

Diplomarbeit

**Antivirale Therapie gegen Hepatitis C
und Hepatokarzinogenese: Rolle von FGF19**

eingereicht von

Michael Johann Kipperer

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Klinischen Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie

Universitätsklinik für Innere Medizin

unter der Anleitung von

Assoz. Prof.ⁱⁿ Priv.-Doz.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ med. univ. Vanessa Stadlbauer-Köllner

Mag.^a rer. nat. Dr.ⁱⁿ sci. med. Bettina Leber

Graz, 7. 12. 2016

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, 7. 12. 2016

Michael J. Kipperer eh

Für Maxi und Flori.

Vorwort

Den Naturwissenschaften, der Geschichte und den Sprachen war ich immer schon zugeneigt und seit jeher liebe ich den Umgang mit Menschen. So begann ich nach der Matura Lehramtsstudien aus Anglistik und Amerikanistik, Romanistik und Physik. Doch dann wurde mein Interesse an der Medizin durch mein ehrenamtliches Engagement im Notfall-, Rettungs- und Krankentransportdienst des Roten Kreuzes geweckt. Ich wollte nicht länger nur paramedizinisch agieren, da die Grenzen des Machbaren dort schnell erreicht schienen, sondern mich, auch von meinem Freund Jacob in der Entscheidung bestärkt, in die Materie vertiefen, um den Menschen noch besser helfen zu können. Und so begann ich frohen Mutes und motiviert das Medizinstudium.

Nun, der Weg des Studiums war dann länger und steiniger als gedacht, doch jetzt ist es geschafft, manchem Unkenruf zum Trotz. Die vorliegende Arbeit war der letzte fehlende Meilenstein auf diesem Wegabschnitt meiner Ausbildung zum Arzt.

Danksagung

Allen voran möchte ich mich herzlich bei meiner Betreuerin, Assoz. Prof.ⁱⁿ Priv.-Doz.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ med. univ. Vanessa Stadlbauer-Köllner bedanken. Als ich im Juli dieses Jahres an sie herantrat, um sie nach einem Diplomarbeitsthema zu fragen, versprach sie mir, sich umgehend bei mir zu melden, sobald ihr ein geeignetes Thema unterkäme. Kaum 30 Minuten später klingelte mein Telefon und sie bot mir begeistert ein aktuelles Thema an: ein möglicher Zusammenhang zwischen der neuen Therapie der Hepatitis C mit DAAs, dem Wachstumsfaktor FGF19 und dem Auftreten von hepatozellulären Karzinomen im Gefolge einer solchen Therapie. Da mein Interesse geweckt war, stimmte ich sofort zu. Im weiteren Verlauf der Arbeit unterstützte sie mich in allen Bereichen äußerst engagiert und war sogar abends und an Wochenenden per Email und telefonsich erreichbar. Ohne ihren Einsatz und die unkomplizierte Kommunikation mit ihr wäre es nicht möglich gewesen, die Diplomarbeit neben dem Praktischen Jahr, meiner beruflichen Tätigkeit und meinen familiären Pflichten in dieser Zeitspanne fertigzustellen. Ferner gilt mein Dank Frau Mag.^a rer. nat. Dr.ⁱⁿ sci. med. Bettina Leber und Frau Bianca Schmerböck, Bsc. Besonders möchte ich Frau Schmerböck dafür danken, dass sie mit mir viele Stunden im Labor verbracht hat, um mich beim ELISA und dessen Auswertung fachkundig anzuleiten.

Von tiefem Herzen gebührt besonders großer Dank meiner Verlobten Ute, selbst eine wunderbare Ärztin, und meinen beiden großartigen Buben Maximilian und Florian. Ute hat mich während der Studienzeit mit Rat und Tat unterstützt, mich immer wieder motiviert, wenn der Berg an Lernstoff, Prüfungen und Praktika, der noch vor mir lag, unüberwindbar erschien, und nicht zuletzt durch die Übernahme eines Großteils der Lebenshaltung unserer Familie, das Fortsetzen des Studiums erst möglich gemacht. Maxi und Flori mussten immer wieder auf viele Stunden des Spielens mit ihrem Papa verzichten, auch wenn ich stets versucht habe, soviel Zeit wie nur irgend möglich mit ihnen zu verbringen. Ich danke euch für euer Verständnis! Ferner gilt mein Dank meinen Eltern Franz und Dagmar Kipperer sowie meinen Schwiegereltern. An vielen Wochenenden vor Prüfungen haben sich die Großeltern liebevoll unserer Knirpse angenommen, damit ich mehr Zeit zum Lernen hatte.

Zu guter Letzt sei noch meinem Freund und Arbeitgeber Dr. med. Philip Riedherr für die moralische Unterstützung und die Möglichkeit der flexiblen Arbeitszeitgestaltung gedankt.

Zusammenfassung

Hepatitis C und Hepatokarzinogenese

Weltweit sind rund 160 Millionen Menschen an einer chronischen Hepatitis C erkrankt, in Österreich wird die Prävalenz auf 0,5% geschätzt. Eine chronische Infektion mit HCV ist eine wichtige Größe in der multifaktoriellen Hepatokarzinogenese. Neben der vermuteten direkten onkogenen Wirkung viraler Proteine wird in der Leber durch die chronisch unterhaltene Entzündungsreaktion und die damit verbundene Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren (u. a. FGF19) ein fibrotisch-zirrhotisches Milieu geschaffen, das die Entstehung von Tumoren begünstigt.

Therapie der HCV Infektion

Nachdem die Therapie der chronischen Hepatitis C lange auf Interferon basierte, wurde in der EU 2011 die erste Generation der DAAs zugelassen. Heute werden die Wirkstoffe der zweiten Generation in verschiedenen Kombinationsregimen erfolgreich eingesetzt und es lassen sich so SVR Raten von 85%-100% erreichen.

FGF19 und Hepatokarzinogenese

Der Fibroblastenwachstumsfaktor FGF19 hat u. a. einen proliferationsfördernden Effekt auf Hepatozyten, der durch den Rezeptor FGFR4 vermittelt wird. Das FGF19 Gen ist in 14% der humanen HCC überexprimiert und es finden sich auch erhöhte Serumspiegel von FGF19 bei HCC PatientInnen. *In vitro* Versuche zeigten, dass FGF19 die Apoptose von HCC-Zellen unterdrücken kann und gleichzeitig die Zellmobilität und Invasivität erhöht. In der Zusammenschau spricht also viel für eine Beteiligung von FGF19 an der Hepatokarzinogenese.

Methoden:

Die FGF19 Serumspiegel von 18 HCV PatientInnen und einer Kontrollgruppe von 12 Gesunden wurden vor Therapiebeginn, vier Wochen und 12 Wochen nach Therapiebeginn sowie 12 Wochen nach Erreichen eines SVR mittels Sandwich-ELISA bestimmt.

Ergebnisse:

Die FGF19 Serumspiegel der HCV PatientInnen unterschieden sich vor der Therapie nicht von denen der Kontrollen. Bei PatientInnen, die an einem HCC erkrankt waren, sank der FGF19 Spiegel nach vier Wochen DAA Therapie signifikant. Weder der FGF19 Spiegel noch das Alter, Geschlecht, HCV Genotyp oder Therapieregime, Vortherapie, Leberfestigkeit, Leberfunktionsparameter oder das Erreichen eines SVR hatten einen Einfluss auf die Hepatokarzinogenese.

Diskussion:

Die Ergebnisse haben aufgrund der geringen Stichprobenzahl nur begrenzt Aussagekraft. Das Absinken der FGF19 Werte bei den HCC PatientInnen ist derzeit nicht erklärbar, eine Hypothese wäre, dass durch möglicherweise gesteigerte FGFR4 Expression vermehrt FGF19 gebunden wird. Weitere große Studien sollten diesem Effekt sowie dem Einfluss von DAAs auf eine HCC Entstehung nachgehen.

Abstract

Hepatitis C and hepatocarcinogenesis

Around 160 million people worldwide suffer from chronic hepatitis C; in Austria the prevalence is estimated to be 0.5%. Chronic HCV infection is an important factor in hepatocarcinogenesis. In addition to the presumed direct oncogenic effect of viral proteins, a fibrotic-cirrhotic environment that favors the development of tumors is created in the liver by the chronically maintained inflammatory reaction and the associated release of inflammatory mediators and growth factors (e.g. FGF19).

Therapy of HCV infection

Therapy of chronic HCV was based on interferon until the first generation of DAAs was approved in the EU in 2011. Today, the drugs of the second generation are successfully used in various combination regimens and achieve SVR rates of 85%-100%.

FGF19 and hepatocarcinogenesis

FGF19 has amongst others a proliferation-promoting effect on hepatocytes which is mediated by FGFR4. The FGF19 gene is overexpressed in 14% of human HCC and FGF19 serum levels are also elevated in HCC patients. Experiments have showed, that FGF19 can suppress HCC cell apoptosis while increasing cell mobility and invasiveness. In summary, there is much evidence that FGF19 is involved in hepatocarcinogenesis.

Methods

FGF19 serum levels of 18 HCV patients and a control group of 12 healthy subjects were determined using a sandwich ELISA before the start of therapy, four weeks and twelve weeks after the start of therapy as well as twelve weeks after reaching SVR.

Results

FGF19 levels of HCV patients did not differ from those of the controls before the therapy. In patients with HCC, FGF19 dropped significantly after four weeks of DAA therapy. Neither FGF19 nor age, sex, HCV genotype or therapy regimen, pre-treatment, liver tissue, liver function parameters or achievement of SVR had any effect on the development of HCC.

Discussion

Due to the low number of samples, the value of the results is limited. The decrease of the FGF values in the HCC patients is currently not explainable. A hypothesis would be that an upregulation of FGFR4 expression increases FGF19 binding. Further large studies should investigate this effect as well as the influence of DAAs on HCC development.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	iii
Danksagung	iv
Zusammenfassung	v
Abstract	vii
Inhaltsverzeichnis	ix
Glossar und Abkürzungen	xi
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	xiii
1 Einleitung	1
2 Chronische Hepatitis C und Hepatokarzinogenese	2
2.1 Das Hepatitis C Virus.....	2
2.2 Epidemiologie der chronischen Hepatitis C.....	2
2.3 Diagnose und Screening der chronischen Hepatitis C	3
2.4 Entwicklung der Leberzirrhose und Hepatokarzinogenese.....	5
2.4.1 Molekulare Pathogenese des HCC	5
2.4.2 Die Rolle des HCV in der Hepatokarzinogenese	6
3 Antivirale Therapie gegen Hepatitis C	7
3.1 Entwicklung neuer Therapien mit Direct Acting Antivirals.....	7
3.2 Therapieschemata mit DAAs	9
3.2.1 DAAs – Zugelassene Wirkstoffe.....	9
3.2.2 Spielen DAAs eine Rolle in der Hepatokarzinogenese?	10
4 Literaturübersicht zur Rolle von FGF19	12
4.1 Korrelation von Erkrankungen mit FGF15 bzw. FGF19.....	12
4.1.1 FGF15.....	12
4.1.2 FGF19 und Hepatozytenproliferation.....	13
4.1.3 FGF19 und Hepatokarzinogenese.....	14
4.1.4 Ist M70 das bessere FGF19?	15
4.1.5 Korrelationen von anderen Erkrankungen und FGF19	17
4.2 Therapeutische Verwendung von FGF19 und M70.....	17
4.3 Erhöht eine Therapie mit DAAs den FGF19 Spiegel?	18
5 Material und Methoden	18
5.1 ELISA Verfahren.....	19

5.1.1	Vorbereitung der Reagenzien und Proben	19
5.1.2	Ablauf des Assays.....	20
5.1.3	Statistische Analyse	21
6	Ergebnisse.....	21
7	Diskussion.....	25
8	Literaturverzeichnis	29

