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

Lipidtropfen und -assoziierte Proteine bei viralen Hepatitiden

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der

Medizin

der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Selina Schelbert
aus Würzburg

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

3. Gutachter:

Tag der Promotion: 12. Juli 2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis VI

Tabellenverzeichnis VII

Abbildungsverzeichnis VIII

1 Einleitung und Ziel der Dissertation 1

2 Literaturdiskussion 2

2.1 Physiologie und Anatomie der Leber 2

2.2 Lebererkrankungen 3

2.2.1 Steatotische Lebererkrankungen 4

2.2.2 Virale Hepatitiden 8

2.2.3 Nicht-virale Hepatitiden 15

2.2.4 Leberzirrhose 17

2.2.5 Präneoplasien der Leber 19

2.2.6 Neoplasien der Leber 20

2.3 Lipidtropfen und -assoziierte Proteine 24

2.3.1 Lipidtropfen 24

2.3.2 Perilipin-Familie 25

2.3.3 Rolle der Perilipine bei Lebererkrankungen 27

3 Material und Methoden 30

3.1 Material 30

3.1.1 Arbeitsgeräte 30

3.1.2 Verbrauchsmaterialien ... 31
3.1.3 Chemikalien ... 32
3.1.4 Lösungen ... 34
3.1.5 Antikörper für die immunhistochemische Färbung ... 35
3.1.6 Software ... 36
3.1.7 Gewebe ... 37
3.2 Methoden ... 38
3.2.1 Herstellung von Paraffingewebeschnitten ... 38
3.2.2 PAS-Färbung ... 38
3.2.3 H&E-Färbung ... 39
3.2.4 Immunhistochemie („Dako Cytomation Autostainer plus“) ... 39
3.2.5 Immunhistochemie („VENTANA BenchMark ULTRA“) ... 40
3.2.6 Transmissionselektronenmikroskopie ... 40
3.2.7 Histologische Beurteilung der Proben ... 41
3.2.8 Statistische Auswertung ... 43

4 Ergebnisse ... 45
4.1 Lipidtropfen-assoziierte Proteine bei Leberbiopsien von Patienten mit chronischer Hepatitis C ... 45
4.1.1 Klinische Charakteristika des HCV-Kollektivs ... 46
4.1.2 Steatose und Perilipin-Expression in Leberbiopsien von Patienten mit chronischer Hepatitis C ... 49
4.2 Lipidtropfen-assoziierte Proteine bei chronischer Hepatitis B und anderen viralen Hepatitiden ... 59
4.2.1 Lipidtropfen-assoziierte Proteine bei Leberbiopsien von Patienten mit chronischer Hepatitis B ... 59
4.2.2 Lipidtropfen-assoziierte Proteine in Leberbiopsien von Patienten mit akuter Hepatitis E ... 65
4.3 Lipidtropfen-assoziierte Proteine bei nicht-viralen Hepatitiden ... 66

4.4 Lipidtropfen-assoziierte Proteine in Kontrolllebergewebe 67
4.5 Immunhistochemische und ultrastrukturelle Analyse Perilipin positiver-Foci 70

5 Diskussion 74
5.1 Repräsentativität der Kollektive 74
5.2 Steatose bei viralen Hepatitiden 76
5.3 Perilipin-positive Foci 78
5.4 Lipidtropfen-Homöostase in gesunder Leber 80
5.5 Metabolische Hepatokarzinogenese 81

6 Zusammenfassung 84

7 Literatur 85

8 Anhang 117

Danksagung 122

Tabellarischer Lebenslauf 123

Abkürzungsverzeichnis

A

AFLD *Alkoholische Fettlebererkrankung ("alcoholic fatty liver disease")*
AFP *Alpha-Fetoprotein*
AIH *Autoimmune Hepatitis*
Anti-HBe *Antikörper gegen HBeAg*
Anti-HBs *Antikörper gegen HBsAg*
Anti-HDV *Antikörper gegen HDV*
AP *Alkalische Phosphatase*
ASH *Alkoholische Steatohepatitis ("alcoholic steatohepatitis")*

B

BDMA *Benzyldimethylan*
BilIN *Biliäre intraeptheliale Neoplasie ("Biliary intraepithelial neoplasia")*

C

cHCC-CCA *Kombiniertes hepatozelluläres und Cholangiokarzinom*
CHE *Cholinesterase*
cPAT *"constitutives" PAT-Protein*

D

DAA *Direkte antivirale Agenzien*
DDSA *Dodecenyl Succinic Anhydrid*
DEN *Diethylnitrosamin*

E

ePAT *"exchangeable" PAT-Protein*
ER *Endoplasmatisches Retikulum*

F

FFPE *Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet*

H

HAV *Hepatitis A Virus*
HBcAg *Hepatitis B Core-Antigen*
HBeAg *Hepatitis B Envelope-Antigen*
HBsAg *Hepatitis B-Oberflächenantigen*
HBV *Hepatitis B Virus*
HCC *Hepatozelluläres Karzinom*
HCV *Hepatitis C Virus*
HDAg *Hepatitis D-Antigen*
HDV *Hepatitis D Virus*
HEV *Hepatitis E Virus*
HIV *Humanes Immundefizienz Virus*

I

iCCA *Intrahepatisches Cholangiokarzinom*
IHC *Immunhistochemie*
INFα *PEGyliertes Interferon alpha*
IPNB *Intraduktale papilläre Neoplasien der Gallenwege ("intraductal papillary neoplasm of the bile duct")*

M

MNA *Methyl Nadic Anhydrid*
MTM-HCC *Hepatozelluläres Karzinom vom makrotrabekulär-massiven Subtyp*

N

NAFLD *Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung ("non-alcoholic fatty liver disease")*
NASH *Nicht-alkoholische Steatohepatitis ("non-alcoholic steatohepatitis")*
NS-Proteine *Nicht-Struktur-Proteine*

P

PARP-1 *Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1*
PBC *Primär Biliäre Cholangitis*
PLIN1 *Perilipin 1, Perilipin*
PLIN2 *Perilipin 2, Adipophilin*
PSC *Primär Sklerosierende Cholangitis*

S

SH-HCC *Hepatozelluläres Karzinom vom steatohepatitischen Subtyp*
STIKO *Ständige Impfkommission*

T

TAG *Triacylglyceride*

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Geräte 30

Tab. 2: Verbrauchsmaterialien 31

Tab. 3: Chemische Substanzen 32

Tab. 4: Antikörper 35

Tab. 5: Software 36

Tab. 6: Kontrollleberbiopsien und -resektate 37

Tab. 7: Klinische Parameter der HCV-Patienten Teil 1 47

Tab. 8: Klinische Parameter der HCV-Patienten Teil 2 48

Tab. 9: Auswertung von Perilipin-Expression und Steatosegrad in Leberbiopsien verschiedener HCV-Genotypen 52

Tab. 10: Perilipin-positive Foci in chronischer Hepatitis C bezogen auf die HCV-Genotypen 56

Supp. Tab. 1: Steatosegrad und prozentualer Anteil an Leberbiopsien mit Perilipin-positiven Foci von Patienten mit chronischer Hepatitis C 117

Supp. Tab. 2: Klinische und histologische Parameter von Patienten mit chronischer Hepatitis B 118

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Gliederung der Leberläppchen 3

Abb. 2: Schematische Darstellung eines Lipidtropfen..... 25

Abb. 3: Beispielhafte Darstellung der semiquantitativen Bestimmung mittels IHC-Scores..... 42

Abb. 4: Exemplarische Focusbeurteilung in der Perilipin 2-Immunhistochemie 43

Abb. 5: Box-Plot-Analyse der HCV-Genotypen in Relation zur Steatose gemäß H&E-Färbung..... 50

Abb. 6: Repräsentative Beispiele der Immunhistochemie von Perilipin 2 in Leberbiopsien von Patienten mit chronischer Hepatitis C 51

Abb. 7: Streudiagramme mit Spearman Korrelation des Steatosegrads mit den Serumtransaminasen AST und ALT 53

Abb. 8: Perilipin-positive Foci bei Patienten mit chronischer Hepatitis C..... 55

Abb. 9: Vergleich des Vorhandenseins Perilipin 2-positiver Foci mit dem Steatosegrad gemäß H&E- sowie Perilipin 2-Färbung 57

Abb. 10: Perilipin-positive Foci in chronischer Hepatitis C mit unterschiedlichem Steatosegrad 58

Abb. 11: Verschiedene Bereiche in einer Perilipin 2-gefärbten Leberbiopsie eines Patienten mit chronischer Hepatitis B 60

Abb. 12: Immunhistochemie Perilipin-positiver Foci in Leberbiopsien bei chronischer Hepatitis B..... 61

Abb. 13: Vergleich Perilipin 2-positiver Foci in der Immunhistochemie mit H&E-Färbung bei chronischer Hepatitis B 62

Abb. 14: Immunhistochemie Perilipin-positiver Foci mit Antikörpern gegen Perilipin 2, Perilipin 1, Hepatitis B-Oberflächenantigen, Fettsäure bindendes Protein vom Lebertyp und Glutaminsynthetase bei Leberbiopsien von 2 Patienten mit chronischer Hepatitis B 64

Abb. 15: Repräsentative Immunhistochemie von Perilipinen bei akuter Hepatitis E 65

Abb. 16: Immunhistochemie Perilipin-positiver Foci bei AIH sowie teilweise Overlap-Syndrom mit PSC 66

Abb. 17: Immunhistochemie von Perilipin 1 und Perilipin 2 in einer Normalleber 67

Abb. 18: Perilipin 1 und 2-Immunhistochemie in Normallebern mit Perilipin-positiven Foci 68

Abb. 19: Glykogenotischer Focus in PAS-Färbung und Perilipin-Immunhistochemie in Normallebergewebe 69

Abb. 20: Immunhistochemie mit Antikörpern gegen Perilipin 1, Perilipin 2, Ki-67 und Glutaminsynthetase in Vergleich zu H&E- und PAS-Färbung in einem Leberresektat eines Patienten mit geringer Steatose 71

Abb. 21: Transmissionselektronenmikroskopie eines Perilipin-positiven Focus 72

Abb. 22: Transmissionselektronenmikroskopie des angrenzenden Lebergewebes 73

Supp. Abb. 1: Zonale Bevorzugung von Perilipin 1 in Zone 3 119

Supp. Abb. 2: Immunhistochemie gegen Perilipin 1 und 2 in einer Leberbiopsie bei PSC 120

Supp. Abb. 3: Perilipin-Immunhistochemie im Leberresektat bei Echinococcus granulosus 121

Supp. Abb. 4: Glutaminsynthetasefärbung in Zone 3 121

1 Einleitung und Ziel der Dissertation

Im Jahr 2020 wurde der Nobelpreis für Medizin für die Entdeckung sowie die Charakterisierung des Hepatitis C Viruses (HCV) an Harvey J. Alter, Michael Houghton und Charles M. Rice verliehen (Baumert 2020). Ohne diesen Meilenstein der medizinischen Forschung würden heute keine diagnostischen Tests und keine erfolgreichen Therapien gegen die durch HCV verursachte chronische Hepatitis C zur Verfügung stehen. Im Jahr 2015 waren immer noch 1%, entsprechend 71 Millionen Menschen weltweit mit HCV infiziert (WHO 2017). Eine chronische Hepatitis C kann wie auch eine alkoholische und nicht-alkoholische Fettlebererkrankung eine Steatose verursachen (Longerich et al. 2008). Bleibt eine chronische Hepatitis C unbehandelt, so kann diese zu einer Leberzirrhose führen und damit das Risiko eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) erhöhen (WHO 2017). HCV benötigt für seine Virusreplikation Lipidtropfen, um infektiöse Viruspartikel zu generieren (Miyanari et al. 2007). Die in Hepatozyten gelagerten Lipidtropfen stellen damit einen Grundstein des HCV-Lebenszyklus dar. Um auch kleinste Lipidtropfen histologisch darzustellen eignen sich vor allem immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen die konstitutiv an Lipidtropfen lokalisierten amphiphilen Strukturproteine Perilipin 1 und 2 der Perilipin-Familie, die essentiell für Biogenese, Strukturerhaltung und Lipidtropfenabbau sind (Wolins et al. 2006; Straub et al. 2013; Itabe et al. 2017).

Ziel dieser Arbeit war es, den Steatosegrad und die Perilipin-Expression bei Leberbiopsien von Patienten mit chronischer Hepatitis C mit Hilfe konventioneller Lichtmikroskopie von H&E-Schnitten und immunhistochemischen Färbungen (Perilipin 1 und 2) zu untersuchen und mit Lebergewebe von Patienten mit anderen viralen und nicht-viralen Hepatitiden sowie mit Normallebergewebe zu vergleichen. Die hier vorgelegte Arbeit soll damit helfen das Grundverständnis der Rolle von Lipidtropfen für die Pathogenese viraler Hepatitiden zu verbessern.

2 Literaturdiskussion

2.1 Physiologie und Anatomie der Leber

Die menschliche Leber befindet sich im rechten Oberbauch unterhalb des Zwerchfells und besteht aus vier Lappen: Lobus dexter, Lobus sinister, Lobus quadratus und Lobus caudatus. Sie hat zahlreiche wichtige Funktionen: So dient sie unter anderem der Regulierung des Blutvolumens, ist beteiligt am Energiestoffwechsel, wird zum Abbau von körperfremden Stoffen wie bspw. Medikamenten benötigt und fungiert als Speicherorgan für Glucose in Form von Glykogen. Dabei dient die humane Leber ab der 34. bis 37. Schwangerschaftswoche neben der Glucoseverwertung auch der Glucoseproduktion (Trefts et al. 2017).

Leberläppchen bilden histologisch die funktionelle Einheit der Leber (Abb. 1). Sie bestehen aus Hepatozytenbälkchen, die zu einer Zentralvene führen (Trefts et al. 2017). In den Sinusoiden wird sowohl venöses als auch arterielles Blut gefördert (Trefts et al. 2017). In den Portalfeldern ist jeweils eine Vene, eine Arterie und ein Gallengang nachweisbar (Gordillo et al. 2015). Die Hepatozyten, welche den größten Anteil des Lebervolumens ausmachen (Trefts et al. 2017), haben für den Stoffwechsel die wichtige Funktion Stoffe wie Albumin, Gallensäure und Gerinnungsfaktoren zu synthetisieren (Gordillo et al. 2015). Weitere wichtige Zelltypen, die in der Leber vorkommen sind Cholangiozyten, Endothelzellen, Kupffer-Zellen (Leber-spezifische Makrophagen) und Ito-Zellen (Syn.: „Hepatic Stellate Cells“, hepatische Sternzellen) (Gordillo et al. 2015). Vitamin A kann in Form von Lipidtropfen im Zytoplasma von Ito-Zellen gespeichert werden (Trefts et al. 2017).

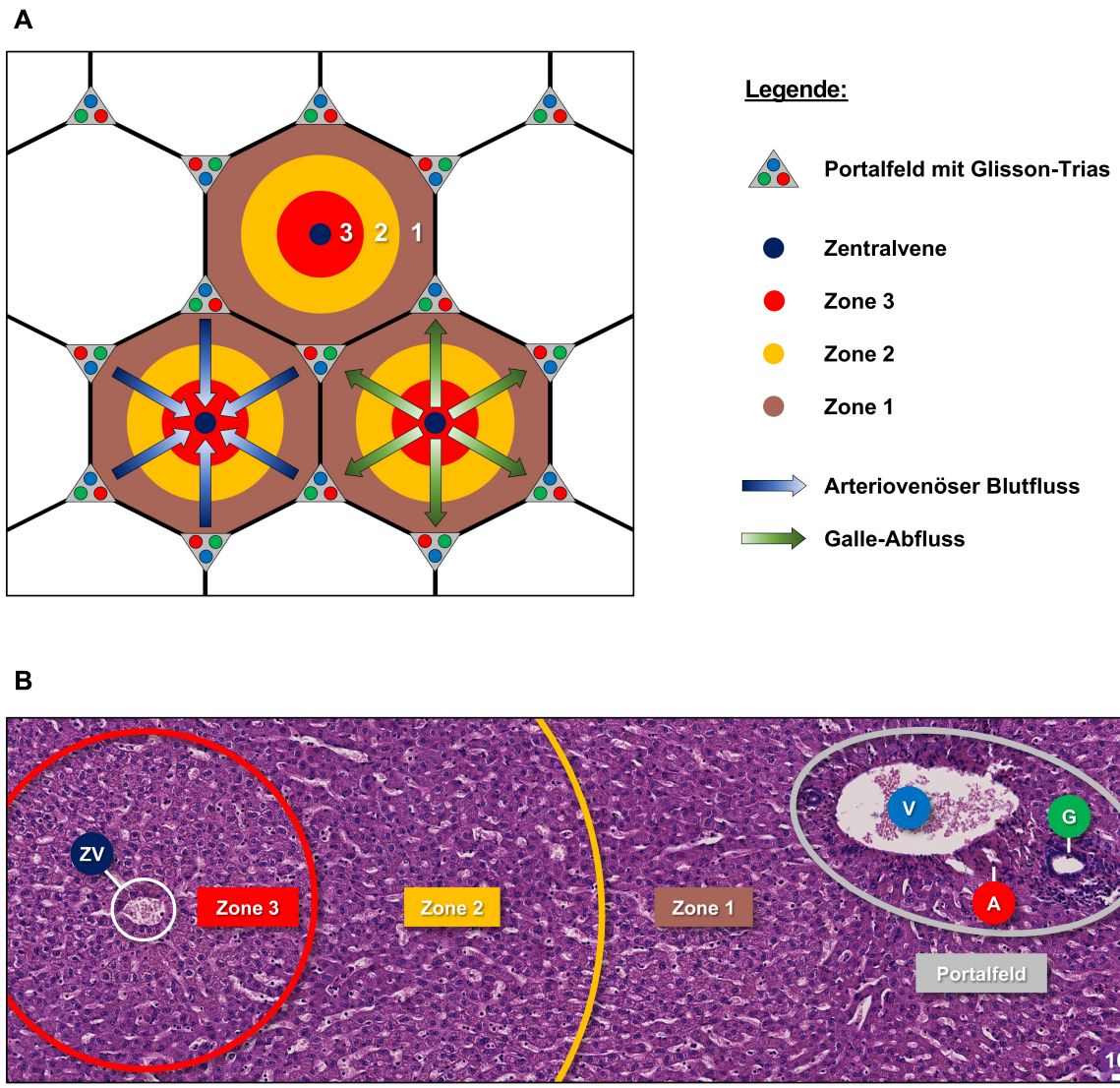


Abb. 1: Gliederung der Leberläppchen. A) Schematische Darstellung und B) zonale Gliederung in der Histologie. V: Vene, G: Gallengang, ZV: Zentralvene. Die Abbildung wurde durch Zuhilfenahme folgender Textquellen erstellt (Rappaport et al. 1954; Böcker et al. 2012).

2.2 Lebererkrankungen

Lebererkrankungen sind weltweit für ca. 2 Millionen Todesfälle pro Jahr verantwortlich: Ca. 1 Million Menschen in Folge einer viralen Hepatitis und eines HCCs und ca. 1 Million aufgrund von Komplikationen durch eine Leberzirrhose (Mokdad et al. 2014; Asrani et al. 2019). Die alkoholische Fettlebererkrankung (AFLD) zählt zu den Hauptursachen einer chronischen Lebererkrankung (Rehm et al. 2009; Asrani et al. 2019). Mit steigender Inzidenz weltweit spielt auch die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) eine immer größere Rolle (Asrani et al. 2019). Wichtigster Risikofaktor ist Übergewicht, dessen Prävalenz in den letzten vier

Jahrzehnten um das sechsfache zugenommen hat (NCD Risk Factor Collaboration 2017; Asrani et al. 2019). Regional unterschiedlich spielen virale Hepatitiden eine Rolle als Ursache, bevorzugt jedoch in Ländern mit niedrigem oder mittlerem Einkommen (WHO 2017; Asrani et al. 2019).

2.2.1 Steatotische Lebererkrankungen

Eine Ansammlung von Triacylglyceriden (TAG) im Zytoplasma von Hepatozyten bezeichnet man als Lebersteatose (bzw. Leberparenchymverfettung) (Burt et al. 2018). Eine Verfettung von bis zu 5 % des Leberparenchyms wird als physiologisch betrachtet und stellt somit noch keinen Krankheitswert dar (Cairns und Peters 1983; Kleiner et al. 2005; Burt et al. 2018). Eine Fettleber ist definiert als eine Leberzellverfettung von mehr als 50 % des Leberparenchyms (Tannapfel et al. 2011).

Durch verschiedene Ursachen wie bspw. virale, metabolische, nutritiv-toxische oder genetische Erkrankungen kann es zu einer hepatischen Steatose kommen (Burt et al. 2018). Histologisch kann man die hepatische Steatose in eine mikro- (kleintropfige) und makrovesikuläre-(großtropfige) Steatose unterteilen, wobei eine makrovesikuläre Steatose durch Verdrängung des Zellkerns gekennzeichnet ist (Longerich et al. 2008). Eine mikrovesikuläre Steatose wird unter anderem durch Aflatoxin (Valdivia et al. 2001), eine Schwangerschaftsfettleber (Sherlock 1983), Medikamente wie Valproinsäure (Zimmerman und Ishak 1982), Salicylate (Starko und Mullick 1983), Tetracycline (Westphal et al. 1994; Deng et al. 2015) und Propofol (Kneiseler et al. 2010) verursacht. Aber auch erbliche Stoffwechselerkrankungen wie ein Mangel an lysosomaler saurer Lipase können eine mikrovesikuläre Steatose induzieren (Synoracki et al. 2018). Mögliche Ursachen einer vorwiegend makrovesikulären Steatose können eine AFLD, NAFLD, Medikamente wie Tamoxifen, HCV, Hepatitis B Virus (HBV), Lipoproteinstoffwechselerkrankungen wie Familiäre Hypobetalipoproteinämie, totale parenterale Ernährung, Morbus Wilson oder eine Leberischämie sein (Bowyer et al. 1985; Amacher und Chalasani 2014; Celli und Zhang 2014; Stättermayer et al. 2015; Burt et al. 2018; Vitaglione et al. 2019).

2.2.1.1 AFLD

Die AFLD wird durch einen chronischen Alkoholkonsum verursacht und führt schon in frühen Stadien zu einer Verfettung der Leber (Edmondson et al. 1967; Roeb et al. 2015; WHO 2018).

Gemäß WHO 2018 wird Alkohol in der europäischen, amerikanischen und Westpazifik-Region von mehr als der Hälfte der dort ansässigen Menschen konsumiert. Dabei lag 2016 die weltweite Prävalenz von schwerem episodischen Trinken, definiert als Aufnahme ≥ 60g reinen Alkohol bei mindestens einer einzigen Gelegenheit mindestens einmal pro Monat bei 18,2 % (WHO 2018). Drei Millionen Menschen starben 2016 an den Folgen übermäßigen Alkoholkonsums, wobei der Effekt an der weltweiten Mortalität durch Alkoholkonsum höher ist als bspw. durch AIDS, Tuberkulose oder arterieller Hypertonie (WHO 2018). Im Jahr 2016 führten durch Alkohol verursachte Erkrankungen des Verdauungstrakts, wie z.B. eine Leberzirrhose, bei 637.000 Menschen zum Tod (WHO 2018).

Man geht davon aus, dass eine Kopathogenese von Alkohol bei chronischen Lebererkrankungen, wie bspw. einer chronischen Hepatitis C oder chronischen Hepatitis B, die Mortalität erhöhen kann (Mokdad et al. 2014; Rehm et al. 2017; WHO 2018).

Die Leberbiopsie spielt bei der Diagnosestellung eine wichtige Rolle: Sie dient unter anderem der Differenzierung von Fettlebererkrankungen (Tannapfel et al. 2012), sowie der Prognoseeinschätzung. Patienten mit einer AFLD weisen höhere Fettsäure- und TAG-Spiegel auf als Menschen mit Übergewicht (Mavrelis et al. 1983).

Übermäßiger Alkoholkonsum führt in der Leber zu einer makrovesikulären Steatose (Celli und Zhang 2014). Eine AFLD kann zu einer alkoholischen Steatohepatitis (ASH) fortschreiten; diese ist aufgrund der entzündlichen Prozesse durch ballonierte Hepatozyten, Apoptosen, entzündliches Infiltrat und Mallory-Denk-Körperchen gekennzeichnet (MacSween und Burt 1986; Tannapfel et al. 2011; Celli und Zhang 2014). Die von Frank Burr Mallory 1911 beschriebenen Mallory-Denk-Körperchen sind intrazelluläre Ablagerungen fehlgefalteter Proteine, die sich als Zytoplasma-Einschlüsse in Hepatozyten zeigen (Strnad et al. 2008; Caldwell et al. 2010; Basaranoglu et al. 2011). Eine ASH induziert typischerweise eine perisinusoidale Fibrose (MacSween und Burt 1986; Celli und Zhang 2014).

Eine ASH kann über eine Leberfibrose zu einer Leberzirrhose führen (Tannapfel et al. 2011). Ein wichtiger prognostischer Faktor bei einer ASH ist die intraparenchymale Cholestase, welche signifikant negativ mit dem Überleben korreliert (Nissenbaum et al. 1990; Spahr et al. 2011).

Alkoholkonsum führt mutmaßlich über Stress am Endoplasmatischen Retikulum (ER) zu einer Fettakkumulation in der Leber (Ji et al. 2006). Es wird vermutet, dass die Energieaufnahme durch den kalorienreichen Gehalt alkoholischer Getränke den Energieverbrauch übersteigt und somit eine Steatose begünstigt wird (Syn et al. 2009). Vor allem der Transkriptionsfaktor SREBP-1c, der Gene des TAG- und Fettsäuremetabolismus reguliert, scheint einen wichtigen Einfluss auf die Entwicklung einer AFLD zu haben, da SREBP-1c-Knockout-Mäuse signifikant vor einer TAG-Akkumulation, jedoch nicht vor einer Cholesterinakkumulation oder Apoptose geschützt sind (Ji et al. 2006). Durch Inhibition von Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1), einer Isoform der PARP-Enzymfamilie, wird die alkoholinduzierte SREBP-1-Hochregulation gedämpft (Mukhopadhyay et al. 2017). Dabei spielt PARP-1 eine wichtige Rolle bei der Reparatur von DNA-Schäden (Durkacz et al. 1980). Die hepatische PARP-Aktivität ist bei einer ASH erhöht (Mukhopadhyay et al. 2017).

2.2.1.2 NAFLD

Gemäß der American Gastroenterological Association, der American Association for the Study of Liver Diseases und dem American College of Gastroenterology ist eine NAFLD eine Verfettung der Leber, die durch ein histologisches oder bildgebendes Verfahren gesichert wurde und nicht durch eine andere Ursache wie einen signifikanten Alkoholkonsum oder einen Morbus Wilson erklärbar ist (Chalasani et al. 2012). Dabei wird histologisch ab einem Grenzwert von 5 % Steatose von einer NAFLD gesprochen (Kleiner et al. 2005; Straub und Schirmacher 2010). Ein noch „risikoarmer Konsum“ von Alkohol wird als täglich konsumierte Alkoholmenge von unter 24 g pro Tag bei gesunden Männer bzw. unter 12 g pro Tag bei gesunden Frauen definiert (Herold 2018). Eine nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) ist als Leberschaden mit Nekroinflammation aufgrund einer Steatose definiert (Straub und Schirmacher 2010).

In den westlichen Industrieländern nimmt die NAFLD in den letzten Jahren stetig zu; dabei ergaben sich bei der „Dionysos Nutrition and Liver Study“ Prävalenzen von 25 %

bzw. 20 % bei Patienten mit und ohne Verdacht auf eine Lebererkrankung (Bedogni et al. 2005). Übergewicht und Diabetes mellitus Typ 2 sind wichtige Risikofaktoren für die Entstehung von Steatose und Steatohepatitis; Risikofaktoren der Steatohepatitis verhalten sich hierbei additiv zueinander und die Steatohepatitis korreliert mit dem Schweregrad der Steatose (Wanless und Lentz 1990). Hyperinsulinämie, Insulinresistenz und erhöhte TAG-Werte sind mit einer NAFLD assoziiert (Marchesini et al. 1999). Zudem steht das Risiko für das Auftreten einer NAFLD und NASH in Zusammenhang mit dem metabolischen Syndrom (Marchesini et al. 2003). Beim metabolischen Syndrom werden unter anderem folgende diagnostischen Kriterien berücksichtigt: Glucoseintoleranz, Insulinresistenz, beeinträchtigte Glucoseregulation, arterielle Hypertonie, erhöhte TAG-Werte und/oder erniedrigte HDL-Cholesterol-Werte, abdominelle Fettleibigkeit und Mikroalbuminurie (Alberti und Zimmet 1998).

Zum Screening einer NAFLD können bildgebende Verfahren wie Ultraschalldiagnostik und Fibroscan herangezogen werden (Papatheodoridi und Cholongitas 2018). Die Diagnose einer NASH erfordert eine Leberbiopsie (Papatheodoridi und Cholongitas 2018). Diagnostische Kriterien einer NASH in Analogie zur ASH sind neben einer Steatose zusätzliche entzündliche Infiltrate und ballonierte Hepatozyten (Chalasani et al. 2012). Auf dem Boden der Entzündung entwickelt sich eine Fibrose (Chalasani et al. 2012), die portal, perivenulär und perisinusoidal ausgebildet sein kann (Straub und Schirmacher 2010). Besonders typisch ist die perisinusoidale Fibrose, die früher auch als Maschendrahtfibrose („chicken wire fibrosis“) bezeichnet wurde (Straub und Schirmacher 2010). Ein systematisches Review, in welchem Daten aus PubMed-Artikeln von 1992 bis 2011 zusammengetragen wurden, zeigte, dass Kohorten von Patienten mit NASH und einer Leberzirrhose ein höheres Risiko für ein HCC aufwiesen als Kohorten von Patienten mit einer NAFLD oder NASH (White et al. 2012). Patienten, die eine NAFLD mit Nekrosen aufweisen, haben zudem ein schlechteres Outcome als jene ohne Nekrosen (Matteoni et al. 1999).

Tierversuche haben gezeigt, dass Mäuse, die eine Hochfett- und Hochcholesteroldiät erhielten, eine NASH entwickelten; Mäuse, die nur eine Hochfettdiät bekamen, entwickelten im Gegensatz dazu lediglich eine Steatose. Die gleiche Studie zeigte, dass die Inzidenz für ein HCC (induziert durch Diethylnitrosamin/ DEN) bei Mäusen mit zusätzlicher Hochcholesteroldiät höher war als bei jenen, die nur eine Hochfettdiät bekamen (Liang et al. 2018). Bei einem Mausmodell mit Diät-induzierter Fettleibigkeit zeigte sich durch Gabe von PARP-Inhibitoren eine Abnahme von Steatose,

Entzündung und Fibrose (Mukhopadhyay et al. 2017). Normalerweise werden PARP-Inhibitoren in der Krebstherapie eingesetzt, da diese Replikationsgabeln durch DNA-Einschluss destabilisieren können und den Zelltod einleiten (Slade 2020). Interessanterweise scheinen Marker für oxidativen Stress geeignet zu sein, um Diabetes mellitus Typ 2-Patienten mit einem erhöhten Risiko für eine Fettlebererkrankung zu erkennen (Klisic et al. 2018).

Bei der Behandlung von NAFLD-Patienten beschränkt man sich nicht nur allein auf die Lebererkrankung, sondern geht therapeutisch auch auf die zugrunde liegenden metabolischen Komorbiditäten wie Übergewicht, Hyperlipidämie, Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 ein; dabei haben Patienten ohne Steatohepatitis eine vergleichsweise gute Prognose (Chalasani et al. 2012).

2.2.2 Virale Hepatitiden

Weltweit waren virale Hepatitiden im Jahr 1990 auf Platz 10 der Hauptursachen für Mortalität und 2013 bereits auf Platz 7 zu finden (Stanaway et al. 2016; Asrani et al. 2019). Virale Hepatitiden, vor allem ausgelöst durch HBV und HCV, sind unabhängige Risikofaktoren für die Entwicklung eines HCCs oder eines Cholangiokarzinoms (Asrani et al. 2019). Auch nicht-hepatotrope Viren, wie das Epstein-Barr- und das Zytomegalie-Virus, können eine allerdings akute Hepatitis hervorrufen (Clarke et al. 1979; Purtilo und Sakamoto 1981).

2.2.2.1 Hepatitis A

Das Hepatitis A Virus (HAV) ist ein RNA-Virus und wurde erstmals 1973 entdeckt (Feinstone et al. 1973; Lin et al. 2017). Es existieren 7 verschiedene Genotypen (1 bis 7) (Robertson et al. 1992). Dabei sind die Genotypen zu weniger als 85 % in ihrer Genom-Sequenz gleich (Lin et al. 2017). Häufige Genotypen, die bei Patienten mit Hepatitis A gefunden werden, sind vor allem die Genotypen 1 und 3 (Lin et al. 2017). Eine akute Hepatitis A ist gekennzeichnet durch eine hepatozelluläre Schädigung und erhöhte Serumtransaminase-Werte (Burt et al. 2018). 2015 starben weltweit schätzungsweise 11.000 Menschen an einer akuten Hepatitis A, was 0,8 % der Todesfälle aufgrund einer viralen Hepatitis ausmacht (WHO 2017).

Der Rezeptor HAVcr-1 scheint eine wichtige Rolle bei der Virusanheftung an Zellen und deren Infektion zu spielen (Kaplan et al. 1996). Die virale Translation der RNA des Virus generiert ein Polyprotein, welches mittels viral-kodierter Protease in die RNA-abhängige RNA-Polymerase und in 8 weitere virale Proteine gespalten wird (Lin et al. 2017). Nach der Virusreplikation in der Leber gelangt das Virus in die Galleflüssigkeit, die anschließend in den Verdauungstrakt gelangt und mit dem Kot ausgeschieden wird (Vaughan et al. 2014).

