, prompted us to examine the expression profile of factors that are involved in regulation of CYP7A1 transcription.³¹ Interestingly, significant alterations regarded the lower expression levels of hSHP, which is known to act as a corepressor of hCYP7A1 transcription. Notably, the strong induction of hCYP7A1 transcription and suppression of hSHP was also confirmed in liver biopsy samples obtained from CHB patients.

Enhancement of cholesterologenic genes could be, at least in part, a consequence of CYP7A1 induction, because previous studies indicated that overexpression of CYP7A1 increased transcription levels of SREBP2, LDLr, and HMGCR.³⁰ Within hepatocytes, BAs operate as signaling molecules that activate FXR, a BA sensor that can initiate various signaling cascades involved in regulation of CYP7A1. Nuclear translocation of the FXR/retinoid X receptor complex was shown to induce expression of SHP, which, in turn, can suppress CYP7A1 transcription also by interacting with LRH-1 and HNF-4 α . The reduced presence of hFXR proteins observed by IF in the nuclei of HBV-infected human hepatocytes, along with the transcriptional changes determined upon HBV infection, suggest that the lower levels of hSHP and induction of hCYP7A1 may reflect the attempt of hepatocytes to maintain BA homeostasis, whereas the light up-regulation of hFXR could be a result of feedback mechanisms.²²

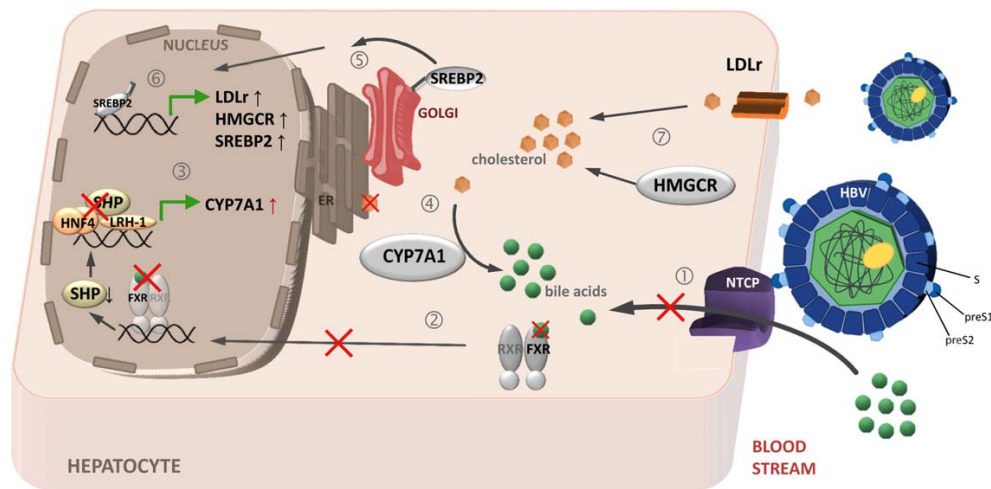


Fig. 6. Proposed mechanism possibly contributing to the induction of hCYP7A1 and genes related to BA and cholesterol metabolism upon binding of HBV pre-S1 to hNTCP. Binding of HBV or Myrcludex-B to the cellular receptor, NTCP (1), which is responsible for most of the hepatocellular uptake of bile salts, limits its function. This, in turn, appears to hinder the activity and nuclear translocation of the BA sensor, FXR (2), leading to reduced expression of SHP, a nuclear factor that, in normal conditions, represses CYP7A1 transcription by interacting with LRH-1 and HNF-4 α (3). The higher levels of CYP7A1 promote BA synthesis by increasing the conversion of intracellular cholesterol to BAs (4). As a means of compensation, activation of SREBP2 processing (5) may lead to expression of genes involved in transcriptional regulation (SREBP2) of cholesterol synthesis (HMGCR) (6) and increased uptake of lipoprotein-associated cholesterol through LDLr-mediated endocytosis (7).

Up-regulation of mCYP7A1 and genes involved in cholesterol and BA metabolism was determined also in murine hepatocytes present within livers of the same HBV-infected humanized mice. Because mouse hepatocytes do not support HBV infection, but permit binding of HBV to mNTCP,^{19,20,32} we assumed that interactions occurring between circulating viral components and the hepatocyte surface, rather than intracellular viral replication, may provoke the alterations determined in hepatocytes of both species. Because NTCP is responsible for the majority of hepatocellular uptake of conjugated bile salts,¹³ we hypothesized (Fig. 6) that binding of HBV to its receptor limits BA uptake and, as a means of compensation, activates pathways promoting BA synthesis.

Myrcludex-B is a synthetic lipopeptide derived from the pre-S1 domain of HBV, which has entered clinical trials after demonstration of its capacity to block HBV and HDV infection in humanized uPA/SCID mice⁸⁻¹⁰ upon binding to NTCP.¹² We showed here that also administration of Myrcludex-B induced a strong enhancement of human and, to a lesser extent, murine CYP7A1 expression in uninfected humanized mice, thus providing evidence that binding of the pre-S1 domain of the HBV envelope to its cellular receptor is sufficient to limit BA uptake, thereby triggering alterations of BA metabolism. It is worth noting that repeated administration of Myrcludex-B in HBV stably infected mice did not cause further changes in gene expression, because hCYP7A1 expression levels determined in Myrcludex-B-

treated, HBV-infected mice were comparable to those achieved in untreated HBV-infected controls.

Our findings raise important questions about the fate and transport function of hNTCP after viral binding, as well as the molecular mechanisms by which pre-S1-mediated binding to NTCP triggers the observed expression changes *in vivo*. Besides transporting bile salts, NTCP is involved in the uptake of various drugs that have been shown to affect its capacity to uptake BAs.³³ To this regard, SMV was shown to limit, but not completely inactivate, NTCP-mediated uptake of bile salts,²¹ and we showed here that administration of SMV to uninfected humanized mice also enhanced hCYP7A1 expression, thus strongly suggesting that binding of HBV to NTCP induces effects resembling those observed upon administration of substances that are known to act as NTCP inhibitors.

Altogether, these results support previous *in vitro* observations reporting a limited uptake of bile salts upon Myrcludex-B administration^{14,15} and suggest that, even in the setting of CHB infection, hepatocellular uptake of BAs may be affected. This may lead to different levels of compensatory metabolic alterations. As a result of serum sampling limitations and differences in levels of human liver chimerism, which are known to affect the ratio and type of circulating BA,³⁴ we could not detect clear bile salt concentration differences among the different groups of humanized mice (M. Haag, personal communication). Future studies

will be needed to address such questions and evaluate the consequences that the described metabolic alterations may have on liver disease progression, drug-drug interactions, and other metabolic pathways. Moreover, it will be important to assess whether viral replication may be also affected by factors interfering with BA and cholesterol metabolism. It is tempting to speculate that the intimate link shown between HBV and liver metabolism may be further exploited for host-targeted therapeutic strategies.

Acknowledgment: The authors are grateful to A. Alexandrov for providing Myrcludex-B, to M. Haag and M. Schwab (IKP, Stuttgart, Germany) for bile salt measurements, to A. Groth and R. Reusch for their excellent assistance with the mouse colony, and to G. Apitzsch, S. Ehret, and C. Dettmer for their great technical help.

