

Aus dem Institut für Pathologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Lipidtropfen und –assoziierte Proteine der Perilipin-Familie in
Hepatozellulären Adenomen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Diane Duret
Aus Paris, Frankreich

Mainz, 2023

Tag der Promotion:

18. März 2024

Meinen wundervollen Söhnen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	X
1 Einleitung	1
2 Literaturdiskussion.....	2
2.1 Die normale Leber	2
2.1.1 Aufbau der Leber.....	2
2.1.2 Funktion der Leber	3
2.2 Lebererkrankungen.....	4
2.2.1 Genetische Lebererkrankungen.....	4
2.2.2 Metabolische Lebererkrankungen.....	5
2.2.3 Leberzirrhose	6
2.2.4 Lebertumoren und Tumor-artige Läsionen	7
2.2.4.1 Fokale Noduläre Hyperplasie	7
2.2.4.2 Hepatozelluläres Adenom	8
2.2.4.3 Hepatozelluläres Karzinom.....	13
2.2.4.4 Differentialdiagnosen	14
2.2.4.5 β -Catenin in Lebertumoren und Tumor-artigen Läsionen.....	15
2.3 Intrazelluläre Lipidtropfen und -assoziierte Proteine	18
2.3.1 Lipidtropfen	18
2.3.1.1 Funktion der Lipidtropfen.....	18
2.3.1.2 Aufbau der Lipidtropfen	19
2.3.2 Perilipine.....	20
2.3.2.1 Perilipin 1.....	22
2.3.2.2 Perilipin 2.....	23
2.3.2.3 Perilipin 3.....	24
2.3.2.4 Perilipin 4.....	24
2.3.2.5 Perilipin 5.....	25
2.3.3 Lipidtropfen und Perilipine in Neoplasien	26
3 Material und Methoden	28
3.1 Material	28
3.1.1 Geräte.....	28
3.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien	30

3.1.3 Chemikalien, Lösungen, Reagenzien	31
3.1.4 Standards.....	33
3.1.5 Puffer	33
3.1.6 Zellkulturmedien.....	34
3.1.7 Kits	34
3.1.8 Antikörper.....	35
3.1.9 Zellkulturen.....	37
3.1.10 Plasmide	38
3.1.11 Oligonukleotide (Primer)	39
3.2 Methoden	41
3.2.1 Gewebe-/Patienten-Kollektiv.....	41
3.2.2 Mikroskopiemethoden	42
3.2.2.1 Herstellung eines TMA	42
3.2.2.2 Dünnschnitte	42
3.2.2.3 Hämatoxylin und Eosin (H&E)-Färbung	42
3.2.2.4 Immunhistochemische Färbungen	43
3.2.2.5 Immunfluoreszenzmikroskopie.....	46
3.2.3 Proteinbiochemische Methoden	46
3.2.3.1 Isolierung von Gesamtprotein aus kryoasserviertem Gewebe	46
3.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	47
3.2.3.2 Diskontinuierliche Protein-Gelelektrophorese nach Lämmli.....	47
3.2.3.4 Immunblot und Signaldetektion	48
3.2.4 Molekularbiologische Methoden	50
3.2.4.1 DNA-Analyse (Sanger Sequenzierung)	50
3.2.4.1.1 Extraktion genomischer DNA aus FFPE-Gewebe	50
3.2.4.1.2 Nukleinsäurekonzentrationsbestimmung.....	50
3.2.4.1.3 Amplifikation von DNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion	51
3.2.4.1.4 Sequenzierung.....	52
3.2.4.2 RNA-Analyse	52
3.2.4.2.1 Isolierung von Gesamt-mRNA aus kryoasserviertem Gewebe und Zellkulturen	52
3.2.4.2.2 cDNA-Synthese	53
3.2.4.2.3 Quantitative Echtzeit-PCR	54
3.2.4.2.4 Auswertung der Echtzeit-PCR-Ergebnisse	55

3.2.5 Zellbiologische Methoden	56
3.2.5.1 Passagieren von Zellen	56
3.2.5.2 Zellzahlbestimmung.....	56
3.2.5.3 Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)	57
3.2.6 Auswertungskriterien	57
3.2.6.1 Histopathologische Begutachtung.....	57
3.2.6.2 Immunhistochemische Begutachtung	58
3.2.7 Digitale Bildanalyse.....	60
3.2.8 Statistische Auswertung	61
4 Ergebnisse	62
4.1 Erstellung, klinische und histopathologische Charakterisierung eines Gewebe-Kollektivs Hepatozellulärer Adenome.....	62
4.1.1 Mikroskopie	65
4.1.2 Immunhistochemische und molekularpathologische Charakterisierung von HCAs ...	68
4.1.2.1 Subtypisierung	68
4.1.2.2 Auswertung der Ki67-Proliferationsrate in HCAs	71
4.1.3 Steatose in Hepatozellulären Adenomen	72
4.2 Perilipin-Expression in Hepatozellulären Adenomen.....	73
4.2.1 Analyse der Perilipine 1 und 2 in HCAs.....	74
4.2.2 Analyse der Perilipine 3, 4 und 5 in HCAs.....	79
4.3 Evaluation der Steatose und der Perilipin-Expression im angrenicht-neoplastischen Leberparenchym von HCA-Patienten.....	81
4.4 Analyse der Assoziation der Perilipin 1- und Perilipin 2-Expression mit dem Wnt-Signalweg.....	87
4.4.1 Gemeinsames Vorkommen von Perilipin 1 und Glutaminsynthetase	87
4.4.2 Verstärkte <i>PLIN1</i> mRNA-Expression in FNHs	89
4.4.3 Perilipin 1 und β -Catenin in HCAs und FNHs.....	91
4.4.4 Induktion der <i>PLIN1</i> mRNA-Transkription durch <i>CTNNB1</i> -Überexpression in kultivierten HEK293T-Zellen	93
5 Diskussion	95
5.1 Diagnostische Schwierigkeiten und Besonderheiten der HCA-Diagnose	95
5.2 Entartungspotential Hepatozellulärer Adenome.....	98
5.3 Einfluss der Steatose im nicht-tumorösen Leberparenchym auf die HCA-Entstehung.....	99
5.4 Perilipin 1 und zonale Expressionsprogramme der Leber	101
5.5 Perilipin 2 und Steatose in benignen Lebertumoren	104
5.6 Ausblick.....	105

6 Zusammenfassung	106
7 Literaturverzeichnis.....	107
8 Anhang.....	123
9 Danksagung.....	129
10 Tabellarischer Lebenslauf	130

Abkürzungsverzeichnis

AA	Amyloid A
ABHD5	<i>Abhydrolase Domain Containing 5</i>
ACCase	Acetyl-CoA Carboxylase
ACLY	ATP-Citrat-Lyase
ADFP	<i>Adipose Differentiation-related Protein</i>
AFLD	<i>Alcoholic Fatty Liver Disease</i>
AFP	<i>Alpha-Fetoprotein</i>
AG β C	Axin/GSK3/ β -Catenin-Komplex
APS	Ammoniumpersulfat
ASH	Alkoholische Steatohepatitis
ASL	Argininosuccinat-Lyase
ASS1	Argininosuccinat-Synthase 1
ATGL	Adipose Triglyceride Lipase
ATP	Adenosintryphosphat
β -TrCP	<i>Beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase</i>
BHCA	β -Catenin-aktiviertes Hepatozelluläres Adenom
BMI	<i>Body mass index</i>
Bp	Basispaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CA-Form	<i>Constitutively active</i> , konstitutiv aktive Form
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CE	Cholesterinester
COX2	Cyclooxygenase 2
CK1	Casein Kinase 1
cPAT	<i>Constitutive PAT-Protein</i>
CREP	<i>cAMP response element binding protein</i>
CRP	C-Reaktives-Protein
CT	Computertomographie
CTP1	<i>Choline-phosphate cytidyltransferase 1</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
DTT	Dithiothreitol
ECL-Entwicklungslösung	<i>Enhanced chemoluminescent</i> -Entwicklungslösung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ePAT	<i>Exchangeable PAT-Protein</i>
FAS	Fettsäuresynthase
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FOXO	<i>Forkhead-Box-Protein-O</i>
FNH	Fokale Noduläre Hyperplasie
FFPE-Gewebe	Formalin-fixiertes Paraffin-engebettetes-Gewebe
G6Pase	Glucose-6-phosphatase
G6PC	Gen der Glucose-6-Phosphatase- α
<i>G6PT</i>	Gen des Glucose-6-phosphat-Transporters
GAPD	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUL	Glutaminsynthetase-Gen
gp130	Glykoprotein 130
GPC3	Glypican 3
GPR49	<i>G-protein coupled receptor 49</i>
GS	Glutaminsynthetase
GSD	<i>Glycogen storage disease</i> , Glykogenspeicherkrankheit
GSK3	Glycogensynthase-Kinase 3
HCA	Hepatozelluläres Adenom
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Salzsäure
H&E-Färbung	Hämatoxylin & Eosin-Färbung
HHCA	<i>HNF1alpha</i> -inaktiviertes Hepatozelluläres Adenom
HNF1A	<i>Hepatocyte nuclear factor 1alpha</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSC	<i>Hepatic stellate cells</i> , hepatische Sternzellen
Hsp 70	Hitzeschockprotein 70
iCCA	Intrahepatisches Cholangiokarzinom
IHCA	Inflammatorisch-telangiektatisches Hepatozelluläres Adenom
IL6	Interleukin-6
ILST6	<i>Interleukin 6 Cytokine Family Signal Transducer</i>

INHBE	<i>Inhibin beta E chain</i>
JAK	Janus Kinase
k. A.	keine Angabe
L-FABP	<i>Liver-type fatty acid-binding protein</i> , auch FABP1
LEF	<i>Lymphoid enhancer factor</i>
LGR4/5	<i>Leucine-rich repeat containing G-protein-coupled receptor 4/5</i>
mAb	monoklonaler Antikörper
MLDP	<i>Myocardial lipid-droplet protein</i>
MODY3-Diabetes	<i>Maturity-onset diabetes of the young type 3</i> , Typ 3-Diabetes
MRT	Magnetresonanztomographie
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n.a.	nicht anwendbar
NAFLD	<i>non-alcoholic fatty liver disease</i> , nicht-alkoholische Fettleber Erkrankung
NASH	<i>non-alcoholic steatohepatitis</i> , nicht-alkoholische Steatohepatitis
OXPAT	<i>Oxidative PAT protein</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PEI	Polyethylenimine
PGE2	Prostaglandin E2
pAb	polyklonaler Antikörper
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
PLIN	Perilipin
PPAR α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>
RICTOR	<i>Rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>
RNA	Ribonukleinsäure
<i>RNAse</i>	Ribonuklease
RSpo	R-Spondin
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Natriumdodecylsulfat</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
shHCA	Sonic-Hedgehog-aktiviertes Hepatozelluläres Adenom
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>

SLS	<i>Sample Loading Solution</i>
STAT 3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TAG	Triglycerid
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
TCF	<i>T-cell factor</i>
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TERT	Telomerase reverse Transkriptase
TIC	<i>Tumor initiating cells</i>
TIP47	<i>Tail-interacting protein of 47 kiloDaltons</i>
TMA	<i>Tissue-Microarray</i>
TP53	<i>Tumor Protein 53</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
UHCA	Unklassifizierbares Hepatozelluläres Adenom
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Diagnostisches und therapeutisches Verhalten bei HCAs	12
Abb. 2: Schematische Darstellung des Wnt-Signalwegs	16
Abb. 3: Schematischer Aufbau eines Lipidtropfens	20
Abb. 4: Modell der sequenziellen Perilipin-Expression beim Reifungsprozess von Lipidtropfen	22
Abb. 5: Histomorphologische Charakteristika der HCA-Proben und Vergleich zu FNH- und HCC-Proben	66
Abb. 6: Histomorphologische und immunhistochemische Merkmale der HCA-Subtypen	69
Abb. 7: Ki67-Proliferationsrate in HCAs und Vergleich zu FNHs und HCCs.....	71
Abb. 8: Heterogenität des Steatosegrades bei unterschiedlichen Lebertumor-Entitäten.....	72
Abb. 9: Steatose in HCAs und Vergleich zu FNHs und HCCs.....	73
Abb. 10: Perilipin 1-Expression in HCAs und Vergleich zu FNHs und HCCs	75
Abb. 11: Perilipin 2-Expression in HCAs und Vergleich zu FNHs und HCCs	77
Abb. 12: Differentielle Perilipin 1- und ubiquitäre Perilipin 2-Expression in HCA-Subtypen und Vergleich zu FNHs und HCCs.....	78
Abb. 13: Perilipin 3-, 4- und 5-Expression in HCAs und Vergleich zu FNHs und HCCs.....	79
Abb. 14: Ubiquitäre zytoplasmatische Lokalisation von Perilipin 3, 4 und 5 und partielle Expression um Lipidtropfen.....	80
Abb. 15: Intensitätsschwankungen der immunhistochemischen Färbungen von Perilipin 3, 4 und 5 zwischen HCA und angrenzendem Lebergewebe	81
Abb. 16: Steatose des nicht-tumorösen Leberparenchyms der HCA-Patienten und Vergleich zu den FNH- und HCC-Patienten	82
Abb. 17: Perilipin 1- und 2-Immunhistochemie im nicht-tumorösen Leberparenchym	85
Abb. 18: Zytoplasmatische Lokalisation der ePATs Proteine Perilipin 3, 4 und 5 im nicht-tumorösen Leberparenchym	86
Abb. 19: Koexpression von Glutaminsynthetase und Perilipin 1 in der Leber	87
Abb. 20: Gemeinsames Vorkommen von Glutaminsynthetase und Perilipin 1 in der Leber	88
Abb. 21: mRNA-Analyse von <i>GS</i> und <i>PLIN1</i> in HCAs, FNHs und nicht-tumorösem Lebergewebe ...	90
Abb. 22: Immunblot von Perilipin 1, 2, 5 und β -Catenin in HCAs und FNHs.....	92
Abb. 23: Induktion der <i>PLIN1</i> mRNA bei Überexpression von <i>CTNNB1</i>	94
Abb. 24: Beteiligung zentraler Expressionsprogramme der Leber in unterschiedlichen Tumoren	102
Abb. 25: Histopathologische Evaluierung der Intensität der Perilipin 1- und 2-Färbung in HCAs und im Vergleich zu FNHs und HCCs.....	123

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Merkmale der HCA-Subtypen	11
Tab. 2: Differentialdiagnose von HCAs.....	14
Tab. 3: Merkmale von Tumoren mit <i>CTNNB1</i> -Mutationen.....	17
Tab. 4: Primärantikörper.....	35
Tab. 5: Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzmikroskopie.....	37
Tab. 6: Sekundärantikörper für den Immunblot.....	37
Tab. 7: Oligonukleotide für real-time PCR-Analysen.....	39
Tab. 8: Oligonukleotide für <i>CTNNB1</i> -Genotypisierung bei Standard PCR.....	40
Tab. 9: Oligonukleotide für <i>CTNNB1</i> -Genotypisierung bei Nested PCR.....	40
Tab. 10: Protokoll der H&E-Färbung.....	43
Tab. 11: Protokoll der IHC-Färbung	45
Tab. 12: Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen	48
Tab. 13: Zusammensetzung der real-time PCR-Mastermixe.....	51
Tab. 14: PCR-Programme des Thermocyclers Gene Amp PCR System 9.700	51
Tab. 15: Thermocycler-Programm für die cDNA-Synthese	54
Tab. 16: Programm der Echtzeit-PCR.....	55
Tab. 17: Scoring histomorphologischer Parameter von Lebertumoren.....	57
Tab. 18: Scoring des Steatosegrads.....	58
Tab. 19: Scoring-System zur Beurteilung der Färbeintensitäten.....	59
Tab. 20: HCA-Kollektiv	63
Tab. 21: Klinische Daten des Kollektivs	64
Tab. 22: Größe der Lebertumoren und Vorkommen von flächigen Einblutungen im Kollektiv	67
Tab. 23: Ergebnisse der <i>CTNNB1</i> -Mutationsanalyse.....	70
Tab. 24: Perilipin 3-, 4- und 5-Expression in HCA-Subtypen	80
Tab. 25: Auswertung der Perilipin 1- und Perilipin 2-Immunhistochemie im nicht-tumorösen Leberparenchym von HCA-Patienten und Vergleich zu FNH- und HCC-Patienten	84
Tab. 26: Auswertung der Perilipin 3-, 4- und 5-Immunhistochemie im nicht tumorösen Leberparenchym von HCA-Patienten und Vergleich zu FNH- und HCC-Patienten	86
Tab. 27: Kryoasservierte Leberproben.....	89
Tab. 28: IHCA- und HHCA-Charakteristika in der MRT-Untersuchung	124
Tab. 29: Perilipine-Nomenklatur.....	124
Tab. 30: Klinische Daten des HCA-Kollektivs.....	125
Tab. 31: Erstdiagnose und radiologische Diagnose bei Lebertumoren des Mainzer Kollektivs	126

Tab. 32: Ki67-Proliferationsrate in HCAs im Vergleich zu FNHs und HCCs.....	127
Tab. 33: Steatosegrade in HCAs im Vergleich zu FNHs und HCCs	127
Tab. 34: Steatosegrade des nicht-tumorösen Leberparenchyms der HCA-Patienten im Vergleich zu den FNH- und HCC-Patienten	128

1 Einleitung

Hepatozelluläre Adenome (HCA) sind seltene benigne Neoplasien der Leber, die maligne entarten oder zu einem akuten Abdomen bzw. Schockgeschehen aufgrund von Einblutungen führen können (1-5). HCAs treten typischerweise im gesunden Leberparenchym auf (6, 7). In Deutschland liegt die Prävalenz dieser Tumoren bei 0,05 % (3). HCAs werden entsprechend der Bordeaux-Klassifikation (1, 2, 8) in mehrere Subtypen eingeteilt: *HNF1A*-inaktiviertes HCA (HHCA), β -Catenin-aktiviertes HCA (BHCA) und inflammatorisch-telangiektatisches HCA (IHCA). Vor kurzem wurde das *Sonic*-Hedgehog-mutierte HCA (shHCA) als neuer Subtyp identifiziert (9, 10). Unter 10 % der HCAs bleiben unklassifizierbar (UHCA, unklassifizierbares HCA). Die verschiedenen Subtypen zeigen unterschiedliche Komplikationsrisikoprofile (1, 2, 9). β -Catenin-aktivierte HCAs können in hepatozelluläre Karzinomen (HCC) übergehen (11-14). Um das Entartungsrisiko besser erfassen zu können, wurde in den letzten Jahren eine Verfeinerung der HCA-Klassifikation angestrebt (15, 16). Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass Tumorzellen von unterschiedlichen Ursprungsgeweben wie Darm, Haut und Leber häufig mehr Lipidtropfen, dementsprechend auch mehr Lipidtropfen-assoziierte Proteine, als Zellen des respektiven Normalgewebe aufweisen (17, 18), was als Ausdruck eines veränderten Stoffwechsels gewertet wurde. Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit der Untersuchung von Lipidtropfen sowie Lipidtropfen-assoziierten Proteinen in den unterschiedlichen HCA-Subtypen sowie im respektiven gesunden Leberparenchym. Dabei soll ein Beitrag geleistet werden, die zugrundeliegenden pathologischen Mechanismen der HCA-Entstehung bzw. deren Entartung zu ergründen, und damit zu der Entwicklung von weiteren Präventions- und diagnostischen Möglichkeiten sowie Therapieansätzen beizutragen.

2 Literaturdiskussion

2.1 Die normale Leber

2.1.1 Aufbau der Leber

Die Leber ist das größte parenchymatöse Organ des Menschen. Anatomisch wird die Leber in zwei große Leberlappen, nämlich den *Lobus dexter* und *Lobus sinister* sowie in zwei kleinere Leberlappen, den *Lobus caudatus* und den *Lobus quadratus* unterteilt. Die Leber wird auf funktioneller Ebene in acht Segmente gegliedert: es sind Einheiten, die jeweils von einem Ast der Pfortader und der *Arteria hepatica propria* versorgt werden und die Galle in einen Gallengangast ausschütten. Histologisch ist das Leberparenchym in Leberläppchen organisiert. Im Zentrum des Leberläppchens liegt die Zentralvene, und in der Peripherie zwischen den Läppchen liegen die Portalfelder. Das sauerstoffreiche Blut der *Arteria hepatica propria* (*Arteria interlobularis*) sowie das nährstoffreiche Blut der *Vena portae hepatis* (*Vena interlobularis*, Portalvene) kommen im Bereich der Portalfelder an und fließen Richtung Zentralvene, wo sie immer mehr Abbauprodukte enthalten. Der Gallenfluß erfolgt in entgegengesetzter Richtung.

Die Leberläppchen bestehen aus Hepatozytenbalken, die maximal zwei Zellreihen breit sind, und den dazwischenliegenden fenestrierten Sinusoiden. Zwischen den Sinusoiden und der basolateralen Seite der Hepatozyten befindet sich der Disse-Raum, der Blutplasma enthält. An der apikalen Seite der Hepatozyten befinden sich die Gallenkanalikululi (*canaliculi biliferi*). Die verschiedenen Zelltypen der Leber tragen gemeinsam zu den unterschiedlichen Leberfunktionen bei. Die metabolischen Hauptfunktionen der Leber werden von den Hepatozyten erfüllt (19, 20), Epithelien, die etwa 80 % des Leberparenchyms ausmachen. Die Cholangiozyten sind die zweithäufigsten epithelialen Zellen der Leber. Sie bilden das Epithel der Gallengänge und helfen somit die Galle abzuleiten. Die leberspezifischen Ito Zellen (auch Sternzellen oder englisch: *hepatic stellate cells*, HSC) speichern im Ruhezustand Lipide und Vitamin A, und können sich bei Leberparenchym-Schädigungen in Myofibroblasten verwandeln, proliferieren und Bindegewebe synthetisieren. Die Kupfferzellen sind leberspezifische Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems. Ito Zellen und Fortsätze der Kupfferzellen befinden sich im sogenannten Disse-Raum.

2.1.2 Funktion der Leber

Die Leber spielt bei zahlreichen physiologischen Prozessen eine zentrale Rolle. Sie ist an biosynthetischen (Produktion von Serumproteinen wie Albumine und Gerinnungsfaktoren) und biotransformatorischen Prozessen (Abbau von Fremdstoffen wie Medikamenten z.B.) beteiligt. Die Leber hat zudem eine Speicherfunktion für Triglyceride (TAG), Glykogen und Vitamine (20). Darüber hinaus ist die Kontrolle des Energiehaushalts eine zentrale Leberfunktion: Fettsäuren, Kohlenhydraten und Aminosäuren werden in der Leber verstoffwechselt. Dabei finden in der Leber sowohl anabole als auch katabole Stoffwechselvorgänge statt. In Abhängigkeit von der Insulin- Konzentration und vom metabolischen Status kann Glykolyse, Gluconeogenese und Glykogen-Speicherung zunehmen. Nach den weißen Adipozyten besitzen die Hepatozyten die größte Kapazität, Fett zu speichern, und so hat die Leber auch eine Schlüsselfunktion im Fettmetabolismus (19).

Die Galle-Synthese und -Sekretion ermöglicht im Rahmen der Verdauung von Nahrung eine effiziente Aufnahme von Lipiden. Chylomikronen dienen dabei dem Transport von Triglyceriden, Phospholipiden und Cholesterin aus dem Dünndarm in die Leber. In der Leber bauen Lipoproteinlipase TAGs zu freien Fettsäuren und Glycerin ab. Die Leber ist in der Lage, die Fettsäuren als interne Energiequelle zu benutzen oder diese als Energiequelle für andere Organe in Form von Ketonkörpern zur Verfügung zu stellen. Nach dem Essen stellt die Leber Fettsubstrate für den Organismus her, indem sie Triglyceride durch die Veresterung von freien Fettsäuren mit Glycerin synthetisiert, die dann in den Blutstrom sezerniert werden und in Fettgewebe gespeichert oder als Energiequelle von den Muskelzellen verstoffwechselt werden (19-21). Zudem werden bei erhöhter Nährstoffexposition neben Glykogen v. a. Neutralfette in der Leber gespeichert (21).

2.2 Lebererkrankungen

Lebererkrankungen sind weltweit ein immenses Gesundheitsproblem. Pro Jahr sterben über 2 Millionen Menschen an den Folgen einer Leberzirrhose, einer viralen Hepatitis oder eines Lebertumors (22).

2.2.1 Genetische Lebererkrankungen

Die Leber ist bei unterschiedlichen genetischen Erkrankungen mit systemischer bzw. Multiorganbeteiligung involviert. Nachstehend werden zwei genetische Erkrankungen, die mit einem gehäuften Auftreten von Hepatozellulären Adenomen assoziiert sind, genauer beschrieben.

Diabetes Typ 3, auch MODY3-Diabetes (englisch: maturity-onset diabetes of the young type 3) genannt, ist bei Erwachsenen die häufigste monogenetische Form eines Diabetes (23, 24). Es handelt sich um eine autosomal dominante Erkrankung mit einer Mutation in *HNF1A* (*hepatocyte nuclear factor 1alpha*) (24, 25), die eine B-Zell-Dysfunktion des Pankreas sowie eine defekte renale tubuläre Glukose-Wiederaufnahme als Konsequenz hat (26-28), und zu einem Diabetes, i. d. R vor dem Alter von 25 Jahren, führt (24, 25). Über 400 Mutationen in kodierenden oder nicht kodierenden, regulatorischen Regionen des *HNF1A*-Gens, die zu MODY3-Diabetes führen, sind identifiziert worden (29). Für die Entstehung einer Leberadenomatose sind biallelische Mutationen des *HNF1A*-Gens erforderlich. Diese treten entweder als Keimbahn- und somatische Mutation oder als zwei unabhängige somatische Mutationen auf (2, 30). *HNF1A* erfüllt hier die Kriterien eines Tumorsuppressorgens. Bei Patienten mit biallelischer *HNF1A*-Mutation kommen solitäre Adenome sehr selten vor (6). In einer französischen Kohorte entwickelten 6,5 % der Patienten mit MODY3-Diabetes eine Leberadenomatose (23). Diese Patienten hatten am häufigsten trunkierende Mutationen oder Mutationen im Gly292fs Hotspot (23). Das Auftreten der Leberadenome sowie die einhergehende Symptomatik sind bei Patienten mit biallelischer *HNF1A*-Mutation jedoch sehr uneinheitlich (23, 25), und es konnte keine Korrelation zwischen der Mutation und dem Phänotyp der Leberadenomatose wie der Anzahl und Größe der Herde oder histologischen Eigenschaften, wie *Steatosis hepatis* oder *Peliosis* gefunden werden (23).

Eine Glykogenspeicherkrankheit (englisch: *glycogen storage disease*, GSD) Typ I ist eine autosomal rezessive Erkrankung mit Defekten des Glucose-6-phosphatase (G6Pase) -Komplexes (31-33). Der G6Pase-Komplex hat eine Schlüsselfunktion in der Glycogenolyse und Gluconeogenese, indem er Glucose-6-Phosphat zu Glucose hydrolysiert (32, 33). Die Mutation der Glucose-6-Phosphatase- α (*G6PC*-Gen) bei der GSD Typ Ia und des Glucose-6-phosphat-Transporters (*G6PT*-Gen) bei der GSD

Typ Ib führen zur Glycogen-Akkumulation in unterschiedlichen Organen, v.a. in der Leber (31-33). Zusammenhänge zwischen dem *G6PT*- und dem *HNF1A*-Gen konnten im Mausmodell gezeigt werden. In *HNF1A*^{-/-} Mäuse wird die mRNA-Menge von *G6PT* vermindert, wohingegen die mRNA von *G6PT* in *HNF1A*^{+/+} Mäuse verstärkt exprimiert wird (34). Dies deutet darauf hin, dass *HNF1A* für die Transkription des *G6PT*-Gens erforderlich ist (34). Bei Patienten mit Glykogenspeicherkrankheit treten Hepatozelluläre Adenome mit einer Prävalenz von 80 % auf und bilden einen der wichtigsten Morbiditätsfaktoren (32). Bei Glykogenspeicherkrankheit treten häufig multiple HCA-Herde auf, und betreffen epidemiologisch gesehen oft junge männliche Patienten (31, 35). GSD-assoziierte HCA weisen ein bestimmtes Subtyp-Profil auf: in der Mehrheit der Fälle (52 %) handelt es sich um IHCA; zudem kommen BHCA gehäuft vor, und machen bis zu 28 % der Fälle aus (31). Dagegen wurden keine HHCA-Fälle beschrieben (31). Bemerkenswert ist, dass HCAs von den Patienten mit GSD-Erkrankung immer Lipidtropfen aufweisen (31), was klassischerweise als histologisches Merkmal der HHCA angesehen wird.

2.2.2 Metabolische Lebererkrankungen

Metabolische Lebererkrankungen werden am häufigsten durch Ernährungs- und Lebensstilfaktoren bedingt. Insbesondere sind Alkoholabusus, Diabetes und das metabolische Syndrom gut bekannte Risikofaktoren (36-39). Genetische Faktoren wie bei der GSD sind demgegenüber selten.

Bei der *Steatosis hepatis* findet eine reversible intrazelluläre Fetteinlagerung in Lipidtropfen ohne Entzündungszeichen statt (20). Die *Steatosis hepatis* wird als Krankheit mit einem aberranten Lipidtropfengehalt von ≥ 5 % bezogen auf die Parenchymfläche definiert und verläuft in der Regel subklinisch. Wenn über 50 % der Hepatozyten verfettet sind, spricht man von einer Fettleber (20). Die *Steatosis hepatis* ist die häufigste Lebererkrankung der westlichen Länder mit einer Prävalenz der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (englisch: *Non Alcoholic Fatty Liver Disease*, NAFLD) in Europa von fast 24 % (38), und der alkoholischen Fettlebererkrankung (englisch: *Alcoholic Fatty Liver Disease*, AFLD) in den USA von 4,3 % (40). Die AFLD ist gekennzeichnet durch einen Alkoholkonsum von ≥ 20 g/Tag bei der Frau und ≥ 30 g/Tag beim Mann. Die NAFLD gilt als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms (41, 42): Übergewicht, Typ 2-Diabetes, Bluthochdruck, Dyslipidämie sind prädisponierende Faktoren. Die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) und die alkoholische Steatohepatitis (ASH) sind fortgeschrittenen Stadien respektiv der AFLD und NAFLD, und werden histologisch von spezifischen Läsionen gekennzeichnet: ballonierte Hepatozyten, Mallory-Denk-Körperchen, Entzündungsinfiltrate sowie perisinusoidale Fibrose (43). Eine Ballonierung von Hepatozyten ist eine besondere Form der Degeneration, die durch das Anschwellen der Zellen sowie ein flockiges Zytoplasma charakterisiert ist, und initial in Zone 3 vorkommt. NASH und ASH können

entweder klinisch inapparent verlaufen oder Symptome wie Oberbauchmerzen oder Ikterus verursachen. Die Unterscheidung zwischen bänder *Steatosis hepatis* und NASH/ASH ist nur histologisch durch eine Leberbiopsie zu gewährleisten (42). Patienten mit einfacher *Steatosis hepatis* weisen keine erhöhte Morbiditätsrate auf (44). Hingegen haben ASH- und NASH-Patienten eine im Vergleich zur restlichen Bevölkerung reduzierte Lebenserwartung (45).

2.2.3 Leberzirrhose

Chronische Leberschädigungen führen zu einer Aktivierung von HSCs, die eine Kollagenmatrix als Ersatz des zerstörten Leberparenchyms bilden. Dies führt letztendlich zur Entstehung einer Leberfibrose bis hin zum Endstadium einer Leberzirrhose und Zerstörung der Leberarchitektur (19, 20, 46). Ein fibrotischer Umbau ist ein dynamischer Prozess, der in frühen Stadien noch reversibel ist (47). Dagegen ist die Leberzirrhose irreversibel (47). Der Prozess kann sich, je nach Patienten und Ätiologie innerhalb von wenigen Monaten aber auch erst nach Jahren entwickeln. Die häufigsten Ursachen einer Leberfibrose sind virale Hepatitiden, eine ASH und NASH (47), von denen 10 bis 20 % innerhalb von 10 bis 20 Jahren eine Zirrhose entwickeln (48, 49). Die schwersten Komplikationen der Leberzirrhose sind Leberversagen, portale Hypertonie mit Aszites, Ösophagusvarizen und HCC-Entstehung. Die Leberzirrhose ist der Hauptrisikofaktor für die Entstehung von HCCs und weltweit für 80 % der HCCs verantwortlich (50).

2.2.4 Lebertumoren und Tumor-artige Läsionen

In der Leber kommen neben lebereigenen Tumoren häufig auch Metastasen anderer Primarien vor. Unter den primären Lebertumoren sind maligne epitheliale Neoplasien, wie das HCC sowie das intrahepatische Cholangiokarzinom (iCCA) am häufigsten. Weltweit machte 2018 das HCC 80 %, und das iCCA 14,9 % der lebereigenen Tumoren aus (51). Andere Tumorentitäten, wie vaskuläre und mesenchymale Neoplasien sowie auch benigne epitheliale Neoplasien bzw. Hyperplasien kommen nur selten vor, und machen zusammen ungefähr 5 % der primären Lebertumoren aus.

2.2.4.1 Fokale Noduläre Hyperplasie

Die Fokale Noduläre Hyperplasie (FNH) ist mit einer Prävalenz von 0,4–3 % in den Industrieländern der häufigste benigne epitheliale Lebertumor (52). Eine FNH ist keine Neoplasie, sondern eine lokale Hyperplasie auf eine vaskuläre Abnormalität, die zu einer lokalen Hypoperfusion bzw. Hypoxie führt (53, 54). Bei FNH-Patienten können weitere vaskuläre Malformationen oder Neoplasien auftreten, wie Hämangiome (55). Patienten mit weiteren assoziierten vaskulären Malformationen oder Neoplasien weisen in den meisten Fällen multiple FNH-Herde auf (55). Zu 66-80 % kommen FNHs solitär vor (3, 56). FNHs treten in gesundem Leberparenchym auf (3, 56). Frauen sind mit 90 % deutlich häufiger betroffen als Männer (3). Die meisten FNHs werden zwischen dem 35. und 50. Lebensjahr diagnostiziert (3, 55, 56). Eine Assoziation mit der Einnahme von oralen Kontrazeptiva oder einer Schwangerschaft wird diskutiert, ist jedoch aktuell nicht ausreichend belegt (57). Typischerweise sind FNHs Zufallsdiagnosen bei asymptomatischen Patienten (3, 52) und verursachen i.d.R. keine Lebervergrößerung (3, 52). Nur sehr selten können große Läsionen abdominelle Schmerzen bei Kompression anderer Organe verursachen (3, 52). Die FNH-Diagnose lässt sich mit dynamischer Bildgebung sichern. Dabei wird zur Diagnosesicherung empfohlen, eine MRT-Untersuchung durchzuführen (3, 56). Eine Histologie wird nur in unklaren Fällen durchgeführt, zur Abgrenzung von einem HCA oder HCC (3, 56). Klinisch verläuft eine FNH meist ohne nennenswerte Komplikationen (3, 52, 58). FNHs besitzen nach heutigem Verständnis kein Potential zur Entartung (3, 58). Des Weiteren besteht nur eine sehr geringe Gefahr der Ruptur oder Einblutung (3, 58). Bei eindeutiger, bildgebender Diagnostik wird daher bei asymptomatischen Patienten ein strikt konservatives Vorgehen empfohlen (3, 57).

2.2.4.2 Hepatozelluläres Adenom

In Deutschland ist das HCA der dritthäufigste benigne Lebertumor nach dem Leberhämangiom und der FNH (3). Die aktuelle HCA-Klassifizierung (WHO-Klassifikation, fünfte Ausgabe, 2019, 59) beruht auf einer retrospektiven multizentrischen Studie von Zucman-Rossi und Koautoren (2), die 2006 vier Hauptkategorien identifizierten. 2007 wurden von Bioulac-Sage und Koautoren (8) immunhistochemische und molekularpathologische Marker, die der Diagnose dieser Subtypen dienen, identifiziert. 2017 wurde diese Klassifikation um einen weiteren Subtyp, das *Sonic-Hedgehog*-mutierte HCA (shHCA) erweitert (9). Für jeden Subtyp bestehen spezifische morphologische, immunhistochemische und molekularpathologische Charakteristika (2, 8; Tab. 1).

10 % der chirurgisch resezierten HCAs sind mit genetischen Erkrankungen (siehe Abschnitt 2.2.1) assoziiert (1, 2, 23, 32). Die Mehrheit der HCAs wird von Umweltfaktoren begünstigt, so treten in über 85 % der Fälle HCAs bei Frauen im gebärfähigen Alter auf (2, 3, 6, 60-63). Bei nachgewiesener Hormonsensibilität des Tumors ist die Einnahme von oralen Kontrazeptiva seit langem ein gut etablierter begünstigender Faktor für die HCA-Entstehung (1, 2, 60, 61, 62). Aktuell haben orale Kontrazeptiva eine 2-5fache bzw. 5-10fache niedrigere Östrogen- bzw. Progesteron-Konzentration im Vergleich zu ihrer Einführung in den 1960er Jahren (64). Damit wäre eine Abnahme der HCA-Inzidenz zu erwarten; jedoch nahm in den letzten Jahrzehnten die Zahl der resezierten Fälle sogar zu (65). Parallel dazu ist die Inzidenz übergewichtiger HCA-Patienten gestiegen. Bioulac-Sage und Koautoren (65) fanden in ihrer Kohorte, dass zwischen 1990 und 2000 14,2 %, zwischen 2001 und 2011 38,1 % der HCA-Patienten einen BMI > 25 aufwiesen. In den USA fanden Bunchorntavakul und Koautoren (61), dass zwischen 2005 und 2010 73 % der HCA-Patienten einen BMI > 25 hatten. In dieser Patienten-Gruppe zeigten zudem 55 % der Patienten einen BMI > 30 (61). Adipositas war dabei mit dem Vorkommen multipler HCAs assoziiert (61). Das Körpergewicht der Patienten beeinflusste auch den Krankheitsverlauf. Bei den Patienten, die initial konservativ behandelt wurden, wurde eine Größenzunahme der Läsionen lediglich in adipösen Patienten festgestellt (61). Männliches Geschlecht sowie Einnahme Androgen-haltiger Präparate begünstigte spezifisch die Entstehung Exon 3 *CTNMB1*-mutierter B(I)HCAs (66). Das männliche Geschlecht stellt darüber hinaus einen Risikofaktor für eine maligne Entartung dar. In einer dänischen Studie von Bossen und Koautoren (67) lag das 10-Jahres-Risiko für eine HCC-Transformation bei Männern mit histologisch gesichertem HCA bei 60 %.

Auch HCAs werden in 33,6 % (1) bis 60 % (61) der Fälle zufällig durch bildgebende Verfahren entdeckt. Allerdings können sie, im Gegensatz zu anderen benignen Leberläsionen häufiger mit unspezifischen abdominellen Beschwerden symptomatisch werden (1, 3, 61). Einblutungen können zur Entstehung eines akuten Abdomens führen (1, 61). Ein Viertel der HCA-Patienten zeigen abdominelle Beschwerden

auch ohne nachweisbare Einblutungen (1). Sehr selten werden HCAs durch eine spürbare Lebermasse entdeckt (1). HCAs können in seltenen Fällen zu einer Erhöhung der Leberwerte, sowohl der Transaminasen als auch der Cholestase-Parameter führen (1). *Alpha-Fetoproteins* (AFP)-Spiegel liegen in der Regel im Normbereich, ebenfalls bei BHCAs (68). Bei IHCAs kann es zu einer Erhöhung von CRP-Serumwerten kommen (3, 8). Bildgebende Verfahren stellen den ersten Schritt zur Diagnosesicherung dar. Die eigentliche Diagnose eines HCAs und dessen Subtyps kann eine Herausforderung darstellen, da HCAs unterschiedliche Erscheinungsbilder im CT und MRT haben können (69-71). Kontrastmittelverstärkte MRT-Untersuchungen haben hierbei den Vorteil, dass sie die meisten HHCAs und IHCAs anhand ihres typischen Musters (Anhang, Tab. 28) identifizieren können (70-71). Dennoch weisen BHCAs und UHCAs kein spezifisches Muster in den MRT-Untersuchungen auf (69-71).

Maligne Entartung und Einblutungen sind zwei Hauptkomplikationen bei HCAs. Das systematische Review von Stoot und Koautoren (11) mit der Untersuchung von 1600 HCA-Herden zeigte, dass die maligne Transformation eines HCA zu einem HCC in etwa 4,2 % der Läsionen, Adenomatose-Fälle ausgenommen, vorkommt. B(l)HCAs sind die Subtypen, die ein erhöhtes Entartungsrisiko haben. Zucman-Rossi und Koautoren (2) zeigten, dass 46 % der B(l)HCAs mit Borderline-Läsionen zwischen HCA und HCC oder bereits mit HCC-Arealen assoziiert waren. Es wird ansonsten nur über wenige und sehr seltene Fälle von anderen HCA-Subtypen, insbesondere HHCAs, mit maligner Transformation berichtet (72, 73). Die Größe der Herde spielt zusätzlich eine Rolle. Nur 4,4 % der entarteten HCAs weisen eine Größe von unter 5 cm auf (11). Häufiger vorkommend sind intratumorale Blutungen: das systematische Review von van Aalten und Koautoren (4) zeigte, dass ein Einblutungsrisiko von 27,2 % auf den einzelnen Patienten bezogen und von 15,8 % auf die einzelne Läsion bezogen besteht. Das Risiko einer HCA-Ruptur mit intraperitonealer Blutung lag bei 17,5 % bezogen auf den einzelnen Patienten (4). Des Weiteren besteht auch eine Relation zwischen der Größe der Läsion und dem Blutungsrisiko. Bei einer Läsionsgröße von ≥ 5 cm steigt das Blutungsrisiko signifikant an, wenngleich auch kleinere HCAs durchaus Einblutungen zeigen können (4, 62). Unter den unterschiedlichen Subtypen sind shHCAs signifikant mit einem gehäuften Vorkommen von Blutungen assoziiert (9, 10).

HNF1A-inaktivierte HCAs (HHCAs, 30-50 %) weisen auf genetischer Ebene eine biallelische inaktivierende Mutation des *HNF1A*-Gens auf (2, 30). *HNF1A* ist ein Transkriptionsfaktor, der vorwiegend in der Leber, jedoch auch in anderen Organen wie Pankreas, Niere und dem Gastrointestinaltrakt exprimiert wird (24). *HNF1A*-knockout Mäuse zeigen eine gesteigerte Hepatozyten-Proliferation mit Hepatomegalie (74). Die *HNF1A*-Inaktivierung führt zur Herunterregulation des nachgeschalteten *L-FABP* (*Liver-type fatty acid-binding*, auch *FABP1*)-Gens (75), die dominante Form von *FABP* in der Leber (76). Liver fatty acid-binding Proteine (*FABP*) stellen

eine Gruppe intrazellulärer lipidbindender Proteine dar, die hydrophobe Liganden wie Fett- und Gallensäure innerhalb der Zelle transportieren (76). Dementsprechend sind HHCAs morphologisch durch eine diffuse und ausgeprägte Steatose (2, 8) sowie immunhistochemisch durch eine fehlende Expression von LFABP charakterisiert, im Gegensatz zum normalen Leberparenchym, wo LFABP homogen exprimiert wird (8, 76).

CTNNB1-aktivierte HCAs (BHCAs, 5-18 %) weisen eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs auf (2). Es kommen verschiedene *CTNNB1*-Mutationen vor, die zu unterschiedlichen Aktivierungsniveaus des Wnt-Signalwegs sowie unterschiedlichen Tumorphänotypen führen (15, Tab. 3). In BHCAs werden *CTNNB1*-Zielgene überexprimiert, darunter Glutaminsynthetase (GS) und G-protein coupled receptor 49 GPR49 (2). Es existiert kein Überlappungsbereich von HHCAs und BHCAs (2). Immunhistochemisch werden BHCAs durch eine GS-Positivität und eine nukleäre Lokalisation von β -Catenin charakterisiert (8). Histologisch können BHCAs zytologische Atypien sowie ein pseudoglanduläres Wachstumsmuster zeigen (1, 2, 8).

Inflammatorisch-telangiektatische HCAs (Synonym: inflammatorische HCAs, IHCA, 30-55 %) zeigen eine Aktivierung des Interleukin-6 (IL6) oder JAK-STAT inflammatorischen Signalwegs (77). 60 % der IHCA weisen kleine Gendelektionen des Glykoproteins 130 (gp130) im Bereich der Bindungsstelle für IL6 auf, die zur Aktivierung von *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3), auch ohne Ligandbindung führen (77). Auch eine *gp130*-Aktivierung und eine *HNF1A*-Inaktivierung schließen sich gegenseitig aus (77). IHCA sind morphologisch durch dilatierte, blutgefüllte Sinusoide und Immuneinfiltrate, vorwiegend aus Lymphozyten, charakterisiert (1, 2, 8). Des Weiteren können intratumorale Blutungen sowie eine duktiläre Reaktion vorkommen (2). Immunhistochemisch sind entzündungsassoziierte Proteine wie Amyloid A (AA) und C-Reaktives-Protein (CRP) nachweisbar (1, 8).

CTNNB1-Mutationen können auch bei IHCA vorkommen (*CTNNB1*-mutierte inflammatorische HCA (BIHCA)). Zwischen 14 und 27 % der IHCA Gruppe und 7 bis 11 % der gesamten HCAs könnten dieser Subkategorie zugeordnet werden (1, 8).

Sonic-Hedgehog-mutierte HCAs (shHCA, 4 %) sind durch eine Aktivierung des Sonic-Hedgehog-Signalwegs charakterisiert (10). Es konnte gezeigt werden, dass der Arginin-Biosyntheseweg in shHCA verstärkt aktiviert wird, darunter insbesondere Argininosuccinat-Synthase 1 (ASS1) und Argininosuccinat-Lyase (ASL) (9, 10). Da Arginin als Vorläufermolekül für die Stickstoffmonoxidsynthese benötigt wird (78), führt die Arginin-Überproduktion letztendlich zu einer gesteigerten vaskulären Permeabilität und einem erhöhten Blutungsrisiko (79, 80). Immunhistochemisch zeigen diese shHCA eine diffuse Überexpression von ASS1 im Vergleich zum

angrenzenden Leberparenchym, bei dem ASS1 periportal und in Septen exprimiert wird und ein Bienenwaben-artiges Expressionsmuster zeigt (9). Morphologisch sind shHCAs durch dilatierte Sinusoide und Einblutungen charakterisiert (9). Die ASS1-Expression scheint nicht Subtyp spezifisch zu sein. Bis zu 45 % der IHCAs, bevorzugt Läsionen mit Blutungen oder massiver Blutstauung, sind ASS1 positiv (9). Des Weiteren ist die ASS1-Expression nicht immer mit einer nachweisbaren *Sonic-Hedgehog*-Mutation korreliert (9).

Letztlich können anhand der oben aufgeführten morphologischen, immunhistochemischen und molekularpathologischen Merkmale einige HCAs nicht kategorisiert werden, die dann als unklassifizierbare HCAs (UHCAs, < 10 %) eingestuft werden.

Tab. 1: Merkmale der HCA-Subtypen

Subtyp	Histomorphologie	Immunhistochemie	Molekularpathologie
HHCA	Diffuse und ausgeprägte Steatose	Ausfall von L-FABP	Inaktivierende Mutationen des <i>HNFL1A</i> -Gens
BHCA	Zytologische Atypien Pseudoglanduläres Muster	GS-Positivität* Nukleäre Anfärbung für β -Catenin	Aktivierende Mutationen des <i>CTNNB1</i> -Gens
IHCA	Ektatische Sinusoide Immunzellinfiltrate Duktuläre Reaktion	CRP- und/oder AA-Positivität	Aktivierung des Interleukin-6 (IL-6) oder JAK-STAT-Signalwegs
shHCA	Ektatische Sinusoide Blutungen	ASS1-Überexpression	Aktivierung des Sonic-Hedgehog-Signalwegs
UHCA	Keine	Keine	Keine

CRP: C-Reaktives Protein; GS: Glutaminsynthetase; ASS1: Argininosuccinat-Synthase 1; L-FABP: *Liver-type fatty acid-binding protein*. *je nach *CTNNB1*-Mutation unterschiedliche Muster, dazu siehe Tab. 3.

Hepatozelluläre Adenomatosen wurde 1985 von Flejou und Koautoren zum ersten Mal beschrieben (81). Es wurde initial vermutet, dass Risikofaktoren und zugrundeliegende pathophysiologische Mechanismen bei Adenomatose-Patienten sich von denen der anderen HCA-Patienten unterscheiden (81, 82). Aktuell wird die Leberadenomatose nicht mehr als eigenständige Entität im Sinne von differierenden pathophysiologischen Mechanismen spezieller Patienten-Gruppen angesehen (83). Es wird angenommen, dass alle Subtypen und Ätiologien solitäre oder multiple Adenome verursachen können (1). Bei 10 oder mehr Läsionen spricht man von Adenomatose; demnach ist heutzutage die Adenomatose eine rein numerische Definition (81, 83).

Das diagnostische und therapeutische Vorgehen ist abhängig vom HCA-Subtyp (Abb. 1).