Wichtige Transmissionswege des Virus sind fäkal-oral sowohl durch den Verzehr von kontaminierter Nahrung oder Wasser als auch die Exposition gegenüber infizierten Personen (WHO 2017). Die ersten Symptome manifestieren sich ca. 2 bis 6 Wochen nach Exposition (Linder und Malani 2017). Zur Diagnose einer akuten Hepatitis A wird Anti-HAV-IgM im Blut bestimmt, was bei symptomatischen Patienten ca. 5 bis 10 Tage vor Auftreten der Symptome detektierbar ist (Desai und Kim 2020). Typische Symptome der akuten Hepatitis A sind unter anderem Unwohlsein, Erbrechen, Fieber, Schmerzen im rechten oberen Quadranten und Müdigkeit (Tong et al. 1995; Lin et al. 2017). Sowohl das Alter des Patienten als auch Komorbiditäten, wie bspw. eine chronische virale Hepatitis, können einen Einfluss auf die Schwere der Symptome haben (Lin et al. 2017).

Zwei histologische Merkmale treten bei einer akuten Hepatitis A gehäuft auf: eine Interface-Hepatitis mit periportaler Entzündung, Einzelzelluntergängen (auch als „Councilman-Bodies“ bezeichnet (Klion und Schaffner 1966)) und eine perivenuläre Cholestase, welche auch als cholestatische Hepatitis bezeichnet wird (Abe et al. 1982; Burt et al. 2018).

Gegen die akute Hepatitis A gibt es keine spezifischen Therapiemöglichkeiten, sondern nur supportive Maßnahmen wie Rehydrierung, sowie die Gabe von Antiemetika und Antipyretika (Jeong und Lee 2010). Zur Prävention steht jedoch eine Hepatitis A-Impfung zur Verfügung (Linder und Malani 2017).

2.2.2.2 Hepatitis B

HBV ist ein 42 nm großes, ikosaedrisches DNA-Virus und wird nach seinem Entdecker auch als „Dane-Partikel“ bezeichnet (Dane et al. 1970). Zuerst wurde das Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsAg) als „Australian Antigen“ beschrieben (Blumberg et al. 1965). Weitere Virusbestandteile, die auch für den Nachweis von HBV wichtig sind, sind unter anderem die HBV-DNA, das „Core-Antigen“ (HBcAg) und das „Envelope-Antigen“ (HBeAg) (Liang 2009). Es gibt insgesamt 10 Genotypen, welche mit Großbuchstaben (A bis J) kenntlich gemacht werden (Lin und Kao 2017). In Deutschland und den Vereinigten Staaten prädominiert vor allem Genotyp G (Sunbul 2014). Genotyp J wurde bei einem 88-jährigen Japaner entdeckt (Tatematsu et al. 2009; Castelhano et al. 2017) und hat genetische Ähnlichkeiten mit den HBV-Genotypen von Gibbons und Orang-Utans sowie dem Genotyp C des humanen HBVs (Tatematsu et al. 2009). HBV-Genotypen zeigen eine sehr heterogene Rekombinationsrate: Bei Genotyp E ist sie am höchsten, Genotyp B und C wiesen ebenfalls sehr hohe Rekombinationsraten auf, bei Genotyp D ist sie nur als intermediär einzustufen und Genotypen A, F, G, H und I weisen lediglich eine sehr geringe Rekombinationsrate auf (Castelhano et al. 2017). Ein wichtiger Faktor bei der HBV-Replikation scheint der Lipidmetabolismus zu sein, da durch Fettsäuresynthase-Inhibitoren ein Rückgang der extrazellulären HBV-DNA und des HBsAg‘s erreicht werden konnte (Okamura et al. 2016).

Eine durch HBV verursachte Infektion kann chronifizieren, wenn der HBsAg-Status länger als 6 Monate positiv bleibt (Cornberg et al. 2011). 2015 lebten 257 Millionen Menschen mit einer chronischen Hepatitis B, was ca. 3,5 % der Weltbevölkerung entspricht (WHO 2017). Bleibt eine Hepatitis B unbehandelt, kann dies wie bei anderen chronischen Lebererkrankungen zu einer Leberzirrhose und der Entwicklung eines HCCs führen (Mani und Kleiner 2009; WHO 2017). Im Jahr 2015 waren 2,7 Millionen Menschen mit HBV und HIV (Humanes Immundefizienz Virus)-koinfiziert (WHO 2017). HBV wird hauptsächlich über ungeschützten Geschlechtsverkehr oder durch Kontakt mit kontaminierten Körperflüssigkeiten wie Blut, Sperma oder Vaginalsekret (z.B. transversal von Mutter auf das Kind während der Geburt) übertragen (Robert Koch-Institut (RKI) 2020). Die Diagnosestellung einer Hepatitis B basiert auf klinischen, biochemischen, histologischen und serologischen Untersuchungen, wobei aktuell vor allem Letztere essenziell ist, um die Diagnose stellen zu können (Liang 2009). Eine Serokonversion von HBeAg-Positivität zum Nachweis von Antikörper gegen HBeAg

(Anti-HBe) signalisiert typischerweise eine Abnahme der Krankheitsaktivität durch das Sistieren der HBV-Replikation mit Normalisierung der Aminotransferase-Werte (Fattovich et al. 1986). Eine Serokonversion einer HBsAg-Positivität zu Antikörpern gegen HBsAg (Anti-HBs) wird als „Heilung“ der chronischen Hepatitis B angesehen (Burns und Thompson 2014). Eine geringe Viruslast kann eine HBsAg-Seroclearance positiv beeinflussen (Liu et al. 2010). Interessanterweise erwies sich auch extremes Übergewicht bei Männern als signifikanter Prädiktor für eine HBsAg-Seroclearance (Liu et al. 2010).

Charakteristisch für eine chronische Hepatitis B ist das Vorkommen von Milchglashepatozyten, welche durch Proliferation des ERs, welches reich an HBsAg ist, ein feinkörniges Zytoplasma zeigen (Burt et al. 2018). Das HBsAg kann durch Orcein-Histochemie und Immunhistochemie dargestellt werden (Nayak und Sachdeva 1975).

Bei der Therapie einer chronischen Hepatitis B werden PEGyliertes Interferon-alpha (INFα) und Nukleos(t)-id-Analoga eingesetzt (Cornberg et al. 2011). Um einer HBV-Infektion wirksam vorzubeugen, wird gemäß der Ständigen Impfkommission (STIKO) aktuell eine dreimalige Grundimmunisierung im Alter von 2, 4 und 11 Monaten empfohlen (Robert Koch-Institut (RKI) 2019). Eine perinatale Transmission von HBsAg-positiven Müttern auf ihr Kind konnte durch die Gabe von Hepatitis B Immunglobulinen postnatal in Kombination mit aktiver Immunisierung verhindert werden (Beasley et al. 1983).

HBV-Genotypen spielen bei der Prognose der Erkrankung eine wichtige Rolle: HBV-Genotyp C ist signifikant häufiger in Patienten mit Leberzirrhose vorhanden als in altersgematchten asymptomatischen HBV-Trägern (Kao et al. 2000). Interessanterweise war Genotyp B bei Patienten häufiger, die ein HCC vor dem 50. Lebensjahr entwickelten, wobei sich eine HCC-Entwicklung bei Patienten mit Genotyp C meist erst nach dem 50. Lebensjahr zeigte (Kao et al. 2000). Ein weiterer wichtiger prognostischer Faktor bei chronischer Hepatitis B ist die Koinfektion mit anderen Viren, so ist eine HIV-Koinfektion prognostisch ungünstiger (Housset et al. 1992).

2.2.2.3 Hepatitis C

Laut Leitlinie ist eine chronische Hepatitis C eine länger als 6 Monate bestehende HCV-Infektion mit positivem HCV-RNA-Status; dabei kann es klinisch, laborchemisch und/oder histologisch zu einem nachweisbaren hepatozellulären Schaden und extrahepatischen Manifestationen kommen, was als chronische Hepatitis C bezeichnet wird (Sarrazin et al. 2018). Es existieren 7 HCV-Genotypen und 67 Subtypen, dabei unterscheiden sich die Subtypen in weniger als 15% (Smith et al. 2014). Auch Rekombinationen der Genotypen wurden bereits festgestellt (Hedskog et al. 2015). Der HCV-Eintritt in die Hepatozyten geschieht über das Tight Junction Protein Occludin (Ploss et al. 2009). Ebenso dient SR-BI als Eintrittsfaktor für HCV (Dao Thi et al. 2012). Syndecan-1 wird als Rezeptor für die HCV-Anheftung benötigt (Shi et al. 2013). Auch Heparansulfatproteoglykane auf der Oberfläche der Hepatozyten können als Anheftungsstelle für das Virus dienen (Jiang et al. 2013). Die Heparansulfatproteoglykane können dabei mit dem HCV-Envelopeprotein E2 interagieren (Barth et al. 2003). Das Hüllprotein E1 soll bei der Membranfusion beteiligt sein (Lavillette et al. 2007). Dabei zeigten sich die virionassoziierten E1- und E2-Proteine als große kovalente Komplexe, welche durch Disulfidbrücken stabilisiert werden (Vieyres et al. 2010). Das ApoE-Protein dient dabei als Mediator für die HCV-Anheftung an Heparansulfatproteoglykane (Jiang et al. 2013). Zudem ist eine Clathrin-vermittelte Endozytose des Virus beschrieben (Blanchard et al. 2006).

2015 waren 71 Millionen Menschen weltweit mit HCV infiziert (WHO 2017). Genotyp 1 stellt global betrachtet den häufigsten Genotyp dar, gefolgt von HCV-Genotyp 3; Genotypen 2, 4 und 6 stellen den größten Anteil aller HCV-Genotypen für die verbliebenen HCV-Fälle dar (Messina et al. 2015). Die Übertragung erfolgt bei ungeschütztem Geschlechtsverkehr und über die Exposition mit infektiösem Blut (Sarrazin et al. 2018). Intravenöser Drogenkonsum („Needle-Sharing“) ist ein wichtiger Risikofaktor für den Erwerb einer HCV-Infektion (Alter 2002; Zhou et al. 2019).

Zur Diagnosestellung wird die Bestimmung der HCV-Antikörpern mittels Immunoassay herangezogen; bei positivem Befund im Immunoassay wird dieser mittels HCV-RNA Nachweis bestätigt (Sarrazin et al. 2018). Patienten mit einer chronischen Hepatitis C geben vor allem physische und mentale Müdigkeit, Reizbarkeit, Depressionen, Abdominalschmerzen, Schlafprobleme, Gelenkschmerzen, Konzentrationsschwäche und allgemeine Körperschmerzen als Symptome an (Lang et al. 2006).

Histologisch sind bei Patienten mit chronischer Hepatitis C sowohl portale und lobuläre Entzündungsinfiltrate als auch periportale und fokale Einzelzellnekrosen erkennbar (Petrescu et al. 2015). HCV-typisch sind dabei vor allem Lymphfollikel in den Portalfeldern (Bach et al. 1992). Eine chronische Hepatitis C führt unbehandelt zur Fibrosierung (Sebastiani et al. 2014). Das Ausmaß der Fibrose steht in Korrelation zum Hepatitis-Aktivitätsindex (Petrescu et al. 2015). Sogenannte Mottenfraßnekrosen bei Patienten mit chronischer Hepatitis C zeigten mehr CD4-positive als CD8-positive T-Lymphozyten, jedoch waren mehr CD8-positive Lymphozyten in den Leberläppchen vorhanden (Mosnier et al. 1993). Ein histologischer Aktivitätsalgorithmus wurde durch folgende zwei histologische Gegebenheiten bestimmt: Mottenfraßnekrosen und Einzelzellnekrosen im Leberparenchym (Bedossa und Poynard 1996). Der Grad der entzündlichen Aktivität einer chronischen Hepatitis wird nach Desmet in Grad 1 bis 4 (Grading) eingeteilt und das Ausmaß der Fibrose in 5 Stadien (Staging) untergliedert (Desmet et al. 1994; Longerich et al. 2008).

Eine Kombination von Interferon und Ribavirin zur Behandlung einer chronischen Hepatitis C zeigte sich effektiver als eine alleinige Interferongabe, jedoch entwickelten Patienten unter dieser Therapie Nebenwirkungen wie Hb-Abfall, Dyspnoe, Pharyngitis und Pruritus (McHutchison et al. 1998). Heute gehören neue direkte antivirale Agenzien (DAA) zum Therapieschema (Sarrazin et al. 2018). HCV-Reinfektionen treten epidemiologisch gehäuft bei Patienten mit niedrigem Sozialstatus und anhaltendem intravenösen Drogenkonsum auf (Grebely et al. 2012). Auch HCV-Superinfektionen sind bei Patienten mit chronischer Hepatitis C möglich (Kao et al. 1996). Bei Reinfektion oder Superinfektion mit HCV wurden Erhöhungen der ALT-Werte bei 75 % der untersuchten Patienten gefunden (Grebely et al. 2012).

Insulinresistenz ist unabhängig von metabolischen Faktoren mit einer Hepatitis C assoziiert und ein unabhängiger Prädiktor für eine Leberfibrose bei Patienten mit chronischer Hepatitis C (Moucari et al. 2008). Eine Insulinresistenz wurde häufiger bei Patienten mit chronischer Hepatitis C als bei Patienten mit chronischer Hepatitis B festgestellt (Moucari et al. 2008).

2.2.2.4 Hepatitis D

Das Hepatitis D Virus (HDV) ist ein inkomplettes RNA-Virus und benötigt HBV zur Replikation (WHO 2017; Robert Koch-Institut (RKI) 2020). HDV kann somit nur Menschen infizieren, die bereits HBV-infiziert sind (WHO 2017). Insgesamt gibt es 8 verschiedene Genotypen von HDV (Chen et al. 2019; Da et al. 2019). Hepatitis D kann sowohl akut als auch chronisch (länger als 6 Monate bestehende Infektion) verlaufen (Da et al. 2019). Schätzungsweise 5 % der Menschen, die mit HBV infiziert sind, haben eine Koinfektion mit HDV (Farci 2003; WHO 2017).

Die Übertragung von HDV verläuft meistens durch Exposition mit infektiösem Blut (WHO 2017). Die HDV-Testung wird mit der Bestimmung von Antikörpern gegen HDV (Anti-HDV) und Bestätigung mittels positiver HDV-RNA-PCR am Patientenserum durchgeführt (Da et al. 2019).

Die akute Hepatitis D ähnelt histologisch anderen akuten Hepatitis-Infektionen; bei der chronischen Hepatitis D ist histologisch eine erhöhte Entzündungsaktivität in Form von Interface- und lobulärer Hepatitis zu erkennen und man kann zudem konfluierende Einzelzellnekrosen bei schweren Ausprägungen feststellen (Burt et al. 2018). Interessanterweise kann man in HDV-infizierten Hepatozyten teilweise sogenannte „sanded nuclei“ erkennen, welche durch Hepatitis D-Antigen (HDAg)-Akkumulation im Zellkern verursacht werden und somit als intranukleäre Einschlüsse lichtmikroskopisch erkennbar sind (Moreno et al. 1989; Burt et al. 2018).

Die Behandlung von HBV/HDV-koinfizierten Patienten unterscheidet sich von der Behandlung bei Patienten, die ausschließlich HBV-positiv sind (WHO 2017). Neuere Antinukleos(t)ide, die sehr effektiv bei Patienten mit Hepatitis B eingesetzt werden, zeigen keine gute Wirksamkeit bei Patienten mit HBV-HDV-Koinfektion (WHO 2017). Zudem ist bei Superinfektion von HBV-erkrankten Patienten mit HDV deren Outcome verschlechtert (WHO 2017). Durch Impfung gegen HBV kann einer HDV-Infektion vorgebeugt werden (WHO 2017).

2.2.2.5 Hepatitis E

Das Hepatitis E Virus (HEV) ist ein RNA-Virus, welches eine meist selbstlimitierend verlaufende akute Hepatitis verursacht (Lhomme et al. 2020).

HEV ist weltweit die Hauptursache einer akuten viralen Hepatitis (Lhomme et al. 2020). Jedes Jahr gibt es schätzungsweise 20 Millionen HEV-Infektionen (Rein et al. 2012; WHO 2017). Infektionen mit den HEV-Genotypen 1 und 2 sind vor allem in den Entwicklungsländern zu verzeichnen (Lhomme et al. 2020).

Die Übertragung verläuft fäkal-oral, vor allem über kontaminiertes Trinkwasser (WHO 2017). Zur Diagnosestellung wird das Patientenserum auf Antikörper gegen HEV (Anti-HEV) getestet (Marrone et al. 2019).

Histologisch unterscheidet man bei akuter Hepatitis E eine klassische Form von einer cholestatischen Form (Krawczynski 1993; Peron et al. 2007). Die klassische Form zeigt in der Leberbiopsie fokal oder konfluierend hepatozelluläre Einzelzellnekrosen mit azidophilen Körperchen, geschwollenen Hepatozyten, sowie parenchymatöse und portale Entzündungsinfiltrate (Peron et al. 2007). Die cholestatische Form ist gekennzeichnet durch eine kanalikuläre Cholestase (Krawczynski 1993). Die meisten HEV-Infektionen verlaufen asymptomatisch, können aber vor allem bei Patienten mit einer vorbestehenden Lebererkrankung oder bei Schwangeren auch schwere Verlaufsformen annehmen (Lhomme et al. 2020). Zudem besteht die Gefahr, dass bei lebertransplantierten Patienten mit erhöhten Leberenzymwerten eine akute Hepatitis E fälschlicherweise als akute Abstoßungsreaktion gewertet wird (Darstein et al. 2020). Behandelt wird die akute Hepatitis E lediglich symptomatisch (Khuroo et al. 2016).

2.2.3 Nicht-virale Hepatitiden

Nicht nur Viren können eine Hepatitis verursachen, sondern auch Bakterien wie bspw. *Rickettsia rickettsia*, welches das Rocky-Mountain-Fleckfieber verursacht (Jackson et al. 1986; Burt et al. 2018). Eine disseminierte Listeriose zeigt sich klinisch wie eine akute virale Hepatitis (Yu et al. 1982). Die zoonotische Erkrankung Toxoplasmose führt in seltenen Fällen ebenfalls zur Hepatitis (Mohanty et al. 2012). Verschiedene Medikamente können ebenso einen hepatozellulären Schaden verursachen (Burt et al. 2018). Eine besondere nicht-virale Hepatitis stellt die autoimmune Hepatitis (AIH) dar (Strassburg et al. 2017).

2.2.3.1 AIH

Eine AIH ist eine autoimmune chronisch-entzündliche Lebererkrankung, die bei Patienten mit einer Hepatitis als Differentialdiagnose in Betracht gezogen werden muss (Strassburg et al. 2017). Sie kann mit weiteren Autoimmunerkrankungen vergesellschaftet sein, wie z.B. einer Hypothyreose, einer rheumatoiden Arthritis oder einer Colitis ulcerosa (Muratori et al. 2009).

Eine schwedische Studie zeigte eine jährliche Inzidenz von 0,85 / 100.000 und eine Punktprävalenz von 10,7 / 100.000 für eine AIH in ihrer untersuchten Kohorte (Werner et al. 2008). Dabei konnten auch Overlap-Syndrome mit einer primär Biliären Cholangitis (PBC) in 10 % der Fällen und mit einer primär Sklerosierenden Cholangitis (PSC) in 2 % der Fällen entdeckt werden (Werner et al. 2008). Eine andere Studie stellte bei 82 untersuchten AIH-Patienten Overlap-Syndrome in 13 % der Fälle mit einer PBC und in 7% der Fälle mit einer PSC fest (Gheorghe et al. 2004). Vor allem bei Frauen in der zweiten Lebensdekade mit einem mittleren Alter von 36 Jahren, sowie einem weiteren Peak in der fünften Lebensdekade, ist eine AIH weit verbreitet (Muratori et al. 2009).

Als zugrundeliegende Ursache für eine AIH wird ein Verlust der Toleranz gegen das eigene Lebergewebe betrachtet. Medikamente und infektiöse / virale Ursachen können diesen autoimmunen Prozess bei genetisch prädisponierten Personen triggern. (Burt et al. 2018)

Die Diagnose einer AIH muss auf klinischer, laborchemischer und histologischer Ebene gesichert werden (Strassburg et al. 2017). Klinisch kann sich die AIH als akute Hepatitis mit Ikterus und erhöhten Serumtransaminase-Werten, jedoch auch symptomlos mit verändertem Leberfunktionstest äußern (Muratori et al. 2009). Bei der AIH-Diagnostik sind ANA-Antikörper moderat sensitiv und spezifisch, SMA-Antikörper moderat sensitiv aber höchst spezifisch und Anti-SLA/LP zeigen eine niedrige Sensitivität und hohe Spezifität (Zhang et al. 2014). 1993 erstellte die Internationale Autoimmunhepatitis-Gruppe ein Scoring-System zur Diagnose der AIH, das sowohl histologische als auch klinische Parameter beinhaltete und zwischen „definitiver“ und „wahrscheinlicher“ AIH unterschied (Johnson und McFarlane 1993). Folgende Punkte werden bei diesem Score positiv angerechnet und ergeben ab einem Punktwert von ≥ 10 Punkten mindestens die Diagnose einer „wahrscheinlichen AIH“: weibliches Geschlecht, erniedrigte AP/AST-Ratio, γ-Globulin- oder IgG-Erhöhung,

Autoantikörper, negative virale Hepatitismarker, negative Medikamentenanamnese, kein oder geringer Alkoholkonsum, HLA-Status (HLA-DR3 oder -DR4), andere Autoimmunerkrankungen, Leberhistologie (Interface-Hepatitis, lymphoplasmazelluläre Infiltrate, Rosetten) und positiver Therapieerfolg (Strassburg et al. 2017).

Als akute Erstmanifestation einer AIH erkennt man histologisch oft perivenuläre Nekrosen und eine lobuläre Entzündung, wobei vor allem die Interface-Hepatitis als wichtiges Kernkriterium zu nennen ist (Strassburg et al. 2017). Lymphoplasmazelluläre Infiltrate findet man in den Portalfeldern, welche die Grenzlamelle überschreiten und auf das Leberparenchym übergreifen vor allem mit IgG-positive Plasmazellen (Abe et al. 2014; Strassburg et al. 2017). Zudem kann man Einzelzellnekrosen erkennen (Strassburg et al. 2017). Brückennekrosen, konfluierende Nekrosen und eine Leberzirrhose sind bei Patienten mit einer AIH häufiger als bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis C (Bach et al. 1992). 20 bis 37 % der Patienten mit einer AIH weisen bei Erstdiagnose eine Leberzirrhose auf (Strassburg et al. 2017).

Standardtherapie der AIH ist eine immunsuppressive Therapie mit Prednisolon in Kombination mit Azathioprin (Strassburg et al. 2017). Da bei schwerer und fulminanter AIH in den meisten Fällen eine Glucocorticosteroidtherapie ineffektiv ist, sollte die Möglichkeit einer Lebertransplantation evaluiert werden (Ichai et al. 2007). Unabhängige Prädiktoren für Leber-assoziierten Tod oder Voraussetzungen für eine Lebertransplantation sind eine unvollständige Normalisierung der ALT-Werte innerhalb von 6 Monaten nach Diagnose, niedriges Serumalbumin zum Zeitpunkt der Diagnose und ein Alter unter 20 Jahren oder über 60 Jahren zum Zeitpunkt der Präsentation (Ngu et al. 2013). Bei HLA-Typisierung wiesen Patienten mit AIH häufig HLA B8, DR3, AI-B8-DR3 und DR4 auf (Nikias et al. 1994). Dabei zeigte eine Positivität für HLA DRB1*0401 sich als unabhängige Variable für eine vollständige und anhaltende Remission der AIH unter niedrig dosierter Steroidtherapie (Muratori et al. 2009).

2.2.4 Leberzirrhose

Eine Leberzirrhose ist das Endstadium einer chronischen Lebererkrankung mit knotig-fibrotischem Parenchymumbau sowie Aufhebung der physiologischen Gefäßarchitektur (Anand 1999; Schuppan und Afdhal 2008). Dabei wird eine

Leberfibrose als das Vorhandensein von Kollagen aufgrund der Bildung neuer Fasern definiert (Anthony et al. 1977).

Eine Leberzirrhose ist weltweit die 14. häufigste Todesursache im Erwachsenenalter (Lozano et al. 2012; Tsochatzis et al. 2014). In Europa ist sie jedes Jahr die Hauptindikation für 5.500 Lebertransplantationen (Blachier et al. 2013; Tsochatzis et al. 2014). Dabei können bspw. eine Hepatitis B und C, Alkoholismus, eine Hämochromatose oder ein α-1-Antitrypsin-Mangel zu einer Leberzirrhose führen (Anthony et al. 1977). Eine Erhöhung der ALT kann unter anderem als Indikator für einen Leberzellschaden herangezogen werden (Tang et al. 2017). Eine dekompensierte Leberzirrhose äußert sich durch klinische Komplikationen wie portale Hypertonie mit Aszites, Varizenblutung und / oder hepatischer Enzephalopathie oder eine Leberinsuffizienz mit Ikterus (Garcia-Tsao et al. 2010). Klinisch wird vor allem der MELD-Score (bestehend aus Gesamtbilirubin, Kreatinin und INR) für die Vergabe von Lebern bei Lebertransplantationen und der Child-Pugh-Score (bestehend aus Aszites, hepatische Enzephalopathie, Gesamtbilirubin, Albumin und Quick bzw. INR) als klinischer Maßstab zur Schweregrad-Einstufung herangezogen (Kamath und Kim 2007; Peng et al. 2016).

Wichtige Diagnosekriterien in der Histologie sind eine Architekturstörung der Leber durch fibröse Septen und durch Septen abgegrenzte Pseudolobuli (Burt et al. 2018). Die bereits makroskopisch erkennbaren Knoten in Zirrhoselebern können mikronodulär (< 3 mm Durchmesser) oder auch makronodulär (> 3 mm Durchmesser) sein (Celli und Zhang 2014; Burt et al. 2018).

Eine Leberzirrhose erhöht das Risiko einer HCC-Entstehung (Anthony et al. 1977). HCC-Patienten mit einer unerkannten Leberzirrhose haben ein 6,5 mal höheres Risiko für ein weiter fortgeschrittenes HCC zum Diagnosezeitpunkt als Patienten, die keine Leberzirrhose aufwiesen (Walker et al. 2016). Es ist wichtig Präventionsmaßnahmen und die Behandlung der zugrundeliegenden Erkrankung einzuleiten, um der weiteren Verschlechterung der Leberfunktion entgegenzuwirken (Romanelli und Stasi 2016).

Ito-Zellen sollen beim Prozess der Leberfibrosierung beteiligt sein und für den Hauptteil des interzellulär produzierten Kollagens bei einer Leberfibrose verantwortlich sein (Celli und Zhang 2014). In Patienten mit Leberzirrhose stellte man fest, dass die hepatische Aufnahme von Plasmabestandteilen signifikant verändert ist (Garcia-Tsao

et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass der hepatische Fibrosegrad mit den Hyaluronsäure- und γ-GT-Werten im Serum positiv korrelierte (Tang et al. 2017).

2.2.5 Präneoplasien der Leber

Präneoplasien sind definiert als phänotypisch veränderte Zellpopulationen noch ohne neoplastische Natur, die mit erhöhter Wahrscheinlichkeit einhergehen in einen malignen Tumor überzugehen (Bannasch 1986). Unter präkanzerösen Bedingungen versteht man eine Situation, bei deren Vorhandensein das Risiko für maligne Tumore erhöht ist (Tannapfel und Wittekind 2001).

In der Leber können präneoplastische cholangiozelluläre Läsionen, sogenannte „biliary intraepithelial neoplasia“ (BilIN) und „intraductal papillary neoplasm of the bile duct“ (IPNB), auftreten, welche die Entwicklung eines intrahepatischen Cholangiokarzinoms (iCCA) begünstigen (Terada et al. 1992; Chen et al. 2001; Zen et al. 2005; Nakanuma und Sudo 2017). Des Weiteren sind präneoplastische hepatozelluläre Läsionen beschrieben, die sich als Foci veränderter Hepatozyten darstellen und in ein Leberzelladenom oder HCC übergehen können (Bannasch 1986).

Histologisch lassen sich kleinzellige von großzelligen hepatozellulären Dysplasien unterscheiden (Watanabe et al. 1983). Kleinzellige Dysplasien bilden kleine Foci in der Leber und weisen eine Zellgröße zwischen normalen Hepatozyten und HCC-Zellen auf (Watanabe et al. 1983). Das Kern-/ Zytoplasma-Verhältnis ist erhöht (Watanabe et al. 1983). Vor allem die kleinzelligen Dysplasien stellen ein Risiko für eine Entartung dar (Watanabe et al. 1983). Bei einer Leberzirrhose wurden unterschiedliche Arten von Foci mit veränderten Hepatozyten gefunden, die als präneoplastische Läsionen gelten: Glykogen-speichernde Foci, gemischtzellige Foci und basophile Foci; diese Foci von alterierten Hepatozyten wurden häufiger in Leberzirrhosen mit bestehenden HCC als in Leberzirrhosen ohne HCC entdeckt (Su et al. 1997).

Im Vergleich zu Kontroll-Patienten treten dysplastische Hepatozyten vor allem bei Patienten mit Leberzirrhose und bereits bestehendem HCC auf (Watanabe et al. 1983). Kleinzellige hepatozelluläre Veränderungen sind mit einer Hochrisikozirrhose assoziiert (Su et al. 1997). Das vermehrte Auftreten von präneoplastischen hepatozellulären Läsionen ohne gleichzeitig bestehendes HCC ist häufiger bei

Leberzirrhose aufgrund einer AIH, eines Alkoholabusus, einer Hepatitis B oder C (Su et al. 1997).

Es wird vermutet, dass grundsätzlich drei Arten von Zellen in der Leber eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese spielen: der reife Hepatozyt, die duktale „bipolare“ Progenitorzelle und die periduktale Stammzelle (Sell 2001). Mithilfe von N-Nitrosomorpholin konnte bei Ratten Veränderungen von Hepatozyten induziert werden (Zerban et al. 1994). Dabei zeigten sich kombiniert klar-/azidophilzellige Foci, intermediärzellige Foci, gemischtzellige Foci, diffus basophilzellige Foci, trigroidzellige Foci und amphophilzellige Foci (Zerban et al. 1994). Es wird vermutet, dass gemischt-/basophilzellige Foci im Vergleich zu klar-/azidophilzelligen und intermediärzelligen Foci ein weiter fortgeschrittenes Stadium in der neoplastischen Entwicklung darstellen (Zerban et al. 1994).

Bei Experimentalratten, welche nach Behandlung mit DEN und 2-Acetylaminofluoren Foci mit veränderten Hepatozyten entwickelten, zeigte sich eine Herunterregulierung von Carboxylase 3 in den Lebern, insbesondere in den Foci (Quiroga et al. 2016). Da die Carboxylase 3-Expression durch Omega-3-Fettsäuren reguliert wird, konnte durch die Substitution von Fischöl eine Wiederherstellung der Carboxylase 3-Expression innerhalb der Foci erreicht werden und sogar eine Abnahme der Foci herbeigeführt werden (Quiroga et al. 2016).

2.2.6 Neoplasien der Leber

Neoplasien der Leber haben in der Onkologie einen großen Stellenwert. So starben 2015 weltweit 810.000 Menschen aufgrund von Leberkrebs, womit es die vierthäufigste krebsbedingte Todesursache ist (Asrani et al. 2019). Die Leber ist zudem ein Organ, in dem oft Metastasen lokalisiert sind. Deshalb müssen diese von den zwei häufigsten primären Lebermalignomen (HCC und iCCA) differenziert werden (Burt et al. 2018).

2.2.6.1 HCC

HCC ist der häufigste primäre Lebertumor (WHO 2019). Als bildgebende diagnostische Verfahren dienen vor allem Ultraschall, MRT und CT, wobei das MRT im Gegensatz zum CT bei Knoten kleiner als 2 cm besser geeignet ist und die kontrastmittelverstärkte Ultraschalltechnik sich als Untersuchungsmethode mit guter Sensitivität und Spezifität zeigte (Aghemo 2018). Als serologischer Biomarker wird das alpha-Fetoprotein (AFP) herangezogen (Aghemo 2018), wobei beim HCC-Screening ein Grenzwert von 20 ng/mL empfohlen wird (Galle et al. 2019).

Man kann gemäß Histologie und Molekularpathologie mehrere Subtypen von HCCs unterscheiden: einen steatohepatitischen (SH-HCC), klarzelligen, szirrhösen, makrotrabekulär-massiven (MTM-HCC), chromophoben, fibrolamellären, neutrophilenreichen und lymphozytenreichen Subtyp (Schirmacher 2018). Das szirrhöse HCC zeigt eine dichte intratumorale Fibrose (Schirmacher 2018). Das fibrolamelläre HCC stellt sich histologisch in Form von tief eosinophilen und prallen Hepatozyten dar und zeigt faseriges Stroma in dünnen parallelen Bändern, welches um die Tumorzellen angeordnet ist (Craig et al. 1980). Die SH-HCCs weisen histologisch oft große Lipidtropfen, sowie ballonierte Tumorzellen mit Mallory-Denk-Körperchen auf und man kann in einigen Fällen auch eine verstärkte intratumorale Entzündung und Fibrose erkennen (Salomao et al. 2010). 63,6 % der untersuchten Patienten mit SH-HCCs wiesen bekannte Risikofaktoren für eine NAFLD / NASH, wie bspw. Übergewicht, Diabetes und arterielle Hypertension auf (Salomao et al. 2010).

Prognostische Parameter bei Patienten mit einem HCC sind vor allem das UICC-Stadium, Edmondson Grading, eine bestehende Leberzirrhose und das Lebensalter (Tannapfel et al. 2000). MTM-HCCs sind mit höheren AFP-Serumspiegeln und größerer Tumorgröße assoziiert (Ziol et al. 2018). Neben Leberresektion und Thermoablation steht als weitere Therapieoption die Lebertransplantation zur Wahl (Aghemo 2018). Bei einer möglichen Lebertransplantation werden die sogenannten „Milan-Kriterien“ beachtet: diese gelten als erfüllt, wenn entweder eine HCC-Läsion kleiner als 5 cm oder 3 Läsionen jeweils kleiner als 3 cm bestehen (Mazzaferro et al. 1996; Aghemo 2018). Für eine medikamentöse systemische Therapie steht unter anderem der Tyrosinkinase-Inhibitor Sorafenib zur Verfügung (Aghemo 2018; Raoul et al. 2018). Dabei werden, je nach BCLC-Stadium, die therapeutischen Optionen gegeneinander abgewogen (Aghemo 2018).