References

- Dandri M, Locarnini S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. *Gut* 2012;61(Suppl 1):i6-i17.
- Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2009;51:581-592.
- Kim KH, Shin HJ, Kim K, Choi HM, Rhee SH, Moon HB, et al. Hepatitis B virus X protein induces hepatic steatosis via transcriptional activation of SREBP1 and PPARgamma. *Gastroenterology* 2007;132:1955-1967.
- Na TY, Shin YK, Roh KJ, Kang SA, Hong I, Oh SJ, et al. Liver X receptor mediates hepatitis B virus X protein-induced lipogenesis in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *HEPATOLOGY* 2009;49:1122-1131.
- Hsu CS, Liu CH, Wang CC, Tseng TC, Liu CJ, Chen CL, et al. Impact of hepatitis B virus infection on metabolic profiles and modifying factors. *J Viral Hepat* 2012;19:e48-e57.
- Bar-Yishay I, Shaul Y, Shlomai A. Hepatocyte metabolic signalling pathways and regulation of hepatitis B virus expression. *Liver Int* 2011;31:282-290.
- Schulze A, Schieck A, Ni Y, Mier W, Urban S. Fine mapping of pre-S sequence requirements for hepatitis B virus large envelope protein-mediated receptor interaction. *J Virol* 2010;84:1989-2000.
- Petersen J, Dandri M, Mier W, Lutgehetmann M, Volz T, von Weizsacker F, et al. Prevention of hepatitis B virus infection in vivo by entry inhibitors derived from the large envelope protein. *Nat Biotechnol* 2008;26:335-341.
- Lutgehetmann M, Mancke LV, Volz T, Helbig M, Allweiss L, Bornscheuer T, et al. Humanized chimeric uPA mouse model for the study of hepatitis B and D virus interactions and preclinical drug evaluation. *HEPATOLOGY* 2012;55:685-694.
- Volz T, Allweiss L, Ben MBarek MB, Warlich M, Lohse AW, Pollok JM, et al. The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks intrahepatic virus spreading in humanized mice previously infected with hepatitis B virus. *J Hepatol* 2013;58:861-867.
- Schulze A, Mills K, Weiss TS, Urban S. Hepatocyte polarization is essential for the productive entry of the hepatitis B virus. *HEPATOLOGY* 2012;55:373-383.
- Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* 2012;1:e00049.
- 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* 2011;205-259.
- Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, Nkongolo S, Kaufman C, Falth M, et al. Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology* 2014;146:1070-1083.e6.
- Nkongolo S, Ni Y, Lempp FA, Kaufman C, Lindner T, Esser-Nobis K, et al. Cyclosporin A inhibits hepatitis B and hepatitis D virus entry by cyclophilin-independent interference with the NTCP receptor. *J Hepatol* 2014;60:723-731.
- Watashi K, Sluder A, Daito T, Matsunaga S, Ryo A, Nagamori S, et al. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter NTCP. *HEPATOLOGY* 2013 Dec 21. doi: 10.1002/hep.26982. [Epub ahead of print]
- Lutgehetmann M, Bornscheuer T, Volz T, Allweiss L, Bockmann JH, Pollok JM, et al. Hepatitis B virus limits response of human hepatocytes to interferon-alpha in chimeric mice. *Gastroenterology* 2011;140:2074-2083, 2083.e1-2.
- Volz T, Lutgehetmann M, Wachtler P, Jacob A, Quaas A, Murray JM, et al. Impaired intrahepatic hepatitis B virus productivity contributes to low viremia in most HBeAg-negative patients. *Gastroenterology* 2007;133:843-852.
- Schieck A, Schulze A, Gahler C, Muller T, Haberkorn U, Alexandrov A, et al. Hepatitis B virus hepatotropism is mediated by specific receptor recognition in the liver and not restricted to susceptible hosts. *HEPATOLOGY* 2013;58:43-53.
- Meier A, Mehrle S, Weiss TS, Mier W, Urban S. Myristoylated preS1-domain of the hepatitis B virus L-protein mediates specific binding to differentiated hepatocytes. *HEPATOLOGY* 2013;58:31-42.
- Dong Z, Ekins S, Polli JE. Structure-activity relationship for FDA approved drugs as inhibitors of the human sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). *Mol Pharm* 2013;10:1008-1019.
- Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, et al. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell* 2000;6:517-526.
- Bissig KD, Wieland SF, Tran P, Isogawa M, Le TT, Chisari FV, Verma IM. Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment. *J Clin Invest* 2010;120:924-930.
- Strom SC, Davila J, Grompe M. Chimeric mice with humanized liver: tools for the study of drug metabolism, excretion, and toxicity. *Methods Mol Biol* 2010;640:491-509.
- Tall AR, Yvan-Charvet L, Terasaka N, Pagler T, Wang N. HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis. *Cell Metab* 2008;7:365-375.
- Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, Evans RM. PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med* 2013;19:557-566.
- Hajjou M, Norel R, Carver R, Marion P, Cullen J, Rogler LE, Rogler CE. cDNA microarray analysis of HBV transgenic mouse liver identifies genes in lipid biosynthetic and growth control pathways affected by HBV. *J Med Virol* 2005;77:57-65.
- Bremer CM, Bung C, Kott N, Hardt M, Glebe D. Hepatitis B virus infection is dependent on cholesterol in the viral envelope. *Cell Microbiol* 2009;11:249-260.
- Dorobantu C, Macovei A, Lazar C, Dwek RA, Zitzmann N, Branza-Nichita N. Cholesterol depletion of hepatoma cells impairs hepatitis B virus envelopment by altering the topology of the large envelope protein. *J Virol* 2011;85:13373-13383.
- Li T, Matozel M, Boehme S, Kong B, Nilsson LM, Guo G, et al. Overexpression of cholesterol 7alpha-hydroxylase promotes hepatic bile acid synthesis and secretion and maintains cholesterol homeostasis. *HEPATOLOGY* 2011;53:996-1006.

31. Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J, Mangelsdorf DJ. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell* 2000;6:507-515.
32. Yan H, Peng B, He W, Zhong G, Qi Y, Ren B, et al. Molecular determinants of hepatitis B and D virus entry restriction in mouse sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *J Virol* 2013;87:7977-7991.
33. Anwer MS, Stieger B. Sodium-dependent bile salt transporters of the SLC10A transporter family: more than solute transporters. *Pflugers Arch* 2014;466:77-89.
34. Ellis EC, Nauglers S, Parini P, Mork LM, Jorns C, Zemack H, et al. Mice with chimeric livers are an improved model for human lipoprotein metabolism. *PLoS One* 2013;8:e78550.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's website.

Supplementary Materials and Methods

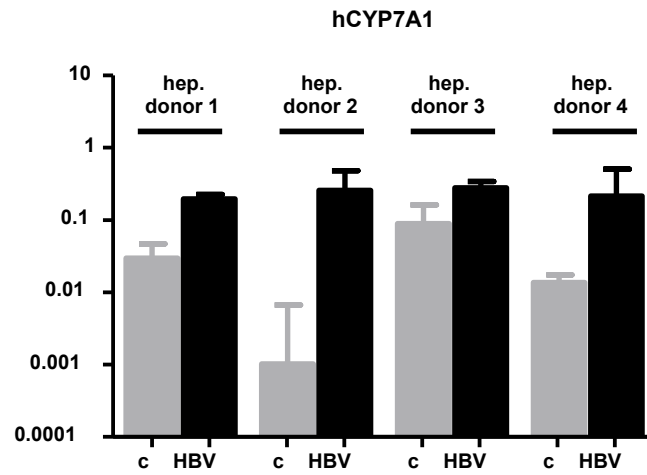
Cloning of NTCP cDNA into a lentiviral vector. To construct a lentiviral expression vector, human NTCP cDNA (OriGene, clone SC118232) has been amplified by PCR using the following primers hNTCP-forward: tataGAATTCcgccaccATGGAGGCCCAACAACGCG (adding a EcoRI site and Kozak-sequence) and hNTCP-reverse: tataGCGGCCGCCTAGGCTGTGCAAGGGGAGC (adding a NotI site). The PCR fragment was cloned using EcoRI and NotI into the third-generation self-inactivating HIV-1 derived lentiviral vector LeGO-iG2-Puro⁺ [1], expressing NTCP under control of an SFFV promoter on a bicistronic mRNA together with eGFP as fluorescent marker linked by a 2A-sequence to a puromycin resistance for drug selection. The integrity of the PCR fragment in the final vector LeGO-iG2-Puro⁺-NTCP has been verified by sequencing. As indicated by OriGene, a silent point mutation is present compared to the reference sequence (accession number: NM_003049), not changing the amino acid sequence of the protein. Vector maps and sequences are available upon request. The vector LeGO-G2-Puro⁺ expressing eGFP and the puromycin resistance only served as control.

Generation and titration of viral particles. Viral particles were produced as cell-free supernatants by transient transfection of HEK-293T packaging cells as described [2]. In brief, lentiviral vectors were packaged using the third-generation packaging plasmids pMDLg/pRRE and pRSV-Rev [3] together with pHCMV-VSV-G [4] expressing the vesicular stomatitis virus envelope protein. Supernatants containing viral particles were titrated on 293T cells, plated at 5×10^4 cells in 0.5 ml medium in each well of a 24 well plate in the presence of 8 μ g/ml polybrene. After addition of viral particle containing supernatant, the plate has been centrifuged at 1,000 \times g for 1 hour at 25°C. Initial gene transfer rates were analysed 6 days after transduction by FACS.