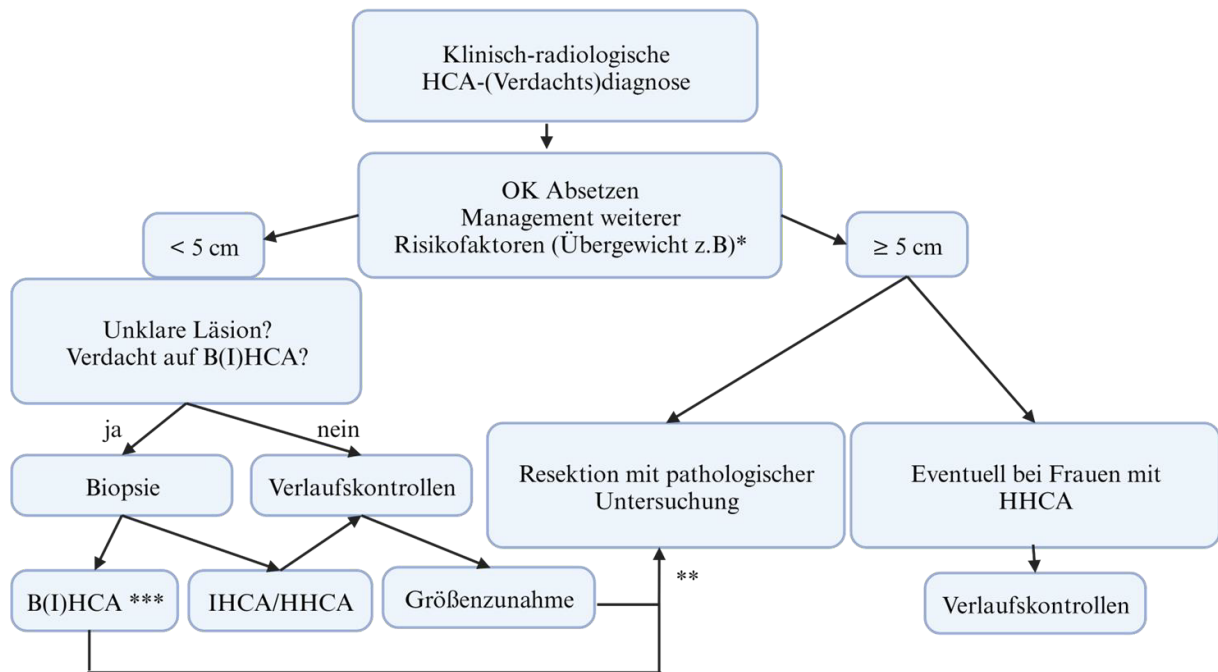


Abb. 1: Diagnostisches und therapeutisches Verhalten bei HCAs. Abb. erstellt mit BioRender.com. *Die Größe der Tumoren ist dann im Verlauf häufig regredient (1, 84). **Die Lage des HCAs, der Allgemeinzustand des Patienten und die Leberfunktion werden ebenfalls in Betracht gezogen (83, 57). ***B(I)HCAs sollen wie HCCs behandelt werden (1).

2.2.4.3 Hepatozelluläres Karzinom

Im Jahr 2020 stellen HCCs mit 905.700 Neuerkrankungen die sechshäufigste Tumorerkrankung und mit 830.200 Fällen die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache weltweit dar (85). In Europa lag die alterstandardisierte Inzidenzrate im Jahr 2020 bei 6,7 (Männer) bzw. 2,6 (Frauen) pro 100.000 Einwohnern (85). Chronische HBV- und HCV-Infektionen sind weltweit die bedeutendsten exogenen Risikofaktoren (86, 87). Weitere Risikofaktoren sind Nikotinabusus und der Verzehr von Aflatoxin-haltigen Nahrungsmitteln (88). Daneben gewinnen Alkoholabusus sowie NAFLD immer mehr an Bedeutung (86, 88). Endogene Risikofaktoren sind hohes Alter, männliches Geschlecht sowie Ethnizität (86). In den westlichen/europäischen Ländern sind derzeit HCV-Infektion und Alkoholkonsum im Rahmen einer ASH und/oder Leberzirrhose die bedeutendsten Risikofaktoren für ein HCC (89).

HCCs ohne Leberzirrhose sind oft ein Zufallsbefund, denn HCCs sind lange symptomarm und weisen unspezifische Symptome wie Schmerzen im rechten Oberbauch, Gewichtsverlust, Hepatosplenomegalie, Ikterus und Aszites auf. Die S3 Leitlinie von 2021 (90) erklärt die histologische Sicherung vor dem Ergreifen von therapeutischen Maßnahmen in bestimmten Situationen als erforderlich: vor allem in der nicht-zirrhatischen Leber und bei unklarem Kontrastmittelverhalten in zwei unabhängigen Bildgebungen.

Auf genetischer Ebene wurden zahlreiche Mutationen bzw. Änderungen von Chromosomenstrukturen bei HCCs identifiziert (91). So konnten bis zu 121 Mutationen beschrieben werden (92). Unterschiedliche Ätiologien beeinflussen dabei das genetische Profil des Tumors (93). Mutationen im *CTNNB1*-Gen (94, 95), im *TERT* (telomerase reverse transkriptase) Promotor (96) und des Tumor Proteins 53 (TP53) (97, 98) sind drei der häufigsten Mutationen in HCCs (59, 91).

2.2.4.4 Differentialdiagnosen

Der klinische Hintergrund spielt bei der Diagnoseeinschätzung eine wichtige Rolle. Während HCAs und FNHs präferenziell bei Frauen im reproduktiven Alter in nicht-zirrhosischem Leberparenchym auftreten, kommen HCCs bevorzugt bei älteren männlichen Patienten vor, die bereits an einer Lebererkrankung wie beispielsweise einer Leberzirrhose leiden. Die histopathologische Untersuchung gegebenenfalls mit ergänzenden immunhistochemischen Färbungen spielt bei der Diagnostik dieser Lebertumoren eine wichtige Rolle (Tab. 2).

Tab. 2: Differentialdiagnose von HCAs

Tumorentität	HCA	FNH	HCC
Art der Läsion	Benigne Neoplasie	Lokale Hyperplasie	Maligne Neoplasie
Makroskopie	I. d. R. nicht bekapselt, z.T. schwierig abzugrenzen Hellbraune bis braune Schnittfläche Weiche Läsionen	Gut umschrieben, nicht bekapselt, potentiell multinodulär Häufig hellere Verfärbung als das anliegende Parenchym Zentrale Narbe, von der fibröse Septen zur Peripherie ziehen	Gut umschrieben, häufig eine (pseudo-) Kapsel Hellbraune, gelbliche oder grünliche Läsionen
Architektur	Aufgehobene Läppchenarchitektur mit erhaltenem Retikulinfaserskelett	Aufgehobene Läppchenarchitektur mit erhaltenem Retikulinfaserskelett und Portalfeldern	Aufgehobene Läppchenarchitektur mit verbreiteten Trabekeln und Verlust des Retikulinfaserskeletts
Histologie	Große, dünnwandige peripher gelegene aberrante Arteriolen Je nach Subtyp weitere Merkmale (Tab. 1.)	In den Septen proliferierte Gallenductuli* Zahlreiche dystrophe arterielle Gefäße Lymphozytäres Entzündungsinfiltrat	Vermehrte Vaskularisation mit aberranten Arteriolen Gallepigment intrazytoplasmatische Einschlüsse: Mallory Denk-Körperchen und „Pale Bodies“
Atypien	Atypiefreie Hepatozyten (mögliche Atypien bei B(I)HCAs)	Atypiefreie Hepatozyten**	Atypische Hepatozyten
Immunhistochemie	Je nach Subtyp unterschiedliche Expressionsprofile (Tab. 1)	Typisches landkartenartiges GS- Muster	Potentielle Positivität für GPC3, Hsp70 und GS***
Ki67-Proliferationsrate	I.d.R. < 2 %	< 2 %	I.d.R. >10 %

*bei ca. 20 % aller FNHs ist die dukuläre Reaktion das einzige vorhandene Merkmal (52). **Darüber hinaus können die Hepatozyten in der Minderheit der FNHs milde zytologische Atypien aufweisen (52). ***Antikörper gegen Glypican 3 (GPC3), Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) und Glutaminsynthetase (GS) helfen bei der Unterscheidung hochdifferenzierter HCC gegenüber dysplastischen Knoten oder gutartigen Leberläsionen. Anhand dieses 3-Marker-Panels – bei Positivität von mindestens 2 von 3 Markern, wird für die Biopsie eine Spezifität von 100 % und eine Sensitivität von 50 % angegeben (99).

2.2.4.5 β -Catenin in Lebertumoren und Tumor-artigen Läsionen

In normalen Zellen spielt β -Catenin als Strukturprotein eine zentrale Rolle bei Zell-Zell-Verbindungen. β -Catenin als Adherens Junctions-Plaueprotein verknüpft hierbei Transmembranproteine der Cadherin-Familie wie E-Cadherin mit dem Aktin-Zytoskelett (100). Des Weiteren ist β -Catenin ein wesentlicher nachgeschalteter Effektor des Wnt-Signalwegs, und erfüllt als Signalmolekül Schlüsselfunktionen in der Leber, indem es sowohl physiologische als auch pathologische Prozesse beeinflusst (101, 102).

Physiologisch wird die Wnt- β -Catenin-Signalkaskade (Abb. 2) durch Wnt mit seinen Coaktivatoren, die R-Spondins (RSpo), die an Frizzeld bzw. leucine-rich repeat containing G-protein-coupled receptor4/5 (LGR4/5) binden, aktiviert (102). In Abwesenheit von an die Rezeptoren gebundenen Wnt-Liganden und seinen Coaktivatoren wird β -Catenin durch einen Komplex bestehend aus Adenomatous Polyposis Coli (APC), AXIN und Kinasen phosphoryliert und anschließend degradiert. Das Paradigma ist, dass in diesem Komplex β -Catenin durch die Casein Kinase 1 (CK1) an Serine 45 phosphoryliert wird. Diese erste Phosphorylierung ermöglicht weitere Phosphorylierungen an den Serinen 33, 37, 41 durch die Glykogensynthase Kinase 3 (GSK3). Die Beta-Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase (β -TrCP) erkennt die phosphorylierte DSGIHS-Box, und ubiquitiniert β -Catenin, was schließlich zu dessen proteosomaler Degradation führt. Binden hingegen Wnt/R-Sponsin ihre Rezeptoren, führt dies zu einer Rekrutierung von AXIN an den Rezeptorkomplex. Der Degradierungskomplex kann nicht mehr gebildet werden, β -Catenin transloziert in den Zellkern und aktiviert als Cofaktor der Transkriptionsfaktoren Lymphoid Enhancer Factor (LEF) und T-Cell Factor (TCF) die Transkription von Zielgenen (102).

Bereits bei der Organogenese nimmt β -Catenin eine Schlüsselrolle bei der Leberentwicklung ein (103). Später trägt β -Catenin zur Homöostase der Leber sowie zu regenerativen Prozessen des Leberparenchyms bei (104). Im Mausmodell führt eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs zu einer Größenzunahme der Leber, einer effizienteren Leberparenchymregeneration und ektopen Expression von Zielgenen des Wnt-Signalwegs (104). Der Wnt- β -Signalweg ist in der Leber an der Tumorgenese unterschiedlicher Entitäten wie des Hepatoblastoms (105) oder des schlecht differenzierten Cholangiokarzinoms (106) beteiligt.

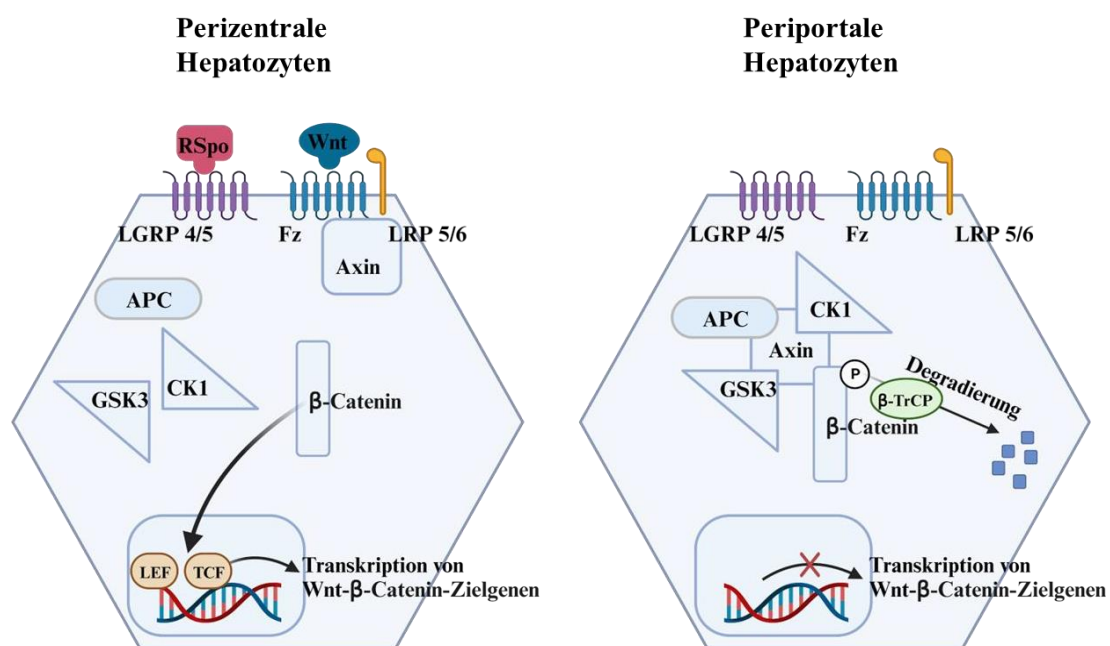


Abb. 2: Schematische Darstellung des Wnt-Signalwegs. Modifiziert nach (103) und (104). Abb. erstellt mit BioRender.com. RSpo: R-Spondin; Fz: Frizzled; LGR 4/5: leucine rich repeat containing G-protein-coupled receptor 4/5; LRP 5/6: low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6; APC: Adenomatous polyposis coli; CK1: Casein kinase 1; GSK3: glycogen synthase kinase 3; β -TrCP: beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase; TCF: T-cell factor; LEF: lymphoid enhancer factor.

Somatische Mutationen des *CTNNB1*-Gens kommen in 11-39 % der HCCs und in 10-25 % der HCAs vor (2, 107, 108). 65 % der Borderline-Läsionen zwischen HCA und HCC weisen eine *CTNNB1*-Mutation auf (15). Insgesamt konnten 217 unterschiedliche Mutationen des *CTNNB1*-Gens in HCAs und HCCs identifiziert werden (15). Die häufigsten *CTNNB1*-Mutationen kommen in den Exonen 3, 7 und 8 vor (Tab. 3). Diese Mutationen führen zu gestörter Phosphorylierung und Degradation von β -Catenin (15). Exon 7, Exon 8 und Exon 3 Mutationen schließen sich gegenseitig aus (104). Die durch die verschiedenen *CTNNB1*-Mutationen verursachten unterschiedlichen Aktivierungsniveaus des Wnt-Signalwegs konnten durch Bestimmung der mRNA-Expression von *GLUL* (*Glutaminsynthetase-Gen*) und *LGR5* (*Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5*), welche klassische β -Catenin Zielgene sind, nachgewiesen werden (15). Risiko für die HCC-Entstehung bilden in erster Linie Exon 3 Mutationen des *CTNNB1*-Gens, die zu einer starken Aktivierung des Wnt-Signalwegs führen (15).

Die prognostische Bedeutung der *CTNNB1*-Mutationen im HCC ist noch unklar. Cieply und Koautoren (109) fanden heraus, dass *CTNNB1*-mutierten HCCs größer waren sowie häufiger eine Gefäßinvasion aufwiesen. In einer Metaanalyse von Wang und Koautoren (110) wurde gezeigt, dass Patienten mit *CTNNB1*-mutierten HCCs ein längeres Überleben, weniger Lymphknotenmetastasen und besser differenzierte Tumoren aufwiesen.

Tab. 3: Merkmale von Tumoren mit *CTNNB1*-Mutationen

Aktivierungsgrad	schwach	mild	stark
Lokalisation der Mutationen (Häufigkeit in HCAs und HCCs)	S45, Exon 3 (22 %) K335, Exon 7 (11 %) N387, Exon 8 (4 %)	T41, Exon 3 (14 %)	D32-S37, Exon 3 (35 %) In frame Deletionen, Exon 3 (10 %)
Vorkommen	S45: 25 % HCA / 20 % HCC* K335 und N387: 40 % HCA / 5 % HCC	16 % HCA vs 14 % HCC	D32-S37: 9 % HCA / 48 % HCC In frame Deletionen: 5 % HCA / 6 % HCC
Immunhistochemie	S45: diffus heterogenes schwaches bis mäßig starkes GS-Muster K335 und N387: diskrete Anfärbbarkeit (z. T. nur um Gefäße)	Starkes und diffus homogenes Muster	Starkes und diffus homogenes Muster

Glutaminsynthetase (GS)-Muster werden klassischerweise in diffus homogen (> 90 % der Tumorzellen) oder diffus heterogen unterteilt (50-90 %) (15). Die Stärke der Anfärbbarkeit wird zudem auch berücksichtigt (stark/ mittel/ schwach) (15). * Im Fall einer S45-Mutation in HCC kommen in 55 % der Fälle noch "Second Hits" dazu (Verdopplung des mutierten Allels oder zweite Mutation), die auf Proteinebene und immunhistochemisch eher das Profil der stark/mild aktivierenden Mutationen aufweisen (15).

In FNHs konnte gezeigt werden, dass in perizentralen Hepatozyten wirkende Gene, darunter *GLUL* (*Glutaminsynthetase*) überexprimiert, dagegen in periportalen Hepatozyten wirkende Gene wie z.B. *ASS* (*Argininosuccinat-Synthase*) herunterreguliert werden (111). Keine aktivierende *CTNNB1*-Mutation (111, 112) oder Alterationen im Wnt-Signalweg (111) konnten gefunden werden. Auf Proteinebene zeigen FNHs ein deutlich höheres Level der aktiven, hypophosphorylierten Form von β -Catenin im Vergleich zum normalen Leberparenchym (111). In FNHs kommt es ohne aktivierende Genmutation zu einer lokalen Aktivierung des Wnt-Signalwegs.

2.3 Intrazelluläre Lipidtropfen und -assoziierte Proteine

2.3.1 Lipidtropfen

2.3.1.1 Funktion der Lipidtropfen

Lipidtropfen sind nicht speziesspezifisch, sondern im Zytoplasma von Zellen aller Wirbeltiere zu finden (113). Außer in reifen weißen Adipozyten, bei denen die Lipidtropfen physiologisch fast das ganze Zytoplasma einnehmen, besitzen die meisten Zellen regulär nur winzige Lipidtropfen, die lediglich einen geringen Anteil des Zytoplasmas ausmachen (113). Lipidtropfen wurden lange Zeit als statische Zell-Organellen angesehen. Die Identifikation von strukturellen Proteinen sowie Enzymen nach Isolierung von Lipidtropfen-Fractionen von Zellkulturen (114) und Geweben (115) brachte die Komplexität dieser dynamischen Zellorganellen ans Licht (116-118). Lipidtropfen bieten einen effektiven Schutzmechanismus vor der Lipotoxizität freier Fettsäuren (21, 119, 120). Lipidtropfen dienen als intrazelluläre Speicher für neutrale Lipide, hauptsächlich Triglyceride und Sterolester. Lipidtropfen sind eine Quelle von Substraten für Energiehaushalt und Membransynthese sowie Synthese von Signalmolekülen und Steroidhormonen (113, 119, 121). Lipidtropfen tragen zu ihrer eigenen Regulierung bei, indem sie Lipid-Liganden für nukleäre Rezeptoren wie PPAR α (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha) herstellen, der selbst die Expression von Perilipinen und somit die Homöostase von Lipidtropfen reguliert (122). Darüber hinaus sequestrieren Lipidtropfen Protein (123), wie beispielweise Transkriptionsfaktoren (124) und Chromatinkomponenten (125) im Zytoplasma. Lipidtropfen sind im Zytoplasma nicht statisch, sondern können mit weiteren Zellorganellen wie beispielweise Peroxisomen, Endosomen, dem endoplasmatischen Retikulum (126), der Plasmamembran (127, 128) und Mitochondrien (129, 130) interagieren. Selbst im Zellkern konnten Lipidtropfen lokalisiert werden (131, 132), wo sie zur Homöostase nukleärer Lipide und zur Interaktion zwischen Lipidmolekülen beitragen können (116), wobei ihre genaue Zusammensetzung und Funktion im Zellkern noch weitgehend unerforscht ist. Es gibt viele Erkrankungen wie das metabolische Syndrom und die NAFLD, die zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen dem Auf- und Abbau sowie der Speicherung von Fetten führen (133, 134).

2.3.1.2 Aufbau der Lipidtropfen

Lipidtropfen besitzen einen hydrophoben Kern, bestehend aus neutralen Lipiden (hauptsächlich TAG und Cholesterinester (CE)), der von einer amphiphilen Membran aus Phospholipiden sowie Cholesterinestern und Sphingomyelin umgeben ist (Abb.3). Dieser Monolayer dient der Solubilität der Lipidtropfen im hydrophoben Zytoplasma (119, 135). Die genaue Zusammensetzung des Lipidtropfenkerns sowie der Lipidtropfenmembran ist abhängig vom Zelltyp sowie vom metabolischen Status: z.B. prädominieren TAG im Lipidtropfenkern von weißen Adipozyten, dagegen herrschen CE in steroidbildenden Zellen für die Hormonbildung vor (136). Die Größe der Lipidtropfen variiert in unterschiedlichen Zelltypen zwischen 0,4 und 100 μm (137, 138), wobei die Größe im selben Zelltyp bzw. in derselben Zelle unter unterschiedlichen pathophysiologischen Bedingungen auch stark variieren kann (139). In der Leber treten mikrovesikuläre Lipidtropfen typischerweise bei akuten pathologischen Zuständen wie dem Reye-Syndrom oder der akuten Abstoßung auf, und betreffen vor allem die periportalen Hepatozyten der Zone 1. Dagegen kommen makrovesikuläre Lipidtropfen eher bei chronischen pathologischen Zuständen vor, die vorwiegend durch metabolische Faktoren wie Alkoholismus, Diabetes und fettreiche Ernährung bedingt sind. Dabei sind die Lipidtropfen zunächst vorwiegend in Hepatozyten in Zone 3 lokalisiert. In den Phospholipid-Monolayer der Lipidtropfen inserieren Lipidtropfen-assoziierte Proteine, die an der Lipidhomöostase beteiligt sind (113).

Über 200 Lipidtropfen-assoziierte Proteine konnten identifiziert werden (140), was auf die Komplexität ihrer Regulation der Lipidtropfen und ihre Multifunktionalität hindeutet (113, 121, 140). Im Gegensatz zu selbstreplizierenden Organellen, werden Lipidtropfen hauptsächlich *de novo* synthetisiert (119). Die Mechanismen der Lipidtropfenbiogenese wurden viel erforscht (138, 141, 142), jedoch konnten die genauen Schritte bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Laut dem vorherrschenden Modell findet die Lipidtropfen-Bildung im endoplasmatischen Retikulum statt, wo die Synthese und Akkumulation von Neutrallipiden erfolgt, und wird durch eine kritische Konzentration von intrazellulären Fettsäuren initiiert (119, 136). Wenn die akkumulierten Lipide eine bestimmte Konzentration erreicht haben, ist die Grenze der Solubilität erreicht, und infolge dessen erfolgt die zytoplasmatische Freisetzung der Lipidtropfen (143). Die die Lipidtropfen umgebende Phospholipidmembran ist von der Membran des endoplasmatischen Retikulums abgeleitet (138). Ein möglicher Mechanismus der Größenzunahme von Lipidtropfen ist also ein lateraler Transfer von Neutralfetten vom endoplasmatischen Retikulum, während die neu gebildeten Lipidtropfen noch mit dem endoplasmatischen Retikulum verbunden sind (119, 126). Ein weiterer möglicher Mechanismus ist die Fusion von mehreren kleinen mobilen Lipidtropfen (144-146).

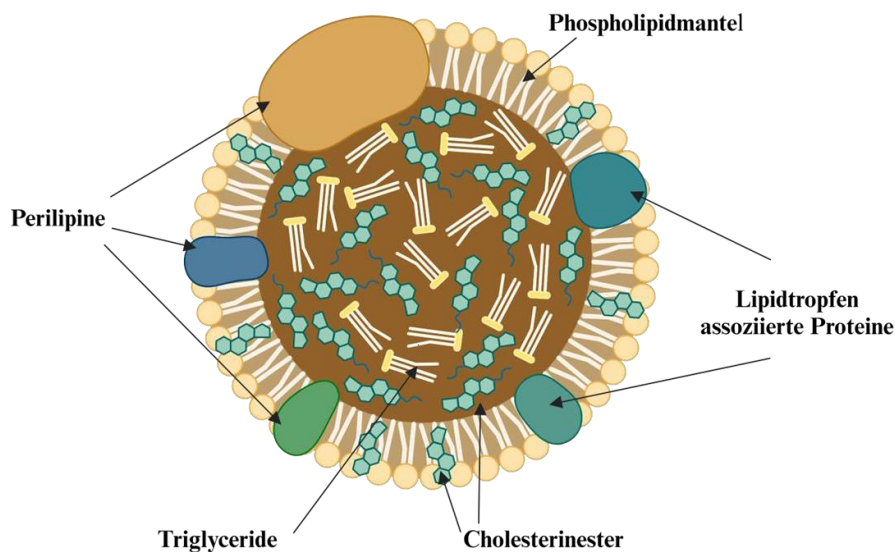


Abb. 3: Schematischer Aufbau eines Lipidtröpfchens. Modifiziert nach (111). Abb. herstellt mit BioRender.com.

2.3.2 Perilipine

Perilipine sind die quantitativ häufigsten Lipidtröpfchen-assoziierten Proteine in Säugetieren (140). Bei Säugetieren wurden bislang keine Lipidtröpfchen ohne assoziierte Perilipine identifiziert (140). Perilipine sind hochgradig konserviert, und Perilipin-ähnliche Proteine wurden sogar bei Pilzen identifiziert (113). Die alte Bezeichnung „PAT-Proteine“ steht für die Anfangsbuchstaben der drei zuerst identifizierten Proteine dieser Familie (Perilipin, Adipophilin, Tail-interacting protein of 47 kiloDaltons (TIP47)) (147, 148). Zwei weitere Proteine wurden später identifiziert und der Proteinfamilie zugeordnet: S3-12 und das oxidative PAT protein (OXPAT, MLDP) (148). Diese fünf Mitglieder besitzen zum Teil noch weitere synonyme Gen- bzw. Proteinnamen (148, 149; Anhang, Tab. 29). Nach neuer Nomenklatur werden die 5 Mitglieder der Perilipin-Familie als Perilipine 1 bis 5 bezeichnet (147). Die fünf Perilipine besitzen bei Säugetieren eine hohe Aminosäuresequenzähnlichkeit und damit ähnliche konservierte Domänen (148). Mit Ausnahme von Perilipin 4 weisen alle Perilipine eine charakteristische 100 Aminosäuren lange N-terminale PAT-Domäne auf (148, 150). Zudem haben alle Perilipine N-terminal eine amphipathische α -Helix, die durch eine 11-mer Proteinsequenz-Wiederholung gekennzeichnet ist und der Verankerung der Perilipine im Phospholipidmantel dient (140, 148).

Perilipine werden in zwei Untergruppen eingeteilt (148, 151). Perilipin 1 und 2 liegen hauptsächlich konstitutiv mit Lipidtröpfchen assoziiert vor und werden ansonsten schnell degradiert. Sie werden konstitutive PAT-Proteine (constitutive, cPAT) genannt. Perilipin 3, 4 und 5 werden zwar konstitutiv

exprimiert, bilden jedoch einen zytoplasmatischen Pool und werden erst unter bestimmten metabolischen Bedingungen an Lipidtropfen rekrutiert. Sie werden deswegen als austauschbare PAT (exchangeable, ePAT) bezeichnet (151).

Perilipine weisen eine unterschiedliche Affinität zu Lipidtropfen auf, die von den in den Lipidtropfen gespeicherten Fetten abhängig ist. Perilipin 1A (Hauptform von Perilipin 1), Perilipin 2 und 5 sind tendenziell mit TAG-reichen Lipidtropfen, Perilipin 3 und 4 präferenziell mit cholesterinreichen Lipidtropfen assoziiert (152). Des Weiteren binden Perilipin 2 und 3 an Retinsäure-haltigen Lipidtropfen in HSCs und in Retinazellen der Pigmentepithelschicht (18, 153, 154). In der Leber variiert die Zusammensetzung der Perilipine in der Membran der Lipidtropfen auch je nach Größe der Lipidtropfen, deren Lokalisation im Leberläppchen und dem Grad der Steatose (36, 37).

Auf transkriptioneller Ebene werden Perilipine hauptsächlich über die Transkriptionsfaktoren PPARs reguliert (36, 155). Es existieren mehrere PPAR-Isoformen (α , δ , γ), die analog zur Perilipin-Expression je nach Gewebe unterschiedlich exprimiert werden (156). Alle drei PPARs werden in Hepatozyten exprimiert, wobei PPAR α in der Leber die dominante Isoform und an der Regulierung der Fettsäureoxidation beteiligt ist (157). In der Leber wird die Transkription von Perilipin 2 (158) und 5 (159) durch PPAR α , die von Perilipin 1 durch PPAR α und PPAR γ (37) und die von Perilipin 4 durch PPAR γ (160) reguliert. Außerdem interagieren Perilipine mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie Sterol Regulatory Element-binding Protein (SREBP), die wiederum an der Lipidtropfengese beteiligt sind (161-163).

Die Entstehung von Lipidtropfen ist ein dynamischer Prozess, der einer sequentiellen Perilipin-Expression unterliegt (36, 37; Abb. 4), und in der Leber vergleichbar mit der Adipogenese abläuft (151). Bei akuter bzw. mikrovesikulärer Steatose in der Leber wird zunächst vorwiegend in periportal lokalisierten Hepatozyten die Expression von Perilipin 3 und Perilipin 5 induziert (36, 37). Dabei wurde gezeigt, dass Perilipin 3 an kleine naszierende Lipidtropfen rekrutiert wird und zur Fusion von kleinen Lipidtropfen beiträgt (36, 151, 164). Bei chronischen Prozessen werden Perilipin 2 und Perilipin 1 induziert. Während Perilipin 2 vorwiegend an größeren Lipidtropfen assoziiert vorkommt und ubiquitär in der Leber exprimiert wird, ist Perilipin 1 hauptsächlich perizentral lokalisiert (36, 37, 39). Perilipin 1 und Perilipin 2 können dabei kolokalisieren (37). Die Perilipin 1-, 2- und 3-positive Parenchymfläche ist im nicht neoplastischen Lebergewebe mit dem Steatosegrad positiv korreliert und scheint unabhängig von der Ätiologie der *Steatosis hepatis* zu sein (36, 37, 165, 166). Spärliche Lipidtropfen des normalen Leberparenchyms, das definitionsgemäß <5 % Verfettung aufweist, zeigen nur für Perilipin 2 und Perilipin 3 Positivität aber nicht für Perilipin 1 (37, 167).

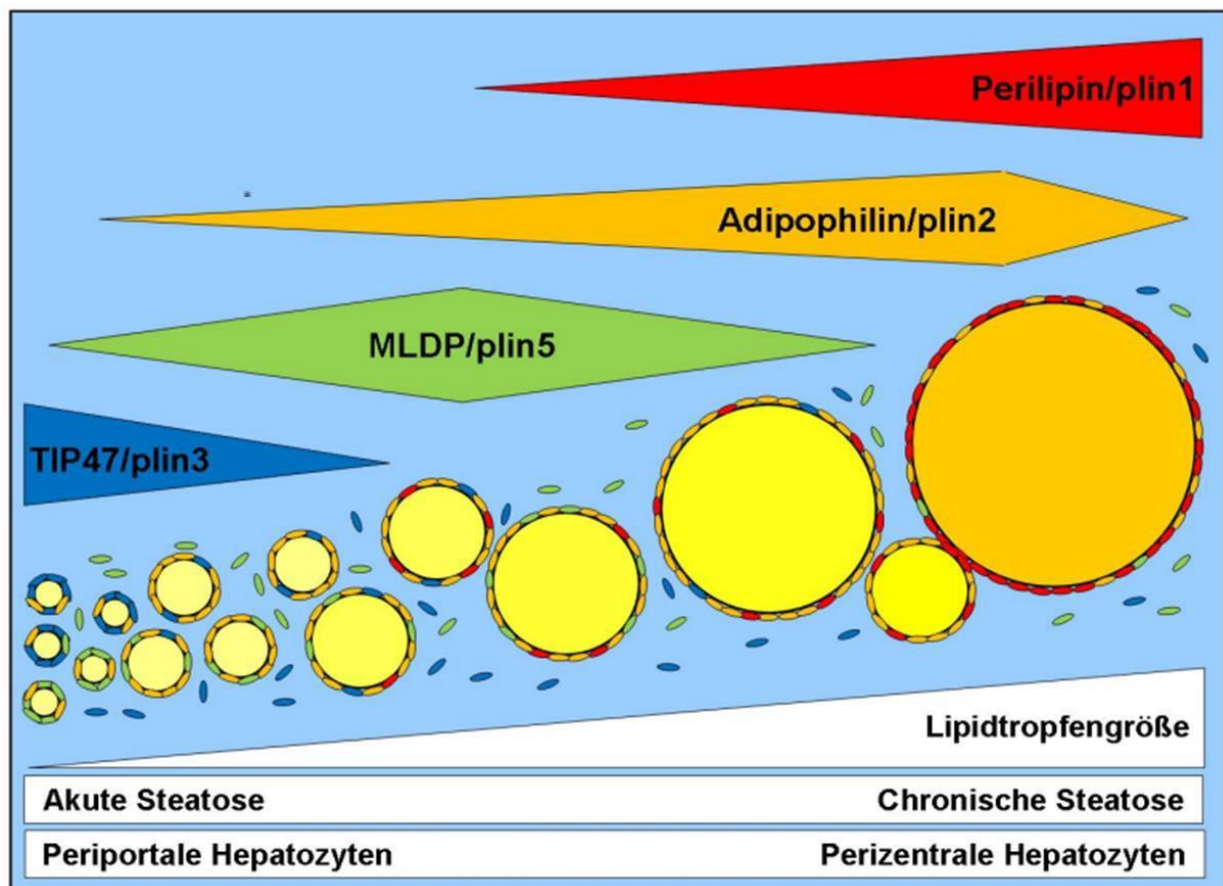


Abb. 4: Modell der sequenziellen Perilipin-Expression beim Reifungsprozess von Lipidtropfen. plin: Perilipin; TIP47: *Tail-interacting protein of 47 kiloDaltons*; MLDP: myocardial lipid droplet protein. Modifiziert nach (36).

2.3.2.1 Perilipin 1

Perilipin 1 (Perilipin, Peri) wurde zunächst als spezifisch für weiße und braune Adipozyten sowie steroidproduzierende Zellen beschrieben (167, 168). Perilipin 1 gilt als Marker der Adipozytendifferenzierung. Perilipin 1 wird bei murinen Präadipozyten kaum, während der Adipozytendifferenzierung dann jedoch verstärkt exprimiert (169). Später wurde Perilipin 1 auch in humaner Leber identifiziert (36, 37). Es existieren vier Isoformen: Perilipin 1 A, B, C und D (150). In steatotischen Hepatozyten kommen vorwiegend die Formen 1A und 1B vor (37, 170). Perilipin 1 spielt eine zentrale Rolle in der Lipolyse. Im basalen Zustand hat das nicht-phosphorylierte Perilipin 1 einen protektiven Effekt gegenüber Lipolyse und dient somit der Stabilität der Lipidtropfen (151, 167, 171, 172). In Adipozyten konnte gezeigt werden, dass im basalen Zustand Perilipin 1 den Koaktivator Abhydrolase Domain Containing 5 (ABHD5) der Schlüssellipase Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) sequestriert (175). Die Phosphorylierung von Perilipin 1 durch Proteinkinase A (PKA) führt zur proteosomalen Degradation von Perilipin 1 und somit Freisetzung von ABHD5, der nun ATGL an Lipidtropfen rekrutieren kann (140, 173-175). Zudem bindet das phosphorylierte Perilipin 1 die

ebenfalls durch PKA phosphorylierte Hormonsensitive Lipase (HSL), die dann aus dem Zytoplasma an Lipidtropfen rekrutiert wird. Dies führt zur Steigerung der Lipolyse (140, 175). Die Phosphorylierung von Perilipin 1 wird durch β -adrenerge Stimulation oder Abwesenheit von PKA-inhibierendem Insulin induziert (140). Die Überexpression von Perilipin 1A *in vitro* in 3T3-L1-Prädipozyten erhöht die TAG-Akkumulation durch reduzierte basale Lipolyse (176). Dagegen zeigen Perilipin 1-Knockout Mäuse selbst bei hochkalorischer Ernährung einen schlanken Phänotyp mit im Vergleich zu Kontrollmäusen erhöhter basaler Lipolyse und histologisch kleineren Lipidtropfen im Fettgewebe (177). Der hepatische Fettgehalt reduziert sich in den Perilipin 1-Knockout Mäusen um 50-65 % im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (177).

2.3.2.2 Perilipin 2

Perilipin 2 (Adipose differentiation-related Protein (ADRP), Adipophilin, ADPH, ADFP) wurde 1992 zum ersten Mal in murinen Prädipozyten identifiziert (178, 180). Während der Adipozytendifferenzierung steigt die Expression dann stark an (180, 181). Perilipin 2 wird weitgehend ubiquitär exprimiert (36, 166, 181). In kultivierten CHO-Zellen im Fettsäure-depletierten Milieu sind die Perilipin 2-Proteinexpression und die Fettakkumulation reduziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Regulation von Perilipin 2 auf Proteinebene durch Ubiquitinierung und proteosomaler Degradation erfolgt (182). Perilipin 2 schützt vor Lipolyse, hat jedoch im Vergleich zu Perilipin 1 und 5 einen schwächeren Einfluss auf die lipolytische Aktivität (140, 183, 184). In murinen Fibroblasten führt die Überexpression von Perilipin 2 zu einem erhöhten intrazellulären TAG-Inhalt und korreliert mit einer Zunahme der Größe und Menge von Lipidtropfen (165). Die Reduktion der TAG-Hydrolyse durch Sequestrierung von Lipasen wurde als Erklärungsmodell vorgeschlagen (185). So führte eine erhöhte Perilipin 2-Expression in HEK293T-Zellen zu einer geringeren Rekrutierung von ATGL an Lipidtropfen (185). In COS-7 Zellen konnte gezeigt werden, dass Perilipin 2 zudem die Aufnahme von Fettsäuren (FS) fördert (186). Dagegen bewirkt das Fehlen von Perilipin 2 durch Gendeletion im Mausmodell eine Reduktion des hepatischen TAG-Inhalts und schützt teilweise von Diät-induzierter *Steatosis hepatis* (187, 188). In murinen AML12-Zellen sowie in humanen Huh7-Zellen kompensierte Perilipin 3 den siRNA-vermittelten Knockdown von Perilipin 2 (189, 190). Erst der Doppelknockdown von Perilipin 2 und Perilipin 3 in diesen Zellen führte zu einem geringeren Gesamt-TAG-Gehalt und einer verstärkten Lipolyse durch Rekrutierung von ATGL an Lipidtropfen (189, 190).

2.3.2.3 Perilipin 3

Perilipin 3 (Tail-interacting protein of 47 kiloDaltons (TIP47), Placental protein 17 (PP17), Mannose 6 phosphate binding protein 1 (M6PRBP1)) wurde zunächst als Sortierungsprotein des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors von Endosomen zum trans-Golgi-Apparat identifiziert (191). Perilipin 3 kommt wie Perilipin 2 weitgehend ubiquitär vor (43). Die Expression von Perilipin 3 wird durch fettreiche Diät reguliert. Im Mausmodell induziert eine hochkalorische Diät Perilipin 3 auf mRNA-Ebene sowie auf Proteinebene (192). Ölsäure-Behandlung in HeLa- und MA10 Leydig-Zellen induziert die Translokation von Perilipin 3 aus dem Zytoplasma an Lipidtropfen (164). Perilipin 3 spielt eine Rolle bei der Lipidtropfengenesse. In murinen OP9-Stromazellen konnte nach Stimulation der Lipidakkumulation Perilipin 3 um winzige, junge Lipidtropfen an der zytosolischen Seite der Membran des endoplasmatischen Retikulums identifiziert werden (193). Der siRNA-vermittelte Knockdown von Perilipin 3 im Mausmodell führt zu einer Reduktion des TAG-Gehalts in der Leber und verringert die Steatosis hepatis (192). In murinen AML12 Leberzellen verursacht die Herunterregulation von Perilipin 3 mittels siRNA bei gleichzeitiger Inkubation mit Ölsäure eine Abnahme der Größe der Lipidtropfen, bei jedoch unverändertem zellulärem TAG-Gehalt und Erhöhung der Lipidtropfen-Anzahl (190).

2.3.2.4 Perilipin 4

Perilipin 4 (S3-12, Plasma membrane associated protein, K1AA1881) wird vorwiegend im weißen und braunen Fettgewebe sowie in Herz- und Skelettmuskelzellen exprimiert (194), lokalisiert zytoplasmatisch und zeigt ein punktförmiges Färbemuster (195). Die Perilipin 4-Expression ist bereits in frühen Stadien der Adipozytendifferenzierung induziert (196). In Hepatozyten hingegen ist Perilipin 4 nur schwach exprimiert (149, 194, 197). Die steatogene Behandlung von 3T3-L1- Adipozyten mit Oleat führt zu einer Rekrutierung von Perilipin 4 verstärkt an TAG-reiche, naszierende Lipidtropfen, die an der Peripherie der Zelle gelegen sind (195). Die Überexpression von Perilipin 4 in S2 Zellen führt zu einer Reduktion der Größe der Lipidtropfen (198). Wenn in diesen S2 Zellen CTP1 (Choline-Phosphate Cytidylyltransferase 1), das für die Synthese von Phosphatidylcholin und somit Lipidtropfenmembranen notwendig ist, depletiert wird, kann Perilipin 4 die Rolle von Phospholipiden des Lipidtropfenmantels übernehmen und kleine Lipidtropfen stabilisieren (198). Im Mausmodell schützt der Knockout von Perilipin 4 vor Diät-induzierter Verfettung des Herzgewebes und führt zu einer Reduktion des TAG-Gehalts im Herzgewebe, wobei in anderen oxidativen Geweben wie der Leber dieser Effekt nicht zu beobachten war (199). Im Herzgewebe dieser Mäuse kam es zudem zu einer reduzierten Expression von Perilipin 5 (199).

2.3.2.5 Perilipin 5

Perilipin 5 (Oxidative PAT protein (OXPAT), Myocardial lipid droplet protein (MLDP), lipid storage droplet protein 5 (LSDP5), PAT-1) wird stark in oxidativen Geweben wie in Herz- und Skelettmuskelgewebe, braunem Fettgewebe sowie im Leberparenchym exprimiert (159, 200-203), kommt darüber hinaus auch in den Nebennieren (159), den Epithelzellen des gastrointestinalen und urogenitalen Trakts, den Ausführungsgängen der Speicheldrüsen und des Pankreas, den Tubuluszellen der Niere sowie den Parietalzellen des Magens (200) und in weißem Fettgewebe vor (200). Perilipin 5 lokalisiert oft an Lipidtropfen, die sich in unmittelbarer Nähe von Mitochondrien befinden (202, 204, 205). Es wurde angenommen, dass Perilipin 5 den Transport zwischen Lipidtropfen und Mitochondrien reguliert (202, 204). Im Mausmodell wird ATGL von Perilipin 5 indirekt durch kompetitive Bindung an ABHD5 inhibiert (206). In basalem Zustand bindet Perilipin 5 HSL und macht somit diese Lipase funktionsunfähig (184). So trägt Perilipin 5 auch zur Hemmung der Lipolyse in oxidativen Geweben bei, vermindert oxidativen Stress und führt zur TAG-Akkumulation (184, 206, 207). In Mäusen, die mit fettreicher Diät gefüttert werden, führt die Überexpression von Perilipin 5 zudem zu einem höheren Steatosegrad in der Leber und zur Herunterregulation von Genen, die in der Lipolyse involviert sind und durch PPAR α induziert werden (208). Eine Überexpression von Perilipin 5 in murinen Kardiomyozyten führt zu einem erhöhten TAG-Gehalt mit ausgeprägter Verfettung und verminderter β -Oxidation (202, 209). Der Knockdown von Perilipin 5 mittels siRNA in AML12 Zellen führt zu einer Reduktion der Lipidtropfen und TAG-Menge der Lipidtropfen, bedingt durch Induktion der Lipolyse, Zunahme der Mitochondrien-Menge sowie Steigerung der β -Oxidation (210). Konkordant damit zeigen Perilipin 5 Knockout Mäuse einen reduzierten Fettgehalt in der Leber, kleinere Lipidtropfen, sowie eine erhöhte Lipolyse und mitochondriale Oxidationskapazität (206). Dabei zeigen sich in den H&E-Färbungen zelluläre Schäden und eine Zunahme von Entzündungsmarkern (206).

2.3.3 Lipidtropfen und Perilipine in Neoplasien

Auch bei ausreichender Sauerstoffversorgung gewinnen Tumorzellen im Gegensatz zu normalen Zellen häufig Energie durch aerobe Glykolyse, was als sogenannter "Warburg-Effekt" bezeichnet wird (211, 212). Daraus resultiert, dass Glukose im Citratzyklus in den Mitochondrien nicht vollständig zu CO₂ verstoffwechselt wird, was die ATP-Produktion reduziert, im Gegenzug aber makromolekulare Vorläufermoleküle bereitstellt (212). Somit wird die Synthese von Zellkomponenten optimiert (211). Die meisten humanen Tumore zeigen eine erhöhte Fettsäure-Synthese (213), anschaulich durch gesteigerte Expressionsniveaus von lipogenen Enzymen (214-216). HCCs weisen daher auf mRNA-Niveau eine erhöhte Expression von Fettsäuresynthase (FAS), Acetyl-CoA Carboxylase (ACCase) und ATP-Citrat-Lyase (ACLY) auf (217). Folglich könnte die Inhibition der Fettsäure-Synthese mit dem Tumorwachstum interferieren. Kuhajda und Koautoren konnten zeigen, dass in Mammakarzinomen die Cerulenin inhibierte Acylglycerolsynthese zu einer Hemmung der Tumorgrößenzunahme führt (218).

Als morphologisches Korrelat weisen einige Tumorentitäten histologisch identifizierbare Lipidtropfen auf (17, 219, 220). In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte anhand eines Kollektivs von über 900 Proben unterschiedlicher Tumorentitäten mit respektivem Normalgewebe gezeigt werden, dass Tumorzellen häufig mehr Perilipin 2, Perilipin 3 und Perilipin 5-positive Lipidtropfen als das ursprüngliche normale Gewebe aufweisen (17, 18). Dabei variieren die Anzahl, Lokalisation und Größe von Lipidtropfen in den unterschiedlichen Entitäten (17). Lichtmikroskopisch sind diese Lipidtropfen insbesondere bei 10 % aller HCCs und dem klarzelligen Nierenzellkarzinom prominent (17, 219, 220). Des Weiteren kann in bis zu 90 % der HCCs eine geringe Steatose mittels Perilipin 1, 2 und 3 Immunhistochemie nachgewiesen werden (17).

Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten, dass Perilipin 2 und Perilipin 3 eine weitgehend ubiquitäre Expression in Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen unterschiedlichen Ursprungs haben (17). Dabei war Perilipin 3 sowohl an kleinen Lipidtropfen als auch im Zytoplasma lokalisiert (17). Perilipin 2 kam am stärksten in lipidreichen Tumoren wie apokrinen Mammakarzinomen sowie in Tumoren mit klarzelliger Morphologie wie dem klarzelligen Nierenzellkarzinomen vor (17, 220). Perilipin 1 dagegen zeigte eine begrenzte Expression in Tumoren und konnte lediglich in Hepatozellulären Karzinomen und Hepatozellulären Adenomen, Talgdrüsenadenomen und -karzinomen sowie adipogenen mesenchymalen Tumoren nachgewiesen werden, also in Geweben, in denen die Lipidbildung und der Lipidstoffwechsel auch im Normalgewebe eine große Rolle spielen (17, 18, 221, 222). Somit reflektiert das Expressionsmuster der Perilipine in den Tumoren weitgehend das des ursprünglichen Normalgewebes (17). Aufgrund der differentiellen

Expression der Perilipine in den unterschiedlichen Geweben, wird vorgeschlagen, immunhistochemische Perilipin-Färbungen für die Tumor-Diagnostik einzusetzen: Mrozinski (221) zeigte, dass Perilipin 1 in Liposarkomen, jedoch nicht in anderen Sarkomen exprimiert wird, und Izumi und Koautoren (222) schlagen die Perilipin 1-3 IHC-Färbungen vor, um die holokrine Sekretion in seborrhischen Karzinomen des Augenlids zu identifizieren und somit die Diagnose dieser Tumoren zu unterstützen.

Yao und Koautoren (220) konnten finden, dass in klarzelligen Nierenzellkarzinomen eine hohe *ADFP* (*Adipose Differentiation-related Protein*)-Expression mit einer besseren Prognose hinsichtlich des krebsspezifischen Überlebens einhergeht. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Perilipin 2-Expression sowohl positiv mit der Ki67-Proliferationsrate in Mammakarzinomen und HCCs als auch negativ mit dem Tumorgrad bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen korreliert ist (17). Die Perilipin 3-Expression korrelierte in Adenokarzinomen der Kolonschleimhaut, Lungenkarzinomen sowie Plattenepithelkarzinomen der Haut positiv mit der Tumorgröße sowie teilweise auch mit Tumorstadium und -grad (17). Perilipin 4 wurde speziell in Triple-negativen Mammakarzinomen sowie kultivierten Doxorubicin-resistenten Zellen beschrieben (223).