Wichtige Mutationen in HCCs sind unter anderem Veränderungen im p53-Gen, im β-Catenin-Wnt-Signalweg (CTNNB1) und in den RAS/PI3K-Signalwegen (Schirmacher 2018). Untersuchungen zeigten, das CTNNB1-mutierte Tumore häufig größer, besser differenziert und mit intakter Tumorkapsel sind (Calderaro et al. 2017). CTNNB1 ist das Gen, das für β-Catenin kodiert (Khalaf et al. 2018). TP53-mutierte Tumore zeigten eine schlechtere Differenzierung und sind mit makro- und mikrovaskulärer Invasion assoziiert (Calderaro et al. 2017). TP53-mutierte Tumore zeigen häufig eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs und sind häufig MTM-HCCs (Calderaro et al. 2017). Das Protein p27, ein Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor und wichtig für den Zellzyklus, ist in höheren pT-Stadien bei HCCs erniedrigt; zudem besteht eine signifikante Assoziation zwischen erniedrigtem p27-Protein mit einer fortgeschrittenen lokoregionalen Ausdehnung des Primarius und höherer Tumorgröße (Tannapfel et al. 2000).

2.2.6.2 iCCA

Das iCCA ist ein malignes biliäres Karzinom und nach dem HCC das zweithäufigste primäre Leberkarzinom (WHO 2019). Dabei kann man iCCAs in zwei Subtypen unterteilen: der „large duct“ Typ, der von größeren zentralen Gallengängen abstammt, und der „small duct“ Typ, der von den kleinen Gallenwegen abstammt; der „large duct“ Typ entstammt den großen intrahepatischen Gallengängen in der Nähe des Leberhilus und ist deswegen typischerweise zentral lokalisiert (WHO 2019).

Als Risikofaktoren eines iCCAs, werden unter anderem Radon, parasitäre Erkrankungen, biliäre Lebererkrankungen wie PSC, virale Hepatitis und das metabolische Syndrom diskutiert (Gupta und Dixon 2017).

Zum Diagnosezeitpunkt beträgt das mittlere Alter über 50 Jahre mit männlicher Prädominanz. Oft ist der Laborparameter CA19-9 erhöht. Die Patienten geben gehäuft abdominale Schmerzen und Gewichtsverlust als Symptomatik an, wobei Patienten mit einem „large duct“ Karzinom, welches zentral eine Gallengangsobstruktion verursacht, aufgrund einer Cholestase oder Cholangitis auffällig werden können. „Small duct“ Karzinome bleiben oft klinisch inapparent. (WHO 2019)

iCCAs imponieren histologisch als Adenokarzinom mit säulenförmigen bis kubischen Epithelzellen, die ein klares oder leicht eosinophiles Zytoplasma aufweisen. Schlecht

differenzierte Adenokarzinome haben hingegen meist ein kribriformes Wachstum mit verstärkten Zell- und Kernpleomorphismen. Histologisch kann eine desmoplastische Gewebereaktion imponieren. Zentral im Tumorherd sind oft Koagulationsnekrosen vorzufinden. (Nakanuma und Kakuda 2015)

Zur kurativen Therapie gehört die vollständige chirurgische Resektion (Vogel et al. 2014). Eine Studie zeigte allerdings eine 5-Jahres-Überlebensrate nach Leberresektion von lediglich 27 % (Neeff et al. 2018).

Molekulare Mutationen bei iCCAs betreffen IDH1/2, ARAF, KRAS, BRAF FGF19, ARID1A, BAP1, EGFR und TP53 (Sia et al. 2015; WHO 2019). FGFR2-Fusionsgene kann man vor allem bei iCCAs nachweisen und sind therapeutisch bedeutsam (Nakamura et al. 2015; Abou-Alfa et al. 2020). FGFR2-PPHLN1 stellt ein solches Fusionsgen dar, das durch eine chromosomale Translokation t (10;12) (q26; q12) zustande kommt und eine transformierende und onkogene Aktivität aufweist (Sia et al. 2015). Es wird vermutet, dass die Aktivierung von Notch wichtig für die Umwandlung von Hepatozyten in Gallengangsepithelien ist und somit eine wichtige Rolle bei der Entstehung von iCCAs spielt (Sekiya und Suzuki 2012). Nicht nur Notch ist in die Entwicklung von iCCAs involviert ist, sondern auch der Akt-Signalweg (Fan et al. 2012).

2.2.6.3 Kombiniertes hepatozelluläres und Cholangiokarzinom

Kombinierte hepatozelluläre und Cholangiokarzinome (cHCC-CCA) sind primäre Leberkarzinome, die durch das Vorhandensein einer hepatozellulären und cholangiozellulären Differenzierung innerhalb desselben Tumors definiert sind (WHO 2019).

Die Inzidenz für ein cHCC-CCA beträgt 2 bis 5 % der primären Lebertumore (Brunt et al. 2018; WHO 2019). Bezüglich der Ätiologie eines cHCC-CCAs sollten die gleichen Ursachen wie für die Entwicklung eines HCCs und iCCAs betrachtet werden (WHO 2019).

Leberbiopsien sind hilfreich bei der Diagnosestellung, der Subtypisierung und Analyse des Tumors auf molekularpathologischer Ebene, sowie der Untersuchung des normalen Leberparenchyms; jedoch kann eine Leberbiopsie aufgrund intratumoraler Heterogenität den gesamten Tumor nicht repräsentativ darstellen und so zu einer

falschen Diagnose führen (Brunt et al. 2018). Histologisch können die hepatozellulären resp. cholangiozellulären Tumorareale wie ein HCC resp. iCCA imponieren (WHO 2019). Kombinierte hepatozelluläre und Cholangiokarzinome weisen im Vergleich zu reinen HCCs und iCCAs eine höhere Prävalenz für eine Venen-Infiltration und eine multifokale Lage auf (Koh et al. 2005). Immunhistochemisch kann man Marker für eine hepatozelluläre Differenzierung (z.B AFP, Arginase-1 und Glypican-3) und Marker für eine cholangiozelluläre Differenzierung (z. B CK7 und CK19) des Tumors heranziehen (Brunt et al. 2018). Die Überlebensrate von cHCC-CCA-Patienten ist intermediär zwischen der von iCCA-Patienten und HCC-Patienten (Koh et al. 2005).

2.3 Lipidtropfen und -assoziierte Proteine

Lipide sind essenziell für Zellen und werden unter anderem zum Aufbau von Membranen benötigt, dienen aber auch als Mediatoren bei verschiedensten Signalwegen (Olzmann und Carvalho 2019). Da Lipide toxisch für Zellen sind und den Zelltod triggern, werden Lipide in Form von Lipidtropfen gespeichert (Schaffer 2003; Olzmann und Carvalho 2019). An Lipidtropfen assoziiert sind Proteine, welche wichtige Funktionen zum Erhalt, der Biogenese, Struktur und Abbau von Lipidtropfen erfüllen (Itabe et al. 2017; Olzmann und Carvalho 2019).

2.3.1 Lipidtropfen

Lipidtropfen sind vollwertige und durchaus dynamische Zellorganellen (Farese und Walther 2009; Olzmann und Carvalho 2019). Sie bestehen aus einem einfachen Phospholipid-Monolayer mit einem Lipidzentrum, welches vor allem aus TAGs und Cholesterinestern besteht; der Phospholipid-Monolayer wird von Proteinen, die unter anderem aus der Perilipin-Familie stammen, ummantelt (Bartz et al. 2007; Brasaemle 2007; Arrese et al. 2008; Olzmann und Carvalho 2019) (Abb. 2). Lipidtropfen sind im Zytoplasma fast aller eukaryotischer Zellen vorzufinden, können aber auch im Zellkern vorkommen (Walther und Farese 2012; Layerenza et al. 2013; Walther et al. 2017). Sie kommen in enger Nachbarschaft zum ER vor, wo sie auch gebildet werden (Walther et al. 2017). Außerdem können Lipidtropfen mit Peroxisomen interagieren, um mutmaßlich die β-Oxidation von Fettsäuren zu erleichtern (Binns et al. 2006; Walther et al. 2017).

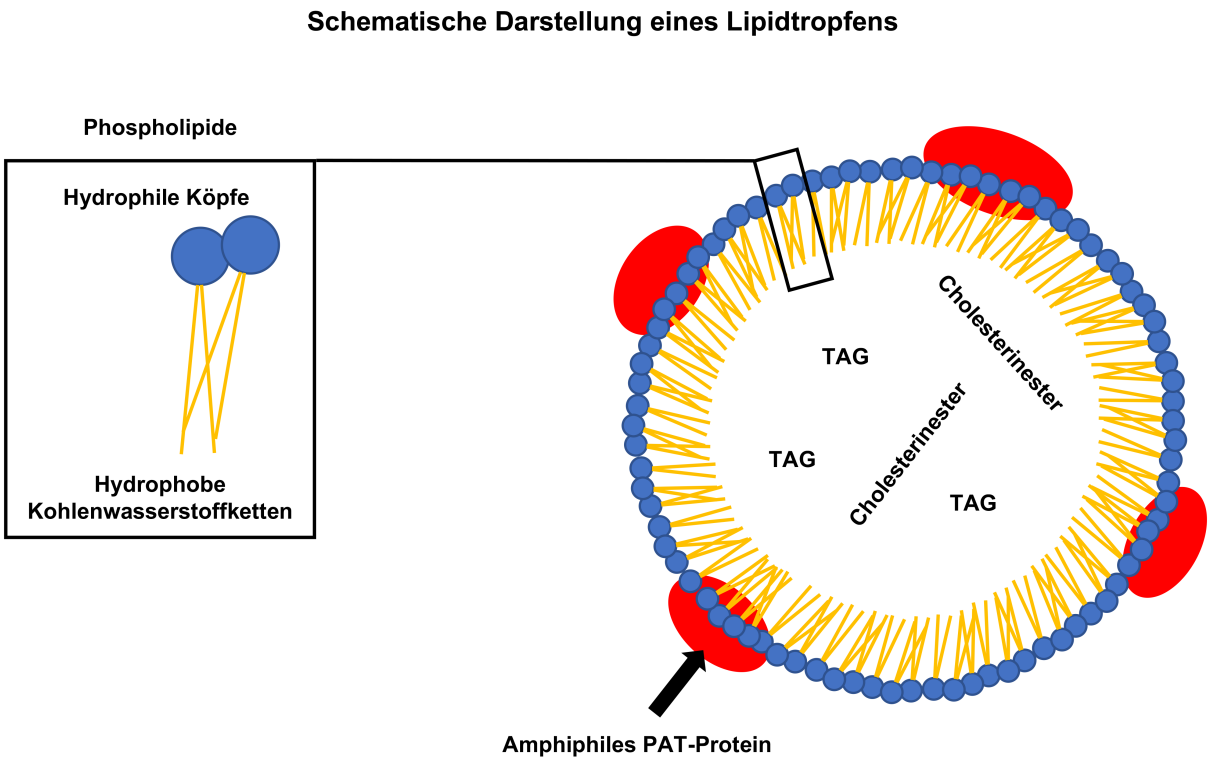


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Lipidtropfen. Die Abbildung wurde mithilfe folgender Textquellen erstellt (Bartz et al. 2007; Brasaemle 2007; Arrese et al. 2008; Mortimer et al. 2015).

2.3.2 Perilipin-Familie

Die an Lipidtropfen lokalisierten Proteine der Perilipin-Familie sind wichtig für die Kontrolle und Aufrechterhaltung der Lipidtropfendynamik. So sind sie essenziell für die Koordination der Lipolyse der in den Lipidtropfen enthaltenden Lipiden (Sztalryd und Brasaemle 2017). In Säugetieren existieren 5 Mitglieder der sogenannten PAT-/ Perilipinfamilie: Perilipin 1 / Perilipin / PLIN1 (Greenberg et al. 1991), Perilipin 2 / Adipophilin / ADRP/ PLIN2 (Heid et al. 1998), Perilipin 3 / TIP47 / PLIN3 (Wolins et al. 2001), Perilipin 4 / S3-12 / PLIN4 (Wolins et al. 2003) und Perilipin 5 / MLDP / PLIN5 (Yamaguchi et al. 2006), die in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden (Itabe et al. 2017). Perilipin 1 und 4 werden vor allem in Fettgewebe exprimiert; Perilipin 2, 3 und 5 ubiquitär (Itabe et al. 2017; Sztalryd und Brasaemle 2017; Hashani et al. 2018). Mit Ausnahme von Perilipin 4 weisen die Proteine der Perilipin-Familie eine so genannte „PAT-Domäne“ auf, die nach Perilipin, Adipophilin und TIP47 benannt wurde (Itabe et al. 2017). Mit Perilipin 1, 2 und 3 verwandte Proteine wurden auch in Spezies wie Drosophila und Dictyostelium gefunden (Lu et al. 2001; Miura et al. 2002; Itabe et al. 2017). Perilipin 1 und 2 sind konstitutiv mit Lipidtropfen assoziiert und werden

deswegen auch als „constitutive“ PAT-Proteine (cPAT) bezeichnet (Wolins et al. 2006). Perilipin 3, 4 und 5 können sowohl im Zytoplasma als auch an Lipidtropfen assoziiert vorliegen und werden deswegen auch „exchangeable“ PAT-Proteine (ePAT) genannt (Wolins et al. 2006). Demnach lokalisiert Perilipin 5 im Gegensatz zu Perilipin 2 nicht ausschließlich um Lipidtropfen, sondern auch im Zytoplasma an Mitochondrien. Perilipin 5 könnte dabei eine Funktion bei der Koordination des Transfers von Fettsäuren aus Lipidtropfen zu Mitochondrien für die β-Oxidation haben (Bosma et al. 2012). Zudem wiesen Perilipin 5-Knockout-Mäuse eine verstärkte Fettsäureoxidation und erhöhte ROS-Produktion im Herzen auf: Die Autoren schlussfolgerten, dass Perilipin 5 das Herz vor oxidativem Stress schützt (Kuramoto et al. 2012).

Bei der Lipidtropfenreifung in Hepatozyten weist die PAT-Protein-Expression in Analogie zur Adipogenese in braunem und weißem Fettgewebe eine Hierarchie auf: dabei wurde zuerst Perilipin 3, dann Perilipin 5, Perilipin 2 und schlussendlich Perilipin1 um Lipidtropfen lokalisiert gefunden (Pawella et al. 2014).

2.3.2.1 Perilipin 1

Perilipin 1 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Lipidspeichers und kann in drei verschiedenen Isoformen (A, B und C) vorliegen, wobei Isoform A am häufigsten vorkommt (Londos et al. 1995; Conte et al. 2016). Perilipin 1 kommt vor allem in Adipozyten, Talgdrüsenepithelzellen, steroidogenen Zellen, steatotischen Hepatozyten und daraus abgeleiteten Tumoren vor (Bickel et al. 2009; Pawella et al. 2014). „Loss-of-function"-Mutationen von Perilipin 1 führen bei Patienten zu einem Subtyp der familiären partiellen Lipodystrophie (Gandotra et al. 2011; Kozusko et al. 2013). Adipozyten von Perilipin 1-Knockout-Mäusen zeigen eine erhöhte basale Lipolyse durch den Verlust der protektiven Funktion von Perilipin 1 (Tansey et al. 2001). Das in Normallebern nicht vorkommende Perilipin 1 wird bei chronischer Steatose unabhängig von der jeweiligen Ursache exprimiert (Pawella et al. 2014) und zeigt eine zonale Bevorzugung mit prädominanter Lokalisation in Zone 3 des Leberparenchyms (Straub et al. 2008). Interessanterweise eignet sich Perilipin 1 als guter Marker um Liposarkome von anderen Weichgewebssarkomen zu unterscheiden (Straub et al. 2019) sowie HCCs von anderen Karzinomen (Straub et al. 2010).

2.3.2.2 Perilipin 2

Perilipin 2 wird in normalen humanen Geweben ubiquitär exprimiert, ist aber vor allem in metabolisch aktiven Zellen vorzufinden (Brasaemle et al. 1997; Straub et al. 2013). Es ist an Lipidtropfen lokalisiert und wird in Abwesenheit von Lipidtropfen im Proteasom abgebaut, weshalb die Perilipin 2-Expression abhängig vom Lipidtropfengehalt der Zellen ist (Conte et al. 2016). Daraus resultierend eignet sich Perilipin 2 als guter immunhistochemischer Marker, um eine Lipidtropfenakkumulation sichtbar zu machen (Straub et al. 2013). Interessanterweise haben Studien mit Perilipin 2-Knockout-Mäusen gezeigt, dass Perilipin 2 Lipidtropfen vor der Autophagie schützt und ein Mangel an Perilipin 2 die Autophagie verstärkt und zu einer Verminderung der hepatischen TAGs führt (Tsai et al. 2017).

2.3.3 Rolle der Perilipine bei Lebererkrankungen

Ein Ungleichgewicht von zu vielen oder zu wenigen Lipidtropfen kann zu unterschiedlichen Erkrankungen der Leber führen (Krahmer et al. 2013). Perilipine, die dabei an Lipidtropfen lokalisiert vorkommen und mit diesen in Interaktion treten, spielen eine Schlüsselrolle bei dieser Pathogenese (Krahmer et al. 2013).

Bei der Entstehung einer AFLD spielen Perilipine eine wichtige Rolle: In Mäusen, welche Ethanol zugefüttert bekamen, entwickelte sich eine hepatische Steatose und Insulinresistenz, wobei diese Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Erhöhung von Perilipin 2 zeigten (Carr et al. 2013). Perilipin 2-Knockout-Mäuse, die chronisch mit Alkohol gefüttert wurden, waren gegen eine hepatische Steatose, Glucoseintoleranz und hepatische Ceramidanreicherung geschützt (Carr et al. 2014). Mit Ethanol gefütterte Mäuse wiesen vor allem in Zone 2 der Leber eine TAG-Akkumulation auf; um die hier entdeckten Lipidtropfen waren Perilipin 1, 2 und 3 lokalisiert (Orlicky et al. 2011). Im Vergleich zu isokalorisch-gefütterten Kontrollmäusen waren die Lipidtropfen größer (Orlicky et al. 2011). Beim Austausch von langkettigen TAGs durch mittelkettige TAGs bei der Ethanoldiät konnte eine Verminderung der Perilipin 2-Immunfärbung und eine Verringerung der hepatischen Steatose festgestellt werden (Mak et al. 2008).

Perilipin 1 und 2 werden bei einer NAFLD - sowohl bei alleiniger Steatose als auch bei NASH - exprimiert (Fujii et al. 2009). Perilipin 1 war um größere Lipidtropfen lokalisiert

und Perilipin 2 wurde vermehrt um Lipidtropfen in ballonierten Hepatozyten exprimiert gefunden (Fujii et al. 2009). Perilipin 2-positive ballonierte Hepatozyten korrelierten mit dem Grad der Entzündung und mit dem Score von oxidierten Phosphatidylcholin-positiven ballonierten Hepatozyten, woraus die Autoren schlussfolgerten, dass die Perilipin 2-Expression in ballonierten Hepatozyten auf einen oxidativen Schaden dieser Zellen hinweisen kann (Fujii et al. 2009). Es wird vermutet, dass durch eine hochkalorische Diät bei Mäusen die Perillipin 2-Expression durch PPARγ-Aktivität herbeigeführt wird (Motomura et al. 2006). Unabhängig vom Auslöser der Steatose wird Perilipin 1 bei chronischer Steatose exprimiert und ist vermindert oder gar nicht in akut steatotischen Hepatozyten vorhanden, wohingegen Perilipin 2 sowohl bei akuter als auch chronischer Steatose um Lipidtropfen in Hepatozyten vorzufinden ist (Pawella et al. 2014).

Lipidtropfen und an diese lokalisierte Perilipine haben eine tragende Rolle bei der HCV-Pathogenese: Lipidtropfen sind essenziell für den Replikationszyklus von HCV; dabei rekrutiert das an Lipidtropfen-assoziierte Core-Protein Nicht-Strukturproteine (NS-Proteine) und HCV-RNA zu Lipidtropfen, damit infektiöse Viruspartikel gebildet werden können (Miyanari et al. 2007). Es wird zudem ein Zusammenhang zwischen HCV Core-Protein und Lipidtropfeneinlagerungen in der Leber bei chronischer Hepatitis C vermutet (Moriya et al. 1997). Die Anzahl und Infektiosität sezernierter Viruspartikel steigt in Perilipin 2-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen; HCV sorgt offenbar für einen Anstieg der Perilipin 2-Expression und somit nimmt die Oberfläche der Lipidtropfen durch eine Erhöhung des Lipidgehalts zu (Branche et al. 2016). Zudem war die Perilipin 2-mRNA in HCV-infizierten Zellen - verglichen mit nicht-infizierten Zellen - erhöht, sowohl in HCV-Genotyp 3, als auch in HCV-Genotyp 1 (Campana et al. 2018). In Perilipin 2-Knockout-Zellen ist der Lipidtropfenzugang für das HCV-Core-Protein und NS5A-Proteine eingeschränkt und die entstehenden HCV-Partikel weisen Reifestörungen auf (Lassen et al. 2019). Es gibt zudem eine signifikante Korrelation zwischen dem Occludin- und dem Perilipin 2-mRNA-Expressionslevel in HCV-infizierten humanen Lebern (Branche et al. 2016). Im Serum wurden HCV-Partikel mit β-Lipoproteinen assoziiert entdeckt und man vermutet, dass dieser Zustand als Schutz vor neutralisierenden Antikörpern fungieren könnte (Thomssen et al. 1992).

Auch bei der Hepatokarzinogenese konnte eine Veränderung in der Perilipin-Expression festgestellt werden; die Perilipin 2-Expression korrelierte in HCCs mit der

Zellproliferation (Ki-67), die Perilipin 1-Expression war im Vergleich zu Normallebergewebe reduziert und die Perilipin 3-Expression war in HCCs im Vergleich zu Hepatozyten erhöht (Straub et al. 2010).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Arbeitsgeräte

Tab. 1: Geräte

Geräte	Daten	Hersteller/Lieferant
Dampfgarer	Braun	De'Longhi Braun Household GmbH (Neu-Isenburg, Deutschland)
Färbeautomat für H&E-Färbung	Dako CoverStainer	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG (Waldbronn, Deutschland)
Färbeautomaten für Immunhistochemie (IHC)	DAKO Cytomation Autostainer plus VENTANA BenchMark ULTRA	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
Färbeautomat für PAS-Färbung	Leica ST 4040 Linear Stainer	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Heizplatte	Stuart Digital Hotplate SD300	Bibby Sterilin Ltd. (Stone, England)
Kamera für die Transmissionselektronenmikroskopie	4kTEMCam-F416	Tietz Video and Image Processing Systems GmbH (Gauting, Deutschland)
Kühlplatte	Medite TKF 22	Medite GmbH (Burgdorf, Deutschland)
Lichtmikroskop	Olympus BX45	LabX (Midland, Kanada)
Magnetrührer	IKA RCT	IKA® -Werke GmbH (Hamburg, Deutschland)
Messzylinder 250 ml		VWR International (Darmstadt, Deutschland)
Objektträgerstrecktisch	Medite OTS 40	Medite GmbH
pH-Meter	WTW Series InoLab® pH720	WTW GmbH (Weilheim, Deutschland)
Pinzette	Dumont Pinzette, Typ 7, Biologie, rostfreier Stahl	Plano GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Präzisionswaage	Sartorius, LC620S-ODS	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)

Rotationsmikrotom	Hyrax M55	Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Jena, Deutschland)
Transmissionselektronenmikroskop	Jeol „JEM 1400HC“	Jeol (Germany) GmbH (Freising, Deutschland)
Ultramikrotom	Leica Ultracut R	Leica Microsystems GmbH
Wärmeschrank	Heraeus Function Line UT6	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller/ Lieferant
Deckgläser 24 mm x 60 mm	Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH (Braunschweig, Deutschland)
Deckgläser 24 mm x 50 mm	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG
Deckgläser 18 mm x 18 mm	Marienfeld GmbH (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Diatome ultra-Diamantmesser, 45° 2,5 mm	Science Services GmbH (München, Deutschland)
Einweg-Pasteurpipetten, graduiert, 152 mm, 1,8 ml,unsteril	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Filterpapier Whatman Grad 1 rund, 90 mm	Whatman GmbH (Dassel, Deutschland)
Gelatinekapseln Größe 3	Küpper-Primax GmbH (Troisdorf-Spich, Deutschland)
Glasmesser	Agar Scientific Ltd. (Stansted, England)
Kupfergrids 100 mesh	Plano GmbH
Magnetrührstäbchen	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)
Mikrotomklingen S35	PFM Medical AG (Köln, Deutschland)
Objektträger für Transmissionselektronenmikroskopie	Gerhard Menzel GmbH (Braunschweig, Deutschland)
Objektträger Superfrost Plus	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
Pasteurpipette, Glas, 150 mm	VWR International
Pinsel	Pelikan Vertriebsgesellschaft mbH & Co. KG (Hannover, Deutschland)
Rasierklingen Heavy Duty Industrial Blades .012 HD	Plano GmbH
Zellstoff	Kurt Müller GmbH (Pulheim-Brauweiler, Deutschland)

3.1.3 Chemikalien

Tab. 3: Chemische Substanzen

Substanz	Hersteller /Lieferant
Agar 100 Resin	Agar Scientific Ltd.
Aqua bidestillata	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Aqua destillata	Medizintechnik der UM Mainz
Azur II	Merck KGaA (VWR) (Darmstadt, Deutschland)
Bluing Reagent	Roche Diagnostics GmbH
Benzyldimethylan (BDMA)	Agar Scientific Ltd.
Blei (II)-nitrat	Merck KGaA (VWR)
Dako Bluing Buffer	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG
Dako Eosin	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG
Dako Hematoxylin	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG
Dako REAL Hematoxylin	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA (VWR)
Dodecenyl Succinic Anhydrid (DDSA)	Agar Scientific Ltd.
Entellan	Merck KGaA (VWR)
EnVision ™ FLEX Antibody Diluent	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG
EnVision ™ FLEX DAB+ Chromogen	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG
EnVision ™ FLEX/HRP	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG
EnVision ™ FLEX + Mouse (LINKER)	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG
EnVision ™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG
EnVision TM FLEX + Rabbit (LINKER)	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG
EnVision ™ FLEX Substrate Buffer	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG
EnVision ™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x)	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG
EnVision ™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x)	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG

EnVision ™ FLEX Wash Buffer (20x)	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG
Ethanol absolut	SAV Liquid Production GmbH (Flintsbach am Inn, Deutschland)
Ethanol 96%	SAV Liquid Production GmbH
Hämatoxylin nach Gill II	Merck KGaA (VWR)
Hämatoxylin nach Gill III	Merck KGaA (VWR)
Hematoxylin II	Roche Diagnostics GmbH
Histo-Clear II	National Diagnostics, Scientific Laboratory Supplies (Nottiingham, England)
Isopropanol	SAV Liquid Production GmbH
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA (VWR)
Methylenblau	Merck KGaA (VWR)
Methyl Nadic Anhydrid (MNA)	Agar Scientific Ltd.
Natriumacetat	Merck KGaA (VWR)
Natriumdisulfit	Merck KGaA (VWR)
Natriumhydroxid	Merck KGaA (VWR)
Natronlauge 1N	Merck KGaA (VWR)
Osmiumtetroxid	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Perjodsäure	Merck KGaA (VWR)
Propylenoxid	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Protein Block Serum-Free Ready-to-use	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG
Salzsäure 1N	Merck KGaA (VWR)
Schiffs‘ Reagenz	Merck KGaA (VWR)
Stickstoff (flüssig)	Linde AG Gases Division Germany (Pullach, Deutschland)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth GmbH
UltraView Universal DAB Detection Kit	Roche Diagnostics GmbH
Uranylacetat	Serva Electrophoresis GmbH
Xylol	SAV Liquid Production GmbH

3.1.4 Lösungen

3.1.4.1 Lösungen für die PAS-Färbung

Disulfitwasser:	6 g Natriumdisulfit 950 ml Leitungswasser 50 ml 1N Salzsäure
Hämalaun nach Gill:	1:1 Mischung aus Hämalaun nach Gill II und Hämalaun nach Gill III
Natriumacetatlösung:	4,1 g Natriumacetat 500 ml Aqua destillata
Perjodsäure:	4,5 g Perjodsäure 50 ml Natriumacetatlösung 450 ml Aqua destillata

3.1.4.2 Lösungen für die Transmissionselektronenmikroskopie

Färbelösung nach Richardson:	50 ml 1%iges Azur II 25 ml 1%iges Methylenblau 25 ml 1%iges Borax-Wasser
Lösung A:	2,7 g Kaliumdihydrogenphosphat 200 ml Aqua destillata
Lösung B:	7,1 g Dinatriumhydrogenphosphat 500 ml Aqua destillata
Phosphatpufferlösung nach Soerensen:	80,4 ml Lösung B 19,6 ml Lösung A

Bleicitrat nach Richardson:	50 ml Aqua bidestillata 1,33 g Blei (II)-nitrat 1,76 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat *Nach 30 min* 2 Tropfen 1%ige Natronlauge
Alkoholische Uranylacetatlösung:	0,5 g Uranylacetat 50 ml 50%iges Ethanol
Für 102 g Epon:	48 g Agar Resin 100 26 g DDSA 26 g MNA 2 g BDMA

3.1.5 Antikörper für die immunhistochemische Färbung

Tab. 4: Antikörper

Antikörper gegen (Klon)	Immunglobulinklasse	Verdünnung	Hersteller / Lieferant
Akt (C67E7)	Kaninchen IgG	1:200, pH 6,1	Cell Signaling Technology (Frankfurt am Main, Deutschland)
Beta-Catenin (β-Catenin-1)	Maus IgG1, κ	Unverdünnt, ready-to-use, pH 6,1	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG
E-Cadherin (36/E-Cadherin)	Maus IgG2a, κ	1:500, pH 9	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
FABP1* (polyklonal)	Kaninchen	1:3500	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Glutaminsynthetase* (GS-6)	Maus monoklonal	Unverdünnt, ready-to-use	Cell Marque (Rocklin, USA)
Glypican 3* (GC33)	IgG2a Maus monoklonal	Unverdünnt, ready-to-use	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG
Heat shock protein 70* (W27)	Maus monoklonal	1:250	Santa Cruz Biotechnology, INC. (Heidelberg, Deutschland)
Hepatitis B Virus Oberflächen-Antigen (AI0FI)	IgG2b Maus	Unverdünnt; ready-to-use, pH 9	DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Dr. Christian Sartori GmbH & Co. KG (Hamburg, Deutschland)
Ki-67 Antigen (MIB-1)	Maus IgG1, κ	Unverdünnt, ready-to-use, pH 6,1	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG

N-Cadherin (36/N-Cadherin)	Maus IgG1	1:500, pH 9	BD Biosciences
p53 Protein (DO-7)	Maus IgG2b, κ	Unverdünnt, ready-to-use, pH 6,1	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG
Perilipin 1 (PERI 112.17)	IgG1 Maus monoklonal	1:25, pH 9	PROGEN Biotechnik GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Perilipin 2 (AP 125)	IgG1 Maus monoklonal	1:25, pH 9	PROGEN Biotechnik GmbH
Phospho-mTor (49F9)	Kaninchen IgG	1:100, pH 6,1	Cell Signaling Technology

3.1.6 Software

Tab. 5: Software

Software	Daten	Hersteller/ Lieferant
Adobe Photoshop CS5		Adobe Inc. (Mountain View, USA
Aperio ImageScope	Version 12.2	Leica Microsystems GmbH
Gryphax		Gryphax, Jenoptik AG (Jena, Deutschland)
Microsoft Excel	Office365 ProPlus	Microsoft Deutschland GmbH (München, Deutschland)
Microsoft Powerpoint	Office365 ProPlus	Microsoft Deutschland GmbH
Microsoft Word	Office365 ProPlus	Microsoft Deutschland GmbH
PathoPro		ifms GmbH (Saarbrücken, Deutschland)
R Statistics	R version 3.6.1 (2019-07-05) Packages: tidyverse (1.3.0) ggpubr (0.2.4)	R Foundation (Wien, Österreich)
SPSS Statistics	IBM SPSS Statistics 25	IBM Deutschland GmbH (Ehningen, Deutschland)

3.1.7 Gewebe

3.1.7.1 Leberbiopsien von HCV-Patienten

Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete (FFPE) Leberstanzbiopsien von 231 Patienten mit chronischer HCV-Infektion wurden untersucht. Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 42,21 ± 12 Jahren und einem medianen Lebensalter von 41 Jahren. 57,58 % der Patienten waren männlich, 42,42 % weiblich.

3.1.7.2 Kontrollleberbiopsien und -resektate

Zu Kontrollzwecken wurden Leberbiopsien von Patienten mit chronischer Hepatitis B, akuter HEV-Infektion, AIH und PSC verwendet. Zusätzlich wurde normales Lebergewebe in Form von Leberresektaten von Patienten mit Lebermetastasen (hier das nicht-neoplastische Gewebe) und einer Patientin mit einer Echinococcus granulosus-Zyste untersucht. Das FFPE-Gewebe, welches für diagnostische Zwecke entnommen, untersucht und archiviert wurde, stammte aus dem Institut für Allgemeine Pathologie der Universitätsmedizin Mainz. Für die hier vorgelegte Arbeit lag ein positives Ethikvotum (2020-15428, “Lipidtropfen und -assoziierte Proteine bei viralen Hepatitiden”) vor.

Tab. 6: Kontrollleberbiopsien und -resektate

Lebererkrankung	Stichproben-größe	Durchschnittsalter [a] ± Standardabweichung [a]	Medianes Lebensalter [a]	Anteil männlicher Patienten [%]
HBV	33	41,70 ± 12	43	45,45
Lebermetastasen	15	64,47 ± 11	61	40,00
AIH (+PSC)	12	13,17 ± 7	13	66,67
HEV	4	60,00 ± 11	55,5	100
PSC	1	8,00	-	0
Echinococcus granulosus	1	21,00	-	0

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung von Paraffingewebeschnitten

Die FFPE-Gewebeproben wurden gekühlt, um die Schnittführung zu erleichtern. Anschließend wurden mit einem Rotationsmikrotom 2 µm dicke Schnitte angefertigt. Nach Aufziehen der Paraffinschnitte auf die Objektträger wurden diese auf einen Objektträger-Strecktisch bei 37 °C inkubiert, um eine bessere Adhäsion der Paraffinschnitte auf den Objektträgern zu erreichen.