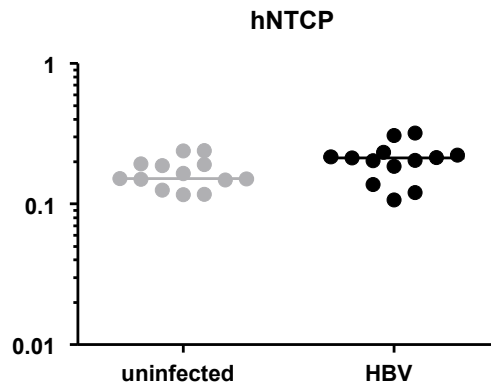
In vitro experiments with hNTCP-transduced HepG2 cells. To generate human hepatoma HepG2 cells stably expressing the human NTCP, HepG2 cells were transduced with a lentiviral vector. LeGO-iG2-Puro⁺-NTCP and the control vector LeGO-G2-Puro⁺ were added to the cells plated at a density of 5×10^4 in 0.5 ml medium in each well of a 24 well plate. Transduced cells were selected with 1 μ g/mL puromycin starting two days after addition of the viral particles. To determine CYP7A1 gene expression profile hNTCP-transduced HepG2 cells were seeded in 12-well plates and cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) GlutaMAX (+4.5g/L D-glucose, + pyruvate) containing 10% fetal calf serum (FCS), 10 μ g/mL gentamicin and 0.25 μ g/mL amphotericin B. After two days the medium was changed and cells were kept in medium containing 2% dimethyl sulfoxide (DMSO) and 2% FCS for treatment experiments. Cells were incubated either with 2 μ g/mL Myrcludex-B or 100 μ M sodium taurocholate hydrate (TC, Sigma-Aldrich). In one experimental setting, 30 minutes after pre-incubation with Myrcludex-B, TC was added. Cells were harvested after 4 hours of treatment, lysed and RNA was purified with Qiagen RNeasy Micro Kit as described in the methods section.

References

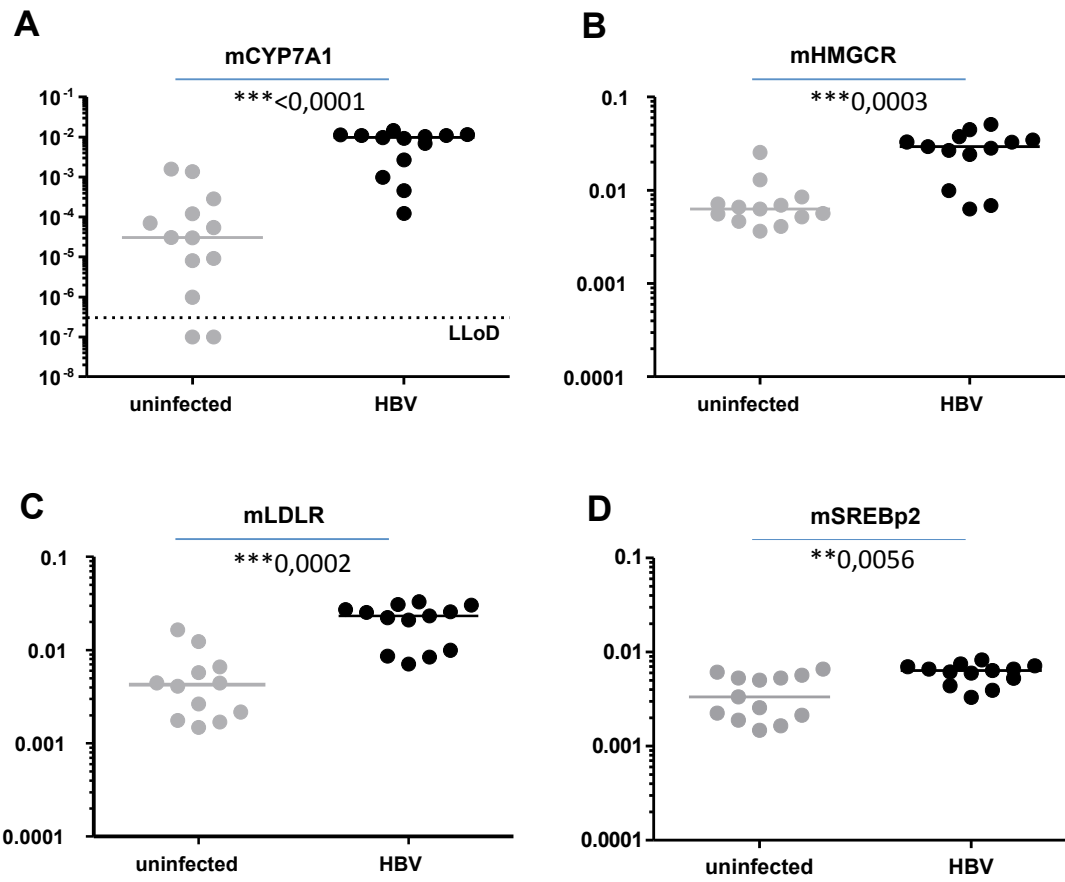
1. Weber K, Mock U, Petrowitz B, Bartsch U, Fehse B. Lentiviral gene ontology (LeGO) vectors equipped with novel drug-selectable fluorescent proteins: new building blocks for cell marking and multi-gene analysis. *Gene Therapy* 2010, **17**(4): 511-520.
2. Weber K, Thomaschewski M, Benten D, Fehse B. RGB marking with lentiviral vectors for multicolor clonal cell tracking. *Nat Protoc* 2012, **7**(5): 839-849.
3. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, *et al.* A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *Journal of virology* 1998, **72**(11): 8463-8471.
4. Beyer WR, Westphal M, Ostertag W, von Laer D. Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range. *Journal of virology* 2002, **76**(3): 1488-1495.



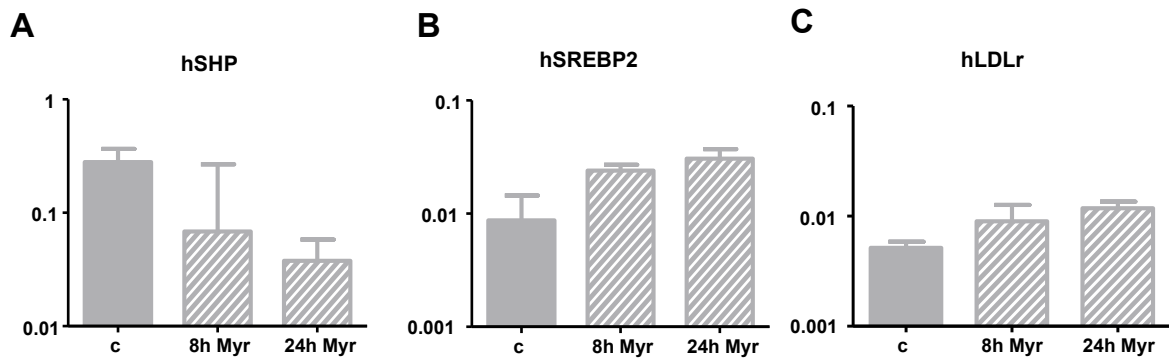
Suppl. Fig. 1. Relative expression of human CYP7A1 in uninfected (c) and HBV-infected (HBV) mice was determined in four different groups of mice harbouring distinct human donor hepatocytes (donor 1-4).



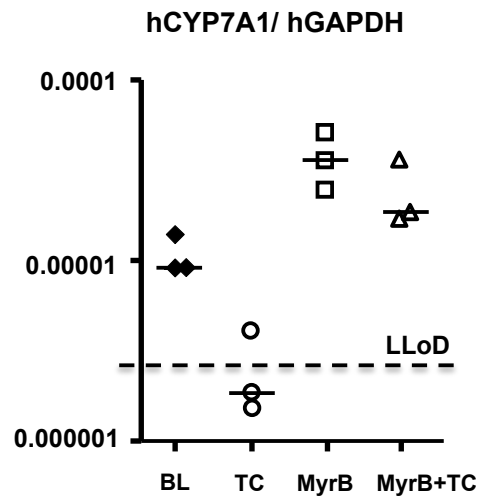
Suppl. Fig.2. Expression levels of human NTCP in chronically HBV infected humanized mice compared to levels determined in uninfected humanized mice.



Suppl. Fig. 3. The presence of HBV infection in humanized mice also affected the expression profile of murine genes involved in bile acids and cholesterol metabolism. By using mouse-specific primers not recognising human transcripts we found significant up-regulation of murine CYP7A1 (**A**), HMGCR (**B**), LDL-R (**C**) and SREBp2 (**D**) in HBV not-permissive murine hepatocytes.



Suppl. Fig. 4. RNA expression levels of human SHP, SREBP2 and LDLr in uninfected humanized mice sacrificed 8 or 24 hours after one single administration of Myrcludex-B.



Suppl. Fig. 5. RNA expression levels of human CYP7A1 in NTCP-transduced HepG2 left untreated (BL), or harvested after 4h of incubation either with sodium taurocholate (TC), or Myrcludex-B (MyrB), or after a 30min incubation with MyrB followed by 4h of TC administration. CYP7A1 expression was reduced after incubation with TC and enhanced upon MyrB administration.

Zusammenfassende Darstellung der Publikation

Hintergrund

Infektionen mit dem Hepatitis B Virus zählen zu den häufigsten Infektionskrankheiten weltweit. Trotz der Existenz einer effektiven Impfung gegen HBV und verschiedener Therapiekonzepte mit Interferon- α oder Nukleos(t)id-Analoga, die sowohl zum Rückgang der Inzidenz als auch der krankheitsassoziierten Komplikationen geführt haben, stellt die Infektion mit geschätzten 350 Millionen chronisch Infizierten noch immer ein gravierendes globales Gesundheitsproblem dar (Trépo et al. 2014).

