

Abschlussbericht Teilprojekt 13.1

Projekttitel: Analyse der Hepatitis B Virus cccDNA

Projektleiter: Prof. Dr. H. Will
Universität Hamburg
Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie und
Immunologie
Martinistr. 52
20251 Hamburg

Telefon: +49-(0) 40-4805 1221

Fax: +49-(0) 40-4805 1222

E-Mail: will@hpi.uni-hamburg.de

Berichtszeitraum: 01.02.2002 – 31.01.2005

I. Kurze Darstellung

1. Aufgabenstellung

Im Zentrum dieses Projekts stand wie geplant die Suche nach zellulären und viralen Faktoren, welche für die Synthese, Stabilität und Medikamenten-Resistenz der Hepatitis B Virus spezifischen cccDNA eine entscheidende Rolle spielen. Aufbauend auf den erhofften Erkenntnissen sollte es mittel- oder langfristig möglich sein, neue Medikamente zu entwickeln, welche die cccDNA destabilisieren oder zerstören und so zur endgültigen Viruseliminierung führen.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das Projekt wurde in Labors der Sicherheitsstufe S2 und S3* am Heinrich-Pette Institut für experimentelle Virologie und Immunologie durchgeführt. Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung des Projekts war die bereits vorhandene Laborausstattung mit einer Vielzahl von Geräten für molekular- und zellbiologischen Arbeiten sowie die Mitarbeit von zwei technischen Mitarbeitern und einem Postdoc, welche durch Mittel der Grundausrüstung des Instituts finanziert wurden. Aus Projektmitteln des Hepnet wurde eine Doktorandin finanziert und ein relativ kleiner Teil der notwendigen Sachmittel. Die Kooperationsmöglichkeiten mit Partnern aus dem Hepnet, mit Kollegen aus dem Heinrich-Pette-Institut (AG Hohenberg) sowie mit vielen externen Partnern waren essentielle Voraussetzungen für die Durchführung des Vorhabens.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Experimente wurden wie geplant durchgeführt. Die hohe Komplexität der Forschungsthematik, neue Entwicklungen auf wissenschaftlichem Gebiet sowie im Laufe des Vorhabens erhaltene Ergebnisse führten zudem zu ursprünglich nicht geplanten zusätzlichen Forschungsaktivitäten. Dazu gehörten die Entwicklung von Mikroorgansystemen, die Testung von Proteasominhibitoren als neue antivirale Agenzien, sowie die Analyse der antiviralen Potenz von neuen Nukleosidanaloga.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Zu Beginn der Arbeit waren weder zelluläre noch virale Faktoren bekannt, welche für die Synthese, Stabilität und Medikamenten-Resistenz der Hepatitis B Virus spezifischen cccDNA von entscheidender Bedeutung sind. Auch die Mechanismen der Regulation der Kopienzahl der cccDNA sind bis heute weit gehend unbekannt.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Kooperation und der wissenschaftliche Erfahrungsaustausch mit mehreren Teilprojektleitern des Hepnet haben wesentlich zur erfolgreichen Durchführung des Projekts beigetragen. Zu den beteiligten Personen/Projekten zählen C. Trautwein/M. Manns (TP 12.3), S. Behrens und W. Gehrlich (TP 13.3), M. Roggendorf / M. Lu, R. Bartenschlager (TP 13.1), F. von Weizsäcker (TP 14.1) und H.P. Dienes (TP 11.2.4). Des Weiteren waren externe Kooperationen mit Prof. U. Schubert (HPI, jetzt Universität Erlangen) bei der Testung der antiviralen Aktivität von Proteasominhibitoren von Bedeutung. Hierbei handelt es sich um Studien, die teilweise durch NGFN-Mittel gefördert wurden. Desweiteren sind die Kooperationen mit E. Hildt (RKI-Berlin) und mit E. Mathes (MDC-Berlin) zu nennen, die bei der erfolgreichen Bearbeitung von spezifischen Aspekten des Projekts zum Thema „Virus-Zellinteraktion“ bzw. „neue Nukleosidanaloga“ unabdingbar waren.