3.2.2 PAS-Färbung

PAS-Färbungen wurden exemplarisch sowohl am HCV-Kollektiv als auch an ausgewählten Fällen des Kontrollkollektivs gemäß dem Protokoll der Routinediagnostik durchgeführt.

Zuerst wurden die Objektträger mit den Paraffinschnitten für mind. 10 min in den Wärmeschrank (60 °C) gestellt, damit das Paraffin ablaufen konnte. Die Schnitte wurden anschließend dreimal für jeweils 10 min in Xylol entparaffiniert und für 50 s in Xylol. Als nächstes folgten drei Isopropanolbäder (100 %) für jeweils 50 s. Im Anschluss wurden die Schnitte in ein 70%iges Isopropanolbad für 50 s gestellt. Danach wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser für 50 s vom Isopropanol befreit. Im Anschluss wurden die Objektträger dreimal für je 50 s mit Perjodsäure behandelt und danach zweimal für jeweils 50 s in Leitungswasser gestellt. Danach erfolgte eine sechsmalige Behandlung mit Schiffs Reagenz für jeweils 50 s. Es folgte eine dreimalige Behandlung in Disulfitwasserbäder auch für je 50 s. Danach wurden die Objektträger dreimal für jeweils 50 s in Leitungswasser behandelt und es erfolgte eine Behandlung in Hämalaun nach Gill für weitere 50 s. Die Objektträger wurden dann zweimal für jeweils 50 s mit Leitungswasser gewaschen, dreimal in ein Isopropanolbad (100 %) für jeweils 50 s gestellt und zuletzt noch 50 s in Xylol inkubiert. Nach der Färbung wurden Deckgläser (24 mm x 60 mm) mittels Entellan auf den Objektträgern fixiert.

3.2.3 H&E-Färbung

Die meisten Fälle, die aus der Routinediagnostik stammen, waren bereits H&E-gefärbt. Fälle, bei denen keine H&E-Färbungen vorlagen, wurden gemäß dem Protokoll der Routinediagnostik H&E-gefärbt.

Die Objektträger mit den Paraffinschnitten wurden in den Dako CoverStainer gegeben. Dort wurden sie vollautomatisiert entparaffiniert. Im Färbeautomat wurden sie zweimal für jeweils 3 min mit Histo-Clear II behandelt. Danach folgte eine zweimalige Behandlung mit 96%igem Ethanol für 10 s bzw. 2 min und einmalig mit 70%igem Ethanol für 2 min. Danach wurden die Schnitte mit Leitungswasser für 1 min gespült und für 1,5 min mit Dako Hämatoxylin behandelt und anschließend wieder für 1 min mit Leitungswasser gespült. Danach wurden die Objektträger für 1,5 min mit Dako Bluing Buffer behandelt und wieder 1,5 min lang gespült. Es folgte eine einmalige Behandlung mit 70%igem Ethanol und Dako Eosin für jeweils 1 min. Im Anschluss wurden die Objektträger einmalig mit 96%igem Ethanol und dreimalig mit 99%igem Ethanol für jeweils 1 min inkubiert. Zum Schluss wurden die Objektträger für 1 min mit Histo-Clear II gespült und manuell mithilfe von Entellan mit einem 24 mm x 50 mm großen Deckglas eingedeckt.

3.2.4 Immunhistochemie („Dako Cytomation Autostainer plus“)

Die 2 µm dicken Paraffinschnitte wurden auf Superfrost Plus Objektträger aufgezogen und auf die Objektträger-Streckplatte bei 42 °C gelegt, bevor sie ü. N. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert wurden. Anschließend wurden die Paraffinschnitte bei 60 °C für 15 min in den Wärmeschrank gestellt, damit überschüssiges Paraffin ablaufen konnte. Zur Entparaffinierung wurden die Objektträger dreimal für jeweils 5 min in ein Xylolbad gegeben. Danach folgte ein Bad in absteigender Alkoholreihe (100 %, 96 %, 70 %, 50 % Ethanol) für jeweils zweimal 3 min und am Schluss für 3 min in Aqua destillata. Zur Vorbehandlung wurde je nach Antikörper-Produkt ein pH-Wert von 6,1 (Target Retrieval Solution, Low pH) oder ein pH-Wert von 9 (Target Retrieval Solution, High pH) verwendet (vgl. Tab. 4). Bei einem pH-Wert von 6,1 wurden die Proben für 35 min und bei einem pH-Wert von 9 für 20 min im Dampfgarer gekocht, um Bindestellen zu demaskieren. Im Anschluss wurden die Objektträger unter fließendem Leitungswasser für 7 min gekühlt. Die vorbehandelten Schnitte wurden in einer Glasküvette mit

EnVision™ FLEX Wash Buffer für ca. 4 min gewaschen. Im Anschluss wurde der Dako Cytomation Autostainer plus mit den vorbehandelten Objektträgern, EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision™ FLEX/HRP, einer Mischung aus EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen und EnVision™ FLEX Substrate Buffer (1Tropfen : 1ml), Protein Block Serum-Free Ready-to-use, DAKO REAL Hematoxylin und zur Spülung EnVision™ FLEX Wash Buffer bestückt. Je nach Art der verwendeten Antikörper musste man entweder den EnVision™ FLEX+ Rabbit (Linker) oder den EnVision™ FLEX+ Mouse (Linker) dem Gerät beifügen und anschließend das Gerät starten. Nach erfolgreich beendeter Färbung wurden die Objektträger für 3 min unter fließendes Leitungswasser gestellt und für 3 min in Aqua destillata gestellt. Anschließend folgte für jeweils zweimal 3 min ein Bad mit aufsteigender Alkoholreihe (50 %, 70 %, 96 % und 100 % Ethanol) und dreimal für jeweils 5 min ein Bad in Xylol. Zum Schluss wurden die gefärbten Proben mittels Entellan und Deckgläsern (24 mm x 60 mm) eingedeckt.

3.2.5 Immunhistochemie („VENTANA BenchMark ULTRA“)

Für spezielle Antikörper (mit Stern markierte Antikörper siehe Tab. 4) wurde der VENTANA BenchMark ULTRA Färbeautomat verwendet. Hierfür wurden 2 µm dicken Paraffinschnitte auf Superfrost Plus Objektträger gezogen und in den Ventana BenchMark ULTRA Färbeautomat gestellt. Für alle Färbungen wurde das UltraView Universal DAB Detection Kit, das Bluing Reagent und Hematoxylin II verwendet und der jeweilige Antikörper hinzugefügt. Nach der vollautomatisierten Färbung wurden die Objektträger mit Entellan und Deckgläser (24 mm x 60 mm) eingedeckt.

3.2.6 Transmissionselektronenmikroskopie

FFPE-Lebergewebe einer Größe von 0,1 cm x 0,1 cm x 0,1 cm wurde dreimal für jeweils 5 min in Xylol gegeben, gefolgt von einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 70%, 50% Ethanol) für jeweils zweimal 3 min zur Entparaffinierung. Danach wurde das Material mit 0,1 molarer Phosphatpufferlösung (siehe Lösungen für die Transmissionselektronenmikroskopie) für jeweils zweimal 15 min bei 4 °C rehydriert. Die Proben wurden für 2 h in 1%igem Osmiumtetroxid (OsO_4) inkubiert und im Anschluss für zweimal 15 min wieder bei 4°C mit 0,1 molarer Phosphatpufferlösung gewaschen. Es folgte eine Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (50 %, 70 %,

90 % und 100 % Ethanol) für jeweils zweimal 15 min. Danach wurden die Proben für 15 min mit Propylenoxid entwässert. Für 60 min wurden die Proben mit einer Propylen-Epon Mischung (Verhältnis 2:1), danach für 1h im Verhältnis von 1:2 inkubiert und dann ü.N. bei 4°C in Epon belassen. Die Proben wurden nun in Gelatinekapseln, die mit Epon gefüllt waren, überführt und für 24 h bei 60 °C auspolymerisiert. Von den Epon-Proben wurden mit einem Glasmesser max. 1 µm dicke Semidünnschnitte zur Übersicht hergestellt und bei 100°C auf einer Heizplatte getrocknet. Für 1 min wurden die Schnitte nach Richardson gefärbt und mit Aqua dest. gewaschen. Deckgläser (18 mm x 18 mm) wurden mittels Entellan auf den Objektträgern fixiert, die Schnitte lichtmikroskopisch evaluiert und das weiter zu untersuchende Areal ausgesucht.

Das Gewebe wurde nun mit einer Rasierklinge zugeschnitten. Mit einem Diamantmesser wurden Ultradünnschnitten von etwa 90 ηm angefertigt und auf Kupfergrids aufgezogen. Zur Nachkontrastierung folgte ein Bad für 10 min in 1%iger alkoholischem Uranylacetat, gefolgt von kurzem Waschen in Aqua dest. Danach wurden die Proben 5 min mit Bleicitrat nach Reynolds behandelt. Reste des Bleicitrats wurden anschließend mit Aqua dest. entfernt.

Die fertig mit Ultradünnschnitten bestückten Kupfergrids wurden in das Transmissionselektronenmikroskop eingeschleust und evaluiert. Aufnahmen wurden mit einer 4kTEMCam-F416 im Format 4096 x 4096 gemacht, welche anschließend als 8 Bit Bilder gespeichert wurden.

3.2.7 Histologische Beurteilung der Proben

3.2.7.1 Immunhistochemischer Score

Bei der Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen des HCV-Kollektivs wurde ein semiquantitativer Score in Anlehnung an den IRS-Score (d.h. 0 = negativ, 1= schwach, 2 = mäßig stark und 3 = stark) benutzt (Remmele und Stegner 1987). Dabei wurde die Färbeintensität im Bereich von 0 bis 3 geschätzt, wobei Zwischenabstufungen gemacht wurden, um die Färbeintensitäten noch genauer differenzieren zu können.

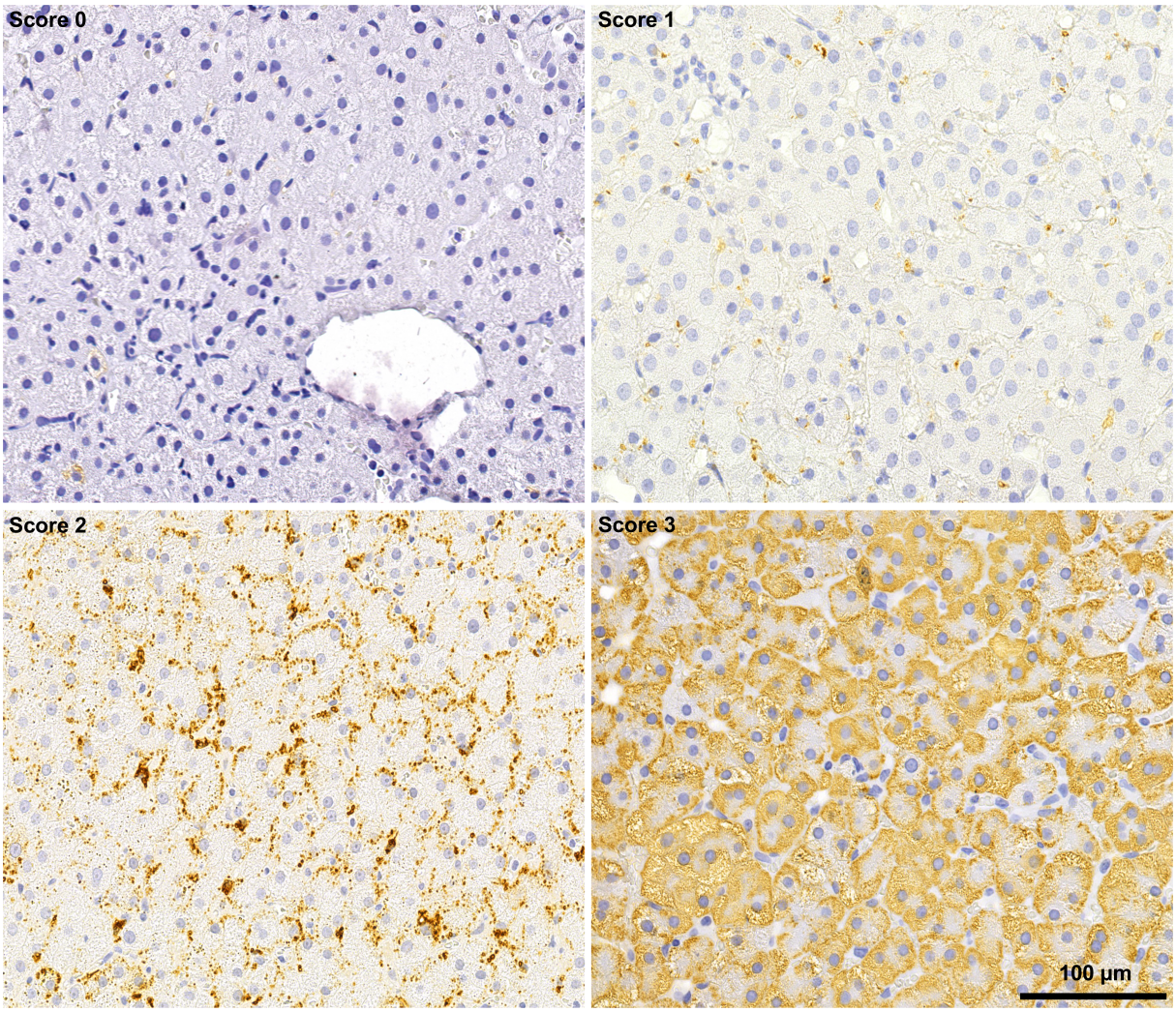


Abb. 3: Beispielhafte Darstellung der semiquantitativen Bestimmung mittels IHC-Scores. Immunhistochemie mit Antikörpern gegen Perilipin 2 in Leberbiopsien.

3.2.7.2 Auswertung der Foci

Bei den immunhistochemischen Färbungen mit Antikörpern gegen Perilipin 1 und 2 wurden zusammenliegende Gruppen von stark zytoplasmatisch gefärbten Hepatozyten als Foci definiert, wenn sie sich stark von der Umgebung hervorhoben (Abb. 4). Den Biopsien wurden Kategorien zugeordnet. Kategorie 1 bedeutete, dass klar Foci abzugrenzen waren. Bei Kategorie 2 war das Vorhandensein von Foci nicht eindeutig (meistens aufgrund von relativ starker Färbung benachbarter Hepatozyten). In Kategorie 0 waren keine Foci nachweisbar.

Für Kategorie 1 oder 2 wurde zusätzlich stichprobenartig der prozentuale Anteil der vorhandenen Foci an den gesamten Hepatozyten bestimmt.

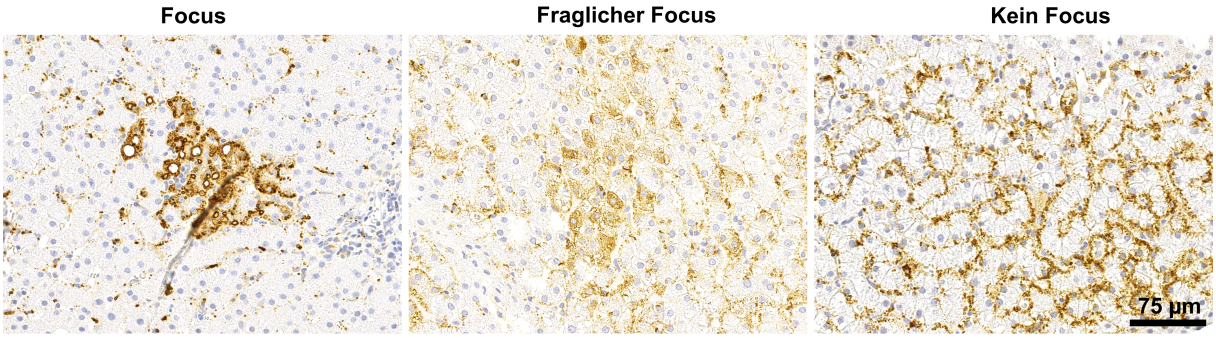


Abb. 4: Exemplarische Focusbeurteilung in der Perilipin 2-Immunhistochemie. Links Leberbiopsie mit einem sich klar vom Parenchym abgrenzenden Focus (Kategorie 1). In der Mitte ein fragliches Focus (Kategorie 2), das sich nur unscharf vom restlichen Parenchym abhebt. Rechts Leberbiopsie ohne Focus (Kategorie 0).

3.2.7.3 Beurteilung des Steatosegrades

Die Lebersteatose wurde mithilfe der Perilipin 2-Färbung im HCV-Kollektiv bestimmt und als prozentualen Anteil am Parenchym angegeben. Voruntersuchungen am HCV-Kollektiv erfassten den prozentualen Anteil der Steatose anhand der H&E-Färbung und wurden im Rahmen dieser Arbeit mit ausgewertet.

3.2.8 Statistische Auswertung

Statistische Auswertungen wurden sowohl mit dem Statistik-Programm SPSS als auch mit R durchgeführt. Es wurden dabei sowohl histologische als auch klinische Parameter ausgewertet. Bei den Patienten mit chronischer Hepatitis C standen bereits klinische Laborparameter und histologische Parameter der H&E-Färbung in Form von Excel-Tabellen zur Verfügung. Diese Parameter wurden im Rahmen dieser Arbeit mit SPSS in Form von Mittelwerts- und Standardabweichungsberechnungen ausgewertet und nach HCV-Genotyp getrennt in Form von Tabellen numerisch dargestellt. Die in dieser Arbeit erfassten Werte der immunhistochemischen Auswertung wurden ebenfalls als Mittelwerte und Standardabweichungen in dieser Tabelle dargestellt. Die Steatose in Korrelation zu den Serumtransaminasewerten wurde mit dem Statistik-Programm R als Korrelationsdiagramme nach Spearman dargestellt und auch die p-Werte wurden berechnet.

Des Weiteren wurden Wilcoxon-Tests über den Zusammenhang des Steatosegrades mit den HCV-Genotypen und den Zusammenhang von Steatosegrad mit dem

Vorhandensein von Perilipin-positiven Foci durchgeführt und diese graphisch mittels Boxplots dargestellt.

Bei den Patienten der Kontrolllebern wurde sowohl eine Mittelwertberechnung des Alters durchgeführt als auch der prozentuale Anteil der Foci-positiven Proben am Kollektiv (alle Patienten mit der gleichen Lebererkrankung) bestimmt.

4 Ergebnisse

Da HCV Lipidtropfen benötigt, um zu replizieren (Miyanari et al. 2007), untersuchten wir Leberstanzbiopsate von Patienten mit chronischer Hepatitis C immunhistochemisch mit Antikörpern gegen die konstitutiv an Lipidtropfen lokalisierten Proteine Perilipin 1 und 2 (Wolins et al. 2006). Zum Vergleich diente Lebergewebe von Patienten mit einer chronischen Hepatitis B, einer nicht-viralen Hepatitis (AIH-Patienten) sowie Normallebergewebe.

4.1 Lipidtropfen-assoziierte Proteine bei Leberbiopsien von Patienten mit chronischer Hepatitis C

Zur Untersuchung von Steatose und Perilipin-Expression bei chronischer Hepatitis C verwendeten wir ein klinisch gut charakterisiertes Kollektiv von 231 Leberbiopsien aus den Jahren 1996 bis 2002 (freundliche Gabe von Dr. Volker Dries, Prof. Dr. Uta Drebber, Pathologie Köln). Von den 231 Patienten waren 57,58 % männlich und 42,42% weiblich. Die Altersverteilung lag im Schnitt bei 42,21 ± 12 Jahren mit einem medianen Lebensalter von 41 Jahren. Bei 71 (30,74%) Patienten wurde als Infektionsmodus der chronischen Hepatitis C ein intravenöser Drogenkonsum angegeben. Bei 26 Patienten bestand eine Komorbidität mit einer anderen (ausgeheilten) viralen Hepatitis. 4 Patienten wiesen zum Zeitpunkt der Biopsie neben einer chronischen Hepatitis C noch eine andere aktive virale Hepatitis auf. 3 Patienten waren zum Zeitpunkt der Biopsie mit HIV koinfiziert. Bei 111 Patienten wurde ein Alkoholkonsum angegeben. Dieser variierte im Bereich von minimal / gelegentlich bis hin zum Alkoholabusus. 18 Patienten hatten neben einer chronischen Hepatitis C noch eine andere Lebererkrankung wie bspw. eine AIH oder andere Auffälligkeiten wie eine Hepato(spleno)megalie oder Ösophagusvarizen, die mit einer hepatozellulären Schädigung assoziiert sind. Bei diesen Patienten wurden klinische und histologische Parameter mit dem HCV-Genotyp korreliert. Ein Teil der Patienten wurde gemäß dem damals bestehenden Therapieregime bereits mit Interferon therapiert.

4.1.1 Klinische Charakteristika des HCV-Kollektivs

Zuerst wurde das vorhandene HCV-Kollektiv klinisch und histologisch nach HCV-Genotyp getrennt charakterisiert. Die klinischen Laborparameter der einzelnen Patienten wurden nach HCV-Genotyp getrennt ausgewertet (Tab. 7 und 8). Für jeden Parameter wurde der Mittelwert mit Standardabweichung berechnet. Da nicht alle Parameter bei jedem Patienten bekannt waren, wurde jeweils für jede Berechnung die Stichprobengröße angegeben.

Den höchsten Mittelwert bei den Serumtransaminasen AST und ALT wiesen mit 35,7 U/l und 61,9 U/l Patienten mit HCV-Genotyp 4 auf, gefolgt von den Patienten mit HCV-Genotyp 3. Die γ-GT-Werte waren mit einem Mittelwert von 66,6 U/l bei Patienten mit unbekanntem Genotyp am höchsten. Die Alkalische Phosphatase (AP) war im Mittel bei HCV-Genotyp 4 mit 140 U/l am stärksten erhöht. Patienten mit HCV-Genotyp 2 wiesen mit 0,88 mg/dl den höchsten Mittelwert für Gesamtbilirubin auf. Patienten mit HCV-Genotyp 1 (798.569,34 IU/ml) und bei unbekanntem HCV-Genotyp (800.366,67 IU/ml) wiesen die höchsten Viruslast-Mittelwerte auf. Größere Standardabweichungen als Mittelwerte ergaben sich bei Viruslast und γ-GT-Spiegel (Tab. 7).

Die HCV-Patienten hatten im Mittel annähernd gleiche Werte bei Albumin, bis auf den einen Patienten mit HCV-Genotyp 6, mit einem Wert von nur 47,4 g/l. Mittelwerte für Cholinesterase (CHE) waren in einem Bereich von 5,36 bis 7 kU/l. Die HCV-Patienten zeigten BMI-Mittelwerte von 22,4 bis 25,79 kg/m^2. Die Glucose-Mittelwerte lagen zwischen 89,12 mg/dl und 100,71 mg/dl. Mit einem Mittelwert von 125,92 mg/dl zeigten Patienten mit unbekanntem Genotyp die höchsten Werte bei den TAGs. Die Mittelwerte für die γ-Globuline waren im Bereich von 17,13 % bis 21,73 %. Der Patient mit HCV-Genotyp 6 zeigte den höchsten Cholesterinwert (229 mg/dl) und hatte zudem im Vergleich zu den anderen HCV-Patienten einen Ausreißerwert bei γ-Globulinen (26,8%) und Glucose (73 mg/dl) (Tab. 8).

Tab. 7: Klinische Parameter der HCV-Patienten Teil 1

Parameter	HCV-Genotyp					
	1	2	3	4	6	Nicht getestet/ unbekannt
Alter [a]						
Median	43	41	33	38	46	45,5
MW	43,43	41,82	33,09	39	46	45,68
SD	11,85	10,41	8,13	2,94	-	12,73
N	116	17	34	7	1	56
Geschlecht (♂) [%]	52,59	47,06	67,65	85,71	100	60,71
AST [U/l]						
MW	28,1	26,8	29,9	35,7	24	29,7
SD	21,3	20,3	22,8	28	-	26,6
N	116	17	34	7	1	56
ALT [U/l]						
MW	47,6	49,2	57,8	61,9	32	46,1
SD	42,3	48,1	52,5	44,9	-	39,1
N	116	17	34	7	1	56
γ-GT [U/l]						
MW	40,6	31,6	31,9	53,9	21	66,6
SD	47,7	40	40,7	68,8	-	197,2
N	116	17	34	7	1	56
AP [U/l]						
MW	120	124	126	140	49	123
SD	50	54	74	73	-	45
N	112	17	33	7	1	56
Bilirubin(gesamt) [mg/dl]						
MW	0,64	0,88	0,67	0,59	0,6	0,82
SD	0,42	0,85	0,35	0,25	-	0,54
N	114	17	33	7	1	56
Viruslast [IU/ml]						
MW	798.569,34	622.200	693.757,5	363.500	-	800.366,67
SD	1.009.947,01	466.505,16	657.027,44	181.726,44	-	667.698,51
N	61	10	18	2	0	15

N: Stichprobengröße, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung.

Tab. 8: Klinische Parameter der HCV-Patienten Teil 2

Parameter	HCV-Genotyp					
	1	2	3	4	6	Nicht getestet/ unbekannt
Albumin [g/l]						
MW	60,29	59,77	60,25	55,73	47,4	57,82
SD	4,80	6,54	6,51	11,02	-	7,06
N	106	17	33	7	1	43
CHE [kU/l]						
MW	6,13	5,82	5,72	5,36	7	5,64
SD	1,57	1,76	1,82	2,24	-	1,81
N	112	17	33	7	1	43
BMI [kg/m^2]						
MW	24,61	25,71	23,09	23,11	22,40	25,79
SD	3,89	4,54	3,34	2,39	-	4,2
N	116	17	34	7	1	56
Glucose [mg/dl]						
MW	95,93	100,71	89,12	90,86	73	98,23
SD	34,11	23,22	11,68	13,59	-	25,59
N	108	17	34	7	1	48
TAG [mg/dl]						
MW	118,56	114,13	103,03	114,2	144	125,92
SD	78,65	77,99	60,87	35,56	-	77,55
N	108	16	33	5	1	48
Cholesterin [mg/dl]						
MW	184,53	187,19	159,42	148,6	229	187,13
SD	37,80	45,00	48,34	30,40	-	42,73
N	108	16	33	5	1	48
γ-Globuline [%]						
MW	17,13	18,18	17,56	21,73	26,8	19,59
SD	4,11	5,66	5,47	9,93	-	7,05
N	105	17	33	7	1	43

N: Stichprobengröße, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung.

4.1.2 Steatose und Perilipin-Expression in Leberbiopsien von Patienten mit chronischer Hepatitis C

Perilipin 2 als ubiquitär vorkommendes, konstitutiv an Lipidtropfen gebundenes Protein wurde als aussagekräftiger Marker für Lipidtropfenakkumulation beschrieben (Straub et al. 2013). Perilipin 2 markiert somit auch sehr kleine Lipidtropfen und könnte somit den Grad der Steatose histologisch noch genauer beschreiben.

Die Leberbiopsien wurden dabei konventionell mit H&E und immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Perilipin 1 und Perilipin 2 gefärbt. Der Steatosegrad wurde über die H&E- und die Perilipin 2-Färbung in Prozent der Parenchymfläche geschätzt. Der Steatosegrad gemäß H&E-Färbung wurde bereits im Vorfeld diagnostisch erhoben und im Rahmen dieser Arbeit statistisch ausgewertet. Die immunhistochemischen Färbungen (Perilipin 1 und 2) wurden nach Färbeintensität in Anlehnung an den IRS-Score (immunhistochemischer Score von 0 = negativ bis 3 = stark positiv) in dieser Arbeit zusätzlich evaluiert (Remmele und Stegner 1987).

4.1.2.1 Steatose in Leberbiopsien verschiedener HCV-Genotypen

In der Literatur wurde bereits ein Zusammenhang zwischen dem Steatosegrad und den HCV-Genotypen beschrieben und gilt als gesichert. Demnach wiesen Leberbiopsien von Patienten mit HCV-Genotyp 3 einen höheren Steatosegrad auf als Leberbiopsien von Patienten mit HCV-Genotyp 1 (Campana et al. 2018). Auch in diesem HCV-Kollektiv wurde dieser Zusammenhang überprüft und der HCV-Genotyp (mit weiterer Unterteilung nach HCV-Subtypen) mit dem Steatosegrad gemäß H&E-Färbung in Leberbiopsien von Patienten mit chronischer Hepatitis C korreliert.

Im Wilcoxon-Test zeigte sich dabei ein signifikanter (p= 0,014) Unterschied im Steatosegrad zwischen HCV-Genotyp 3a und 1b (Abb. 5).

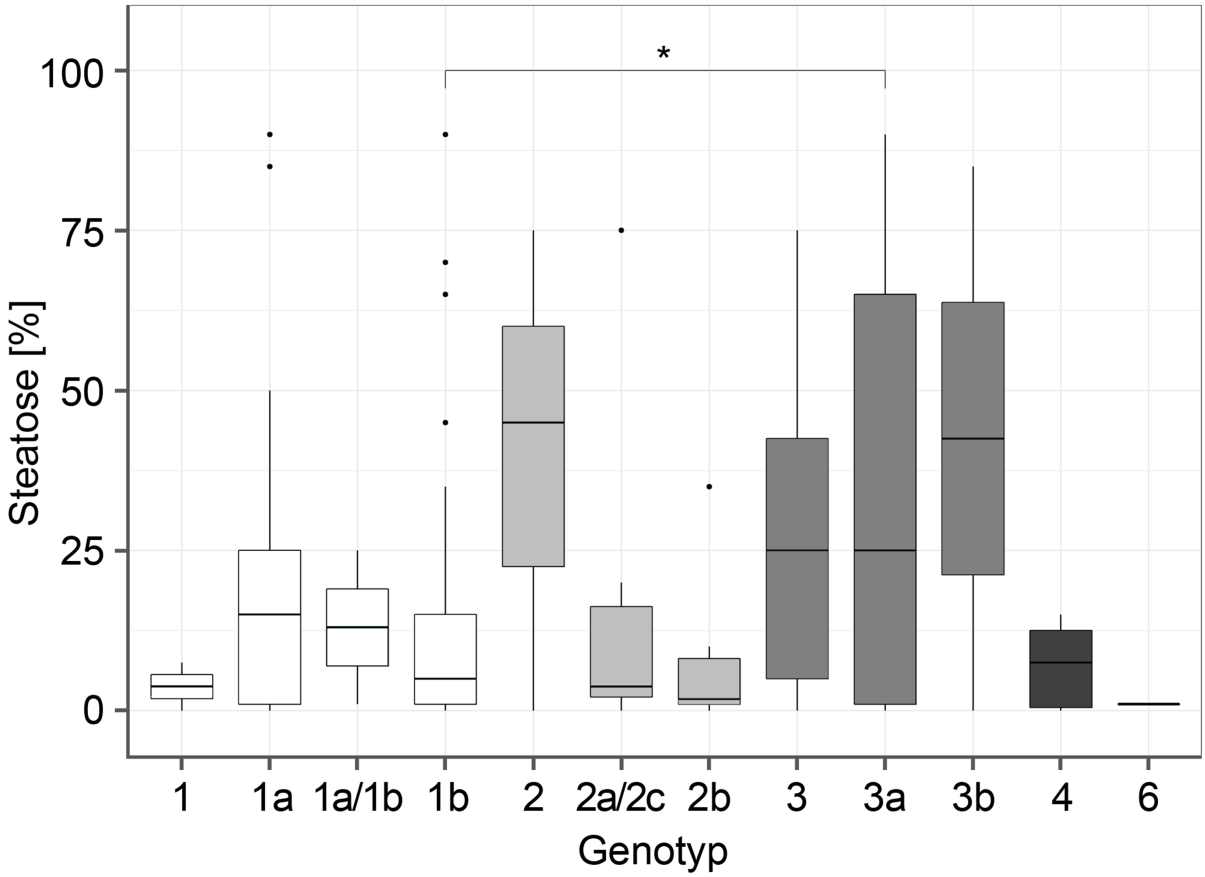


Abb. 5: Box-Plot-Analyse der HCV-Genotypen in Relation zur Steatose gemäß H&E-Färbung. ***:** p = 0,014.

In den zusätzlich angefertigten immunhistochemischen Färbungen gegen Perilipin 1 und 2 zeigten sich ebenfalls Unterschiede im Grad der Steatose zwischen den verschiedenen HCV-Genotypen.

Leberbiopsien von Patienten mit HCV-Genotyp 3 wiesen im Durchschnitt den größten Mittelwert (2,27) des Perilipin2-Scores auf, gefolgt von Leberbiopsien von Patienten mit unbekanntem HCV-Genotyp (Perilipin 2 Score = 1,92), HCV-Genotyp 1 (Perilipin 2 Score = 1,85), 4 (Perilipin 2-Score = 1,79) und 2 (Perilipin 2 Score = 1,75) (vgl. dazu Abb. 6 und Tab 9).