Glossar und Abkürzungen

%	Prozent
®	Registrierte Warenmarke
AAV	Adeno-Associated Virus (Vektor)
abh.	abhängig
AK	Antikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
bzw.	beziehungsweise
CRP	C-Reaktives Protein
DAA	Direct Acting Antivirals
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EASL	European Association for the Study of the Liver
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (Ethyldiamintetraessigsäure)
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
epCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
EU	Europäische Union
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
g/dl	Gramm pro Deziliter
GFP	Green Fluorescent Protein
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
h	Stunde
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
H-RAS Gen	Protoonkogen, das für das Protein H-RAS, eine GTPase kodiert
HRP	Horseradish Peroxidase Enzyme, Meerrettichperoxidase
i. v.	intravenös
IGF-2	Insulin Like Growth Factor-2
IL-6	Interleukin 6

inkl.	inklusive
IU/ml	International Units pro Milliliter
kDa	Kilodalton, Molekülmasse
Kps.	Kapsel(n)
Mb	Morbus
mg/dl	Milligramm pro Deziliter
mg/l	Milligramm pro Liter
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NASH	Non Alcoholic Steatohepatitis
nm	Nanometer
o.	oder
P53	Tumorsuppressor-Protein mit 53kDa
PegINF- α	Pegyliertes Interferon Alpha
pg/ml	Piktogramm pro Milliliter
pRb	Retinoblastom-Protein, (Tumorsuppressorprotein)
PZINR	Prothrombinzeit International Normalized Ratio
RNA	Ribonucleic Acid, Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
shRNA	Small Hairpin RNA
siRNA	Small Interfering RNA
SNP	Single-nucleotide polymorphism
SPSS	Statistikprogramm von IBM
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
SVR	Sustained Viral Response, Therapieansprechen
Tbl.	Tablette
TGF- α	Transforming Growth Factor Alpha
Tsd/ μ l	Tausend pro Mikroliter
u. a.	unter anderem
U/l	Units pro Liter
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Wo.	Woche
z. B.	zum Beispiel

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1. Verlauf einer unbehandelten HCV Infektion (adaptiert nach (11)).	5
Abbildung 2. FGF19 Serumspiegel. PatientInnen mit/ohne HCC im Vergleich.....	24
Abbildung 3. Δ FGF19 Spiegel vier Wochen nach Therapiebeginn.	24
Tabelle 1. Übertragungswege der HCV Infektion nach Genotyp (4).....	3
Tabelle 2. Vermutete onkogene Effekte von HCV Proteinen (reviewt in (10)).	6
Tabelle 3. Interferonfreie Kombinationstherapien für die Genotypen 1-3 (14).	9
Tabelle 4. In der EU zugelassene DAAs (Stand 2016) und Ribavirin (9).	10
Tabelle 5. Auftreten von HCC nach DAA Therapie (21).	11
Tabelle 6. Beim ELISA-Verfahren verwendete Komponenten und Reagenzien.	20
Tabelle 7. Übersicht der HCV positiven untersuchten Population.	22
Tabelle 8. Laborwerte vor Beginn der Therapie, Median (Perzentil 25; 75).	23
Tabelle 9. FGF19 Serumspiegel und Deltawerte, Median (Perzentil 25; 75).	23

1 Einleitung

Das hepatozelluläre Karzinom gehört weltweit zu den häufigsten malignen Erkrankungen (1). Aktuell wurde von einer hohen Rate von Frührezidiven eines HCC bei Patientinnen, die mit DAAs gegen ihre HCV Infektion behandelt wurden, berichtet (2). Untersuchungen ergaben, dass das FGF19 Gen häufig in humanen HCC überexprimiert ist (3) und sich ebenfalls erhöhte FGF19 Serumspiegel bei HCC Patientinnen finden (4). Zur Frage, ob eine antivirale Therapie der Hepatitis C bei PatientInnen mit Leberzirrhose den FGF19 Serumspiegel erhöht, und damit eventuell das Entstehen eines Frührezidivs begünstigt, konnten keine Literaturstellen gefunden werden. Mit der vorliegenden Arbeit wird versucht, dieser Frage auf den Grund zu gehen.

Diese Diplomarbeit besteht aus zwei Teilen. Erstens aus einer Literaturübersicht, in der Hauptsache als PubMed-Recherche zur möglichen hepatokarzinogenen Wirkung von FGF19 (bzw. FGF15 bei der Maus) und zum Risiko der Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms nach Therapie mit Direct Acting Antivirals (DAAs). Zuvor werden in einem Überblick die Epidemiologie, Diagnose und aktuelle Therapiemöglichkeiten der chronischen Hepatitis C, sowie die Assoziation einer HCV Infektion mit dem Auftreten eines hepatozellulären Karzinoms dargestellt.

Im zweiten, experimentellen Teil wurden die FGF19 Serumspiegel mittels Sandwich-ELISA aus insgesamt 30 PatientInnenproben bestimmt und ausgewertet. Die Proben wurden vor, während und nach Therapie der Hepatitis C mit DAA gewonnen.

2 Chronische Hepatitis C und Hepatokarzinogenese

2.1 Das Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus wurde erstmals 1989 beschrieben, zuvor war von einem Erreger der Non-A Non-B Hepatitis die Rede (5). Es handelt sich dabei um ein Plusstrang-RNA Virus, welches ein selbständiges Genus (Hepacivirus) in der Familie der Flaviviren darstellt (6). Es können derzeit sieben Genotypen mit über 67 Subtypen unterschieden werden (7). Die Genotypen unterscheiden sich von einander in ihrer Aminosäuresequenz zu mindestens 30% (6). Die Häufigkeiten der Genotypen 1, 2, 3 und 4 sind wie folgt verteilt: 80,4%, 4,5%, 12,3% und 2,7% (8). Machen die Unterschiede zwischen den Genotypen bzw. Subtypen weniger als 10% aus, spricht man von Quasispezies. Diese enorme Vielfalt lässt sich auf die hohe Mutationsrate bei der HCV Synthese zurückführen und ist auch für die ineffektive Immunabwehr verantwortlich. Es können zwar neutralisierende Antikörper gegen HCV nachgewiesen werden, diese bewirken aber wegen ihrer kurzen Überlebenszeit keine Immunität, sodass eine Reinfektion möglich ist (6). In bis zu 50-85% der Erkrankungsfälle geht eine akute HCV Infektion in die chronische Form über (9).

Nachdem das Virus in die Zelle eingedrungen ist, findet das Uncoating statt und die virale RNA wird in ein Polypeptid mit 3011 Aminosäuren translatiert. Durch Spaltung des Polypeptides durch zelluläre und virale Proteasen entstehen zehn virale Proteine. Diese werden in Strukturproteine und Nicht-Strukturproteine (NS), die für die virale Replikation verantwortlich sind, unterteilt. Letztere können u. a. als Angriffspunkte für DAAs dienen, z.B. NS3, NS4A und NS5A (reviewt in (10)).

2.2 Epidemiologie der chronischen Hepatitis C

Es leiden schätzungsweise 160 Millionen Menschen (2,35% der Weltbevölkerung) an einer chronischen Infektion mit dem Hepatitis C Virus (11). In Österreich gibt es keine zentrale Datenbank mit korrekten Zahlen zur Erhebung der Prävalenz von HCV Infektionen in der Bevölkerung (12). Allerdings wird in einer europaweiten Untersuchung der Prävalenzverteilung von HCV für Österreich ein Schätzwert von 0,5% angegeben. Generell gibt es in Europa ein starkes Nord-Süd- und West-Ostgefälle mit Prävalenzen von 0,1%-0,2% in Skandinavien, 3%-3,5% in Italien und Griechenland sowie bis zu 6% in Rumänien (13).

Eine in Oberösterreich für den Beobachtungszeitraum 1992-2006 an 604 PatientInnen durchgeführte Untersuchung kam zu dem Ergebnis, dass bei den Genotypen 1 und 4 der Infektionsweg mit HCV in den meisten Erkrankungsfällen nicht nachvollziehbar ist (41,4%), bei den Genotypen 2 und 3 liegt der intravenöse Drogenmissbrauch (37,6%) mit deutlichem Abstand an erster Stelle (siehe Tabelle 1) (8). Als weitere, aber seltene Übertragungswege gelten sexuelle Kontakte und perinatale Infektionen, vor allem bei HIV Koinfektion, ferner Organtransplantationen, nasaler Drogenabusus, Hämodialyse und Akupunkturnadeln. Da Blutspenden heute mittels RT-PCR auf HCV RNA untersucht werden, konnte man das Risiko einer transfusionsbedingten HCV Infektion auf 1:2,3 Millionen Transfusionen reduzieren (6).

Tabelle 1. Übertragungswege der HCV Infektion nach Genotyp (4)

Übertragungsweg	Genotypen 1 & 4		Genotypen 2 & 3	
	Anzahl	Anteil in %	Anzahl	Anteil in %
Unbekannt	205	41,4	29	26,6
Blut und Blutprodukte	131	26,5	27	24,8
Plasmaspende	78	15,8	4	3,7
i. v. Drogenabusus	55	11,1	41	37,6
Piercing / Tätowierung	17	3,4	7	6,4
Nadelstichverletzung	8	1,6	0	0
Impfung	1	0,2	1	0,9
Gesamt	495	100	109	100

2.3 Diagnose und Screening der chronischen Hepatitis C

Die Diagnosestellung einer chronischen Hepatitis C erfolgt durch die Bestimmung der Anti-HCV Antikörper sowie der HCV RNA in Zusammenschau mit dem klinischen Bild und histologischen Befunden. Dabei gilt es zu beachten, dass im frühen Stadium einer akuten Infektion und bei stark immunsupprimierten PatientInnen die Anti-HCV AK mit Hilfe eines ELISA eventuell nicht nachweisbar sein können (14). Bei einem positiven Antikörpertest muss ein HCV RNA Nachweis erfolgen (15).

Die EASL empfiehlt in ihren Guidelines bezüglich der Diagnosestellung der Hepatitis C folgendes Vorgehen (14):

1. Die Suche nach Anti-HCV AK stellt den First-Line Test dar.
2. Besteht der klinische Verdacht auf eine akute HCV Infektion oder ist die getestete Person immunsupprimiert, sollte eine HCV RNA Quantifizierung bereits initial durchgeführt werden.
3. Werden initial Anti-HCV AK gefunden, sollte die HCV RNA bestimmt werden.
4. Anti-HCV AK positive, aber HCV RNA negative Personen sollten nach drei Monaten erneut getestet werden, um die Genesung zu bestätigen.
5. Das HCV Core Antigen kann als Marker der viralen Replikation und zur Diagnosestellung der akuten oder chronischen Hepatitis C herangezogen werden falls HCV RNA Tests nicht möglich sind. Die Bestimmung des Core Antigens hat aber eine geringfügig niedrigere Sensitivität bezüglich der Bestimmung der viralen Replikationsrate.

Da eine HCV Infektion häufig über lange Zeit symptomarm oder gar asymptomatisch verlaufen kann, sind sich viele infizierte Menschen ihres positiven Infektionsstatus nicht bewusst. Deshalb erscheint es sinnvoll, Personen welche einer Risikogruppe für eine HCV Infektion angehören, in ein Screening einzubinden (6). Dabei sollten die Screeningstrategien unter Berücksichtigung der lokalen Epidemiologie der HCV Infektionen und nationaler Gesundheitspläne erstellt werden. Die Grundlage des Screenings stellt auch hier die Detektion von Anti-HCV AK dar, wobei auch Schnelltests zur Anwendung kommen können. Bei einem positiven Untersuchungsergebnis muss die HCV RNA oder gegebenenfalls das HCV Core Antigen zur Absicherung der Diagnose bestimmt werden. Ziel des Screenings ist es, HCV positive Personen zu identifizieren, um ihnen möglichst frühzeitig eine Therapie zukommen zu lassen, damit den hepatischen und extrahepatischen Folgen einer HCV Infektion vorgebeugt werden kann (14).

2.4 Entwicklung der Leberzirrhose und Hepatokarzinogenese

Bei PatientInnen mit chronischer HCV Infektion ist unabhängig von der klinischen Ausprägung davon auszugehen, dass etwa 20-25% nach 20 Jahren eine Leberzirrhose entwickeln (9). Die möglichen Verläufe einer unbehandelten HCV Infektion sind aus Abbildung 1 ersichtlich (16).