Die Übertragung von HBV erfolgt parenteral oder sexuell und führt abhängig von vielfältigen Faktoren wie der Infektionsdosis, dem Immunstatus oder dem Alter des Patienten zu unterschiedlichen Manifestationen der Infektion (Trépo et al. 2014). Zumeist entwickelt sich eine akute Hepatitis, bei der es fast immer zu einer spontanen Ausheilung kommt. In anderen Fällen zeigt sich bei Viruspersistenz das Bild einer chronischen Hepatitis, die - bei klinisch sehr vielfältiger Manifestation - im Verlauf zu Lebersteatose, Leberzirrhose und der Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms führen kann (Dandri und Locarnini 2012, Kim et al. 2007).

Zwar ist bekannt, dass HBV nicht direkt zytopathisch ist und die körpereigene Immunantwort zum Fortschreiten des Krankheitsprozesses beiträgt, um jedoch in infizierten Hepatozyten persistieren zu können, etabliert das Hepatitis B Virus ein komplexes Netzwerk aus Virus-Wirts-Interaktionen. Eben diese Pathogenese der Erkrankung sowie aktuellste Erkenntnisse weisen auf die zentrale Rolle des hepatozellulären Stoffwechsels im Krankheitsverlauf und insbesondere auf die große Bedeutung des Zusammenspiels zwischen Virus und metabolischen Prozessen hin (Bar-Yishay et al. 2011, Dandri und Locarnini 2012, Yan et al. 2012).

Dennoch sind die genauen Pathomechanismen und molekularen Prozesse während der persistierenden Infektion und vor allem die Auswirkungen einer Infektion mit HBV auf zelluläre Signalwege im Rahmen des hepatischen Wirtsmetabolismus bislang nur in Ansätzen verstanden.

Molekulare Grundlagen zur HBV Infektion und zum hepatozellulären Stoffwechsel

Das Hepatitis B Virus ist ein leber- und speziesspezifisches DNA-Virus, dessen Genom aus einer partiell doppelsträngigen zirkulären DNA (rcDNA) besteht und von einem Kapsid, dem Hepatitis-B-Core-Protein (HBc-Antigen) sowie einer Hülle

umgeben ist. Die Hülle besteht neben Lipiden der Wirtszelle aus drei unterschiedlich großen Oberflächenproteinen. Das kleine Oberflächenprotein (SHB) besteht aus der S-Domäne (HBs-Antigen), während das mittlere (MHB) und das große Oberflächenprotein (LHB) neben diesem zusätzliche N-terminale präS2- und präS1-Domänen enthalten, wovon die präS1-Domäne für die Bindung des Virus an den erst kürzlich charakterisierten zellulären Rezeptor essentiell ist (Urban et al. 2014, Yan et al. 2012). Nach Aufnahme in die Zelle wird die virale rcDNA in ein stabiles Minichromosom, die covalently closed circular DNA (cccDNA) umgewandelt, die im Zellkern persistieren kann und als Vorlage für die viralen Genprodukte wie die prägenomische RNA, die HBV-Polymerase, das HBc-Antigen sowie das regulatorische HBx Protein und die Hüllproteine fungiert. Nach Formation des reifen Viruspartikels und sogenannter subviraler Partikel, die nur aus der viralen Hülle bestehen, erfolgt schließlich die Sekretion (Dandri und Locarnini 2012).

Der hepatische Lipid-, Cholesterin- und Gallensäurestoffwechsel unterliegt durch ein komplexes Netzwerk spezifischer Transkriptionsfaktoren und Effektormolekülen strengen Regulationsmechanismen.

Auf den Lipid- und Cholesterinstoffwechsel soll im Folgenden nur kurz eingegangen werden. Die zentralen Transkriptionsfaktoren im hepatozellulären Fettstoffwechsel sind peroxisome-proliferator-activated receptors (PPARs), liver X receptors (LXRs) und das sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP1c), wobei Letztere unter anderem über Zielproteine wie SREBP1c selbst, fatty acid synthase (FASN) und weitere die Lipogenese fördern. LXRs vermitteln zudem über die Induktion von Genen wie Apolipoprotein E (APO E), ATP-cassette binding protein (ABCG5/8, ABCA1) und cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) den retrograden Cholesterintransport, die Verwertung von Cholesterin zu Gallensäuren und dessen Sekretion in die Galle (Hong und Tontonoz 2014, Horton et al. 2002, Wagner et al. 2011). Eine Schlüsselfunktion bei der Cholesterinhomöostase kommt auch dem Transkriptionsfaktor sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2) zu, der bei Absinken des intrazellulären Cholesterinspiegels durch Translokation in den Zellkern zur kompensatorischen Induktion von Zielproteinen wie der hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (HMGCR), dem zentralen Enzym der Cholesterinbiosynthese, und dem LDL Rezeptor (LDLr), der die Aufnahme von Cholesterin in die Zelle vermittelt, führt (Horton et al. 2002).

Im Rahmen des enterohepatischen Kreislaufs werden Gallensäuren über den Gallensäuretransporter Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP), in geringerem Ausmaß auch über sogenannte organic anion-transporting polypeptides (OATPs), in die Hepatozyten aufgenommen und gelangen über den Transporter bile salt export pump (BSEP) wiederum in die Gallencanaliculi (Clausel et al. 2011). Der hepatozelluläre Gallensäurehaushalt wird primär über einen negativen Feedback-Mechanismus reguliert. Bei Anstieg des zellulären Gallensäurespiegels wird der Gallensäuresensor und Transkriptionsfaktor farnesoid X receptor (FXR) aktiviert und induziert im Zellkern die Expression seines Zielproteins small heterodimer partner (SHP). SHP wiederum supprimiert über die Interaktion mit den Cofaktoren liver receptor homolog 1 (LRH-1) und hepatocyte nuclear factor 4α (HNF4α) die Expression der cholesterol 7α-hydroxylase (CYP7A1), dem Schlüsselenzym der Gallensäuresynthese, das Cholesterin in Gallensäuren umwandelt (siehe Abbildung 1). Weiterhin kommt es FXR-abhängig zur Supprimierung der Expression von NTCP und der Induktion von BSEP (Clausel et al. 2011).

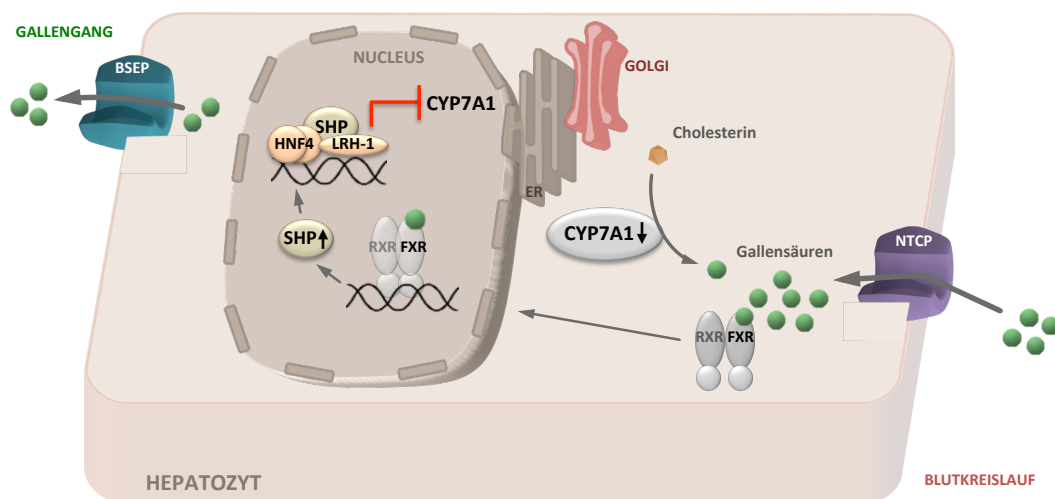


Abb. 1 Regulationsmechanismen des hepatozellulären Gallensäuremetabolismus (modifiziert nach Oehler et al. 2014)

Aktueller Stand der Forschung zur Bedeutung von HBV im hepatischen Stoffwechsel

Bislang konnten an unterschiedlichen Ansatzpunkten wechselseitige Interaktionen zwischen dem Hepatitis B Virus und dem hepatischen Stoffwechsel beleuchtet werden.