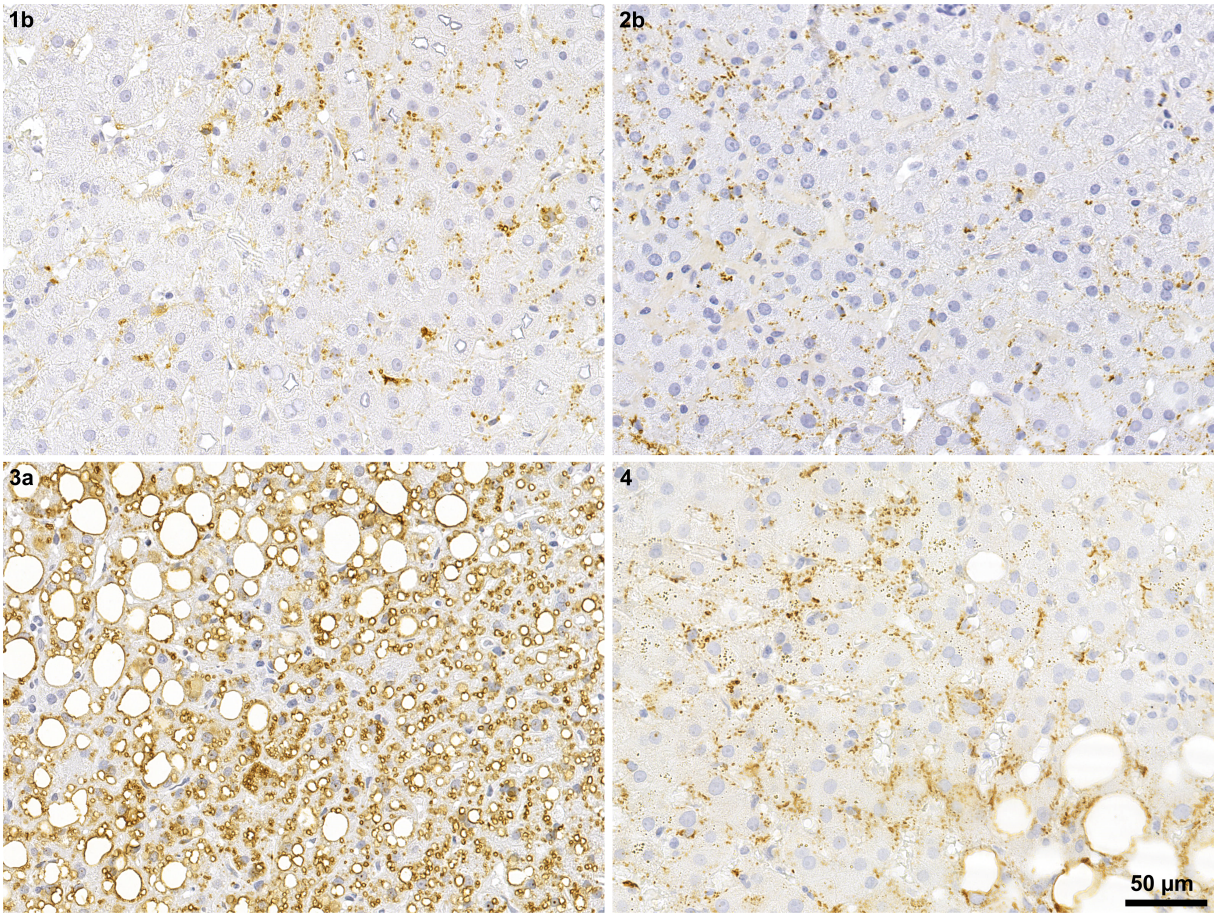


Abb. 6: Repräsentative Beispiele der Immunhistochemie von Perilipin 2 in Leberbiopsien von Patienten mit chronischer Hepatitis C. Leberbiopsien mit mikrovesikulärer Steatose bei HCV-Genotyp 1b und 2b, sowie gemischt mikro- und makrovesikulärer Steatose bei HCV-Genotyp 3a und 4.

Der Perilipin 1-Score in Leberbiopsien von Patienten mit HCV-Genotyp 3 war ebenfalls im Mittel am höchsten mit einem Wert von 1,66. Verglichen mit dem Perilipin 1-Score von Leberbiopsien von Patienten mit dem gleichen HCV-Genotyp war der Mittelwert des Perilipin 2-Scores bei allen HCV-Genotypen höher. Der Steatosegrad war, sowohl gemessen an der H&E- als auch an der Perilipin 2-Färbung, bei Leberbiopsien von Patienten mit HCV-Genotyp 3 im Mittel am höchsten (Tab. 9).

Tab. 9: Auswertung von Perilipin-Expression und Steatosegrad in Leberbiopsien verschiedener HCV-Genotypen

Parameter	HCV-Genotyp					
	1	2	3	4	6	Nicht getestet/ unbekannt
PLIN1-Score [0–3]						
MW	1,15	1,3	1,66	0,71	-	1,26
SD	0,5	0,56	0,71	0,27		0,53
N	114	16	34	7		56
PLIN2-Score [0–3]						
MW	1,85	1,75	2,27	1,79	-	1,92
SD	0,79	0,73	0,79	0,49		0,74
N	114	16	34	7		56
Steatose gemäß PLIN2 [%]						
MW	15,72	16,15	35,71	14,36	1	23,24
SD	20,94	24,07	32,63	15,59	-	24,47
N	115	17	34	7	1	55
Steatose gemäß H&E [%]						
MW	12,54	17,09	34,03	6,93	1	18,15
SD	18,46	25,38	32,69	6,72	-	22,95
N	116	17	34	7	1	55

PLIN1: Perilipin 1, PLIN2: Perilipin 2, N: Stichprobengröße; MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung.

Mithilfe des Statistik-Programms *R* wurde ein Streudiagramm erstellt, in dem der Steatosegrad (gemäß H&E- und Perilipin 2-Färbung) mit den Serumtransaminase-Werten (AST und ALT) korreliert wurde. Der Korrelationskoeffizient R wurde nach Spearman berechnet. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt. Es ergaben sich p-Werte von < 0,001, weshalb das Ergebnis als signifikant einzustufen ist. Der Steatosegrad korrelierte positiv mit der Höhe der Serumtransaminase-Werten. Es ergaben sich Korrelationskoeffizienten in einem Bereich von 0,33 bis 0,46 (vgl. Streudiagramme Abb. 7). Weitere Berechnungen ergaben keine signifikante Korrelation zwischen dem Steatosegrad und der Viruslast.

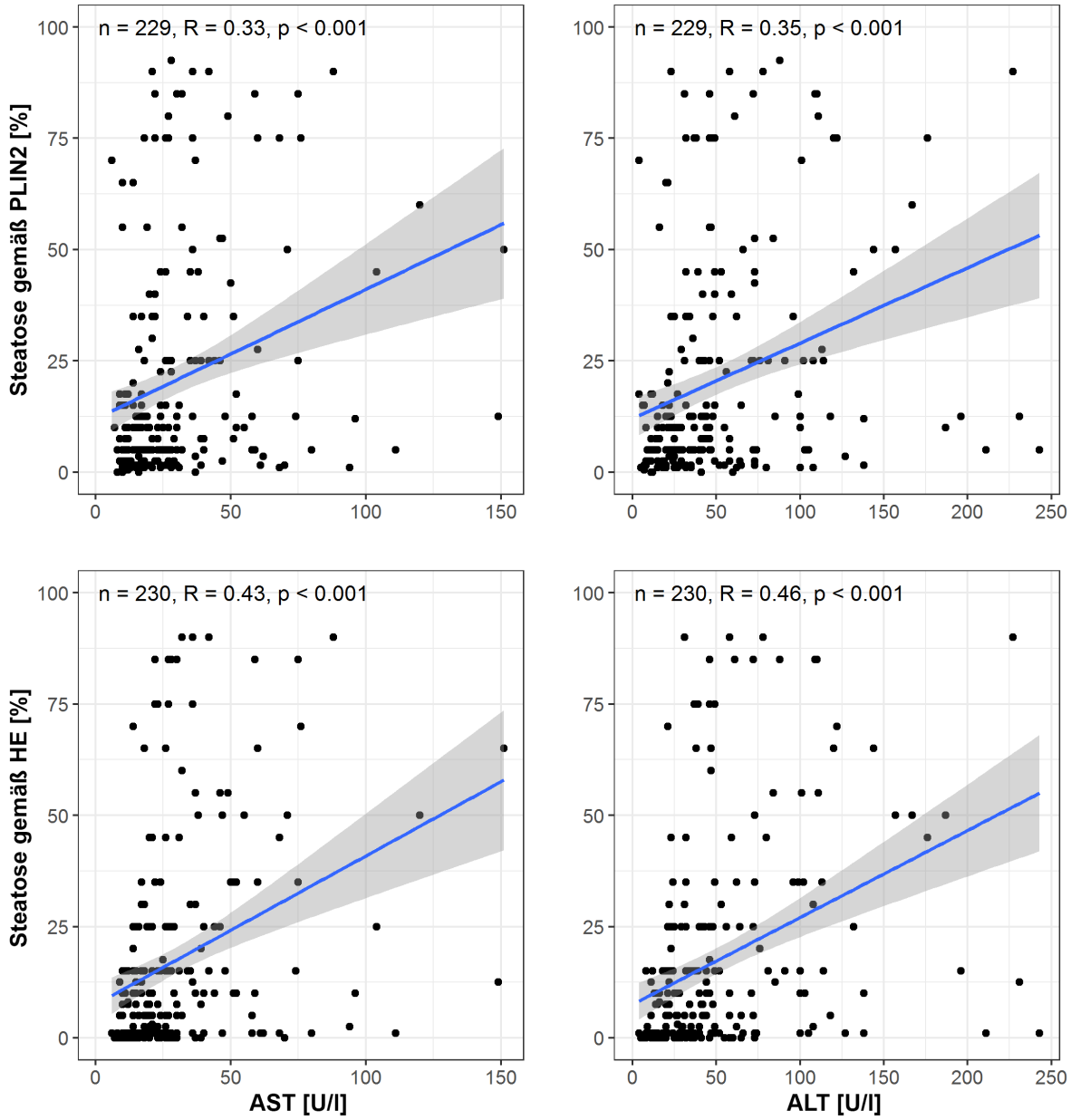


Abb. 7: Streudiagramme mit Spearman Korrelation des Steatosegrads mit den Serumtransaminasen AST und ALT. PLIN2: Perilipin 2.

4.1.2.2 Perilipin-positive Foci in Leberbiopsien von Patienten mit chronischer Hepatitis C

Bei der Untersuchung der immunhistochemisch gefärbten Leberbiopsien von Patienten mit chronischer Hepatitis C wurden häufig und regelmäßig Perilipin-positive Foci, definiert als zusammenliegende Gruppen von stark zytoplasmatisch Perilipin 1 oder 2-gefärbten Hepatozyten, die sich deutlich von der Umgebung hervorhoben, nachgewiesen. Stichprobenartig wurde die Größe der Perilipin-positiven Foci erfasst, welcher im Mittel 11 Hepatozyten betrug. Leberbiopsien konnten dabei mehrere, unterschiedlich große Perilipin-positive Foci aufweisen. Eine zonale Bevorzugung der Perilipin-positiven Foci konnte nicht festgestellt werden: Foci waren gleichermaßen in Zone 1, 2 oder 3 nachweisbar.

Perilipin 1 und 2-Immunhistochemie sowie PAS-Färbungen wurden von sequentiell erstellten Schnitten der Leberbiopsien angefertigt, wodurch eine Vergleichbarkeit der einzelnen Färbungen untereinander gewährleistet werden konnte. Perilipin-positive Foci, welche in der Perilipin 1-Färbung allenfalls schemenhaft auszumachen waren, waren vor allem in der Perilipin 2-Färbung gut und klar abgegrenzt. Eine zytoplasmatische Färbung zeigte sich in Hepatozyten der Perilipin-positiven Foci, welche sonst nur in ballonierten Hepatozyten vorkam. Die Foci waren in der Perilipin 1- und Perilipin 2-Färbung miteinander nicht immer vollständig deckungsgleich. Insbesondere die Perilipin 1-Färbung zeigte weniger Positivität und wie bereits beschrieben eine zonale Bevorzugung um Zone 3 (Straub et al. 2008). In der PAS-Färbung konnte man in einigen Fällen Lipidtropfen in den Bereichen erkennen, die der Perilipin-positiven Foci entsprachen, jedoch hoben sich diese Bereiche in der PAS-Färbung farblich schlecht ab (Abb. 8), es war keine stärkere PAS-Positivität erkennbar, also keine verstärkte Glykogenspeicherung in den Perilipin-positiven Foci. Immunfärbungen, die exemplarisch für Perilipin 3 und 5 durchgeführt wurden, zeigten keine eindeutig abgrenzbaren Foci.

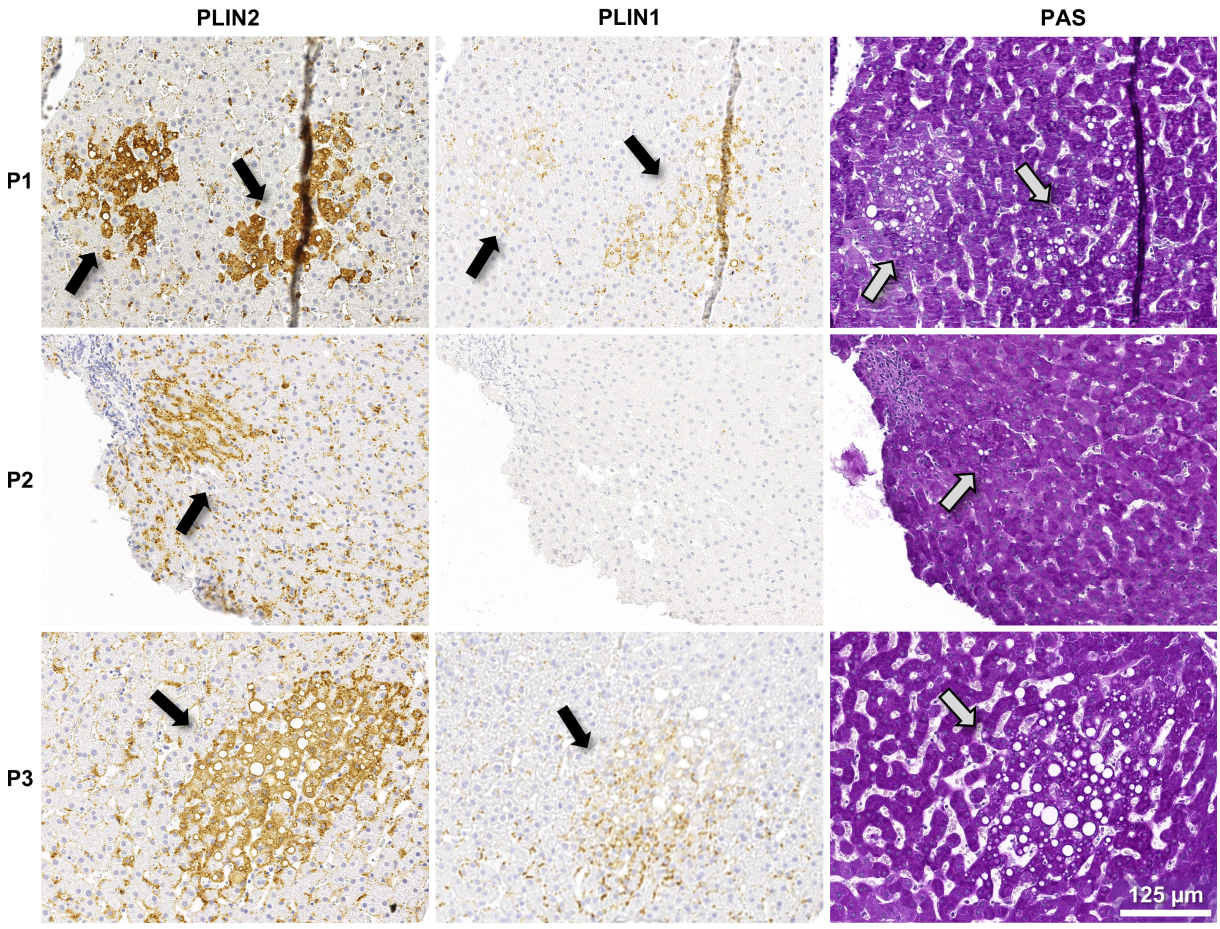


Abb. 8: Perilipin-positive Foci bei Patienten mit chronischer Hepatitis C. P1, P2 und P3: 3 verschiedene Patienten, Pfeile: Perilipin-positive Foci in Serienschnitten in der Perilipin 1 und 2-Immunhistochemie (PLIN1, PLIN2) und in der PAS-Färbung.

4.1.2.2.1 Anteil Perilipin-positiver Foci bei Leberbiopsien von Patienten mit chronischer Hepatitis C

Bei einer Stichprobengröße n = 227 der Immunhistochemie wiesen 22,03 % aller Leberbiopsien klar abgrenzbare Perilipin 1-positive Foci und 36,12 % klar abgrenzbare Perilipin 2-positive Foci auf. Weitere statistische Auswertungen der Perilipin-positiven Foci wurden bei den Leberbiopsien getrennt nach HCV-Genotyp durchgeführt. Der Anteil an Perilipin-positiven Foci wurde berechnet und angegeben. Zudem wurde stichprobenartig in den jeweiligen Perilipin-positiven Biopsien der Anteil an Perilipin-positiven Hepatozyten an allen Hepatozyten berechnet. Dabei wies die HCV-Genotypgruppe 4 mit 57,14 % den höchsten Anteil an Leberbiopsien mit Perilipin 2-positiven Foci im Vergleich zu den anderen HCV-Genotypgruppen auf. Die HCV-Genotypgruppe 1 wies mit 29,82 % den höchsten Anteil an Leberbbiopsien mit Perilipin 1-positiven Foci im Vergleich zu den anderen HCV-Genotypgruppen auf.

Den höchsten Anteil an Foci mit einem Mittelwert von 45 % gemessen an allen Hepatozyten innerhalb einer Biopsie wiesen Leberbiopsien von Patienten mit HCV-Genotyp 3 auf (Tab. 10).

Tab. 10: Perilipin-positive Foci in chronischer Hepatitis C bezogen auf die HCV-Genotypen

Parameter	HCV-Genotyp					
	1	**2**	**3**	**4**	**6**	**Nicht getestet/ unbekannt**
Anteil PLIN2-Foci [%]	35,09	50	23,53	57,14	-	39,29
N	114	16	34	7		56
Anteil PLIN1-Foci [%]	29,82	18,75	11,76	0	-	16,07
N	114	16	34	7		56
Anteil Foci an allen Hepatozyten [%]						
MW	13	8	45	10	-	23
SD	15	4	38	6		26
N	51	10	16	4		33

PLIN1: Perilipin 1, PLIN2: Perilipin 2, N: Stichprobengröße, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung.

4.1.2.2.2 Korrelation Perilipin-positiver Foci mit der Steatose

Um den Steatosegrad mit dem Vorhandensein Perilipin-positiver Foci in der Perilipin 2-Färbung vergleichen zu können, wurden Wilcoxon-Tests mit dem Programm *R* durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurden nur Leberbiopsien berücksichtigt, die entweder keine oder klar abgrenzbare Foci aufwiesen (hier definiert als Kategorie 1 oder 0). Patienten mit fraglichen Foci (hier definiert als Kategorie 2) wurden bei dieser Auswertung ausgeschlossen. Leberbiopsien, welche keine Foci aufwiesen, zeigten im Mittel einen Steatosegrad von 6,85 % (gemäß Perilipin 2-Färbung), wohingegen Leberbiopsien mit Perilipin 2-positiven Foci einen signifikant ($p < 0,001$) höheren Steatosegrad (gemäß Perilipin 2-Färbung) von 11,67 % zeigten. Leberbiopsien ohne Foci zeigten einen mittleren Steatosegrad von 6,14 % (gemäß H&E-Färbung) und Leberbiopsien mit Perilipin 2-positiven Foci einen mittleren Steatosegrad von 8,06 % (gemäß H&E-Färbung). Der Vergleich des Steatosegrades gemessen an der H&E-Färbung war ebenfalls signifikant ($p < 0,001$). Die Effektstärken betrugen 0,57 in der Auswertung der Steatose gemäß Perilipin 2-Färbung und 0,31 in

der Auswertung der Steatose gemäß H&E-Färbung (Abb. 9). Bei schwergradiger Steatose waren in den meisten Fällen typischerweise keine abgrenzbaren Foci erkennbar.

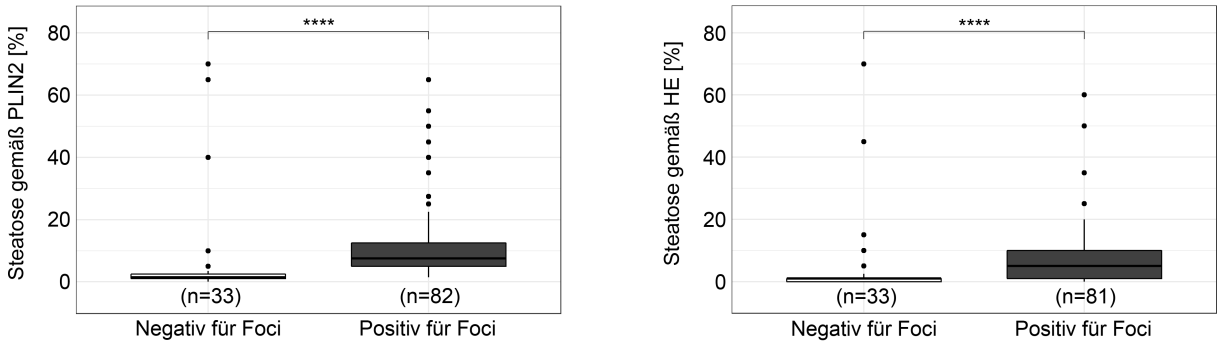


Abb. 9: Vergleich des Vorhandenseins Perilipin 2-positiver Foci mit dem Steatosegrad gemäß H&E- sowie Perilipin 2-Färbung. ****: p-Wert < 0,001. PLIN2: Perilipin 2.

Viele der Biopsien mit einem besonders hohen Steatosegrad wurden der Kategorie 2 (fragliches Vorhandensein von Foci) zugeordnet. Bei 60% der HCV-Leberbiopsien wurde eine relevante Lebersteatose von > 5% festgestellt, meist eine milde Steatose, während bei 19% der Leberbiopsien eine mäßige bis ausgeprägte Steatose gesehen wurde (Anhang Tab. 1). Typischerweise waren Perilipin-positive Foci bei gering- bis mittelgradiger Steatose am häufigsten (Abb. 10).

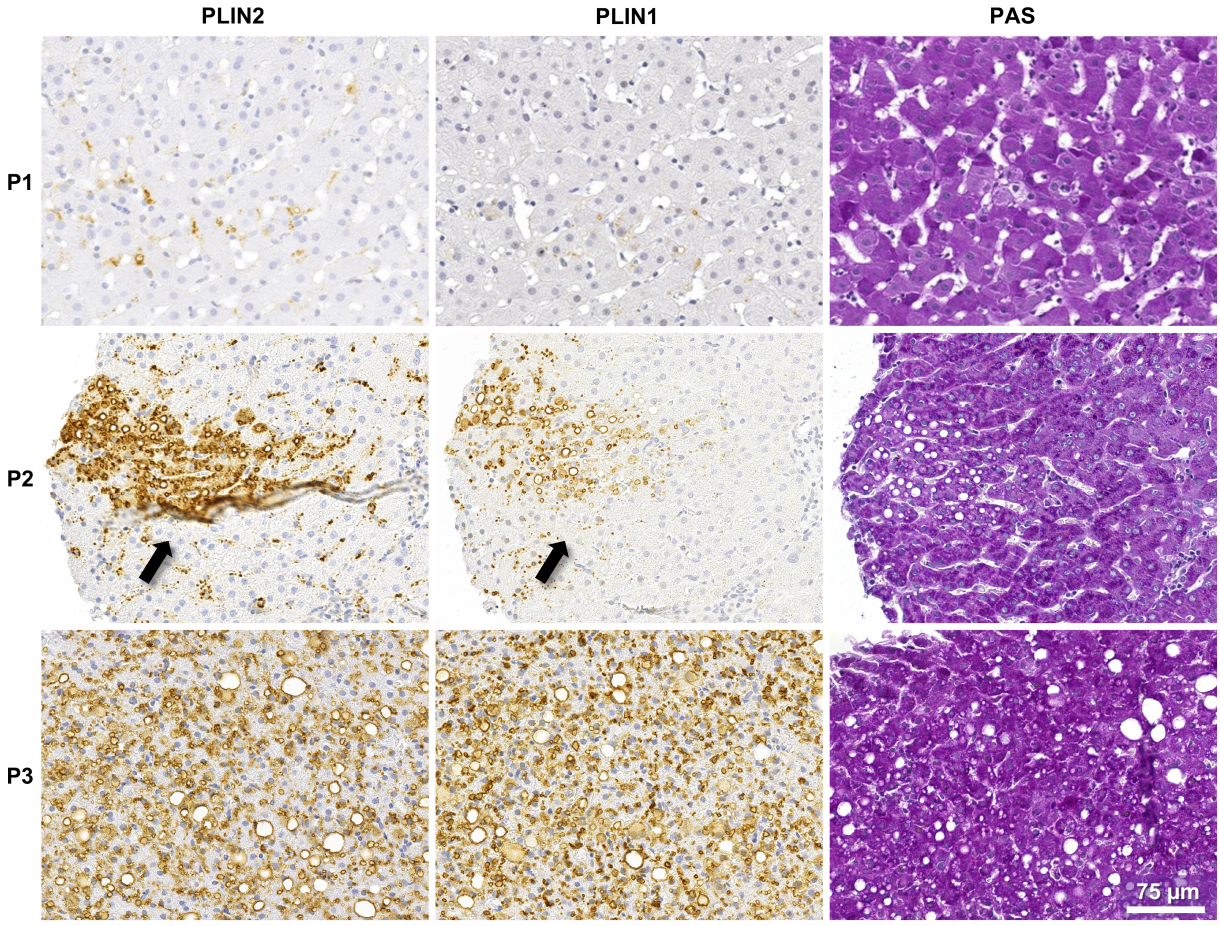


Abb. 10: Perilipin-positive Foci in chronischer Hepatitis C mit unterschiedlichem Steatosegrad. Bei einem Patienten (exemplarisch P1) mit leichter Steatose waren keine Foci erkennbar. Bei ausgeprägter Steatose (exemplarisch P3) waren keine Foci erkennbar. Bei mittelgradiger Steatose (exemplarisch P2) waren Foci (Pfeile) am besten sichtbar. PLIN1: Perilipin 1, PLIN2: Perilipin 2.

Zudem konnte bei geringer Verfettung Perilipin 2 in „Hepatic Stellate Cells“ nachgewiesen werden. Bei hoher Verfettung wurde Perilipin 2 fast ausschließlich in den Hepatozyten exprimiert.

Histologische Untersuchungen von Leberbiopsien bei Patienten mit chronischer Hepatitis C zeigten einen Zusammenhang sowohl zwischen Steatosegrad und HCV-Genotyp als auch zwischen Steatosegrad und Höhe der Serumtransaminase-Werten. In den immunhistochemischen Färbungen waren Perilipin-positive Foci vor allem bei geringer bis mittelgradiger Steatose sichtbar, während bei stärkerer Steatose aufgrund der starken Immunfärbung keine Foci abgrenzbar waren.

4.2 Lipidtropfen-assoziierte Proteine bei chronischer Hepatitis B und anderen viralen Hepatitiden

Um zu klären, ob Perilipin-positive Foci nur bei HCV-infizierten Lebern nachweisbar sind und somit spezifisch für eine HCV-Hepatitis oder doch ein generelles virales Phänomen darstellen, wurden Leberbiopsien von Patienten mit anderen viralen Hepatitiden untersucht. Da die diagnostischen Befunde zu den jeweiligen Fällen vorhanden waren und sich bei den HCV-Patienten zeigte, dass bei übermäßiger Verfettung Perilipin-positive Foci nicht klar abgrenzbar waren, wurden vor allem Fälle herausgesucht, welche in der Routinediagnostik eine Verfettung von unter 15 bis 20 % aufwiesen. Somit fand im Gegensatz zum HCV-Kollektiv eine Vorselektion statt und Leberbiopsien mit einer erhöhten Verfettung wurden ausgeschlossen.

4.2.1 Lipidtropfen-assoziierte Proteine bei Leberbiopsien von Patienten mit chronischer Hepatitis B

Zum Vergleich wurden Leberbiopsien von Patienten mit Hepatitis B verwendet: Hierbei ist von Vorteil, dass das HBsAg immunhistochemisch stabil gefärbt werden kann und somit direkt virale Bestandteile in Leberbiopsien sichtbar gemacht werden (Nayak und Sachdeva 1975).

Es wurden 32 Leberbiopsien und ein Leberresektat von Patienten mit einer chronischen Hepatitis B untersucht. Routinemäßig wurde bei jedem Patienten sowohl die entzündliche Aktivität (Grading von 0 - 4), als auch das Ausmaß der Fibrose (Staging von 0 - 4) bestimmt (Desmet et al. 1994; Longerich et al. 2008). Im Durchschnitt lag das Grading bei 1,56 und das Staging bei 2. Bei 27 Patienten lagen klinische Daten zur HBV-DNA-Viruslast vor. Diese betrug im Durchschnitt 7.183.971 IU/ml ± 29.659.236, 6 IU/ml bei einem Median von 4.000 IU/ml (Anhang Tab. 2).

Innerhalb einer Leberbiopsie zeigte sich in der Perilipin 2-Immunhistochemie oft ein inhomogenes Färbungsmuster von schwach bis kräftig angefärbten Arealen (Abb. 11)

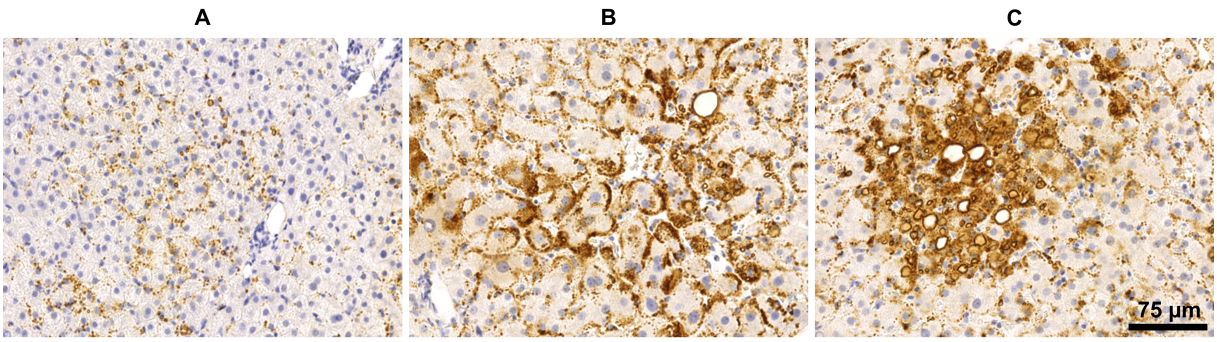


Abb. 11: Verschiedene Bereiche in einer Perilipin 2-gefärbten Leberbiopsie eines Patienten mit chronischer Hepatitis B. A, B, C: 3 verschiedene Bereiche einer Leberbiopsie.

In 6 der 33 Proben (18 %) waren Perilipin-positive Foci nachweisbar, die vor allem in der Perilipin 2-Färbung gut sichtbar waren. In der Perilipin 1-Färbung waren diese Foci weniger stark oder nicht sichtbar und auch nicht immer vollständig deckungsgleich mit der Perilipin 2-Färbung (Abb. 12). Zum Vergleich der Perilipin-positiven Foci mit den Hepatitis B-infizierten Zellen wurden immunhistochemische Färbungen für HBsAg angefertigt. Perilipin-positive Foci waren nicht immer und auch nicht vollständig mit den HBsAg-positiven Bereichen deckungsgleich und man konnte keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen den Färbungen feststellen (Abb. 12). Bei einer Leberbiopsie zeigte sich im Randbereich der Perilipin-positiven Foci HBsAg-positive Hepatozyten, wobei der Bereich, der sich in der Perilipin-Färbung als Focus zeigte, ausgespart blieb (Abb. 12 P1).

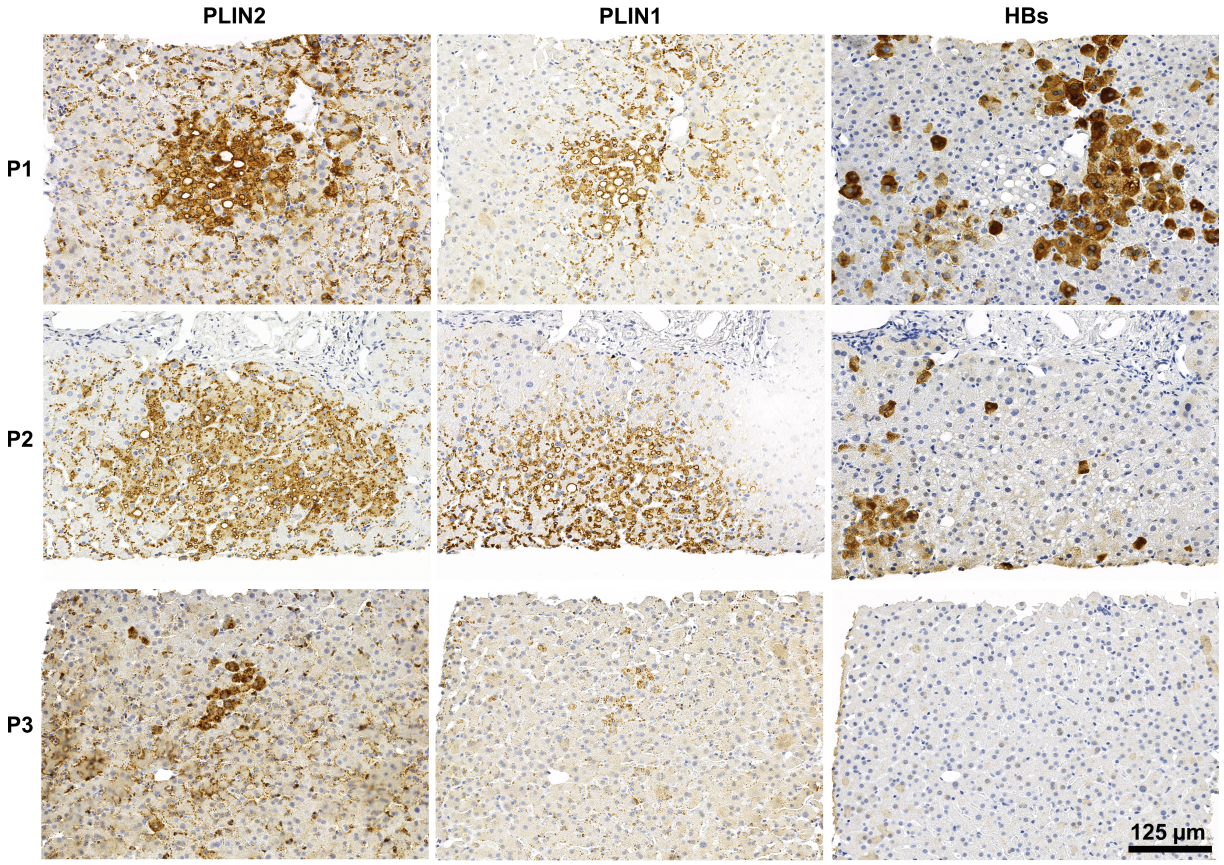


Abb. 12: Immunhistochemie Perilipin-positiver Foci in Leberbiopsien bei chronischer Hepatitis B. P1, P2, P3: 3 verschiedene Patienten. PLIN1: Perilipin 1, PLIN2: Perilipin 2.