II. Eingehende Darstellung

1. Erzielte Ergebnisse

Um unser Ziel zu erreichen, haben wir in der vergangenen Förderperiode intensiv an der Etablierung eines 3-dimensionalen Minileberorgansystems gearbeitet, um *in vitro* eine effiziente Synthese von cccDNA unter *in vivo* ähnlichen Bedingungen studieren zu können. Hierbei sind wir einen wesentlichen Schritt vorangekommen, da es gelang funktionell und morphologisch leberähnliche Mikroorgane herzustellen und die Infizierbarkeit der darin befindlichen Hepatozyten nachzuweisen. Mit diesem Modell war es erstmalig möglich, einige Schritte der Morphogenese und der

Sekretion von Hepatitis B Viren auf ultrastruktureller Ebene darzustellen. Durch die Verwendung von primären Hepatozytenkulturen ist es darüber hinaus gelungen, eine Reihe neuer Erkenntnisse zu einzelnen Schritten während der frühen Phase der hepadnaviralen Infektion bis hin zur Formation der cccDNA zu gewinnen. Insbesondere konnten einige zelluläre Komponenten identifiziert werden, die für die Etablierung der Infektion essentiell sind.

Trotz der limitierten Förderung des Projekts gelang es erstmals auch zelluläre Komponenten zu identifizieren, ohne die keine cccDNA synthetisiert werden kann. Erste Experimente sprechen dafür, dass sich einige dieser Komponenten als Zielstrukturen für neue antivirale Medikamente eignen. Ein Teil dieser Erkenntnisse ist von grundsätzlicher Bedeutung für das Verständnis der Vermehrung anderer Viren, einschließlich des Hepatitis C Virus. Innerhalb des HepNets sind eine Reihe von Kooperationen entstanden, die zum Erfolg unseres Projekts beigetragen und Projekte anderer Arbeitsgruppen positiv beeinflusst haben. Eine Vielzahl von Anfragen von Mitgliedern des HepNet als auch von Hepatologen außerhalb des Netzwerks bzgl. kooperativer Nutzung des innovativen 3D Minilebermodells für die Testung von antiviralen Substanzen liegen vor, konnten bisher aber wegen mangelnder personeller und finanzieller Ressourcen bei weitem nicht alle positiv beantwortet werden.

2. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit des Ergebnisses

Das Finden von neuen Medikamenten, mit denen die cccDNA von HBV zerstört oder wenigsten destabilisiert werden kann, ist bisher weltweit keiner Arbeitsgruppe gelungen, und bleibt daher das angestrebte Ziel unseres Projekts. Hierzu müssen weitere zelluläre Komponenten identifiziert werden, die für die Synthese und/oder Stabilität der cccDNA notwendig sind und die Evaluierung, ob sie sich als Zielstruktur für eine effiziente antivirale Therapie mit neuen Medikamenten eignen.

Bei dieser Art von Medikamenten sollte aus theoretischen Gründen die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von medikamenten-resistenten Viren sehr viel kleiner sein als beim Einsatz von Nukleosidanaloga. Neue Nukleosidanaloga mit antiviraler Potenz, an denen wir derzeit arbeiten und die zum Teil patentiert wurden, könnten aber dennoch auch zur Reduktion oder Eliminierung der cccDNA führen und

damit zu einer erfolgreicherer Therapie der Hepatitis B beitragen. Daher sollten auch diese Arbeiten fortgeführt werden.

3. Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Mir sind keine erwähnenswerte Fortschritte anderer Forschungsgruppen zur Beantwortung der zentralen Fragen des Projekts bekannt. Die Eliminierung der cccDNA aus infizierten Zellen von Patienten ist nach wie vor das wichtigste ungelöste Problem bei der Therapie von Hepatitis B, ohne die eine irreversible Viruseliminierung nicht möglich ist.

4. Veröffentlichungen der Ergebnisse

Funk, A., Hohenberg, H., Mhamdi, M., **Will, H.** and Sirma, H.: Spread of hepatitis B virus in vitro requires extracellular progeny and may be codetermined by polarized Egress. *J Virol.* 2004 Apr;78 (8):3977-83.

Funk, A., Lin, L., Mhamdi, M., **Will, H.** and Sirma, H.: Determinants of hepadnaviral species and liver tropism. In: *Animal Models for Hepatitis Viruses*. M. Roggendorf and F.v. Weizsäcker, Monographs of Virology 2005, 56-65, Karger Verlag.

Sirma, H., Funk, A., Hohenberg, H., Petrimpol, M., Mhamdi, M., Lin, L., Schubert, U. and **Will, H.**: Functional modulation of virus-cell interactions by drugs: new concepts for treatment of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. In: *Proc. 11th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease*. Sydney, Australia, (eds. A.R. Jilbert et al.), Australian Centre for Hepatitis Virology Publisher, ISBN 1877040266, 2004 pp 292-296.

Funk, A., Mhamdi, M., Lin, L., **Will, H.** and Sirma, H.: Itinerary of hepatitis B viruses: delineation of restriction points critical for infectious entry. *J.Virol.* 2004 78, 8289-300.