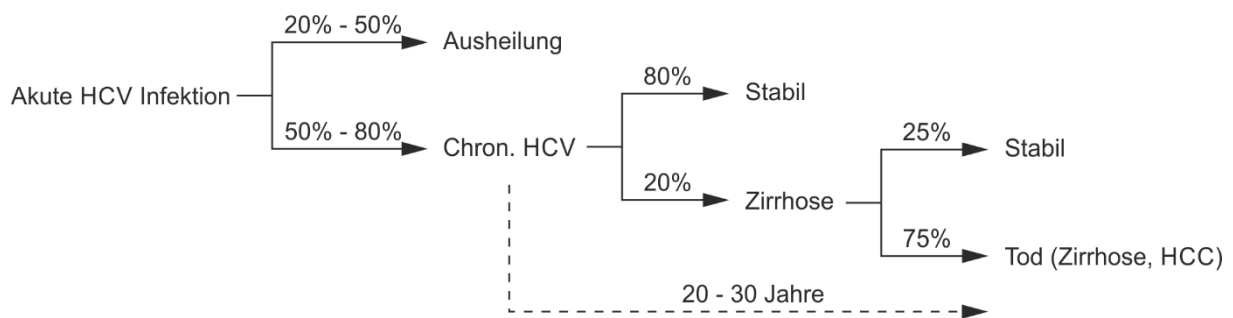


Abbildung 1. Verlauf einer unbehandelten HCV Infektion (adaptiert nach (16)).

2.4.1 Molekulare Pathogenese des HCC

Die Hepatokarzinogenese ist ein langer Prozess, der aus vielen kleinen Schritten und genetischen Veränderungen besteht. Als Reaktion auf die von der chronischen HCV Infektion unterhaltene Entzündung und Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Zytokinen, kommt es zum Untergang der einzelnen Hepatozyten, gefolgt von einer verstärkten Regeneration des Leberparenchyms. Diese wiederum führt zur vermehrten Freisetzung von TGF- α und IGF-2. Durch die gesteigerte Expression von Wachstumsfaktoren wird die Proliferation von Hepatozyten gefördert, sodass mit der Zeit das Risiko des Auftretens monoklonaler Hepatozyten erhöht ist (reviewt in (10)). Der Fibroblastenwachstumsfaktor FGF19, der bei Schädigung des Leberparenchyms vermehrt exprimiert wird, spielt hier ebenfalls eine bedeutende Rolle (siehe Kapitel 4) (17). Auch genetische Veränderungen, z.B. in der Expression der Telomerasen, der Methylierung oder Demethylierung, deletierte Allele oder Mikrosatelliteninstabilität sind an der malignen Entartung der Hepatozyten beteiligt. Insgesamt haben an der Pathogenese die verschiedenen Veränderungen in der Regulation der Zellproliferation, in den zellulären Signalketten und die verstärkte Neoangiogenese durch erhöhte VEGF und FGF Expression teil. Mutationen mit Verlust von Tumorsuppressorgenen, wie z.B. P53 und pRb sind ebenfalls von Bedeutung (reviewt in (10)).

2.4.2 Die Rolle des HCV in der Hepatokarzinogenese

Der Einfluss des Hepatitis C Virus ist bei der Entstehung von hepatozellulären Karzinomen durchaus beachtlich. Schätzungen zufolge, erhöht eine HCV Infektion das Risiko ein HCC zu entwickeln um das 17-fache. Ebenso führt ein Ausheilen der HCV Infektion zu einem deutlichen Rückgang des HCC Risikos und einer Verbesserung der Gesamt mortalität. Andererseits wiederum, weisen bis zu 17% der HCC PatientInnen keine Zirrhose auf.

Im Gegenteil zu HBV, führt eine Infektion mit HCV nicht zu einer Integration von viralem Erbgut in die DNA der Hepatozyten. Die Pathogenese eines HCC ist vielmehr multifaktoriell und es tragen neben dem direkten onkogenen Effekt viraler HCV Proteine auch die chronische Leberentzündung, Fibrose und Zirrhose, Steatose, Insulinresistenz, oxidativer Stress und chromosomale Instabilität das Ihre bei. Der genaue pathogenetische Zusammenhang zwischen der HCV Infektion und dem HCC ist allerdings noch nicht geklärt (reviewt in (10)).

Tabelle 2. Vermutete onkogene Effekte von HCV Proteinen (reviewt in (10)).

HCV Protein	Effekt
Core	Hemmt die Apoptose Inaktiviert Tumorsuppressorgene Fördert die Zellproliferation Suppressiert das Immunsystem Bewirkt reaktiven oxidativen Stress Fördert die Fibrogenese Verursacht direkte Schäden an Mitochondrien und DNA
E1-E2	Bewirkt Stress für das Endoplasmatische Retikulum
E2	Hemmt die Apoptose Fördert die Zellproliferation Fördert die Zytokinsynthese und zytotoxische Granulation
NS3	Hemmt die Apoptose Fördert die Zellproliferation Hemmt Tumorsuppressorgene
NS5A	Hemmt die Apoptose Fördert die Zellproliferation Dysreguliert die Mitose und bewirkt chromosomale Instabilität

3 Antivirale Therapie gegen Hepatitis C

Das vorrangige Ziel der antiviralen Therapie ist die Ausheilung der HCV Infektion, welche durch ein SVR (anhaltendes Therapieansprechen) als Marker gekennzeichnet ist (18). Ein SVR ist erreicht, wenn 12 Monate (SVR12) bzw. 24 Monate (SVR24) nach Beendigung der antiviralen Therapie keine HCV RNA mehr nachweisbar ist (Nachweisgrenze ≤ 15 IU/ml). Mehr als 99% der PatientInnen, die ein SVR erreichen, können als geheilt angesehen werden. Im Allgemeinen ist ein SVR bei PatientInnen, die noch keine Zirrhose aufweisen, mit einer Normalisierung der Leberenzyme und dem Schwinden der nekrotisierenden Entzündung bzw. der Fibrose verbunden. PatientInnen, deren Leber bereits einen schweren Schaden im Sinne einer Zirrhose aufweist, profitieren ebenfalls von einem SVR. Ihr Risiko, ein Leberversagen, portalen Hypertonus oder ein HCC zu erleiden gilt ebenso wie die Gesamtmortalität als vermindert, und auch die extrahepatischen Komplikationen können sich größtenteils zurückbilden (14). Vor Therapiebeginn müssen eventuell bestehende Komorbiditäten und virale Parameter wie Genotyp, Viruslast und mögliche Koinfektionen mit anderen hepatotropen Viren oder HIV erfasst werden. Auch der Fibrosegrad der Leber sowie der Grad der Aktivierung gehören bestimmt (14). Da die Leberelastizität mit ihrem Fibrosegrad korreliert, können nicht-invasive Verfahren zur ultraschallbasierten Messung der Gewebeelastizität (z.B. FibroScan®) über den Fortschritt der Erkrankung Aufschluss geben (19). In einigen Fällen, besonders bei Verdacht auf eine zusätzliche Ätiologie der Lebererkrankung, bleibt dennoch die Biopsie das diagnostische Verfahren der Wahl (14).

3.1 Entwicklung neuer Therapien mit Direct Acting Antivirals

Bis 2011 galt die Kombination aus pegyliertem Interferon (PegINF) und Ribavarin, angewendet über 24 oder 48 Wochen, als anerkannte Therapie der chronischen Hepatitis C. Mit diesem Therapieschema konnten in Westeuropa bei mit Genotyp 1 infizierten PatientInnen SVR Raten von rund 50% erreicht werden. Besonders beim Genotyp 2, aber auch bei den Genotypen 3, 5 und 6 war es sogar möglich, SVR Raten von bis zu 80% zu erreichen. Beim Genotyp 4 waren allerdings nur mittelmäßige Heilungsraten realisierbar.

Im Jahr 2011 wurden Telaprevir und Boceprevir zur Therapie der chronischen Hepatitis C bei Infektion mit HCV Genotyp 1 in Kombination mit PegINF- α und Ribavirin in

der EU zugelassen. Beide DAAs dieser ersten Generation sind Proteaseinhibitoren (NS3-4A Serinprotease). Mit dieser Tripeltherapie waren nun SVR Raten von 65%-75% möglich. Unter der Therapie mit DAAs der ersten Generation kam es aber bei bis zu 15% der PatientInnen zu so schwerwiegenden Nebenwirkungen, dass die Therapie abgebrochen werden musste (reviewt in (20)). Wegen der Nebenwirkungen dieser Dreifachtherapie und den hohen Kosten, die durch die Behandlung von PatientInnen mit fortgeschrittener Leberfibrose entstanden, wurde dieses Therapieschema nach der Zulassung weiterer DAAs aufgegeben (18).

2014 wurden drei neue DAAs als zweite Generation in der EU zugelassen: Sofosbuvir ist ein pangenotypisch wirksames Nukleotidanalogen, das die HCV RNA abhängige RNA Polymerase hemmt, Simeprevir wirkt als NS3-4A Proteaseinhibitor bei den Genotypen 1 und 4, und Daclatasvir ist ein pangenotypischer NS5A Inhibitor. Alle drei DAAs können in einer Tripelkombination mit PeglNF- α und Ribavirin Anwendung finden und ermöglichen SVR Raten von 60%-100%. Trotz besserer Verträglichkeit dieser Therapieschemata bleibt das Management der unerwünschten Nebenwirkungen von PeglNF- α und Ribavirin eine Herausforderung (18). Seit der Zulassung neuerer DAAs 2014 wurde damit begonnen, interferonfreie Therapieschemata europaweit anzuwenden, die hohen Kosten dieser neuen Medikamente verhindern allerdings derzeit noch eine europaweite vereinheitlichte Anwendung der Therapieschemata. Mit der Kombination aus Sofosbuvir und Ribavirin (Genotyp 2 für 12 Wochen und Genotyp 3 für 24 Wochen) konnten SVR Raten von 80%-90% ermöglicht werden. Die Therapie mit Sofosbuvir und Simeprevir (in oder ohne Kombination von Ribavirin) war in 82%-89% erfolgreich. Als noch erfolgreicher erwies sich eine Kombination aus Sofosbuvir und Daclatasvir mit oder ohne Ribavirin für PatientInnen mit einer HCV Genotyp 1 Infektion: Es wurde von SVR Raten zwischen 95% und 100% berichtet. Dazu wurde diese Kombination in der Studie von den ProbandInnen gut toleriert (18). Zum Beispiel konnte in einer Phase 3 Studie für die Kombinationstherapie von Sofosbuvir und Ledipasvir gezeigt werden, dass obwohl 3,8% der gesamten Kohorte ernsthafte Nebenwirkungen aufwiesen, kein Studienteilnehmer die Therapie wegen den Nebenwirkungen abbrechen musste (reviewt in (20)).

3.2 Therapieschemata mit DAAs

Die Therapieschemata der chronischen Hepatitis C mit DAAs beruhen stets auf der Kombination von einem DAA mit Ribavirin oder mehreren DAAs mit oder ohne Ribavirin. Dabei erhöhen Fixkombinationen der Wirkstoffe die Einfachheit der Anwendung und tragen zu einer besseren Compliance bei (Tabelle 3).

Tabelle 3. Interferonfreie Kombinationstherapien für die Genotypen 1-3 (14).

Kombinationsregime	Genotyp 1	Genotyp 2	Genotyp 3
Sofosbuvir + Ribavirin	Nein	Suboptimal	Suboptimal
Sofosbuvir + Ledipasvir +/- Ribavirin	Ja	Nein	Nein
Sofosbuvir + Velpatasvir +/- Ribavirin	Ja	Ja	Ja
Ombitasvir + Paritaprevir + Ritonavir + Dasabuvir +/- Ribavirin	Ja	Nein	Nein
Ombitasvir + Paritaprevir + Ritonavir +/- Ribavirin	Nein	Nein	Nein
Grazoprevir + Elbasvir +/- Ribavirin	Ja	Nein	Nein
Sofosbuvir + Daclatasvir +/- Ribavirin	Ja	Ja	Ja
Sofosbuvir + Simeprevir +/- Ribavirin	Suboptimal	Nein	Nein

3.2.1 DAAs – Zugelassene Wirkstoffe

Die erste Generation von DAAs, die 2011 in der EU zugelassen wurde, ist 2014 von der zweiten Generation abgelöst worden (18). Die derzeit zur Therapie der chronischen Hepatitis C zugelassenen Wirkstoffe und ihre Kombinationen samt Handelsnamen, Angriffspunkten bzw. Wirkmechanismen, Applikationsformen und Dosierungen sind der einfacheren Übersicht wegen tabellarisch dargestellt (Tabelle 4).