Anhand der H&E-Färbung konnten keine Perilipin-positiven Foci vorhergesagt werden. Beim direkten Vergleich der Perilipin- und H&E-Färbungen, zeigten sich nur teilweise mikroskopisch sichtbare Lipidtropfenansammlungen in den Bereichen, die in den Perilipin-Färbungen Perilipin-positive Foci aufwiesen. Und es waren nicht in allen Bereichen, die in der H&E-Färbung Lipidtropfen aufwiesen, Perilipin-positive Foci nachweisbar (Abb. 13).

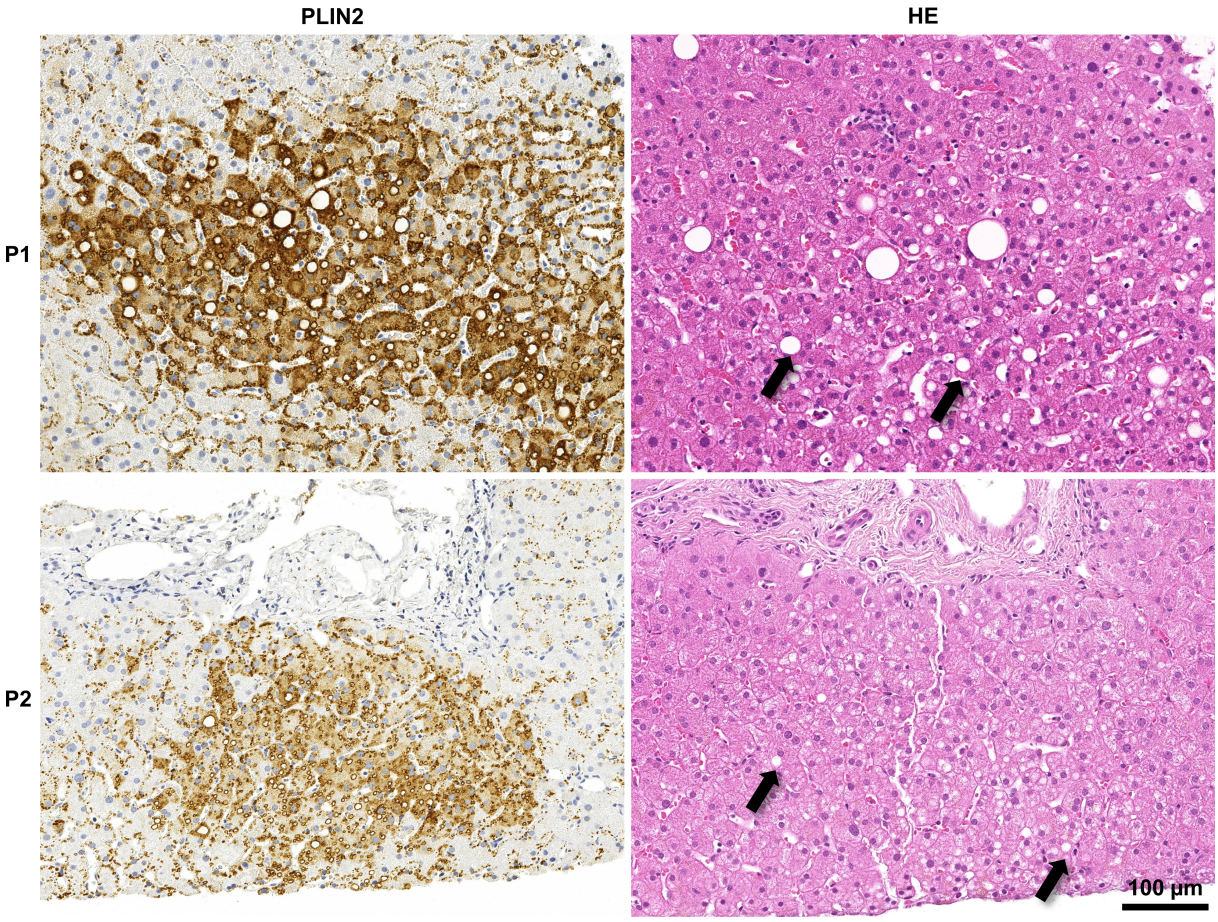


Abb. 13: Vergleich Perilipin 2-positiver Foci in der Immunhistochemie mit H&E-Färbung bei chronischer Hepatitis B. P1, P2: 2 verschiedene Patienten, Pfeile: sichtbare Lipidtropfen in H&E-Färbung, PLIN2: Perilipin 2.

Letztendlich zeigen auch andere virale Hepatitiden Perilipin-positive Foci und es ist somit kein HCV-spezifisches Phänomen. Daneben zeigen die Perilipin-positiven Foci nur eine partielle Überlappung mit den virusinfizierten Zellen.

4.2.1.1 Immunhistochemische Analysen von Leberbiopsien bei chronischer Hepatitis B mit Perilipin-positiven Foci

Um die Ursache für die Entstehung dieser Perilipin-positiven Foci zu untersuchen, wurden weitere immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Die Auswahl der immunhistochemischen Marker (vgl. Tab. 4) beruhte auf den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Ribback, welche klarzellige Foci in Lebern in Hinblick auf eine hepatokarzinogene Ursache untersucht hatte (Ribback et al. 2013). Zusätzlich zeigen beispielsweise hepatozelluläre Adenome bei maligner Transformation neben einer Beta-Catenin-Mutation eine Glutaminsynthetase (GS)-Überexpression (Bioulac-Sage et al. 2007; Di Tommaso et al. 2009). FABP1-Überexpression wurde beim HCC nachgewiesen (Ku et al. 2016). FABP1 soll dabei an der Hochregulation von VEGF-A beteiligt sein und einem sich daraus resultierenden erhöhten angiogenetischem Potential in HCC-Zellen vergesellschaftet sein (Ku et al. 2016).

Die HBsAg-Färbung war in den Perilipin-positiven Foci negativ oder nur in vereinzelten Hepatozyten positiv, die sich außerhalb des Perilipin-positiven Focus befanden. Bei den Leberbiopsien sah man eine homogene Anfärbbarkeit der Hepatozyten für das fettsäurebindende Protein vom Lebertyp (FABP1) und ist somit als normal zu werten (Bioulac-Sage et al. 2007). In den Glutaminsynthetasefärbungen (GS) war eine zonale Färbung in Zone 3 nachweisbar, ohne aberrante GS-Färbung (Bioulac-Sage et al. 2007) (Abb. 14).

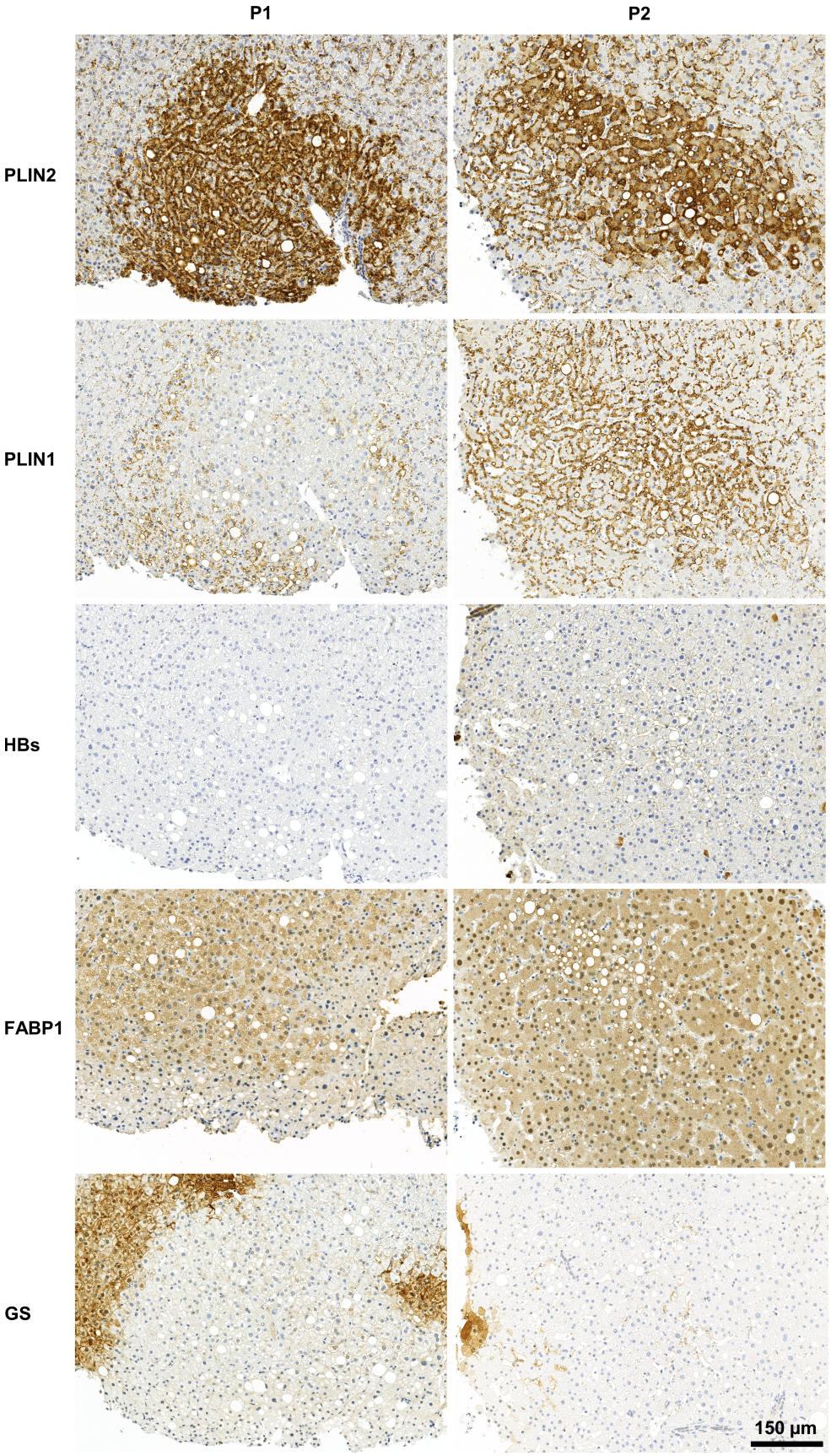


Abb. 14: Immunhistochemie Perilipin-positiver Foci mit Antikörpern gegen Perilipin 2, Perilipin 1, Hepatitis B-Oberflächenantigen, Fettsäure bindendes Protein vom Lebertyp und Glutaminsynthetase bei Leberbiopsien von 2 Patienten mit chronischer Hepatitis B. P1 und P2: 2 verschiedene Patienten, PLIN1: Perilipin 1, PLIN2: Perilipin 2, HBs: Hepatitis B-Oberflächenantigen, FABP1: Fettsäure bindendes Protein vom Lebertyp, GS: Glutaminsynthetase.

4.2.2 Lipidtropfen-assoziierte Proteine in Leberbiopsien von Patienten mit akuter Hepatitis E

Zum Vergleich mit anderen viralen Hepatitiden wurden Leberbiopsien von 4 Patienten mit serologisch und molekularbiologisch bestätigter Hepatitis E und einem durchschnittlichen Alter von 60 ± 11 Jahren analysiert. Auch wenn die Leberbiopsien in der Immunhistochemie positiv für Perilipin 1 und 2 waren, konnte man in keiner der 4 Leberbiopsien Perilipin-positive Foci erkennen. Vor allem um die Zentralvene in Zone 3 waren die Hepatozyten vermehrt Perilipin-positiv und einzelne Hepatozyten waren verstärkt Perilipin 1 und 2 positiv (Abb. 15).

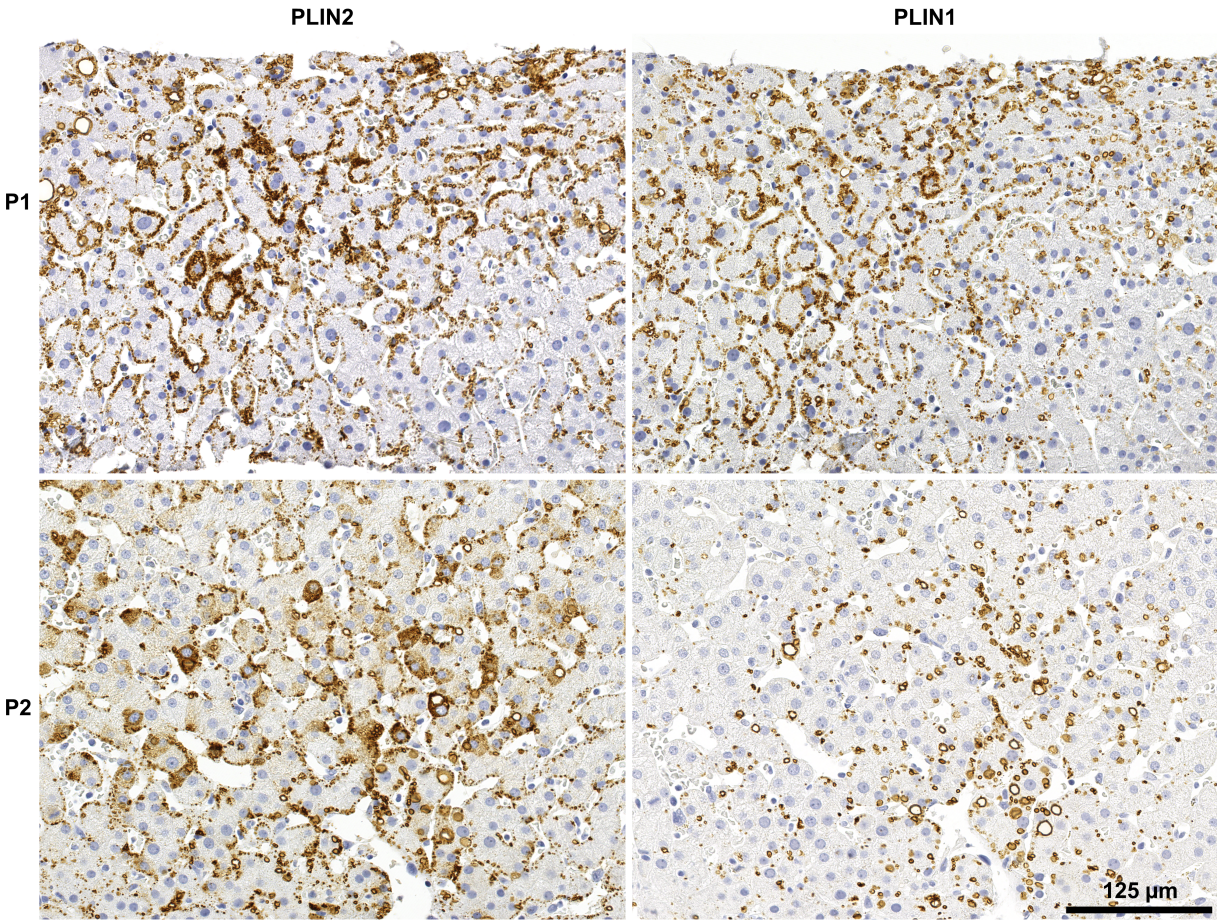


Abb. 15: Repräsentative Immunhistochemie von Perilipinen bei akuter Hepatitis E. P1 und P2: 2 verschiedene Patienten. PLIN1: Perilipin 1, PLIN2: Perilipin 2.

4.3 Lipidtropfen-assoziierte Proteine bei nicht-viralen Hepatitiden

Zum Vergleich des Steatosemusters viraler Hepatitiden und nicht-viraler Hepatitiden wurden Leberbiopsien von insgesamt 12 Patienten (Durchschnittliches Alter: 13 ± 7 Jahre) mit AIH, partiell mit PSC-Overlap. In 3 Leberbiopsien (25 %) waren Perilipin-positive Foci nachweisbar, die in der Perilipin 2-Färbung abermals deutlich besser sichtbar waren als in der Perilipin 1-Färbung. In der PAS-Färbung waren zwar vereinzelt größere Lipidtropfen erkennbar, jedoch ohne klar veränderte Anfärbbarkeit der Hepatozyten, d.h. ohne veränderten Glykogengehalt (Abb. 16).

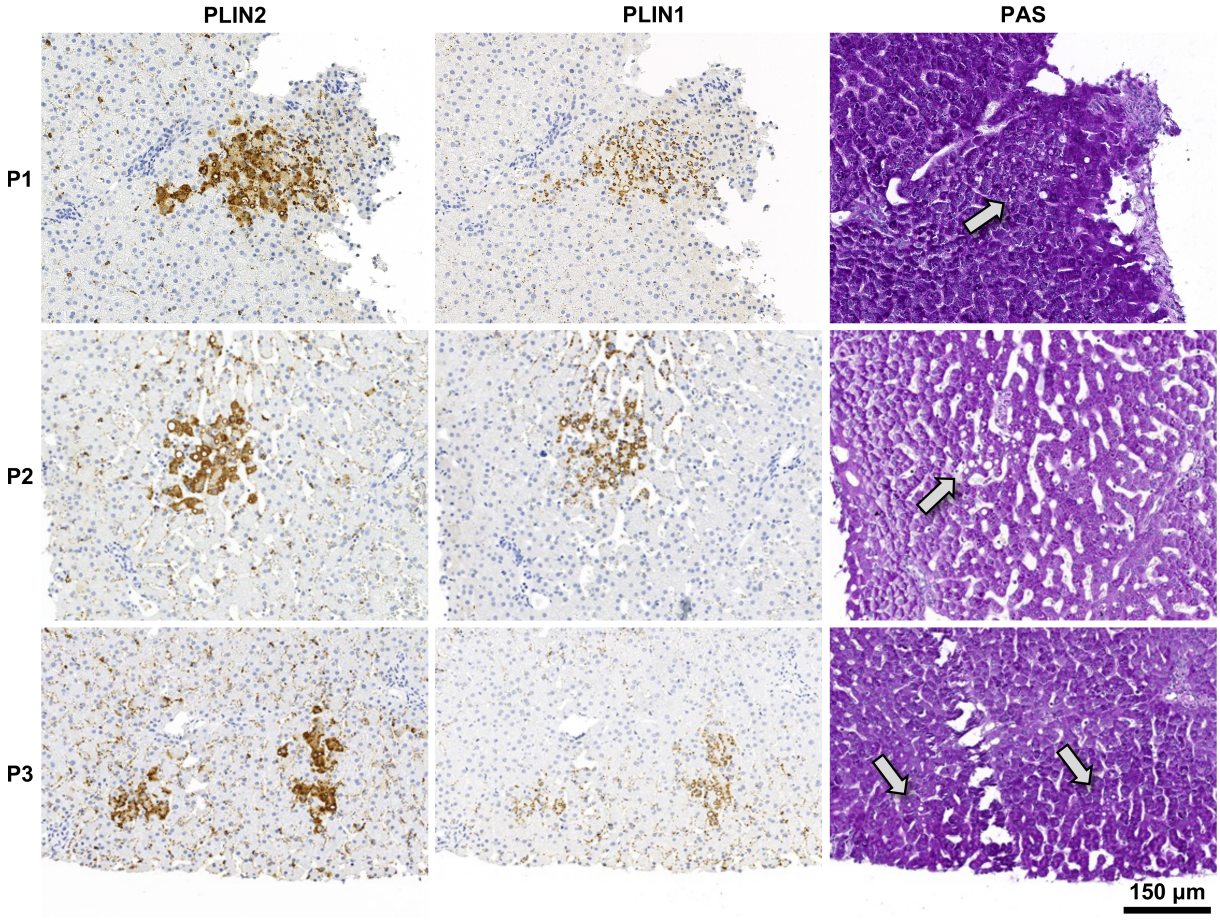


Abb. 16: Immunhistochemie Perilipin-positiver Foci bei AIH sowie teilweise Overlap-Syndrom mit PSC. Pfeile: in H&E-Färbung sichtbare Lipidtropfen. P1: 14-jährige AIH-Patientin mit PSC-Overlap-Syndrom; P2: 15-jähriger AIH-Patient. P3: 16-jähriger AIH-Patient. PLIN 1: Perilipin, PLIN2: Perilipin 2.

Des Weiteren wurde eine Leberbiopsie eines Patienten mit einer PSC untersucht, diese zeigte keine klar abgrenzbaren Perilipin-positiven Foci, jedoch eine starke Anfärbung der Hepatozyten in der Perilipin 2-Immunhistochemie. Die Perilipin 1-

Immunhistochemie war flauer als die Perilipin 2-Immunhistochemie und zeigte die um die Zentralvenen (Zone 3) stärker ausgeprägte Perilipin 1-typische Färbung (Anhang Abb. 2).

Damit sind Perilipin-positive Foci kein Alleinstellungsmerkmal einer viralen Genese, sondern kommen auch in Leberbiopsien von Patienten mit einer nicht-viralen Hepatitis vor.

4.4 Lipidtropfen-assoziierte Proteine in Kontrolllebergewebe

Zu Kontrollzwecken wurde normales Lebergewebe von Patienten verwendet, die wegen Lebermetastasen (n = 15) kolorektaler und neuroendokriner Tumore oder Echinokokkose (n = 1) operiert wurden. Dabei wiesen die Patienten mit Lebermetastasen ein durchschnittliches Alter von 64 ± 11 Jahre auf.

Das Lebergewebe einer 21-jährigen Patientin mit Echinokokkose zeigte keine Steatose, kein aberrantes Perilipin-Färbemuster und im Lebergewebe waren nur wenig Perilipin 1- und 2-positive Lipidtropfen (< 5%) der Parenchymfläche nachweisbar (Abb. 17). Wobei Perilipin 2 vor allem Lipidtropfen in „Hepatic Stellate Cells“ markiert und Perilipin 1 nur in Lipidtropfen von Hepatozyten der Zone 3 nachweisbar waren.

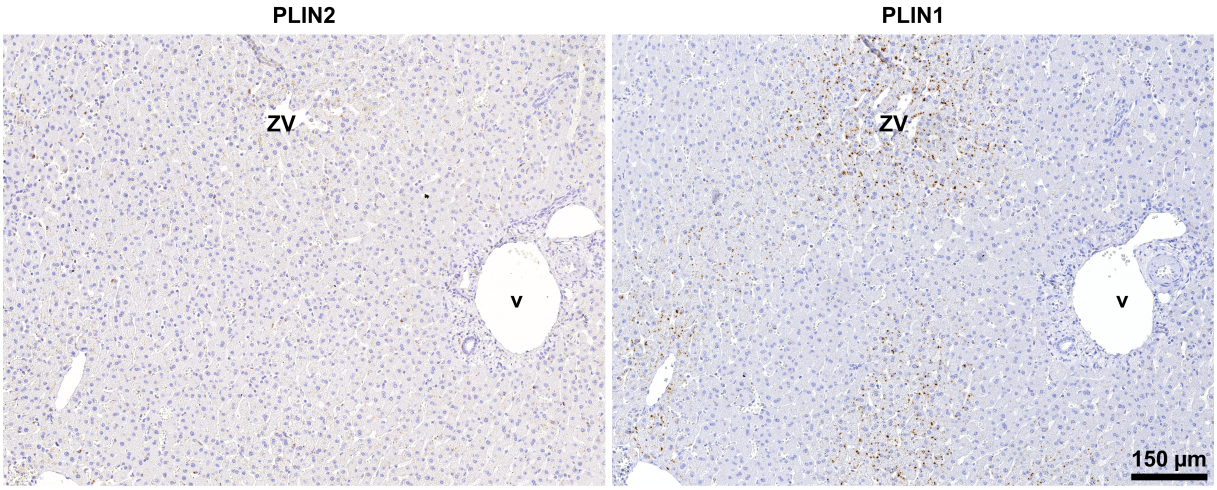


Abb. 17: Immunhistochemie von Perilipin 1 und Perilipin 2 in einer Normalleber. V: Vene im Portalfeld, ZV: Zentralvene, PLIN1: Perilipin: 1, PLIN2: Perilipin 2.

In 3 der 15 Leberresektate (20 %) von Patienten mit Lebermetastasen waren Perilipin-positive Foci erkennbar. In der PAS-Färbung konnte man teilweise im Bereich der Perilipin-positiven Foci eine Abnahme der Farbintensität feststellen (P1 Abb. 18), was auf einen erniedrigten Glykogengehalt der Hepatozyten hindeutete. Das hierfür verwendete Kontrolllebergewebe stammte jedoch von überwiegend älteren Patienten, sodass Effekte von Alter und Vorerkrankungen (Lebermetastasen) möglich sind.

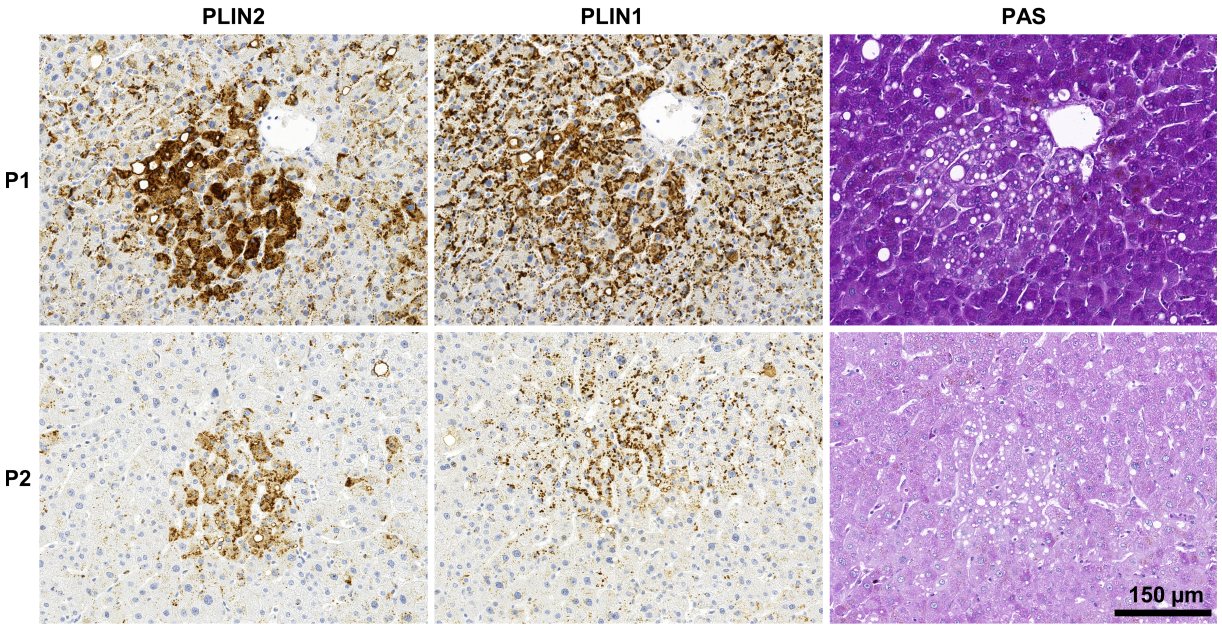


Abb. 18: Perilipin 1 und 2-Immunhistochemie in Normallebern mit Perilipin-positiven Foci. P1: 61-jährige Patientin, P2: 75-jähriger Patient. PLIN1: Perilipin 1, PLIN2: Perilipin 2.

Zusätzlich waren in der PAS-Färbung der Leberresektate partiell PAS-positive, glykogenotische Foci nachweisbar. Hierbei wiesen die Hepatozyten in den gleichen Arealen ein klarzelliges Aussehen mit partieller Anfärbung von Perilipin 1 und 2 in der Immunhistochemie auf (Abb. 19), jedoch ohne Perilipin-positive Foci in diesen Bereichen, so dass es sich bei den glykogenotischen und den Perilipin-positiven Foci um unterschiedliche Foci handelt.

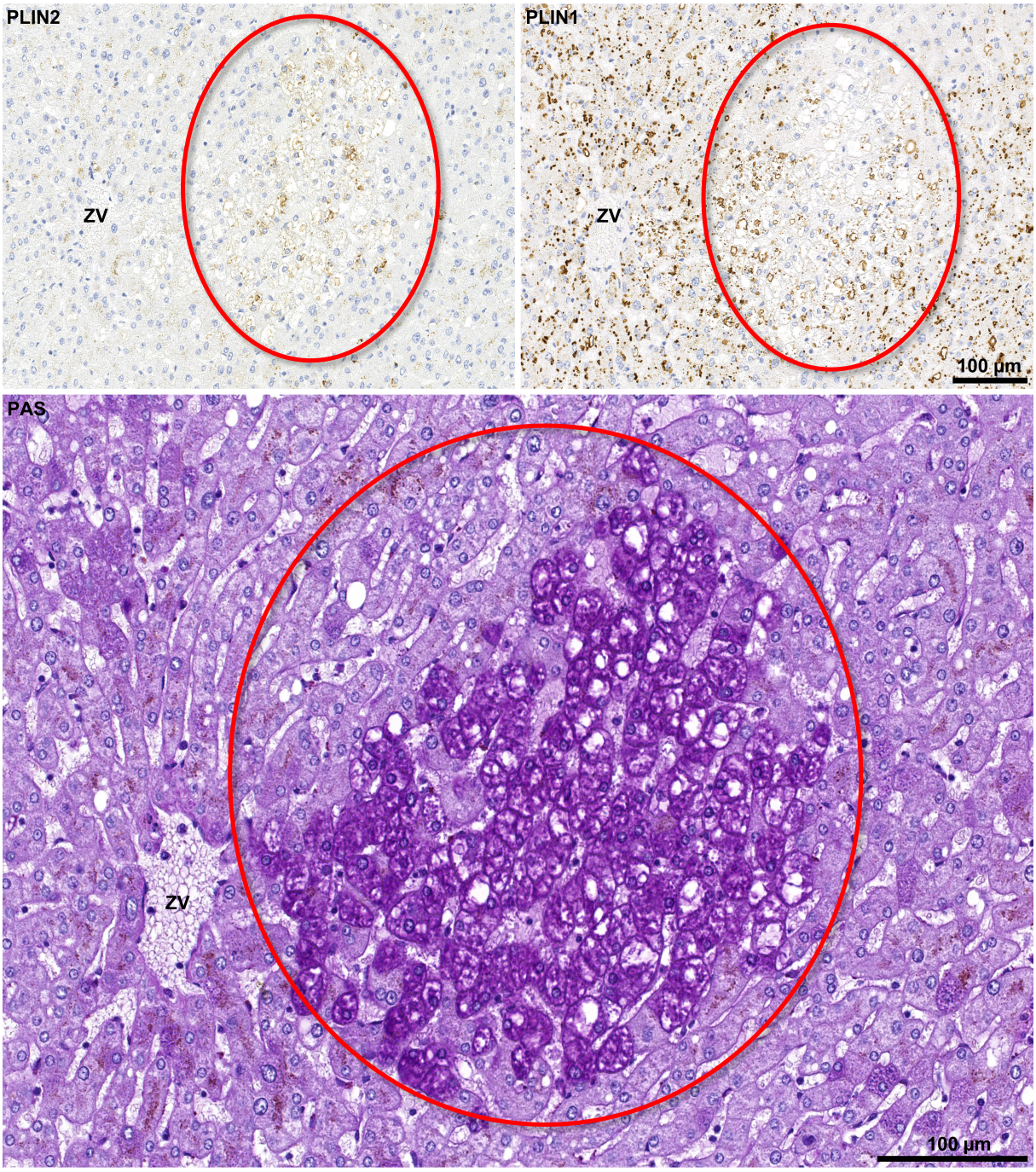


Abb. 19: Glykogenotischer Focus in PAS-Färbung und Perilipin-Immunhistochemie in Normallebergewebe. Rote Umrandung: glykogenotischer Focus, ZV: Zentralvene, PLIN1: Perilipin 1, PLIN2: Perilipin 2.

Zusammenfassend konnte man Perilipin-positive Foci auch in Normallebergewebe detektieren. Glykogenotische Foci überlappen nicht mit Perilipin-positiven Foci.

4.5 Immunhistochemische und ultrastrukturelle Analyse Perilipin positiver-Foci

Bei den vorangegangenen Analysen war noch unklar geblieben, um was es sich bei den Foci handelt, da sie zwar unterschiedlich häufig, jedoch grundsätzlich bei viralen, nicht-viralen Hepatitiden und in normalem Lebergewebe vorkommen. Wie bei den Leberbiopsien von Patienten mit chronischer Hepatitis B wurden auch hier zur Frage der Genese der Foci weitere immunhistochemische Färbungen sowie Transmissionselektronenmikroskopie durchgeführt. Ki-67 diente als Proliferationsmarker (Sun und Kaufman 2018). Zudem wurden noch ultrastrukturelle Analysen durchgeführt, um die Besonderheit der Perilipin-positiven Foci genauer zu untersuchen.

In einem Beispiel eines durch Größe und durch besonders charakteristisches Aussehen ausgewähltes Perilipin-positiven Focus wiesen sowohl die H&E- als auch die PAS-Färbungen eine Entfärbung durch den Lipidgehalt auf. In der Ki-67-Immunhistochemie waren einzelne proliferationsaktive Hepatozyten nachweisbar (< 5% Ki-67-Proliferationsrate) (Abb. 20). Die GS-Immunhistochemie zeigte im gleichen Areal einen Verlust der Färbung mit gefärbten Randsaum und somit eine auffällige Inhomogenität in diesem Bereich (vgl. hierzu Abb. 20 mit Anhang Abb.4).