Einerseits konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von HBV eng mit metabolischen Prozessen verzahnt ist, indem verschiedene Transkriptionsfaktoren

wie LXR α , FXR, PPARs, HNFs und andere, deren natürliche Funktion die Regulation verschiedener Stoffwechselprozesse ist, auf das Genom von HBV rekrutiert werden, um die Persistenz und Replikation von HBV sicherzustellen (Bar-Yishay et al. 2011, Kim et al. 2011, Wagner et al. 2011). Auch unter Bedingungen erhöhter Gallensäurekonzentrationen konnte in verschiedenen Zelllinien humaner Hepatozyten ein replikationsfördernder Effekt nachgewiesen werden (Kim et al. 2010). Zudem ist bekannt, dass die Sekretion reifer HBV Partikel und damit die Intaktheit des viralen Lebenszyklus eng mit dem intrazellulären Cholesterinangebot verknüpft ist (Bremer et al. 2009, Dorobantu et al. 2011).

Andererseits weisen Studien mit transgenen Mäusen darauf hin, dass HBV Einfluss auf den Lipidmetabolismus ausübt, indem durch das regulatorische HBx Protein Gene wie LXR, SREBP1c, PPAR γ und FASN aktiviert werden, die die Fettsäuresynthese und deren Akkumulation fördern und somit über die Induktion von Steatose, oxidativem Stress und Inflammation die Progredienz des Krankheitsprozesses zu begünstigen vermögen (Kim et al. 2007, Na et al. 2009).

Ferner konnte ein cDNA Microarray bei HBV-transgenen Mäusen unter anderem einen Einfluss von HBV auf Schlüsselgene des Cholesterinstoffwechsels wie SREBP2 zeigen (Hajjou et al. 2005).

Kürzlich gelang es Li et al. den Gallensäuretransporter NTCP als funktionellen zellulären Rezeptor zu identifizieren, der die Aufnahme von HBV und HDV in primäre humane Leberzellen vermittelt (Yan et al. 2012). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass für die Bindung des Viruspartikels an NTCP die präS1-Domäne der viralen Hülle essenziell ist (König et al. 2014). Auch für Myrcludex B, ein von der präS1-Domäne abgeleitetes Lipopeptid, von dem bekannt ist, dass es die Aufnahme von HBV in die Zelle effektiv blockiert, stellt NTCP die Bindungsstelle dar (Petersen et al. 2008, Volz et al. 2013, Ni et al. 2014). Aktuellste *in vitro* Studien weisen zudem darauf hin, dass sowohl die Bindung von Myrcludex B als auch der myristoylierten präS1-Domäne von HBV selbst an NTCP dessen Funktion als Gallensäuretransporter inhibieren (König et al. 2014, Ni et al. 2014, Nkongolo et al. 2014, Watashi et al. 2014).

Die Entdeckung des Gallensäuretransporters NTCP als Rezeptor von HBV (Yan et al. 2012) stellt eine wichtige Verbindung zwischen der Infektion mit dem Hepatitis B Virus und dem hepatischen Stoffwechsel, insbesondere dem

Gallensäurestoffwechsel, dar und rückt somit den Zusammenhang dieser beiden Bereiche deutlich in den Fokus. Diese Erkenntnisse geben Anlass die Auswirkungen von HBV auf zelluläre Signalwege im Rahmen des hepatischen Wirtsmetabolismus genauer zu analysieren.

Bislang blieben jedoch Untersuchungen über Stoffwechseleffekte von HBV in infizierten humanen Hepatozyten durch den Mangel an geeigneten Infektionsmodellen limitiert, was zum einen auf die Instabilität und eingeschränkte Vollständigkeit metabolischer Signalwege in Zelllinien und Kulturen primärer humaner Hepatozyten und zum anderen auf den engen Wirts- und Gewebetropismus von HBV zurückzuführen ist. Die Entwicklung humanisierter chimärer uPA/SCID/beige (USB) Mäuse, die sich durch Aufrechterhaltung eines hohen Differenzierungsgrades mit der Produktion hepatozytenspezifischer Faktoren und Transportproteine als wertvolles Modell für die Durchführung von Infektionsstudien mit humanen hepatotropen Viren und Analysen humanspezifischer Stoffwechselprozesse erwiesen haben, ermöglicht die Überwindung dieser Einschränkungen und so ein tieferes Verständnis über die Virus-Wirts-Interaktionen im Rahmen einer HBV Infektion zu erlangen (Dandri und Petersen 2012, Lütthegemann et al. 2012, Strom et al. 2010).

Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Auswirkung einer chronischen Infektion mit dem Hepatitis B Virus auf den hepatischen Lipid-, Cholesterin- und insbesondere Gallensäurestoffwechsel in humanisierten chimären USB Mäusen. Zudem sollten mögliche funktionelle Mechanismen und die genauen zellulären Signalwege ermittelt werden, die derartigen Veränderungen zugrunde liegen.

Methodik

Als in-vivo Infektionsmodell wurde das USB Mausmodell verwendet. Hierbei wird durch das spezifisch hepatotoxische uPA (Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator) Transgen das Absterben muriner Hepatozyten induziert und somit die Repopulation der Mausleber mit humanen Fremdhepatozyten ermöglicht, die aus nicht verwendeten Teilen von Lebertransplantaten gewonnen und den Mäusen intrasplenisch injiziert werden. Durch Einkreuzen von immundefizienten SCID/beige

Mäusen (severe combined immunodeficiency), die weder funktionelle B- und T-Lymphozyten, noch NK-Zellen aufweisen, wird eine Abstoßungsreaktion der transplantierten humanen Leberzellen verhindert. In der Folge können die humanen Hepatozyten der chimären Mauslebern mit dem Hepatitis B Virus infiziert werden. Die Expressionsprofile stoffwechselspezifischer Gene chronisch HBV-infizierter Mäuse wurden mit denen uninfizierter Kontrolltiere verglichen, wobei in beide Gruppen jeweils Tiere mit humanen Hepatozyten aus insgesamt vier verschiedenen Spenderlinien eingeschlossen waren. Für die Analyse bindungsspezifischer Effekte erfolgte die Behandlung mit Myrcludex B (siehe Abbildung 2).

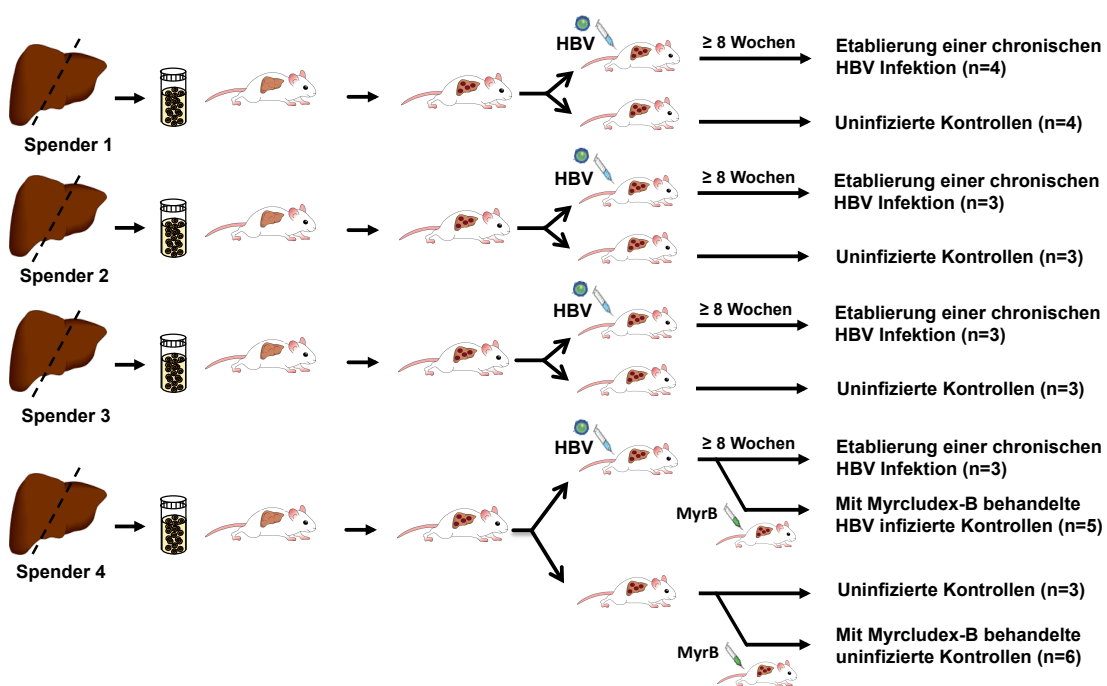


Abb. 2 Versuchsaufbau zur Expressionsanalyse stoffwechselspezifischer Gene in HBV-infizierten und uninfizierten chimären Mäusen

Die Genexpressionsanalyse wurde mittels Real-Time PCR (RT-PCR) durchgeführt, wobei Primer verwendet wurden, die entweder spezifisch humane oder murine Gene erkennen. Auch die Analyse von Leberbiopsien chronisch HBV-infizierter und uninfizierter Patienten erfolgte mittels RT-PCR.