Perilipin 2 und Perilipin 3 konnten zumindest fokal in fast allen HCCs nachgewiesen werden. Perilipin 1 wurde dagegen in lediglich etwa 30 % der HCCs mit unterschiedlichen Differenzierungsgraden detektiert, wobei die Perilipin 1-Expression jeweils auf eine Subpopulation begrenzt war (17). Perilipin 1 und 2 zeigen eine differentielle Expression in HCC-Zellen (17). Perilipin 2 wird schon früh in der Hepatokarzinogenese gebildet, da bereits dysplastische Knoten mehr Perilipin 2 aufweisen, verglichen mit dem entsprechenden Normallebergewebe (17). Dagegen scheint Perilipin 1 bei der Hepatokarzinogenese herunterreguliert zu werden: HCCs sowie dysplastische Knoten weisen eine schwächere Perilipin 1-Expression als das gesunde Leberparenchym auf (17). Ähnlich wie im nicht neoplastischen steatotischen Leberparenchym kommt Perilipin 3 in HCCs am häufigsten lediglich diffus im Zytoplasma der Hepatozyten vor. Nur kleine Mengen von Perilipin 3 lokalisieren an der Peripherie von mikrovesikulären Lipidtröpfchen (17). Es konnte keine Korrelation zwischen der Intensität der Perilipin 3-Färbung und der Ätiologie des HCCs herausgefunden werden (17).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Analysewaage	New Classic (Sartorius AG, Göttingen)
Brutschrank	Heraeus® Function Line B6, T6060 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
Chemilumineszenzimager	Fusion Solo S (Vilber Lourmat, Eberhadzell)
CO ₂ -Inkubator	BBD6220 (Thermo Fisher Scientific)
Dampfgerar	Braun 3216 (Braun GmbH, Kronberg im Taunus)
DNA-Extraktionsautomat	Maxwell® RSC Automat AS4500 (Promega GmbH, Mannheim)
Eindeckautomat	Leica CV 5030 (Leica Biosystems, Wetzlar)
Gewebehomogenisator	Perccellys® 24 (Bertin Technologies, Saint Aubin, Frankreich)
Gewebe-Mikroarrayer	TMArrayer™, Semiautomartic Tissue MicroArrayer (Pathology Devices Inc., Westminster, MD, USA)
Hämatoxylin-Eosin Färbeautomat	ST4040 Linear Stainer (Leica Biosystems)
Immunhistochemie Färbeautomat	Dako Cytomation Autostainer Plus (Dako, Glostrup, Dänemark)
Immunblot-Transfersystem	Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)
Konfokales Laserscanning-Mikroskop	SP8 (Leica Biosystems)
Kryostat	Leica CM3050S (Leica Biosystems)
Kühlplatte	Tissue Cool Plate COP 30 (Medite GmbH, Burgdorf)
Klingenhalter	Trimming Blade Handle Feather 99061308 (PFM Medical AG, Köln)
Laufkammer	Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cells (Bio-Rad Laboratories Inc.)
Lichtmikroskope	Axioscope (Zeiss, Oberkochen)
Mikrotom	Epredia™ HM 355S (Thermo Fisher Scientific)

Pipetten	Eppendorf Research® 10, 100, 1000 µl (Eppendorf AG, Hamburg) PIPETMAN® Classic P10, P100, P1000 µl (Gilson® Inc, Middleton, WI, USA)
Pipettierhilfe	PIPETBOY acu 2(INTEGRA Biosciences Corp., Hudson, NY, USA)
Real-time PCR Automat	Quantstudio™ 3 real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
Schnitt-Scanner	Hamamatsu NanoZoomer S60 (Hamamatsu Photonics, Japan)
Sequenzierer	Beckman Coulter CEQ-8000 Analyser (Marshall Scientific, Hampton, NH, USA)
Spektralphotometer	NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) Tecan Spark 10M (Tecan Group, Männedorf, Schweiz)
Sterilbank	HERAsafe KS12 (Thermo Fisher Scientific)
Thermocycler	Thermocycler GeneAmp® PCR System 9.700 (Thermo Fisher Scientific)
Tischzentrifuge	Mikro 120 (Hettich AG, Bäch, Schweiz)
Universalzentrifuge	Heraeus™ Multifuge™ X3 (Thermo Fisher Scientific)
Vortex	Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc., New York, USA)
Wippschüttler	CAT ST 5 (Ingenieurbüro CAT M. Zipperer GmbH, Ballrechten-Dottingen)
Zählkammer	Neubauer Improved (Brand GmbH + CO KG, Wertheim)
Zentrifuge	Z 216 MK (Hermle Labortechnik GmbH, Gosheim)

3.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

96-Well Platten	MicroAmp® Optical (Thermo Fisher Scientific)
Abdeckfolie für 96-Well Platten	MicroAmp™ Optical (Thermo Fisher Scientific)
Adhäsionsobjektträger	SuperFrost® Plus (Thermo Fisher Scientific)
Deckgläser	Menzel Gläser 24 x 60 mm (Thermo Fisher Scientific)
Eppendorf® Tubes	Safe-Lock Tubes PCR-clean 1,5 ml und 2 ml (Eppendorf AG)
Homogenisator Lysing Tube	Percellys® Lysing Plus Ceramic Beads 2 ml (Bertin Technologies)
Kryoröhrchen	Thermo Scientific™ Nalgene™ Cryogenic Vials, steril 1,2 ml (Thermo Fisher Scientific)
Magnetic Beads	MagSI-DT Removal Beads SL-DKT04050 (Steinbrenner Laborsysteme GmbH, Wiesenbach)
Mikrotomklinge	S35 (PFM Medical Inc., Carlsbad, CA, USA)
Nitrocellulose-Membran	0,45 µm (Bio-Rad Laboratories Inc.)
Objektträger, unbeschichtet	76 x 26 mm (Diagonal GmbH & Co. KG, Münster)
PCR-Reaktionsgefäße	Cellstar® Sapphire 0,2 ml (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich)
Pipettenspitzen mit Filtern	SafeSeal SurPhob Spitzen, Low Binding, graduert, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1250 µl (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Holdendorf)
Pipettenspitzen	Refill System, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1250 µl (Nerbe Plus GmbH, Winsen)
Serologische Pipetten	Cellstar®, steril, frei von DNase, RNase, DNA, Pyrogen 5 ml, 10 ml, 25 ml (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich)
Sterile Filterpapiere	Wathman™ (Thermo Fisher Scientific)
Zellkulturschalen	Cellstar®, steril, frei von DNase, RNase, DNA, Pyrogen 60 x 15 mm (Greiner Bio-One GmbH)
Zentrifugenröhrchen	Cellstar® Tubes, steril, konischer Boden, Schraubverschluss 2 ml und 50 ml (Greiner Bio-One GmbH)

3.1.3 Chemikalien, Lösungen, Reagenzien

Aqua dest	Destilliertes Laborwasser (Medizintechnik der Universitätsmedizin Mainz)
Acrylamid-Mix	Acrylamid-Stammlösung mit 0,8 % Bisacrylamid, Rotiphorese® Gel 30 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
APS	Ammoniumpersulfat = Ammoniumperoxodisulfat (Carl Roth GmbH)
BSA (Bovines Serumalbumin)	Albumin Fraktion V (Carl Roth GmbH)
Bradfordreagenz	Bio-Rad Protein Assay, Farbstoff+ Konzentrat (Bio-Rad Laboratories Inc.)
Bromphenolblau	Bromphenolblau für Natriumsalze (Carl Roth GmbH)
Chloroform	Trichlormethan, Methylidyne Trichloride (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA)
Coumarinsäure	p-Coumaric acid ≥ 98 % (Sigma Aldrich)
DMSO	Dimethylsulfoxid (Sigma Aldrich)
DTT	Dithiothreitol (BioChemica AppliChem GmbH, Darmstadt)
Eindeckmittel	Entellan™ (Sigma Aldrich) Millipore Sigma™ Calbiochem™ Mowiol™ 4-88 Reagent (Thermo Fisher Scientific)
Eosin	Referenz (REF): CS701 (Dako)
Essigsäure	Rotipuran® 100 % (Carl Roth GmbH)
Ethanol	100 %, 96 %, 70 %, 50 % (SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn) Absolute ≥ 99,8 % (Honeywell Research Chemicals, Seelze)
Formaldehydlösung	36,6 -38 % in H ₂ O (Sigma Aldrich)
Glycerin	Glycerol Reagent Plus™ (Sigma Aldrich)
Glycin	≥ 99 %; 75,07 g/mol (Carl Roth GmbH)
Hämatoxylin	REF: CS702 (Dako)
Histo-Clear II	REF: HS-202 (Fa. National Diagnostics, Atlanta, GA, USA)
Isopropanol (2-Propanol)	≥ 99 % (Sigma Aldrich)

Luminol	≥ 97 % (Sigma Aldrich)
Magermilchpulver	Artikel-Nr: 2003467 (BioChemica AppliChem GmbH)
Nuklease-freies Wasser	REF: 129117 (Qiagen, Hilden)
Paraffin	Paraplast® (Klinika Medical GmbH, Usingen)
PBS-Puffer	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (BioChemica AppliChem GmbH)
PEI-Reagenz	Polyethylenimine in PBS, Stammlösung 1,67 mM (Sigma Aldrich)
Penicillin-Streptomycin	P0781 (Sigma Aldrich)
Ponceau S <i>Solution</i>	0,1 % (w/v) in 5 % Acetic Acid (Sigma Aldrich)
Protease und Phosphatase Inhibitor	Halt™, Cocktail 100X, Lot: LD144507 (Thermo Fisher Scientific)
Reinstwasser	Milli-Q Typ-1 (Reinstwasseranlage, Medizintechnik der Unimedizin Mainz)
Salzsäure (HCl (aq))	rauchend 37 %, Rotipuran® (Carl Roth GmbH)
SDS	Natriumdodecylsulfat Pellet M 288,4 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
Sequenzierpuffer	A.C.E.™ <i>Sequencing Buffer</i> (VWR International GmbH)
SLS	CEQ™ <i>Sample loading solution</i> (Beckman Coulter Inc.)
TEMED	Tetramethylethyldiamin, ≥ 98,5 % (Carl Roth GmbH)
Tris	Tris Ultrapure, 121,14 g/mol (BioChemica AppliChem GmbH)
Triton® X100	t-Octylphenoxy-polyethoxyethanol (Sigma Aldrich)
TRizol	TRI-Reagent™ <i>Solution</i> , RNA Isolation Reagent (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA, USA)
Trypsin	Trypsin-EDTA <i>Solution</i> , 0,25 % (Sigma Aldrich)
Tween	Tween 20, Molecular Biology Grade (Biomedicals, Eschwege)
Wasserstoffperoxid	30 %-ig Perhydrol™ (Merck KGaA, Darmstadt)
Xylol	Xylol (SAV Liquid Production GmbH)

3.1.4 Standards

Proteingröße-Standard	PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific)
Proteinquantifizierung-Standard	Purified bovine serum albumine 10 mg/ml (New England BioLabs®, Ipswich, MA, USA)

3.1.5 Puffer

Die Puffer wurden i.d.R. mit Reinstwasser angesetzt.

„CO-IP“-Lysepuffer (pH = 8,0)	50 mM Tris-HCl 15 mM EDTA 100 mM NaCl
Elektrophoresepuffer (pH = 8,8)	0,092 M Tris-HCl 0,76 M Glycin 0,2 % SDS (w/v)
Immunpräzipitationspuffer	20 mM HEPES pH = 7,6 150 mM NaCl 1 % Triton-X-100 (v/v)
RNA-Ladepuffer 2x	100 µl Formamid 40 µl Formaldehyd 20 µl TBE 10x
Protein-Probenpuffer 6x	36 % Glycerin (v/v) 350 mM Tris-HCl pH = 6,8 10,28 % SDS (m/v)
SDS-PAGE-Laufpuffer 10x (pH = 8,3)	35 mM SDS 250 mM TRIS 1,92 M Glycin
Semidryblot Puffer 1x	480 mM Tris 390 mM Glycin 13 mM SDS
Semidryblot Puffer 10x	10 % Semidryblot Puffer 10x (v/v) 20 % Methanol (v/v)
Stripping-Puffer (2 Ansätze pH = 2,8 bzw. 2,2)	500 mM NaCl 200 mM Glycin HCl je nach pH titriert

TBS (Tris-buffered Saline) 10x 200 mM Tris
1,38 mM NaCl
HCl je nach pH titriert

TBST 10 % TBS 10x (v/v)
0,05 % Tween 20 (v/v)

3.1.6 Zellkulturmedien

Fetales Kälberserum (FBS) 10 % FBS, F7524 (Sigma Aldrich)

Dulbecco's Modified Eagle Medium
(DMEM) mit 4,5 g/l D-Glucose und L-Glutamine und Pyruvate
(Thermo Fisher Scientific)

3.1.7 Kits

DNA-Sequenzierung CEQ DTCS QuickStart Kit (Beckman Coulter Inc.)
ExoSAP-IT™ Affymetrix™ (Thermo Fisher Scientific)
Fast Cycling PCR KIT, Q-Fast-MM 203745 (QIAGEN)
Multiplex PCR Mastermix, Q-Mix 206145 (QIAGEN)
Maxwell® RSC FFPE Plus DNA Kit AS1720 (Promega)

Immunhistochemie EnVision™ FLEX High pH Code 8010 (Dako)
Protein Block Serum-Free Ready-to-use, Code X0909 (Dako)
Bluing-Puffer, REF: CS702 (Dako)

Real-time PCR High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit
(Thermo Fisher Scientific)
Illustra™ ExoProSTAR™ (Cytiva, Marlborough, MA, USA)
ReadyMix™-RedTaq™ PCR Reaction Mix with MgCl₂
(Sigma Aldrich)
SYBR™-Green PCR Mastermix (Thermo Fisher Scientific)

3.1.8 Antikörper

Primärantikörper

Die verwendeten Primärantikörper werden im Nachfolgenden dargestellt (Tab. 4).

Tab. 4: Primärantikörper

Antigen, Artikelnummer	Hersteller	Spezies und Klonalität	Anwendung und Färbeprotokoll
AA (Amyloid A), IR605	Dako	Maus, mAb	IHC: Inkubationszeit: 20 min Verdünnung: keine, gebrauchsfertig
Actin, MAB1501 Klon C4	Merck KGaA	Maus, mAb	WB : Inkubationszeit: 1 h Verdünnung: 1:1000
ASS1 (Argininosuccinat- Synthase 1), 16210-1-AP	Proteintech Group, Rosemont, IL, USA	Kaninchen, pAb	IHC : Inkubationszeit: 30 min Verdünnung: 1:800
β -Catenin, IR702	Dako	Maus, mAb	WB : Inkubationszeit: 1 h Verdünnung: 1:10
CRP (C-reaktives Protein), ab32412	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Kaninchen, mAb	IHC : Inkubationszeit: 30 min Verdünnung: 1:1.000
L-FABP (liver-type fatty acid binding protein, FABP1), HPA 028275	Sigma Aldrich	Kaninchen, pAb	IHC : Inkubationszeit: 32 min Verdünnung: 1:3500
GAPDH (Glycerinaldehyd-3- phosphat- Dehydrogenase), 6C5	Santa Cruz Biotechnology	Maus, mAb	WB : Inkubationszeit: 1 h Verdünnung: 1:1000
Glypican 3, 790-4564	Ventana Medical Systems, Oro Valley, AZ, USA	Maus, mAb	IHC: Inkubationszeit: 32 min Verdünnung: keine, gebrauchsfertig
GS (Glutaminsynthetase), 760-4898	Cell Marque, Rocklin, CA, USA	Maus, mAb	IHC: Inkubationszeit: 32 min Verdünnung: keine, gebrauchsfertig
GS, MA5-27749	Thermo Fisher Scientific	Maus, mAb	IFM: Inkubationszeit: 30 min Verdünnung: 1:100 (verdünnt in 10 % FCS, 0,1% Triton X-100 in PBS)
Hsp70 (Hitzeschockprotein70), sc-24	Santa Cruz, Biotechnology, Dallas, TX, USA	Maus, mAb	IHC : Inkubationszeit: 32 min Verdünnung: 1:250
MIB-1/Ki67-Protein, IR626	Dako	Maus, mAb	IHC: Inkubationszeit: 20 min Verdünnung: keine, gebrauchsfertig

PLIN1 (Perilipin 1), GP29	Progen	Meerschweinchen, pAb	IFM: Inkubationszeit: 30 min Verdünnung: 1:100 (verdünnt in 10 % FCS, 0,1% Triton X-100 in PBS)
PLIN1, hCT-A	Freundliche Gabe von Dr. Hans Heid, DKFZ	Meerschweinchen, pAb	IFM: Inkubationszeit: 30 min Verdünnung: 1:100 (verdünnt in 10 % FCS, 0,1 % Triton X-100 in PBS)
PLINA/1, P1998	Sigma Aldrich	Kaninchen, pAb	IFM: Inkubationszeit: 30 min Verdünnung: 1:100 (verdünnt in 10 % FCS, 0,1 % Triton X-100 in PBS)
PLIN1 (Perilipin 1 N Terminus), 651156 Klon PERI 112.17	Progen, Heidelberg	Maus, mAb	IHC : Inkubationszeit: 30 min Verdünnung: 1:25 WB : Inkubationszeit: 1 h Verdünnung: 1:10
PLIN2 (Perilipin 2 N Terminus), 651102 Klon AP125	Progen	Maus, mAb	IHC : Inkubationszeit: 30 min Verdünnung: 1:25 WB : Inkubationszeit: 1 h Verdünnung: 1:20
PLIN3 (Perilipin 3 N Terminus), GP30	Progen	Meerschweinchen, pAb	IHC : Inkubationszeit: 30 min Verdünnung: 1:400
PLIN4 (Perilipin 4 C Terminus), GP34	Progen	Meerschweinchen, pAb	IHC : Inkubationszeit: 30 min Verdünnung: 1:200
PLIN5 (Perilipin 5 C Terminus), GP31	Progen	Meerschweinchen, pAb	IHC : Inkubationszeit: 30 min Verdünnung: 1:250
PLIN5 (Perilipin 5 C Terminus), GP31	Progen	Meerschweinchen, pAb	WB : Inkubationszeit: 1 h Verdünnung: 1:1000

mAb = monoklonaler Antikörper; pAb = polyklonaler Antikörper; ICH: Immunhistochemie; IFM:Immunfluoreszenzmikroskopie; WB: Immunblot.

Drei unterschiedliche Perilipin 1-Antikörper wurden für die Immunfluoreszenzmikroskopie getestet. Die besten Färbergebnisse in humanem Gewebe wurden mit dem GP29-Antikörper erzielt. Dementsprechend wurden die Färbungen in Rahmen dieser Arbeit unter der Verwendung dieses Antikörpers durchgeführt.

Sekundärantikörper

Für die immunhistochemischen Analysen wurden biotinylierte ImmunSekundärantikörper verwendet, die das Fc-Fragment des Erstantikörpers erkennen: anti-Maus IgG, anti-Kaninchen IgG und anti-Meerschweinchen IgG. Diese sind im Dako EnVision™ FLEX, High pH FärbeKit (Code K8010, Dako) gebrauchsfertig enthalten. Das enzymkonjugierte Tertiärreagenz (Streptavidin HRP: „Horseradish Peroxidase“, gebrauchsfertig, REF: ab64269) wurde von der Firma Abcam bezogen.

Die für die Immunfluoreszenzmikroskopie verwendeten Sekundärantikörper (Tab. 5) werden im Nachfolgenden dargestellt.

Tab. 5: Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzmikroskopie

Antigen, Artikelnummer	Hersteller	Spezies und Klonalität	Färbeprotokoll
Ziege anti-Maus Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	Ziege, pAb	Inkubationszeit: 30 min Verdünnung: 1:250
Ziege anti- Meerschweinchen Alexa Fluor 555	Thermo Fisher Scientific	Ziege, pAb	Inkubationszeit: 30 min Verdünnung: 1:250
Ziege anti-Kaninchen Alexa Fluor 546	Thermo Fisher Scientific	Ziege, pAb	Inkubationszeit: 30 min Verdünnung: 1:250

mAb = monoklonaler Antikörper; pAb = polyklonaler Antikörper.

Für das Anfärben der Zellkerne bei der Immunfluoreszenzmikroskopie wurde der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Sigma Aldrich) verwendet. Dieser wurde 1:10.000 verdünnt.

Die für die Immunblots verwendeten Sekundärantikörper (Tab. 6) werden im Nachfolgenden dargestellt.

Tab. 6: Sekundärantikörper für den Immunblot

Antigen, Artikelnummer	Hersteller	Spezies und Klonalität	Protokoll
Ziege anti-Maus (Highly cross-absorbed), A16078	Invitrogen, Inc.	Ziege, pAb	Inkubationszeit: 1 h Verdünnung: 1:3.000
Ziege anti-Kaninchen, 170-6516	Bio-Rad Laboratories Inc.	Ziege, pAb	Inkubationszeit: 1 h Verdünnung: 1:3.000
Ziege anti- Meerschweinchen (Highly cross-absorbed), A18775	Invitrogen, Inc.	Ziege, pAb	Inkubationszeit: 1 h Verdünnung: 1:3.000

mAb = monoklonaler Antikörper; pAb = polyklonaler Antikörper.

3.1.9 Zellkulturen

Adhärent wachsende menschliche embryonale Nierenepithelzellen der Linie HEK293T (Artikelnummer: CRL-11268, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA) wurden für die Zellkulturexperimente eingesetzt. Das Kulturmedium wurde aus DMEM mit 10 % FBS und 1 % Penicillin- Streptomycin, 10.000 U/ml zusammengesetzt.

3.1.10 Plasmide

Plasmide sind doppelsträngige, zirkuläre und extrachromosomale DNA-Moleküle von Bakterien, die in Bakterien unabhängig von der genomischen DNA vervielfältigt werden können (224). Sie können in modifizierter Form als Vektor zum Einbringen von Fremd-DNA in Organismen verwendet werden (224). Sie besitzen folgende, funktionelle Elemente: einen Replikationsstart (origin of replication), ein oder mehrere Antibiotikaresistenzgen(e) zur Selektion und einen Sequenzabschnitt, der über mehrere Schnittstellen für Restriktionsenzyme zur Klonierung verfügt (*multiple cloning site*) (224).

Als Ausgangsvektor diente pcDNA3.1 (Invitrogen, Inc.), ein 5,4 kb großer Expressionsvektor mit CMV-Promotor und Neomycin- und Ampicillin-Resistenzgenen. In diesen wurde über die Schnittstellen *XhoI* und *XbaI* ein FLAG-Epitop inseriert, sodass nach erfolgreicher Insertion eines Gens das überexprimierte Protein als Fusionsprotein mit FLAG-Tag vorlag (225).

Neben dem Ausgangsvektor bzw. Leervektor pcDNA3.1-FLAG wurden weitere pcDNA3.1-FLAG Vektoren verwendet, in den *CTNNB1* oder *CTNNB1 CA* über die Schnittstellen *BamHI* und *NotI* oder *PLIN1* über die Schnittstellen *HindIII* und *XbaI* inseriert wurden. Für die konstitutiv aktive (CA) Variante von *CTNNB1* wurden die Serine und Threonine S33, S37, S45, sowie T41 zu Alaninen mutiert, um so die proteasomale Degradierung von β -Catenin zu verhindern.

3.1.11 Oligonukleotide (Primer)

Real-time PCR Primer für die Quantifizierung der mRNA

Folgende Oligonukleotide wurden im Rahmen der real-time PCR Analysen verwendet und über die Firma Merck KGaA bezogen (Tab. 7).

Tab. 7: Oligonukleotide für real-time PCR-Analysen

Zielgen/ Name	Größe des Amplikons	Primer	Exon/ Bindestelle	Sequenz 5'-3'
<i>PLIN 1</i>	84 Bp	forward	Exon 3	CTGCCGGTGGTGAGTGGCAC
		reverse	Exon 3	CACAGAGGCCACCAGGGGGT
<i>PLIN 5</i>	138 Bp	forward	Exon 5	GCTGTGGATGTTGTACTGGA
		reverse	Exon 6	CTGCTGTCTCCTCTGATCCT
<i>GLUL</i>	105 Bp	forward	Exon 5	CCTGCTTGTATGCTGGAGTC
		reverse	Exon 6	GATCTCCCATGCTGATTCCT
<i>MYC</i>	114 Bp	forward	Exon 2	CTCGGATTCTCTGCTCTCCT
		reverse	Exon 3	TCTTGTTCTCCTCAGAGTCG
<i>AXIN2</i>	97 Bp	forward	Exon 2	CACGGAAACTGTTGACAGTGGATAC
		reverse	Exon 3	GGTGGCTGGTGCAAAGACATAG
<i>CCDN1</i>	145 Bp	forward	Exon 2	GGATGCTGGAGGTCTGCGA
		reverse	Exon 3	GAGGCCACGAACATGCAAG
<i>RNA18S</i>	67 Bp	forward	Nicht zutreffend	CATGGCCGTTCTTAGTTGGT
		reverse	Nicht zutreffend	ATGCCAGAGTCTCGTTCGTT

Bp: Basenpaare.

Oligonukleotide für *CTNNB1*-Genotypisierung

Folgende Oligonukleotide wurden im Rahmen der *CTNNB1*-Genotypisierung verwendet und über die Firma Biomers.net GmbH (Ulm/Donau) bezogen (Tab. 8 und Tab. 9).

Tab. 8: Oligonukleotide für *CTNNB1*-Genotypisierung bei Standard PCR

Zielgen/ Name	Größe des Amplikons	Primer	Exon/ Bindestelle	Sequenz 5'-3'
<i>BCAT-Ex3</i>	350 Bp	forward	Exon 3	CAATGGGTCATATCACAGATTCTT
		reverse	Exon 3	TGACTTTCAGTAAGGCAATGAAAA
<i>BCAT7</i>	315 Bp	forward	Exon 7	GGTAATATGGCTCTTCTCAGACA
		reverse	Exon 7	TTCAGTAGTTAAAGTCTACCACCT
<i>BCAT8</i>	303 Bp	forward	Exon 8	GGACACCTCCTAAGGCTAGAAC
		reverse	Exon 8	GTCCCAAGGAGACCTTCCATC

Bp: Basenpaare.

Tab. 9: Oligonukleotide für *CTNNB1*-Genotypisierung bei Nested PCR

Zielgen/ Name	Größe des Amplikons	Primer	Exon/ Bindestelle	Sequenz 5'-3'
<i>BCAT-Ex3-SCA</i>	239 Bp	forward	Exon 3	ATGGAACCAGACAGAAAAGC
		reverse	Exon 3	TGACTTTCAGTAAGGCAATGA
<i>BCAT7-SCA</i>	266 Bp	forward	Exon 7	GGTAATATGGCTCTTCTCAGACA
		reverse	Exon 7	AGAACTGCAGATGCTATACACA
<i>BCAT8-SCA</i>	263 Bp	forward	Exon 8	GGACACCTCCTAAGGCTAGAAC
		reverse	Exon 8	ACAGATGGTCAGTACAAGCACA

Bp: Basenpaare.

3.2 Methoden

3.2.1 Gewebe-/Patienten-Kollektiv

Die vorliegende Arbeit umfasst die Erstellung eines Kollektivs aller HCAs, die im Zeitraum von 1997 bis 2022 in Mainz operiert und diagnostiziert wurden. Zum Vergleich wurden Proben von FNHs, HCCs sowie, wenn vorhanden, vom respektiven nicht-tumorösen Lebergewebe genommen. Alle weiteren Herde von HCA-Patienten wurden mituntersucht, ob FNH oder HCA. Die anderen FNHs wurden zufällig ausgesucht. G1-HCCs ohne zugrundeliegende Lebererkrankung und ohne Leberzirrhose sowie HCCs auf dem Boden eines HCAs wurden zum Vergleich analysiert. Die entsprechenden Fälle wurden mithilfe einer Datenbanksuche in Pathopro (Institut für medizinische Software, Saarbrücken) identifiziert. Das Kollektiv umfasst Formalin-fixierte und in Paraffin-eingebettete (FFPE) sowie kryokonservierte Gewebeprobe. Hierbei handelt es sich um Überschussmaterial von Resektaten, das für die Forschung freigegeben wurde („Immunhistochemische und Molekularpathologische Analysen von Hepatozellulären Adenomen“, Bearbeitungsnummer: 837.412.17 (11246), 2017, Antragsteller: Straub, Duret, Kooperation: PD Dr. Stefan Heinrich, PD Dr. Marcus-Alexander Wörns, Dr. Jens Mittler). Bei allen Proben von kryokonserviertem humanem Lebergewebe wurde ebenfalls das zugehörige FFPE-Gewebe untersucht. Klinische Informationen von Patienten wurden aus Arztbriefen und/oder Chirurgie-Radiologie- und Anästhesie-Berichten des Krankenhausinformationssystem KIS-SAP (Krankenhausinformationssystem Systemanalyse Programmentwicklung, SAP, Walldorf) gesammelt.

3.2.2 Mikroskopiemethoden

3.2.2.1 Herstellung eines TMA

TMAAs ermöglichen es, auf einem Objektträger Antikörper-sparend und unter identischen Bedingungen viele Gewebeproben parallel anzufärben und zu untersuchen, was zu einer besseren Vergleichbarkeit der Färbungen untereinander mit geringerer Intraobserver-Variabilität führt (226). Da die Stanzen für die Herstellung des TMA sehr klein sind, ist die Gewebe-Schädigung des Spender-Blocks minimal. Die Stanzen werden senkrecht zum Block realisiert, so dass die Dicke konstant bleibt, und so weiterhin dieselbe Schnitte-Anzahl als zuvor potentiell anfertigt werden kann.

Für die Herstellung des Tissue-Microarrays (TMA) wurde FFPE-Gewebe von Resektaten des HCA-Kollektivs (siehe oben) verwendet. Aus den Spender-Paraffinblöcken wurden kleine Gewebezylinder (1 mm Durchmesser) repräsentativer Areale, die zuvor auf den Objektträgern bzw. Blöcken eingezeichnet wurden, ausgestanzt und die Stanzen in Empfänger-Paraffinblöcke eingefügt. Um die Heterogenität des Gewebes abzubilden, wurden hierbei, wenn vorhanden, zwei Stanzen HCA (bzw. FNH/HCC) sowie zwei Stanzen vom angrenzenden nicht-tumorösen Leberparenchym entnommen. Beim Vorliegen mehrerer resezierter HCAs desselben Patienten wurden jeweils zwei Stanzen pro Herd genommen.

3.2.2.2 Dünnschnitte

Ausgangspunkt für histologische und immunhistochemische Färbungen sind Dünnschnitte. Mit einem Mikrotom wurden aus FFPE-Blöcken Dünnschnitte von 2 µm Dicke angefertigt und nach Streckung in einem Wasserbad auf einen Objektträger überführt und danach in einem Wärmeschrank über Nacht getrocknet.

Histologische und immunhistochemische Färbungen lagen für einige Fälle bereits aus der Routinediagnostik vor. Fehlende Färbungen wurden für die vorliegende Arbeit ergänzend durchgeführt.

3.2.2.3 Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung

Die konventionell-histologische lichtmikroskopische Untersuchung von H&E-Färbungen dient der Untersuchung der Mikroarchitektur der Gewebe und der Morphologie der Zellen. Hämatoxylin ist ein basischer Farbstoff, der DNA und dementsprechend Zellkerne bläulich anfärbt. Eosin hingegen ist ein saurer Farbstoff, der das Zytoplasma, die Proteine und das Kollagen rötlich anfärbt.

Die H&E-Färbung wurde in einem Färbeautomaten (Leica ST4040 Linear Stainer), der für eine gleichmäßige Benetzung der Objektträger mit den jeweiligen Reagenzien sorgt, durchgeführt (Tab. 10).

Tab. 10: Protokoll der H&E-Färbung

Schritt	Reagenz	Zeit	Funktion
1	Histo-Clear II	2 x für 3 min bis 3 min 30 s	Vorbehandlung / Entparaffinieren
2	Ethanol 96 %	10 s	Rehydrierung
3	Ethanol 96 %	2 min	Rehydrierung
4	Ethanol 70 %	2 min	Rehydrierung
5	Leitungswasser	1 min	Waschschritt
6	Hämatoxylin	1 min 30 s	Färbung
7	Leitungswasser	1 min	Waschschritt
8	Bluingpuffer	1 min 30 s	Alkalinisierung
9	Leitungswasser	1 min 30 s	Waschschritt
10	Ethanol 70 %	1 min	Waschschritt
11	Eosin	1 min	Färbung
12	Ethanol 96 %	1 min	Dehydrierung
13	Ethanol 99 %	1 min	Dehydrierung
14	Ethanol 96 %	1 min	Dehydrierung
15	Ethanol 99 %	1 min	Dehydrierung
16	Histo-Clear II	1 min	Nachbehandlung

Nach der Färbung wurde mittels des Leica CV 5030 Automaten Eindeckmittel aufgetragen und ein Deckglas aufgelegt. Der Schnitt war nun fixiert und eingedeckt.

3.2.2.4 Immunhistochemische Färbungen

Immunhistochemie und Immunfluoreszenzmikroskopie ermöglichen es, mittels spezifischer Antikörper Proteine und ihre Lokalisation darzustellen. Hierbei kam die indirekte Färbemethode zum Einsatz, bei der im ersten Schritt der Primärantikörper das Zielprotein bindet. Die dann verwendeten biotinylierten Sekundärantikörper erkennen das Fc-Fragment des Primärantikörpers und binden über Biotin Streptavidin gekoppelte Peroxidase. Die Peroxidase setzt dann ein Substrat wie beispielsweise das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) zu seinem farbigen, hier braunen Endprodukt um. Vorteil der hier verwendeten indirekten Färbemethode ist die Amplifikation des Signals, so dass auch bei geringen Konzentrationen der nachzuweisenden Proteine Signale messbar sind.

Die Schnitte für die immunhistochemischen Färbungen wurden wie unter 3.2.2.1. beschrieben angefertigt, und auf beschichtete Objektträger (Adhäsionsobjektträger, SuperFrost® Plus) aufgezogen. Die Schnitte wurden dann in einem Wärmeschrank bei 37 °C über Nacht getrocknet. Am Folgetag wurde das Paraffin bei 60 °C grob entfernt und die Schnitte auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt. Zum vollständigen Entparaffinieren wurden die Schnitte 15 min in Xylol inkubiert und anschließend in einer Ethanolreihe mit absteigender Konzentration (2 x 100 %, 2 x 96 %, 2 x 70 % und 2 x 50 %) für je 5 min rehydriert und in destilliertes Wasser überführt. Im Anschluss wurde eine hitzeinduzierte Epitop-Demaskierung durchgeführt, die Grundlage der spezifischen Antikörperbindung ist (227). Durch die Formalin-Fixierung werden bestimmte Aminosäuren quervernetzt und somit für Antikörper nicht mehr zugänglich (Maskierung). Des Weiteren muss die Permeabilität für die Antikörper verbessert werden (227). Die Schnitte wurden im Dampfgerar bei 95 °C in Abhängigkeit des eingesetzten Primäantikörpers entweder für 35 min in Citratpuffer (pH = 6,1, 8 ml TRS mit Aqua dest. auf 250 ml eingestellt) oder für 20 min in Tris/EDTA-Puffer (pH = 9,8 ml TRS mit Aqua dest. auf 250 ml eingestellt) inkubiert. Dann wurden die Schnitte für 7 min unter fließendem Leitungswasser abgekühlt und für 4 min bei RT im DAKO-Wasch-Puffer inkubiert. Die Schnitte wurden danach in den Dako Cytomation Autostainer Plus überführt. Folgende Schritte (Tab. 11) wurden unter Einsatz des Nachweissystems Dako EnVision™ FLEX, High pH FärbeKit (Code K8010, Dako) automatisiert durchgeführt. Alle Reagenzien wurden in einem Volumen von 100 µl eingesetzt.

Tab. 11: Protokoll der IHC-Färbung

Schritt	Reagenzien	Zeit	Funktion
1	Wasserstoffperoxidhaltiger Phosphatpuffer (EnVision™ FLEX <i>Peroxidase-Blocking Reagent</i>).	5 min	Blockierung der endogenen Peroxidasen, um unspezifische Hintergrundfärbungen zu reduzieren
2	DAKO-Waschpufferlösung (EnVision™ FLEX <i>Wash Buffer</i>)	1-5 s	Waschschritt
3	Blockierlösung (<i>Protein Block Serum-Free Ready-to-use, Code X0909</i>)	15 min	Maskierung freier Proteinbindungsstellen, so dass unspezifische Bindungen am Primäranikörper unterdrückt werden
4	DAKO-Waschpufferlösung (EnVision™ FLEX <i>Wash Buffer</i>)	1-5 s	Waschschritt
5	Verdünnter Primäranikörper (in En Vision™ FLEX <i>Antibody Diluent</i>) + dazugehörige Vorbehandlung	Je nach Antikörper, siehe Tab. 4	Bindung des Primäranikörpers an das Zielantigen
6	DAKO-Waschpufferlösung (EnVision™ FLEX <i>Wash Buffer</i>)	1-5 s	Waschschritt
7	Biotinylierter Sekundäranikörper	15 min	Bindung des Sekundäranikörpers an das Fc-Fragment des Primäranikörpers
8	DAKO-Waschpufferlösung (EnVision™ FLEX <i>Wash Buffer</i>)	1-5 s	Waschschritt
9	Enzymkonjugiertes Tertiärreagenz (Streptavidin HRP, <i>ready-to-use</i>)	20 min	Bindung von Peroxidasemolekülen an Biotin-Molekülen des Sekundäranikörpers
10	DAKO-Waschpufferlösung (EnVision™ FLEX <i>Wash Buffer</i>)	1-5 s	Waschschritt
11	Chromogen-Lösung (in wasserstoffperoxidhaltiger Substratpufferlösung verdünnte DAB-Lösung, EnVision™ FLEX <i>Working Solution</i>)	10 min	Enzymatische Farbreaktion: führt zu einem braunen Endprodukt am Ort der Antikörperbindung
12	DAKO-Waschpufferlösung (EnVision™ FLEX <i>Wash Buffer</i>)	1-5 s	Waschschritt
13	Hämatoxylin (EnVision™ FLEX Hämatoxylin)	5 min	Gegenfärbung, blaue Färbung der Zellkerne

Die gefärbten Schnitte werden aus dem Automat genommen und 3 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen und dann in destilliertes Wasser überführt. Es folgt eine aufsteigende Ethanolreihe (2 x 50 %, 2 x 70 %, 2 x 96 % und 2 x 100 % Ethanol) um die Schnitte zu dehydrieren. Im Anschluss wurden die Schnitte 3 x für 5 min in Xylol inkubiert und mit einem Tropfen Etallan eingedeckt und getrocknet.

3.2.2.5 Immunfluoreszenzmikroskopie

In dieser Arbeit wurde für Immunfluoreszenz-Färbungen kryokonserviertes Gewebe verwendet.

Mit einem Kryostat wurden von humanen Lebergewebe 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Adhäsionsobjektträger (SuperFrost® Plus) aufgezogen. Zur Fixierung wurde eine 3,7 %ige Formaldehydlösung in PBS angesetzt, auf jeden Gewebeschnitt pipettiert und für 10 min bei RT inkubiert. Dann wurde bei RT 3mal für 5 min mit PBS gewaschen.

Wie bei der Immunhistochemie wurde auch bei der Immunfluoreszenzmikroskopie die indirekte Färbemethode angewandt. Um das Gewebe für die Antikörper zugänglich zu machen, erfolgte zunächst eine Permeabilisierung und dann Blockierung mit 500 µl 0,1 % Triton X-100 + 10 % FBS in für 30 min bei 37 °C. Der in der Blockierlösung (PBS mit 0,1% Triton X-100 + 10 % FBS) verdünnte (Tab. 4) Primärantikörper wurde auf die Schnitte aufgebracht und 30 min bei RT inkubiert. Dann wurde 3mal für 5 min mit 500 µl PBS + 0,1 % Triton X-100 gewaschen. Danach folgt die Inkubation mit dem entsprechenden Fluorophor-konjugierten Sekundärantikörper bzw. mit DAPI, verdünnt in PBS mit 0,1 % Triton X-100 + 1 % FBS (Tab. 5). Die Inkubation erfolgte für 30 min bei RT in einer dunklen Kammer als Schutz vor dem Ausbleichen. Im Anschluss wurde erneut 3mal mit PBS + 0,1 % Triton X-100 gewaschen. Die Proben wurden mit Mowiol eingedeckt und über Nacht bei 4 °C in einer dunklen Kammer getrocknet. Die Schnitte der gefärbten Gewebeproben wurden mit dem Konfokalmikroskop SP8 von Leica Biosystem angeschaut und Bilder aufgenommen.

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

Die im Nachfolgenden aufgeführten Methoden befassen sich mit der Expressionsanalyse verschiedener Gene auf Proteinebene in kryoasserviertem humanem Lebergewebe.

3.2.3.1 Isolierung von Gesamtprotein aus kryoasserviertem Gewebe

Für die Isolierung von Gesamtproteinen aus kryoasserviertem humanem Gewebe erfolgte zunächst ein Zellaufschluss mittels Homogenisator. Hierzu wurden jeweils ca. 100 Schnitte von 5 µm Dicke mit einem Kryostat-Mikrotom bei -20 °C angefertigt und in eine 2 ml Homogenisator Lysing Tube (Perccellys® Lysing Plus Ceramic Beads) übertragen. Die in dem Probengefäß enthaltenen Keramikugeln unterstützen den Zellaufschluss mechanisch. Die Gewebeschnitte wurden mit 500 µl Lysepuffer (Co-IP-Puffer) und 1 % Protease- und Phosphatase-Inhibitor sowie 1 % Triton X-100 vermischt und anschließend im Homogenisator für 20 s bei 6.500 U/min lysiert. Im Anschluss wurde

das Proteinlysate 5 min bei 20 °C und 12.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand, der die löslichen Proteine enthält, wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und das Sediment verworfen.

3.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Lysaten erfolgte photometrisch mittels Bradford-Methode (228). Im Bradfordreagenz befindet sich der Coomassie-Brillant-Blau Farbstoff, der mit Proteinen Komplexe bildet. Durch die Komplexe verändert sich die Licht-Absorption der Lösung in Abhängigkeit der Proteinkonzentration und somit ist die Änderung der Farbe ein Maß für die Proteinmenge (228).

Vor der Messung wurde eine Eichkurve mit bovinem Serumalbumin (BSA) einer bekannten Proteinkonzentration erstellt: es wurden jeweils 0 µl, 2,5 µl, 5 µl, 7,5 µl, 10 µl und 15 µl 1mg/ml BSA mit 1 ml destilliertem Wasser verdünntem Bradfordreagenz (Verhältnis 1:5) vermischt. Für die Messung der Proteinlysate unbekannter Proteinkonzentrationen wurden jeweils 2,5 µl Proteinprobe mit 1 ml verdünnter Bradfordreagenz vermischt und gevortext. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT wurde dann 200 µl pro Ansatz in eine 96-Well Messplatte pipettiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm im Spektralphotometer (Tecan Spark 10M) gemessen. Mit der anhand der BSA-Standardreihe erstellten Eichkurve wurde später aus der Geradengleichung die Proteinkonzentration der unterschiedlichen Proben errechnet.

3.2.3.3 Diskontinuierliche Protein-Gelelektrophorese nach Lämmli

Die diskontinuierliche Protein-Gelelektrophorese (*SDS-PAGE*, „*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*“) dient der Auftrennung der Proteine unabhängig von ihrer elektrischen Ladung nach ihrer Molekülmasse (229). Sie basiert auf der unterschiedlichen Mobilität der Proteine im elektrischen Feld. Proteine mit einer geringen Molekülmasse wandern am schnellsten durch das Gel, Proteine mit einer Molekülmasse wandern hingegen langsamer durch das Gel. Je höher hierbei die Polyacrylamidkonzentration des Gels ist, desto kleiner ist die Porengröße und dementsprechend langsamer wandern die Proteine durch das Gel (229). Das Polyacrylamidgel (Tab. 12) besteht aus einem Sammel- (oberer Anteil) und einem Trenngel (unterer Anteil). Das Sammelgel dient der Konzentrierung der Proteine in der Lauffront. Im Trenngel erfolgt die eigentliche Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht (229, 230).

Tab. 12: Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen

Chemikalien	Trenngel (10 %)	Trenngel (12 %)	Sammelgel
30 % Acrylamid-Mix*	1,7 ml	2 ml	0,33 ml
10 % SDS	50 µl	50 µl	20 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	20 µl
TEMED	2 µl	2 µl	2 µl
Puffer	1,3 ml Tris-HCl 1,5 M, pH = 8,8	1,3 ml Tris-HCl 0,5 M, pH = 8,8	0,5 ml Tris-HCl 0,5 M, pH = 6,8
Reinstwasser	2 ml	1,7 ml	1,15 ml

Zusammensetzung aus Trenn- und Sammelgel. In Abhängigkeit der aufzutrennenden Proteingröße wurde ein 10 %- oder ein 12%-iges Trenngel benutzt. APS = Ammoniumpersulfat; TEMED = Tetramethylethylendiamin; SDS = Natriumdodecylsulfat. *Acrylamid-Stammlösung mit 0,8 % Bisacrylamid.

Alle Komponenten des Trenngels wurden zusammenpipettiert und die Polymerisation mit APS und TEMED gestartet. Die Flüssigkeit wurde dann zügig zwischen zwei Glasplatten pipettiert und mit 500 µl Isopropanol überschichtet. Nach Abschluss der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen, residuelles Isopropanol mit VE-Wasser heruntergespült und anschließend das VE-Wasser mit Filterpapier entfernt. Dann wurde auf das auspolymerisierte Trenngel das Sammelgel pipettiert und mit einem 15-Well-Kamm versehen. Die auspolymerisierten Gele wurden in die Laufkammer Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cells eingespannt. Die Laufkammer wurde anschließend mit 1 x SDS PAGE Laufpuffer aufgefüllt. Für alle Aliquots wurde die gleiche Proteinmenge (jeweils 50 µg Protein) mit 6 x Protein-Probenpuffer und mit entsprechendem Co-IP Puffer auf 30 µl Gesamtvolumen eingestellt. Der Ansatz wurde 10 min bei 95 °C inkubiert, um die Proteine zu denaturieren. Anschließend wurden die Geltaschen, nachdem sie mit Laufpuffer gespült wurden, mit den Proben bzw. mit 5 µl eines Proteinstandards (PageRuler™ Prestained Protein Ladder), der als Größenmarker diente, beladen. Damit eine optimale Auftrennung erfolgte, wurden die Proteine im Sammelgel etwa 10 min bei 50 V fokussiert, bis die Lauffront die Grenze Sammel-/Trenngel erreichte. Die Elektrophorese lief dann bei 100 V etwa zwei Stunde bis die Lauffront das Ende des Trenngels erreichte.

3.2.3.4 Immunblot und Signaldetektion

Die im SDS-Gel der Größe nach aufgetrennten Proteine wurden mit dem Trans-Blot® Turbo™ Transfer System auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Auf die untere Elektrodenplatte der Blotkassette wurden zunächst drei in Transferpuffer getränkte Filterpapiere aufeinandergelegt, dann die Nitrozellulosemembran und das in Blot-Puffer äquilibrierte Polyacrylamidgel gelegt und oben mit drei weiteren aufeinanderliegenden luftblasenfreien Filterpapieren abgedeckt. Dann wurde die Kassette

mit der Elektrodenplatte verschlossen. Die Proteine des Polyacrylamidgels wurden während des Transfers bei 25 V und 1 A innerhalb von 30 min auf die Nitrozellulosemembran übertragen und danach 10 s mit Ponceau S, einem Azofarbstoff, der alle Proteine reversibel und unspezifisch bindet, angefärbt und anschließend mit VE-Wasser 3mal gewaschen. So konnte kontrolliert werden, dass der Transfer richtig funktionierte und irrelevante Membrananteile abgeschnitten werden konnten. Um den Farbstoff zu entfernen, wurde die Nitrozellulosemembran in TBS + 0,05 % Tween 20 inkubiert. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen über Nacht bei RT auf einem Rollenschüttler in 10 ml TBS + 0,05 % Tween 20 mit 5 % (w/v) Magermilchpulver (Blockierlösung) platziert. So wurden freie Proteinbindungsstellen auf der Membran blockiert und eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers verhindert. Die Blockierlösung wurde am Folgetag durch 5 ml frische Lösung, in der der Erstantikörper entsprechend verdünnt (Tab. 14) war, ersetzt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte für 1 h bei RT auf einem Rollenmischer. Die Membran wurde dann dreimal für 10 min mit 10 ml TBS + 0,05 % Tween 20 gewaschen, damit ungebundener Antikörper entfernt werden konnten. Danach folgte ebenfalls unter ständigem Rollen eine 1-stündige Inkubation bei RT mit dem Spezies-spezifischen Reporterenzym Meerrettichperoxydase-gekoppeltem Sekundärantikörper (Tab. 15), welcher in 5 ml der Blockierlösung verdünnt wurde. Vor der Signaldetektion wurde die Membran dreimal für je 10 min mit 10 ml TBST gewaschen.

Um den Immunblot zu entwickeln, wurde die Nitrozellulosemembran für 1 min in ECL (enhanced chemoluminescent)-Entwicklungslösung inkubiert, die wie folgt zusammengesetzt war:

10 ml 0,1 M Tris-HCl pH = 8,5
50 µl Luminol (250 mM in DMSO)
25 µl Cumarinsäure (90 mM in DMSO)
4 µl Wasserstoffperoxid 30 %-ig

Die Oxidation von Luminol in Gegenwart von Wasserstoffperoxid und der als Enhancer fungierten Cumarinsäure wurde durch die am Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxydase katalysiert. Diese enzymatische Reaktion erzeugte eine Lumineszenz, die mit dem Chemolumineszenzimager Fusion Solo S detektiert wurde. Diese Methode ist semiquantitativ, da das Chemolumineszenzsignal der ECL-Entwicklungslösung nur bis zu einer gewissen Proteinmenge linear ist. Um eine Membran mit unterschiedlichen Primärantikörpern entwickeln zu können, mussten die gebundenen Antikörper wieder entfernt werden (Stripping). Im sauren Milieu wurden die gebundenen Antikörper durch die sequentielle Inkubation von zwei „Stripping-Puffern“ von pH = 2,8 und 2,2 denaturiert und lösten sich ab. Es wurden jeweils 10 ml des Puffers auf die Membran pipettiert und 10 min wippend inkubiert. Abschließend wurde die Nitrozellulosemembran 10 min mit TBST gewaschen.

3.2.4 Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1 DNA-Analyse (Sanger Sequenzierung)

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger (231) ist ein molekularbiologisches Analyseverfahren, das die Nukleotidabfolge eines definierten DNA-Abschnitts (Lokus) nach PCR-Amplifikation bestimmt und so zur Identifikation von Mutationen herangezogen werden kann. In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine Mutationsanalyse des *CTNNB1*-Gens. Dafür wurde das zu untersuchende Tumorgewebe auf den Schnitten eingezeichnet und anschließend abgekratzt, so dass spezifisch nur das Tumorgewebe untersucht werden konnte.