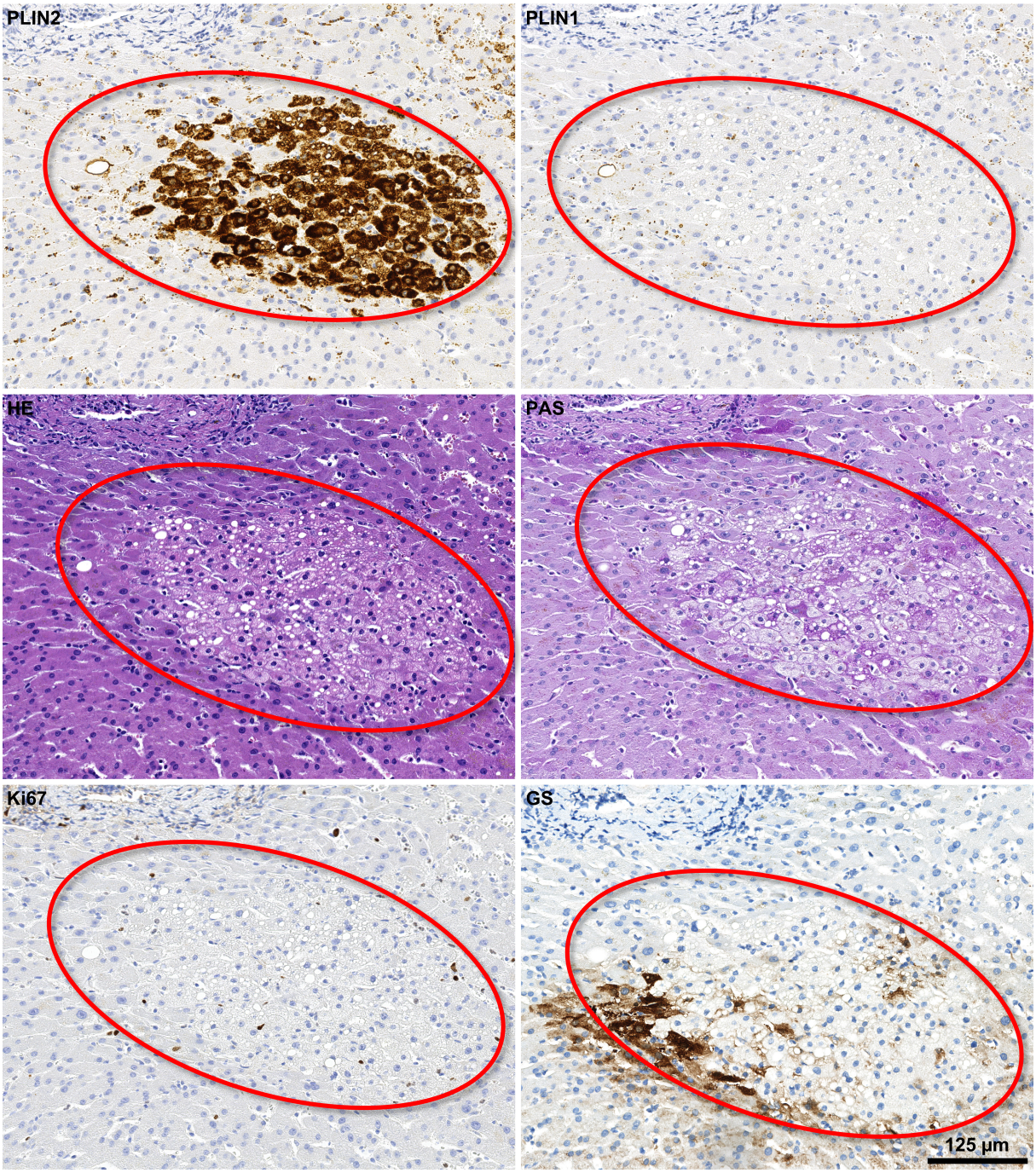


Abb. 20: Immunhistochemie mit Antikörpern gegen Perilipin 1, Perilipin 2, Ki-67 und Glutaminsynthetase in Vergleich zu H&E- und PAS-Färbung in einem Leberresektat eines Patienten mit geringer Steatose. Rote Umkreisung: Perilipin 2-positiver Focus-Bereich. PLIN1: Perilipin 1, PLIN2: Perilipin 2, GS: Glutaminsynthetase.

Aufgrund der Größe des Focus gelang es, an FFPE-Material eine Umbettung für die Transmissionselektronenmikroskopie zu erzielen, um die Ultrastruktur des Focus evaluieren zu können.

Die Transmissionselektronenmikrospie des Perilipin-positiven Focus (vgl. Abb. 20) zeigte eine scharfe Abgrenzung von Hepatozyten des Focus, die reich an Lipidtropfen

waren und daneben Hepatozyten außerhalb des Focus, die wenige bis gar keine Lipidtropfen aufwiesen (Abb. 21). Es war keine Vermehrung von Glykogen in den Hepatozyten des Focus nachweisbar.

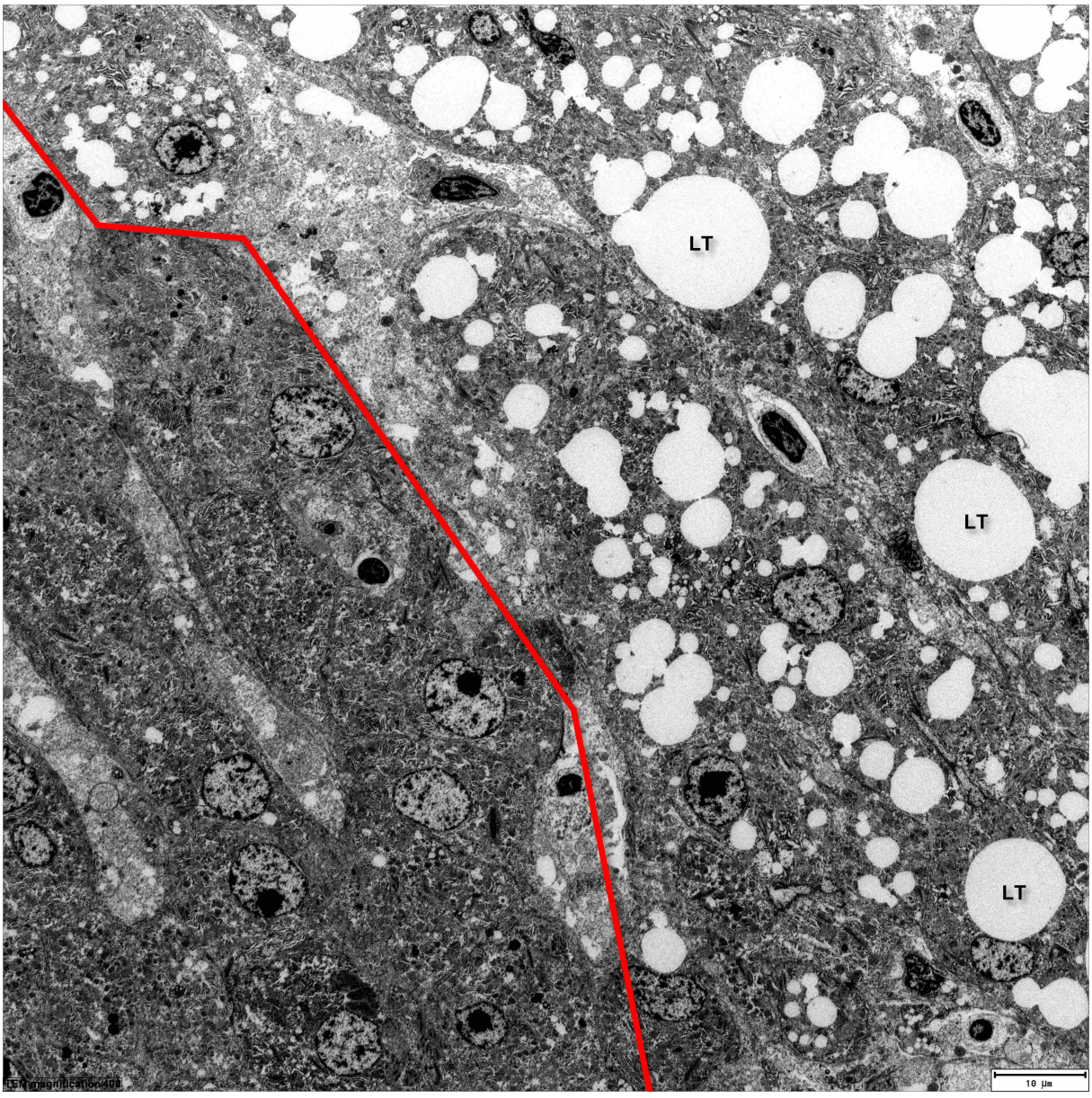


Abb. 21: Transmissionselektronenmikroskopie eines Perilipin-positiven Focus. Die rote Linie markiert die Abgrenzung zwischen Hepatozyten des Focus reich an kleinen Lipidtropfen (LT) und Hepatozyten außerhalb des Focus mit wenigen Lipidtropfen. Maßstab: 10 µm.

In den angrenzenden Hepatozyten waren Aberrationen der Mitochondrien mit deutlichen Größenvariationen und parakristallinen Einschlüssen nachweisbar (Abb. 22). Diese Mitochondrienaberrationen waren sowohl in den Hepatozyten des Focus als auch in benachbarten Hepatozyten vorhanden und nicht Focus-spezifisch. Ggf.

sind die Mitochondrienaberrationen Zeichen etwaiger systemischer Therapien bei bekanntem Krebsleiden oder anderweitiger Medikamente.

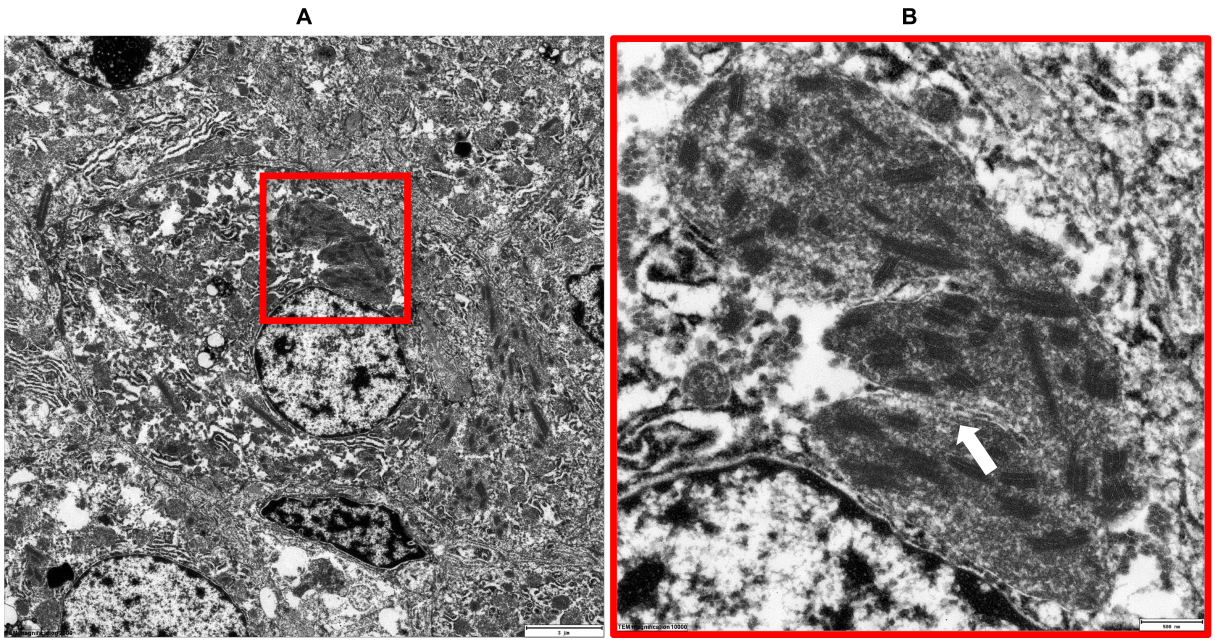


Abb. 22: Transmissionselektronenmikroskopie des angrenzenden Lebergewebes. Vgl. TEM Abb. 21. Bild B: vergrößerter Ausschnitt von Bild A. Maßstab Bild A: 3 µm, Maßstab Bild B: 500 nm, Pfeil: parakristalline Einschlüsse in den Mitochondrien.

Schlussendlich zeigten immunhistochemische und ultrastrukturelle Analysen eines Focus eine Verschiebung der GS-Färbung sowie in der Transmissionselektronenmikroskopie eine scharfe Abgrenzung zwischen Hepatozyten reich an Lipidtropfen und Hepatozyten ohne Lipidtropfen, passend zum immunhistochemischen Befund der starken Perilipin-Expression.

5 Diskussion

Die Leber spielt eine entscheidende Rolle beim Lipidmetabolismus: Sie ist für Aufnahme, Synthese, Verpackung und Sekretion von Lipiden und Lipoproteinen verantwortlich. Gallensäure wird benötigt, um Lipide aufnehmen zu können. In extremen Fastenzuständen kann die Leber aus Fettsäuren Ketonkörper synthetisieren, um diese als internen Energieträger zu nutzen. Ohne eine suffiziente hepatische Lipidaufnahme und -sekretion können wichtige fettlösliche Vitamine (E, D, K und A) nicht aufgenommen werden und es kann zu Vitaminmangelzuständen führen. (Trefts et al. 2017)

Viele Lebererkrankungen gehen mit einer Steatose einher. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Lipidtropfen und assoziierte Proteine bei chronischer Hepatitis C und anderen chronischen Hepatitiden im Vergleich zu Kontrolllebergewebe untersucht und erstmalig im Rahmen dieser Dissertation wurden Perilipin-positive, mikrovesikulär steatotische Foci beschrieben. Hierbei war auffällig, dass Lipidtropfen aber auch Perilipin positive Foci in weitgehend altersentsprechendem Lebergewebe („Normalleber“) vorlagen.

5.1 Repräsentativität der Kollektive

Die 231 untersuchten Patienten des hier untersuchten HCV-Kollektivs wiesen eine nahezu ausgeglichene Geschlechterverteilung (42,42 % : 57,58 %/ ♀ : ♂) auf und deckten verschiedene Altersgruppen mit einem mittleren Alter von 42,21 ± 12 Jahren ab, wodurch eine gewisse Repräsentativität gewährleistet war. Bei 71 Patienten (30,74 %) wurde intravenöser Drogenkonsum als Infektionsmodus der chronischen Hepatitis C angegeben, was im Einklang mit anderen Studien steht, die gezeigt haben, dass Drogenkonsum ein häufiger Risikofaktor für die Entstehung einer HCV-Infektion ist (Alter 2002; Zhou et al. 2019). Bei 26 Patienten (11 %) bestand eine Komorbidität mit einer anderen ausgeheilten viralen Hepatitis. 4 Patienten wiesen zum Zeitpunkt der Biopsie neben einer chronischen Hepatitis C noch eine andere virale Hepatitis auf. Koinfektionen sind durchaus typisch und andere Studien zeigen eine Prävalenz für eine HBV/HCV-Koinfektion von über 10 % (Liaw 1995; Liaw 2002). 3 Patienten waren zum Zeitpunkt der Biopsie mit HIV koinfiziert, was ca. 1 % des hier untersuchten

Kollektivs ausmacht. Dabei scheint die allgemeine Prävalenz einer HIV-Koinfektion bei HCV-Patienten sogar bis zu 10 % zu erreichen (Kupin 2017). Bei insgesamt 111 Patienten (48 %) wurde ein Alkoholkonsum angegeben. Auch dies ist nicht unüblich bei HCV-Patienten und wurde schon in anderen Studien beobachtet, wobei hier sogar bei bis zu 60 % der HCV-Patienten Alkoholkonsum in der Anamnese berichtet wurde (Jamal et al. 2005). Koinfektionen, wie bspw. eine HBV/HCV-Koinfektion oder auch ein zusätzlicher Alkoholkonsum können einen durch die chronische Hepatitis C hervorgerufenen hepatozellulären Schaden noch weiter aggravieren und das Risiko für die Entwicklung einer Leberzirrhose und damit für die Entstehung eines HCCs erhöhen (Jamal et al. 2005; Yang et al. 2016b; Shih und Liu 2020). Somit bestanden bei einem relevanten Teil der Patienten neben der chronischen Hepatitis C noch weitere Risikofaktoren, die einen Leberschaden begünstigen, weshalb man das Ausmaß der hepatozellulären Schädigung in den Leberbiopsien nicht allein auf die chronische Hepatitis C zurückführen kann.

Die statistischen Auswertungen erfolgten bei Patienten mit chronischer Hepatitis C nach jeweiligem HCV-Genotyp getrennt. Die Bestimmung des HCV-Genotyps wurde mittels PCR-Untersuchung durchgeführt. Mittlerweile stehen weitere Bestimmungsmethoden zur Verfügung, wie bspw. das Next-Generation-Sequencing (Barzon et al. 2013; Cunningham et al. 2015), welche eventuell abweichende Ergebnisse liefern könnten. Zudem fanden sich im HCV-Kollektiv Genotyp-Angaben wie 1a/1b oder 2a/2c, was als Rekombination zweier Subtypen gedeutet wurde und jeweils dem Genotyp 1 bei 1a/1b bzw. Genotyp 2 bei 2a/2c zugeordnet und ausgewertet wurde. Es wurde gezeigt, dass - je nach Sequenzierungsmethode - HCV-Genotypen manchmal falsch klassifiziert werden, weshalb in einer Studie zwei Proben mittels VERSANT HCV Genotype 2.0 Assay als 2a/2c Isolate bestimmt wurden, die durch die NS5B-Sequenzierungsmethode als HCV 2k/1b-Genotyp klassifiziert wurden (Keukeleire et al. 2015). Für die Auswertung im Rahmen dieser Arbeit hat dies jedoch eine untergeordnete Rolle, da keine Aussagen bezüglich der Subtypen von HCV-Genotyp 2 gemacht wurden. Gemischte HCV-Infektionen können vor allem auch bei i.v.-Drogenabhängigen vorkommen (Pham et al. 2010), was 71 Patienten des HCV-Kollektiv betreffen könnte. Die Bestimmung solcher gemischter HCV-Infektionen kann jedoch - je nach Sequenzierungsmethode - unterschiedliche Ergebnisse liefern (Forns et al. 1996). Somit ist auch bei dem hier untersuchten HCV-Kollektiv nicht gänzlich ausgeschlossen, dass es Patienten gibt, die mit verschiedenen HCV-Genotypen

infiziert sind und diese nicht strikt einer HCV-Genotypgruppe zugeordnet werden konnten.

Durch weitere Untersuchungen an Lebergewebe von 33 Patienten mit chronischer Hepatitis B und 4 Patienten mit akuter Hepatitis E wurden auch andere virale Hepatitiden evaluiert und so neben chronischen auch akute virale Hepatitiden untersucht. Kontrolluntersuchungen wurden an Lebergewebe von Patienten mit Lebermetastasen (n = 15) oder Echinokokkose (n = 1) durchgeführt. Die Patienten mit Lebermetastasen wiesen im Vergleich einen hohen Altersdurchschnitt (64 ± 11 Jahre) auf, wodurch das Kollektiv ein höheres Durchschnittsalter als die der anderen Kollektive aufwies, was einen möglichen Störfaktor darstellen könnte. So konnte bereits in Mausmodellen gezeigt werden, dass ältere Mäuse bei einer fettreichen Ernährung im Vergleich zu jüngeren Kontrollmäusen eine höhere Anfälligkeit für die Entwicklung einer Leberfibrose als auch einer hepatischen Entzündungsreaktion aufwiesen (Kim et al. 2016). Zudem zeigen Studien an Ratten, dass ältere Ratten im Vergleich zu jüngeren Kontrollratten niedrigere replikative DNA-Synthese-Spiegel in den Hepatozyten aufwiesen (Sawada und Ishikawa 1988). Dies würde somit die These unterstützen, dass ein erhöhtes Lebensalter die Anhäufung hepatozellulärer Schäden begünstigt. Auch aus diesem Grund wurden Untersuchungen an Lebergewebe von AIH-Patienten (n = 12), welche den niedrigsten Altersdurchschnitt aller Kollektive aufwiesen, durchgeführt, wobei dieses Subkollektiv auch gleichzeitig einen Vergleich einer nicht-viralen Hepatitis zu einer viralen Hepatitis darstellte.

5.2 Steatose bei viralen Hepatitiden

In dieser Arbeit wurde erstmals eine Steatose mit konventioneller Lichtmikroskopie von H&E-gefärbten Schnitten und Perilipin-Immunhistochemie in Lebergewebe von Patienten mit chronischer Hepatitis C untersucht und mit Lebergewebe von Patienten mit chronischer Hepatitis B und AIH verglichen. Hierbei wurde Perilipin 2 als guter Marker für eine (mikrovesikuläre) Steatose bei chronischen Hepatitiden validiert (Straub et al. 2013). Lipidtropfen sind essenzielle Zellorganellen im Lebenszyklus von HCV, denn HCV benötigt Lipidtropfen, um zu replizieren und infektiöse Viruspartikel zu generieren (Miyanari et al. 2007). HCV begünstigt zudem eine Steatose (Lonardo et al. 2004). In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse vorangegangener Studien bestätigt, dass je nach HCV-Genotyp Unterschiede im Grad der Steatose vorliegen

und vor allem HCV-Genotyp 3 eine Steatose begünstigt (Asselah et al. 2006; Hourioux et al. 2007; Cross et al. 2010; Roingeard 2013; Campana et al. 2018). Die Viruslast korrelierte hierbei jedoch nicht signifikant mit dem Steatosegrad, sodass es weitere Faktoren geben muss, die entscheidend für eine Lipidtropfenakkumulation bei chronischer Hepatitis C sind. Analysen getrennt nach HCV-Genotyp zeigten, dass bei Patienten mit HCV-Genotyp 1 der Grad der Steatose mit dem BMI assoziiert ist und bei Patienten mit HCV-Genotyp 3a die Steatose mit den HCV-RNA-Spiegeln korrelierte; übergreifende Korrelationen des gesamten Kollektivs zeigten jedoch weder eine Korrelation der Steatose mit dem BMI noch mit der Viruslast (Adinolfi et al. 2001). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es je nach HCV-Genotyp unterschiedliche Risikofaktoren geben könnte, die eine Steatose begünstigen, wobei HCV-Gentoyp 3a direkt steatogen zu sein scheint. Andere Studien bestätigen, dass es je nach HCV-Genotyp unterschiedliche Ätiologien der Steatose gibt; dabei wurde vor allem zwischen HCV-Genotyp 3 und Non-HCV-Genotyp 3-Patienten unterschieden: So sind ein aktueller Alkoholkonsum, Alter und BMI vor allem bei Non-HCV-Genotyp 3-Patienten mit dem Grad der Steatose assoziiert, nicht aber bei HCV-Genotyp 3-Patienten, die alleine durch diesen Genoytp ein höheres Risiko für die Entwicklung einer Steatose tragen (Hui et al. 2002; Monto et al. 2002; Rubbia-Brandt et al. 2004; Björnsson und Angulo 2007). Auch bei HCV/HIV-Koinfektionen scheint die Steatose mit Übergewicht und dem metabolischen Syndrom zu korrelieren (Johnson und Sterling 2020).

Somit stellt sich die Frage, warum HCV-Genotyp 3 als einziger Genotyp einen direkten Einfluss auf eine Steatose aufweist. Die Arbeitsgruppe von L. Rubbia-Brandt diskutiert dabei einen zytopathischen Effekt von HCV-Genotyp 3 (Rubbia-Brandt et al. 2000; Björnsson und Angulo 2007). In Tierversuchen scheint vor allem das HCV-Core-Protein einen Effekt auf die hepatozelluläre Lipidtropfenakkumulation zu haben (Moriya et al. 1997; Björnsson und Angulo 2007). Dabei könnte ein Phenylalanin-Rest an Position 164 des HCV-Core-Proteins von HCV-Genotyp 3 ursächlich für eine höhere Affinität zu Lipiden sein und somit eine Erklärung für den höheren Grad an Steatose bei Patienten mit HCV-Genotyp 3 sein (Hourioux et al. 2007; Chayama und Hayes 2011).

Schlussendlich zeigen sich innerhalb der verschiedenen HCV-Genotypen Unterschiede im biologischen Verhalten. Die Konsequenz für die HCV-Therapie ist folglich, dass individuell nach HCV-Genotyp therapiert werden muss und verschiedene

Kombinationen von DAAs und Interferon eingesetzt werden müssen (Kohli et al. 2014). Trotz der mittlerweile sehr effektiven DAAs wird aber auch ein Einfluss der DAAs auf ein mögliches HCC-Rezidiv diskutiert: So zeigte eine Studie, dass 27,6 % der Patienten mit einer DAA-Therapie aufgrund einer HCV-Infektion ein Rezidiv ihres bereits erfolgreich behandelten HCCs bekamen (Reig et al. 2016). Hierbei könnte die DAA-Therapie einen negativen Einfluss auf die „Immune Surveillance“ haben und vor allem ältere Patienten sollten bei einer bevorstehenden DAA-Therapie sorgfältig gescreent werden (Gao et al. 2020).

5.3 Perilipin-positive Foci

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal Perilipin-positive steatotische Foci bei chronischer Hepatitis C und anderen Hepatitiden beschrieben. Wir definierten diese als zusammenliegende Gruppe von zytoplasmatisch stark Perilipin 2-positiven Hepatozyten, die sich scharf von der Umgebung hervorhoben. Auch in der Perilipin 1-Färbung konnten derartige Foci detektiert werden, jedoch waren die Foci in der Perilipin 1-Immunhistochemie nicht so scharf demarkiert. Eine mögliche Hypothese ist, dass die Foci infizierten (HCV)-Zellen entsprechen könnten, die durch Induktion von HCV oder ein anderes (virales) Agens Lipidtropfen akkumulieren. Die bei chronischer Hepatitis B durchgeführten Korrelationen von Perilipin-positiven Foci mit HBsAg-positiven Zellen zeigten lediglich eine partielle Deckungsgleichheit, was eine virale Genese nicht ausschließt, aber auch nicht beweist. Möglicherweise triggert die Virusgenese die Foci-Entstehung. Bei HCV konnte gezeigt werden, dass die Anzahl von sezernierten Viruspartikeln und ihre Infektiosität in Perilipin 2-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen anstieg, sodass HCV wahrscheinlich für einen Anstieg der Perilipin 2-Expression sorgte (Branche et al. 2016). Dieser Perilipin 2-Expressionsanstieg könnte durchaus in Form von Foci zur Darstellung kommen. Dass Perilipin 2 wichtig für die HCV-Replikation ist, zeigte auch eine Studie, die veranschaulichte, dass der Lipidtropfenzugang für HCV-Core und NS5A-Proteine bei Perilipin 2-Knockout-Mäusen eingeschränkt war und die entstandenen HCV-Partikel Reifestörungen aufwiesen (Lassen et al. 2019). Da das HCV-Core-Protein einen wichtigen Einfluss auf die Lipidtropfenakkumulation zu haben scheint (Moriya et al. 1997; Björnsson und Angulo 2007), könnte somit eine Interaktion von Perilipin 2 und HCV-Core-Protein ein wichtiger Schritt in der Entstehung von Foci sein.

Es konnte weder in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe bei chronischer Hepatitis C mittels RNA-in-situ-Hybridisierung (nicht gezeigt) noch bei chronischer Hepatitis B eine eindeutige Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Viruspartikeln in Hepatozyten, die Perilipin-positive Foci bildeten, gefunden werden. Jedoch zeigte z.B. eine Leberbiopsie eines HBV-Patienten interessanterweise eine HBsAg-Negativität der Hepatozyten in einem Perilipin-positiven Focus mit angrenzenden HBsAg-positiven Hepatozyten. Perilipin-positive Foci könnten dementsprechend Folge einer Virusreplikation sein im Sinne zeitlich aufeinander folgender Prozesse. Bei den Patienten des HCV-Kollektivs lagen zusätzliche weitere Risikofaktoren, wie Alkoholkonsum oder Medikamenteneinnahme vor (Westphal et al. 1994; Monto et al. 2002; Rubbia-Brandt et al. 2004), die - wie bereits erwähnt - eine Lebersteatose begünstigen können und somit auch einen Einfluss auf die Foci-Entstehung haben könnten. Auch eine Koinfektion mit HIV könnte hier eine Rolle spielen. So konnte gezeigt werden, dass bei HBV-HIV-Koinfektion, die HBV-DNA-Clearance geringer war als bei HIV-Negativität (Housset et al. 1992). Hierbei könnte die Entstehung von Perilipin-positiven Foci möglicherweise über eingeschränkte Abwehrmechanismen begünstigt werden.

Da auch bei nicht-viralen Hepatitiden und Kontroll-Normallebergewebe Perilipin-positive Foci gefunden wurden, können Perilipin-positive Foci keine exklusiven Phänomene bei viraler Hepatitis darstellen. Da die Foci vor allem in der Perilipin 2-Färbung deutlich nachweisbar waren und andere Autoren zeigten, dass Perilipin 2 in ballonierten Hepatozyten bei einer NASH stark zytoplasmatisch exprimiert vorliegt (Fujii et al. 2009), könnten Foci Ausdruck einer hepatozellulären Schädigung sein.

In der radiologischen Diagnostik sind multifokal vorkommende steatotische Areale bereits als „Steatosis arreata“ beschrieben; diese können eine Differentialdiagnose zu anderen hepatischen Läsionen wie bspw. Lebermetastasen mit nodulärem Charakter sein, sodass sich eine (radiologische) Differenzierung schwierig gestalten kann (Reinert et al. 2017). Es stellt sich zudem die Frage, ob die radiologisch beschriebenen Verfettungsareale makroskopische Korrelate der von uns beschriebenen mikroskopisch sichtbaren steatotischen Foci darstellen könnten.

5.4 Lipidtropfen-Homöostase in gesunder Leber

Grundsätzlich stellt eine Lipidtropfenakkumulation die pathogenetische Basis von chronischen Lebererkrankungen wie einer NAFLD oder einer AFLD dar (Edmondson et al. 1967; Chalasani et al. 2012). Jedoch kann die Leber und allgemein der menschliche Körper auch nicht ohne Lipidtropfen auskommen, so führt z.B. ein Mangel an Lipidtropfen im Fettgewebe zu einer Lipodystrophie (Onal et al. 2017). Es ist ein Grenzbereich anzunehmen, in dem eine Lipidtropfenvermehrung/ -verminderung noch als normal anzusehen ist und die hier beschriebenen Perilipin-positiven Foci ggf. auch ein physiologisches Phänomen darstellen könnten, (noch) ohne eigentlichen Krankheitswert.

Die in den Lipidtropfen enthaltenen TAGs werden durch Lipolyse oder auch Lipophagie mobilisiert und bspw. für die Membranbiosynthese herangezogen; gleichzeitig schützen Lipidtropfen mit ihrer Speicherfunktion auch die Zellen vor Lipotoxizität, denn erhöhte Mengen an Fettsäuren sind zytotoxisch (Olzmann und Carvalho 2019). Interessanterweise haben Untersuchungen an Mäusen gezeigt, dass hepatische Lipidtropfen eine wichtige Rolle bei der Entgiftung des Karzinogens Aflatoxin B1 spielen und damit die Entstehung eines HCCs verhindern können (Hammoudeh et al. 2020). Lipide scheinen auch eine wichtige Bedeutung für die Leberregeneration zu haben: So zeigten Perilipin 2-Knockout-Mäuse im Vergleich zu Perilipin 2-Wildtyp-Mäusen eine verminderte hepatische TAG-Akkumulation und einen verzögerten Zellzyklus nach partieller Hepatektomie, was mit einer eingeschränkten Leberregeneration einher ging (Kohjima et al. 2013). Interessanterweise wiesen „Smad Interacting Protein-1“-Knockout-Mäuse nach partieller Hepatektomie eine höhere Ki-67-Proliferationsrate, eine höhere Lipidakkumulation und eine erhöhte Perilipin 2-Expression im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auf; „Smad Interacting Protein-1“ ist ein Protein, welches unter anderem mit dem WNT-Signalweg assoziiert ist und die Leberzellregeneration inhibiert (Yang et al. 2016a). Caveolin-1-Knockout-Mäuse zeigen eine reduzierte Lipidakkumulation in Hepatozyten und eine verzögerte Leberregeneration im Vergleich zu Kontrollmäusen; Caveolin-1 ist als Strukturprotein an der Lipid-Homöstase beteiligt. (Fernández-Rojo et al. 2012). Hepatische Sternzellen speichern Vitamin A in Lipidtropfen und werden durch einen hepatischen Schaden aktiviert, wodurch die Anzahl und Größe von Lipidtropfen abnimmt (Leo und Lieber 1982; Blaner et al. 2009). Die Lipidtropfen-Homöostase ist somit maßgeblich für die Funktion des menschlichen Organismus und sowohl ein Mangel als auch eine

Übermaß an Lipidtropfen in der Leber können zu einem Leberschaden führen. Perilipin positive-Foci könnten dabei das histologische Korrelat einer fokalen und temporären Lipidanreicherung eines physiologischen Prozesses z.B. im Rahmen einer Leberzellregeneration darstellen.

5.5 Metabolische Hepatokarzinogenese

Perilipin-positive Foci, welche eine Form der hepatozellulären Schädigung oder sogar eine physiologische Variante darstellen könnten, könnten auch eine allerdings sehr frühe Krebsvorstufe sein. Zwar konnte keine signifikant erhöhte Ki-67-Proliferationsrate der Hepatozyten in den Foci nachgewiesen werden, jedoch war ein verändertes zonales Muster der GS-Färbung vorhanden als Zeichen einer geringen Störung der Leberarchitektur. Eine GS-Überexpression tritt bei hepatozellulären Adenomen mit β-Catenin-Mutation (im Sinne einer Wnt-Aktivierung) als frühes Zeichen einer malignen Entartung auf (Bioulac-Sage et al. 2007; Di Tommaso et al. 2009), und auch HCCs können eine GS-Überexpression aufweisen (Long et al. 2010). Dies war in den Foci nie der Fall.