Um die intrazelluläre Verteilung stoffwechselspezifischer Proteine zu detektieren, wurden kryokonservierte Leberproben HBV-positiver und -negativer Tiere immunhistochemisch gefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Zudem konnten Proteinexpressionslevel nach Immunopräzipitation mittels Westernblot quantifiziert werden.

Analysen und Ergebnisse

A. Auswirkung einer HBV Infektion auf das Expressionsprofil von Genen des Lipid-, Cholesterin- und Gallensäuremetabolismus in humanen Hepatozyten

Für die Analyse des Genexpressionsmusters humaner Hepatozyten innerhalb der Mäuselebern wurden Primer verwendet, die spezifisch humane Gene und nicht Gene murinen Ursprungs erkennen. Die Expressionslevel von Schlüsselgenen des Fett-, Cholesterin- und Gallensäurestoffwechsels von insgesamt 13 HBV-infizierten Tieren wurden mit 13 uninfizierten Tieren verglichen.

Im Rahmen des Lipidmetabolismus zeigten nur wenige Gene wie hPPAR γ und hAPOA1 signifikant erhöhte RNA-Level, während weitere mit der Lipogenese assoziierte Gene (hPPAR α , hSREBP1c, hLXR α/β , hFASN) und Apolipoproteine (hAPOB, hAPOC3, hAPOE) nur leicht veränderte oder nicht signifikante Werte aufwiesen.

Dagegen zeigten Gene, die an der Transkriptionsregulation, Neusynthese und der zellulären Aufnahme von Cholesterin beteiligt sind wie hSREBP2, hHMGCR und hLDLr deutlich erhöhte Expressionswerte bei infizierten Tieren im Vergleich zu uninfizierten Kontrollen.

Die auffallendste Veränderung stellte die Induktion des Schlüsselenzyms der Gallensäuresynthese, hCYP7A1 dar, das Cholesterin in Gallensäuren umwandelt. Diese Beobachtung konnte auch mittels Westernblot auf Proteinebene bestätigt werden.

Auch Gene, die im Rahmen des Feedbackmechanismus an der Regulation von CYP7A1 beteiligt sind, zeigten deutliche Veränderungen. Neben verminderten Expressionswerten von hSHP, dem Corepressor von CYP7A1, wies hLRH-1 eine signifikante Erhöhung auf.

Bemerkenswerterweise konnten auch in Leberbiopsien chronisch HBV-infizierter Patienten deutlich erhöhte RNA-Level von hCYP7A1 und eine Reduktion von hSHP im Vergleich zu uninfizierten Proben gemessen werden, wodurch die Ergebnisse der Analysen in chimären Mäusen untermauert wurden.

B. Auswirkungen von HBV auf murine Gene in chimären Mäusen

Um herauszufinden, ob die beobachteten Veränderungen durch die Infektion selbst oder durch im Blut zirkulierende Virionen hervorgerufen wurden, wurden wiederum

Hepatozyten derselben Versuchstiere analysiert, nun jedoch unter Verwendung von Primern, die ausschließlich Gene murinen Ursprungs erkennen.

Erstaunlicherweise zeigten auch hier infizierte Tiere erhöhte Expressionswerte für Gene wie mCYP7A1 und mSREBP2 im Vergleich zu uninfizierten Kontrollen. Da Maushepatozyten zwar die Bindung der präS1-Domäne an den Rezeptor mNTCP zulassen, eine anschließende Infektion jedoch durch eine erst kürzlich charakterisierte fehlende Aminosäuresequenz im murinen NTCP nicht möglich ist (Ni et al. 2014, Schieck et al. 2013), ließen diese Ergebnisse darauf schließen, dass nicht die intrazelluläre Virusreplikation, sondern vielmehr die Interaktion von HBV mit der Hepatozytenmembran ursächlich für die beobachteten Veränderungen sein musste.

C. Das von der präS1-Domäne von HBV abgeleitete Lipopeptid Myrcludex B induziert die Expression von CYP7A1

Um die für die beobachteten Veränderungen verantwortlichen viralen Komponenten näher einzugrenzen, wurden uninfizierte chimäre Mäuse mit dem von der präS1-Domäne von HBV abgeleiteten Lipopeptid Myrcludex B behandelt, das sowohl an den humanen als auch mit geringerer Affinität an den murinen NTCP bindet (Meier et al. 2013, Schieck et al. 2013). Auch hier zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Expressionslevel von hCYP7A1 und weiteren Schlüsselgenen wie hSREBP2 und hLDLr, wodurch die Bindung der präS1-Domäne von HBV an NTCP als ursächlich für die beobachteten Auswirkungen auf den Gallensäurestoffwechsel bestätigt wurde.

Die Behandlung NTCP-transduzierter HepG2 Zellen mit Myrcludex B bewirkte ebenfalls eine Induktion von CYP7A1; durch die darauffolgende Inkubation mit der Gallensäure Natriumtaurocholat, die wiederum zu einer Reduktion der Expressionslevel von CYP7A1 führte, konnte die Annahme gestützt werden, dass eine gehemmte Gallensäureaufnahme, vermittelt durch die Bindung der präS1-Domäne an NTCP, zur Induktion der Gallensäuresynthese führen könnte.

Auch die Behandlung uninfizierter Mäuse mit Simvastatin, von dem neben vielen weiteren Medikamenten bekannt ist, dass es die Transportfunktion von NTCP hemmt (Dong et al. 2013), erbrachte ebenfalls erhöhte RNA Level für hCYP7A1 und bekräftigte einen mit einer Inhibition von NTCP vergleichbaren ursächlichen Mechanismus.

D. Das zelluläre Verteilungsmuster von FXR ist in HBV-infizierten chimären Mäusen verändert

Um den genauen intrazellulären Signalweg aufzudecken, der durch den verminderten Gallensäureeinstrom induziert wird und somit das veränderte Expressionsprofil im Gallensäuremetabolismus vermittelt, wurde der negative Feedbackmechanismus über den Transkriptionsfaktor FXR, der durch Gallensäuren aktiviert über die Induktion von SHP die Expression von CYP7A1 hemmt (Claudel et al. 2011), näher analysiert. In der Annahme, dass die HBV-vermittelte reduzierte Transportfunktion von NTCP eine verminderte Aktivierung von FXR und damit reduzierte Translokation in den Zellkern bedingt, wurde mittels Immunfluoreszenz die intrazelluläre Verteilung von FXR in Lebergewebe HBV-infizierter und uninfizierter humanisierter Mäuse analysiert. Damit im Einklang zeigte sich FXR in den Nuclei HBV-positiver Hepatozyten im Vergleich zu uninfizierten Kontrollen deutlich vermindert und so konnte die Feedbackregulation über FXR als zugrunde liegender intrazellulärer Signalweg bestätigt werden.

Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine HBV Infektion unmittelbaren Einfluss auf den Gallensäure- und Cholesterinhaushalt hat, dass diese Auswirkungen durch Bindung des Virus an seinen Rezeptor NTCP verursacht sind und dass eine dadurch bedingte Inhibition von NTCP den vermittelnden Mechanismus darzustellen vermag.

Erste Analysen im Bereich des Lipidmetabolismus ergaben im Gegensatz zu Studien an transgenen Mäusen, die eine HBx-abhängige Induktion zentraler Gene des anabolen Fettstoffwechsels zeigten (Kim et al. 2007, Na et al. 2009), nur vereinzelte Effekte bei HBV-infizierten Tieren. Als ursächlich für diese Unterschiede werden die geringeren Konzentrationen des HBx Proteins in infizierten humanisierten Mäusen im Vergleich zu HBx-transgenen Mäusen vermutet.

Im Rahmen des Cholesterinstoffwechsels dagegen zeigten sich in Übereinstimmung mit einer vorangegangenen Studie (Hajjou et al. 2005) deutliche Veränderungen des Genexpressionsprofils bei chronisch HBV-infizierten Tieren, indem Gene induziert waren, die über die Begünstigung der Neusynthese und zellulären Aufnahme von Cholesterin dessen intrazelluläre Bereitstellung fördern.

Am eindrucksvollsten zeigte sich jedoch der Gallensäurestoffwechsel mit der erheblich gesteigerten Expression des Schlüsselenzyms der Gallensäuresynthese CYP7A1 beeinflusst. In Übereinstimmung hiermit ergab die anschließende Expressionsanalyse der an der Regulation von CYP7A1 beteiligten Faktoren Effekte, die mit einer gesteigerten Gallensäuresynthese über CYP7A1 vereinbar sind. Diese schlossen die mittels Immunfluoreszenz detektierte verminderte nukleäre Translokation und damit reduzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors FXR sowie die daraus resultierende reduzierte Transkription von hSHP, dem Corepressor von CYP7A1, ein. Durch die Untersuchung von Leberbiopsien chronisch HBV-infizierter Patienten konnten diese Effekte auf CYP7A1 und SHP untermauert werden.