Tabelle 4. In der EU zugelassene DAAs (Stand 2016) und Ribavirin (9).

Wirkstoff	Handelsname	Wirkmechanismus	Applikation	Dosis
Sofosbuvir	Sovaldi®	HCV-RNA abh. RNA-Polymerase Inhibitor	Tbl., 400mg	1-0-0-0
Sofosbuvir + Ledipasvir	Harvoni®	Ledipasvir = HCV-NS5A Inhibitor	Tbl., 400mg/90mg	1-0-0-0
Sofosbuvir + Velpatasvir	Epclusa®	Velpatasvir = HCV-NS5A Inhibitor	Tbl., 400mg/100mg	1-0-0-0
Paritaprevir + Ombitasvir + Ritonavir	Viekirax®	Paritaprevir = HCV-NS3-4A Protease Inhibitor Ombitasvir = HCV-NS5A Inhibitor Ritonavir = CYP 3A4 Inhibitor	Tbl., 75mg/12,5mg/50mg	2-0-0-0
Dasabuvir	Exviera®	HCV-RNA abh. RNA-Polymerase Inhibitor	Tbl., 250mg	1-0-1-0
Grazoprevir + Elbasvir	Zepatier®	Grazoprevir = HCV-NS3-4A Protease Inhibitor Elbasvir = HCV-NS5A Inhibitor	Tbl., 100mg/50mg	1-0-0-0
Daclatasvir	Daklinza®	HCV-NS5A Inhibitor	Tbl., 30mg o. 60mg	1-0-0-0
Simeprevir	Olysio®	HCV-NS3-4A Serinprotease Inhibitor	Kps., 150mg	1-0-0-0
Ribavirin	Copegus® Rebetol®	Nukleosid Analogon, Proteaseinhibitor	Kps., 200mg	bis 3-0-3-0

3.2.2 Spielen DAAs eine Rolle in der Hepatokarzinogenese?

Entgegen allen Erwartungen fiel in einer Studie zum Effekt der HCV Eradikation bei PatientInnen mit HCC eine hohe Rate an Frührezidiven der Krebserkrankung auf. Nachdem diese PatientInnen mit DAAs behandelt worden waren, verstarben von den 58 Studienteilnehmern drei, bei weiteren 16 (27,6%) trat nach kompletter Remission erneut mindestens ein Tumor auf. Und das bei einem medianen Follow-up von nur 5,7 Monaten (2). Da die meisten dieser PatientInnen im Rahmen ihrer primären Therapie auch chirurgisch bzw. mit Radiofrequenzablation behandelt wurden, hätte man sich eine deutlich geringere Rückfallrate erwartet (21).

Auch in einer Arbeit von F. Conti et al. wurde das frühzeitige Auftreten bzw. Wiederauftreten von HCC bei HCV PatientInnen, die zuvor mit DAAs behandelt worden waren, untersucht. Von den 344 untersuchten PatientInnen erreichten 91% ein SVR. Während der 24 Wochen des Follow-up wurde bei 17 von 59 PatientInnen (28,8%) ein Rezidiv eines HCC festgestellt. Bei 9 der 285 PatientInnen (3,2%), die zuvor als tumorfrei gegolten hatten, trat ein HCC neu auf (Tabelle 5). Das Ausmaß der zirrhotischen Leberschädigung, ein HCC in der Vorgeschichte und niedrigere Thrombozytenwerte waren signifikant mit dem Tumoraufreten assoziiert (22).

Tabelle 5. Auftreten von HCC nach DAA Therapie (21).

n_(gesamt) = 344		kein HCC (n = 318; 92,4%)	HCC (n = 26; 7,6%)
Alter (Median, Range)		64 (37-86)	57,5 (47-81)
Geschlecht, n (%)	Männlich	189 (59,4)	18 (69,2)
	Weiblich	129 (40,6)	8 (30,8)
Genotyp, n (%)	Anderer Genotyp	94 (29,6)	13 (50,0)
	Genotyp 1	224 (70,4)	13 (50,0)
Vortherapie, n (%)	Nein	146 (45,9)	19 (73,1)
	Ja	172 (54,0)	7 (26,9)
*Lebergewebe, n (%)	Keine Zirrhose	134 (42,1)	5 (19,2)
	Zirrhose	101 (57,9)	16 (80,8)
SVR, n (%)	Nicht erreicht	26 (8,2)	4 (15,4)
	Erreicht	292 (91,8)	22 (84,6)
*HCC in der Vorgeschichte, n (%)	Nein	276 (96,8)	9 (3,2)
	Ja	42 (71,2)	17 (28,8)

*) Signifikanter Unterschied zwischen kein HCC und HCC.

Beide Arbeiten legen den Schluss nahe, dass es eine Korrelation zwischen der Therapie mit DAAs und einem vermehrten Auftreten eines Frührezidivs oder der Erstmanifestation eines HCCs geben könnte. Diese These konnte in drei prospektiven Multicenter-Kohortenstudien aus Frankreich (ANRS CO22 HEPATHER, ANRS CO12 CIRVIR, ANRS CO23 CUPILT) jedoch nicht bestätigt werden. Insgesamt bestanden die Kohorten aus über 6000 PatientInnen, die mit DAAs behandelt wurden. Es wurde das Augenmerk auf die 516 PatientInnen gelegt, die vor Beginn der DAA Therapie bezüglich eines HCC kurativ (inkl. Lebertransplantation) behandelt werden konnten. Bei der Auswertung der Daten konnte kein Beleg für ein erhöhtes Risiko eines Rückfalls durch die Therapie mit DAAs erbracht werden (23).

Zusätzlich wurden in den HEPATHER und CIRVIR Kohorten HCC PatientInnen, die eine DAA Therapie erhalten hatten, mit jenen verglichen, die sie nicht erhielten. In beiden Kohorten zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des Risikos für ein Rezidiv (23).

4 Literaturübersicht zur Rolle von FGF19

Der folgende Abschnitt behandelt primär den Fibroblasten-Wachstumsfaktor FGF19, es wird aber auch kurz auf andere endokrine FGF, nämlich FGF15, FGF21 und FGF23, eingegangen.

Wie Nobuyuki Itoh et. al. in ihrem Review über endokrine FGF darlegen, spielen Fibroblasten-Wachstumsfaktoren als Signalproteine eine essentielle Rolle in den verschiedensten Bereichen des Nervensystems, der Entwicklung und des Stoffwechsels. Zur Familie der humanen FGF gehören 22 evolutionär und strukturell verwandte Polypeptide, die bei Menschen wie auch bei Mäusen mit FGF1 bis FGF23 bezeichnet werden. FGF19 beim Menschen entspricht dem orthologen FGF15 der Maus. Der FGF Familie des Menschen fehlt daher FGF15, der der Nagetiere FGF19 (24). FGF19 und FGF15 teilen sich etwa 50% ihrer Aminosäuresequenz und haben bei Menschen und Nagetieren sehr ähnliche Effekte auf metabolische Parameter. Nach ihrem Wirkmechanismus klassifiziert man FGF als intrakrine, parakrine und endokrine Wachstumsfaktoren (24). Typischerweise binden FGF an die Rezeptoren FGFR1 bis FGFR4 (25). FGF19, FGF21 und FGF23 bilden die Untergruppe der endokrinen humanen FGF, die zur Interaktion mit ihren Rezeptoren α -Klotho oder β -Klotho als Kofaktoren benötigen (24). Des Weiteren ist FGF19 auch in der Lage, FGFR4 direkt, ohne β -Klotho, zu aktivieren (26). FGF19 und FGF23 zeigen eine metabolische und proliferatorische Wirkung, FGF21 hingegen ist *in vivo* nur metabolisch aktiv (24) (26).

FGF19 wird hauptsächlich im Ileum, Gehirn, der Haut, Retina, Gallenblase, Niere und der Nabelschnur exprimiert (24). Bei Cholestase oder Leberzirrhose wird FGF19 auch in der Leber exprimiert (27). FGF21 wird vor allem in der Leber exprimiert und ist im Fettgewebe wirksam (28), FGF23 stammt hingegen aus dem Knochen und reguliert unter anderem die Phosphathomeostase in der Niere (29).

4.1 Korrelation von Erkrankungen mit FGF15 bzw. FGF19

4.1.1 FGF15

Die Rolle des endokrinen FGF15 (FGF19 beim Menschen) ist aus dem Phänotyp der jeweiligen Knockout-Mäuse ableitbar. Dazu zählen die Herzentwicklung, der hepatische Gallensäurestoffwechsel, die Füllung der Gallenblase, der hepatische Protein-

und Glykogenstoffwechsel, die Regenerationsfähigkeit der Leber und die durch Fibrose induzierte hepatozelluläre Karzinogenese; z.B. ist die FGF15 Expression im Ileum bei Mäusen, die an einem Karzinom erkrankt sind, erhöht. Ferner weisen FGF15 Knockout-Mäuse eine geringere Zahl und kleinere Tumore auf als Mäuse des Wildtyps. Diese Umstände deuten darauf hin, dass im Ileum exprimiertes FGF15 die Entwicklung von Karzinomen fördern kann (24). In der Leber von Mäusen mit erhöhter FGF15 Expression konnte auch eine größere Menge an Alpha-Fetoprotein mRNA gemessen werden als bei Knockout-Mäusen (30). Alpha-Fetoprotein ist ein embryonales hepatisches Protein, dessen Wert bei PatientInnen mit HCC, korrelierend mit der Tumorgroße und der Anzahl der Tumore, häufig erhöht ist (31).

4.1.2 FGF19 und Hepatozytenproliferation

Da von den anderen FGF bekannt ist, dass sie Einfluss auf die Zellproliferation haben, wurde untersucht, ob auch die einander sehr ähnelnden FGF19 und FGF21 diesbezügliche Eigenschaften aufweisen. FGF21 ist offensichtlich nur metabolisch wirksam (24). Im Fall von FGF19 konnte eine verstärkte Proliferation von läppchenzentralen Hepatozyten festgestellt werden, nachdem den Mäusen rekombinantes FGF19 verabreicht worden war – dies galt gleichermaßen für transgene FGF19 Mäuse wie auch für Tiere vom Wildtyp (17). Ai-Luen Wu et. al. konnten ebenfalls in Versuchsreihen zeigen, dass FGF19 die Proliferation der Hepatozyten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mediiert (32). Allgemein wird angenommen, dass eine Zellproliferation die Voraussetzung für eine maligne Entartung ist. Dafür spricht auch, dass Analysen von FGF19 induzierten HCC ergeben haben, dass die dysplastischen und neoplastischen Zellen ihren Ursprung nahe an den Zentralvenen der Leberläppchen hatten, wo auch die umfangreichste Proliferation stattfand (17). Weitere Versuche von Xinle Wu et. al. haben gezeigt, dass FGF19 in der Lage ist, den FGF4 Rezeptor selektiv und ohne Mithilfe von β -Klotho in der Leber zu aktivieren und somit die läppchen-zentrale Proliferation von Hepatozyten zu fördern. Daraus schließen sie, dass der mitogene Effekt von FGF19 durch den FGFR4 Rezeptor vermittelt wird, und zur Entwicklung eines HCC beitragen kann, besonders wenn man in Betracht zieht, dass FGFR4 in erster Linie in Hepatozyten exprimiert wird (26).

4.1.3 FGF19 und Hepatokarzinogenese

Da das FGF19-Gen in 14% der humanen HCC überexprimiert ist, geht man von dessen bedeutsamer Rolle bei der Entwicklung der Tumore aus (3).