3.2.4.1.1 Extraktion genomischer DNA aus FFPE-Gewebe

Die DNA-Extraktion erfolgte mittels Maxwell® RSC Automats und Maxwell® RSC FFPE Plus DNA Kit. Pro Probe wurde 180 µl Inkubationspuffer in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß vorgelegt. Die auf den Objektträgern markierten Tumor-Areale wurden von den Objektträgern abgekratzt. Je nach Größe des angezeichneten Areals wurden hierbei 1 bis 12 ungefärbte FFPE-Schnitte von 6-8 µm Dicke verwendet. Wenn der Block nur aus Tumorgewebe bestand, dann wurde ein Röllchen direkt vom FFPE-Block für die Isolierung genommen. Das Gewebe wurde im Anschluss in ein Eppendorf-Gefäß mit Inkubationspuffer überführt. Dazu wurde 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) gegeben und gemischt. Proteinase K dient der Verdauung von Proteinen, vor allem von mit DNA-assoziierten Proteinen, so dass im Anschluss eine PCR durchgeführt werden konnte. Danach wurde kurz zentrifugiert und sichergestellt, dass sich das Material komplett im Lysispuffer befindet. Dann wurde das Material über Nacht bei 70 °C, die zwei ersten Stunden schüttelnd, inkubiert. Anschließend lief das Programm FFPE Plus DNA AS1720 vom Maxwell® RSC Automat.

3.2.4.1.2 Nukleinsäurekonzentrationsbestimmung

DNA- und RNA- Konzentrationen wurden photometrisch mittels NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Nanodrop-Programms ND1000) bestimmt. Bei 260 nm wird die Absorption von Nukleinsäuren gemessen. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes (232, 233) wird die Nukleinsäurekonzentration errechnet. Zusätzlich ermöglicht die Messung der Absorption bei 230 nm die Detektion organischer Substanzen, und bei 280 nm die von Proteinen und Phenolen. So geben die Quotienten der Absorption bei 260 nm (A_{260}) und 280 nm (A_{280}) bzw. bei 230 nm (A_{230}) und 260 nm Aufschluss über die Reinheit der DNA. Im Idealfall liegt der Quotient A_{260}/A_{280} bei 1,8 für DNA und 2,0 für RNA, und der Quotient $A_{260}/A_{230} \geq 2,0$ sowohl für DNA als auch RNA (232, 233). Für die Messung wurde 1 µl Probe verwendet. Die Messung wurde mindestens einmal wiederholt. Sollten die Werte um mehr als 10 %

unterschiedlich gewesen sein, wurde ein drittes Mal gemessen. Erst wenn mindestens zwei Werte weniger als 10 % Unterschied aufwiesen, konnten diese zur Bildung des Mittelwerts herangezogen werden.

3.2.4.1.3 Amplifikation von DNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (englisch: polymerase chain reaction, PCR) dient der Amplifizierung von spezifischen DNA-Sequenzen und besteht aus den Reaktionsschritten Denaturierung der DNA-Stränge, Hybridisierung von Primern und Elongation mittels DNA-Polymerase (234). Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurden PCR Mastermixe angefertigt (Tab. 13). Puffer und Polymerase wurden von der Firma Roche Diagnostics (Basel, Schweiz) bezogen und nach Angaben des Herstellers verwendet. Falls unter Standardbedingungen keine Amplifikation möglich war, wurde eine nested-PCR durchgeführt. Bei einer nested-PCR wird aus dem Produkt einer ersten PCR-Reaktion eine zweite mit unterschiedlichen Primern gestartet, um die Sensitivität und Spezifität der gewünschten Zielsequenz zu erhöhen (235). Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler Gene Amp PCR System 9.700 (Tab. 14).

Tab. 13: Zusammensetzung der real-time PCR-Mastermixe

Standard PCR		Nested PCR	
Komponente	Volumen	Komponente	Volumen
Template	2 µl	Template	0,8 µl
2x Q-Mix	10,5 µl	Q-Fast-MM	10 µl
bCAT-Primermix-1	8 µl	bCAT-Primermix-N	9,2 µl
100 µM bCAT Forward-Primer	0,075 µl	100µM bCAT-SCA Forward-Primer	0,075 µl
100 µM bCAT Reverse-Primer	0,075 µl	100µM bCAT- SCA Reverse-Primer	0,075 µl
H ₂ O	7,85 µl	H ₂ O	9,05 µl
Gesamtvolumen	20,5 µl	Gesamtvolumen	20 µl

Tab. 14: PCR-Programme des Thermocyclers GeneAmp PCR System 9.700

Schritte	PCR-Programm 1 Standard PCR		PCR-Programm N Nested PCR	
	Temperatur	Dauer	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	15 min	95 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	30 s (x 35)	96 °C	5 s (x 35)
Hybridisierung	62→57 °C dann 56 °C	90 s (x 6) dann 30 s (x 29)	60 °C	5 s (x 35)
Polymerisation	72 °C-	45 s (x 35)	68 °C	7 s (x 35)
Finale Polymerisation	72 °C	7 min	72 °C	1 min

3.2.4.1.4 Sequenzierung

Nach der PCR-Amplifikation mussten vor der Sequenzierung zunächst die nicht integrierten Primer und dNTPs aus dem Reaktionsansatz entfernt werden. Hierzu wurden 5 µl PCR-Produkt mit 2 µl ExoSAP-IT Affymetrix versetzt, und dann in den Cycler für 15 min bei 37 °C und anschließend für 15 min bei 80 °C inkubiert. Danach folgte eine weitere PCR-Reaktion mit Fluoreszenz-markierten dNTPs sowie Kettenabbruch-ddNTPs, für die der Sequenzieransatz wie folgt angesetzt wurde:

- 1 µl PCR-Produkt nach ExoSAP Behandlung
- 1 µl 5 µM Primer (Forward oder Reverse)
- 2 µl CEQ DTCS QuickStart Kit
- 0,5 µl CEQ-Buffer
- 5,5 µl H₂O

Der Sequenzierungszyklus (96 °C für 20 s, dann 50 °C für 20 s und letztlich 60 °C für 4 min) wurde 30mal wiederholt. 1 ml Aliquot wurde in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Im Anschluss wurden die PCR-Produkte aufgereinigt. Zu diesem Zweck wurde 10 µl MagSI-DT Removal Magnetic Beads mit 42 µl 85 % Ethanol gewaschen und 5 min inkubiert. Dann wurde die Mischung in Vertiefungen der Magnetplatte übertragen und der Überstand abpipettiert. Im Anschluss wurde 100 µl 85 % Ethanol zum Waschen dazugegeben und für 30 s inkubiert. Dann wurde das Ethanol abpipettiert. Der Waschschrift mit Ethanol wurde einmal wiederholt. Die Beads wurden 1 min getrocknet, danach wurde 40 µl CEQ™ Sample Loading Solution (SLS) dazu pipettiert. Der Ansatz wurde gemischt, 5 min inkubiert und komplett in die Platte des Sequenzierers umpipettiert. 1 Tropfen Öl wurde dazugegeben. Diese Platte wurde kurz auf die Magnetplatte geführt, bis die Beads unten waren. Schließlich konnte der Sequenzierer (Beckman Coulter CEQ-8000 Analyser) gestartet werden.

3.2.4.2 RNA-Analyse

3.2.4.2.1 Isolierung von Gesamt-mRNA aus kryoasserviertem Gewebe und Zellkulturen

Um die RNA aus kryoasserviertem humanem Lebergewebe zu isolieren, wurden pro Probe ca. fünfzig 5 µm dicke Gewebeschnitte mit einem Kryostat bei - 20 °C angefertigt und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß bei - 80 °C überführt. Für die Isolierung von RNA aus Zellkulturen wurde auf die Zellen nach dem Entfernen des Nährmediums 1 ml Trizol Reagent pipettiert, die Zellen durch Auf- und Abpipettieren lysiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die Gewebeschnitte wurden ebenfalls mit 1 ml Trizol Reagent versetzt und durch Auf- und Abpipettieren lysiert. Bei beiden Verfahren wurde im Anschluss pro Probe 200 µl Chloroform zugegeben, 15 s gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Die

Proben wurden bei 11.200 U/min und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Dabei bilden sich drei Phasen: in der untersten Phase, der organischen Phase, befinden sich organische Moleküle, in der mittleren, der sogenannten Interphase, die DNA und in der obersten wässrigen Phase (ca. 500 µl) die RNA. Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß transferiert. Zur Fällung der RNA wurde das gleiche Volum Isopropanol zugegeben und das Gefäß mehrfach invertiert. Der Ansatz wurde dann 10 min auf Eis inkubiert und im Anschluss bei 11.200 U/min und 4 °C für 10 min zentrifugiert, so dass die RNA präzipitierte. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das RNA-Pellet 2mal mit 80 %igem Ethanol gewaschen. Hierbei wurden 500 µl 80 % Ethanol (v/v) auf das Pellet pipettiert, mehrfach invertiert und im Anschluss bei 8.800 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in 50 µl nukleasefreiem Wasser für 15 min bei 55 °C zurückgelöst.

Anschließend wurde von jeder Probe 1 µl rückgelöste RNA photometrisch die RNA-Konzentration mit dem Nanodrop 1000 Spectrophotometer bestimmt.

3.2.4.2.2 cDNA-Synthese

Für die quantitative Transkriptionsanalyse mittels Echtzeit-PCR (englisch: real-time PCR) wurde die isolierte RNA mittels reverser Transkription in die entsprechende komplementäre DNA (englisch: *complementary DNA*, cDNA) umgeschrieben. Dies erfolgte unter Einsatz einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der reversen Transkriptase (RT) und sogenannten Random Hexamer-Oligonukleotid-Primern, die randomisiert an die RNA hybridisieren. Somit werden alle Bereiche der RNA in cDNA abgebildet (236, 237). Pro Reaktionsansatz wurde 2 µg RNA eingesetzt und mit nukleasefreiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl eingestellt. Pro Probe wurde das gleiche Volumen (10 µl) zweifachen Mastermixes dazugegeben, der wie folgt angefertigt wurde:

- 3,7 µl nukleasefreies Wasser
- 2 µl 10 x Reverse Transkription-Random Primer
- 0,8 µl 25 x dNTP Mix (100mM)
- 2 µl 10 x RT (Reverse Transkription)-Puffer
- 1 µl Multi Scribe Reverse Transkriptase 50 U/µl
- 0,5 µl RNase Inhibitor

Die Reaktionsansätze wurden auf Eis pipettiert. Die Reaktion wurde im Thermocycler (Thermocycler GeneAmp® PCR System 9.700) mit dem in der Tab. 15 dargestellten Programm durchgeführt. Die cDNA wurde dann 1:4 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt und diente als Template für die real-time PCR.

Tab. 15: Thermocycler-Programm für die cDNA-Synthese

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (min)
1	25	10
2	37	120
3	85	5
4	4	∞

3.2.4.2.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Eine Echtzeit-PCR dient der Quantifizierung der Expression unterschiedlicher Gene auf mRNA-Ebene. Hierfür wird eine Kombination aus Amplifikation definierter, von Primerpaaren flankierter Bereiche der cDNA mittels DNA-Polymerase und Quantifizierung dieser Amplifikate durch eine Fluoreszenzmessung mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green verwendet, der in doppelsträngige DNA interkaliert (238). In jedem PCR-Zyklus kommt es zu einem, von der Menge des Amplikons abhängigen Anstieg des Fluoreszenzsignals. Geht man von einer 100 % Effizienz der PCR aus (Verdopplung der Amplikons pro Zyklus), so kommt es bei exponentieller Amplifikation der Amplikons auch zu exponentieller Zunahme der Fluoreszenzsignalstärke.

Die gefriergetrockneten Primer (100 µM Stock-Lösung) wurden in nukleasefreiem Wasser auf 5 µM eingestellt. Die PCR-Ansätze für die real-time PCR wurden wie folgt angefertigt:

- 1 µl cDNA (1:4 verdünnt)
- 5 µl SYBR™-Green Mastermix
- 0,5 µl forward und reverse Primer je 5 µM
- 3,5 µl doppelt destilliertes Wasser

Die Effizienz der Primer wurde zuvor mit Hilfe einer Standardkurve unter der Verwendung unterschiedlicher cDNA-Konzentrationen ermittelt. Die Effizienz der Primer lag hierbei bei $100 \pm 10\%$. Eine Schmelzkurvenanalyse am Ende der PCR-Reaktion diente der Überprüfung, ob nur ein einziges Amplikon bei der Reaktion erzeugt wurde. Als Negativkontrolle wurde nukleasefreies Wasser verwendet. Zur Analyse wurde das Standardprogramm des QuantStudio™ 3 real-time PCR Systems (Tab. 16) und die zugehörige QuantStudio™ Design und Analyse Software (Thermo Fisher Scientific) verwendet.

Tab. 16: Programm der Echtzeit-PCR

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer
1	50	2 min
2	95	10 min
3	95	15 s
4 (x 40)	60	1 min
5 (x 40)	95	15 s
6	60	1 min
7	95	1 s

3.2.4.2.4 Auswertung der Echtzeit-PCR-Ergebnisse

Bei der Echtzeit-PCR wird für jedes Amplikon ein sogenannter CT-Wert (Schwellenwert-Zyklus, englisch: *Cycle Threshold*) ermittelt (238). Der CT-Wert gibt die Anzahl der Zyklen an, die durchlaufen werden, bis das gemessene Fluoreszenzsignal erstmalig signifikant die Hintergrundfluoreszenz (basale Fluoreszenz) überschreitet (238). Der CT-Wert ist umso niedriger, je mehr DNA in der Ausgangsmenge vorhanden ist. Ein um eine Einheit geringerer CT-Wert entspricht damit einer Verdopplung der Menge an Ausgangs-DNA bzw. respektiver RNA-Startmenge.

Für die Berechnung der relativen Expression eines Zielgenes wird auf ein sogenanntes Housekeeping-Gen, normalisiert, dessen Expression proportional zur Gesamtgenexpression einer Zelle ist, und somit Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA ausgleicht (238). In dieser Arbeit wurde das *RNA18S*-Gen (ribosomale Untereinheiten), dessen Expression trotz äußerer Einflüsse annähernd stabil bleibt, als Referenzgen verwendet. Um die relative Expression zu berechnen, wird der CT-Wert des Referenzgens vom CT-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert (238):

$$\text{CT (Zielgen)} - \text{CT (Housekeeping Gen)} = \Delta\text{CT}.$$

Geht man von einer 100 %igen Effizienz aus, d. h. einer Verdopplung der Amplifikate pro Zyklus, kann dann die relative Expression wie folgt kalkuliert werden: relative Expression = $2^{-\Delta\text{CT}}$. Bei allen Untersuchungen wurden die Reaktionsansätze in Duplikaten erstellt (technische Replikate): pro Gen und Fall wurden zwei ΔCT -Werte und zwei relative Expressionen errechnet. Zusätzlich wurden Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen berechnet.

Bei Experimenten mit Bezugspunkt bzw. Kontrollgruppe konnte ein $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert errechnet werden. Dieser wurde wie folgt berechnet (238):

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT (Versuchsbedingung)} - \Delta\text{CT (Kontrollgruppe)}.$$

Zur Berechnung der relativen Genexpression wurde die $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ -Methode verwendet (238, 239). Der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert der Kontrollgruppe wurde wie folgt berechnet:

$$\Delta\text{CT Kontrolle Replik 1} - \Delta\text{CT Kontrolle Replik 2}.$$

Der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert der Versuchsbedingung wurde wie folgt berechnet: $\Delta\text{CT Versuchsbedingung Replik 1} - \Delta\text{CT Kontrolle Replik 1}$. Mit den CT-Werten des zweiten Replikats wurde analog verfahren. Im Anschluss wurden die ermittelten $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte in folgende Formel eingesetzt:

$$x = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}.$$

Für die Kontrollgruppe ergibt sich hierbei ein Wert von etwa 1. Der Wert der Versuchsbedingung gibt die Änderung der Expression in Bezug zur Kontrollgruppe an.

3.2.5 Zellbiologische Methoden

3.2.5.1 Passagieren von Zellen

Die fetale humane Nierenzelllinie HEK293T wurde im Kulturmedium (siehe 3.1.9) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und je nach Dichte 2-3mal pro Woche passagiert. Hierzu wurde nach Absaugen des Kulturmediums mit 2 ml PBS gewaschen und dann mit 1-2 ml Trypsin-EDTA Lösung (0,25 %) 3 min lang bei 37 °C behandelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Kulturmedium abgestoppt und die Zellen resuspendiert. Ein Zehntel der Suspension wurde für die erneute Aussaat der Zellen verwendet (1:10).

3.2.5.2 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl in der Zellsuspension nach Ablösen durch Trypsinisierung wurde mittels Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop durchgeführt. 10 µl der Zellsuspension wurden auf den Objektträger der Zählkammer pipettiert und mit einem Deckgläschen abgedeckt. 4 Eckquadrate (1 Eckquadrat= 1 µl) wurden ausgewählt. Die Berechnung der Zellzahl pro ml wurde durch folgende Formel angegeben: Mittelwert der 4 Eckquadrate x 10⁴ = Zellzahl pro ml.

3.2.5.3 Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)

Eine Transfektion ist ein Verfahren zur Einbringung von Fremdnukleinsäuren, wie beispielsweise Plasmid-DNA, in eukaryotische Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde für das Einbringen der Fremd-DNA Polyethylenimin (PEI) verwendet (240, 241). Am ersten Tag wurden 1×10^6 HEK293T-Zellen in 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät. 24 h später wurde der Transfektionsansatz wie folgt angesetzt:

DNA-PBS (Lösung A): 180 μ l PBS mit 10 μ g DNA unmittelbar vor Transfektion vermischen

PEI-PBS (Lösung B): 216 μ l 2 mM PEI in PBS

1 h vor Transfektion wurde das Zellkulturmedium gewechselt. Lösung B wurde in Lösung A durch Hoch- und Runter-Pipettieren, und im Anschluss 5 s Vortexen gemischt. Der Ansatz wurde dann 5 min bei RT inkubiert und im Anschluss tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert.

3.2.6 Auswertungskriterien

3.2.6.1 Histopathologische Begutachtung

Histopathologische Charakteristika von HCAs, sowie zum Vergleich von FNHs und HCCs, wurden anhand folgender Parameter beurteilt: flächige Einblutungen, Immunzellinfiltrat und Dilatation der Sinusoide (*Peliosis hepatis*) (Tab. 17).

Tab. 17: Scoring histomorphologischer Parameter von Lebertumoren

Parameter	Kriterium	Score
Dilatation der Sinusoide	Keine	0
	Leicht ektatische Sinusoide (unter ein Hepatozyt breit)	1
	Deutlich ektatische Sinusoide (unter ein Hepatozyt breit)	2
Immunzellinfiltrat	Keine oder nur wenige verstreute Immunzellen	0
	Mäßiges Immunzellinfiltrat mit einzelnen Immunzell-Aggregaten	1
	Ausgeprägtes und diffuses Immunzellinfiltrat mit größeren Immunzellaggregaten	2
Einblutungen	Keine Einblutungen	0
	Kleine umschriebene, nur mikroskopisch identifizierbare Einblutungen (unter 3 mm)	1
	Große, zum Teil flächenhafte und makroskopisch gut identifizierbare Einblutungen (über 3 mm)	2

Zudem wurde der Steatosegrad des Tumors und des nicht-tumorösen Leberparenchyms bestimmt (Tab. 18) als prozentualer Anteil der Lipidtropfen am Parenchym. Für die Beurteilung der Steatose des angrenzenden Leberparenchyms wurde das Scoringssystem nach Kleiner und Koautoren (242) eingesetzt. Bei den Tumoren und Tumor-artigen Läsionen (HCAs/FNHs/HCCs) wurde eine Untergrenze von 10 % Steatose definiert, wie in der Veröffentlichung von Paradis und Koautoren (243).

Tab. 18: Scoring des Steatosegrads

Kategorie	Kriterium	Score
Nicht-tumoröses Leberparenchym, nach Kleiner und Koautoren (242)	< 5 %	0
	5-33 %	1
	34-66 %	2
	> 66 %	3
Tumoren und Tumor-artige Läsionen, nach Paradis und Koautoren (243)	< 10 %	0
	10-33 %	1
	34-66 %	2
	> 66 %	3

3.2.6.2 Immunhistochemische Begutachtung

Die Bewertungskriterien der immunhistochemischen Färbungen wurden folgendermaßen gewählt:

GS (Glutaminsynthetase): eindeutig positiv, wenn eine flächig diffuse, genau so starke Intensität der zytoplasmatischen Färbung der Hepatozyten, wie in Zone 3 des nicht-tumorösen Leberparenchyms nachweisbar ist. Für die weiteren möglichen GS-Muster siehe Tab. 3.

AA (Amyloid A): positiv, wenn mindestens 10 % der HCA-Zellen eine zytoplasmatische AA-Färbung aufweisen.

CRP (C-reaktives Protein): positiv, wenn mindestens 50 % der HCA-Zellen eine zytoplasmatische CRP-Färbung aufweisen.

ASS1 (Argininosuccinat-Synthase 1): positiv, wenn eine diffuse Überexpression von ASS1 im HCA im Vergleich zum angrenzenden Leberparenchym sichtbar ist.

Ki67: prozentualer Anteil der positiven Tumorzellen.

L-FABP (L-FABP: Liver-type Fatty Acid Binding Protein, FABP1): kompletter Ausfall oder sehr stark reduzierte Färbung im HCA im Vergleich zum angrenzenden Leberparenchym.

- Perilipin 1 und 2 - Prozentualer Anteil der von gefärbten Lipidtropfen eingenommenen Parenchymfläche
- Prozentualer Anteil der gefärbten Hepatozyten
- Intensität der Färbung

Perilipin 3-5 Intensität der zytoplasmatischen Färbung (Tab. 19)

Die Beurteilung der Intensität der Perilipin 1- und 2-Färbeintensitäten erfolgte in Analogie mit dem HER2-neu Scoring System: 0=keine Färbung, 1=schwache Färbung, 2=mäßige Färbung und 3= starke Färbung (244). Bei Perilipin 3-5 wurde die Intensität der zytoplasmatischen Färbung der Hepatozyten wie in der Tab. 19 angegeben ausgewertet.

Tab. 19: Scoring-System zur Beurteilung der Färbeintensitäten

Kriterium	Score
Keine Färbung in 400-facher Vergrößerung	0
In 400-facher Vergrößerung schwache, schlecht sichtbare zytoplasmatische Färbung	1
In 400-facher Vergrößerung deutliche Färbung mit hellbraunem bis braunem zytoplasmatischem Färbemuster	2
Bereits in 200-facher Vergrößerung starke Färbung mit dunkelbraunem zytoplasmatischem Farbmuster	3

3.2.7 Digitale Bildanalyse

Für die digitale Auswertung der Färbeintensitäten wurden die gefärbten TMA-Schnitte und einzelnen Gewebe-Vollschnitte mit dem Hamamatsu Nanozoomer S60 in 40-facher Vergrößerung eingescannt. Die Auflösung der Bilder betrug hierbei 0,23 $\mu\text{m}/\text{Pixel}$. Anschließend erfolgte die digitale Bildanalyse mit der Open Source Software QuPath (Ver.0.1.2.; Centre for Cancer Research & Cell Biology, Queen's University Belfast, Irland). Quellcode sowie ausführliche Dokumentation zu den unterschiedlichen QuPath Funktionen sind online unter <https://qupath.github.io> zu finden (245). Nachdem die Bilder in QuPath importiert wurden, wurde die Bildanalyse mit einem *Preprocessing* (Vorverarbeitung) begonnen, nämlich dem *Estimate Stain Vector*. Zu diesem Zweck wurde ein repräsentatives Areal mit den unterschiedlichen Farbmustern des Bildes, inklusiv weißer Hintergrund, mit dem Einzeichnungstool ausgewählt. Somit sollte die Software eine repräsentative Farbmusterpalette des Bildes gewinnen und die Färbung normalisieren, um Unterschiede z.B. zwischen mehreren Slides eines TMAs zu minimieren. Diese Funktion trägt auch dazu bei, eine feinere Farbanalyse mit effizienter Trennung der positiven und negativen Pixel zu erreichen. Bei den TMA-Schnitten wurde dann die *TMA-Derrayer*-Funktion benutzt, was die automatische Identifikation der unterschiedlichen TMA-Cores eines eingescannten Schnitts ermöglicht. Jedoch war eine weitere manuelle Anpassung/Verfeinerung notwendig, um präzisere TMA-Konturen zu erlangen. Hierzu wurden folgende, für die Analyse der Perilipin 1- und Perilipin 2-Expression im Zytoplasma der Hepatozyten irrelevanten Areale mit einem Auszeichnungs-Tool ausgespart: Gefäße, Fibroseareale, dilatierte Sinusoide und Defekt-überlagertes Gewebe. Dann wurde das „positiv pixel count“-Tool der Software mit folgenden Einstellungen benutzt:

Downsample Factor 0,01
Gaussian Sigma 1,0 μm
Hematoxylin Threshold 0,4 OD Units
DAB Threshold PLIN1: 0,8 OD Units
 PLIN2: 0,7 OD Units

Dieses Tool ermöglicht die automatische Quantifizierung der positiven Pixel eines markierten Areals. Dafür werden zunächst vom Software-Benutzer selbst die gewünschten Grenzen für die positive Diaminobenzidin-IHC-Färbung (DAB) und (positive) Hematoxylin-Anfärbung bestimmt. Zwar wurden alle TMA-Cores mit jeweils 1mm Durchmesser gestochen, jedoch wurden unterschiedlich große, nicht relevante Areale von der Bildanalyse-Zone nachträglich ausgeschlossen. Um die Untersuchungen der unterschiedlichen Cores sowie auch der eingezeichneten Areale von separaten Schnitten vergleichen zu können, war es deshalb notwendig, die Zahl der positiven Pixel auf die untersuchte Fläche zu

beziehen. Die untersuchte Fläche wurde automatisch von der Software quantifiziert. Berechnet wurde also eine positive Pixelzahl pro Fläche nach folgender Formel: Anzahl der positiven Pixel/ Fläche (μm^2). Des Weiteren wurde die Intensität der Perilipin 1- und Perilipin 2- Färbungen mit der Software analysiert: für jedes eingezeichnete Areal wurde der „Mean Positive DAB Staining OD“-Wert bestimmt, der wie folgt von der Software berechnet wurde: $\text{mean positive DAB staining OD} = \log(\text{Max Intensity} / \text{Mean Intensity})$. Die Färbungen wurden jeweils in Duplikaten durchgeführt und die Mittelwerte errechnet.

3.2.8 Statistische Auswertung

Die Datenanalyse wurde mit Excel (Microsoft® Office 365, Microsoft Corporation, Redmond, IL, USA), die statistische Auswertung mit R Version 4.2.2 (2022; Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich) durchgeführt. Zur Überprüfung der Verteilung der numerischen Variablen wurde der Shapiro-Wilk-Test (246) benutzt. Es handelte sich jeweils um unabhängige Vergleichsgruppen. Unter diesen Voraussetzungen wurden für die gepaarten Vergleiche von normalverteilten Variablen der parametrische Student's t-Test (247) und von nicht normalverteilten Daten der nicht parametrische Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (248) eingesetzt. Für die ungepaarten Vergleiche von nicht normalverteilten Variablen wurde der nicht parametrische Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test (248, 249) herangezogen, wobei der Post-hoc Test „FDR“ (Falscherkennungsrate, englisch: False Discovery Rate) verwendet wurde (250). Bei den Korrelationen wurde, falls die Variablen normalverteilt waren, die Pearson-Korrelation (251), und falls die Variablen nicht normalverteilt waren, der nicht parametrische Spearman Test (252, 253) benutzt. Beim Vergleich von kategorischen Variablen wurde der Chi-Square-Test angewandt (254), mit und ohne Yates Korrektur (255). Die Auswertung bezüglich der Signifikanz unterlag einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$. Für die Berechnung der globalen P-Werte von Vergleichen mit mehr als zwei Kategorien wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet (256). P-Werte ≤ 0.05 (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***), $p \leq 0.0001$ (****) wurden als signifikant, p- Werte > 0.05 (n.s) als nicht signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Erstellung, klinische und histopathologische Charakterisierung eines Gewebe-Kollektivs Hepatozellulärer Adenome

Von zentraler Bedeutung für Komplikationsrisiko und somit Therapieverfahren ist das Wissen über den spezifischen Subtyp (1, 3). Hierfür wurde ein Kollektiv erstellt und die HCAs histologisch, immunhistochemisch und molekularpathologisch anhand etablierter Kriterien (1, 2, 8-10, 108) klassifiziert. Dabei sollte analysiert werden, ob die Charakteristika dieses Kollektivs mit denen von anderen Arbeitsgruppen vergleichbar sind, und ob potentielle neue Merkmale identifiziert werden können, um eventuell die aktuell geltende Klassifizierung verfeinern zu können. Ein weiteres Ziel war die Identifikation potentiell begünstigender Umweltfaktoren. Zu diesem Zweck wurden klinische Daten von den Patienten erhoben (Tab. 20 und Tab. 21). Da es sich bei dieser Arbeit um eine retrospektive Studie handelt, lagen nur unvollständige und uneinheitliche klinische Daten vor, was die Korrelation mit den in der Arbeit erhobenen pathologischen Ergebnissen erschwerte.

In unserem Kollektiv waren mehr als die Hälfte der HCAs vom inflammatorischen Subtyp (IHCA, 57,8 %). 21,1 % waren HHCA, wobei 10 der 15 HHCA-Herde einen Patienten mit Leberadenomatose, der auch einen BIHCA Herd aufwies, stammten. Das Auftreten multipler HCA-Herde war am häufigsten beim inflammatorischen Subtyp zu beobachten: 40 % der Patienten mit zumindest einem IHCA wiesen weitere IHCA-Herde auf. Dabei konnte festgestellt werden, dass sowohl steatotische als nicht steatotische IHCA bei einem selben Patienten vorkommen können. In unserem Kollektiv wurden lediglich bei Patienten mit IHCA (16 %) zusätzliche FNH-Herde reseziert. Die Hälfte der Patienten mit Leberadenomatose (3/6) wies eine genetische Erkrankung auf. Zwei Patientinnen zeigten eine GSD und ein Patient einen MODY3-Diabetes. Bei beiden GSD-Patientinnen waren IHCA nachweisbar, wobei eine Patientin sowohl steatotische als nicht steatotische Herde, die andere lediglich steatotische IHCA aufwies sowie zusätzlich einen FNH-Herd. Der Patient mit MODY3-Diabetes zeigte zahlreiche HHCA und einen einzigen BIHCA, mit fokalem Übergang in ein gut differenziertes HCC. Im gesamten HCA-Kollektiv wiesen somit 7 % der Patienten eine bekannte genetische Ursache auf.

Tab. 20: HCA-Kollektiv

Tumorentität	Anzahl der Patienten [n]	Anzahl der Herde [n]	Klinisch multiple HCA-Herde [n]	Klinisch Adenomatose [n]	Klinisch FNH-Herde [n]
IHCA	25	41	10	3	4
B(I)HCA	6	6	1	0	1
BIHCA und HHCA	1	11	1	1	0
BHCA und UHCA	1	3	1	0	0
HHCA	5	5	1	1	0
UHCA	3	3	1	0	0
shHCA	2	2	1	1	0
HCA, Gesamt	43	71	16	6	5
HCC	7	9	0	0	0
FNH	24	32	2	2	n.a.

n.a.: nicht anwendbar.

Während die Mehrheit der Patienten mit HCAs (86,0 %) und FNHs (70,8 %) Frauen waren, waren hingegen 85, 71 % der Patienten mit einem HCC Männer. Der durchschnittliche BMI der HCA-, FNH- und HCC-Patienten des vorliegenden Kollektivs war höher als der der im Jahre 2021 in Deutschland lebenden Erwachsenen, der bei 26 kg/m² lag (257). Die Patienten mit shHCAs ($43,8 \pm 14,6$) und IHCAs ($30,5 \pm 6,9$) wiesen im Trend einen etwas höheren BMI auf. Dennoch konnten generell keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich des BMI zwischen den unterschiedlichen HCA-Subtypen oder den verschiedenen Tumorentitäten gefunden werden. Die HCC-Patienten ($63,7 \pm 7,7$) waren älter als die HCA- ($35,9 \pm 12,3$) und FNH- ($43,6 \pm 15,6$) Patienten (jeweils $p \leq 0,001$), wobei die FNH-Patienten in unserem Kollektiv älter als die HCA-Patienten waren ($p \leq 0,01$). 52,9 % der HCA-Patientinnen, bei denen der Status über eine potentielle hormonelle Behandlung dokumentiert war, gaben eine Kontrazeptiva-Einnahme an.

Tab. 21: Klinische Daten des Kollektivs

Tumorentität	Geschlecht w/m [n]	Alter Jahre [M ± SD]	BMI kg/m ² [M ± SD]	Kontrazeptiva- Einnahme [n]
IHCA	23/2	36 ± 11,6 (25)	30,5 ± 6,9 (18)	8 (11)
B(I)HCA	4/2	29 ± 7,5 (6)	27,3 ± 4,0 (3)	0 (3)
BIHCA und HHCA	0/1	19 ± 0 (1)	24,9 ± 0 (1)	n.a.
BHCA und UHCA	1/0	31 ± 0 (1)	k. A.	k. A.
HHCA	5/0	42,2 ± 17,4 (5)	18,7 ± 0 (1)	0 (1)
shHCA	2/0	30,5 ± 9,2 (2)	43,8 ± 14,6 (2)	1 (1)
UHCA	2/1	48,7 ± 8,7 (3)	30,9 ± 10,6 (3)	0 (1)
HCA, Gesamt	37/6	35,9 ± 12,3 (42)	30,6 ± 8,3 (28)	9 (17)
HCC	1/6	63,7 ± 7,7 (7)	29,5 ± 4,6 (6)	0 (1)
FNH	17/7	43,6 ± 15,6 (24)	27,6 ± 7,5 (21)	3 (3)

In Klammern wird jeweils die Anzahl [n] der Patienten mit vorhandenen Daten angegeben. w: weiblich; m: männlich; k. A.: keine Angabe; n.a.: nicht anwendbar; M: Mittelwert; SD: Standardabweichung.

Weitere klinische und radiologische Daten des Kollektivs wurden gesammelt und sind im Anhang (Anhang, Tab. 30 und Tab. 31) aufgeführt.

Es zeigte sich, dass 67 % der HCA-Patienten zumindest eine charakteristische Eigenschaft des metabolischen Syndroms aufwiesen (Anhang, Tab. 30). Ein großer Anteil der Patienten war asymptomatisch, und 41,1 % der Fälle (8/17) wurden per Zufall diagnostiziert. Sechs Patienten wiesen unspezifische Oberbauch- und ein Patient Thoraxschmerzen auf. Die zwei HCA-Fälle, die aufgrund von Einblutungen mit begleitenden abdominellen Schmerzen entdeckt worden waren, shHCAs (Anhang, Tab. 31).

4.1.1 Mikroskopie

Miller und Koautoren (16) wiesen daraufhin, dass die klassisch beschriebenen histomorphologischen Charakteristika der Subtypen nicht spezifisch sind und sich zum Teil überlappen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deswegen, diese Merkmale durch ein semi-quantitatives Scoring-System (Tab. 19) zu überprüfen und zu ergänzen. Speziell wurde das Vorkommen von Entzündungsinfiltraten, *Peliosis hepatis* und Einblutungen in den unterschiedlichen Tumorentitäten und HCA-Subtypen untersucht, quantifiziert und miteinander verglichen (Abb. 5). Zudem wurde die Tumorgroße von den Befunden erhoben und das Vorkommen von flächigen Einblutungen evaluiert (Tab. 24).

Die Auswertung ergab, dass IHCA's im Trend das stärkste Entzündungsinfiltrat zeigten ($0,9 \pm 0,9$). UHCA's ($0,3 \pm 0,5$) und B(l)HCA's ($0,4 \pm 0,5$) wiesen hingegen tendenziell geringere Entzündungsinfiltrate auf. FNH's ($1,5 \pm 0,7$) zeigten stärkere Entzündungsinfiltratwerte als HCA's ($0,7 \pm 0,8$) und HCC's ($0,4 \pm 0,5$) (jeweils $p \leq 0,001$).

Die nicht steatotischen IHCA's wiesen die höchsten *Peliosis hepatis*-Werte ($1,2 \pm 0,8$), die HHCA's ($0,6 \pm 0,9$) die niedrigsten ($p \leq 0,05$) auf. Auch die steatotischen IHCA's zeigten tendenziell relativ niedrige *Peliosis hepatis*-Werte.

Für shHCA's wurde das Auftreten von Einblutungen beschrieben (9). Beide shHCA's des Kollektivs zeigten flächige Einblutungen (2 ± 0). Zwischen den HCA-Subtypen konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. FNH's ($0,06 \pm 0,35$) zeigten signifikant weniger Einblutungen als HCA's ($0,9 \pm 0,7$; $p \leq 0,001$) oder HCC's ($1,0 \pm 1,0$; $p \leq 0,001$). Unabhängig vom HCA-Subtyp war das Einblutungsrisiko bei einer HCA-Größe von ≥ 5 cm signifikant erhöht (14): in unserem Kollektiv zeigten 48,7 % der ≥ 5 cm großen HCA's flächige Einblutungen. Hingegen gab es lediglich vier Herde, die < 5 cm waren (ein nicht steatotisches IHCA, ein HHCA und zwei UHCA's; Spannweite: 1,5-4,6 cm; Durchschnitt: 3,75 cm), mit flächigen Einblutungen. Zwölf der vier-und-zwanzig FNH's waren ≥ 5 cm und lediglich eine FNH zeigte flächige Einblutungen.

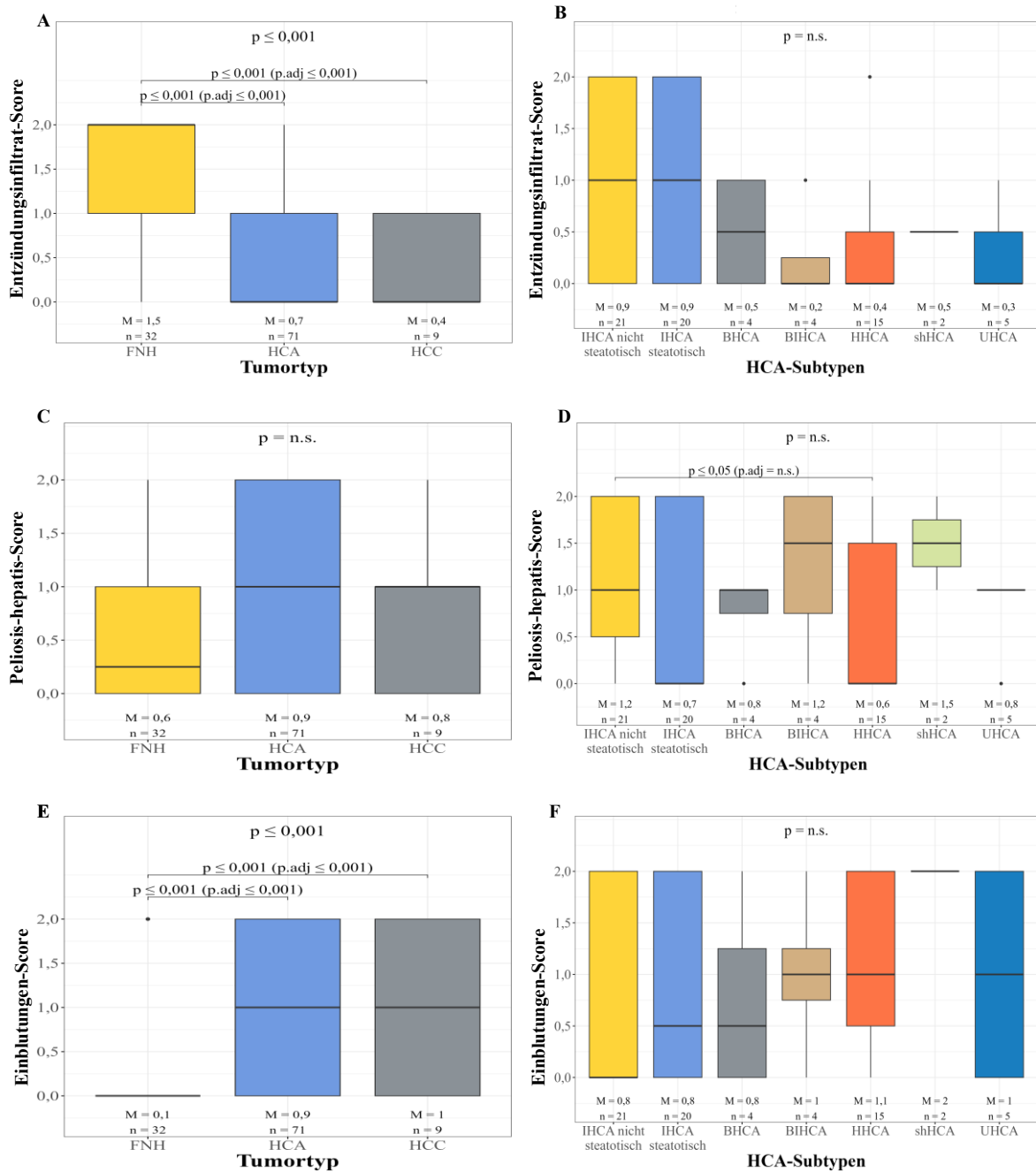


Abb. 5: Histomorphologische Charakteristika der HCA-Proben und Vergleich zu FNH- und HCC-Proben. Die Ergebnisse sind als Box-Whisker-Plots dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test verwendet. Für die Berechnung der globalen P-Werte wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet.

Tab. 22: Größe der Lebertumoren und Vorkommen von flächigen Einblutungen im Kollektiv

Tumorentität (Anzahl der Herde)	Größe in cm [M ± SD]	Anzahl der Herde > 5 cm mit flächigen Einblutungen / Anzahl Herde > 5 cm
IHCA Gesamt (41)	6,3 ± 4,7	11 / 21
IHCA nicht steatotisch (21)	6,1 ± 4,5	6 / 11
IHCA steatotisch (20)	6,5 ± 5,0	5 / 10
B(I)HCA Gesamt (8)	7,9 ± 3,2	2 / 8
BHCA (4)	8,5 ± 3,3	1 / 4
BIHCA (4)	7,3 ± 3,5	1 / 4
HHCA (15)	4,1 ± 3,1	4 / 7
shHCA (2)	8,7 ± 1,0	2 / 2
UHCA (5)	6,8 ± 2,9	0 / 3
HCA Gesamt (71)	6,1 ± 4,2	19
FNH (32)	4,4 ± 3,8	1 / 12
HCC (9)	9,8 ± 5,8	4 / 8

Proben des gleichen Tumortyps bzw. -subtyps wurden jeweils zusammengefasst. Die Mittelwerte (M) und Standardabweichungen (SD) der makroskopisch bestimmten Größe der Tumore wird angegeben. Zudem wird die Anzahl der Herde > 5 cm mit flächigen Einblutungen im Verhältnis zur Anzahl Herde > 5 cm angegeben.

4.1.2 Immunhistochemische und molekularpathologische Charakterisierung von HCAs

4.1.2.1 Subtypisierung

Neben der Untersuchung histomorphologischer Eigenschaften der Hepatozellulären Adenome sind immunhistochemische Analysen (Abb. 6) mit Antikörpern gegen CRP, Amyloid A, L-FABP, GS sowie ASS1 und β -Catenin für die Subklassifizierung der HCAs wichtig (1, 2, 8, 16).

Für die L-FABP-Färbung wird eine Sensibilität und Spezifität von 100 % beschrieben (8, 258). So wurden im Kollektiv ein Fall mit granulomatöser Entzündungsreaktion und ein weiterer Fall mit homogener, relativ starker Amyloid A-Expression, die deswegen initial als potentielle IHCA eingestuft worden waren, schließlich bei jeweils fehlender FABP-Expression als HHCA klassifiziert.

Für die IHCA-Diagnose ist die CRP-Färbung sehr sensitiv, jedoch nicht spezifisch (259). In unserem Kollektiv waren 39 % der HCAs (16/41) Amyloid-A negativ, bei einer Positivität für CRP von ≥ 50 % der Tumorfläche. Kein IHCA war CRP negativ. Die nicht steatotischen HCAs (52,4 %) waren im Trend etwas häufiger Amyloid-A negativ als die steatotischen IHCA (25 %; n.s.).

Die in Abhängigkeit der *CTNNB1*-Mutation typischen GS-Muster (Tab. 3) konnten in unserem Kollektiv reproduziert werden. Bei 4 der 71 HCAs (5,6 %) und einem der 9 HCCs (11,1 %) konnte eine *CTNNB1*-Mutation nachgewiesen werden (Tab. 23). Ein initial als UHCA klassifiziertes HCA wurde nach Nachweis einer Exon 8 *CTNNB1*-Mutation als BHCA eingestuft, und ein initial als reines IHCA klassifiziertes HCA wurde nach Nachweis einer Exon 7 *CTNNB1*-Mutation als BIHCA reklassifiziert. Vier unserer B(I)HCAs wurden bei geringer DNA-Qualität anhand der histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen als B(I)HCAs eingestuft, ohne dass eine *CTNNB1*-Mutation gesichert werden konnte.

Da die ASS1-Färbung zum Zeitpunkt der Studie nicht etabliert war, konnten nur zwei Fälle, die im Rahmen der Routine-Diagnostik mit ASS1 gefärbt wurden, als shHCAs klassifiziert werden.

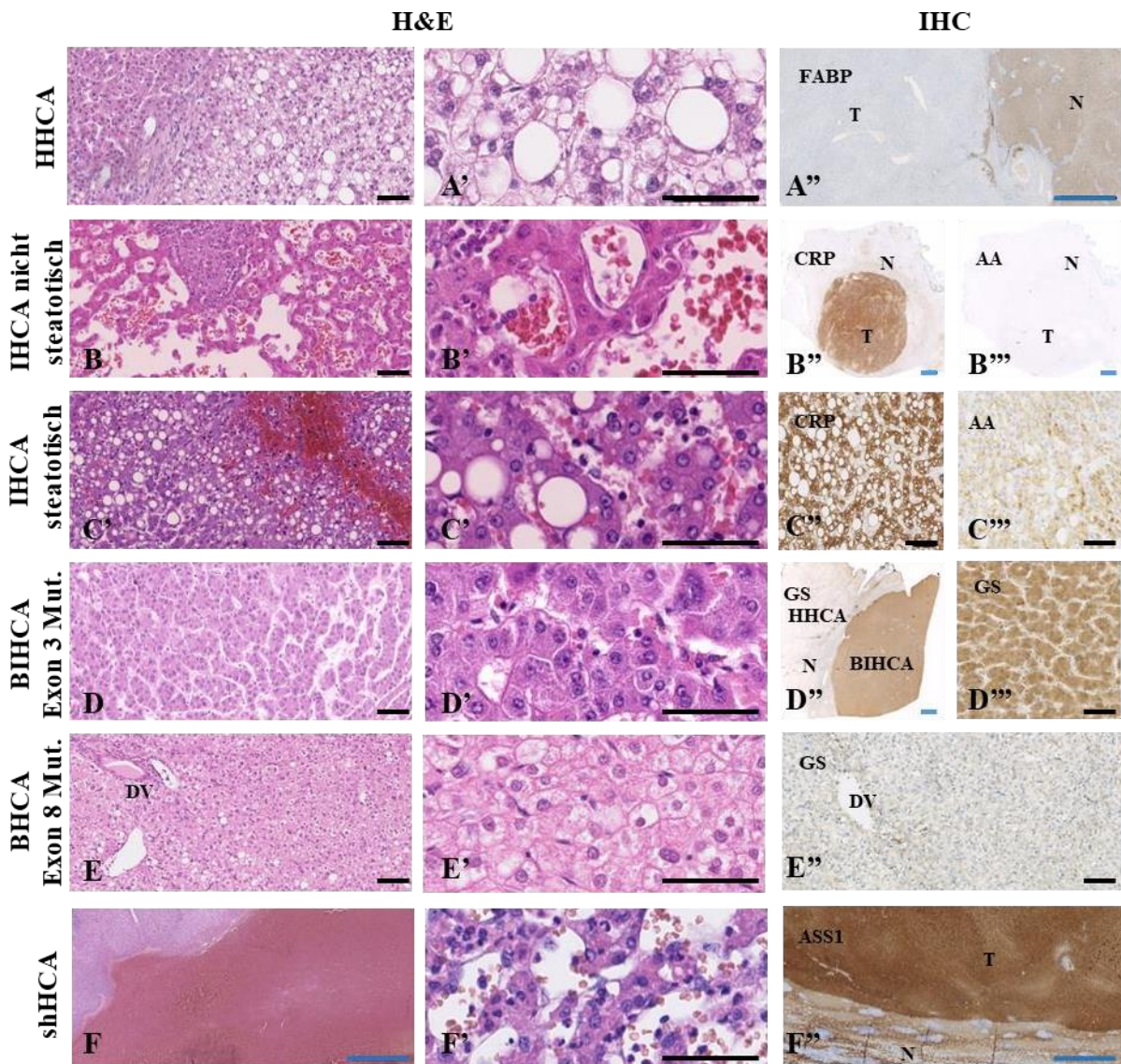


Abb. 6: Histomorphologische und immunhistochemische Merkmale der HCA-Subtypen. H&E- und IHC-Färbungen von humanen HCAs. HHCA mit diffuser Steatose (A und A') und Ausfall der Liver Fatty Acid Binding Protein (L-FABP)-Expression (A''). Nicht steatotisches IHCA mit Entzündungsinfiltrat (B), *Peliosis hepatis* (B und B') und immunhistochemischer starker homogener C-reaktives Protein (CRP)-Positivität (B'') bei Amyloid A (AA)-Negativität (B'''). Steatotisches IHCA mit Einblutungen, Steatose (C und C') und immunhistochemischer CRP-(C'') und AA-(C''') Positivität. Exon 3 *CTNNB1*-mutiertes BIHCA (BIHCA Exon 3 Mut.) mit solidem, fokal auch drüsigem Wachstum (D und D'), Zellatypien (D') und starker homogener Glutaminsynthetase (GS)-Expression (D'' und D'''). Exon 8 *CTNNB1*-mutiertes BHCA (BHCA Exon 8 Mut.) mit dystropfen Gefäßen (E), solidem Wachstum (E') und nur schwacher, partieller GS-Expression mit Verstärkung um Gefäße (E''). shHCA mit flächigen Einblutungen (F), *Peliosis hepatis* (F') und im Vergleich zum angrenzenden Lebergewebe verstärkte Argininosuccinat-Synthase 1 (ASS1)-Expression (F''). DV: dystrophe Gefäße; T: tumoröses Lebergewebe; N: nicht-tumoröses Lebergewebe. Eichstriche: schwarz: 50 µm / blau: 1 mm.