Ein Zusammenhang zwischen den beobachteten Auswirkungen auf den Cholesterin- und Gallensäurestoffwechsel lässt sich insofern ableiten, als die vermehrte intrazelluläre Bereitstellung von Cholesterin als Konsequenz der Induktion von CYP7A1 und damit der Gallensäuresynthese aus Cholesterin anzusehen sein könnte, da in Studien die Überexpression von CYP7A1 eine Induktion von SREBP2, HMGCR und LDLr nach sich zog (Li et al. 2011).

Zusammen mit der beschriebenen FXR- und SHP- abhängigen Förderung der Neusynthese von Gallensäuren durch CYP7A1 könnte die vorliegende Stoffwechsellage insgesamt den Versuch der Hepatozyten widerspiegeln die Gallensäurehomöostase aufrecht zu erhalten.

Erste funktionelle Hintergründe ergaben Analysen von mCYP7A1 und anderen Genen des Cholesterin- und Gallensäurestoffwechsels in murinen Hepatozyten derselben Mäuselebern. Da sich auch hier vergleichbare Stoffwechseleffekte zeigten, rückte vielmehr die Interaktion viraler Komponenten mit der Hepatozytenoberfläche als die Infektion selbst als mögliche Ursache in den Fokus. Die Behandlung uninfizierter Tiere mit Myrcludex B ergab ebenfalls entsprechende Expressionsprofile und bestätigte somit die Bindung der präS1-Domäne der HBV Hülle an NTCP als auslösende Komponente für die beobachteten Stoffwechseleffekte.

Da NTCP auch für den Großteil des Gallensäuretransports verantwortlich ist, vermuteten wir abschließend als zugrunde liegenden Mechanismus, dass die Bindung von HBV über eine Inhibition von NTCP die Aufnahme von Gallensäuren hemmt und folglich als Kompensationsmechanismus Signalwege aktiviert werden, die die Gallensäuresynthese fördern (siehe Abbildung 3).

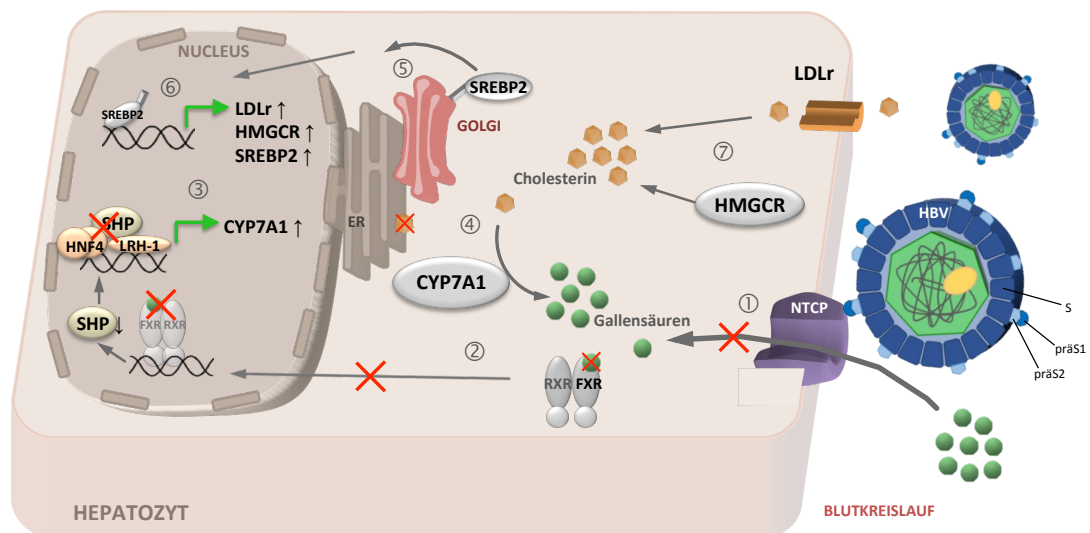


Abb. 3 Vorgeschlagener Mechanismus der Induktion von CYP7A1, an dessen Regulation beteiligter Gene und von Genen des Cholesterinmetabolismus nach Bindung von HBV über die präS1-Domäne an NTCP (modifiziert nach Oehler et al. 2014)

Zusammen bestätigen unsere Analysen aktuellste Beobachtungen *in vitro* über limitierte Gallensäureaufnahme über NTCP sowohl durch Myrcludex B als auch durch die präS1-Domäne von HBV selbst (König et al. 2014, Ni et al. 2014, Nkongolo et al. 2014, Watashi et al. 2014) und deuten darauf hin, dass auch eine chronische HBV Infektion *in vivo* die hepatozelluläre Aufnahme von Gallensäuren beeinflusst und dadurch verschiedene metabolische Kompensationsmechanismen für die Aufrechterhaltung der Gallensäurehomöostase zu aktivieren vermag.

In der Gesamtheit gewähren unsere Ergebnisse völlig neue Einblicke in die Pathophysiologie der Infektion mit dem Hepatitis B Virus und erweitern grundlegend das Verständnis über das komplexe Zusammenspiel zwischen HBV und dem Lebermetabolismus.

Gleichmaßen eröffnen sich neuartige Fragestellungen wie die Ermittlung möglicher Folgen im Rahmen von Medikamenteninteraktionen (Patman 2014) und insbesondere wie sich die beobachteten Veränderungen auf den enterohepatischen Kreislauf und den Gesamtmetabolismus auswirken, was bereits Ergebnis aktuellster Studien an NTCP Knockout-Mäusen ist (Slijepcevic et al. 2015). Zudem ergibt sich die Frage, ob derartige Veränderungen das Potential für den Einsatz als neue, frühe Biomarker einer HBV Infektion haben könnten (Romero et al. 2015).

Aus virologischer Perspektive dagegen, basierend auf dem Wissen, dass die Replikation des Hepatitis B Virus abhängig von metabolischen Prozessen ist, werfen

unsere Ergebnisse insbesondere die Frage auf, ob die beobachteten Stoffwechseleffekte einen Vorteil für das Virus und den Krankheitsprozess darstellen und folglich ob Faktoren, die mit dem Gallensäurestoffwechsel interagieren die virale Replikation zu beeinflussen vermögen (Geier 2014).

Somit wird durch die vorliegende Studie der Weg für einen neuen Ansatz für mögliche Therapiestrategien eröffnet und es bedarf nachfolgender Studien um derartige Fragestellungen zu ergründen.

Literaturverzeichnis

Bar-Yishay I, Shaul Y, Shlomai A. Hepatocyte metabolic signalling pathways and regulation of hepatitis B virus expression. *Liver Int.* 2011 Mar;31(3):282-90.

Bremer CM, Bung C, Kott N, Hardt M, Glebe D. Hepatitis B virus infection is dependent on cholesterol in the viral envelope. *Cell Microbiol.* 2009 Feb;11(2):249-60.

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.* 2011 Aug;1812(8):867-78.

Dandri M, Locarnini S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. *Gut.* 2012 May;61 Suppl 1:i6-17

Dandri M, Petersen J. Chimeric mouse model of hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2012 Feb;56(2):493-5.

Dong Z, Ekins S, Polli JE. Structure-activity relationship for FDA approved drugs as inhibitors of the human sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). *Mol Pharm.* 2013 Mar;10(3):1008-1019.

Dorobantu C, Macovei A, Lazar C, Dwek RA, Zitzmann N, Branza-Nichita N. Cholesterol depletion of hepatoma cells impairs hepatitis B virus envelopment by altering the topology of the large envelope protein. *J Virol.* 2011 Dec;85(24):13373-83.

Geier A. Hepatitis B virus: the "metabolovirus" highjacks cholesterol and bile acid metabolism. *Hepatology.* 2014 Nov;60(5):1458-60.

Hajjou M, Norel R, Carver R, Marion P, Cullen J, Rogler LE, Rogler CE. cDNA microarray analysis of HBV transgenic mouse liver identifies genes in lipid biosynthetic and growth control pathways affected by HBV. *J Med Virol.* 2005 Sep;77(1):57-65.

Hong C, Tontonoz P. Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2014 Jun;13(6):433-44.

Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 2002 May;109(9):1125-31.

Kim KH, Shin HJ, Kim K, Choi HM, Rhee SH, Moon HB, Kim HH, Yang US, Yu DY, Cheong J. Hepatitis B virus X protein induces hepatic steatosis via transcriptional activation of SREBP1 and PPARgamma. *Gastroenterology.* 2007 May;132(5):1955-67.