In einer Versuchsreihe von Mei Zhou et. al. wurde der Einfluss von FGF19 auf die Tumorgenese untersucht. Dazu wurde Wildtyp-FGF19 mit Hilfe von Adeno-assoziierten Viren (AAV) als Vektor in 6-12 Wochen alte Mäuse intravenös eingebracht. Als Kontrollen wurden weiteren Mäusen AAV-GFP oder eine Salzlösung injiziert. Das Lebergewebe war bei dieser Methode der vorrangige Ort der transgenen Expression von FGF19; im Gegensatz zu anderen Versuchen, in denen das FGF19 ektopisch im Muskelgewebe exprimiert wurde. Als Folge der Genübertragung konnten hohe FGF19 Serumspiegel über die Dauer von 24 Wochen gemessen werden. Nach 24 bzw. 52 Wochen wurden die Tiere getötet und ihre Leber auf Gewicht, die Anzahl der sichtbaren Tumore und deren maximale Größe untersucht. In den beiden Kontrollgruppen traten nur vereinzelt Neoplasien auf. In der FGF19 Kohorte war das Lebergewicht erhöht und alle Mäuse entwickelten Tumore. Ihre Zahl und Größe lagen im Median deutlich über der der Kontrollgruppe. Histologische und immunhistochemische Untersuchungen ergaben solide, Glutaminsynthetase-positive HCC mit hoher Proliferationsrate, die auf einen läppchen-zentralen Ursprung hinwiesen (33).

Zu Ergebnissen, die in die gleiche Richtung deuten, kamen auch Autoren anderer Studien. Zum Beispiel berichteten Zhang Jing et. al. im Jahr 2014, dass in HCC der Nachweis erbracht werden konnte, dass FGF19 im Vergleich zu nicht-tumorösem Gewebe überexprimiert war. Es bestand auch ein direkter Zusammenhang zwischen dem FGF19 Spiegel im Serum und der Größe des Malignoms. Ferner konnte gezeigt werden, dass ein FGF19-Antikörper die HCC Zelllinie im Wachstum zu blockieren vermochte und dass postoperative FGF19 Werte niedriger waren als präoperative (25).

In einer weiteren Studie zur Assoziation von FGF19 mit HCC konnte ebenfalls gezeigt werden, dass bei PatientInnen mit HCC sowohl der Serumspiegel von FGF19 und β -Klotho als auch die FGF19 Werte im Tumorgewebe signifikant gegenüber den Werten aus der Kontrollgruppe erhöht waren. Des Weiteren lag auch der FGF19 Wert im Tumor signifikant höher als im benachbarten Lebergewebe. Die Studienautoren konnten in derselben Arbeit auch eine signifikant gesteigerte Expression von FGF19 mRNA sowie FGFR4 im Tumorgewebe im Vergleich zu benachbarten Leberarealen nachweisen. Statistische Analysen ergaben eine signifikant positive Korrelation zwischen der

Höhe der FGF19, FGFR4 und EpCAM Expression einerseits und andererseits dem Grad der Veränderung des histologischen Bildes von der Steatose über die NASH und Zirrhose bis zum HCC. Zusätzlich konnte noch eine signifikant positive Korrelation zwischen der FGF19 Expression und der Expression von EpCAM im Tumorgewebe festgestellt werden (4). EpCAM sind epitheliale Zelladhäsionsmoleküle die von verschiedenen normalen Epithelzellen exprimiert und in vielen Tumoren überexprimiert werden. Bei den meisten Malignomen korreliert eine Überexpression von EpCAM stark mit einer schlechten Prognose und einem hohen Risiko für ein Rezidiv (34). EpCAM positive Zellen eines HCC zeigen stammzellartige Züge und bestimmen so das Tumorstadium und die Invasivität mit. Außerdem sind sie für die große Zellheterogenität und das oft schlechte Ansprechen der HCC auf eine Chemotherapie mitverantwortlich (35).

Eine *in vitro* Studie von Seiki Miura et. al. zeigte, dass rekombinantes FGF19 die Apoptose von HCC-Zellen unterdrücken kann und gleichzeitig die Zellmobilität und Invasivität erhöht. Die Höhe der FGF19 Expression ist daher von großer Bedeutung für die Prognose. PatientInnen mit hohen FGF19 Spiegeln wiesen in den Untersuchungen eine schlechtere 5-Jahres-Überlebensrate auf als solche mit niedrigen Werten (rezidivfreies Überleben 0% vs. 20%, Gesamtüberlebensrate 20% vs. 60%). Die Ergebnisse der Studie wiesen Serum-Alpha-Fetoprotein, FGF19 mRNA und intrahepatische Metastasen als wesentliche Prädiktoren der rezidivfreien Überlebenszeit aus. Für die Gesamtüberlebenszeit waren die Expression von FGF19 mRNA, die Tumorstadium sowie intrahepatische Metastasen ausschlaggebend (36).

4.1.4 Ist M70 das bessere FGF19?

In einem weiteren Versuch sollte die Wirkung von M70 näher erforscht werden. Dazu wurde Versuchsmäusen AAV-M70 injiziert. Bei M70 handelt es sich um eine synthetisierte FGF19 Variante mit veränderter Aminosäuresequenz, die keine proliferatorischen Eigenschaften aufweist (24). Nach 24 Wochen waren diese Mäuse vollkommen tumorfrei und ihr Lebergewicht war nicht erhöht. Bei histologischen Untersuchungen konnten keine Anzeichen für Dysplasien, Adenome oder gar ein HCC gefunden werden (33).

Um das Potential von M70 weiter zu untersuchen, wurden CB6F1-RasH2 Mäuse (die hemizygot für humanes H-RAS Transgen sind) (37) verwendet, um den Einfluss von

M70 und FGF19 zu vergleichen, da eine Aktivierung des RAS-Signalwegs häufig in humanen HCC anzutreffen ist. Nach 52 Wochen wurden die Tiere untersucht. Dabei fiel auf, dass sowohl die M70 als auch die FGF19 exprimierenden rasH2-Mäuse weniger Körpergewicht zugelegt hatten als die Kontrollkohorte. Die M70-Mäuse wiesen sogar ein verringertes Gewicht der Leber auf. In der Gruppe der FGF19 Mäuse konnten morphologische Veränderungen des Lebergewebes sowie zahlreiche Adenome und HCC nachgewiesen werden. Die M70 exprimierenden Mäuse hingegen hatten keinerlei Veränderungen in der Morphologie und es traten auch keine Tumore auf. In der rasH2 Kontrollgruppe wurden nur vereinzelt spontane Neoplasien festgestellt (33). Weiters wurden in den FGF19-exprimierenden rasH2 Mäusen Ki-67 und Alpha Fetoprotein in der Leber überexprimiert, nicht aber bei den M70 Mäusen (33). Diese Umstände legen die Annahme nahe, dass M70 im Gegensatz zu FGF19 keinerlei kanzerogene Wirkung entfaltet.

Weitere Versuche konnten zeigen, dass M70 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* an FGFR4 bindet und dass diese Bindung durch β -Klotho noch verstärkt werden kann. Die intrazelluläre Signaltransduktion entspricht faktisch der von FGF19, z.B. wird die CYP7A1 Expression in vergleichbarer Stärke unterdrückt (33). Ein bedeutsamer Unterschied ist aber der, dass FGF19 die Phosphorylierung von STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) bewirken kann, wozu M70 nicht im Stande ist (33). STAT3 ist ein Transkriptionsfaktor, der in HCC als ein häufig aktiviertes Onkogen fungiert (38). Dieser Umstand lässt natürlich aufhorchen, stellt er doch einen direkten Zusammenhang zwischen FGF19 und einem potentiellen Promotor der Hepatokarzinogenese dar.

Zur folgenden Vorstellung einer möglichen Verkettung der Ereignisse trägt bei, dass die Serumspiegel von FGF19 bei chronischer Cholestase sowie Leberzirrhose längerfristig erhöht sind (27): Aus der Ursache z.B. einer chronischen Entzündung durch Infektion mit Hepatitis C, entwickelt sich (vereinfacht dargestellt) über die geförderte Hepatozytenproliferation und der damit einhergehende erhöhte Expression von FGF19 erst eine Fibrose, später eine Zirrhose und weiter über Onkogenaktivierung ein hepatozelluläres Karzinom.

4.1.5 Korrelationen von anderen Erkrankungen und FGF19

In Zelllinien eines Hepatoblastoms (Hep293TT) konnte ebenfalls eine erhöhte Expression der FGF19 mRNA gemessen werden. Im Gegenzug war es möglich, durch Stilllegen des FGF19-Gens mittels shRNA, Neutralisieren von sekretiertem FGF19 mit Antikörpern oder Blockieren der Signalkette mit einem Kinaseinhibitor die Proliferation der Hepatoblastomzellen zu hemmen (39).

Weitere Korrelationen finden sich z.B. im Sinne einer paraneoplastischen Erkrankung: Pankreastumore können durch Komprimierung des Ductus Choledochus zu einer extrahepatischen Cholestase führen. PatientInnen mit Cholestase zeigen deutlich erhöhte FGF19 Spiegel im Serum sowie eine massiv gesteigerte Expression von hepatischem FGF19 – ein Hinweis darauf, dass FGF19 in einige Adaptionsvorgängen involviert ist, die die Leber vor der Toxizität der zurückgestauten Gallensäuren schützt (27).

Der Serumspiegel von FGF19 kann auch als Biomarker für weitere Erkrankungen herangezogen werden: Erhöhte Spiegel finden sich beim Nierenversagen und bei Prostatakarzinomen mit hohem Gleason-Grad, verminderte Spiegel bei koronarer Herzkrankheit, mit intestinaler Insuffizienz assoziiertem Leberversagen, Diabetes und Mb. Crohn (24).

4.2 Therapeutische Verwendung von FGF19 und M70

Die vielen positiven Eigenschaften von FGF19 machen ihn zu einem potentiellen Kandidaten für zukünftige Entwicklungen in der Pharmaindustrie. Er koordiniert die Gallensäuresynthese und die Motilität der Gallenblase, reguliert den Stoffwechsel, erhöht die Sensibilität für Insulin, senkt die Blutfette und reduziert im Endeffekt damit das Körpergewicht (25).

Man geht davon aus, dass FGF19 den durch Gallensäure verursachten Leberschaden durch eine Modulation der Gallensäuresynthese und die damit einhergehende Senkung des Gallensäurespiegels verhindern kann. Da aber FGF19 auch die Proliferation von Hepatozyten fördert, stellt das mit prolongiert erhöhtem FGF19 Spiegel einhergehende Risiko ein Hindernis bei der Entwicklung einer FGF19-basierten Therapie der hepatzellulären Karzinogenese dar (24).

M70 jedoch vermag den Gallensäurestoffwechsel zu regulieren, ohne dabei kanzerogene Eigenschaften aufzuweisen (24). In einem Versuch von Mei Zhou et. al. konnte

gezeigt werden, dass in transgenen Mäusen, denen zusätzlich zu AVV-FGF19 auch in 10-facher molarer Dosis AVV-M70 injiziert worden war, nach dem Versuchszeitraum von 24 Wochen keinerlei Tumore nachweisbar waren und das Lebergewicht deutlich niedriger ausfiel als in der FGF19 exprimierenden Kohorte. Das koexprimierte M70 konnte also offensichtlich die potentiell onkogene Wirkung von FGF19 neutralisieren (33). Eine auf M70 basierende Therapie könnte sich als zukunftssträchtig erweisen.

4.3 Erhöht eine Therapie mit DAAs den FGF19 Spiegel?

Zur Fragestellung, ob eine antivirale Therapie der Hepatitis C bei PatientInnen mit Leberzirrhose den FGF19 Serumspiegel verändert, waren keine Literaturstellen auffindbar. Im experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit wurde versucht diese Frage zu beantworten (siehe dort).

5 Material und Methoden

Diese Arbeit besteht aus zwei Teilen. Zum Ersten aus einer Literaturübersicht, in der hauptsächlich als PubMed-Recherche zur möglichen hepatokarzinogenen Wirkung von FGF19 (bzw. FGF15 bei der Maus) und zum Risiko der Entwicklung eines HCCs nach Therapie mit DAAs. Zum Zweiten aus einem experimentellen Teil, der Messung und Auswertung der FGF19 Serumspiegel. Die Diplomarbeit war Teil einer größeren klinischen Studie, die von der Ethikkommission bewilligt wurde (Votum Nummer 25-006 ex 12/13). Die FGF19 Serumspiegel von 18 PatientInnen mit Hepatitis C und einer Kontrollgruppe von 12 Gesunden wurden mittels Sandwich-ELISA gemessen. Die Messungen erfolgten aus Proben, die vor, 4 Wochen und 12 Wochen nach Therapiebeginn sowie 12 Wochen nach Erreichen des SVR gewonnen wurden, wobei nicht alle PatientInnen eine SVR erreichten. Als Parameter für einen potentiellen Leberschaden wurde bei allen ProbandInnen die Alanin-Aminotransferase (ALT) bestimmt. Zusätzlich wurden zu den genannten Zeitpunkten auch ein Blutbild sowie Leber-, Nieren-, Gerinnungs- und Entzündungsparameter bestimmt. Die Leberfestigkeit wurde mittels FibroScan® ermittelt.