Tab. 23: Ergebnisse der *CTNNB1*-Mutationsanalyse

Tumorentität (Anzahl der Herde)	Anzahl der Herde mit nachgewiesener <i>CTNNB1</i> -Mutation	Anzahl der Herde ohne <i>CTNNB1</i> - Mutation in den Exonen 3, 7 und 8 (schlechte Qualität)	Anzahl der nicht auswertbaren Herde
IHCA, Gesamt (41)	0	35 (4)	6
IHCA, nicht steatotisch (21)	0	19 (2)	2
IHCA, steatotisch (20)	0	16 (2)	4
B(I)HCA, Gesamt (8)	4	0	4
BHCA (4)	1 x Exon 3 (p.T41A)	0	3
BIHCA (4)	1 x Exon 3 (p.I35S) 1 x Exon 7 (p.K335I) 1 x Exon 8 (p.N387K)	0	1
HHCA (15)	0	10* (2)	0
shHCA (2)	0	2 (0)	0
UHCA (5)	0	3 (3)	2
HCA, Gesamt (71)	4	50 (9)	12
FNH (32)	n.a.	n.a.	n.a.
HCC (9)	1 x Exon 3 (p.T41A)	8 (5)	0

Bei FNHs wurde keine Mutationsanalyse durchgeführt (n.a.: nicht anwendbar). *Von den 10 HHCA-Herden eines Patienten wurde nur die Hälfte der Herde (5) molekularpathologisch analysiert, da der Subtyp immunhistochemisch anhand L-FABP eindeutig war.

4.1.2.2 Auswertung der Ki67-Proliferationsrate in HCAs

Komplementär zur Analyse der Perilipin-Expression wurde die Ki67-Proliferationsrate im Kollektiv untersucht. Die HCAs unseres Kollektivs wiesen eine durchschnittliche Proliferationsrate von $0,87 \pm 1,93$ % auf (Abb. 7). Die HCCs dagegen zeigten mit $2,89 \pm 3,91$ % eine signifikant höhere Proliferationsrate sowohl als die HCAs ($p \leq 0,01$) als auch die FNHs ($p \leq 0,001$). Die FNHs zeigten kaum Ki67-positive Zellen ($0,03 \pm 0,18$ %) und somit auch eine deutlich niedrige Proliferationsrate als HCAs auf ($p \leq 0,01$). Die vier HCAs mit einer Proliferationsrate von über 5 % waren inflammatorische Herde: zwei nicht steatotische IHCA, ein steatotisches IHCA und ein BIHCA (Tab. 27). Unter den verschiedenen HCA-Subtypen zeigten die BIHCAs mit einer durchschnittlichen Proliferationsrate von $2,38 \pm 2,93$ %, ähnliche Raten wie HCCs und signifikant höhere als die HHCAs ($0,07 \pm 0,26$ %; $p \leq 0,05$). Auffälligerweise zeigten die BHCA des Kollektivs keine Ki67-positiven Zellen (0 ± 0 %).

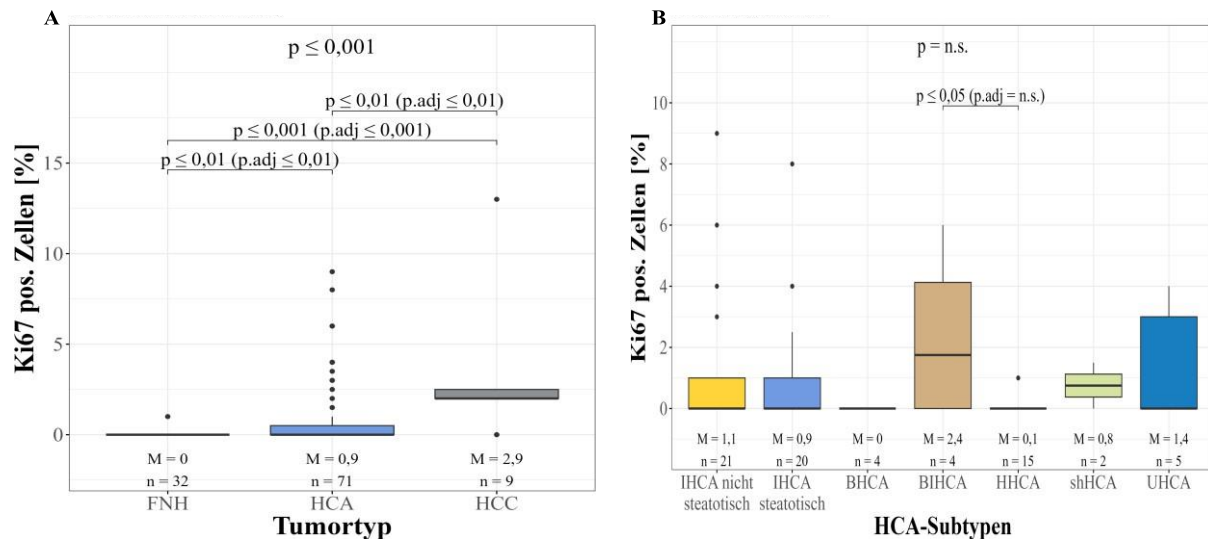


Abb. 7: Ki67-Proliferationsrate in HCAs und Vergleich zu FNHs und HCCs. Prozentsatz der Ki67-positiven Zellkerne. Die Ergebnisse sind als Box-Whisker-Plots dargestellt. Bei Herden mit < 1 % angefärbten Zellkernen in der Ki67-Färbung wurde ein Wert von 0 für die Berechnung des Durchschnitts und der Mediane verwendet. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test eingesetzt. Für die Berechnung der globalen P-Werte wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Im Anhang wird die Anzahl der Tumore pro Kategorie der Ki67-Proliferationsrate angegeben (Anhang, Tab. 32).

4.1.3 Steatose in Hepatozellulären Adenomen

Eine Steatose ist in Lebertumoren relativ häufig (17). In der vorliegenden Arbeit sollte der Steatosegrad in den unterschiedlichen HCA-Subtypen quantifiziert und miteinander verglichen werden.

Alle Lebertumoren zeigten in der vorliegenden Arbeit grundsätzlich eine Steatose (Abb. 8). 53,5 % der HCAs unseres Kollektivs waren steatotisch (Anhang, Tab. 33). Der durchschnittliche Steatosegrad aller HCAs lag bei $24,6 \pm 27,6$ % (Abb. 9), der der steatotischen HCAs bei $44,0 \pm 24,7$ %. Alle HHCAs außer einem Herd (14/15, 93,3 %) waren steatotisch mit einem hohen Steatosegrad ($45,0 \pm 19,6$ %) und waren somit signifikant mehr verfettet als die BHCAs, die shHCAs, die nicht steatotischen IHCAs (Abb. 9). 48,8 % der IHCAs waren steatotisch. Die steatotischen IHCAs zeigten mit einem durchschnittlichen Steatosegrad von $41,1 \pm 28,8$ % mit HHCAs vergleichbare Steatosegrade und waren signifikant mehr verfettet als die B(I)HCAs, die shHCAs, und die nicht steatotischen IHCAs (Abb. 9). Die nicht steatotischen IHCAs wiesen einen durchschnittlichen Steatosegrad von $2,1 \pm 2,5$ % auf. Keines der zwei shHCAs ($1,5 \pm 2,1$ %) war steatotisch. 25 % der BHCA ($8,0 \pm 8,0$ %) bzw. BIHCAs ($15,0 \pm 30,0$ %) wiesen eine milde bis mäßige Verfettung auf (Anhang, Tab. 33). Im Vergleich waren 46,9 % der FNHs, und 33,3 % der HCCs steatotisch. Dabei waren die HCCs mit einem durchschnittlichen Steatosegrad von $41,3 \pm 35,3$ % signifikant mehr verfettet als die FNHs ($11,3 \pm 11,5$ %; $p \leq 0,05$), wobei hier nur wenige HCCs analysiert wurden.

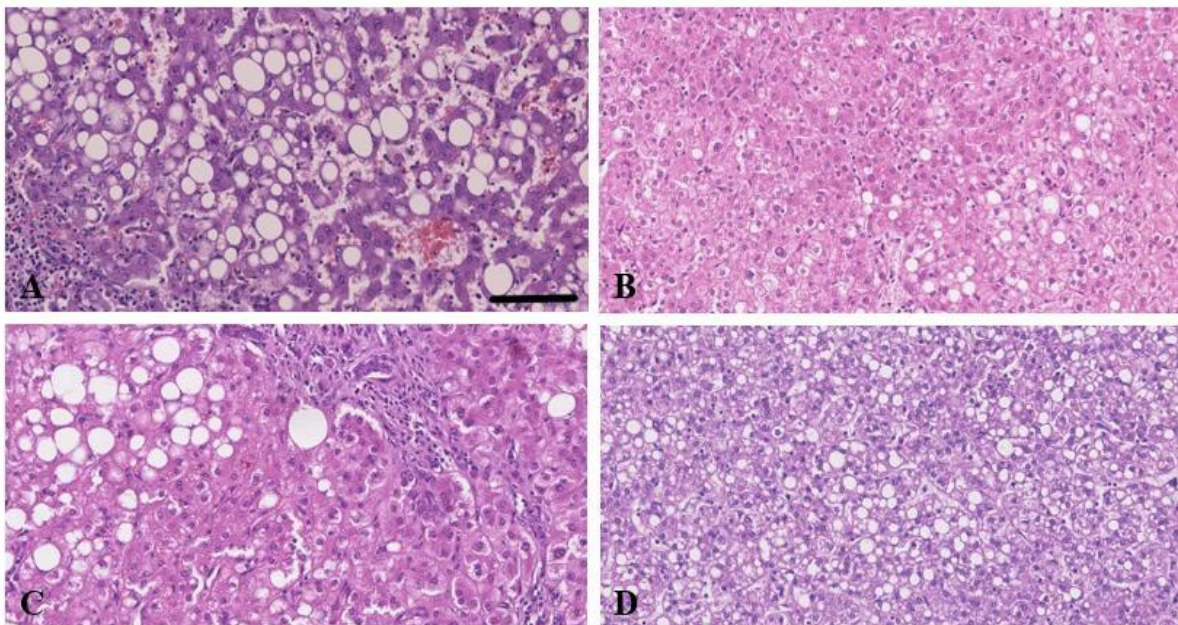


Abb. 8: Heterogenität des Steatosegrades bei unterschiedlichen Lebertumor-Entitäten. H&E-Färbung eines steatotischen IHCA (A), eines Exon 8 *CTNNB1*-mutierten BHCA (B), einer FNH (C) und eines HCC (D). Eichstrich: 100 μ m.

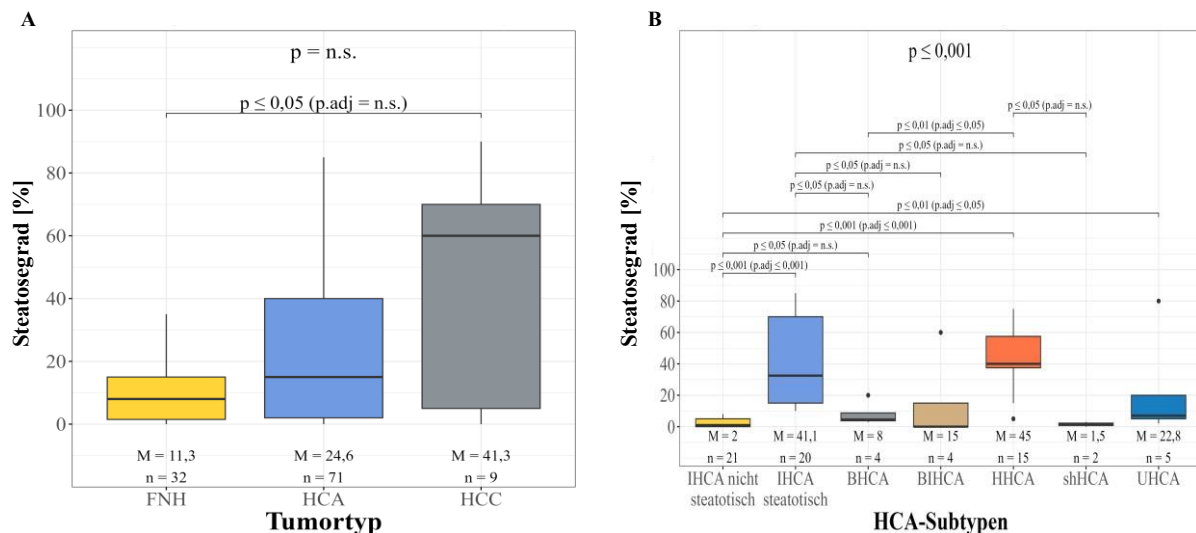


Abb. 9: Steatose in HCAs und Vergleich zu FNHs und HCCs. Die Ergebnisse sind als Box-Whisker-Plots dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test verwendet. Für die Berechnung der globalen P-Werte wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Im Anhang wird die Anzahl der Tumore pro Kategorie des Steatosegrades angegeben (Anhang, Tab. 33).

4.2 Perilipin-Expression in Hepatozellulären Adenomen

Perilipine können bei unterschiedlichen pathologischen Prozessen verschiedene Expressionsmuster aufweisen (17, 37, 38). Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigten, dass in der Tumorigenese Perilipin 1, 2 und 3 exprimiert sind, wobei in der Hepatokarzinogenese Perilipin 2 hochreguliert, hingegen Perilipin 1 herunterreguliert wird (17).

Wir untersuchten deswegen lichtmikroskopisch und mittels digitaler Bildanalyse das Expressionsmuster der Perilipine in den HCA-Subtypen des Kollektivs. Das Ziel war zu untersuchen, ob Perilipine hilfreich bei der Diagnose der HCA-Subtypen sein könnten und ob sie zum Verständnis der Physiopathologie der HCA-Entstehung bzw. -Entartung beitragen können.

Generell konnten wir feststellen, dass alle fünf Perilipine in allen untersuchten Gewebearten vorkommen und dabei sowohl makro- als auch mikroversukuläre Lipidtropfen markieren können. Interessanterweise wurden auch kleine lichtmikroskopisch in den H&E-Färbungen nicht identifizierbare Lipidtropfen markiert.

4.2.1 Analyse der Perilipine 1 und 2 in HCAs

Wir untersuchten die Expression der Perilipine 1 und 2 immunhistochemisch, und es wurden für die HCA-Subtypen jeweils der relative Anteil der positiven Hepatozyten und die positive Parenchymfläche bewertet (Abb. 10 und Abb. 11). Des Weiteren wurden die Schnitte hinsichtlich der Intensität und der positiven Fläche der cPATs-Färbungen mittels digitaler Bildanalyse untersucht (Abb. 10 und Abb. 11). Darüber hinaus wurden die Perilipin 1- und 2-Färbungen lichtmikroskopisch hinsichtlich der Farbintensität bewertet (Anhang, Abb. 25).

Innerhalb der HCA-Subtypen zeigten die BIHCAs ($36,3 \pm 41,9$ %) und die BHCAs ($32,8 \pm 40,7$ %) tendenziell die relative größte Anzahl Perilipin 1-positiver Hepatozyten. Außer den UHCAs ($24,5 \pm 39,7$ %) und steatotischen IHCAs ($12,2 \pm 25,5$ %) wiesen alle anderen Subtypen unter 5 % Perilipin 1-positiver Hepatozyten auf (Abb. 10). Die Perilipin 1-markierte Parenchymfläche war bei allen Subtypen gering und betrug jeweils unter 5 % (Abb. 10). Die BIHCAs zeigten im Trend mit $3,6 \pm 6,0$ % den höchsten Wert (n.s.). In der digitalen Auswertung zeigten IHCAs, shHCAs und HHCAs einen niedrigeren QuPath Score (< 3 ; Abb. 10). BIHCAs ($8,9 \pm 17,1$ %) und BHCAs ($6,6 \pm 6,4$ %) zeigten im Trend leicht höhere QuPath Score als diese letzteren Subtypen (n.s.). UHCAs wiesen einen Score von $13,7 \pm 11,6$ und somit signifikant höhere QuPath Score auf als steatotische ($2,1 \pm 3,1$; $p \leq 0,01$) und nicht-steatotische IHCAs ($2,4 \pm 7,9$; $p \leq 0,01$) sowie HHCAs ($0,2 \pm 0,2$; $p \leq 0,01$).

Im Vergleich zeigten FNHs eine größere Prozentzahl Perilipin 1-markierter Hepatozyten ($35,6 \pm 24,7$ %) als HCAs ($11,3 \pm 23,4$ %; $p \leq 0,001$) und HCCs ($18,9 \pm 32,2$ %; $p \leq 0,05$). Darüber hinaus wiesen FNHs auch eine größere Perilipin 1-markierte Parenchymfläche ($5,5 \pm 6,0$ %) und einen höheren QuPath Score ($12,1 \pm 6,1$ %) auf als HCAs ($1,9 \pm 3,1$ % bzw. $3,2 \pm 12,1$ %; jeweils $\leq 0,001$). Interessanterweise zeigen HCAs tendenziell eine etwas kleinere Perilipin 1-markierte Parenchymfläche und eine geringere Prozentzahl Perilipin 1-markierter Hepatozyten als HCCs (n.s.). FNHs zeigten also im Vergleich zu HCAs und HCCs die stärkste Perilipin 1-Expression.

Es konnte keine Korrelation zwischen dem Steatosegrad und der Perilipin 1-Expression in den unterschiedlichen Tumorentitäten bzw. HCA-Subtypen gefunden werden.

Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass in HCAs und FNHs Perilipin 1 häufig um winzige Lipidtropfen, die in der H&E-Färbung nicht identifizierbar sind, lokalisiert (Abb. 12). Die Perilipin 1-positiven Lipidtropfen waren am häufigsten in B(I)HCAs sowie FNHs nachweisbar, wo sie überwiegend auf der sinusoidalen Seite der Hepatozyten lokalisiert waren (Abb. 12 E und C). Interessanterweise kam Perilipin 1 kaum um den Lipidtropfen der steatotischen IHCAs und HHCAs vor (Abb. 12 B und D). In HCCs des Kollektivs kam Perilipin 1 vorwiegend um makrovesikuläre Lipidtropfen vor (Abb. 12 F).

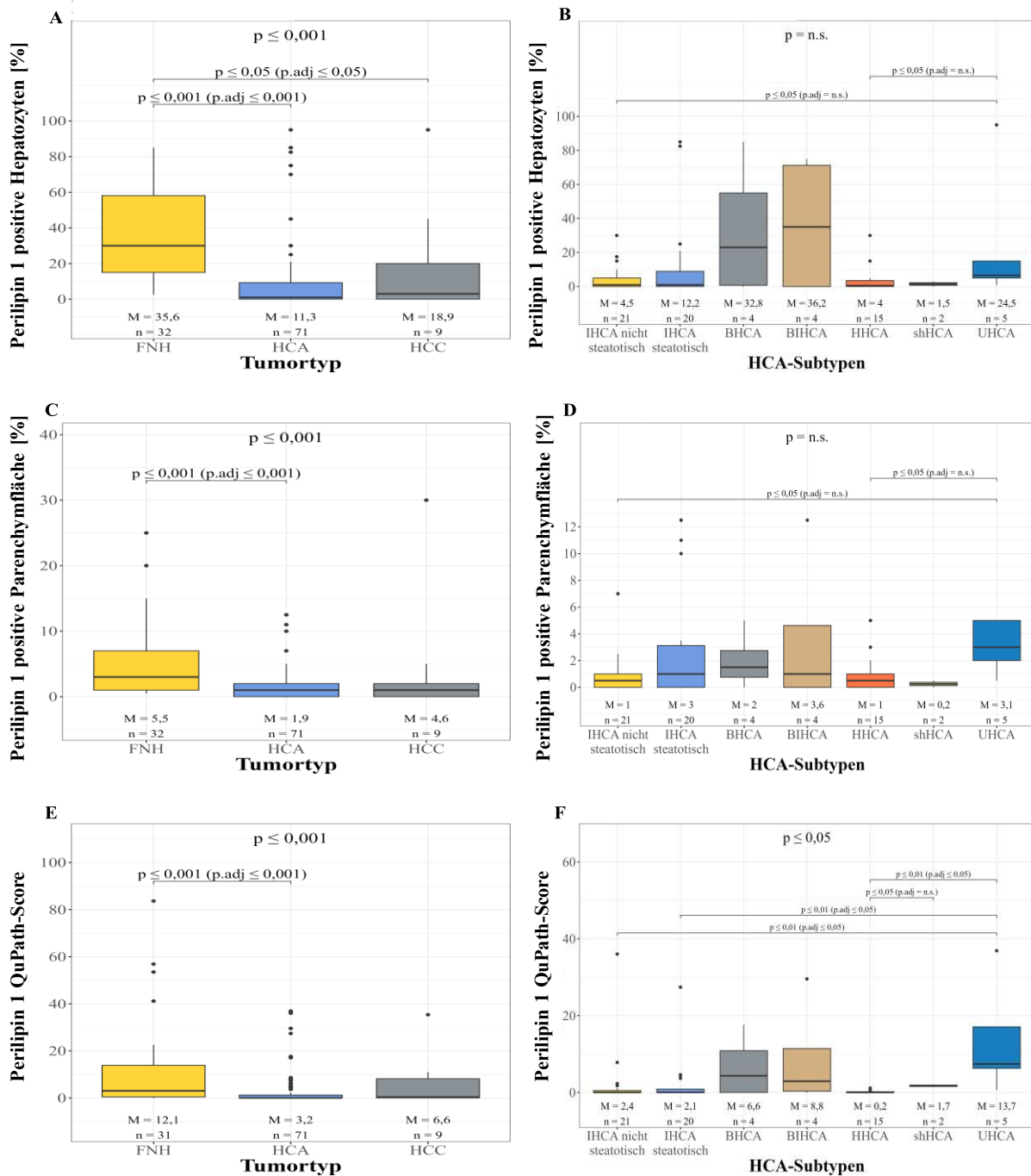


Abb. 10: Perilipin 1-Expression in HCAs und Vergleich zu FNHs und HCCs. Der QuPath Score wurde, wie unter 3.2.7.2. dargestellt, bestimmt und berechnet. Die Ergebnisse sind als Box-Whisker-Plots dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test eingesetzt. Für die Berechnung der globalen P-Werte wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet.

Die Auswertung der Perilipin 2-Färbung ergab, dass die steatotischen IHCA (61,8 ± 33,6 %) und HHCA (76,8 ± 19,1 %) eine höhere Prozentzahl markierter Hepatozyten als die nicht steatotischen IHCA (37,0 ± 31,4 %), BIHCA (15,9 ± 7,3 %) und shHCA (1,8 ± 1,8 %) aufwiesen (Abb. 11). BHCA und UHCA zeigten im Durchschnitt über 50 % Perilipin 2-positiver Hepatozyten. Auch die steatotischen IHCA (27,2 ± 24,2 %) und HHCA (23,7 ± 20,2 %) wiesen eine größere Perilipin 2-markierte Fläche als die nicht steatotischen IHCA (3,5 ± 3,0 %), BHCA (2,6 ± 2,2 %) und shHCA (0,5 ± 0 %) auf (Abb. 11). Außer UHCA (11,9 ± 19,2 %) zeigten alle anderen Subtypen < 10 % positiver Parenchymfläche. Im Rahmen der digitalen Bildanalyse der Perilipin 2-Färbung konnten außer für UHCA (121,8 ± 199,4 %), die einen signifikant höheren QuPath Score als die steatotischen (12,4 ± 16,9 %; $p \leq 0,05$) und nicht steatotischen (6,3 ± 8,7 %; $p \leq 0,01$) IHCA aufwiesen, keine statistisch signifikanten Unterschiede gefunden werden.

HCC (37,2 ± 28,2 %) zeigten eine größere Perilipin 2-markierte Parenchymfläche als HCA (14,8 ± 19,2 %; $p \leq 0,05$) und FNH (5,6 ± 5,9 %; $p \leq 0,01$). Die Perilipin 2-markierte Parenchymfläche der HCA war ebenfalls signifikant größer als die der FNH ($p \leq 0,05$). Die Ergebnisse der digitalen Bildanalyse bestätigten, dass HCC ihrerseits (179,0 ± 187,8 %) eine signifikant größere Perilipin 2-markierte Parenchymfläche als die HCA (21,0 ± 62,2 %; $p \leq 0,01$) und FNH (20,8 ± 42,8 %; $p \leq 0,01$) zeigten. Es konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Prozentzahl Perilipin 2-markierter Hepatozyten gefunden werden.

Perilipin 2 kam an der Peripherie makro- oder mikrovesikulärer Lipidtropfen vor (Abb. 12). Die Mehrheit der lichtmikroskopisch identifizierbaren Lipidtropfen waren hierbei positiv für Perilipin 2. B(I)HCA zeigten winzige Lipidtropfen, die lichtmikroskopisch ohne immunhistochemische Perilipin 1- oder 2-Färbung nicht identifizierbar waren (Abb. 12 C').

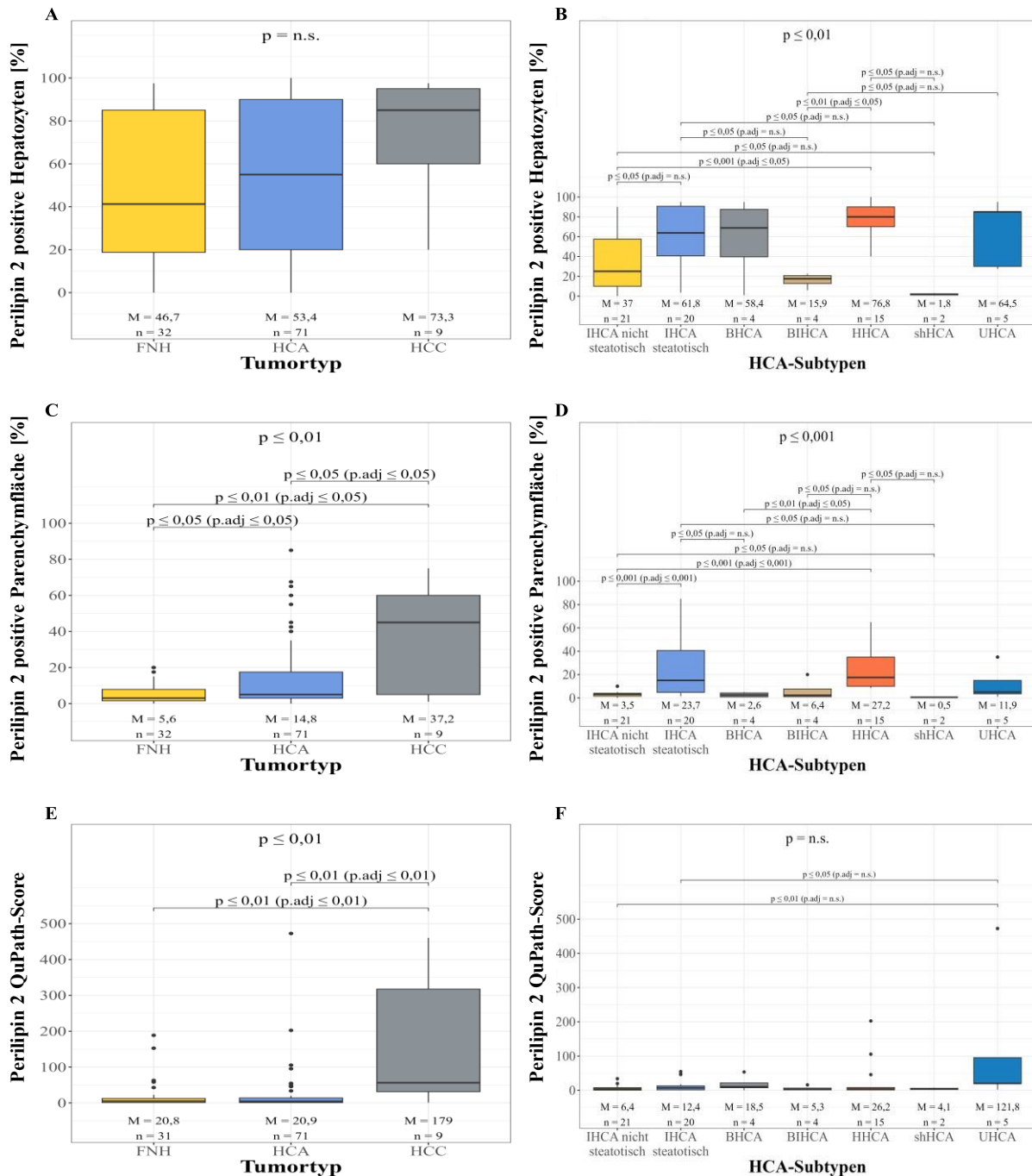


Abb. 11: Perilipin 2-Expression in HCAs und Vergleich zu FNHs und HCCs. Der QuPath Score wurde, wie unter 3.2.7.2. dargestellt, bestimmt und berechnet. Die Ergebnisse sind als Box-Whisker-Plots dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test verwendet. Für die Berechnung der globalen P-Werte wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet.

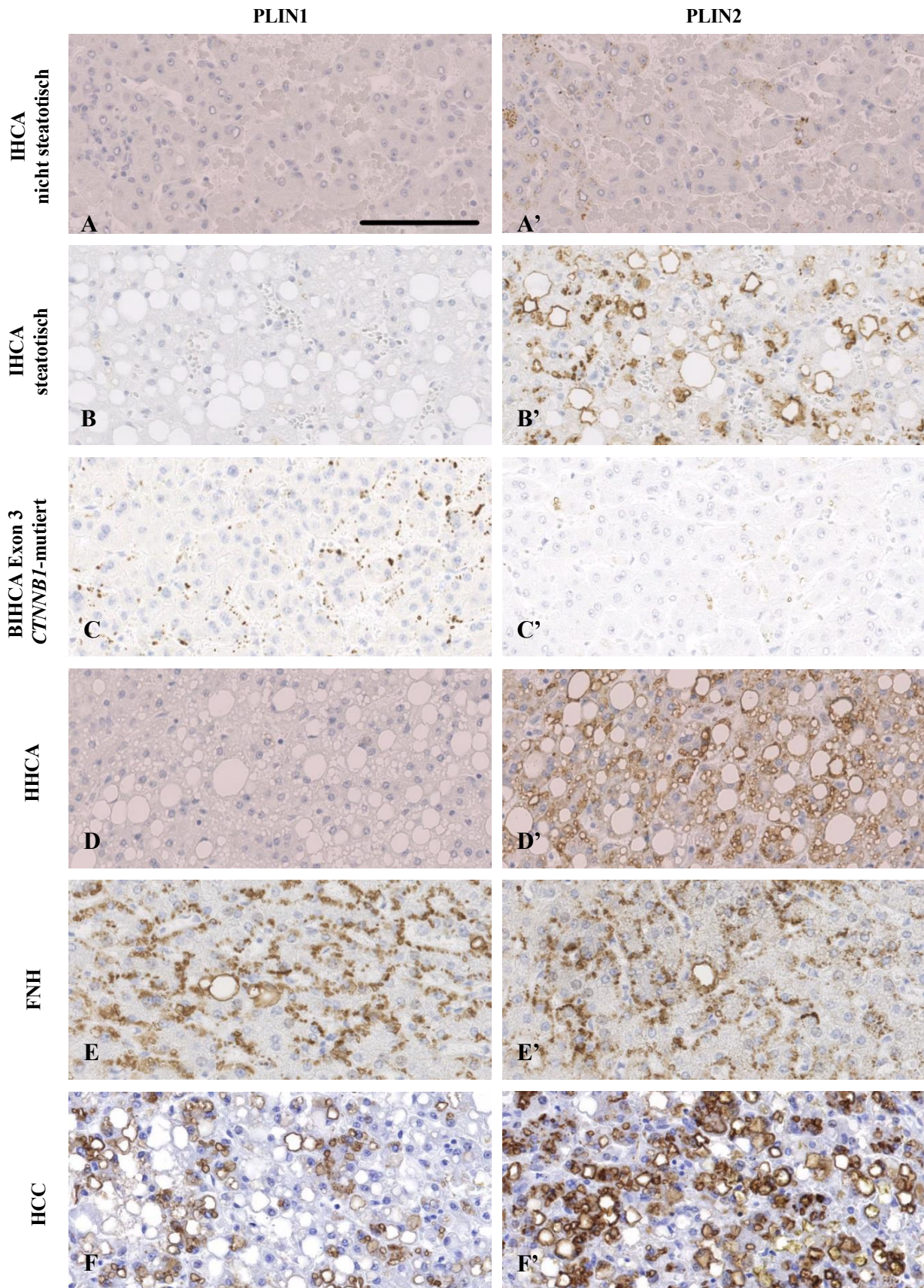


Abb. 12: Differentielle Perilipin 1- und ubiquitäre Perilipin 2-Expression in HCA-Subtypen und Vergleich zu FNHs und HCCs. Perilipin 1 (PLIN1) und Perilipin 2 (PLIN2) Immunhistochemie von FFPE-Schnitten humaner Leberproben. Eichstrich: 100 µm.

4.2.2 Analyse der Perilipine 3, 4 und 5 in HCAs

Wir untersuchten die Expression der ePATs-Proteine Perilipin 3, 4 und 5 immunhistochemisch in den HCA-Subtypen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass HHcAs ($2,1 \pm 0,7$) eine stärkere Intensität der Perilipin 4-Expression als steatotische IHcAs ($1,6 \pm 0,8$; $p \leq 0,05$) aufwiesen. Keine weiteren Unterschiede in der Intensität der Perilipin 3, 4 und 5 Immunhistochemie konnten in HCCs, FNHs sowie HCAs (Abb. 13 und Tab. 24) nachgewiesen werden.

Perilipin 3, 4 und 5 kamen granulär-zytoplasmatisch in allen Tumorentitäten vor. Zudem wurden teils auch mikrovesikuläre Lipidtropfen markiert (Abb. 14 A, B, C, E und G), sowie punktförmige Strukturen (Abb. 13 F). In B(I)HCAs konnten auch winzige zur sinusoidalen Seite der Hepatozyten gerichtete Perilipin 3 und Perilipin 5 Lipidtropfen identifiziert werden (Abb. 8 D und D'). Perilipin 4 wies z. T. auch eine verstärkte Expression auf der basolateralen Seite der Hepatozyten auf (Abb. 8 D'). Zusätzlich bestanden regionale Unterschiede, teils auch Unterschiede von Zelle zu Zelle, in der Intensität der ePATs-Proteine innerhalb der HCAs (Abb. 13 A). Bei FNHs kamen Perilipin 3, 4 und 5 z.T. verstärkt um Septen vor (Abb. 13 E). Bei einigen Patienten waren Schwankungen in der Intensität der zytoplasmatischen Färbung zwischen HCA und dem angrenzenden Lebergewebe nachweisbar (Abb. 15). Sowohl HCA als auch das angrenzende Lebergewebe konnte dabei eine stärkere Farbindensität aufweisen. Es bestand keine Korrelation zwischen Intensität der zytoplasmatischen Färbung der ePATs-Proteine und dem Verfettungsgrad.

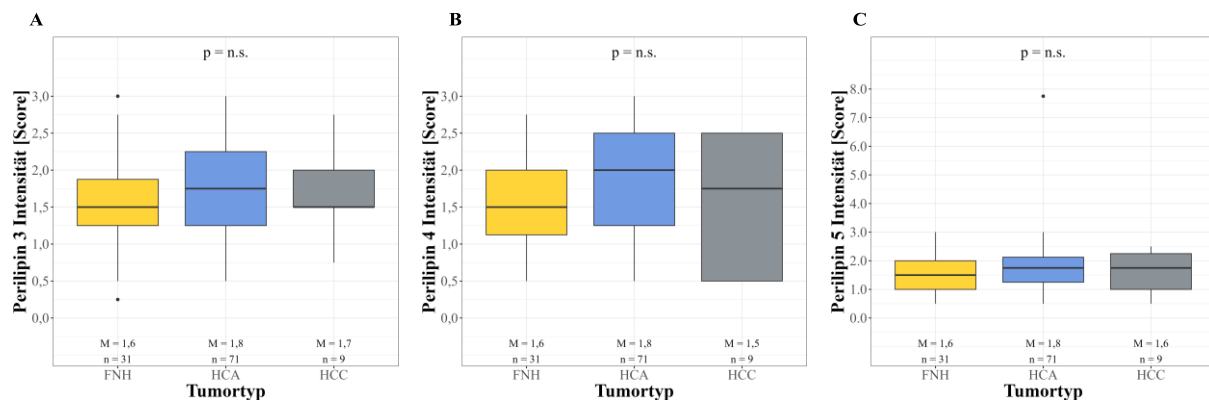


Abb. 13: Perilipin 3-, 4- und 5-Expression in HCAs und Vergleich zu FNHs und HCCs. Die Perilipin 3, 4 und 5 immunhistochemischen Färbungen wurden lichtmikroskopisch hinsichtlich der Intensität semiquantitativ, wie unter 3.2.7.2 dargestellt, bestimmt. Die Ergebnisse sind als Box-Whisker-Plots dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test eingesetzt. Für die Berechnung der globalen P-Werte wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet.

Tab. 24: Perilipin 3-, 4- und 5-Expression in HCA-Subtypen

HCA-Subtyp (Anzahl der Herde)	PLIN3-Intensität [M ± SD]	PLIN4-Intensität [M ± SD]	PLIN5-Intensität [M ± SD]
IHCA, Gesamt (41)	1,9 ± 0,7	1,7 ± 0,8	1,7 ± 0,6
IHCA nicht steatotisch (21)	1,9 ± 0,8	1,9 ± 0,8	1,8 ± 0,6
IHCA steatotisch (20)	1,9 ± 0,7	1,6 ± 0,8	1,6 ± 0,6
B(I)HCA, Gesamt (8)	1,8 ± 0,7	1,7 ± 0,6	1,8 ± 0,4
BHCA (3)	2,3 ± 0,7	1,8 ± 0,8	2,0 ± 0,5
BIHCA (4)	1,3 ± 0,3	1,5 ± 0,3	1,6 ± 0,3
HHCA (15)	1,7 ± 0,5	2,1 ± 0,7	2,2 ± 1,7
shHCA (2)	1,8 ± 0,4	2,1 ± 0,2	1,8 ± 0,4
UHCA (5)	1,8 ± 0,5	2,0 ± 0,4	1,7 ± 0,6

Die Perilipin 3 (PLIN3), 4 (PLIN4) und 5 (PLIN5) immunhistochemischen Färbungen wurden lichtmikroskopisch hinsichtlich der Intensität semiquantitativ, wie unter 3.2.7.2 dargestellt, bestimmt. Die Mittelwerte (M) und Standardabweichungen (SD) wurden berechnet.

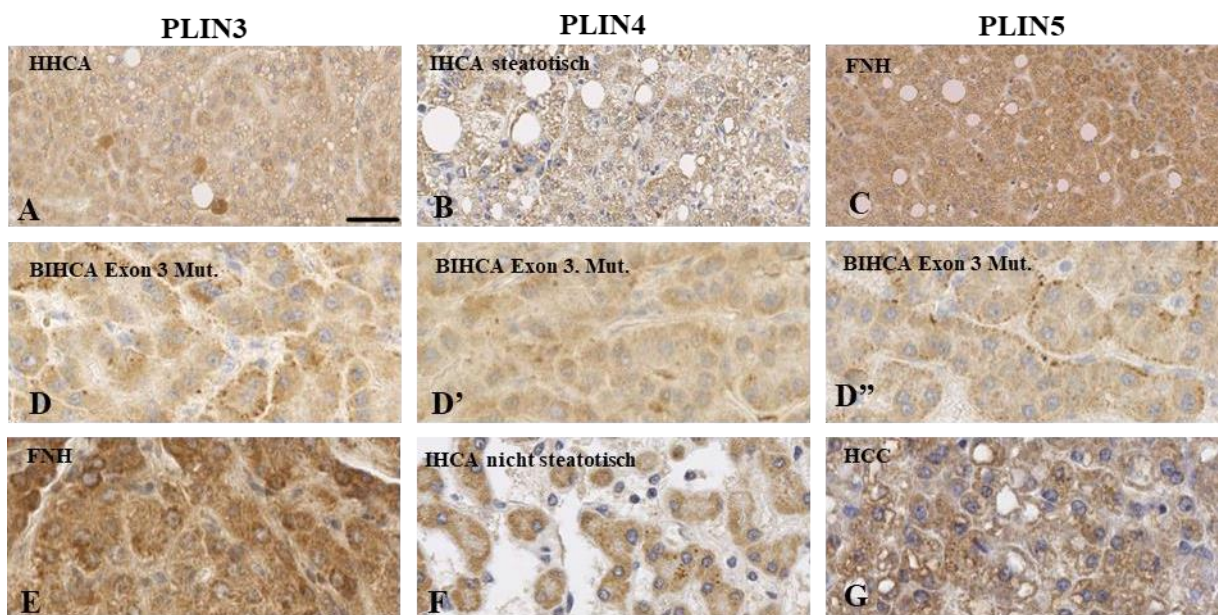


Abb. 14: Ubiquitäre zytoplasmatische Lokalisation von Perilipin 3, 4, und 5 und partielle Expression um Lipidtropfen. Perilipin 3 (PLIN3), 4 (PLIN4) und 5 (PLIN5) Immunhistochemie von FFPE-Schnitten humaner Lebertumoren. BIHCA Exon 3 Mut.: Exon 3 *CTNNB1*-mutiertes inflammatorisches HCA. Eichstrich: 25 µm.

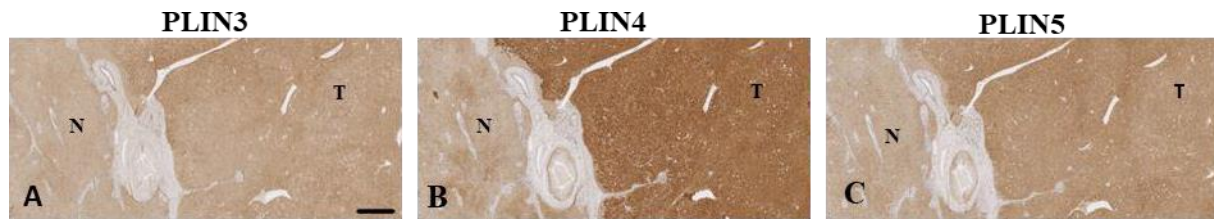


Abb. 15: Intensitätsschwankungen der immunhistochemischen Färbungen von Perilipin 3, 4 und 5 zwischen HCA und angrenzendem Lebergewebe. Perilipin 3 (PLIN3), 4 (PLIN4) und 5 (PLIN5) Immunhistochemie von FFPE-Schnitten eines HHCA mit angrenzendem Lebergewebe. T: Tumor; N: nicht-tumoröses Lebergewebe. Eichstrich: 500 μ m.

4.3 Evaluation der Steatose und der Perilipin-Expression im nicht-neoplastischen Leberparenchym von HCA-Patienten

Dem Tumormikromilieu wird für die Tumorentwicklung zunehmendes Interesse zugeteilt, wobei bislang in erster Linie die Rolle von Immunzellinfiltraten analysiert wurde (260-262). Eine *Steatosis hepatis* kann beispielweise eine HCC-Entstehung begünstigen, ohne Zirrhose (263-265).

Im Rahmen dieser Arbeit untersuchten wir die Steatose des angrenzenden Lebergewebes von HCA-Patienten des Kollektivs. Das den HCAs angrenzende Lebergewebe war in 76,5 % der Fälle steatotisch war. Der durchschnittliche Steatosegrad lag bei $17,7 \pm 18,5$ % (Abb. 16). Das angrenzende Leberparenchym der FNHs und HCCs unseres Kollektivs war im Vergleich in über der Hälfte der Fälle (63,3 % bzw. 62,5 %) steatotisch, wies jedoch mit einem durchschnittlichen Steatosegrad von $15,4 \pm 16,6$ % und $10,1 \pm 11,5$ % leicht niedrigere Steatosegrade als das Lebergewebe bei HCA-Patienten (n.s.).

Übergewicht und *Steatosis hepatis* wurden von Bunchorntavakul und Koautren (61) sowie Bioulac-Sage und Koautoren (1, 65) spezifisch mit dem IHCA-Subtyp assoziiert. In unserem Kollektiv war das nicht-tumoröse Leberparenchym der IHCA-Patienten in 85 % der Fälle verfettet (Anhang, Tab. 34). Das angrenzende Leberparenchym der IHCA-Patienten zeigte mit einem durchschnittlichen Steatosegrad von $19,6 \pm 18,5$ % eine höhere Leberparenchymsteatose als das angrenzende Leberparenchym der B(I)HCA-Patienten ($3,7 \pm 6,6$ %; $p \leq 0,01$), hierbei war das angrenzende Leberparenchym der B(I)HCA-Patienten in 71,4 % der Fälle nicht verfettet (Anhang, Tab. 34). Das angrenzende Lebergewebe der steatotischen IHCA-Patienten war stärker verfettet ($26,0 \pm 20,2$ %) als das der nicht steatotischen IHCA-Patienten ($13,3 \pm 14,5$ %; $p \leq 0,05$; Abb.16). Das angrenzende Leberparenchym der HHCA-Patienten wies in der Mehrheit der Fälle (85,7 %) eine milde Verfettung auf (Anhang, Tab. 34; durchschnittlicher Steatosegrad: $11,6 \pm 6,2$ %) und war somit signifikant mehr verfettet als das angrenzende Leberparenchym der BHCA-Patienten ($2,3 \pm 2,5$ %; $p \leq 0,05$), wies jedoch einen niedrigeren Steatosegrad als das angrenzende Leberparenchym der shHCA-Patienten ($35,0 \pm 7,07$ %; $p \leq 0,05$) auf.

Das angrenzende Leberparenchym der UHCA-Patienten zeigte im Durchschnitt eine Verfettung von $32,2 \pm 35,2$ %.

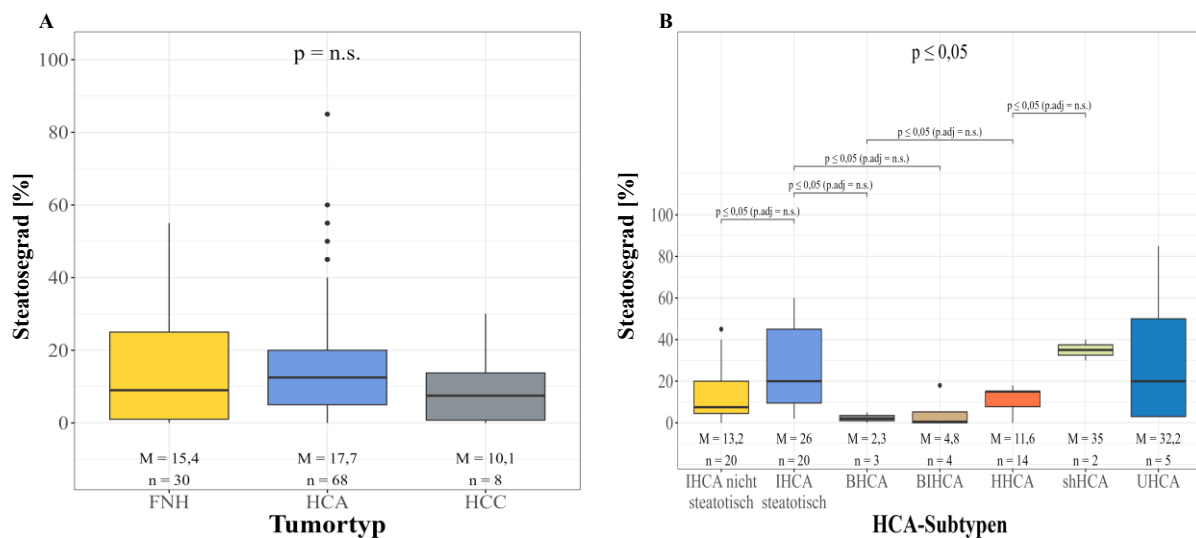


Abb. 16: Statistische Auswertung des Steatosegrades des nicht-tumorösen Leberparenchyms der HCA-Patienten und Vergleich zu den FNH- und HCC-Patienten. Die Ergebnisse sind als Box-Whisker-Plots dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test eingesetzt. Für die Berechnung der globalen P-Werte wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. IHCA st.: steatotisches inflammatorisches HCA; IHCA nt. st.: nicht steatotisches inflammatorisches HCA; Im Anhang wird die Anzahl der Leberproben pro Kategorie des Steatosegrades angegeben (Anhang, Tab. 34).

HCA und HCCs zeigten im Trend gering höhere Steatosegrade als das respektive nicht-neoplastische Leberparenchym (n.s.). FNHs zeigten einen etwas niedrigeren Steatosegrad als das zugehörige nicht-tumoröse Leberparenchym (n.s.). Lediglich die nicht steatotischen IHCA sowie die zwei shHCA zeigten geringere Steatosegrade als das zugehörige nicht-tumoröse Lebergewebe (n.s.).

Im nicht-neoplastischen Leberparenchym kann die Perilipin-Expression Aufschlüsse zur Frage akuter oder chronischer Veränderung geben (36). Wir untersuchten, ob das Perilipin-Expressionsmuster im angrenzenden Leberparenchym der HCAs besondere Merkmale aufwies.

Keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Perilipin 1-markierten Parenchymfläche, der Perilipin 1-markierten Hepatozyten oder der Intensität der Perilipin 1-Färbung im nicht-neoplastischen Leberparenchym waren nachweisbar (Tab. 25). Ebenso zeigten sich keine Unterschiede in der Perilipin 1-Expression, wenn man das angrenzende Lebergewebe der HCA-, HCC- und FNH-Patienten miteinander verglich (Tab. 25). Im nicht-tumorösen Leberparenchym war jeweils etwa ein Drittel der Hepatozyten positiv für Perilipin 1 waren. Die Perilipin 1-Expression war perizentral lokalisiert (Abb. 17 A und B). Sowohl makro- als auch mikrovesikuläre Lipidtropfen waren positiv für Perilipin 1 (Abb. 17 A

und B). Im Trend zeigte sich eine geringe Zunahme der Perilipin 1-markierten Leberparenchymfläche mit dem Steatosegrad, auch wenn diese statistisch nicht signifikant war.