Kim HY, Cho HK, Choi YH, Lee KS, Cheong J. Bile acids increase hepatitis B virus gene expression and inhibit interferon-alpha activity. *FEBS J.* 2010 Jul;277(13):2791-802.

Kim HY, Cho HK, Kim HH, Cheong J. Oxygenated derivatives of cholesterol promote hepatitis B virus gene expression through nuclear receptor LXR α activation. *Virus Res.* 2011 Jun;158(1-2):55-61.

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.* 2014 Oct;61(4):867-75.

Li T, Matozel M, Boehme S, Kong B, Nilsson LM, Guo G, Ellis E, Chiang JY. Overexpression of cholesterol 7 α -hydroxylase promotes hepatic bile acid synthesis and secretion and maintains cholesterol homeostasis. *Hepatology.* 2011 Mar;53(3):996-1006.

Lütgehetmann M, Mancke LV, Volz T, Helbig M, Allweiss L, Bornscheuer T, Pollok JM, Lohse AW, Petersen J, Urban S, Dandri M. Humanized chimeric uPA mouse model for the study of hepatitis B and D virus interactions and preclinical drug evaluation. *Hepatology.* 2012 Mar;55(3):685-94.

Meier A, Mehrle S, Weiss TS, Mier W, Urban S. Myristoylated PreS1-domain of the hepatitis B virus L-protein mediates specific binding to differentiated hepatocytes. *Hepatology.* 2013 Jul;58(1):31-42.

Na TY, Shin YK, Roh KJ, Kang SA, Hong I, Oh SJ, Seong JK, Park CK, Choi YL, Lee MO. Liver X receptor mediates hepatitis B virus X protein-induced lipogenesis in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2009 Apr;49(4):1122-31.

Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, Nkongolo S, Kaufman C, Fälth M, Stindt J, Königer C, Nassal M, Kubitz R, Sülthmann H, Urban S. Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology.* 2014 Apr;146(4):1070-83.

Nkongolo S, Ni Y, Lempp FA, Kaufman C, Lindner T, Esser-Nobis K, Lohmann V, Mier W, Mehrle S, Urban S. Cyclosporin A inhibits hepatitis B and hepatitis D virus entry by cyclophilin-independent interference with the NTCP receptor. *J Hepatol.* 2014 Apr;60(4):723-31.

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. Binding of hepatitis B virus to its cellular receptor alters the expression profile of genes of bile acid metabolism. *Hepatology.* 2014 Nov;60(5):1483-93.

Patman G. Hepatitis: HBV infection alters bile acid metabolism gene profile. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014 Jun;11(6):332.

Petersen J, Dandri M, Mier W, Lütgehetmann M, Volz T, von Weizsäcker F, Haberkorn U, Fischer L, Pollok JM, Erbes B, Seitz S, Urban S. Prevention of hepatitis B virus infection in vivo by entry inhibitors derived from the large envelope protein. *Nat Biotechnol.* 2008 Mar;26(3):335-41.

Romero MR, Monte MJ, Marin JJ. Pathophysiological and pharmacological implications of elucidating the molecular bases of the interaction between HBV and the bile acid transporter NTCP. *Ann Hepatol.* 2015 Jan-Feb;14(1):143-4.

Schieck A, Schulze A, Gähler C, Müller T, Haberkorn U, Alexandrov A, Urban S, Mier W. Hepatitis B virus hepatotropism is mediated by specific receptor recognition in the liver and not restricted to susceptible hosts. *Hepatology.* 2013 Jul;58(1):43-53.

Slijepcevic D, Kaufman C, Wichers CG, Gilglioni EH, Lempp FA, Duijst S, de Waart DR, Oude Elferink RP, Mier W, Stieger B, Beuers U, Urban S, van de Graaf SF. Impaired uptake of conjugated bile acids and Hepatitis B Virus preS1-binding in Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide knockout mice. *Hepatology.* 2015 Jan 10. doi: 10.1002/hep.27694. (Epub ahead of print)

Strom SC, Davila J, Grompe M. Chimeric mice with humanized liver: tools for the study of drug metabolism, excretion, and toxicity. *Methods Mol Biol.* 2010;640:491-509.

Trépo C, Chan HLY, Lok A. Hepatitis B virus infection. *Lancet.* 2014 Dec; 384(9959):2053-63

Urban S, Bartenschlager R, Kubitz R, Zoulim F. Strategies to inhibit entry of HBV and HDV into hepatocytes. *Gastroenterology.* 2014 Jul;147(1):48-64.

Volz T, Allweiss L, Ben MBarek M, Warlich M, Lohse AW, Pollok JM, Alexandrov A, Urban S, Petersen J, Lütgehetmann M, Dandri M. The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks intrahepatic virus spreading in humanized mice previously infected with hepatitis B virus. *J Hepatol.* 2013 May;58(5):861-7.

Wagner M, Zollner G, Trauner M. Nuclear receptors in liver disease. *Hepatology.* 2011 Mar;53(3):1023-34.

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, Kusahara H, Mizokami M, Wakita T. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter, sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). *Hepatology.* 2014 May;59(5):1726-37.

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.* 2012 Nov;1:e00049.

Erklärung des Eigenanteils an der Publikation

Gegenstand dieser Arbeit war es die Auswirkungen einer chronischen HBV Infektion auf den Lipid-, Cholesterin- und insbesondere Gallensäurestoffwechsel zu untersuchen.

Das Konzept der Untersuchungen wurde von Prof. Dr. Maura Dandri und Prof. Dr. Jörg Heeren gemeinsam mit mir erarbeitet. Im Verlauf konnte ich durch Einbringen verschiedener Denkansätze zur Weiterentwicklung des Projekts und des Versuchsaufbaus beitragen.

Die Grundlagen wie die Vorbereitung und Transplantation der humanen Zellen, das Infizieren der Mäuse sowie deren Behandlung konnten mit Hilfe von Dr. Katja Giersch, Dr. Lena Allweiss und Dr. Tassilo Volz umgesetzt werden.

Die Aufbereitung der Mäuselebern, die virologischen Messungen sowie die Genexpressionsanalysen, die im Speziellen die Ergebnisse dieser Arbeit erbrachten, wurden größtenteils eigenständig von mir selbst durchgeführt. Auch die Analysen der Leberbiopsien von Patienten habe ich selbstständig umgesetzt.

Die grundlegenden Proteinanalysen und immunhistochemischen Färbungen wurden von mir durchgeführt und mit Hilfe von Dr. Janine Kah und Dr. Marc Lütgehetmann abschließend umgesetzt. Von Prof. Dr. Maura Dandri und Dr. Tassilo Volz erhielt ich weitere Anregungen und Vorschläge.

Die Erzeugung NTCP-transduzierter HepG2 Zellen erfolgte durch Prof. Dr. Boris Fehse und Dr. Kristoffer Riecken, die anschließenden in vitro Analysen durch Oliver D. Bhadra.

Die Interpretation, Zusammenführung und Überarbeitung der Analysen sowie die Erstellung des Manuskripts wurden vor allem von Prof. Dr. Maura Dandri, Prof. Dr. Jörg Heeren, Dr. Tassilo Volz und mir durchgeführt, wobei auch insbesondere die graphische Gestaltung durch mich umgesetzt wurde.

Unter Mitwirkung aller Co-Autoren erfolgte die Diskussion zur Fertigstellung der Publikation.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Maura Dandri und Prof. Dr. Jörg Heeren für die Bereitstellung des Promotionsthemas, die hervorragende und intensive Betreuung und die vielen Anregungen. Auch für das Vertrauen unsere Ergebnisse auf verschiedenen Kongressen vorstellen zu dürfen möchte ich mich bedanken.

Ganz besonders möchte ich Prof. Dr. Maura Dandri auch dafür danken, dass sie mir nicht zuletzt durch ihr unermüdliches und warmherziges Engagement, die einzigartige Förderung und auch persönliche Gespräche ein Vorbild geworden ist.

Mein Dank gilt vornehmlich auch Dr. Tassilo Volz für seine uneingeschränkte geduldige Bereitschaft mir mit seiner Erfahrung, vielen Anregungen und praktischer Unterstützung zur Seite zu stehen.

Der gesamten Arbeitsgruppe Dr. Marc Lütgehetmann, Dr. Katja Giersch, Dr. Lena Allweis, Dr. Janine Kah, Oliver D. Bhadra, Claudia Dettmer und Anne Groth möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und die tolle Arbeitsatmosphäre danken. Danke auch für die schönen Abende außerhalb des Labors.

Ganz besonders meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Liebe Julian möchte ich für ihren bedingungslosen Rückhalt danken und dafür, dass sie mich auf meinem Weg stets begleiten und bestärken.

Es ist ein großes Glück, dass es euch gibt!

Eidesstattliche Versicherung

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

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:

Nicola Oehler