5.1 ELISA Verfahren

Zur quantitativen Messung des FGF19 wurde der RD191107200R Human FGF19 Sandwich-ELISA des Herstellers BioVendor aus Brünn, Tschechischen Republik verwendet. Dabei wird der Standard, die Qualitätskontrollen und die PatientInnenproben in mit polyklonalem Anti-human FGF19 Antikörper beschichteten Mikrotiter Wells inkubiert. Der Kit erlaubt die Messung von humanem FGF19 aus Serum und Plasma (EDTA, Citrat und Heparin).

Die Sensitivität dieses Test-Kits beträgt 4,8pg/ml. Die bei diesem Test verwendeten Antikörper sind spezifisch für den humanen FGF19. Es wurden keine Kreuzreaktionen mit rekombinantem humanem FGF21 oder rekombinantem humanem FGF23 beobachtet. Tests, deren Resultate den Maximalwert von 800pg/ml überschreiten, müssen mit einer stärkeren Verdünnung wiederholt werden. Der höhere Verdünnungsfaktor ist dann bei der Berechnung der FGF19 Konzentration zu beachten.

Die photometrische Messung der FGF19 Konzentration erfolgte mit dem Spectrostar Omega der Firma BMG LABTECH GmbH aus Ortenberg, Deutschland.

5.1.1 Vorbereitung der Reagenzien und Proben

Vor der Messung muss der gefriergetrocknete Masterstandard mit Pufferlösung wiederhergestellt werden. Die resultierende Konzentration des humanen FGF19 in der Standardlösung beträgt 800pg/ml. Unter Verwendung von Pufferlösung werden weitere Standards mit Konzentrationen von 400pg/ml, 200pg/ml, 100pg/ml, 50pg/ml, 25pg/ml sowie 12,5pg/ml vorbereitet. Ebenso müssen die gefriergetrockneten Qualitätskontrollen (HIGH und LOW) mit Hilfe von Pufferlösung wiederhergestellt werden.

Die Biotin-markierte Antikörperlösung wird durch Mischen von einem Teil Biotin Labelled Antikörperkonzentrat (50x) und 49 Teilen Biotin-Ab Verdünnung hergestellt. Das Waschkonzentrat (10x) wird eins zu neun mit destilliertem Wasser verdünnt.

Die PatientInnenproben werden kurz vor dem Beginn des Assay mit der Pufferlösung verdünnt (ein Teil Probenflüssigkeit zu zwei Teilen Puffer).

Tabelle 6. Beim ELISA-Verfahren verwendete Komponenten und Reagenzien.

Reagenz	Lieferzustand	Menge
Mit Antikörper beschichtete Mikrotiter Streifen	gebrauchsfertig	96 Wells
Biotin-markierte Antikörperlösung (50x)	konzentriert	0,3 ml
Streptavidin-HRP Konjugat	gebrauchsfertig	13 ml
Master Standard	gefriergetrocknet	2 Phiolen
Qualitätskontrolle HIGH	gefriergetrocknet	2 Phiolen
Qualitätskontrolle LOW	gefriergetrocknet	2 Phiolen
Pufferlösung	gebrauchsfertig	20 ml
Biotin-Ab Verdünnung	gebrauchsfertig	13 ml
Waschlösungskonzentrat (3x)	konzentriert	100 ml
Substratlösung	gebrauchsfertig	13 ml
Stopplösung	gebrauchsfertig	13 ml

5.1.2 Ablauf des Assays

1. Jeweils 100µl von Standard, Qualitätskontrolle und Probe in die mit Anti-human FGF19 Antikörper beschichteten Mikrotiter Wells der Mikroplatten pipettiert.
2. Die Mikroplatten bei Raumtemperatur (ca. 25° C) für eine Stunde auf einer Rüttelplatte bei 300rpm inkubieren.
3. Die Wells drei Mal mit Waschlösung (0,35ml pro Well) auswaschen. Nach dem letzten Durchgang die Mikroplatten umgedrehen und wiederholt fest auf mehrere Lagen Zellstoff ausklopfen.
4. 100µl Biotin-markierte Antikörperlösung in jedes Well pipettieren.
5. Die Mikroplatten wieder bei Raumtemperatur für eine Stunde auf einer Rüttelplatte bei 300rpm inkubieren.
6. Die Wells erneut drei Mal mit Waschlösung (0,35ml pro Well) auswaschen. Nach dem letzten Durchgang die Mikroplatten umdrehen und fest auf mehrere Lagen Zellstoff ausklopfen.
7. 100µl Streptavidin-HRP Konjugat in jedes Well pipettieren.
8. Die Mikroplatten nun bei Raumtemperatur (ca. 25° C) für 30 Minuten auf einer Rüttelplatte bei 300rpm inkubieren.
9. Erneutes Auswaschen und ausklopfen der Mikroplatten.

10. 100µl der Substratlösung wird in die Wells pipettiert. Die Mikrotiterplatten sollen nicht dem direkten Sonnenlicht ausgesetzt sein. Sie können z.B. mit Aluminiumfolie abgedeckt werden.
11. Die Mikroplatten nun bei Raumtemperatur (ca. 25° C) für 10 Minuten inkubieren, ohne dass sie dabei gerüttelt werden.
12. Durch die Zugabe von 100µl Stopplösung die Farbentwicklung beenden.
13. Die Extinktion der einzelnen Wells innerhalb von fünf Minuten nach Zugabe der Stopplösung mit Hilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 450nm messen, wobei die Referenzwellenlänge auf 630nm eingestellt wird.

Die gemessenen Konzentrationen der Proben müssen mit ihrem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert werden, da die Proben vor dem Assay verdünnt wurden.

5.1.3 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Statistikprogramms SPSS (Version 22) und GraphPad Prism (Version 7.0). Die Daten wurden mittels D'Agostino & Pearson Normality Test auf Normalverteilung überprüft. Vergleich zwischen zwei Gruppen (nicht verbundene Variablen) erfolgten entweder mit t-Test oder Mann-Whitney U Test. Die Vergleiche zwischen mehr als 2 Gruppen (verbundene Variablen) erfolgten mittels one-way ANOVA und Tukey's post hoc Analyse oder Friedmann Test und Dunns multiple comparison Test. Der Zusammenhang zwischen ordinalskalierten Faktoren wurde mittels Chi-Square oder Fischer's exakt Test untersucht. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

6 Ergebnisse

Bei den im Folgenden präsentierten Resultaten ist es wichtig, sich dessen bewusst zu sein, dass die Aussagekraft aufgrund der relativ kleinen PatientInnenzahl begrenzt ist. Insgesamt wurden 30 Personen untersucht, davon waren 18 an HCV erkrankt und 12 stellten die gesunden Kontrollen dar. Zur Gruppe der HCV PatientInnen gehörten 10 Männer (55,55%) und acht Frauen (44,44%). Vier PatientInnen entwickelten nach

Ende der HCV Therapie ein HCC (7, 8, 9 und 16 Monate nach Ende der Therapie). Eine Studienteilnehmerin verstarb während der Therapie an einer Dekompensation ihrer Leberzirrhose. Sechs (33%) der 18 HCV PatientInnen erhielten eine interferonbasierte Therapie, 12 (66%) eine Therapie mit DAAs. Wie zu erwarten war, war die überwiegende Mehrheit der PatientInnen mit HCV Genotyp 1 infiziert. Insgesamt waren acht (44,4%) der PatientInnen therapienaiv; acht (57,1%) PatientInnen ohne HCC und zwei (50%) PatientInnen mit HCC hatten zuvor bereits eine HCV Therapie erhalten. Alle HCC PatientInnen waren zirrhotisch; bei den PatientInnen ohne HCC wiesen drei (21,4%) eine Fibrose und sechs (42,9%) eine Zirrhose auf. Ein SVR konnte bei 57,1% der PatientInnen ohne HCC erreicht werden, in der Gruppe mit HCC erreichte niemand ein SVR.

Bezüglich Altersverteilung, Geschlecht, Therapieregime, Genotyp, Therapie im Vorfeld, Vorliegen einer Fibrose oder Zirrhose und Erreichen eines SVR konnte bei Baseline (vor Therapiebeginn) kein signifikanter Unterschied zwischen den PatientInnengruppen mit und ohne HCC gefunden werden (Tabelle 7). Ferner war auch weder vor Therapiebeginn noch im Verlauf ein signifikanter Unterschied bei den Leberfunktionsparametern und den weiteren gemessenen Laborwerten zwischen den PatientInnen, die ein HCC entwickelt hatten, und jenen, die tumorfrei waren, feststellbar (Tabelle 8).

Tabelle 7. Übersicht der HCV positiven untersuchten Population.

n(gesamt) = 18		PatientInnen ohne HCC (n = 14; 78%)	PatientInnen mit HCC (n = 4; 22%)
Alter (n ± σ)		61,2 (7,2)	63,2 (6,7)
Geschlecht, n (%)	Männlich	7 (50)	3 (75)
	Weiblich	7 (50)	1 (25)
Therapieregime, n (%)	Interferonhaltig	6 (43)	0
	DAA	8 (57)	4 (100)
Genotyp, n (%)	Anderer Genotyp	4 (29)	1 (25)
	Genotyp 1	10 (71)	3 (75)
Vortherapie, n (%)	Nein	6 (43)	2 (50)
	Ja	8 (57)	2 (50)
Fibrose/Zirrhose, n (%)	Keine Fibrose	5 (36)	0
	Fibrose	3 (21)	0
	Zirrhose	6 (43)	4 (100)
SVR, n (%)	Nicht erreicht	6 (43)	4 (100)
	Erreicht	8 (57)	0

Tabelle 8. Laborwerte vor Beginn der Therapie, Median (Perzentil 25; 75).

Laborparameter		PatientInnen ohne HCC	PatientInnen mit HCC
Albumin	g/dl	3,9 (3,3; 4,5)	3,9 (3,7; 4,0)
ALT keine	U/l	76 (47; 100)	96 (65; 121)
AP keine	U/l	97 (77; 123)	104 (88; 155)
Bilirubin gesamt	mg/dl	0,8 (0,6; 1,2)	1,3 (1,1; 1,7)
CRP	mg/l	1,6 (0,8; 4,5)	0,7 (0,3; 5,0)
GGT	U/l	73 (61; 122)	86 (78; 103)
Hämatokrit	%	41 (37; 44)	40 (37; 40)
Hämoglobin	g/dl	14,7 (12,5; 15,4)	14,2 (13,1; 14,6)
Kreatinin	mg/dl	0,7 (0,7; 0,8)	0,7 (0,5; 1,0)
Leukozyten	Tsd/ μ l	5,4 (3,3; 6,3)	4,0 (3,6; 4,4)
Neutrophile absolut	Tsd/ μ l	2,9 (2,1; 3,8)	2,3 (1,9; 2,9)
Neutrophile	%	59 (54; 63)	58 (52; 66)
PZINR	-	1,16 (1,00; 1,33)	1,22 (1,14; 1,31)
Thrombozyten	Tsd/ μ l	153 (72; 167)	74 (47; 100)

Dem FGF19 Serumspiegel, welchem besondere Aufmerksamkeit galt, konnte ebenso kein signifikanter Einfluss auf die Hepatokarzinogenese nachgewiesen werden. Auch unterschied er sich vor der Therapie nicht von denen der Kontrollen (Tabelle 9 und Abbildung 2). Auffallend hingegen war, dass bei allen PatientInnen mit HCC der Serumspiegel von FGF19 4 Wochen nach Therapie niedriger war als vor Therapiebeginn, während bei bei 64% (n=9) der PatientInnen ohne HCC der FGF 19 Spiegel anstieg. Die Differenz zwischen dem FGF19 Spiegel zu Baseline und nach 4 Wochen (Δ FGF Wo. 0-4) war zwischen PatientInnen mit und ohne HCC signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) (Abbildungen 3).