Das nicht-tumoröse Leberparenchym der IHCA-Patienten ($13,8 \pm 13,6$ %) zeigte eine größere Perilipin 2-positive Parenchymfläche (Anhang, Abb. 25) als das nicht-tumoröse Parenchym der B(l)HCA- ($2,8 \pm 2,4$ %; $p \leq 0,01$) und HHCA-Patienten ($4,9 \pm 3,0$ %; $p \leq 0,05$). Das nicht-tumoröse Parenchym der IHCA-Patienten wies im Trend eine etwas größere Prozentzahl an Perilipin 2-positiven Hepatozyten ($58,9 \pm 31,4$ %) als das der Patienten anderer Subtypen (Tab. 25; n.s.). Darunter zeigte speziell das nicht-tumoröse Parenchym der steatotischen IHCA-Patienten signifikant höhere Prozentzahlen Perilipin 2-markierter Hepatozyten ($65,1 \pm 29,9$ %) als die HHCA- ($48,1 \pm 29,1$ %; $p \leq 0,05$) und BHCA-Patienten ($19,7 \pm 13,8$ %; $p \leq 0,05$); wobei die HHCA-Patienten wiederum eine höhere Prozentzahl an Perilipin 2-markierten Hepatozyten als die BHCA-Patienten aufwiesen ($p \leq 0,05$). Es ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich der Perilipin 2-markierten Parenchymfläche, der Perilipin 2-markierten Hepatozyten oder der Intensität der Perilipin 2-Färbung, wenn man das angrenzende Lebergewebe der HCA-, HCC- und FNH-Patienten miteinander verglich (Tab. 25). Im nicht-tumorösen Leberparenchym war Perilipin 2 an makro- und mikrovesikulären Lipidtropfen ohne zonale Bevorzugung lokalisiert (Abb. 17 A'). Bei nicht-steatotischem Leberparenchym kam Perilipin 2 in Hepatozyten kaum vor (Abb. 17 B').

Tab. 25: Auswertung der Perilipin 1- und Perilipin 2-Immunhistochemie im nicht-tumorösen Leberparenchym von HCA- Patienten und im Vergleich zu FNH- und HCC-Patienten

Angrenzendes nicht-tumoröses Leberparenchym (Anzahl der Fälle)	PLIN1			PLIN2		
	Positive Fläche [%]	Anzahl positiver Hep. [%]	Intensität Score	Positive Fläche [%]	Anzahl positiver Hep. [%]	Intensität Score
IHCA, Gesamt (40)	8,0 ± 11,1	27,5 ± 26,1	1,4 ± 0,7	13,8 ± 13,6	58,9 ± 31,4	1,8 ± 0,7
IHCA nicht steatotisch (20)	4,3 ± 4,4	20,3 ± 21,8	1,2 ± 0,7	8,6 ± 7,7	52,8 ± 32,3	1,7 ± 0,6
IHCA steatotisch (20)	11,7 ± 14,3	34,7 ± 28,6	1,6 ± 0,8	19,0 ± 16,2	65,1 ± 29,9	2,0 ± 0,7
B(I)HCA, Gesamt (7)	2,1 ± 1,7	22,1 ± 20,6	0,9 ± 0,6	2,8 ± 2,4	36,1 ± 32,8	1,3 ± 0,6
BHCA (3)	1,8 ± 1,0	22,5 ± 20,5	0,9 ± 0,5	1,0 ± 0,0	19,7 ± 13,8	0,8 ± 0,3
BIHCA (4)	2,3 ± 2,2	21,9 ± 23,9	0,9 ± 0,5	4,1 ± 2,5	48,4 ± 39,5	1,6 ± 0,5
HHCA (14)	5,04 ± 2,7	41,6 ± 23,2	1,4 ± 0,7	4,9 ± 3,0	48,1 ± 22,1	1,5 ± 0,6
shHCA (2)	6,0 ± 5,7	25,0 ± 14,1	2,0 ± 0,0	5,0 ± 0,0	45,0 ± 35,4	1,8 ± 0,4
UHCA (5)	17,7 ± 23,4	54,0 ± 24,3	2,0 ± 0,7	38,8 ± 38,2	44,5 ± 37,4	1,8 ± 0,8
HCA, Gesamt (68)	7,4 ± 10,9	31,7 ± 25,6	1,4 ± 0,7	12,4 ± 16,5	52,9 ± 30,5	1,7 ± 0,7
FNH (27)	7,6 ± 7,6	30,4 ± 17,8	1,6 ± 0,7	10,0 ± 13,1	47,1 ± 33,4	1,6 ± 0,6
HCC (8)	7,00 ± 8,1	38,0 ± 22,7	1,5 ± 0,7	6,3 ± 5,9	40,6 ± 23,1	1,5 ± 0,8

Prozentzahl der Perilipin 1- bzw. Perilipin 2-positiven Parenchymfläche sowie der positiven Hepatozyten (Hep.). Die Intensität der Perilipin 1- und 2-Färbungen wurde wie unter 3.2.7.2. dargestellt, bewertet. Das nicht-tumorösen Leberparenchym der zugehörigen gleichen Tumortypen bzw. -subtypen wurden jeweils zusammengefasst und Mittelwerte (M) und Standardabweichungen (SD) wurden berechnet.

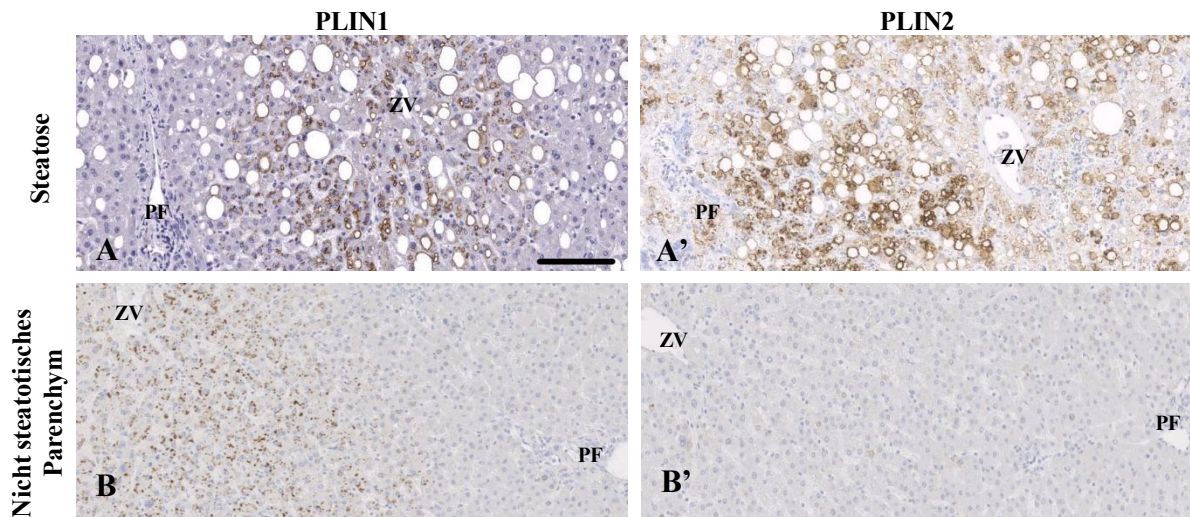


Abb. 17: Perilipin 1- und 2-Immunhistochemie im nicht-tumorösen Leberparenchym. Immunhistochemie von FFPE-Schnitten humaner Leberproben. Perilipin 1 (PLIN1) lokalisiert perizentral. Perilipin 2 (PLIN2) zeigte keine zonale Bevorzugung. Eichstrich: 100 μ m.

In den HCAs war die Perilipin 1-Expression hinsichtlich der Prozentzahl Perilipin 1-positiver Hepatozyten und der Perilipin 1-positiven Parenchymfläche sowie Intensität der Färbung niedriger als im angrenzenden nicht-tumorösen Leberparenchym (jeweils $p \leq 0,001$). Denselben Trend konnten wir bei HCCs und dem zugehörigen nicht-tumorösen Lebergewebe feststellen. Bei FNHs war tendenziell die Anzahl Perilipin 1-positiver Hepatozyten leicht höher als im nicht-tumorösen Lebergewebe (n.s.). Die markierte Parenchymfläche sowie die Intensität der Färbung waren im Trend etwas größer im nicht-tumorösen Leberparenchym als in den FNHs (n.s.). Die IHCA und HHCA zeigten signifikant weniger Perilipin 1-positiver Hepatozyten, eine geringere Perilipin 1-positiver Parenchymfläche sowie eine schwächere Intensität der Perilipin 1-Färbung im Vergleich zum angrenzenden nicht-tumorösen Leberparenchym (jeweils $p \leq 0,001$). shHCA und UHCA zeigten tendenziell auch weniger Perilipin 1 als das angrenzende nicht-tumoröse Lebergewebe. Die B(I)HCA zeigten im Trend eine geringe Zunahme der Prozentzahl Perilipin 1-positiver Hepatozyten und Parenchymfläche im Vergleich zum angrenzenden nicht-tumorösen Lebergewebe (n.s.).

HCAs und FNHs wiesen eine ähnliche Perilipin 2-Expression gemessen als Prozentzahl Perilipin 2-positiver Hepatozyten und Perilipin 2-positiver Parenchymfläche als das angrenzende nicht-tumoröse Lebergewebe auf. Hingegen zeigte das HCC-Tumorgewebe einen höheren Prozentanteil Perilipin 2-positiver Hepatozyten und eine größere Perilipin 2-positiver Parenchymfläche als das angrenzende nicht-tumoröse Lebergewebe (jeweils $p \leq 0,05$). Die unterschiedlichen Subtypen in Betracht genommen zeigte das tumoröse Lebergewebe der HHCA eine größere Prozentzahl Perilipin 2-markierter Hepatozyten und eine größere Perilipin 2-markierte Parenchymfläche als das zugehörige nicht-tumoröse Lebergewebe (jeweils $p \leq 0,001$). Bei den anderen HCA-Subtypen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Perilipin 2-Expression zwischen HCA und angrenzendem Lebergewebe festgestellt werden.

Das nicht-tumoröse Leberparenchym exprimierte zytoplasmatisch Perilipin 3, 4 und 5 (Abb. 18). Bei einigen Patienten gab es Unterschiede in der Intensität der zytoplasmatischen Perilipin 3, 4 und 5 immunhistochemischen Färbungen. Perilipin 3, 4 und 5 ummantelten auch mikro- sowie makrovesikuläre Lipidtropfen (Abb. 18). Hierbei waren Perilipin 3 und 5 betont periportal lokalisiert. Außerdem kamen die ePATs-Proteine Perilipin 3, 4 und 5 auch bei einigen Patienten granulär im Zytoplasma der Hepatozyten vor (Abb. 18 B). Die Intensität der Perilipin 3-Färbung war bei HCC-Patienten ($2,0 \pm 0,5$) signifikant höher als bei FNH-Patienten ($1,5 \pm 0,6$; $p \leq 0,05$). Unsere Analysen konnten ansonsten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Intensität der Perilipin 3, 4 und 5 immunhistochemischen Färbungen im nicht-tumorösen Lebergewebe von HCA-, FNH-, HCC-Patienten oder zwischen dem Leberparenchym der HCA-Patienten feststellen (Tab. 26).

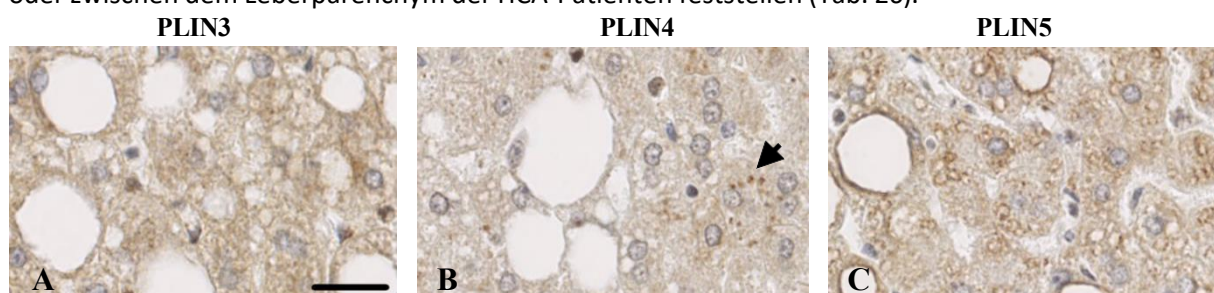


Abb. 18: Zytoplasmatische Lokalisation der ePAT-Proteine Perilipin 3, 4 und 5 im nicht-tumorösen Leberparenchym. Perilipin 3 (PLIN3), 4 (PLIN4) und 5 (PLIN5) Immunhistochemie von FFPE-Schnitten humaner Leberproben nicht-tumorösen steatotischen Lebergewebes. Der Pfeil zeigt das granuläre Vorkommen von Perilipin 4 im Zytoplasma der Hepatozyten. Eichstich: 25 μ m.

Tab. 26: Auswertung der Perilipin 3-, 4- und 5-Immunhistochemie im nicht-tumorösen Leberparenchym von HCA-Patienten und im Vergleich zu FNH- und HCC-Patienten

Angrenzendes nicht-tumoröses Leberparenchym (Anzahl der Fälle)	PLIN3-Intensität [M \pm SD]	PLIN4-Intensität [M \pm SD]	PLIN5-Intensität [M \pm SD]
IHCA, Gesamt (40)	1,3 \pm 0,6	1,5 \pm 0,7	1,5 \pm 0,6
IHCA nicht steatotisch (20)	1,3 \pm 0,6	1,5 \pm 0,7	1,5 \pm 0,6
IHCA steatotisch (20)	1,4 \pm 0,6	1,5 \pm 0,7	1,5 \pm 0,6
B(I)HCA, Gesamt (7)	1,8 \pm 0,5	2,0 \pm 0,6	2,0 \pm 0,4
BHCA (3)	2,1 \pm 0,5	1,9 \pm 0,5	2,0 \pm 0,3
BIHCA (4)	1,6 \pm 0,3	2,1 \pm 0,7	1,9 \pm 0,5
HHCA (14)	2,1 \pm 0,5	2,0 \pm 0,4	2,3 \pm 0,6
shHCA (2)	1,5 \pm 0,0	1,6 \pm 0,2	1,6 \pm 0,9
UHCA (5)	1,5 \pm 0,6	1,7 \pm 0,4	1,6 \pm 0,1
HCA, Gesamt (68)	1,6 \pm 0,6	1,7 \pm 0,6	1,7 \pm 0,7
FNH (27)	1,5 \pm 0,6	1,6 \pm 0,7	1,8 \pm 0,7
HCC (8)	2,0 \pm 0,5	1,8 \pm 0,2	2,0 \pm 0,4

Die Perilipin 3 (PLIN3)-, 4 (PLIN4)- und 5 (PLIN5)-Immunhistochemie wurden hinsichtlich der Intensität semiquantitativ wie unter 3.2.7.2. dargestellt bestimmt. Mittelwerte (M.) und Standardabweichungen (SD) wurden berechnet.

4.4 Analyse der Assoziation der Perilipin 1- und Perilipin 2-Expression mit dem Wnt-Signalweg

4.4.1 Gemeinsames Vorkommen von Perilipin 1 und Glutaminsynthetase

Hepatozyten erfüllen je nach Lokalisation in Zone 1, 2 oder 3 unterschiedliche metabolische Funktionen und exprimieren unterschiedliche Gene (19, 266). Im normalen Leberparenchym ist der Wnt-Signalweg in Zone 3 aktiviert (101, 102) und *GLUL* als Zielgen dort exprimiert (266). In FNHs sowie in B(I)HCAs war eine größere Anzahl Perilipin 1-positiver Hepatozyten vorhanden und eine stärkere GS-Expression nachweisbar. Deshalb untersuchten wir, ob eine potentielle Assoziation zwischen Perilipin 1 und Glutaminsynthetase bestehen könnte.

Perilipin 1 und GS zeigten unabhängig vom Steatosegrad des Gewebes sowohl im nicht-tumorösen Lebergewebe als auch in FNHs, B(I)HCAs (Abb. 19) sowie einigen HCCs teils überlappende Expressionsmuster. So zeigten Perilipin 1 und Glutaminsynthetase in FNHs beide ein landkartenartiges Muster (Abb. 19 A und A'). Ein Exon 3 *CTNNB1*-mutiertes BIHCA zeigte eine ubiquitäre Positivität für Glutaminsynthetase und Perilipin 1 (Abb. 19 B und B'). Die zwei Exon 7 und Exon 8 *CTNNB1*-mutierten B(I)HCAs zeigten keine Perilipin 1-Expression.

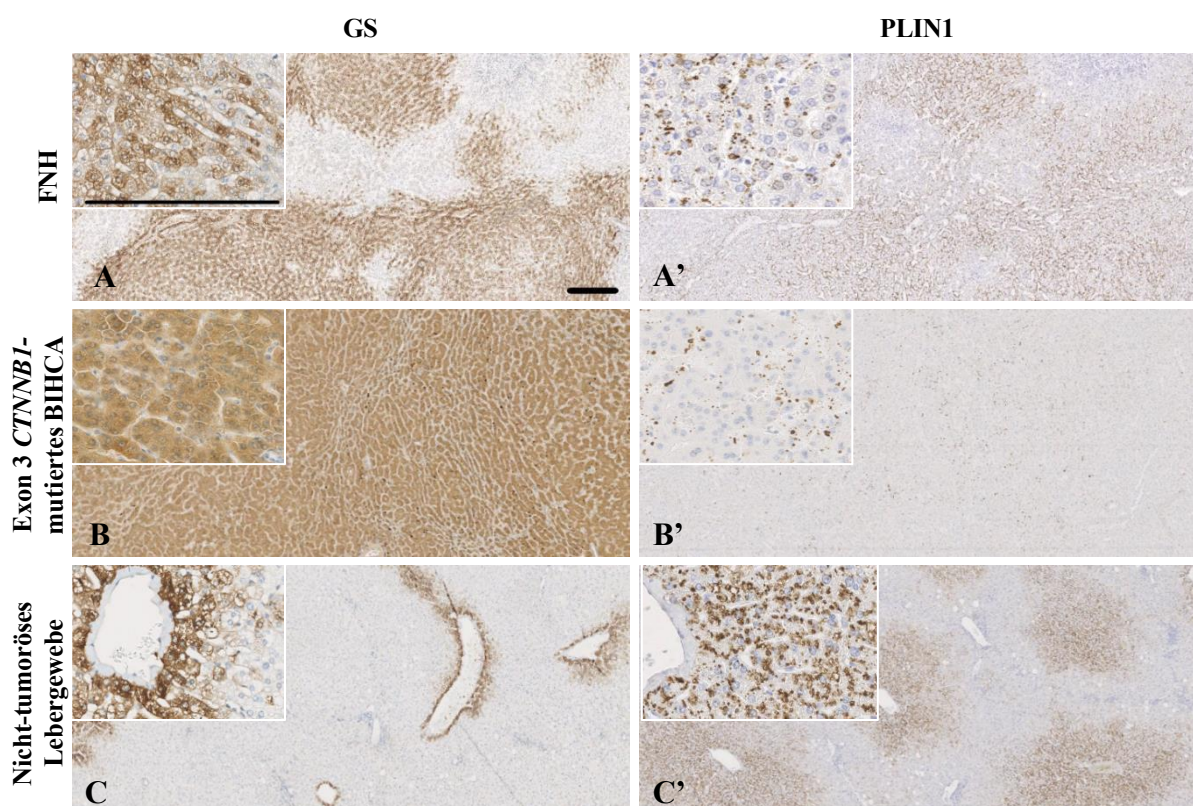


Abb. 19: Koexpression von Glutaminsynthetase und Perilipin 1 in der Leber. Immunhistochemie von FFPE-Schnitten, die mit Antikörpern gegen Glutaminsynthetase (GS) und Perilipin 1 (PLIN1) gefärbt wurden. Eichstrich: 250 μ m.

Um zu überprüfen, ob Glutaminsynthetase und Perilipin 1 in denselben Zellen vorkommen, wurde eine Immunfluoreszenz-Mikroskopie von einer Probe steatotischen nicht-tumorösen Leberparenchyms (A), einem steatotischen IHCA (B) sowie einer steatotischen FNH (C) an Kryogewebe durchgeführt (Abb. 20). Im nicht-tumorösen Leberparenchym kamen Perilipin 1 und Glutaminsynthetase perizentral vor (Abb. 20 A). In dem steatotischen IHCA wurde keine Glutaminsynthetase-Expression nachgewiesen (Abb. 20 B'''), wobei jedoch Perilipin 1-positive Lipidtropfen identifizierbar waren (Abb. 20 B''). Bei der steatotischen FNH kamen fokal Perilipin 1 und Glutaminsynthetase beide zusammen vor (Abb. 20 C).

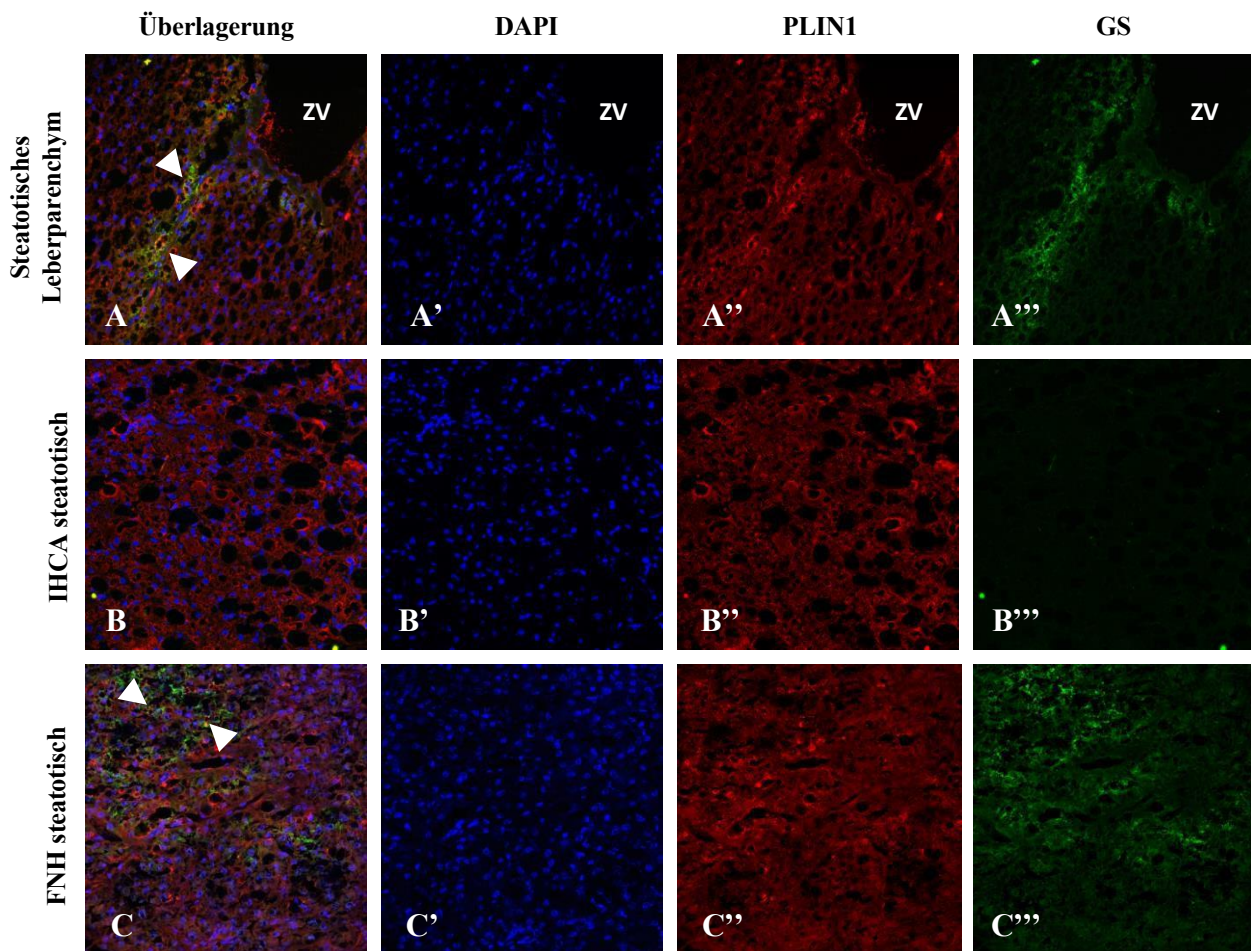


Abb. 20: Gemeinsames Vorkommen von Glutaminsynthetase und Perilipin 1 in der Leber. Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie von Glutaminsynthetase (GS, grün, Alexa Fluor 488) und Perilipin 1 (PLIN1, rot, Alexa Fluor 546) in humaner Leber, einem steatotischen inflammatorischen Hepatozellulären Adenom und einer steatotischen Fokalen Nodulären Hyperplasie. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). ZV: Zentralvene. Die Pfeile zeigen eine Kolokalisation von Glutaminsynthetase und Perilipin 1. Eistrich: 25 µm.

4.4.2 Verstärkte *PLIN1* mRNA-Expression in FNHs

In einem nächsten Schritt wurde die Expression von *PLIN1* und *GLUL* in sieben HCA- und fünf FNH-Kryogewebe-Proben (Tab. 27) auf Transkriptebene untersucht (Abb. 21). Die mRNA von *PLIN1* war höher in den FNHs als in den untersuchten HCAs (IHCA und UHCAs). Im Durchschnitt lag die relative *PLIN1* mRNA-Expression bei $2,45 \cdot 10^{-7} \pm 1,61 \cdot 10^{-7}$ für HCAs und bei $7,46 \cdot 10^{-7} \pm 3,79 \cdot 10^{-7}$ für FNHs ($p \leq 0,05$). Die relative *GLUL* mRNA-Expression lag für HCAs im Durchschnitt bei $3,07 \cdot 10^{-5} \pm 2,38 \cdot 10^{-5}$; für die FNHs bei $9,76 \cdot 10^{-5} \pm 6,71 \cdot 10^{-5}$ (n.s.). Während bei FNHs die *PLIN1* mRNA im Trend leicht stärker im Tumorgewebe als im angrenzenden nicht-tumorösen Leberparenchym exprimiert war ($5,0 \cdot 10^{-7} \pm 1,05 \cdot 10^{-7}$; n.s.), zeigte das nicht-tumoröse, den HCAs angrenzende Lebergewebe ($4,65 \cdot 10^{-7} \pm 3,50 \cdot 10^{-7}$) tendenziell eine etwas höhere *PLIN1* mRNA-Expression als das respektive HCA-Tumorgewebe (n.s.). Die untersuchten I- und UHCAs sowie auch FNHs wiesen im Trend im Tumorgewebe eine etwas stärkere *GLUL* mRNA-Expression auf als das respektive nicht-tumoröse Lebergewebe ($2,22 \cdot 10^{-5} \pm 8,71 \cdot 10^{-6}$ bzw. $6,06 \cdot 10^{-5} \pm 6,69 \cdot 10^{-5}$; n.s.). Zwischen Verfettung und *PLIN1* oder *GLUL* mRNA-Expression oder *GLUL* und *PLIN1* mRNA-Expression konnte statistisch keine Korrelation festgestellt werden.

Tab. 27: Kryoasservierte Leberproben

Fall-IdNr.	IdNr. N/ IdNr. T	Tumorentität	Alter [Jahre]	Geschlecht w/m	Steatosegrad T [%]	Steatosegrad N [%]
A	1/2	UHCA	56	M	80	50
B	3/4	IHCA nicht steatotisch	25	W	8	20
C	5/6	IHCA nicht steatotisch	25	W	2	8
D	7/8	IHCA steatotisch	42	W	75	55
E	9/10	IHCA nicht steatotisch	24	W	2	10
F	11/12	UHCA	51	W	5	80
G	x/13	IHCA nicht steatotisch	25	W	0	k. A.
H	14/15	FNH	50	W	35	25
I	16/17	FNH	61	W	35	20
J	18/19	FNH	62	M	8	25
K	20/21	FNH	48	M	2	55
L	x/22	FNH	27	M	3	k. A.

B, C und G entsprechen drei unterschiedlichen Tumorherden derselben Patientin. Bei Fall F leidet die Patientin an einer Glykogenose (Typ 3). w: weiblich; m: männlich; k. A: keine Angabe; IdNr.: Identifikationsnummer; T: tumoröses Lebergewebe; N: nicht-tumoröses Lebergewebe.

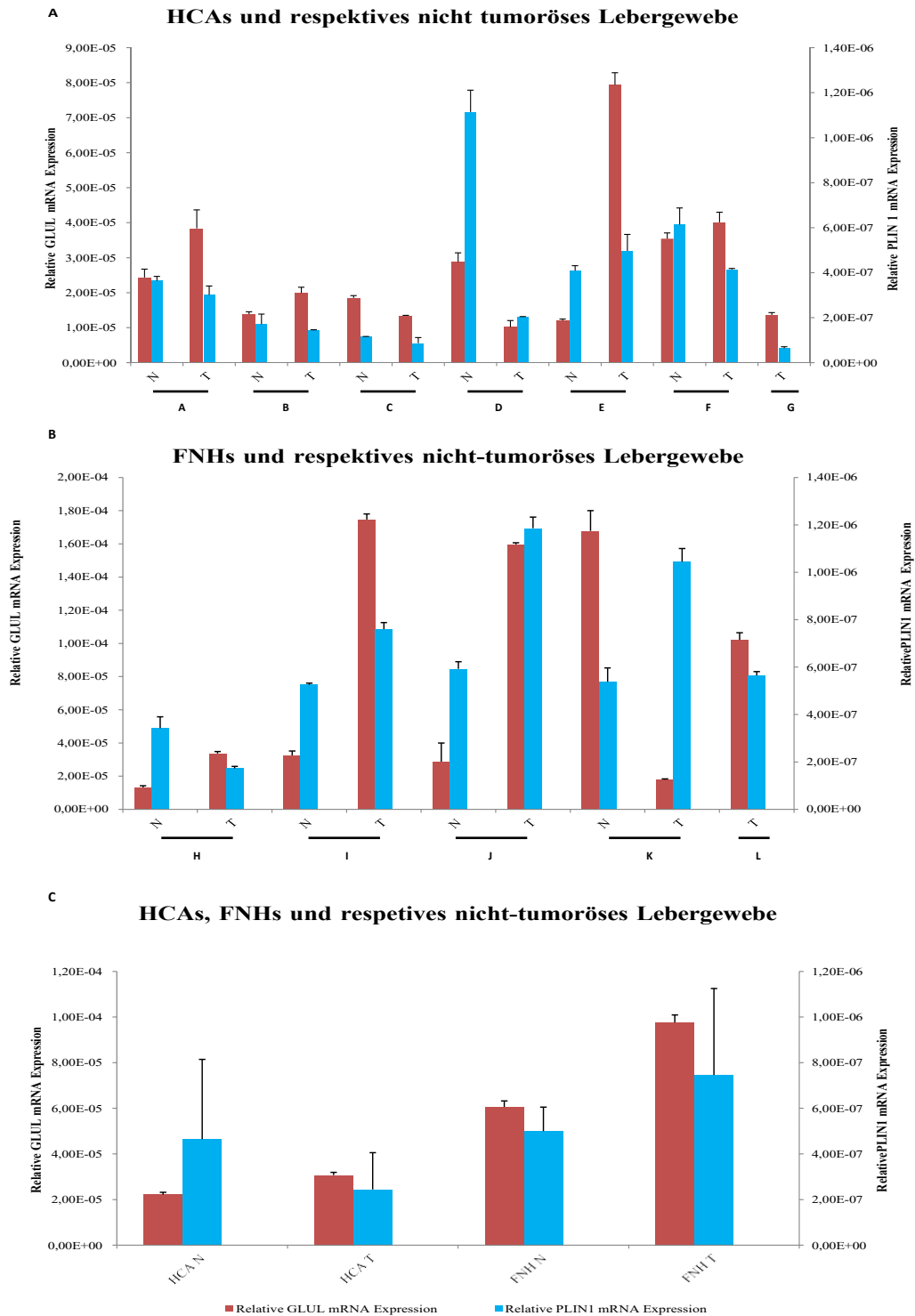


Abb. 21: mRNA-Analyse von *GS* und *PLIN1* in HCAs, FNHs und nicht-tumorösem Lebergewebe. PCR-Analyse von 22 humanen Kryogewebe Leberproben von HCAs (A), FNHs (B) sowie respektivem nicht-tumorösem Lebergewebe, die auf Glutaminsynthetase (GS) und Perilipin 1 (PLIN1)-Transkripte untersucht wurden. Zu der Nummerierung vgl. Tab. 29. In (C.) wurden die tumorösen und nicht-tumorösen Proben der gleichen Tumorentität zusammengefasst. Relative mRNA-Expression, die mittels der ΔCT -Methode auf *RNA18S*-Gen normalisiert wurde. Jeweils Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung. Für die statistische Auswertung wurde der T-Test eingesetzt. N: angrenzendes nicht-tumoröses Lebergewebe. T: Tumorgewebe.

4.4.3 Perilipin 1 und β -Catenin in HCAs und FNHs

Ergänzend untersuchten wir mittels Immunblot an kryoasservierten Gewebeproben der sieben HCAs (IHCA und UHCA) und fünf FNHs die Proteinexpression von Perilipin 1, 2 und 5 und β -Catenin (Abb. 22).

Ein Multiband-Muster (Laufhöhe bei ca. 70, 57, 35 und 27 kDa) von Perilipin 1 kam im nicht-tumorösen Leberparenchym sowie in HCAs und FNHs zur Darstellung. Dabei wird Perilipin 1 tendenziell etwas weniger stark im tumorösen Gewebe der I- und UHCAs (Abb. 22 A) als in dem der FNHs (Abb. 22 B) exprimiert, jedoch bei geringer Probenanzahl.

Alle sieben HCAs zeigten eine schwache Perilipin 1-Expression, und das HCA wies jeweils eine schwächere Perilipin 1-Expression als das zugehörige nicht-tumoröse Lebergewebe auf. Die HCA-Patienten A, B und C zeigten sowohl im nicht-tumorösen Lebergewebe als auch im HCA eine ganz schwache Expression von Perilipin 1 auf Proteinebene. Bei Patienten D, E und G war die Perilipin 1-Expression im Tumorgewebe schwach, bei jedoch etwas stärkerer Expression im nicht-tumorösen Leberparenchym.

Die FNH-Fälle J, K und L zeigten eine mindestens gleich starke oder sogar stärkere Perilipin 1-Expression in der FNH wie im nicht-tumorösen Lebergewebe. FNH-Fall H zeigte eine weitgehend gleiche Perilipin-1-Expression im nicht-tumorösen Lebergewebe und in der FNH. Fall I zeigte ebenfalls eine relativ schwache Perilipin-1-Expression. FNHs der Patienten I und J wiesen eine stärkere Perilipin 1-Expression sowie auch eine etwas stärkere β -Catenin-Expression auf.

Die Perilipin 2 (52-57 kDa)-Expression korrelierte bei HCA- und FNH-Patienten nur in wenigen Fällen (bei Patienten F und I) mit dem Steatosegrad des Gewebes, wie in H&E bestimmt. Unter den HCA-Patienten zeigte Patient D eine stärkere Perilipin 2-Expression im nicht-tumorösen als im tumorösen Lebergewebe, jedoch einen stärkeren Steatosegrad im tumorösen als im nicht-tumorösen Parenchym. Hingegen zeigten in den Immunblots-Analysen die FNH-Patienten I und J eine stärkere Perilipin 2-Expression im tumorösen als im nicht-tumorösen Lebergewebe, allerdings einen stärkeren Steatosegrad im nicht-tumorösen als im tumorösen Parenchym.

Darüber hinaus zeigten die Immunblot-Analysen, dass bei den FNH-Fällen, sowohl das tumoröse als auch angrenzendes nicht-tumoröses Lebergewebe mit starker Perilipin 5-Expression (Patienten I und J) ebenfalls eine hohe β -Catenin(92-102 kDa)-Expression aufwiesen. Beim tumorösen wie auch im angrenzenden nicht-tumorösen Lebergewebe zeigte sich keine Assoziation zwischen der Perilipin 5 (51-55 kDa)-, der Perilipin 1- und der Perilipin 2- Proteinexpression.

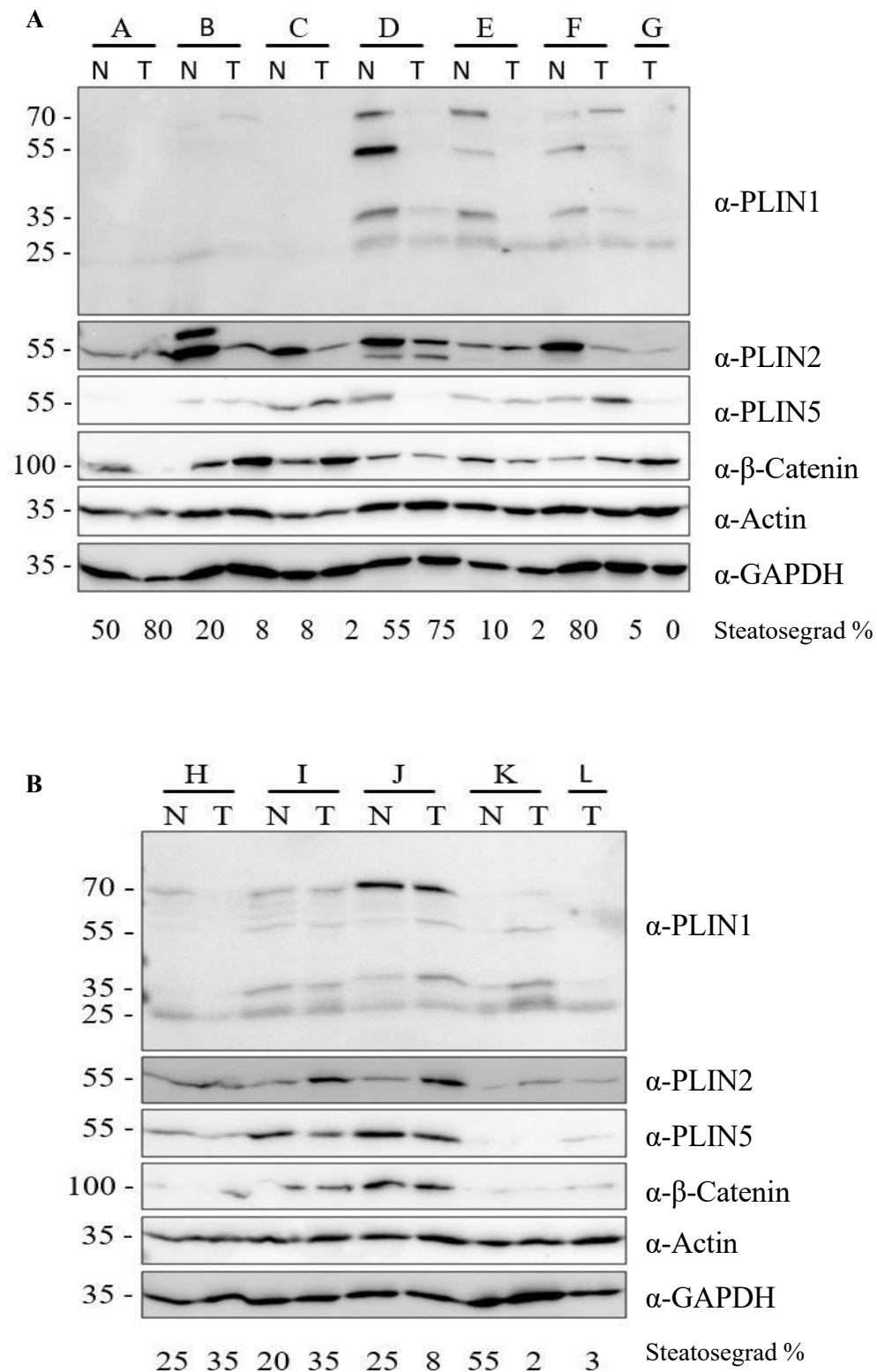


Abb. 22: Immunblot von Perilipin 1, 2, 5 und β -Catenin in HCAs und FNHs. Immunblot-Analyse von 22 humanen kryoasservierten Leberproben, aufgetrennt nach (A) HCA- und (B) FNH-Gewebeproben. Zu der Nummerierung vgl. Tab. 29. 50 μ g Gesamtproteine wurden jeweils aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen Perilipin 1 (PLIN1), Perilipin 2 (PLIN2), Perilipin 5 (PLIN5) und β -Catenin. Aktin und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) dienten als Ladekontrollen. Das Molekulargewicht in kDa ist auf der linken Seite angegeben. T: Tumorgewebe; N: angrenzendes nicht-tumoröses Lebergewebe.

4.4.4 Induktion der *PLIN1* mRNA-Transkription durch *CTNNB1*- Überexpression in HEK293T-Zellen

Um den Zusammenhang zwischen β -Catenin und Perilipin 1 weiter zu erforschen, wurden die Effekte einer transienten Überexpression von *CTNNB1* oder *PLIN1* in kultivierten HEK293T-Zellen mittels Transfektion mit Polyethylenimin untersucht. Bei Überexpression von *PLIN1* war auf Transkriptebene lediglich eine minimale, statistisch nicht signifikante Induktion von β -Catenin Zielgenen nachweisbar (Abb. 23). Eine Überexpression von *CTNNB1* Wildtyp (WT) oder konstitutiv aktiver (CA)-Form von *CTNNB1* erzeugte einen Anstieg der mRNA-Menge von *PLIN1* von 14 % bei der CA-*CTNNB1* Form (n.s.) und von 52 % bei der WT-*CTNNB1* Variante ($p \leq 0,01$). Die Überexpression von *CTNNB1* in der CA-Form oder WT-Variante erzeugte tendenziell eine Minderung der mRNA von β -Catenin-Zielgenen (n.s.). Nur bei Überexpression von CA-*CTNNB1* war eine 69 %ige Zunahme der *Axin2* mRNA-Expression nachweisbar ($p \leq 0,01$). Die mRNA-Expression von *MYC* blieb bei der Überexpression von der *CTNNB1* in der WT-Variante weitgehend stabil, aber reduzierte sich um 26 % bei der CA-*CTNNB1* Form (n.s.).

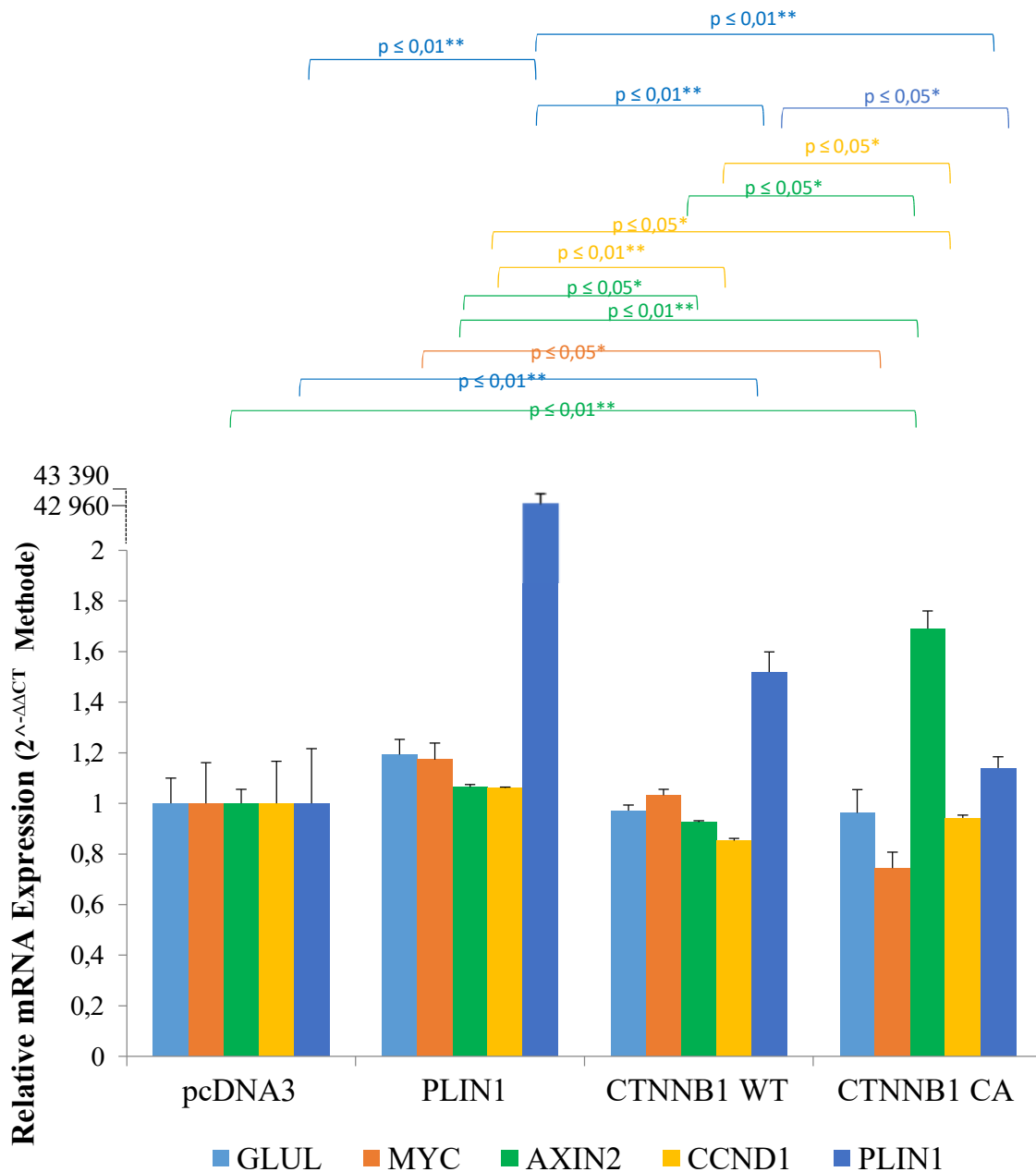


Abb. 23: Induktion der *PLIN1*-mRNA bei Überexpression von *CTNNB1*. PCR-Analyse von HEK293T-Zellen mit *PLIN1*- und *CTNNB1*-Überexpression auf Perilipin 1 (*PLIN1*) und β -Catenin(*CTNNB1*)-Zielgene. Relative mRNA-Expression, die mittels der $\Delta\Delta CT$ -Methode auf die Kontrollgruppe (mit pcDNA3 Leervektor transfizierten Zellen) normalisiert wurde. Die Expression der analysierten Gene wurde auf RNA18S normalisiert. Mittelwerte wurden mit zugehöriger Standardabweichung vom Mittelwert angezeigt. Für die statistische Auswertung wurde der T-Test eingesetzt.

5 Diskussion

HCA's bilden hinsichtlich ihrer klinisch-radiologischen und histomorphologischen Präsentation sowie ihres Komplikationspotentials eine heterogene Tumorgruppe. Bioulac-Sage und Zucman-Rossi sowie Koautoren schlagen deswegen HCA-Subgruppen vor (1, 2). Ein Teil der HCA's zeigte eine prominente Steatose. Auch für andere Tumoren konnte gezeigt werden, dass eine Steatose in Tumoren auftreten kann (17). Aufbauend auf Vorarbeiten von Straub und Koautoren, die zeigten, dass Perilipine in der Leber und im HCC ein spezielles Expressionsprofil aufweisen (17), fokussierten wir auf die Analyse der Steatose und des Perilipin-Expressionsprofils in HCA's.

5.1 Diagnostische Schwierigkeiten und Besonderheiten der HCA-Diagnose

Im Rahmen dieser Dissertation konnten wir feststellen, dass die Abgrenzung von HCA's zu anderen Lebertumoren oft schwierig ist. Morphologisch sind IHCA's und FNH's durchaus ähnlich, wie historisch der Begriff telangiektatische FNH's für IHCA's, dann ihre Reklassifizierung zunächst als telangiektatische Leberadenome und letztlich als IHCA's anschaulich macht (243, 267). Im Jahr 2006 klassifizierten Zucman-Rossi und Koautoren (2) in ihrem 96-Fälle umfassenden Kollektiv 6 Herde als HCA/telangiektatische FNH und 6 weitere Herde als HCA/reine FNH-Fälle, ohne sich zwischen beiden Entitäten festlegen zu können. Im Rahmen der erneuten Begutachtung und anhand der komplementären immunhistochemischen Untersuchungen wurden im Laufe der vorliegenden Arbeit ebenfalls insgesamt 11 ursprünglich als HCA eingeordnete Fälle als FNH's reklassifiziert. Aus klinischer Sicht ist eine solche Reklassifizierung von relativ geringer Bedeutung, da FNH's in der Regel komplikationslos verlaufen (3, 52, 58). Hingegen musste keine unserer zum Vergleich verwendete FNH's als HCA reklassifiziert werden. Da nicht systematisch alle FNH's unseres Instituts erneut begutachtet wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch initial als FNH's betrachtete Tumoren letztlich HCA's waren. Die Unterscheidung zwischen HCA's und gut differenzierten HCC's stellte in einigen Fällen ebenfalls eine Herausforderung dar. So wurden von vorherigen Studien einige Tumoren als Borderline HCA/HCC (1, 2) bzw. atypische HCA's (268) eingestuft. Ähnlich verlangte in unserem Kollektiv die Diagnose eines 1 cm messenden HCC-Areals inmitten eines 5,5 cm messenden BIHCA's eine ausgedehnte Einbettung des Feuchtmaterials und herausfordernde histologische Analysen mit komplementären immunhistochemischen Färbungen (13).

In unserem Kollektiv konnten wir feststellen, dass die Ki67-Proliferationsrate die Diagnose der Tumorentität unterstützen kann. Die Ki67-Proliferationsrate der FNH's war signifikant niedriger als die der HCA's, die wiederum niedriger als die der gut differenzierten HCC's war. Dies ist in Übereinstimmung mit Vorarbeiten von Jones und Koautoren (268), die darauf hindeuten, dass die mediane Ki67-

Proliferationsrate der HCAs (Median 1,2 %), sowie auch der atypischen HCAs (Median 1,0 %) signifikant geringer als die der gut-differenzierten HCCs (Median 4,5 %) war.