Tabelle 9. FGF19 Serumspiegel und Deltawerte, Median (Perzentil 25; 75).

FGF19 Spiegel		PatientInnen ohne HCC	PatientInnen mit HCC
Vor der Therapie	pg/ml	278,70 (152,52; 353,07)	258,47 (207,11; 285,79)
Nach 4 Wochen	pg/ml	313,12 (209,69; 361,79)	159,15 (132,61; 190,28)
Nach 12 Wochen	pg/ml	308,75 (149,63; 388,64)	209,02 (182,27; 300,04)
12 Wo. nach SVR	pg/ml	289,86 (164,75; 347,09)	150,41 (150,41; 150,41)
Δ FGF19 Wo. 0-4	pg/ml	31,65 (-39,95; 178,05)	*-72,15 (-109,21; -60,80)
Δ FGF19 Wo. 4-12	pg/ml	-37,29 (-163,62; 75,52)	74,06 (-8,00; 167,44)
Δ FGF19 Wo. 12-SVR	pg/ml	59,00 (-80,00; 109,00)	-223,00 (-223,00; -233,00)
Δ FGF19 Wo. 0-12	pg/ml	8,48 (-41,10; 59,39)	1,91 (-76,20; 65,62)

Abbildung 2. FGF19 Serumspeigel. PatientInnen mit/ohne HCC im Vergleich.

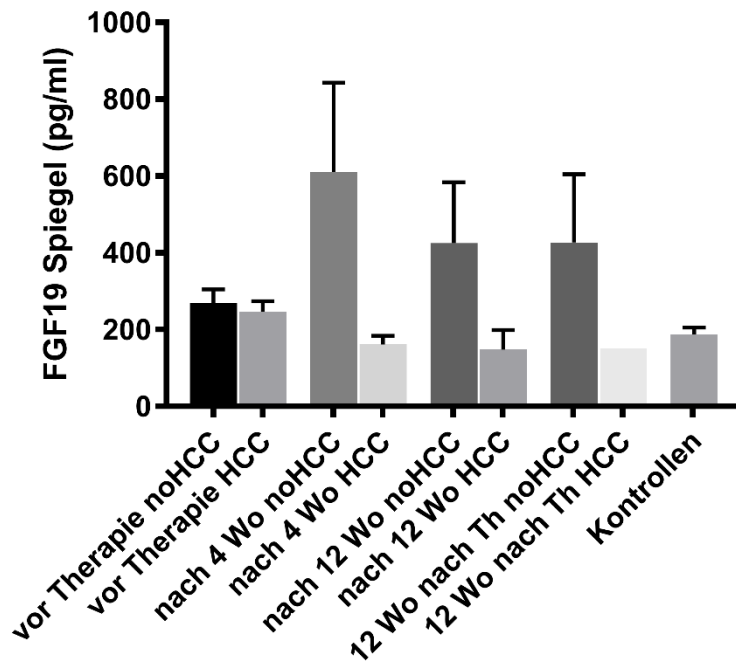
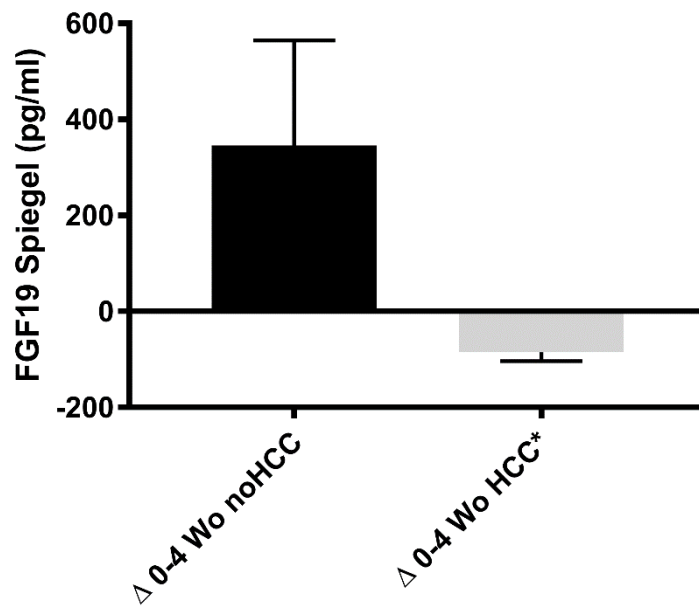


Abbildung 3. Δ FGF19 Spiegel vier Wochen nach Therapiebeginn.



*) Signifikanter Unterschied zwischen kein HCC und HCC ($p < 0,05$).

7 Diskussion

Weltweit sind etwa 160 Millionen Menschen (2,35%) an einer chronischen Hepatitis C erkrankt (11), wobei die Prävalenz in Europa vorwiegend einem Nord-Süd-Gefälle folgt und mit 0,1%-6% stark unterschiedlich ausfällt; in Österreich wird die Prävalenz auf 0,5% geschätzt (13). Bis zu einem Viertel der PatientInnen mit chronischer HCV Infektion entwickeln nach 20 Jahren unabhängig von der klinischen Ausprägung der Erkrankung eine Leberzirrhose (9), welche Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms ist. Die Hepatokarzinogenese ist dabei ein langer Prozess, der aus vielen kleinen Schritten und genetischen Veränderungen besteht. Eine HCV Infektion erhöht das Risiko für ein HCC um das 17-fache, andererseits führt ein Ausheilen der HCV Infektion zu einem deutlichen Rückgang des HCC Risikos und einer Verbesserung der Gesamtmortalität.

Die chronische HCV Infektion unterhält eine ständige Entzündung, in deren Rahmen es zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren, dem Untergang von Hepatozyten, einer verstärkten Regeneration des Leberparenchyms und weiters zur vermehrten Expression von Wachstumsfaktoren (u.a. FGF19 (17)) kommt. Die dadurch gesteigerte Hepatozytenproliferation erhöht das Risiko, dass monoklonale Hepatozyten auftreten. Zusammenfassend betrachtet, sind an der Pathogenese des HCC besonders folgende Faktoren beteiligt (reviewt in (10):

- Chronische Entzündungsreaktion/ Freisetzung von Entzündungsmediatoren
- Hepatozytenuntergang und verstärkte Regeneration des Leberparenchyms
- Wachstumsfaktoren
- Vermutete direkte onkogene Effekte der HCV Proteine
- Veränderungen der Zellproliferation und zellulären Signalketten
- Oxidativer Stress
- Chromosomale Instabilität
- Verlust von Tumorsuppressorgenen
- Metabolische Faktoren (Insulinresistenz, Steatose)
- Fibrose und Zirrhose

Das Ziel ist es, diese unheilvolle Verkettung zu durchbrechen, indem man früh genug, also noch vor dem Entstehen einer Leberzirrhose, versucht, mithilfe einer effektiven

Therapie die HCV Infektion auszuheilen. Als Marker für das Ausheilen dient das so genannte „anhaltende Therapieansprechen“, SVR (18).

Ein SVR ist dann erreicht, wenn nach Beendigung der antiviralen Therapie keine HCV RNA mehr nachweisbar ist (Nachweisgrenze ≤ 15 IU/ml). Mehr als 99% der PatientInnen, die ein SVR erreichen, können als geheilt angesehen werden. Weisen PatientInnen noch keine Zirrhose auf, kann meist mit einer Normalisierung der Leberfunktionsparameter und der bestehenden Leberschädigung gerechnet werden, besteht bereits eine Zirrhose, so sind das Risiko für Komplikationen der Zirrhose sowie für ein HCC bzw. die Gesamtmortalität zwar nicht eliminiert, aber deutlich vermindert (14). Vor Therapiebeginn müssen bestehende Komorbiditäten und virale Parameter wie Genotyp, Viruslast und mögliche Koinfektionen mit anderen hepatotropen Viren oder HIV sowie der Fibrosegrad und der Grad der Aktivierung bestimmt werden (14).

Mit der „alten“ HCV Therapie, die auf PegINF und Ribavarin basierte, waren je nach Genotyp SVR Raten von 50%-80% erreichbar. Im Jahr 2011 wurden die ersten DAAs in der EU zugelassen und in einer Tripeltherapie zusammen mit PegINF- α und Ribavirin eingesetzt (18). Unter der Therapie mit DAAs der ersten Generation kam es aber bei bis zu 15% der PatientInnen zu so schwerwiegenden Nebenwirkungen, dass die Therapie abgebrochen werden musste (20). Seit der Verfügbarkeit der zweiten Generation von DAAs 2014 werden nun interferonfreie Therapieschemata europaweit angewendet, wenn auch die hohen Kosten eine vereinheitlichte Anwendung dieser Therapie derzeit nicht zulassen. Die Wirkstoffe der zweiten DAA Generation werden in Kombinationen von einem DAA mit Ribavirin oder mehreren DAAs mit oder ohne Ribavarin verwendet, und es lassen sich so SVR Raten von 85%-100% erreichen (18)! Außerdem werden die neuen DAAs von den PatientInnen viel besser toleriert. Für die Kombinationstherapie von Sofosbuvir und Ledipasvir konnte gezeigt werden, dass, obwohl 3,8% der gesamten Kohorte ernsthafte Nebenwirkungen aufwiesen, niemand die Therapie wegen der Nebenwirkungen abbrechen musste (20). Mit diesen sehr guten SVR Raten und der gleichzeitig deutlich besseren Verträglichkeit eröffnen die DAAs äußerst wertvolle Therapiemöglichkeiten.

Von diesem Ergebnis erwartete man sich eigentlich, einen wichtigen oder gar ausschlaggebenden Beitrag zur Prävention eines HCC geleistet zu haben. Entgegen diesen Erwartungen fielen in zwei Studien zu DAAs bei PatientInnen hohe Raten an Frührezidiven bzw. Erstmanifestationen des HCC auf: M. Reig. et al. berichteten von drei Todesfällen (bei n=53) und von Rezidiven bei 27,6% der TeilnehmerInnen (2), F. Conti

et al. berichteten von 3,2% Neuerkrankungen und 28,8% Rezidiven (22). Würde es wirklich zutreffen, dass diese Medikamente nun selbst das Wachstum von Tumoren fördern, wäre das natürlich ein herber Rückschlag. Dass das unwahrscheinlich ist, konnte in mehreren großen französischen Kohortenstudien mit über 6000 TeilnehmerInnen gezeigt werden (23).

Wir untersuchten daher in dieser Diplomarbeit an einer kleinen Kohorte von 18 PatientInnen während und nach DAA Therapie, welche Faktoren mit der Entwicklung eines HCCs assoziiert sind. Vier dieser 18 PatientInnen entwickelten nach der Therapie ein HCC. Weder die Thrombozytenzahl, noch das Vorliegen einer Fibrose oder Zirrhose oder ein anderer untersuchter Parameter (besonders DAA Therapie) war in der Kohorte mit dem Auftreten eines HCC assoziiert. Allerdings haben unsere Daten aufgrund der geringen Stichprobenzahl nur eine sehr begrenzte Aussagekraft.

Der Fibroblastenwachstumsfaktor FGF19 hat einen proliferationsfördernden Effekt auf Hepatozyten (32) und das FGF19-Gen ist in 14% der humanen HCC überexprimiert (3). FGF19 könnte deshalb ebenfalls eine bedeutsame Rolle in der multifaktoriellen Hepatokarzinogenese spielen. Darauf deutet auch ein Tierversuch hin, in dem alle transgenen FGF19 Mäuse einer Kohorte ein erhöhtes Lebergewicht und Malignome entwickelten, deren Zahl und Größe über der der Kontrollgruppe lagen (33).

In einer weiteren Studie konnte bei PatientInnen mit HCC eine signifikante Erhöhung von FGF19 Serumspiegel, β -Klotho, FGF19 im Tumorgewebe, Expression von FGF19 mRNA sowie FGFR4 im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Seiki Miura et. al. zeigte ferner, dass rekombinantes FGF19 die Apoptose von HCC-Zellen unterdrücken kann und gleichzeitig die Zellmobilität und Invasivität erhöht.

Eine interessante Fragestellung, auf die ich in der Literatur keinerlei Antwort finden konnte, ist, ob eine Therapie mit DAAs den FGF19 Spiegel erhöht. Durch den gesteigerten FGF19 Spiegel könnte (zumindest theoretisch) doch ein Einfluss der DAA Therapie auf die Entstehung von HCC Rezidiven bestehen. Aus meinen Messergebnissen beim ELISA ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des FGF19 Spiegels in der Gruppe der HCV PatientInnen und der Kontrollgruppe vor Therapiebeginn. Im Verlauf der DAA Therapie stieg bei 64% (n=9) der PatientInnen ohne HCC der FGF19 Spiegel an. Auffallend war, dass bei allen PatientInnen mit HCC, der Serumspiegel von FGF19 vier Wochen nach Therapie signifikant niedriger war als vor Therapiebeginn.

Das Absinken der FGF19 Werte bei den HCC PatientInnen nach vierwöchiger DAA Therapie ist derzeit schwierig zu erklären. Eine Hypothese wäre, dass durch eine möglicherweise gesteigerte FGFR4 Expression in den Hepatozyten vermehrt FGF19 gebunden werden kann, was zu einer konsekutiven Senkung des FGF19 Serumspiegels führen könnte. Groß angelegte Studien sollten diesem Effekt sowie dem Einfluss von DAAs auf den FGF19 Spiegel und auf eine HCC Entstehung weiter nachgehen, um Klarheit zu schaffen.

Wegen seiner besprochenen negativen Eigenschaften eignet sich FGF19 wohl nicht für eine therapeutische Verwendung, was an sich schade ist, hat FGF19 doch auch viele positive Eigenschaften: FGF19 koordiniert die Gallensäuresynthese und die Motilität der Gallenblase, reguliert den Stoffwechsel, erhöht die Sensibilität für Insulin, senkt die Blutfette und reduziert im Endeffekt damit das Körpergewicht (25). M70 jedoch, eine synthetische FGF19 Variante, reguliert den Gallensäurestoffwechsel, ohne dabei kanzerogene Eigenschaften aufzuweisen (24). Eine auf M70 basierende Therapie könnte sich als zukunftssträchtig erweisen. Untersuchungen in diese Richtung könnten bedeutende Früchte tragen und ungeahnte Therapieoptionen für kranke oder gefährdete Menschen eröffnen.

Zusammenfassend scheint die Therapie mit DAA in unserer kleinen Kohorte den FGF19 Spiegel im Serum nicht zu steigern. Man kann also derzeit davon ausgehen, dass man mit den DAAs endlich relativ gut verträgliche Wirkstoffe in der Hand hat, mit denen je nach HCV Genotyp SVR Raten von bis zu 100% erreicht werden können und die somit hoffen lassen, dass durch eine rechtzeitige Eradikation des HCV dem Entstehen von HCC vorgebeugt werden könnte.

8 Literaturverzeichnis

1. Oettle H, Sinn M. Tumoren von Leber und Gallenwegen. In: Dietel M, Suttorp N, Zeitz M, editors. *Harrisons Innere Medizin*. 1. 18th ed. Berlin 2012. p. 832-9.
2. Reig M, Marino Z, Perello C, Inarrairaegui M, Ribeiro A, Lens S, et al. Unexpected high rate of early tumor recurrence in patients with HCV-related HCC undergoing interferon-free therapy. *Journal of hepatology*. 2016 Oct;65(4):719-26. PubMed PMID: 27084592.
3. Sawey ET, Chanrion M, Cai C, Wu G, Zhang J, Zender L, et al. Identification of a therapeutic strategy targeting amplified FGF19 in liver cancer by Oncogenomic screening. *Cancer cell*. 2011 Mar 8;19(3):347-58. PubMed PMID: 21397858. Pubmed Central PMCID: 3061399.
4. Li Y, Zhang W, Doughtie A, Cui G, Li X, Pandit H, et al. Up-regulation of fibroblast growth factor 19 and its receptor associates with progression from fatty liver to hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2016 Jul 21. PubMed PMID: 27447573.
5. Houghton M. The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus. *Journal of hepatology*. 2009 Nov;51(5):939-48. PubMed PMID: 19781804.
6. Stahl M, Schmidt HH-J. Akute virale Hepatitis. In: Dietel M, Suttorp N, Zeitz M, editors. *Harrisons Innere Medizin*. 18th ed. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag GmbH; 2012. p. 2750-3.
7. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. 2014 Jan;59(1):318-27. PubMed PMID: 24115039. Pubmed Central PMCID: 4063340.
8. Maieron A, Metz-Gercek S, Hackl F, Luger C, Ziachehabi A, Strauss R, et al. Chronic hepatitis C in Austria, 1992-2006: genotype distribution and demographic factors. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2010 Feb 25;15(8):19492. PubMed PMID: 20197021.
9. Niehues R, Schmidt HH-J. Chronische Hepatitis. In: Dietel M, Suttorp N, Zeitz M, editors. *Harrisons Innere Medizin*. 18th ed. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag; 2012. p. 2790-1.
10. Lin MV, King LY, Chung RT. Hepatitis C virus-associated cancer. *Annual review of pathology*. 2015;10:345-70. PubMed PMID: 25387053.
11. Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2011 Feb;17(2):107-15. PubMed PMID: 21091831.
12. Strauss R, Fulop G, Pfeifer C. Hepatitis C in Austria 1993-2000: reporting bias distort HCV epidemiology in Austria. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2003 May;8(5):113-8. PubMed PMID: 12799478.

13. Esteban JI, Sauleda S, Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *Journal of hepatology*. 2008 Jan;48(1):148-62. PubMed PMID: 18022726.
14. European Association for the Study of the Liver. Electronic address eee. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016. *Journal of hepatology*. 2016 Sep 12. PubMed PMID: 27667367.
15. Alter MJ, Kuhnert WL, Finelli L, Centers for Disease C, Prevention. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. *Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports*. 2003 Feb 7;52(RR-3):1-13, 5; quiz CE1-4. PubMed PMID: 12585742.
16. Wilkins T, Akhtar M, Gititu E, Jalluri C, Ramirez J. Diagnosis and Management of Hepatitis C. *American family physician*. 2015 Jun 15;91(12):835-42. PubMed PMID: 26131943.
17. Nicholes K, Guillet S, Tomlinson E, Hillan K, Wright B, Frantz GD, et al. A mouse model of hepatocellular carcinoma: ectopic expression of fibroblast growth factor 19 in skeletal muscle of transgenic mice. *The American journal of pathology*. 2002 Jun;160(6):2295-307. PubMed PMID: 12057932. Pubmed Central PMCID: 1850847.
18. European Association for Study of L. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. *Journal of hepatology*. 2015 Jul;63(1):199-236. PubMed PMID: 25911336.
19. Shan R, Yin H, Yang W, Li J, Zhang M, Zhao M, et al. Influencing factors of transient elastography in detecting liver stiffness. *Experimental and therapeutic medicine*. 2016 Oct;12(4):2302-6. PubMed PMID: 27698728. Pubmed Central PMCID: 5038607.
20. Toshikuni N. Therapy with Direct-Acting Antiviral Agents for Hepatitis C-Related Liver Cirrhosis. *Gut and liver*. 2016 Nov 14. PubMed PMID: 27840363.
21. Bruix J, Sherman M, American Association for the Study of Liver D. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*. 2011 Mar;53(3):1020-2. PubMed PMID: 21374666. Pubmed Central PMCID: 3084991.
22. Conti F, Buonfiglioli F, Scuteri A, Crespi C, Bolondi L, Caraceni P, et al. Early occurrence and recurrence of hepatocellular carcinoma in HCV-related cirrhosis treated with direct-acting antivirals. *Journal of hepatology*. 2016 Oct;65(4):727-33. PubMed PMID: 27349488.
23. stanislav.pol@aphp.fr AcsgohcEa. Lack of evidence of an effect of direct-acting antivirals on the recurrence of hepatocellular carcinoma: Data from three ANRS cohorts. *Journal of hepatology*. 2016 Oct;65(4):734-40. PubMed PMID: 27288051.
24. Itoh N, Ohta H, Konishi M. Endocrine FGFs: Evolution, Physiology, Pathophysiology, and Pharmacotherapy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;6:154. PubMed PMID: 26483756. Pubmed Central PMCID: 4586497.

25. Zhang J, Li HT, Fang QC, Jia WP. Role of fibroblast growth factor 19 in maintaining nutrient homeostasis and disease. *Biomed Environ Sci.* 2014 May;27(5):319-24. PubMed PMID: 24827712.
26. Wu X, Ge H, Lemon B, Vonderfecht S, Weiszmann J, Hecht R, et al. FGF19-induced hepatocyte proliferation is mediated through FGFR4 activation. *The Journal of biological chemistry.* 2010 Feb 19;285(8):5165-70. PubMed PMID: 20018895. Pubmed Central PMCID: 2820743.
27. Schaap FG, van der Gaag NA, Gouma DJ, Jansen PL. High expression of the bile salt-homeostatic hormone fibroblast growth factor 19 in the liver of patients with extrahepatic cholestasis. *Hepatology.* 2009 Apr;49(4):1228-35. PubMed PMID: 19185005.
28. Ogawa Y, Kurosu H, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Goetz R, et al. BetaKlotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007 May 1;104(18):7432-7. PubMed PMID: 17452648. Pubmed Central PMCID: 1855074.
29. Fukumoto S, Yamashita T. FGF23 is a hormone-regulating phosphate metabolism--unique biological characteristics of FGF23. *Bone.* 2007 May;40(5):1190-5. PubMed PMID: 17276744.
30. Uriarte I, Latasa MU, Carotti S, Fernandez-Barrena MG, Garcia-Irigoyen O, Elizalde M, et al. Ileal FGF15 contributes to fibrosis-associated hepatocellular carcinoma development. *International journal of cancer.* 2015 May 15;136(10):2469-75. PubMed PMID: 25346390.
31. Ilikhan SU, Bilici M, Sahin H, Akca AS, Can M, Oz, II, et al. Assessment of the correlation between serum prolidase and alpha-fetoprotein levels in patients with hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology.* 2015 Jun 14;21(22):6999-7007. PubMed PMID: 26078578. Pubmed Central PMCID: 4462742.
32. Wu AL, Coulter S, Liddle C, Wong A, Eastham-Anderson J, French DM, et al. FGF19 regulates cell proliferation, glucose and bile acid metabolism via FGFR4-dependent and independent pathways. *PloS one.* 2011 Mar 18;6(3):e17868. PubMed PMID: 21437243. Pubmed Central PMCID: 3060878.
33. Zhou M, Wang X, Phung V, Lindhout DA, Mondal K, Hsu JY, et al. Separating Tumorigenicity from Bile Acid Regulatory Activity for Endocrine Hormone FGF19. *Cancer research.* 2014 Jun 15;74(12):3306-16. PubMed PMID: 24728076.
34. Imrich S, Hachmeister M, Gires O. EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. *Cell adhesion & migration.* 2012 Jan-Feb;6(1):30-8. PubMed PMID: 22647938. Pubmed Central PMCID: 3364135.
35. Terris B, Cavard C, Perret C. EpCAM, a new marker for cancer stem cells in hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology.* 2010 Feb;52(2):280-1. PubMed PMID: 20006402.
36. Miura S, Mitsuhashi N, Shimizu H, Kimura F, Yoshidome H, Otsuka M, et al. Fibroblast growth factor 19 expression correlates with tumor progression and poorer prognosis of hepatocellular

carcinoma. *BMC cancer*. 2012 Feb 06;12:56. PubMed PMID: 22309595. Pubmed Central PMCID: 3293719.

37. Storer RD, Sistare FD, Reddy MV, DeGeorge JJ. An industry perspective on the utility of short-term carcinogenicity testing in transgenic mice in pharmaceutical development. *Toxicologic pathology*. 2010 Jan;38(1):51-61. PubMed PMID: 19893055.

38. He G, Karin M. NF-kappaB and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer. *Cell research*. 2011 Jan;21(1):159-68. PubMed PMID: 21187858. Pubmed Central PMCID: 3193410.

39. Elzi DJ, Song M, Blackman B, Weintraub ST, Lopez-Terrada D, Chen Y, et al. FGF19 functions as autocrine growth factor for hepatoblastoma. *Genes & cancer*. 2016 Mar;7(3-4):125-35. PubMed PMID: 27382436. Pubmed Central PMCID: 4918950.