Die HCA-Subtypisierung ist derzeit weiter eine Herausforderung. Eine Erklärung hierfür sind die zum Teil nicht spezifischen histomorphologischen Eigenschaften der Läsionen (16). Ein Jahr nach Etablierung der Subtypen (2) wurde auf immunhistochemische bzw. molekularpathologische diagnostische Hilfen hingewiesen (8). Unsere Analysen bestätigten die nicht immer spezifischen histomorphologischen Merkmale. Lediglich die nicht-steatotischen IHCA wiesen signifikant höhere *Peliosis hepatis*-Werte als die HHCA auf. Ansonsten konnten zwischen den HCA-Subtypen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der histomorphologischen Merkmale festgestellt werden. Dagegen wiesen FNHs signifikant höhere Entzündungsinfiltrate und signifikant geringere Einblutungen als HCAs und HCCs auf, so dass diese histomorphologischen Merkmale in erster Linie bei der Diagnose der Tumorentität eingesetzt werden könnten.

Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit anschaulich gemacht werden, dass neben HHCA, die in 93,3 % der Fälle steatotisch waren, eine Steatose auch bei allen anderen HCA-Subtypen auftreten konnte. So waren 53,5 % der HCAs unseres Kollektivs steatotisch, ähnlich wie in der Bordeaux Experience von Bioulac-Sage und Koautoren (1), in der 57,8 % der HCAs eine Steatose aufwiesen. Etwas weniger als die Hälfte (48,8 %) der IHCA wiesen mit HHCA vergleichbare Steatosegrade auf. Diese Ergebnisse bestätigen und ergänzen die Daten von Paradis und Koautoren (243), die zeigten, dass 53% der IHCA eine signifikante Steatose aufwiesen.

Der erste Ansatz bei der HCA-(Subtyp)-Diagnose besteht in der Bildgebung (3). Dabei stützt sich die MRT-Untersuchung auf den Neutralfettgehalt des Tumors sowie das Vorhandensein von ektatischen blutgefüllten Sinusoiden (69-71). Jedoch konnten wir anhand unserer Untersuchungen zeigen, dass weder Steatose, die radiologisch als Kriterium für die HHCA-Diagnose genommen wird, noch *Peliosis hepatis*, die radiologisch üblicherweise als Kriterium für die IHCA-Diagnose verwendet wird, Subtypspezifisch sind. Entsprechend ist ähnlich den histomorphologischen Kriterien auch mit den radiologischen Subtypkriterien vorsichtig umzugehen, um Fehldiagnosen zu vermeiden, vor allem bei fälschlich als HHCA klassifizierten Herden, da bei diesem Subtyp nicht systematisch eine Resektion oder nur eine Biopsie empfohlen wird (1, 3).

In der vorliegenden Arbeit konnten wir feststellen, dass auch die immunhistochemischen Marker Interpretationsschwierigkeiten verursachen können. Zunächst erwies sich die Amyloid A-Färbung für die IHCA-Diagnose weniger sensitiv als die CRP-Färbung (siehe Abschnitt 4.1.2.1). Dies ist in Übereinstimmung mit anderen publizierten Studien (16). Im Kollektiv konnte zum Beispiel ein zunächst als UHCA begutachteter Fall nach Etablierung der CRP-Färbung als IHCA reklassifiziert werden. Darüber

hinaus war die Interpretation der GS-Färbung, auch mit den Hintergrundkenntnissen, dass die unterschiedlichen *CTNNB1*-Mutationen zu andersartigen GS-Mustern führen (siehe Abschnitt 2.2.4.5), in einigen Fällen schwierig. Margolskee und Koautoren (258) zeigten die Mängel der GS-Färbung auf. Von 26 analysierten HCAs wurden 4 aufgrund starker homogener GS-Positivität und/oder nuklearer β -Catenin Anfärbbarkeit als BHCA klassifiziert (258). Jedoch nach Mutationsanalyse des gesamten *CTNNB1*-Gens konnte lediglich bei einer Läsion eine *CTNNB1*-Mutation nachgewiesen werden (258). Bei den anderen drei Herden waren *IL6*-Mutationen nachweisbar, so dass diese Fälle als IHCA reklassifiziert wurden (258). Dagegen musste ein initial aufgrund lediglich fokaler GS-Positivität und starker AA-Positivität als IHCA eingestufte Herd, nach Mutationsanalyse als BIHCA klassifiziert werden: sowohl eine Exon 3 *CTNNB1*- als auch *IL6*-Mutationen waren nachweisbar (258). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Fälle aufgrund nicht eindeutiger GS-Färbung zunächst als U- bzw. IHCA klassifiziert und nach molekularpathologischer Analyse als B(I)HCAs reklassifiziert. In der Ergänzung der GS-Färbung werden auch im Rahmen der Routine-Diagnostik HCAs molekularpathologisch hinsichtlich *CTNNB1*-Mutation analysiert. Dies wirft die Frage auf, ob alle HCAs systematisch auf molekularpathologischer Ebene untersucht werden sollten: hinsichtlich *CTNNB1*-Mutation und für genaue HCA-Subtypisierung mit Einschätzung des Risikoprofils bezüglich *HNF1A*-Mutation oder Mutationen im JAK-STAT- bzw. Sonic-Hedgehog-Signalweg. So zeichnet sich ab, dass wie bei anderen Tumoren, wo die Analyse des Genexpressionsprofils zunehmend an Bedeutung für die Therapie gewinnt, auch für HCAs die molekularpathologische Analyse zunehmend im Vordergrund stehen wird.

Letztlich ist hervorzuheben, dass bevorzugt klinisch-radiologisch unklare Fälle operiert bzw. biopsiert werden. Dies könnte einen Erklärungsansatz bieten, warum die HCA-(Subtyp)-Diagnose im Rahmen der vorliegenden Arbeit so herausfordernd war und einige Fälle unklassifizierbar blieben oder reklassifiziert werden mussten. Andererseits ist herauszustellen, dass die Universitätsmedizin Mainz in Rheinland-Pfalz ein wichtiges Zentrum für Lebererkrankungen ist, was die Zusammenstellung eines relativ großen Kollektivs mit 71 HCA-Herden von 43 Patienten ermöglichte. Zum Vergleich wurden in der Bordeaux Experience (1), die als Referenz für die HCA-Klassifizierung gilt, 128 HCA-Herde untersucht. Andere veröffentlichte Studien wiesen deutlich kleinere Kollektive auf: Margolskee und Koautoren (258) analysierten 26 HCAs, Paradis und Koautoren (243) 32 IHCA-Herde.

5.2 Entartungspotential Hepatozellulärer Adenome

Von zentraler Bedeutung bei der HCA-Diagnose ist die Identifizierung von HCAs mit Entartungspotential, d.h. mit *CTNNB1*-Mutationen. Besonders herausfordernd sind fokal auftretende *CTNNB1*-Mutationen, die in IHCA's vorkommen können (269). Saldarriaga und Koautoren (269) berichteten von zwei Patienten mit multiplen IHCA's, bei denen jeweils in einem Herd *CTNNB1*-mutierte Areale immunhistochemisch und molekularpathologisch identifiziert werden konnten. Biopsien könnten also kleine Foci mit *CTNNB1*-Mutation verpassen. Bei Leber-Resektaten sollten deswegen verdächtige Areale inmitten eines HCA-Herdes gezielt auf *CTNNB1*-Mutationen untersucht werden sollten. Diese Foci inmitten von IHCA's deuten daraufhin, dass die *CTNNB1*-Mutation ein *second hit* (zweites Ereignis) ist. Rebouissou und Koautoren (77) zeigten, dass alle HCAs ihres Kollektivs mit Übergang zum HCC eine *CTNNB1*-Mutation in Kombination mit gp130 Alteration aufwiesen. Hingegen zeigten HCCs ohne bekannte HCA-Vorgeschichte keine *Interleukin 6 Cytokine Family Signal Transducer (IL6ST)*-Mutation (77). Darüber hinaus konnte im Zellkulturmodell und in *C. elegans* nachgewiesen werden, dass bei oxidativem Stress die Interaktion zwischen β -Catenin und Forkhead-Box-Protein-O (FOXO) zunimmt, was zu einer Erhöhung der FOXO transkriptionalen Aktivität führt (270). Dies unterstreicht den Einfluss inflammatorischer Bedingungen auf den Wnt-Signalweg. In unserem Kollektiv stammt das BIHCA mit Übergang zum HCC von einem Patienten mit Leberadenomatose. Auch in beiden Fallberichten (269) mit fokaler *CTNNB1*-Mutation handelte es sich um Patienten mit multiplen HCAs.

Es ist gut bekannt, dass HHCA's, die typischerweise eine ausgeprägte Steatose aufweisen, nur sehr selten entarten (1-3, 72, 73). Im untersuchten Kollektiv konnte festgestellt werden, dass die B(I)HCA's niedrige Steatosegrade aufwiesen: drei von den vier BIHCA's sowie drei von den vier BHCA's zeigten weniger als 10 % Verfettung ihres Parenchyms. Das Exon 3 *CTNNB1*-mutierte BIHCA mit fokalem Übergang zum HCC zeigte einen Steatosegrad von 0 %, dagegen wiesen die zahlreichen HHCA's desselben Patienten jeweils ≥ 35 % Steatose auf. Ein potentieller Erklärungsansatz konnte von der Forschungsgruppe von Liu und Koautoren (271) erbracht worden sein. Sie konnten zeigen, dass im Zellkulturmodell 3T3-L1 Maus-Prädipozyten und menschliche embryonale Nierenzellen der Linie HEK293 durch Herunterregulation von Perilipin 2 durch siRNA die Aktivierung des Wnt-Signalwegs herunterreguliert wird (271). Dabei konnte gezeigt werden, dass Perilipin 2 im Wnt-Signalweg zwischen Dishevelled und dem Axin/Glycogen Synthase Kinase 3(GSK3)/ β -Catenin-Komplex (AG β C) eingreifen könnte, da die Wnt-Stimulation mit rekombinanten Wnt3a die Dvl2/PLIN2 Assoziation reduziert, dagegen die GSK3 β /PLIN2 und Axin/PLIN2 Assoziation sowie auch β -Catenin/PLIN2 Assoziation steigert (271). Wenn 3T3-L1 und HEK293 Zellen unter Wnt-Stimulation mit Oleat inkubiert werden, zeigt sich eine Reduktion des Wnt-induzierten ungebundenen β -Catenin (271). Man könnte

so vermuten, dass, wenn Perilipin 2 im Wnt-Signalweg rekrutiert wird, die Entstehung von Lipidtropfen erschwert wird, bzw. dass, wenn Perilipin 2 an Lipidtropfen gebunden ist, Perilipin 2 generell seine Mediator-Funktionen im Wnt-Signalweg weniger ausüben kann. Darüber hinaus konnte von Senni und Koautoren (272) im Mausmodell gezeigt werden, dass in HCCs mit *CTNNB1*-Mutationen die Fettsäureoxidation die Hauptenergiequelle darstellt und notwendig für die HCC-Entstehung ist. Aufgrund der hohen Fettsäureoxidation finden kaum lipogene Prozesse in *CTNNB1*-mutierten HCCs statt, was das Fehlen von Steatose erklärt (272). Es stellt sich somit die Frage, ob Steatose bei HCAs generell für stabile Läsionen spricht. In dieser Perspektive wären weitere Studien wichtig, um zu untersuchen, ob steatotische IHCA häufiger oder seltener als nicht steatotische IHCA mit *CTNNB1*-Mutationen assoziiert sind, respektive häufiger oder seltener solche Mutationen im Laufe der Zeit entwickeln können.

5.3 Einfluss der Steatose im nicht-tumorösen Leberparenchym auf die HCA-Entstehung

Day und James (273) versuchten die schädigende Rolle von Lipiden in Hepatozyten bei Steatohepatitis anhand einer „two-hit Theorie“ zu fassen: die Akkumulation von Lipiden stellen einen ersten Schritt dar, indem sie die Leber für oxidativen Stress, den „second hit“, sensibilisieren, was *in fine* zur Nekroinflammation führt. Darüber hinaus wurde die favorisierende Rolle der *Steatosis hepatis* für die HCC-Tumorentstehung im Rahmen der NAFLD-Forschung ans Licht gebracht (263, 264). Nach Induktion der Hepatokarzinogenese entwickeln Mäuse nach hochkalorischer lipidreicher Ernährung mehr und größere Tumoren als Kontrollmäuse (274). In unserem Kollektiv war das nicht-tumoröse Leberparenchym der HCA-, FNH-, sowie HCC-Patienten jeweils in der Mehrheit der Fälle verfettet mit im Durchschnitt vergleichbaren Steatosegraden des angrenzenden nicht-tumorösen Leberparenchyms dieser drei Tumorentitäten. Weitere Studien wären erforderlich, um zu überprüfen, ob eine *Steatosis hepatis* die Entstehung benigner Tumoren begünstigt. Bioulac-Sage und Koautoren (65) fanden heraus, dass 48,8 % der IHCA-Patienten übergewichtig waren und dieser HCA-Subtyp somit signifikant mit Übergewicht assoziiert war. In der *Bordeaux Experience* (1) zeigte das nicht-neoplastische Leberparenchym der IHCA-Patienten in 38 % der Fälle eine über 20%ige Verfettung der Parenchymfläche. Ähnliche Ergebnisse stellten sich in der vorliegenden Arbeit das: das jeweilige nicht-tumoröse Leberparenchym der IHCA-Patienten war in 85 % der Fälle verfettet und wies in 27,5 % der Fälle eine > 33 %ige Verfettung auf, wobei das anliegende nicht-tumoröse Leberparenchym der steatotischen IHCA-Patienten (40 %) etwas häufiger als das der nicht steatotischen IHCA-Patienten (15 %) eine zumindest milde Steatose zeigte. So ist anzunehmen, dass die Steatose der HCAs zumindest partiell von der metabolischen Situation des Patienten abhängt.

Im Kollektiv war keine Korrelation zwischen dem Steatosegrad des nicht-tumorösen Leberparenchyms und der Größe der HCAs nachweisbar. Es konnte dennoch festgestellt werden, dass im Kollektiv Patienten mit mehreren HCAs im Trend höhere Steatosegrade des nicht-tumorösen Leberparenchyms (25,1 %) als Patienten mit singulären HCAs (14,3 %) aufwiesen.

Die Forschungsgruppe von Debebe und Koautoren (275) zeigte, dass bei PTEN-defizienten Mäusen die Steatose zu einer Aktivierung des Wnt-Signalwegs mit erhöhter Expression von β -Catenin sowie seiner Zielgene (Axin2, C-Myc, Jag1 und CD44) führte. Die Aktivierung des Wnt-Signalwegs stellte sich sowohl in Tumorarealen als auch in periportalen Arealen in prämaligen TIC (Tumor-initierende Zellen, englisch: tumor initiating cells) dar. Wird der Wnt-Signalweg pharmazeutisch durch Zugabe des kleinmolekularen Inhibitors (englisch: small inhibitor) ICG-001, der die Interaktion zwischen β -Catenin und CREBP (englisch: cAMP response element binding protein) unmöglich macht, inhibiert, wird die Expansion der TIC blockiert (275). Mäuse mit dem von Steatose induzierten Wnt-Signalweg zeigten ein bestimmtes Immunzellprofil: sie hatten mehr Makrophagen und weniger CD4Th-Zellen als Kontrollmäuse (275). Die Makrophagen von Mäusen mit verfetteter Leber produzieren Wnt-Ligand, und wenn diese Mäuse-Makrophagen depletiert wurden, entwickelten die Mäuse mit induzierter Steatose keine Tumoren (275). Zusammenfassend konnte also folgendes Erklärungsmodell bei Mäusen vorgeschlagen werden: die Lebersteatose führt zu einer Zunahme der Makrophagen, die Wnt-Ligand produzieren. Die Makrophagen induzieren Gene des Wnt-Signalwegs, was letztlich zur Tumorentstehung führt. In der vorliegenden Arbeit zeigten die Mehrheit (71,43 %) der B(I)HCA-Patienten keine Verfettung des nicht-tumorösen Leberparenchyms. Die zwei anderen Patienten wiesen lediglich milde Steatosegrade mit respektiv 5 % und 18 % Parenchymverfettung auf. Somit zeigten B(I)HCAs unter den verschiedenen HCAs-Subtypen sogar im Trend die niedrigsten Steatosegrade des nicht-tumorösen Lebergewebes. Weitere Studien wären erforderlich, um die Verhältnisse zwischen *CTNNB1*-Mutation, Aktivierung des Wnt-Signalwegs und *Steatosis hepatis* zu erforschen.

5.4 Perilipin 1 und zonale Expressionsprogramme der Leber

Perilipin 1 wurde in der Leber bevorzugt um makrovesikuläre Lipidtropfen von Zone 3 beschrieben (18, 37, 38). Darüber hinaus konnten wir feststellen, dass Perilipin 1 nicht nur um makrovesikuläre Lipidtropfen vorkommt, sondern auch zahlreiche winzige Lipidtropfen markiert, und zwar sowohl im verfetteten als auch nicht steatotischem Lebergewebe. Dies bestätigt die Ergebnisse von Fujii und Koautoren (80), die Perilipin 1 bei *Steatosis hepatis* und NASH auch um kleine bis mittelgroße Lipidtropfen identifizieren konnten.

Vorherige Studien der Arbeitsgruppe zeigten, dass Perilipin 1 lediglich in 30-40 % der HCCs exprimiert wird (17). Ergänzend dazu konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit festgestellt werden, dass HCAs eine Reduktion der Perilipin 1-positiven Hepatozyten und Perilipin 1-positiven Parenchymfläche im Vergleich zum zugehörigen nicht-tumorösen Leberparenchym aufweisen. Perilipin 1 wird somit sowohl bei malignen als auch benignen neoplastischen Prozessen der Leber nur gering exprimiert. Dennoch zeigten die FNHs und der B(l)HCA-Subtyp im Trend eine geringe Zunahme der Prozentzahl Perilipin 1-positiver Hepatozyten im Vergleich zum jeweiligen nicht-tumorösen Lebergewebe. Eine parallele Arbeit unserer Forschungsgruppe konnte anhand immunhistochemischer Untersuchungen eines großen HCC-Kollektivs zeigen, dass HCCs, die GS exprimieren, eine größere Anzahl Perilipin 1-positiver Lipidtropfen im Vergleich zu den GS-negativen HCCs aufweisen ($p \leq 0,001$). Die verstärkte Perilipin 1-Expression in FNHs wurde in unseren PCR- und Immunblot Analysen bestätigt.

Es ist bekannt, dass Glutaminsynthetase zum perivenösen Expressionsprogramm der Leber gehört (266), und es wurde darauf aufmerksam gemacht, dass die Deregulierung zentraler Expressionsprogramme bei der HCA-Genese involviert ist: während BHCA ein gestörtes perivenöses Programm mit konsekutiver gestärkter GS-Expression haben, zeigt der shHCA-Subtyp eine Störung des periportal Programms mit ASS1-Überexpression (10). So ist weiter zu erforschen, ob Perilipin 1 bei Tumoren und Tumor-artigen Läsionen der Leber mit Genmutationen oder Aktivierung von Signalwegen des perivenösen Expressionsprogramms, als mitwirkender Akteur dieses Programms, mit involviert ist.

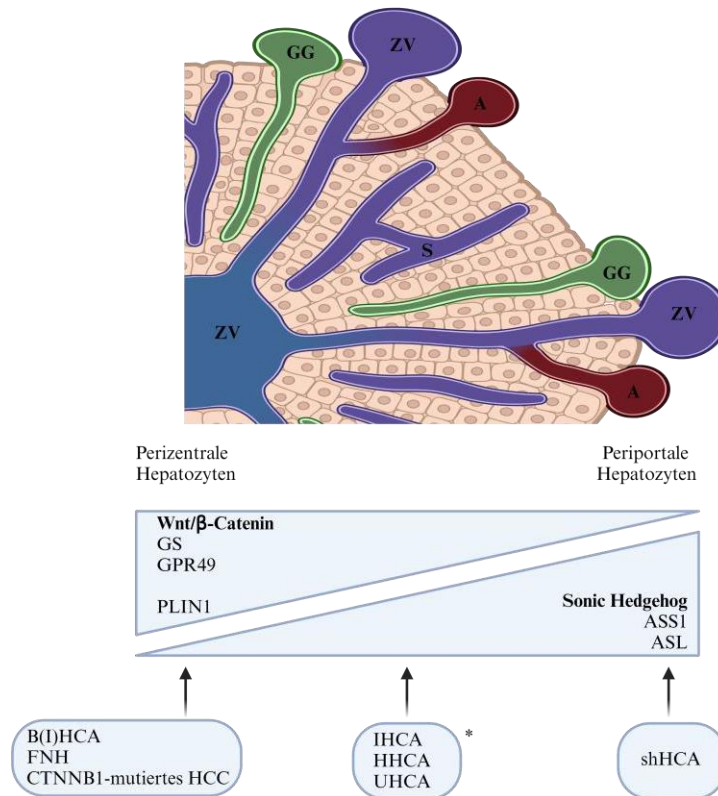


Abb. 24: Beteiligung zonaler Expressionsprogramme der Leber in unterschiedlichen Tumoren. Bei B(I)HCAs, FNHs und HCCs sind Gene des perizentralen, bei shHCAs des periportalen Expressionsprogramms überexprimiert. ZV: Zentralvene; DB: *Ductus biliferi interlobulares*; V: *Vena interlobularis*; A: *Arteria interlobularis*; ASS1: Argininosuccinat-Synthase 1; ASL: Argininosuccinat-Lyase GS: Glutaminsynthetase, PLIN1: Perilipin 1; GPR49: *G-protein coupled receptor 49*. Modifiziert nach (10). *HCAs ohne Überexpression weder von periportalen noch perizentralen Genen.

Der Wnt-Signalweg ist in der Leber in Hepatozyten von Zone 3 aktiviert (101, 102). Die Beteiligung des Wnt-Signalwegs in physiologischen und pathologischen Prozessen wurde seit langem viel erforscht (15, 95, 101-103). Dennoch sind potentielle Interaktionen mit Lipidtropfen bzw. Lipidtropfen-assoziierten Proteinen wenig untersucht. Bis *dato* gibt es keine Publikation, die die Rolle von Perilipin 1 im Wnt-Signalweg untersucht. Aufgrund der festgestellten gemeinsamen Expression von Perilipin 1 und Glutaminsynthetase in den gleichen Tumoren bzw. in derselben Leberzone im nicht-tumorösen Lebergewebe, sowie aufgrund der anhand der Fluoreszenzmikroskopie-Färbungen nachweisbar gemachten Kolo-kalisation von Perilipin 1 mit Glutaminsynthetase, postulierten wir, dass beide Proteine miteinander interagieren könnten. Unsere Zellkulturexperimente zeigen, dass die Überexpression von Wildtyp-*CTNNB1* zu einer signifikanten Überexpression von *PLIN1* führt, was eine potentielle Beteiligung von Perilipin 1 im Wnt-Signalweg unterstützt. Weitere Studien wären erforderlich, um zu identifizieren, auf welchem Niveau des Wnt-Signalwegs Perilipin 1 interagieren könnte.

Zu betonen ist, dass die Aktivierung des Wnt-Signalwegs bei zahlreichen Tumoren unterschiedlicher Prognosen beteiligt ist, sowohl benignen (mit Entartungspotential) und malignen Neoplasien als auch rein hyperplastischen Läsionen ohne Komplikationspotential, und dass diese Aktivierung des Wnt-Signalwegs nicht unbedingt mit einer *CTNNB1*-Mutation einhergeht. Dies ist bei FNHs gut etabliert (111). Cieply und Koautoren (109) konnten in ihrer Arbeit feststellen, dass beinahe alle untersuchten HCCs, ob *CTNNB1*-mutiert oder nicht, höhere Gesamt- β -Catenin-Proteinexpression als das nicht-tumoröse Lebergewebe aufwiesen; jedoch nur die *CTNNB1*-mutierten HCCs eine GS-Expression zeigten.

Interessanterweise konnten wir zudem feststellen, dass in B(l)HCAs sowie FNHs Perilipin 1-positive Lipidtropfen hauptsächlich zur sinusoidalen Seite der Hepatozyten lokalisiert waren. Vorstudien unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass Perilipin 1 in HCCs hauptsächlich an mikrovesikulären Lipidtropfen vorkommt (17), wobei diese Lipidtropfen mit steigender Dedifferenzierung umso mehr diffus im Zytoplasma verteilt waren (17). So bestätigt sich, dass die Lokalisation der Perilipin 1-positiven Lipidtropfen ein Hinweis auf erhaltene oder gestörte Polarität der Hepatozyten, um somit auf den Differenzierungs- bzw. Dedifferenzierungsgrad der Hepatozyten sein könnte.

5.5 Perilipin 2 und Steatose in benignen Lebertumoren

Perilipin 2 wird während der Hepatokarzinogenese hochreguliert (17). Die immunhistochemischen Analysen unserer 9 HCC-Herde bestärkten diese Feststellung. Im Gegensatz dazu konnten wir anhand der immunhistochemischen Färbungen keine Induktion von Perilipin 2 in HCAs und FNHs im Vergleich zum respektiven nicht-tumorösen Lebergewebe feststellen. Die steatotischen HCAs zeigten die stärkere Perilipin 2-Proteinexpression. Unsere Immunblot-Analysen von HCA- und FNH-Proben bestätigten zum Teil diese Ergebnisse. So zeichnet sich ab, dass Perilipin 2 auch in benignen Lebertumoren ein Marker für den Steatosegrad sein könnte.

Darüber hinaus wurde von Fujii und Koautoren (276) beschrieben, dass die Perilipin 2-Expression in Leberbiopsien von NAFLD-Patienten mit oxidierten Phospholipiden (oxPC) kolokalisiert, und generell mit entzündlicher Infiltration des Parenchyms korreliert. In der vorliegenden Arbeit konnten in HCAs kein Zusammenhang zwischen inflammatorischen HCAs und Perilipin 2-Expression festgestellt werden: steatotische IHCA und HHCA, die vergleichbare Steatosegrade aufweisen (41,1 % bzw. 45 %), zeigten keine signifikanten Unterschiede in ihrer Perilipin 2-Expression: sie wiesen respektiv eine 23,7 % bzw. 27,2 %ige Perilipin 2-markierte Parenchymfläche und 61,8 % bzw. 76,8 % Perilipin 2-markierte Hepatozyten auf. Allerdings stammen in unserem Kollektiv 2/3 der HHCA-Fälle von einem Patienten mit MODY3-Diabetes, so dass hiermit ein Confounder vorliegen kann. Die Untersuchung einer größeren Patienten- und Tumor-Anzahl wäre nötig, um eine sichere Aussage zu treffen.

5.6 Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Perilipin 1 und 2 z. T. unterschiedlich in HCAs exprimiert werden. Es wurde bereits darauf aufmerksam gemacht, dass die differentielle Expression der Perilipine eine diagnostische bzw. prognostische Hilfe bei unterschiedlichen Tumorentitäten bieten können (17, 220-223). Die Expression von Perilipin 1 um winzige zur sinusoidalen Seite der Hepatozyten gerichtete Lipidtropfen könnte als Argument zugunsten eines B(l)HCAs im Rahmen der HCA-Subtypdiagnose eingesetzt werden. Perilipin 2 scheint hingegen eher ein Marker der Steatose, unabhängig vom HCA-Subtyp zu sein. Zudem stellte sich heraus, dass die zytoplasmatischen ePAT-Färbungen Intensitätsschwankungen zwischen dem tumorösen und nicht-tumorösen Lebergewebe aufweisen können. Die zugrundeliegenden Mechanismen hierfür sind noch zu klären. Dennoch könnten diese Intensitätsschwankungen, in den Fällen, bei denen sie eindeutig zur Darstellung kommen, potentiell als diagnostische Hilfe eingesetzt werden. HCAs (sowie auch HCCs und FNHs) können lichtmikroskopisch anhand der H&E-Färbungen zum Teil vom angrenzenden nicht-tumorösen Leberparenchym schwierig abzugrenzen sein. Die zytoplasmatischen ePAT-Färbungen könnten in dieser Perspektive eingesetzt und z. B. für die Tumorabgrenzung bzw. Beurteilung der Resektionsränder verwendet werden.

Unsere Experimente deuten zudem darauf hin, dass Perilipin 1 am kanonischen Wnt-Signalweg beteiligt sein könnte. Dennoch müssen die multiplen Regulierungsniveaus des Wnt-Signalwegs hervorgehoben werden: es existieren mehrere Aktivierungsniveaus, und die Aktivierung des Signalwegs ist nicht stets mit einer *CTNNB1*-Mutation verbunden. Die Zellkulturexperimente der vorliegenden Arbeit betonen die multiplen Interaktionen im Wnt-Signalweg; so wurden bei der Überexpression von *CTNNB1* β -Catenin-Zielgene nicht stets induziert. Deshalb wären die potentiellen Interaktionen und Regulierungsniveaus von Perilipin 1 im Wnt-Signalweg tiefer zu erforschen, um *in fine* potentielle Therapieansätze im humanen Lebergewebe vorzuschlagen.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation untersucht Steatogenese und Expression von Perilipinen in Hepatozellulären Adenomen anhand von humanem FFPE- sowie kryoasserviertem Lebergewebe. Es wurde auf die verschiedenen Muster in den unterschiedlichen Subtypen fokussiert und untersucht, ob Lipidtropfen sowie Perilipine eine diagnostische Hilfe sein können und darüber hinaus zum Verständnis der zugrundeliegenden Entstehungs- bzw. Entartungsmechanismen von HCAs beitragen können. Unsere Analysen zeigten, dass HCAs aller Subtypen häufig eine Steatose aufweisen, nicht nur im HHCA-Subtyp. Das respektive nicht-tumoröse Leberparenchym war auch in den meisten Fällen steatotisch; dabei zeigte das respektive nicht-tumoröse Lebergewebe der steatotischen IHCAs einen höheren Steatosegrad als das angrenzende nicht tumoröse Lebergewebe von HHCAs, B(I)HCAs und nicht steatotischen IHCAs. HCAs mit hohem Steatosegrad wiesen auch eine hohe Perilipin 2-Expression auf. Perilipin 1 wurde generell in HCAs wenig exprimiert, und steatotische HCAs wiesen keine verstärkte Perilipin 1-Expression auf. Hingegen konnte festgestellt werden, dass B(I)HCAs, die im Kollektiv nur selten eine signifikante Steatose zeigten, winzige zur sinusoidalen Seite der Hepatozyten gerichtete Perilipin 1-positive Lipidtropfen aufwiesen. Perilipin 1 und Glutaminsynthetase wurden in BIHCAs und FNHs sowie im nicht-tumorösen Lebergewebe in denselben Hepatozyten exprimiert, wie von den Immunfluoreszenz-Färbungen bestätigt. Aufgrund dieser Feststellungen wurde die potentielle Beteiligung von Perilipin 1 im Wnt-Signalweg untersucht. In kryoasservierten Leberproben war tendenziell die Expression von Perilipin 1 in FNHs hochreguliert, jedoch nicht in den untersuchten IHCAs und UHCAs. Die PCR-Analysen der kryoasservierten Leberproben ergänzten diese Ergebnisse: die *PLIN1*-mRNA wurden in FNHs im Vergleich zu den IHCAs und UHCAs verstärkt exprimiert. Die *GLUL* mRNA-Expression neigte ebenfalls dazu, im Trend in FNHs im Vergleich zu den IHCAs und UHCAs verstärkt exprimiert zu werden. In Zellkulturexperimenten führte zudem die Überexpression von *CTNNB1* zu einer Zunahme der *PLIN1*-mRNA-Menge. Schlussfolgernd besteht die Hypothese, dass Perilipin 1 zum perivenösen Expressionsprogramm der Leber gehört und über den Wnt-Signalweg reguliert wird. Der Wnt-Signalweg ist über *CTNNB1*-Mutation auch in verschiedenen Lebertumoren von unterschiedlichen Pathogenesen und Prognosen involviert. Die Rolle der Perilipine in der Tumorentstehung ist noch wenig erforscht. Es besteht die Hoffnung, dass in Zukunft präzisere Erkenntnisse zu neuen Therapieansätzen aufgrund der Kenntnis metabolischer Eigenschaften der Tumoren führen könnten.

7 Literaturverzeichnis

1. Bioulac-Sage P, Laumonier H, Couchy G, Le Bail B, Sa Cunha A, Rullier A, et al. Hepatocellular Adenoma Management and Phenotypic Classification: the Bordeaux Experience. *Hepatology*. 2009;50(02): 481-489.
2. Zucman-Rossi J, Jeannot E, Nhieu JT, Scoazec JY, Guettier C, Rebouissou S, et al. Genotype-phenotype correlation in hepatocellular adenoma: new classification and relationship with HCC. *Hepatology*. 2006;43:515-524.
3. Wörns MA, Lablenz C, Marquardt JU. Gutartige Lebertumoren. *Der Gastroenterologe*. 2016; 11:349-358.
4. van Aalten SM, de Man RA, IJzermans JNM, Terkivatan T. Systematic review of haemorrhage and rupture of hepatocellular adenomas. *Br J Surg*. 2012;99(7):911–916.
5. Stoot JHMB, Coelen RJS, Jong MCD, Dejong CHC. Malignant transformation of hepatocellular adenomas into hepatocellular carcinoma: systematic review including more than 1600 adenoma cases. *HPB (Oxford)*. 2010;12:509-522.
6. Bioulac-Sage P, Sempoux C, Possenti L, Frulio N, Laumonier H, Laurent C, et al. Pathological Diagnosis of hepatocellular Adenoma according to the clinical context. *Int J Hepatol*. 2013: 253261.
7. Massimo Roncalli, Sciarra A, Di Tommaso L. Benign Hepatocellular Nodules of healthy Liver: focal nodular hyperplasia and hepatocellular adenoma. *Clinical Molecular Hepatology*. 2016;2:199-211.
8. Bioulac-Sage P, Rebouissou S, Thomas C, Blanc JF, Saric J, Sa Cunha A, et al. Hepatocellular adenoma subtype classification using molecular markers and immunohistochemistry. *Hepatology*. 2007;46:740-748.
9. Henriët E, Hammoud AA, Dupuy J-W, Dartigues B, Ezzoukry Z, Dugot-Senant N, et al. Argininosuccinate Synthase 1 (ASS1): A marker of Unclassified Hepatocellular Adenoma and High Bleeding risk. *Hepatology*. 2017;66(06):2016-2028.
10. Nault J-C, Couchy G, Caruso S, Meunier L, Caruana L, Letouzé E, et al. Argininosuccinate Synthase 1 and Periportal Gene Expression in Sonic Hedgehog Hepatocellular Adenoma. *Hepatology*. 2018;68(3):964-976
11. Stoot JHMB, Coelen RJS, Jong MCD, Dejong CHC. Malignant transformation of hepatocellular adenomas into hepatocellular carcinoma: systematic review including more than 1600 adenoma cases. *HPB (Oxford)*. 2010;12:509-522.
12. Farges O, Dakmak S. Malignant transformation of liver adenoma: an analysis of the literature. *Digestive surgery*. 2010;27(1):32-38.
13. Ridder D, Duret D, Wörns MA, Schotten S, Heinrich S, Kloth M, et al. [Hepatocellular carcinoma in an inflammatory adenoma with β -catenin mutation in a patient with hepatocellular adenomatosis due to germline mutation in HNF1 α]. *Z Gastroenterol*. 2019;57(1):46-51.
14. Deneve JL, Pawlik TM, Cunningham S, Clary B, Reddy S, Scoggins CR, et al. Liver cell adenoma: a multicentre analysis of risk factors for rupture and malignancy. *Annals of surgical Oncology*. 2009;16(3):640-648.
15. Rebouissou S, Franconi A, Calderaro J, Letouzé E, Imbeaud S, Pilati C, et al. Genotype-phenotype correlation of CTNNB1 mutations reveals different β -catenin activity associated with liver tumor progression. *Hepatology*. 2016;64(6):2047-2061.

16. Miller JC, Campbell CM, Manoharan B, Bryant R, Cavallucci D, O'Rourke N, Clouston AD. Subclassification of hepatocellular adenomas: practical considerations in the implementation of the Bordeaux criteria. *Pathology*. 2018;50(6):593-599.
17. Straub BK, Herpel E, Singer S, Zimbelmann R, Breuhahn K, Macher-Goeppinger S, et al. Lipid droplet-associated PAT-proteins show frequent and differential expression in neoplastic steatogenesis. *Mod Pathol*. 2010;23(3):480-92.
18. Straub BK. [Lipid droplet-associated proteins. Importance in steatosis, steatohepatitis and hepatocarcinogenesis]. *Der Pathologe*. 2015;36(Suppl 2):146-52.
19. Trefts E, Gannon M, Wassermann DH. The liver. *Current Biology*. 2017;27(6):1141-1155.
20. Böcker W, Denk H, Heitz P, Höfler G, Kreipe H, Moch H, et al. *Pathologie*. 5. Auflage. Elsevier Urban & Fischer. 2012; 623-666.
21. Gibbons G, Islam K, Pease RJ. Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1483(1):37-57.
22. Devarbhavi H, Asrani SK, Arab JP, Nartey YA, Pose A, Kamath PS. Global burden of liver disease: 2023 update. *Journal of hepatology*. 2023;79(2):516-537.
23. Haddouche A, Bellanne-Chantelot C, Rod A, Fournier L, Chiche L, Gautier J-F, et al. Liver adenomatosis in patients with hepatocyte nuclear factor-1 alpha maturity onset diabetes of the young (HNF1A-MODY): Clinical, radiological and pathological characteristics in a French series. *J Diabetes*. 2020;12(1):48-57.
24. Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med*. 2001;345(13):971-980.
25. Reznik Y, Dao T, Coutant R, Chiche L, Jeannot E, Clauin S. Hepatocyte nuclear factor 1 alpha gene inactivation: cosegregation between liver adenomatosis and diabetes phenotypes in two maturity-onset diabetes of the young (MODY)3 families. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2004;89(3):1476-1480.
26. Stoffel M, Duncan S A. The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4alpha regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(24):13209-14.
27. Wang H, Maechler P, Antinozzi PA, Hagenfeldt KA, Wollheim CB. Hepatocyte nuclear factor 4alpha regulates the expression of pancreatic beta -cell genes implicated in glucose metabolism and nutrient-induced insulin secretion. *J Biol Chem*. 2000;275(46):35953-35959.
28. Menzel R, Kaisaki P J, Rjasanowski I, Heinke P, Kerner W, Menzel S. A low renal threshold for glucose in diabetic patients with a mutation in the hepatocyte nuclear factor-1alpha (HNF-1alpha) gene. *Diabet Med*. 1998;15(10):816-820.
29. Colclough K, Bellanne-Chantelot C, Saint-Martin C, Flanagan SE, Ellard S. Mutations in the genes encoding the transcription factors hepatocyte nuclear factor 1 alpha and 4 alpha in maturity-onset diabetes of the young and hyperinsulinemic hypoglycaemia. *Hum Mutat*. 2013;34(5):669-685.
30. Bluteau O, Jeannot E, Bioulac-Sage P, Marqués JM, Blanc J-F, Bui H, Beaudoin J-C, et al. Bi-allelic inactivation of TCF1 in hepatic adenomas. *Nat Genet*. 2002;32(2):312-5.
31. Calderaro J, Labrune P, Morcrette G, Rebouissou S, Franco D, Prévot S, et al. Molecular characterisation of hepatocellular adenomas developed in patients with glycogen storage disease type 1. *Journal of Hepatology*. 2013;58: 350-357.

32. Rake JP, Visser G, Labrune P, Lenard JV, Ullrich K, Smit GPA. Glycogen storage disease type I: diagnosis management and clinical outcome. Results of the European Study on Glycogen Storage disease type I (ESGSD I). *Eur J Pediatr* 2002;161:S20-S34.
33. Froissart R, Piraud M, Mollet Boudjemline A, Vianey-Saban C, Petit F, Hubert-Buron A, et al. Glucose-6-phosphatase deficiency. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6:27.
34. Hiraiwa H, Pan CJ, Lin B, Akiyama TE, Gonzalez FJ, Chou JY. A molecular link between the common phenotyp I Glycogen storage disease and HNF1 a null mice. *J Biol chem.* 2001;276(11):7963-7.
35. Labrune P, Trioche P, Duvaltier I, Chevalier P, Odièvre M. Hepatocellular adenomas in glycogen storage disease type I and III: a serie of 43 patients and review of the literature. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1997;24:276-279.
36. Pawella LM, Hashani M, Eiteneuer E, Renner M, Bartenschlager R, Schirmacher P, et al. Perilipin discerns chronic from acute hepatocellular steatosis. *Journal of hepatology.* 2014;60(3):633-42.
37. Straub BK, Stoeffel P, Heid H, Zimbelmann R, Schirmacher P. Differential pattern of lipid droplet-associated proteins and de novo perilipin expression in hepatocyte steatogenesis. *Hepatology.* 2008;47(6):1936-46.
38. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global Epideniology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease- Meta-Analtic Assesement of Prevalence, Incidence, and Outcomes. *Hepatology.* 2016;64:73-84.
39. Lefkowitz JH, Antony LV. The Envolving Role of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Hepatic Neoplasia: Inflammatory Hepatocellular Adenoma in a Man with Metabolic Syndrom. *Seminars in Liver Disease.* 2015;35:349-353.
40. Wong T, Dang K, Ladhani S, Singal AK, Wong RJ. Prevalence of Alcoholic Fatty Liver Disease Among Adults in the United States, 2001-2016. *JAMA.* 2019;321(17):1723-1725.
41. Carr RM, Oranu A, Khungar V. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathophysiology and Management. *Gastroenterology clinics of North America.* 2016;45(4):639-52.
42. Roeb E, Canbay A, Bantel H, Bojunga J, de Laffolie J, Demir M, et al. Aktualisierte S2k-Leitlinie nicht-alkoholische Fettlebererkrankung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). 2022.
43. Yeh MM, Brunt EM. Pathological Features of Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* 2014;147:754-764.
44. Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, Kechagias S. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology.* 2006;44(4):865-873.
45. Gastaldelli A, Kozakova M, Højlund K, Flyvbjerg A, Favuzzi A, Mitrakou A, Balkau B; RISC Investigators. Fatty liver is associated with insulin resistance, risk of coronary heart disease, and early atherosclerosis in a large European population. *Hepatology.* 2009; 49(5): 1537–1544.
46. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2011;25(2):195-206.
47. Smith A, Baumgartner K, Bositis C. Cirrhosis: Diagnosis and Management. *Am Fam Physican.* 2019;100(12):759-770.
48. National Guidelines Center (UK). Cirrhosis in Over 16s: assessment and management. NICE Guideline (NG50). July 2016.

49. Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J, IDF Epidemiology Task Force Consensus Group: The metabolic syndrome—a new worldwide definition. *Lancet*. 2005;366(9491):1059-1062.
50. Simonetti RG, Cammà C, Fiorello F, Politi F, D'Amico G, Pagliaro L. Hepatocellular carcinoma. A worldwide problem and the major risk factors. *Dig Dis Sci*. 1991;36(7):962-72.
51. Rungay H, Ferlay J, de Martel C, Georges D, Ibrahim AS, Zheng R, et al. Global, regional and national burden of primary liver cancer by subtype. *Eur J Cancer*. 2022;161:108-118.
52. Maillette de Buy M, Wenniger L, Terpstra V, Beuers U. Focal nodular hyperplasia and hepatic adenoma: epidemiology and pathology. *Dig Surg*. 2010;27:24–31.
53. Paradis V, Laurent A, Flejou J F, Vidaud M, Bedossa P. Evidence for the polyclonal nature of focal nodular hyperplasia of the liver by the study of X-chromosome inactivation. *Hepatology*. 1997;26:891–895.
54. Wanless IR, Mawdsley C, Adams R. On the pathogenesis of focal nodular hyperplasia of the liver. *Hepatology*. 1985;5(6):1194-200.
55. Wanless IR, Albrecht S, Bilbao J, Frei JV, Heathcote EJ, Roberts EA, Chiasson D. Multiple focal nodular hyperplasia of the liver associated with vascular malformations of various organs and neoplasia of the brain: a new syndrome. *Mod Pathol*. 1989;2:456–462.
56. Bioulac-Sage P, Balabaud C, Bedossa P, Scoazec JY, Chiche L, Dhillon AP, et al. Pathological diagnosis of liver cell adenoma and focal nodular hyperplasia: Bordeaux update. *J Hepatol*. 2007;46:521–527.
57. European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines on the management of benign liver tumours. *J Hepatol*. 2016;65(2):386-98.
58. Nahm CB, Ng K, Lockie P, Samra JS, Hugh TJ. Focal nodular hyperplasia—a review of myths and truths. *J Gastrointest Surg*. 2011;15:2275–2283.
59. Digestive System Tumours: WHO Classification of Tumours: 5th Edition, Volume 1. WHO Classification of Tumours Editorial Board. 2019
60. Rooks JB, Ory HW, Ishak KG, Strauss LT, Greenspan JR, Hill AP, Tyler CW Jr. Epidemiology of hepatocellular adenoma. The role of oral contraceptive use. *JAMA*. 1979;242(7):644–648.
61. Bunchorntavakul C, Bahirwani R, Drazek D, Soulen MC, Siegelman ES, Furth EE, Olthoff K, Shaked A, Reddy KR. Clinical features and natural history of hepatocellular adenomas: the impact of obesity. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;34:664–674.
62. Dokmak S, Paradis V, Vilgrain V, Sauvanet A, Farges O, Valla D, et al. A single-center surgical experience of 122 patients with single and multiple hepatocellular adenomas. *Gastroenterology*. 2009;137(5):1698-705.
63. Massimo Roncalli, Sciarra A, Di Tommaso L. Benign Hepatocellular Nodules of healthy Liver: focal nodular hyperplasia and hepatocellular adenoma. *Clinical Molecular Hepatology*. 2016;2:199-211.
64. Petitti DB. Clinical practice. Combination estrogen-progestin oral contraceptives. *New England Journal of Medicine*. 2003;349(15):1443–1450.
65. Bioulac-Sage P, Taouji S, Possenti L, Balabaud C. Hepatocellular adenoma subtypes: the impact of overweight and obesity. *Liver international*. 2012;32(8):1217-1221.
66. Nault J-C, Couchy G, Balabaud C, Morcrette G, Caruso S, Blanc J-F, et al. Molecular Classification of Hepatocellular Adenoma Associates With Risk Factors, Bleeding, and Malignant Transformation. *Gastroenterology*. 2017;152(4):880-894.
67. Bossen L, Grønbaek H, Eriksen L, Jepsen P. Men with biopsy-confirmed hepatocellular adenoma have a high risk of progression to hepatocellular carcinoma: A nationwide population-based study. *Liver Int*. 2017;37(7):1042-1046.

68. Farges O, Dakmak S. Malignant transformation of liver adenoma: an analysis of the literature. *Digestive surgery*. 2010;27(1):32-38.
69. Ronot M, Bahrami S, Calderaro J, Valla D-C, Bedossa P, Belghiti J, et al. Hepatocellular adenomas: accuracy of magnetic resonance imaging and liver biopsy in subtype classification. *Hepatology*. 2011;53:1182–1191.
70. Ba-Ssalamah A, Antunes C, Feier D, Bastati N, Hodge J C, Stift J, et al. Morphologic and Molecular Features of Hepatocellular Adenoma with Gadoteric Acid-enhanced MR Imaging. *Radiology*. 2015;277(1):104-113.
71. M, Clemente A, Tovoli F, Cappabianca S, Bolondi L, Golfieri R. Hepatocellular adenoma: An unsolved diagnostic enigma. *World J Gastroenterol*. 2019;25(20):2442-2449.
72. Putra J, Ferrell LD, Gouw ASH, Paradis V, Rishi A, Sempoux C, et al. Malignant Transformation of liver fatty acid binding protein-deficient hepatocellular adenoma: histopathologic spectrum of a rare phenomenon. *Modern Pathology*. 2019;33(4):665-675.
73. Micchelli STL, Vivekanandan P, Boitnott JK, Pawlik TM, Choti MA, Torbenson M. Malignant transformation of hepatic adenomas. *Modern Pathology*. 2008;21(4):491-497.
74. Pontoglio M, Barra J, Hadchouel M, Doyen A, Kress C, Bach J P, et al. Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell*. 1996;84(4):575–585.
75. Rebouissou S, Imbeaud S, Balabaud C, Boulanger V, Bertrand-Michel J, Tercé F, et al. HNF1alpha inactivation promotes lipogenesis in human hepatocellular adenoma independently of SREBP 1 and carbohydrate-response element-binding protein (ChREBP) activation. *J Biol Chem*. 2007;282:14437-14446.
76. Smarthers RL, Petersen DR. The human fatty acid-binding protein family: Evolutionary divergences and functions. *Human Genomics*. 2011;5:170-191.
77. Rebouissou S, Amessou M, Couchy G, Poussin K, Imbeaud S, Pilati C, et al. Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. *Nature*. 2009;457:200-204.
78. Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Marc Rhoads J, et al. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids*. 2009;37:153-168.
79. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993;329:2002-2012.
80. Remuzzi G, Perico N, Zoja C, Corna D, Macconi D, Vigano G. Role of endothelium-derived nitric oxide in the bleeding tendency of uremia. *J Clin Invest*. 1990;86:1768-177.
81. Flejou JF, Barge J, Menu Y, Degott C, Bismuth H, Potet F, Benhamou JP. Liver Adenomatosis. An entity distinct from liver adenoma? *Gastroenterology*. 1985;89:1132-1138.
82. Chiche L, Dao T, Salamé E, Galais MP, Bouvard N, Schmutz G, et al. Liver adenomatosis: reappraisal, diagnosis, and surgical management: eight new cases and review of the literature. *Ann Surg*. 2000;231:74–81.
83. Frulio N, Chiche L, Bioulac-Sage P, Balabaud C. Hepatocellular adenomatosis: What should the term stand for! *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2014;38:132-136.
84. Buhler H, Pirovino M, Akobiantz A, Altorfer J, Weitzel M, Maranta E, et al. Regression of liver cell adenoma. A follow-up study of three consecutive patients after discontinuation of oral contraceptive use. *Gastroenterology*. 1982;82:775–782.

85. Sung H, Ferlay J, Siegel R L, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249.
86. McGlynn KA, Petrick JL, El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2021;73(Supp 1):4–13.
87. Maucort-Boulch D, de Martel C, Franceschi S, Plummer M. Fraction and incidence of liver cancer attributable to hepatitis B and C viruses worldwide. *Int J Cancer.* 2018;142(12):2471–2477.
88. Chuang S-C, Vecchia CL, Boffetta P. Liver cancer: descriptive epidemiology and risk factors other than HBV and HCV infection. *Cancer Lett.* 2009;286(1):9–14.
89. El-Serag, HB, Davila JA, Petersen NJ, McGlynn KA. The continuing increase in the incidence of hepatocellular carcinoma in the United States: an update. *Ann Intern Med.* 2003;139(10):817-23.
90. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome Langversion 3.0, 2022, AWMF-Registernummer: 032/053OL, <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/hcc-und-biliaere-karzinome/>
91. Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis.* 2007; 27(1):55-76.
92. Nault J-C, Galle P R, Marquardt J U. The role of molecular enrichment on future therapies in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2018;69(1):237-247.
93. Li M, Zhao H, Zhang X, Wood LD, Anders RA, Choti MA, et al. Inactivating mutations of the chromatin remodeling gene ARID2 in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 2011;43(9):828-9.
94. Ishizaki Y, Ikeda S, Fujimori M, Shimizu Y, Kurihara T, Itamoto T, et al. Immunohistochemical analysis and mutational analyses of betacatenin, Axin family and APC genes in hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol.* 2004.24(5):1077-83.
95. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet.* 2004;5(9):691-701.
96. Nault JC, Calderaro J, Di Tommaso L, Balabaud C, Zafrani ES, Bioulac-Sage P, et al. Telomerase reverse transkriptase promotormutation is an early somatic genetic alteration in the transformation of premalignant nodules in hepatocellular carcinomaon cirrhosis. *Hepatology.* 2014;60:1983–1992.
97. Coursaget P, Depril N, Chabaud M, Nandi R, Mayelo V, LeCann P, Yvonnet B. High prevalence of mutations at codon 249 of the p53 gene in hepatocellular carcinomas from Senegal. *Br J Cancer.* 1993;67(6):1395-7.
98. Minouchi K, Kaneko S, Kobayashi K. Mutation of p53 gene in regenerative nodules in cirrhotic liver. *J Hepatol.* 2002;37(2):231-9.
99. Roncalli M, Park Y N, Borzio M, Sangiovanni A, Sciarra A, Di Tommaso L. Premalignant and early malignant hepatocellular lesions in chronic hepatitis/cirrhosis. In: *Practical hepatic pathology.* Elsevier, Philadelphia. 2018:487–505.
100. Huelsken J, Birchmeier W, Behrens J. E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol.* 1994;127:2061-2069.
101. Thompson MD, Monga SPS. WNT/B-Catenin Signaling. *Hepatology.* 2007;45(5):1298-1305.
102. Colnot S. Focusing on beta-catenin activating mutations to refine liver tumor profiling. *Hepatology.* 2016; 64(6):1850-1852.

103. Micsenyi A, Tan X, Sneddon T, Luo JH, Michalopoulos GK, Monga SP. Beta-catenin is temporally regulated during normal liver development. *Gastroenterology*. 2004;126:1134-1146.
104. Pilati C, Letouze E, Nault JC, Imbeaud S, Boulai A, Calderaro J, et al. Genomic profiling of hepatocellular adenomas reveals recurrent FRK-activating mutations and the mechanisms of malignant transformation. *Cancer Cell*. 2014;25:428-441.
105. Taniguchi K, Roberts L R, Aderca I N, Dong X, Qian C, Murphy L M, et al. Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene*. 2002;21:4863-4871.
106. Rashid A. Cellular and molecular biology of biliary tract cancers. *Surg Oncol Clin North Am*. 2002;11:995-1009.
107. Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, Llovet JM. Genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2015;149:1226-1239.
108. Nault JC, Bioulac-Sage P, Zucman-Rossi J. Hepatocellular benign tumors-from molecular classification to personalized clinical care. *Gastroenterology*. 2013;144:888-902.
109. Cieply B, Zeng G, Proverbs-Singh T, Geller DA, Monga SPS. Unique phenotype of hepatocellular cancers with exon-3 mutations in beta-catenin gene. *Hepatology*. 2009;49:821-831.
110. Wang Z, Sheng Y-Y, Gao X-M, Wang C-Q, Wang X-Y, Lu XU, et al. Beta-catenin mutation is correlated with a favorable prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Mol Clin Oncol*. 2015;3(4):936-940.
111. Rebouissou S, Couchy G, Libbrecht L, Balabaud C, Imbeaud S, Auffray C, et al. The beta-catenin pathway is activated in focal nodular hyperplasia but not in cirrhotic FNH-like nodules. *J Hepatol*. 2008; 49(1) 61–71.
112. Chen Y-W, Jeng Y-M, Yeh S-H, Chen P-J. P53 gene and Wnt signaling in benign neoplasms: beta-catenin mutations in hepatic adenoma but not in focal nodular hyperplasia. *Hepatology*. 2002;36(4 Pt 1):927-35.
113. Murphy DJ. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Progress in lipid research*. 2001;40(5):325-438.
114. Fujimoto Y, Itabe H, Sakai J, Makita M, Noda J, Mori M, et al. Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. *Biochim et Biophys Acta*. 2004;1644(1):47–59.
115. Turro S, Ingelmo-Torres M, Estanyol JM, Tebar F, Fernández MA, Albor CV, et al. 2006. Identification and characterization of associated with lipid droplet protein 1: A novel membran-associated Protein that resides on hepatic lipid droplets. *Traffic*:2006;7(9):1254-1269.
116. Welte MA. Expanding roles for lipid droplets. *Curr Biol*. 2015;25(11):R470–81.
117. Beller M, Thiel K, Thul PJ, Jäckle H. Lipid droplets: a dynamic organelle moves into focus. *FEBS Lett*. 2010;584(11):2176-82.
118. Beckman M. Cell biology. Great balls of fat. *Science*: 2006;311(8576):1232-1234.
119. Onal G, Kutlu O, Gozuacik D, Emre SD. Lipid Droplets in Health and Diseases. *Lipids Health Dis*. 2017;16 (1):128.
120. Unger RH, Zhou YT, Orci L. Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(5):2327-2332.
121. Martin S, Parton RG. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(5):373-8.

122. Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart J-C, Staels B. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest.* 2006;116(3):571-80.
123. Welte MA. Proteins under new management: lipid droplets deliver. *Trends Cell Biol.* 2007;17(8):363-369.
124. Ueno M, Shen WJ, Patel S, Greenberg AS, Azhar S, Kraemer FB. Fat-specific protein 27 modulates nuclear factor of activated T cells 5 and the cellular response to stress. *J Lipid Res.* 2013;54(3):734-743.
125. Cermelli S, Guo Y, Gross SP, Welte MA. The lipid-droplet proteome reveals that droplets are a protein-storage depot. *Curr Biol.* 2006;16(18):1783-95.
126. Guo Y, Walther TC, Rao M, Stuurman N, Goshima G, Terayama K, et al. Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization. *Nature.* 2008;453:657–661.
127. Guo Y, Cordes KR, Farese RV, Farese Jr. RV, Walther TC. Lipid droplets at a glance. *Journal of cell science.* 2009;122(6):749-52.
128. Goodman JM. The gregarious lipid droplet. *J Biol Chem.* 2008;283(42):28005-28009.
129. Shaw CS, Jones DA, Wagenmakers AJM. Network distribution of mitochondria and lipid droplets in human muscle fibres. *Histochem Cell Biol.* 2008;129(1):65-72.
130. Wang H, Sreenivasan U, Hu H, Saladino A, Polster BM, Lund LM, et al. Perilipin 5, a lipid droplet-associated protein, provides physical and metabolic linkage to mitochondria. *J Lipid Res.* 2011;52(12):2159-2168.
131. Uzbekov R, Roingeard P. Nuclear lipid droplets identified by electron microscopy of serial sections. *BMC Res Notes.* 2013; 6:386.
132. Layerenza JP, González P, García de Bravo MM, Polo MP, Sisti MS, Ves-Losada A. Nuclear lipid droplets: a novel nuclear domain. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1831(2):327-340.
133. Greenberg AS, Obin MS. Many roads lead to the lipid droplet. *Cell metabolism.* 2008;7(6):472-473.
134. Krahmer N, Farese Jr RV, Walther TC. Balancing the fat: lipid droplets and human disease. *EMBO Mol Med.* 2013;5(7):973-983.
135. Tauchi-Sato K, Ozeki S, Houjou T, Taguchi R, Fujimoto T. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J Biol Chem.* 2002;277(46):44507-44512.
136. Fujimoto T, Ohsaki Y, Cheng J, Suzuki M, Shinohara Y. Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochem Cell Biol.* 2008;130:263–279.
137. Yang H, Galea A, Sytnyk V, Crossley M. Controlling the size of lipid droplets: lipid and protein factors. *Curr Opin Cell Biol.* 2012;24(4):509-516.
138. Zweytick D, Athenstaedt K, Daum G. Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1469(2):101-20.
139. Zhang S, Wang Y, Cui L, Deng Y, Xu S, Yu J, et al. Morphologically and Functionally Distinct Lipid Droplet Subpopulations. *Sci Rep.* 2016;6:29539.
140. Sztalryd C, Brasaemle DL. The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis. *Biochimica et biophysica acta Molecular and cell biology of lipids.* 2017;1862(10 Pt B):1221-1232.
141. Ploegh HL. A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature.* 2007;448(7152):435-438.

142. Murphy DJ, Vance J. Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem Sci.* 1999; 24(3):109-15.
143. Yuki Ohsaki Y, Suzuki M, Fujimoto T. Open questions in lipid droplet biology. *Chem Biol.* 2014;21(1):86-96.
144. Boström P, Andersson L, Rutberg M, Perman J, Lidberg U, Johansson BR, et al. SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nat Cell Biol.* 2007;9:1286–93.
145. Boström P, Rutberg M, Ericsson J, Holmdahl P, Andersson L, Frohman MA, et al. Cytosolic lipid droplets increase in size by microtubule-dependent complex formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1945–51.
146. Long AP, Manneschmidt AK, VerBrugge B, Dortch MR, Minkin SC, Prater KE, et al. Lipid droplet de novo formation and fission are linked to the cell cycle in fission yeast. *Traffic.* 2012;13(5):705-14.
147. Kimmel AR, Brasaemle DL, McAndrews-Hill M, Sztalryd C, Londos C. Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins. *J Lipid Res.* 2010;51(3):468-471.
148. Bickel PE, Tansey JT, Welte MA. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1791(6):419-440.
149. Zhang P, Meng L, Song L, Du J, Du S, Cui W, et al. Roles of Perilipins in Diseases and Cancers. *Current Genomics.* 2018;19:247-257.
150. Lu X, Gruia-Gray J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Londos C, et al. The murine perilipin gene: the lipid droplet-associated perilipins derive from tissue-specific, mRNA splice variants and define a gene family of ancient origin. *Mamm Genome.* 2001;12(9):741-749.
151. Wolins NE, Brasaemle DL, Bickel PE. A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. *FEBS letters.* 2006;580(23):5484-91.
152. Hsieh K, Lee YK, Londos C, Raaka BM, Dalen KT, Kimmel AR. Perilipin family members preferentially sequester to either triacylglycerol-specific or cholesteryl-ester-specific intracellular lipid storage droplets. *Journal of cell science.* 2012;125(Pt 17):4067-4076.
153. Orban T, Palczewska G, Palczewski K. Retinyl ester storage particles (retinosomes) from the retinal pigmented epithelium resemble lipid droplets in other tissues. *The Journal of biological chemistry.* 2011;286(19):17248-58.
154. Blaner WS, O'Byrne SM, Wongsiriroj N, Kluwe J, D'Ambrosio DM, Jiang H, et al. Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochimica et biophysica acta.* 2009;1791(6):467-73.
155. Shimizu M, Yamashita D, Yamaguchi T, Hirose F, Osumi T. Aspects of the regulatory mechanisms of PPAR functions: analysis of a bidirectional response element and regulation by sumoylation. *Molecular and cellular biochemistry.* 2006;286(1-2):33-42.
156. Braissant O, Fougelle F, Scotto C, Dauça M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology.* 1996;137:354–366.
157. Montagner A, Polizzi A, Fouché E, Ducheix S, Lippi Y, Lasserre F, et al. Liver PPAR α is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. *Gut.* 2016;65(7):1202-1214.
158. Edvardsson U, Ljungberg A, Lindén D, William-Olsson L, Peilot-Sjögren H, Ahnmark A, et al. PPAR α activation increases triglyceride mass and adipose differentiation-related protein in hepatocytes. *Journal of lipid research.* 2006;47(2):329-40.

159. Yamaguchi T, Matsushita S, Motojima K, Hirose F, Osumi T. MLDP, a Novel PAT Family Protein Localized to Lipid Droplets and Enriched in the Heart, Is Regulated by Peroxisome Proliferator-activated Receptor alpha. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281(20):14232-14240.
160. Yu S, Matsusue K, Kashireddy P, Cao W-Q, Yeldandi V, Yeldandi AV, Rao M S, et al. Adipocyte-specific Gene Expression and Adipogenic Steatosis in the Mouse Liver Due to Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma1 (PPARgamma1) Overexpression. *The Journal of biological Chemistry*. 2003;278:498-505.
161. Takahashi Y, Shinoda A, Furuya N, Harada E, Arimura N, Ichi I, et al. Perilipin-mediated lipid droplet formation in adipocytes promotes sterol regulatory element-binding protein-1 processing and triacylglyceride accumulation. *PLoS One*. 2013;8(5):e64605.
162. Libby AE, Bales E, Orlicky D J, McManaman JL. Perilipin-2 Deletion Impairs Hepatic Lipid Accumulation by Interfering with Sterol Regulatory Element-binding Protein (SREBP) Activation and Altering the Hepatic Lipidome. *J Biol Chem*. 2016;291(46):24231-24246.
163. Mosesti D, Regassa A, Kim W-K. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. *Int J Mol Sci*. 2016;17(1):124.
164. Wolins NE, Rubin B, Brasaemle DL. TIP47 associates with Lipid Droplets. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276 (7):5101-5108.
165. Imamura, M, Inoguchi T, Ikuyama S, Taniguchi S, Kobayashi K, Nakashima N, Nawata H. ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;283(4):E775-83.
166. Heid HW, Moll R, Schwetlick I, Rackwitz HR, Keenan TW. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell and tissue research*. 1998;294(2):309-21.
167. Blanchette-Mackie EJ, Dwyer NK, Barber T, Coxey RA, Takeda T, Rondinone CM, et al. Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. *J Lipid Res*. 1995;36:1211-1226.
168. Londos C, Brasaemle DL, Gruia-Gray J, Servetnick DA, Schultz CJ, Levin DM, Kimmel AR. Perilipin: Unique proteins associated with intracellular neutral lipid droplets in adipocytes and steroidogenic cells. *Biochem Soc Trans*. 1995;23(3):611-615.
169. Arimura N, Horiba T, Imagawa M, Shimizu M, Sato R. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates expression of the perilipin gene in adipocytes. *J Biol Chem*. 2004;279(11):10070-10076.
170. Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Garty NB, Blanchette-Mackie EJ, Londos C. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(17):11341-6.
171. Tansey JT, Sztalryd C, Gruia-Gray J, Roush DL, Zee JV, Gavrilova O, et al. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(11):6494-6499.
172. Brasaemle DL. Thematic review series: Adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: Stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J. Lipid Res*. 2007;48(12):2547-2559.
173. Granneman JG, Moore HP, Krishnamoorthy R, Rathod M. Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl). *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(50):34538-44.

174. Walther TC, Farese Jr RV. The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1791:459–66.
175. Clifford GM, Londos C, Kraemer FB, Vernon RG, Yeaman SJ. Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(7):5011-5015.
176. Brasaemle DL, Rubin B, Harten IA, Gruia-Gray J, Kimmel AR, Londos C. Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem*. 2000;275(49):38486-38493.
177. Martinez-Botas J, Anderson JB, Tessier D, Lapillonne A, Chang BH, Quast MJ, et al. Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr* (db/db) mice. *Nat Genet*. 2000;26:474-479.
178. Jiang HP, Serrero G. Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation related protein. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1992;89(17):7856-60.
179. Jiang HP, Harris SE, Serrero G. Molecular cloning of a differentiation-related mRNA in the adipogenic cell line 1246. *Cell Growth Differ*. 1992;3(1):21-30.
180. Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Segrest JP, Kimmel AR. Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin. Cell Dev Biol*. 1999;10(1):51-58.
181. Brasaemle DL, Barber T, Wolins NE, Serrero G, Blanchette-Mackie EJ, Londos C. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J. Lipid Res*. 1997;38(11):2249-2263.
182. Xu G, Sztalryd C, Lu X, Tansey JT, Gan J, Dorward H, et al. Post-translational regulation of adipose differentiation-related protein by the ubiquitin/proteasome pathway. *J Biol Chem*. 2005;280(52):42841-42847.
183. Wang H, Bell M, Sreenivasan U, Hu H, Liu J, Dalen K, et al. Unique regulation of adipose triglyceride lipase (ATGL) by perilipin 5, a lipid droplet-associated protein. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(18):15707-15715.
184. Wang H, Hu L, Dalen K, Dorward H, Marcinkiewicz A, Russell D, et al. Activation of hormone-sensitive lipase requires two steps, protein phosphorylation and binding to the PAT-1 domain of lipid droplet coat proteins. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(46):32116-32125.
185. Listenberger LL, Ostermeyer-Fay AG, Goldberg EB, Brown WJ, Brown DA. Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover. *J Lipid Res*. 2007;48(12):2751-61.
186. Gao J, Serrero G. Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake. *J Biol Chem*. 1999;274(24):16825-16830.
187. McManaman JL, Bales ES, Orlicky DJ, Jackman M, MacLean PS, Cain S, et al. Perilipin-2-null mice are protected against diet-induced obesity, adipose inflammation and fatty liver disease. *J Lipid Res*. 2013;54:1346-1359.
188. Chang B H-J, Li L, Paul A, Taniguchi S, Nannegari V, Heird WC, Chan L. Protection against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-related protein. *Mol Cell Biol*. 2006;26(3):1063-76.
189. Sztalryd C, Bell M, Lu X, Mertz P, Hickenbottom S, Chang BH-J, et al. Functional compensation for adipose differentiation-related protein (ADFP) by Tip47 in an ADFP null embryonic cell line. *J Biol Chem*. 2006;281(45):34341-8.

190. Bell M, Wang H, Chen H, Mc Lenithan JC, Gong DW, Yang RZ, et al. Consequences of lipid droplet coat protein downregulation in liver cells: abnormal lipid droplet metabolism and induction of insulin resistance. *Diabetes*. 2008;57(8):2037-45.
191. Diaz E, Pfeffer SR, TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking. *Cell*. 1998;93(3):433-43.
192. Carr RM, Patel RT, Rao V, Dhir R, Graham MJ, Crooke RM, et al. Reduction of TIP47 improves hepatic steatosis and glucose homeostasis in mice. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2012;302(8):R996-1003.
193. Skinner JR, Shew TM, Schwartz DM, Tzekov A, Lepus C M, Abumrad N A, Wolins N E. Diacylglycerol enrichment of endoplasmic reticulum or lipid droplets recruits perilipin 3/TIP47 during lipid storage and mobilization. *J Biol Chem*. 2009;284(45):30941-30948.
194. Wolins NE, Quaynor BK, Skinner JR, Tzekov A, Croce MA, Gropler MC, et al. OXPAT/PAT-1 is a PPAR-induced lipid droplet protein that promotes fatty acid utilization. *Diabetes*. 2006;55(12):3418-3428.
195. Wolins NE, Skinner JR, Schoenfish MJ, Tzekov A, Bensch KG, Bickel P E. Adipocyte Protein S3-12 coats nascent lipid droplets. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(39):37713-37721.
196. Scherer PE, Bickel PE, Kotler M, Lodish HF. Cloning of cell-specific secreted and surface proteins by subtractive antibody screening. *Nature biotechnology*. 1998;16(6):581-586.
197. de la Rosa Rodriguez MA, Kersten S. Regulation of lipid droplet-associated proteins by peroxisome proliferator-activated receptors. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2017;1862(10 Pt B):1212–1220.
198. Čopič A, Antoine-Bally S, Giménez-Andrés M, La Torre Garay C, Antonny B, Manni MM, et al. A giant amphipathic helix from a perilipin that is adapted for coating lipid droplets. *Nat Commun*. 2018;9(1):1332.
199. Chen W, Chang B, Wu X, Li L, Sleeman M, Chan L. Inactivation of Plin4 downregulates Plin5 and reduces cardiac lipid accumulation in mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2013;304(7):E770-779.
200. Hashani M, Witzel HR, Pawella LM, Lehmann-Koch J, Schumacher J, Mechttersheimer G, et al. Widespread expression of perilipin 5 in normal human tissues and in diseases is restricted to distinct lipid droplet subpopulations. *Cell and tissue research*. 2018;374(1):121-36.
201. Dalen KT, Dahl T, Holter E, Arntsen B, Londos C, Sztalryd C, Nebb H I. LSDP5 is a PAT protein specifically expressed in fatty acid oxidizing tissues. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1771(2):210-227.
202. Wang H, Sreenivasan U, Hu H, Saladino A, Polster B M, Lund LM, et al. Perilipin 5, a lipid droplet-associated protein, provides physical and metabolic linkage to mitochondria. *Journal of lipid research*. 2011;52(12):2159-68.
203. Gallardo-Montejano VI, Yang C, Hahner L, McAfee JL, Johnson JA, Holland WL, et al. Argininosuccinate synthase 1 and periportal gene expression in sonic hedgehog hepatocellular adenomas. *Nat Commun*. 2021;12(1):3320.
204. Bosma M, Minnaard R, Sparks LM, Schaart G, Losen M, de Baets MH, et al. The lipid droplet coat protein perilipin 5 also localizes to muscle mitochondria. *Histochemistry and cell biology*. 2012;137(2):205-16.
205. Gemmink A, Daemen S, Kuijpers HJH, Schaart G, Duimel H, López-Iglesias C, et al. Super-resolution microscopy localizes perilipin 5 at lipid droplet-mitochondria interaction sites and at lipid droplets juxtaposing to perilipin 2. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2018;1863(11):1423-1432.

206. Wang C, Zhao Y, Gao X, Li L, Yuan Y, Liu F, et al. Perilipin 5 improves hepatic lipotoxicity by inhibiting lipolysis. *Hepatology*. 2015;61(3):870-82.
207. Kuramoto K, Okamura T, Yamaguchi T, Nakamura TY, Wakabayashi S, Morinaga H, et al. Perilipin 5, a lipid droplet-binding protein, protects heart from oxidative burden by sequestering fatty acid from excessive oxidation. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(28):23852-63.
208. Trevino MB, Mazur-Hart D, Machida Y, King T, Nadler J, Galkina EV, et al. Liver Perilipin 5 Expression Worsens Hepatosteatosis But Not Insulin Resistance in High Fat-Fed Mice. *Mol Endocrinol*. 2015 Oct;29(10):1414-25.
209. Wang H, Sreenivasan U, Gong DW, O'Connell KA, Dabkowski ER, Hecker PA, et al. Cardiomyocyte-specific perilipin 5 overexpression leads to myocardial steatosis and modest cardiac dysfunction. *Journal of lipid research*. 2013;54(4):953-65.
210. Li H, Song Y, Zhang L-J, Gu Y, Li F-F, Pan S-Y, et al. LSDP5 enhances triglyceride storage in hepatocytes by influencing lipolysis and fatty acid β -oxidation of lipid droplets. *PLoS One*. 2012;7(6):e36712.
211. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123:309–314.
212. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: the Metabolic Requirements of cell proliferation. *Sciences*. 2009;324:1028-1033.
213. Medes G, Thomas A, Weinhouse S. Metabolism of neoplastic tissue IV: A study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices in vitro. *Cancer Res*. 1953;13:27–29.
214. Szutowicz A, Kwiatkowski J, Angielski S. Lipogenetic and glycolytic enzyme activities in carcinoma and non malignant diseases of the human breast. *Br J Cancer*. 1979; 39:681–687.
215. Turyn J, Schlichtholz B, Dettlaff-Pokora A, Presler M, Goyke E, Matuszewski M, et al. Increased activity of glycerol 3-phosphate dehydrogenase and other lipogenic enzymes in human bladder cancer. *Horm Metab Res*. 2003;35:565–569.
216. Kuhajda FP. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition*. 2000;16:202–208.
217. Yahagi, N., Shimano H, Hasegawa K, Ohashi K, Matsuzaka T, Najima Y, et al. Co-ordinate activation of lipogenic enzymes in hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer*. 2005;41(9):1316-22.
218. Kuhajda FP, Jenner K, Wood FD, et al. Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:6379–6383.
219. Goodman ZD, Terraciano L, Wee A, Tumors and tumor-like lesions of the liver in MacSween's *Pathology of the Liver*. 6th Edition. 2012. Churchill Livingstone/Elsevier. Edinburgh; 761-851.
220. Yao M, Tabuchim H, Nagashima Y, et al. Gene expression analysis of renal carcinoma: adipose differentiation related protein as a potential diagnostic and prognostic biomarker for clear-cell renal carcinoma. *J Pathol*. 2005;205:377–387.
221. Mrozinski J. Immunohistochemische Identifikation und Klassifizierung von Liposarkomen mittels verschiedener Fett-assoziiierter Proteine. *Medical Dissertation*. Philipps-University Marburg: Germany, 2007;1–103.
222. Izumi M, Mukai K, Nagai T, Matsubaayashi J, Iwaya K, Chiu C-S, Goto H. Sebaceous carcinoma of the eyelids: thirty cases from Japan. *Pathol Int*. 2008;58:483–488.

223. Sirois I, Aguilar-Mahecha A, Lafleur J, Fowler E, Vu V, Scriver M, et al. A Unique Morphological Phenotype in Chemoresistant Triple-Negative Breast Cancer Reveals Metabolic Reprogramming and PLIN4 Expression as a Molecular Vulnerability. *Mol Cancer Res.* 2019;17(12):2492-2507.
224. Green MR, Sambrook J. Cloning and Transformation with Plasmid Vectors. *Cold Spring Harb Protoc.* 2021;2021(11).
225. Hopp TP, Prickett KS, Price VL, Libby RT, March CJ, Cerretti DP, et al. A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification. *Bio/Technology.* 1988;6:1204-1120.
226. Voduc D, Kenney C, Nielsen TO. Tissue Microarrays in Clinical Oncology. *Semin Radiat Oncol.* 2008;18(2):89-97.
227. Yamashita S, Katsumata O. Heat-Induced Antigen Retrieval in Immunohistochemistry: Mechanisms and Applications. *Methods Mol Biol.* 2017;1560:147-161.
228. Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch I. Bradford Assay for Determining Protein Concentration. *Cold Spring Harb Protoc.* 2020(4):102269.
229. Ornstein L, Davis BJ. Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Ann NY Acad Sci.* 1964; Band 121:321–349.
230. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-685.
231. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975;94(3):441-8.
232. Mayerhöfer TG, Pahlow S, Popp J. The Bouguer-Beer-Lambert Law: Shining Light on the Obscure. *ChemPhysChem.* 2020;21(18):2029–2046.
233. Oshina I, Spigulis J. Beer–Lambert law for optical tissue diagnostics: current state of the art and the main limitations. *Journal of Biomedical Optics.* 2021;26(10):100901.
234. Waters DLE, Shapter FM. The polymerase chain reaction (PCR): general methods. *Methods Mol Biol.* 2014;1099:65-75.
235. Haqqi TM, Sarkar G, David CS, Sommer SS. Specific amplification with PCR of a refractory segment of genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(24):11844.
236. Shepard SB, Cooper AG. PCR synthesis of cDNA from total RNA. *Biotechniques.* 1997;23(2):202-204.
237. Frohman MA, Dush MK, Martin GR. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Nati. Acad. Sci.* 1988;85(23):8998-9002.
238. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005;5(2):209-19.
239. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods.* 2001;25(4):402-408.
240. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:7297-7301.
241. Kircheis R, Kichler A, Wallner G, Kursa M, Ogris M, Felzmann T, et al. Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther.* 1997;4:409-418.

242. Kleiner DE, Brunt EM, Natta MV, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313–1321.
243. Paradis V, Champault A, Ronot M, Deschamps L, Valla D-C, Vidaud D, et al. Telangiectatic Adenoma: An Entity Associated with Increased Body Mass Index and Inflammation. *Hepatology*. 2007;46(1):140-146.
244. Schmidt G, Gerlinger C, Juhasz-Böss I, Stickeler E, Rody A, Liedtke C, et al. Her2-neu score as a prognostic factor for outcome in patients with triple-negative breast cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2016;142(6):1369-76.
245. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific reports*. 2017;7(1):16878. doi:10.1038/s41598-017-17204-5.
246. Shapiro SS, Wilk M B. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*. 1995;52(3-4):591-611.
247. Student. The Probable Error of a Mean. *Biometrika*. 1908;6:1-25.
248. Wilcoxon F. Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bulletin*. 1945;1(6):80–83.
249. Mann HB, Whitney DR. *On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other*. *Ann. Math. Stat.* 1947;18(1):50–60.
250. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society, Serie B*. 1995;57:289-300.
251. Pearson K. Notes on regression and inheritance in the case of two parents. *Proceedings of the Royal Society of London*. 1895;58:240–242.
252. Spearman C. The proof and measurement of association between two things. *American Journal of Psychology*. 1904;15(1):72-01.
253. Siska C, Kechris K. Differential correlation for sequencing data. *BMC Res Notes*. 2017;10(1):54.
254. Pearson K. On the criterion that a given system of derivations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from a random sampling. *The London Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*. 1900;50(5):157-175.
255. Yates F. Contingency table involving small numbers and the χ^2 test". *Supplement to the Journal of the Royal Statistical Society*. 1934; 1(2): 217–235.
256. Kruskal WH, Wallis WA. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*. 1952;47(160):583–621.
257. Bundesamt S. Körpermaße nach Altersgruppen und Geschlecht. Homepage Statistisches Bundesamt. 2021.
258. Margolskee E, Bao F, Koehne de Gonzalez A, Moreira RK, Lagana S, Sireci AN, Sepulveda AR, et al. Hepatocellular adenoma classification: a comparative evaluation of immunohistochemistry and targeted mutation analysis. *Diagnostic Pathology*. 2016;11:27.
259. Joseph NM, Ferrell LD, Jain D, Torbenson MS, Wu T-T, Yeh MM, Kakar S. Diagnostic utility and limitations of glutamine synthetase and serum amyloid associated protein immunohistochemistry in the distinction of focal nodular hyperplasia and inflammatory hepatocellular adenoma. *Mod Pathol*. 2014;27:62-72.
260. Gaida M M. [The ambiguous role of the inflammatory micromilieu in solid tumors]. *Der Pathologe*. 2020;41(Suppl 2):118-123.

261. Hess A-K, Jöhrens K, Zakarneh A, Balermipas P, Von Der Grün J, Rödel C, et al. Characterization of the tumor immune micromilieu and its interference with outcome after concurrent chemoradiation in patients with oropharyngeal carcinomas. *Oncoimmunology*. 2019;8(8):1614858.
262. Kellers F, Fernandez A, Konukiewitz B, Schindeldecker M, Tagscherer KE, Heintz A, et al. Senescence-Associated Molecules and Tumor-Immune-Interactions as Prognostic Biomarkers in Colorectal Cancer. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:865230.
263. Paradis V, Zalinski S, Chelbi E, Guedj N, Degos F, Vilgrain V, et al. Hepatocellular carcinoma in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis: a pathological analysis. *Hepatology*. 2009;49(3):851-859.
264. Scalera A, Tarantino G. Could metabolic syndrom lead to hepatocarcinoma via non-alcoholic fatty liver disease? *World J Gastroenterol*. 2014;20(28):9217-9228.
265. Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology*. 2010;51(5):1820-32.
266. Gebhardt R, Baldysiak-Figiel A, Krügel V, Ueberham E, Gaunitz F. Hepatocellular expression of glutamine synthetase: an indicator of morphogen actions as master regulators of zonation in adult liver. *Prog Histochem Cytochem*. 2007;41(4):201-66.
267. Paradis V, Benzekri A, Dagère D, Bièche I, Laurendeau I, Vilgrain V, et al. Telangiectatic focal nodular hyperplasia: a variant of hepatocellular adenoma. *Gastroenterology*. 2004;126:1323-1329.
268. Jones A, Kroneman TN, Blahnik AJ, Graham RP, Mounajjed T, Torbenson MS, Moreira RK. Ki-67 "hot spot" digital analysis is useful in the distinction of hepatic adenomas and well-differentiated hepatocellular carcinomas. *Virchows Archiv*. 2021;478:201–207.
269. Saldarriaga J, Bisig B, Couchy G, Castain C, Zucman-Rossi J, Balabaud C, et al. Focal B-catenin mutation identified on formalin-fixed and paraffin embedded inflammatory hepatocellular adenoma. *Histopathology*. 2017;71:989-993.
270. Essers MAG, de Vries-Smits LMM, Barker N, Polderman PE, Burgering BMT, Korswagen HC. Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science*. 2005;308(5725):1181-4.
271. Liu X, Lu X, Song K, Blackman MR. Natural Functions of PLIN2 Mediating Wnt/LiCl Signaling and Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3)/GSK3 Substrate-Related effects are Modulated by Lipid. *Molecular and Cellular Biology*. 2015;36(3):421-437.
272. Senni N, Savall M, Cabrerizo Granados D, Alves-Guerra M-C, Sartor C, Lagoutte I, et al. B-catenin-activated hepatocellular carcinomas are addicted to fatty acids. *Gut*. 2019; 68(2): 322-334.
273. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-845.
274. Gruber S, Straub BK, Ackermann PJ, Wunderlich CM, Mauer J, Seeger JM, et al. Obesity promotes liver carcinogenesis via Mcl-1 stabilisation independent of IL-6Ra signalling. *Cell Rep*. 2013;4(4):669-680.
275. Debebe A, Medina V, Chen C-Y, Mahajan IM, Jia C, Fu D, et al. Wnt/ β -catenin activation and macrophage induction during liver cancer following steatosis. *Oncogene*. 2017;36 (43):6020- 6029.
276. Fujii H, Ikura Y, Arimoto J, Sugioka K, Iezzoni JC, Park SH, et al. Expression of perilipin and adipophilin in nonalcoholic fatty liver disease; relevance to oxidative injury and hepatocyte ballooning. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 2009;16(6):893-901.

8 Anhang

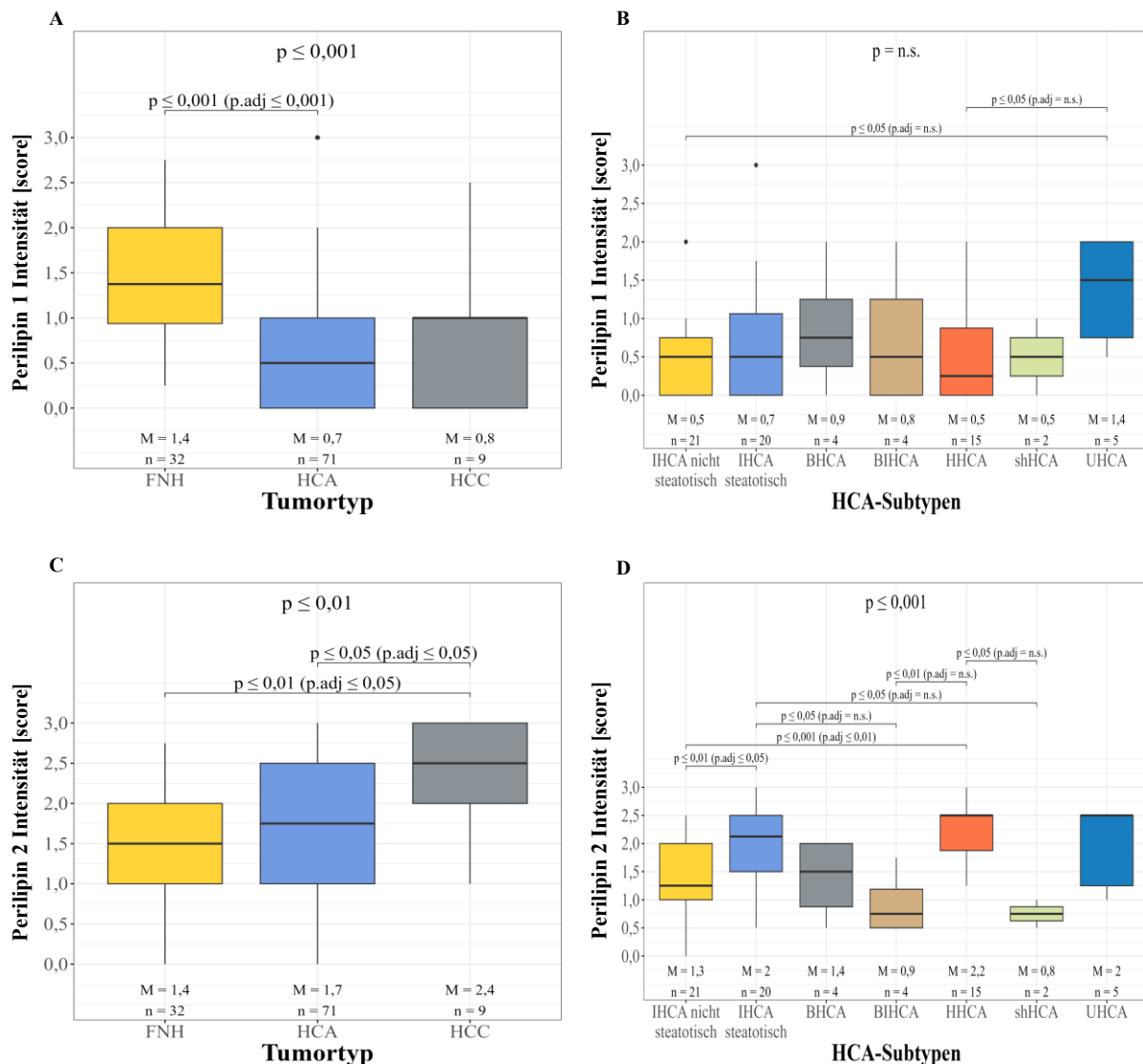


Abb. 25: Histopathologische Evaluierung der Intensität der Perilipin 1- und 2-Färbung in HCAs und im Vergleich zu FNHs und HCCs. Die immunhistochemischen Perilipin 1 (A) und 2 (B) Färbungen wurden hinsichtlich der Intensität semiquantitativ, wie unter 3.2.7.2 dargestellt, bestimmt. Proben des zugehörigen gleichen Tumortyps wurden zusammengefasst. Die Ergebnisse sind als Box-Whisker-Plots dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test eingesetzt. Für die Berechnung der globalen P-Werte wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet.

Tab. 28: IHCA- und HHCA-Charakteristika in der MRT-Untersuchung

Phase	HHCA	IHCA
T1	Iso- oder hyperintens	Iso- oder hyperintens
T2	Iso- oder leicht hyperintense	Deutlich hyperintens mit Betonung der Peripherie
Nach Kontrastmittel-Gabe in der arteriellen Phase	Leichtes Enhancement	Starkes Enhancement
Nach Kontrastmittel-Gabe in der arteriellen Phase	Keine Persistenz	Persistierendes, heterogenes Muster
Chemical Shift Sequenz	Homogen diffuser Signalabfall	Kein oder nur fokaler Signalabfall

MRT: Magnetresonanztomographie. Modifiziert nach (70) und (71).

Tab. 29: Perilipine-Nomenklatur

Verwendeter Name	Andere Namen	Genlokus im Menschen
Perilipin 1	Perilipin, Peri	15q26
Perilipin 2	Adipose differentiation-related Protein (ADRP), Adipophilin, ADPH, ADFP	9p22.1
Perilipin 3	Tail-interacting protein of 47 kiloDaltons (TIP47), Placental protein 17 (PP17), Mannose 6 phosphate binding protein 1 (M6PRBP1)	19p13.3
Perilipin 4	S3-12, Plasma membrane associated protein, KIAA1881	19p13.3
Perilipin 5	Oxidative PAT protein (XPAT), Myocardial lipid droplet protein (MLDP), lipid storage droplet protein 5 (LSDP5), PAT-1	19p13.3

Modifiziert nach (149).

Tab. 30: Klinische Daten des HCA-Kollektivs

Tumorentität	Anzahl der Patienten [n]	Erhöhtes CRP -v. R.- [n]	C2-Abusus [n]	aHT [n]	Diabetes			Erhöhte TAG -v. R.- [n]	Schwache HDL -v. R.- [n]	Erhöhte ALT/AST* -v. R.- [n]	Erhöhte AP / γ -GT/GB* -v. R.- [n]
					Typ 1 [n]	Typ 2 [n]	MODY3 [n]				
IHCA nicht steatotisch	10	2 (4)	0 (6)	1 (6)	0 (6)	0 (6)	0 (10)	1 (4)	1 (4)	2 (5)	3 (5)
IHCA steatotisch und IHCA nicht steatotisch	4	1 (3)	0 (1)	2 (4)	1 (4)	1 (4)	0 (4)	1 (1)	1 (1)	1 (3)	2 (3)
IHCA steatotisch	11	2 (3)	0 (6)	3 (8)	0 (8)	2 (8)	0 (11)	2 (3)	1 (3)	2 (4)	3 (4)
BIHCA	3	1 (1)	0 (1)	0 (2)	1 (2)	0 (2)	k. A.	k. A.	k. A.	0 (1)	0 (1)
BHCA	3	k. A.	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (3)	k. A.	k. A.	0 (1)	1 (1)
BIHCA und HHCA	1	1 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	1 (1)	0 (1)	1 (1)	1 (1)	0 (1)
BHCA und UHCA	1	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	0 (1)	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
HHCA	5	0 (1)	x	1 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (5)	k. A.	k. A.	1 (1)	0 (1)
UHCA	3	k. A.	1 (3)	2 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (3)	k. A.	k. A.	1 (1)	1 (1)
shHCA	2	2 (2)	0 (2)	1 (2)	0 (2)	0 (2)	0 (2)	k. A.	k. A.	1 (2)	2 (2)
HCA, Gesamt	43	9 (15)	1 (21)	10 (30)	2 (30)	3 (30)	1 (43)	4 (9)	4 (9)	9 (19)	12 (19)
HCC	7	2 (3)	1 (4)	5 (6)	0 (6)	4 (6)	0 (7)	1 (1)	0 (1)	3 (4)	4 (5)
FNH	24	5 (7)	6 (21)	0 (18)	1 (21)	2 (21)	0 (24)	3 (6)	2(5)	3 (13)	8 (14)

Die Anzahl der Patienten mit vorhandenem klinischem Parameter wird angegeben. In Klammern wird jeweils die Anzahl der Patienten mit vorhandenen Daten angegeben. v. R.: vor Resektion; k. A. keine Angabe; TAG: Triglycerid; C2-Abusus: Alkoholabusus; aHT: arterielle Hypertonie; Transaminasen: ALT: Alanin-Aminotransferase / AST: Aspartat-Aminotransferase; Cholestaseparameter: AP: Alkalische Phosphatase / γ -GT: Gamma-Glutamyltransferase / GB: Gesamtbilirubin. *Patienten wurden gezählt, wenn zumindest eine der aufgeführten Parameter über dem maximalen Normwert lag.

Tab. 31: Erstdiagnose sowie radiologische Diagnose bei Lebertumoren des Mainzer Kollektivs

Tumorentität	Anzahl Patienten	Entdeckungsart (Anzahl Patienten mit vorhanden Daten)	Radiologische Diagnose (Anzahl Patienten mit vorhanden Daten)
IHCA nt. st.	10	2 x Oberbauchschmerzen 2 x Zufall Bildgebung (4)	5 x HCA > darunter 1x IHCA 1 x fibrolamälläres HCC (6)
IHCA nt. st. und IHCA st.	4	1 x Zufall Bildgebung 1 x Hepatomegalie bei GSD (2)	2 x HCA 1 x HCA DD FNH (3)
IHCA st.	11	1 x Oberbauchschmerzen 1 x postgravide Hepatomegalie 3 x Zufall Bildgebung (5)	5 x HCA 1 x HCA DD <i>Peliosis Hepatis</i> 1 x FNH DD Echinococcus (7)
BIHCA	3	1 x Zufall Bildgebung (1)	1 x HCA (1)
BHCA	3	1 x Oberbauchschmerzen (1)	1 x HCA (1)
BIHCA und HHCA	1	k. A. (0)	1 x HCA (1)
BHCA und UHCA	1	k. A. (0)	k. A. (0)
HHCA	5	1 x Thoraxschmerzen 1 x Zufall Bildgebung (2)	3 x HCA 1 x FNH DD Echinococcus (4)
UHCA	3	k. A. (0)	1 x HCA 1 x HCC DD CCC (2)
shHCA	2	2x Oberbauchschmerzen (2)	2 x HCA (2)
HCA, Gesamt	43	6 x Oberbauchschmerzen 1 x Thoraxschmerzen 8 x Zufall Bildgebung 2 x Hepatomegalie (17)	21 x HCA 1 x HCA DD FNH 2 x FNH DD Echinococcus 1 x HCC DD CCC 1 x HCA DD <i>Peliosis Hepatis</i> 1 x fibrolamälläres HCC (27)
HCC	7	1 x erhöhte Leberwerte 1 x tastbarer Herd 1 x Zufall Bildgebung (3)	1 x HCC (1)
FNH	24	2 x Oberbauchschmerzen 9 x Zufall Bildgebung 1 x Zufall laparoskopisch 1 x erhöhte Leberwerte 1 x postgravide Hepatomegalie (14)	8 x HCA 4 x FNH 2 x Lebermetasasen 1 x HCA DD HCC 1 x nicht zuzuordnen (16)

Tab. 32: Ki67-Proliferationsrate in HCAs im Vergleich zu FNHs und HCCs

Tumorentität (Anzahl der Herde)	Anzahl der Herde nach Ki67-Proliferationsrate		
	< 1 %	[1-5 %]	> 5 %
IHCA Gesamt (41)	29	9	3
IHCA nicht steatotisch (21)	15	4	2
IHCA steatotisch (20)	14	5	1
B(I)HCA Gesamt (8)	6	1	1
BHCA (4)	4	0	0
BIHCA (4)	2	1	1
HHCA (15)	14	1	0
shHCA (2)	1	1	0
UHCA (5)	3	2	0
HCA Gesamt (71)	53	14	4
FNH (32)	31	1	0
HCC (9)	2	6	1

Prozentsatz der Ki67-positiven Zellkerne. Drei Kategorien wurden gebildet (< 1 %; [1-5 %] und > 5 %) und die Anzahl der Tumore pro Kategorie wird angegeben.

Tab. 33: Steatosegrade in HCAs im Vergleich zu FNHs und HCCs

Tumortyp (Anzahl der Herde)	Anzahl der Herde nach Steatosegrad			
	Kat. 0	Kat. 1	Kat. 2	Kat. 3
IHCA Gesamt (41)	21	10	3	7
IHCA nt. st. (21)	21	0	0	0
IHCA st. (20)	0	10	3	7
B(I)HCA Gesamt (8)	6	1	1	0
BHCA (4)	3	1	0	0
BIHCA (4)	3	0	1	0
HHCA (15)	1	1	10	3
shHCA (2)	2	0	0	0
UHCA (5)	3	1	0	1
HCA Gesamt (71)	33	13	14	11
FNH (32)	17	12	3	0
HCC (9)	3	1	2	3

Vier Kategorien des Steatosegrades wurden gebildet: Kat. 0: <10 %; Kat. 1: 10-33 %; Kat. 2: 34-66 %; Kat. 3: > 66 % und die Anzahl der Tumore pro Kategorie wird angegeben.

Tab. 34: Steatosegrade des nicht-tumorösen Leberparenchyms der HCA-Patienten im Vergleich zu den FNH- und HCC-Patienten

Angrenzendes nicht-tumoröses Leberparenchym (Anzahl der Fälle)	Anzahl der Fälle nach Steatosegrad			
	Kat. 0	Kat. 1	Kat. 2	Kat. 3
IHCA (40)	6	23	11	0
IHCA nicht steatotisch (20)	5	12	3	0
IHCA steatotisch (20)	1	11	8	0
B(I)HCA (7)	5	2	0	0
BHCA (3)	2	1	0	0
BIHCA (4)	3	1	0	0
HHCA (14)	2	12	0	0
sh(I)HCA (2)	0	1	1	0
UHCA (5)	2	1	1	1
HCA Gesamt (68)	15	39	13	0
FNH (30)	11	15	4	0
HCC (8)	3	5	0	0

Vier Kategorien des Steatosegrades wurden gebildet: Kat. 0: < 5 %; Kat. 1: 5-33 %; Kat. 2: 34-66 %; Kat. 3: > 66 % und die Anzahl der Tumore pro Kategorie wird angegeben.

9 Danksagung

Ich bedanke mich von ganzem Herzen bei der Forschungsgruppe sowie allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie, die zu meiner Doktorarbeit beigetragen haben.

Meinen Eltern bin ich sehr dankbar, dass sie mir das langjährige Studium ermöglichten. Die Unterstützung meines Partners war mir eine große Hilfe, und ganz besonders umarme ich meine Kinder, deren Liebe mich stets begleitet hat.

10 Tabellarischer Lebenslauf

Diane Salomé Duret

Geboren am 13.02.1992, in Paris, Frankreich

Seit November 2018	Doktorandin im Fachbereich Pathologie, Universitätsmedizin Mainz
Seit November 2016-August 2023	Assistenzärztin im Fachbereich Pathologie, Institut für Pathologie, Universitätsmedizin Mainz
Oktober 2016	Approbation als Ärztin
September 2013-Juni 2016	Externat: Halbzeittätigkeit in unterschiedlichen Stationen verschiedener Krankenhäuser der APHP (Assistance publique des hôpitaux de Paris), drei Monatsrythmus
September 2010 –Juni 2016	Studium der Humanmedizin, Université Paris Descartes, Paris, Frankreich
Juni 2010	Baccalauréat (Abitur) Option internationale allemande, mention très bien
September 2007-Juni 2010	Besuch des Gymnasiums Lycée international Jean-Pierre Vernant, Sèvres, Frankreich
September 2003-Juli 2007	Besuch der Gesamtschule der Sekundarstufe „Collège Saint-Joseph du Parchamp“, Boulogne-Billancourt, Frankreich