Die Arbeitsgruppe von Prof. Ribback, Dombrowski und Koautoren zeigten, dass bei diabetischen Ratten durch intraportale Pankreasinselzelltransplantation ein lokaler Hyperinsulinismus hervorgerufen werden kann, wodurch präneoplastische klarzellige Foci in der Leber induziert werden, die sich in den Langzeitexperimenten zu einem HCC entwickeln können (Dombrowski et al. 1997; Ribback et al. 2013). Daran anknüpfend konnten auch glykogenotische, klarzellige Foci in humanen Lebergewebe identifiziert werden, die den beschriebenen Foci in Ratten ähnlich sind (Ribback et al. 2013). Auch im Kontrolllebergewebe unserer Untersuchungen konnten in der PAS-Färbung glykogenotische Foci gezeigt werden, die jedoch nicht mit den von uns beschriebenen steatotischen Foci deckungsgleich waren, sodass es sich um unterschiedliche Herde handeln muss. Bei Mäusen wurde gezeigt, dass ein veränderter Metabolismus mit einer Akkumulation von Lipiden und / oder Glykogen in präneoplastischen und frühen neoplastischen Foci zu einem HCC führen kann (Bannasch et al. 2017). Bannasch und Koautoren stellen glykogenotische und stetatotische Foci in Mäusen deswegen als zwei Seiten derselben Medaille dar. Beim Menschen zeigten frühe HCCs oft eine neoplastische Steatose (Kutami et al. 2000; The International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia 2009). Zusätzlich

zeigten HCCs erhöhte Mengen an mikrovesikulären Perilipin 2-positiven Lipidtropfen, was auch mit der Ki-67-Proliferationsrate korrelierte (Straub et al. 2010) und auf eine Bedeutung der neoplastischen Steatose in HCC bei der Hepatokarzinogenese hinweist. Warburg konnte für den Zuckerstoffwechsel zeigen, dass Tumore ihren Glucosestoffwechsel auf eine anaerobe Glykolyse mit Laktatbildung umstellen (Warburg 1956). Die in Foci nachweisbare Fettsäure- bzw. Glykogenakkumulation spricht somit für einen veränderten Metabolismus wie bei Präneoplasien und Neoplasien. Interessanterweise konnte eine höhere Anzahl an klarzelligen Foci und viralen Infektionen auch in jungen Patienten mit nicht-zirrhotischen, nicht-fibrolammellären HCCs nachgewiesen werden (Cano et al. 2018). Klarzellige oder steatotische Foci scheinen eine hepatozelluläre Schädigung darzustellen, die eine Lebertumorentstehung begünstigen könnte oder zumindest einen „Bystander" darstellt, der mit Tumorentstehung einhergeht.

Das Core-Protein von HCV wurde als potenzielles Onkoprotein bei der HCC-Entstehung diskutiert (Koike 2009). Dabei wird vor allem eine Interaktion von PPAR-α, welches unter anderem ein zentraler Regulator des Lipidmetabolismus ist, und HCV-Core-Protein vermutet: So wurde gezeigt, dass sich bei 35 % der PPAR-α-Mäusen mit HCV-Core-Protein-Expression ein HCC entwickelt, jedoch nicht bei PPAR-α-Knockout Mäusen mit HCV-Core-Protein-Expression (Tanaka et al. 2008; Koike 2009). Zudem war nur in PPAR-α-Mäusen mit Core-Expression eine ausgeprägte Steatose nachweisbar (Tanaka et al. 2008). Das HCV-Core-Protein - vor allem von Genotyp 3 - ist sehr effizient und verursacht einen höheren Grad an Steatose (Moriya et al. 1997; Hourioux et al. 2007; Chayama und Hayes 2011). Ob dann auch Patienten mit chronischer Hepatitis C Genotyp 3 ein höheres Risiko für eine HCC-Entstehung haben, ist jedoch nicht klar. In einer Untersuchung bei Patienten mit HCV-Genotyp-3-Infektion wurde gezeigt, dass 12,8 % der Patienten nach DAA-Therapie ein HCC entwickelten; jedoch hatten zu Beginn der Studie bereits fast 50 % der Teilnehmer eine Leberzirrhose (Tayyab et al. 2020). Auch eine andere Studie zeigte, dass das Risiko für eine Leberzirrhose und ein HCC bei Patienten mit HCV-Genotyp-3-Infektion 31% höher war, als bei HCV-Genotyp-1-infizierten Patienten (Kanwal et al. 2014).

Insgesamt muss man sagen, dass in unserem Kollektiv viele Fälle sowohl steatotische (36 % bei HCV, 18 % bei HBV, 20 % bei Normallebergewebe von Patienten mit Lebermetastasen und 25 % bei AIH) als auch klarzellige Foci (vor allem bei Leberresektaten) zeigten und beide Arten von Foci damit ein sehr häufiges Phänomen

darstellen. Es könnte einen Grenzbereich - zumindest ohne klaren Krankheitswert - zum Normalbefund darstellen. Selbst wenn es sich um präneoplastische Läsionen handeln sollte, wäre damit das Progressionsrisiko als sehr gering zu betrachten.

Gerade weil die hier beschriebenen Foci kein exklusives Phänomen einer viralen Hepatitis darstellen, sondern generell auftreten, sind sie aufgrund ihres hochfrequenten Vorkommens von wissenschaftlichem Interesse und sollten weiter untersucht werden. Abschließend kann die Frage, ob die hier beschriebenen Perilipin-positiven steatotischen Foci degenerative, regenerative oder sogar frühe präneoplastische Geschehen darstellen, noch nicht beantwortet werden. Für Diagnostik und Therapie könnte es jedoch interessant sein, um einen potenziellen Schaden oder eine Entartung frühzeitig erkennen und behandeln zu können.

6 Zusammenfassung

Die chronische Hepatitis C stellt auch heute noch trotz moderner antiviraler Therapiemöglichkeiten einen Risikofaktor für die Entwicklung einer Leberzirrhose und eines hepatozellulären Karzinoms dar (WHO 2017). Dabei spielen Lipidtropfen eine entscheidende Rolle im viralen Lebenszyklus, denn HCV repliziert an Lipidtropfen und generiert dort infektiöse Viruspartikel (Miyanari et al. 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben konventionellen H&E-Färbungen auch immunhistochemische Färbungen u.a. mit Antikörpern gegen Perilipin 1 und 2 sowie Transmissionselektronenmikroskopie durchgeführt. Proteine der Perilipin-Familie sind wichtige Lipidtropfen-assoziierte Proteine, mithilfe derer man auch kleine Lipidtropfen sichtbar machen kann, die nicht mit konventioneller Lichtmikroskopie von H&E-Schnitten erkannt werden (Straub et al. 2013; Sztalryd und Brasaemle 2017). Ziel dieser Arbeit war es, Steatosemuster sowie Perilipin-Expression bei 231 Leberbiopsien von Patienten mit chronischer Hepatitis C zu untersuchen. Der Grad der Steatose korrelierte - wie auch in anderen Studien gezeigt wurde (Hourioux et al. 2007) - mit dem HCV-Genotyp (HCV-Genotyp 3), jedoch nicht signifikant mit der Viruslast. Wir konnten erstmalig stark Perilipin 2- und 1-positive steatotische Foci nachweisen, die sich als Cluster stark Perilipin 2- und 1-positiver Hepatozytengruppen von durchschnittlich 11 Hepatozyten darstellten und sich scharf vom übrigen Parenchym abhoben. Zudem waren Perilipin-positive steatotische Foci waren in 36% der Leberbiopsien bei Patienten mit chronischer Hepatitis C nachweisbar. Diese kamen auch bei chronischer Hepatitis B, bei AIH und auch in Kontrolllebergewebe zur Darstellung. Es konnte außerdem nur eine partielle Deckungsgleichheit HBV-infizierten Zellen mit den Perilipin-positiven Foci gezeigt werden. Dementsprechend stellen diese steatotischen Perilipin-positiven Foci kein exklusives virales Phänomen dar. Abschließend kann die Frage, ob die hier beschriebenen Perilipin-positiven steatotischen Foci degenerative, regenerative oder sogar frühe präneoplastische Geschehen darstellen, noch nicht beantwortet werden. Für Diagnostik und Therapie könnte es jedoch interessant sein, um einen potenziellen Schaden oder eine Entartung frühzeitig erkennen und behandeln zu können.

7 Literatur

Abe H, Beninger PR, Ikejiri N, Setoyama H, Sata M, Tanikawa K (1982) Light microscopic findings of liver biopsy specimens from patients with hepatitis type A and comparison with type B. Gastroenterology 82:938–947

Abe K, Takahashi A, Nozawa Y, Imaizumi H, Hayashi M, Okai K, Kanno Y, Watanabe H, Ohira H (2014) The utility of IgG, IgM, and CD138 immunohistochemistry in the evaluation of autoimmune liver diseases. Medical molecular morphology 47:162–168. doi:10.1007/s00795-014-0082-z

Abou-Alfa GK, Sahai V, Hollebecque A, Vaccaro G, Melisi D, Al-Rajabi R, Paulson AS, Borad MJ, Gallinson D, Murphy AG, Oh D-Y, Dotan E, Catenacci DV, van Cutsem E, Ji T, Lihou CF, Zhen H, Féliz L, Vogel A (2020) Pemigatinib for previously treated, locally advanced or metastatic cholangiocarcinoma: a multicentre, open-label, phase 2 study. The Lancet. Oncology 21:671–684. doi:10.1016/S1470-2045(20)30109-1

Adinolfi LE, Gambardella M, Andreana A, Tripodi MF, Utili R, Ruggiero G (2001) Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. Hepatology (Baltimore, Md.) 33:1358–1364. doi:10.1053/jhep.2001.24432

Aghemo A (2018) Update on HCC Management and Review of the New EASL Guidelines. Gastroenterology & hepatology 14:384–386

Alberti KG, Zimmet PZ (1998) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association 15:539–553. doi:10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S

Alter MJ (2002) Prevention of spread of hepatitis C. Hepatology (Baltimore, Md.) 36:S93-8. doi:10.1053/jhep.2002.36389

Amacher DE, Chalasani N (2014) Drug-induced hepatic steatosis. Seminars in liver disease 34:205–214. doi:10.1055/s-0034-1375960

Anand BS (1999) Cirrhosis of liver. The Western journal of medicine 171:110–115

Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH (1977) The morphology of cirrhosis: definition, nomenclature, and classification. Bulletin of the World Health Organization 55:521–540

Arrese EL, Rivera L, Hamada M, Mirza S, Hartson SD, Weintraub S, Soulages JL (2008) Function and structure of lipid storage droplet protein 1 studied in lipoprotein complexes. Archives of biochemistry and biophysics 473:42–47. doi:10.1016/j.abb.2008.02.036

Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS (2019) Burden of liver diseases in the world. Journal of hepatology 70:151–171. doi:10.1016/j.jhep.2018.09.014

Asselah T, Rubbia-Brandt L, Marcellin P, Negro F (2006) Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matter? Gut 55:123–130. doi:10.1136/gut.2005.069757

Bach N, Thung SN, Schaffner F (1992) The histological features of chronic hepatitis C and autoimmune chronic hepatitis: a comparative analysis. Hepatology (Baltimore, Md.) 15:572–577. doi:10.1002/hep.1840150403

Bannasch P (1986) Preneoplastic lesions as end points in carcinogenicity testing. I. Hepatic preneoplasia. Carcinogenesis 7:689–695. doi:10.1093/carcin/7.5.689

Bannasch P, Ribback S, Su Q, Mayer D (2017) Clear cell hepatocellular carcinoma: origin, metabolic traits and fate of glycogenotic clear and ground glass cells. Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT 16:570–594. doi:10.1016/S1499-3872(17)60071-7

Barth H, Schafer C, Adah MI, Zhang F, Linhardt RJ, Toyoda H, Kinoshita-Toyoda A, Toida T, van Kuppevelt TH, Depla E, Weizsacker F von, Blum HE, Baumert TF (2003) Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. The Journal of biological chemistry 278:41003–41012. doi:10.1074/jbc.M302267200

Bartz R, Li W-H, Venables B, Zehmer JK, Roth MR, Welti R, Anderson RGW, Liu P, Chapman KD (2007) Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. Journal of lipid research 48:837–847. doi:10.1194/jlr.M600413-JLR200

Barzon L, Lavezzo E, Costanzi G, Franchin E, Toppo S, Palù G (2013) Next-generation sequencing technologies in diagnostic virology. Journal of clinical virology

: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology 58:346–350. doi:10.1016/j.jcv.2013.03.003

Basaranoglu M, Turhan N, Sonsuz A, Basaranoglu G (2011) Mallory-Denk Bodies in chronic hepatitis. World journal of gastroenterology 17:2172–2177. doi:10.3748/wjg.v17.i17.2172

Baumert TF (2020) The Nobel Prize in Medicine 2020 for the Discovery of Hepatitis C Virus: Transforming Hepatology. Journal of hepatology 73:1303–1305. doi:10.1016/j.jhep.2020.10.017

Beasley RP, Hwang LY, Lee GC, Lan CC, Roan CH, Huang FY, Chen CL (1983) Prevention of perinatally transmitted hepatitis B virus infections with hepatitis B immune globulin and hepatitis B vaccine. Lancet (London, England) 2:1099–1102. doi:10.1016/s0140-6736(83)90624-4

Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S (2005) Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. Hepatology (Baltimore, Md.) 42:44–52. doi:10.1002/hep.20734

Bedossa P, Poynard T (1996) An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. Hepatology (Baltimore, Md.) 24:289–293. doi:10.1002/hep.510240201

Bickel PE, Tansey JT, Welte MA (2009) PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. Biochimica et biophysica acta 1791:419–440. doi:10.1016/j.bbalip.2009.04.002

Binns D, Januszewski T, Chen Y, Hill J, Markin VS, Zhao Y, Gilpin C, Chapman KD, Anderson RGW, Goodman JM (2006) An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies. The Journal of cell biology 173:719–731. doi:10.1083/jcb.200511125

Bioulac-Sage P, Rebouissou S, Thomas C, Blanc J-F, Saric J, Sa Cunha A, Rullier A, Cubel G, Couchy G, Imbeaud S, Balabaud C, Zucman-Rossi J (2007) Hepatocellular adenoma subtype classification using molecular markers and immunohistochemistry. Hepatology (Baltimore, Md.) 46:740–748. doi:10.1002/hep.21743

Björnsson E, Angulo P (2007) Hepatitis C and steatosis. Archives of medical research 38:621–627. doi:10.1016/j.arcmed.2006.09.001

Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla D-C, Roudot-Thoraval F (2013) The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. Journal of hepatology 58:593–608. doi:10.1016/j.jhep.2012.12.005

Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, Rouillé Y (2006) Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. Journal of virology 80:6964–6972. doi:10.1128/JVI.00024-06

Blaner WS, O'Byrne SM, Wongsiriroj N, Kluwe J, D'Ambrosio DM, Jiang H, Schwabe RF, Hillman EMC, Piantedosi R, Libien J (2009) Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage. Biochimica et biophysica acta 1791:467–473. doi:10.1016/j.bbalip.2008.11.001

Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S (1965) A "New" Antigen in Leukemia Sera. JAMA 191:541–546. doi:10.1001/jama.1965.03080070025007

Böcker W, Denk H, Heitz PU, Höfler G, Kreipe HH, Moch H (Hrsg) (2012) Pathologie; Mit rund 150 Tabellen ; Plus im Web, mediscript. Elsevier Urban & Fischer, München

Bosma M, Minnaard R, Sparks LM, Schaart G, Losen M, Baets MH de, Duimel H, Kersten S, Bickel PE, Schrauwen P, Hesselink MKC (2012) The lipid droplet coat protein perilipin 5 also localizes to muscle mitochondria. Histochemistry and cell biology 137:205–216. doi:10.1007/s00418-011-0888-x

Bowyer BA, Fleming CR, Ludwig J, Petz J, McGill DB (1985) Does long-term home parenteral nutrition in adult patients cause chronic liver disease? JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition 9:11–17. doi:10.1177/014860718500900111

Branche E, Conzelmann S, Parisot C, Bedert L, Lévy PL, Bartosch B, Clément S, Negro F (2016) Hepatitis C Virus Increases Occludin Expression via the Upregulation of Adipose Differentiation-Related Protein. PloS one 11:1 - 16. doi:10.1371/journal.pone.0146000

Brasaemle DL, Barber T, Wolins NE, Serrero G, Blanchette-Mackie EJ, Londos C (1997) Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. Journal of lipid research 38:2249–2263

Brasaemle DL (2007) Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. Journal of lipid research 48:2547–2559. doi:10.1194/jlr.R700014-JLR200

Brunt E, Aishima S, Clavien P-A et al (2018) cHCC-CCA: Consensus terminology for primary liver carcinomas with both hepatocytic and cholangiocytic differentation. Hepatology (Baltimore, Md.) 68:113–126. doi:10.1002/hep.29789

Burns GS, Thompson AJ (2014) Viral hepatitis B: clinical and epidemiological characteristics. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 4:a024935. doi:10.1101/cshperspect.a024935

Burt AD, Ferrell LD, Hubscher S (2018) MacSween's pathology of the liver. Elsevier, Philadelphia, PA

Cairns SR, Peters TJ (1983) Biochemical analysis of hepatic lipid in alcoholic and diabetic and control subjects. Clinical science (London, England : 1979) 65:645–652. doi:10.1042/cs0650645

Calderaro J, Couchy G, Imbeaud S, Amaddeo G, Letouzé E, Blanc J-F, Laurent C, Hajji Y, Azoulay D, Bioulac-Sage P, Nault J-C, Zucman-Rossi J (2017) Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification. Journal of hepatology 67:727–738. doi:10.1016/j.jhep.2017.05.014

Caldwell S, Ikura Y, Dias D, Isomoto K, Yabu A, Moskaluk C, Pramoonjago P, Simmons W, Scruggs H, Rosenbaum N, Wilkinson T, Toms P, Argo CK, Al-Osaimi AMS, Redick JA (2010) Hepatocellular ballooning in NASH. Journal of hepatology 53:719–723. doi:10.1016/j.jhep.2010.04.031

Campana B, Calabrese D, Matter MS, Terracciano LM, Wieland SF, Heim MH (2018) In vivo analysis at the cellular level reveals similar steatosis induction in both hepatitis C virus genotype 1 and 3 infections. Journal of viral hepatitis 25:262–271. doi:10.1111/jvh.12816

Cano L, Cerapio JP, Ruiz E, Marchio A, Turlin B, Casavilca S, Taxa L, Marti G, Deharo E, Pineau P, Bertani S (2018) Liver clear cell foci and viral infection are associated with non-cirrhotic, non-fibrolamellar hepatocellular carcinoma in young patients from South America. Scientific reports 8:9945. doi:10.1038/s41598-018-28286-0

Carr RM, Dhir R, Yin X, Agarwal B, Ahima RS (2013) Temporal effects of ethanol consumption on energy homeostasis, hepatic steatosis, and insulin sensitivity in mice. Alcoholism, clinical and experimental research 37:1091–1099. doi:10.1111/acer.12075

Carr RM, Peralta G, Yin X, Ahima RS (2014) Absence of perilipin 2 prevents hepatic steatosis, glucose intolerance and ceramide accumulation in alcohol-fed mice. PloS one 9:e97118. doi:10.1371/journal.pone.0097118

Castelhano N, Araujo NM, Arenas M (2017) Heterogeneous recombination among Hepatitis B virus genotypes. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases 54:486–490. doi:10.1016/j.meegid.2017.08.015

Celli R, Zhang X (2014) Pathology of Alcoholic Liver Disease. Journal of clinical and translational hepatology 2:103–109. doi:10.14218/JCTH.2014.00010

Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ (2012) The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. Gastroenterology 142:1592–1609. doi:10.1053/j.gastro.2012.04.001

Chayama K, Hayes CN (2011) Hepatitis C virus: How genetic variability affects pathobiology of disease. Journal of gastroenterology and hepatology 26 Suppl 1:83–95. doi:10.1111/j.1440-1746.2010.06550.x

Chen H-Y, Shen D-T, Ji D-Z, Han P-C, Zhang W-M, Ma J-F, Chen W-S, Goyal H, Pan S, Xu H-G (2019) Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis. Gut 68:512–521. doi:10.1136/gutjnl-2018-316601

Chen TC, Nakanuma Y, Zen Y, Chen MF, Jan YY, Yeh TS, Chiu CT, Kuo TT, Kamiya J, Oda K, Hamaguchi M, Ohno Y, Hsieh LL, Nimura Y (2001) Intraductal papillary neoplasia of the liver associated with hepatolithiasis. Hepatology (Baltimore, Md.) 34:651–658. doi:10.1053/jhep.2001.28199

Clarke J, Craig RM, Saffro R, Murphy P, Yokoo H (1979) Cytomegalovirus granulomatous hepatitis. The American journal of medicine 66:264–269. doi:10.1016/0002-9343(79)90543-6

Conte M, Franceschi C, Sandri M, Salvioli S (2016) Perilipin 2 and Age-Related Metabolic Diseases: A New Perspective. Trends in endocrinology and metabolism: TEM 27:893–903. doi:10.1016/j.tem.2016.09.001

Cornberg M, Protzer U, Petersen J, Wedemeyer H, Berg T, Jilg (2011) Aktualisierung der S 3-Leitlinie zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-B-Virusinfektion; AWMF-Register-Nr.: 021 / 011. Zeitschrift für Gastroenterologie 49:871–930. doi:10.1055/s-0031-1273462

Craig JR, Peters RL, Edmondson HA, Omata M (1980) Fibrolamellar carcinoma of the liver: a tumor of adolescents and young adults with distinctive clinico-pathologic features. Cancer 46:372–379. doi:10.1002/1097-0142(19800715)46:2<372::aid-cncr2820460227>3.0.co;2-s

Cross TJS, Rashid MM, Berry PA, Harrison PM (2010) The importance of steatosis in chronic hepatitis C infection and its management: A review. Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology 40:237–247. doi:10.1111/j.1872-034X.2010.00626.x

Cunningham EB, Applegate TL, Lloyd AR, Dore GJ, Grebely J (2015) Mixed HCV infection and reinfection in people who inject drugs--impact on therapy. Nature reviews. Gastroenterology & hepatology 12:218–230. doi:10.1038/nrgastro.2015.36

Da BL, Heller T, Koh C (2019) Hepatitis D infection: from initial discovery to current investigational therapies. Gastroenterology report 7:231–245. doi:10.1093/gastro/goz023

Dane DS, Cameron CH, Briggs M (1970) Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. Lancet (London, England) 1:695–698. doi:10.1016/s0140-6736(70)90926-8

Dao Thi VL, Granier C, Zeisel MB, Guérin M, Mancip J, Granio O, Penin F, Lavillette D, Bartenschlager R, Baumert TF, Cosset F-L, Dreux M (2012) Characterization of hepatitis C virus particle subpopulations reveals multiple usage of the scavenger receptor BI for entry steps. The Journal of biological chemistry 287:31242–31257. doi:10.1074/jbc.M112.365924

Darstein F, Häuser F, Mittler J, Zimmermann A, Lautem A, Hoppe-Lotichius M, Otto G, Lang H, Galle PR, Zimmermann T (2020) Hepatitis E Is a Rare Finding in Liver Transplant Patients With Chronic Elevated Liver Enzymes and Biopsy-Proven Acute Rejection. Transplantation proceedings 52:926–931. doi:10.1016/j.transproceed.2020.01.011

Deng Z, Yan S, Hu H, Duan Z, Yin L, Liao S, Sun Y, Yin D, Li G (2015) Proteomic profile of carbonylated proteins in rat liver: discovering possible mechanisms for tetracycline-induced steatosis. Proteomics 15:148–159. doi:10.1002/pmic.201400115

Desai AN, Kim AY (2020) Management of Hepatitis A in 2020-2021. JAMA 324:383–384. doi:10.1001/jama.2020.4017

Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ (1994) Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. Hepatology (Baltimore, Md.) 19:1513–1520

Di Tommaso L, Destro A, Seok JY, Balladore E, Terracciano L, Sangiovanni A, Iavarone M, Colombo M, Jang JJ, Yu E, Jin SY, Morenghi E, Park YN, Roncalli M (2009) The application of markers (HSP70 GPC3 and GS) in liver biopsies is useful for detection of hepatocellular carcinoma. Journal of hepatology 50:746–754. doi:10.1016/j.jhep.2008.11.014

Dombrowski F, Bannasch P, Pfeifer U (1997) Hepatocellular neoplasms induced by low-number pancreatic islet transplants in streptozotocin diabetic rats. The American journal of pathology 150:1071–1087

Durkacz BW, Omidiji O, Gray DA, Shall S (1980) (ADP-ribose)n participates in DNA excision repair. Nature 283:593–596. doi:10.1038/283593a0

Edmondson HA, Peters RL, Frankel HH, Borowsky S (1967) The early stage of liver injury in the alcoholic. Medicine 46:119–129. doi:10.1097/00005792-196703000-00006

Fan B, Malato Y, Calvisi DF, Naqvi S, Razumilava N, Ribback S, Gores GJ, Dombrowski F, Evert M, Chen X, Willenbring H (2012) Cholangiocarcinomas can originate from hepatocytes in mice. The Journal of clinical investigation 122:2911–2915. doi:10.1172/JCI63212

Farci P (2003) Delta hepatitis: an update. Journal of hepatology 39 Suppl 1:S212-9. doi:10.1016/s0168-8278(03)00331-3

Farese RV, Walther TC (2009) Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. Cell 139:855–860. doi:10.1016/j.cell.2009.11.005

Fattovich G, Rugge M, Brollo L, Pontisso P, Noventa F, Guido M, Alberti A, Realdi G (1986) Clinical, virologic and histologic outcome following seroconversion from HBeAg to anti-HBe in chronic hepatitis type B. Hepatology (Baltimore, Md.) 6:167–172. doi:10.1002/hep.1840060203

Feinstone SM, Kapikian AZ, Purceli RH (1973) Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. Science (New York, N.Y.) 182:1026–1028. doi:10.1126/science.182.4116.1026

Fernández-Rojo MA, Restall C, Ferguson C, Martel N, Martin S, Bosch M, Kassan A, Leong GM, Martin SD, McGee SL, Muscat GEO, Anderson RL, Enrich C, Pol A, Parton RG (2012) Caveolin-1 orchestrates the balance between glucose and lipid-dependent energy metabolism: implications for liver regeneration. Hepatology (Baltimore, Md.) 55:1574–1584. doi:10.1002/hep.24810

Forns X, Maluenda MD, López-Labrador FX, Ampurdanès S, Olmedo E, Costa J, Simmonds P, Sánchez-Tapias JM, Jimenez De Anta MT, Rodés J (1996) Comparative study of three methods for genotyping hepatitis C virus strains in samples from Spanish patients. Journal of clinical microbiology 34:2516–2521

Fujii H, Ikura Y, Arimoto J, Sugioka K, Iezzoni JC, Park SH, Naruko T, Itabe H, Kawada N, Caldwell SH, Ueda M (2009) Expression of perilipin and adipophilin in nonalcoholic fatty liver disease; relevance to oxidative injury and hepatocyte ballooning. Journal of atherosclerosis and thrombosis 16:893–901. doi:10.5551/jat.2055

Galle PR, Foerster F, Kudo M, Chan SL, Llovet JM, Qin S, Schelman WR, Chintharlapalli S, Abada PB, Sherman M, Zhu AX (2019) Biology and significance of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma. Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver 39:2214–2229. doi:10.1111/liv.14223

Gandotra S, Le Dour C, Bottomley W, Cervera P, Giral P, Reznik Y, Charpentier G, Auclair M, Delépine M, Barroso I, Semple RK, Lathrop M, Lascols O, Capeau J, O'Rahilly S, Magré J, Savage DB, Vigouroux C (2011) Perilipin deficiency and autosomal dominant partial lipodystrophy. The New England journal of medicine 364:740–748. doi:10.1056/NEJMoa1007487

Gao X, Zhan M, Wang L, Ding Y, Niu J (2020) Timing of DAA Initiation After Curative Treatment and Its Relationship with the Recurrence of HCV-Related HCC. Journal of hepatocellular carcinoma 7:347–360. doi:10.2147/JHC.S279657

Garcia-Tsao G, Friedman S, Iredale J, Pinzani M (2010) Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis. Hepatology (Baltimore, Md.) 51:1445–1449. doi:10.1002/hep.23478

Gheorghe L, Iacob S, Gheorghe C, Iacob R, Simionov I, Vadan R, Becheanu G, Parvulescu I, Toader C (2004) Frequency and predictive factors for overlap syndrome between autoimmune hepatitis and primary cholestatic liver disease. European journal of gastroenterology & hepatology 16:585–592. doi:10.1097/00042737-200406000-00012

Gordillo M, Evans T, Gouon-Evans V (2015) Orchestrating liver development. Development (Cambridge, England) 142:2094–2108. doi:10.1242/dev.114215

Grebely J, Pham ST, Matthews GV, Petoumenos K, Bull RA, Yeung B, Rawlinson W, Kaldor J, Lloyd A, Hellard M, Dore GJ, White PA (2012) Hepatitis C virus reinfection and superinfection among treated and untreated participants with recent infection. Hepatology (Baltimore, Md.) 55:1058–1069. doi:10.1002/hep.24754

Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Garty NB, Blanchette-Mackie EJ, Londos C (1991) Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. The Journal of biological chemistry 266:11341–11346

Gupta A, Dixon E (2017) Epidemiology and risk factors: intrahepatic cholangiocarcinoma. Hepatobiliary surgery and nutrition 6:101–104. doi:10.21037/hbsn.2017.01.02

Hammoudeh N, Soukkarieh C, Murphy DJ, Hanano A (2020) Involvement of hepatic lipid droplets and their associated proteins in the detoxification of aflatoxin B1 in aflatoxin-resistance BALB/C mouse. Toxicology reports 7:795–804. doi:10.1016/j.toxrep.2020.06.005

Hashani M, Witzel HR, Pawella LM, Lehmann-Koch J, Schumacher J, Mechtersheimer G, Schnölzer M, Schirmacher P, Roth W, Straub BK (2018) Widespread expression of perilipin 5 in normal human tissues and in diseases is

restricted to distinct lipid droplet subpopulations. Cell and tissue research 374:121–136. doi:10.1007/s00441-018-2845-7

Hedskog C, Doehle B, Chodavarapu K, Gontcharova V, Crespo Garcia J, Knegt R de, Drenth JPH, McHutchison JG, Brainard D, Stamm LM, Miller MD, Svarovskaia E, Mo H (2015) Characterization of hepatitis C virus intergenotypic recombinant strains and associated virological response to sofosbuvir/ribavirin. Hepatology (Baltimore, Md.) 61:471–480. doi:10.1002/hep.27361

Heid HW, Moll R, Schwetlick I, Rackwitz HR, Keenan TW (1998) Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. Cell and tissue research 294:309–321. doi:10.1007/s004410051181

Herold G (2018) Innere Medizin 2019; Eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Herold Gerd, Köln

Hourioux C, Patient R, Morin A, Blanchard E, Moreau A, Trassard S, Giraudeau B, Roingeard P (2007) The genotype 3-specific hepatitis C virus core protein residue phenylalanine 164 increases steatosis in an in vitro cellular model. Gut 56:1302–1308. doi:10.1136/gut.2006.108647

Housset C, Pol S, Carnot F, Dubois F, Nalpas B, Housset B, Berthelot P, Brechot C (1992) Interactions between human immunodeficiency virus-1, hepatitis delta virus and hepatitis B virus infections in 260 chronic carriers of hepatitis B virus. Hepatology (Baltimore, Md.) 15:578–583. doi:10.1002/hep.1840150404

Hui JM, Kench J, Farrell GC, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Byth K, George J (2002) Genotype-specific mechanisms for hepatic steatosis in chronic hepatitis C infection. Journal of gastroenterology and hepatology 17:873–881. doi:10.1046/j.1440-1746.2002.02813.x

Ichai P, Duclos-Vallée J-C, Guettier C, Hamida SB, Antonini T, Delvart V, Saliba F, Azoulay D, Castaing D, Samuel D (2007) Usefulness of corticosteroids for the treatment of severe and fulminant forms of autoimmune hepatitis. Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society 13:996–1003. doi:10.1002/lt.21036

Itabe H, Yamaguchi T, Nimura S, Sasabe N (2017) Perilipins: a diversity of intracellular lipid droplet proteins. Lipids in health and disease 16:83. doi:10.1186/s12944-017-0473-y

Jackson MD, Kirkman C, Bradford WD, Walker DH (1986) Rocky mountain spotted fever: hepatic lesions in childhood cases. Pediatric pathology 5:379–388. doi:10.3109/15513818609068864

Jamal MM, Saadi Z, Morgan TR (2005) Alcohol and hepatitis C. Digestive diseases (Basel, Switzerland) 23:285–296. doi:10.1159/000090176

Jeong S-H, Lee H-S (2010) Hepatitis A: clinical manifestations and management. Intervirology 53:15–19. doi:10.1159/000252779

Ji C, Chan C, Kaplowitz N (2006) Predominant role of sterol response element binding proteins (SREBP) lipogenic pathways in hepatic steatosis in the murine intragastric ethanol feeding model. Journal of hepatology 45:717–724. doi:10.1016/j.jhep.2006.05.009

Jiang J, Wu X, Tang H, Luo G (2013) Apolipoprotein E mediates attachment of clinical hepatitis C virus to hepatocytes by binding to cell surface heparan sulfate proteoglycan receptors. PloS one 8:e67982. doi:10.1371/journal.pone.0067982

Johnson PJ, McFarlane IG (1993) Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group. Hepatology (Baltimore, Md.) 18:998–1005. doi:10.1002/hep.1840180435

Johnson LP, Sterling RK (2020) The Prevalence and Impact of Hepatic Steatosis on Response to Direct-Acting Antiviral Therapy in HIV-HCV Coinfection. Biology 9. doi:10.3390/biology9040087

Kamath PS, Kim WR (2007) The model for end-stage liver disease (MELD). Hepatology (Baltimore, Md.) 45:797–805. doi:10.1002/hep.21563

Kanwal F, Kramer JR, Ilyas J, Duan Z, El-Serag HB (2014) HCV genotype 3 is associated with an increased risk of cirrhosis and hepatocellular cancer in a national sample of U.S. Veterans with HCV. Hepatology (Baltimore, Md.) 60:98–105. doi:10.1002/hep.27095

Kao JH, Chen PJ, Wang JT, Yang PM, Lai MY, Wang TH, Chen DS (1996) Superinfection by homotypic virus in hepatitis C virus carriers: studies on patients

with post-transfusion hepatitis. Journal of medical virology 50:303–308. doi:10.1002/(SICI)1096-9071(199612)50:4<303::AID-JMV4>3.0.CO;2-C

Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS (2000) Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. Gastroenterology 118:554–559. doi:10.1016/s0016-5085(00)70261-7

Kaplan G, Totsuka A, Thompson P, Akatsuka T, Moritsugu Y, Feinstone SM (1996) Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. The EMBO Journal 15:4282–4296

Keukeleire S de, Descheemaeker P, Reynders M (2015) Potential risk of misclassification HCV 2k/1b strains as HCV 2a/2c using VERSANT HCV Genotype 2.0 assay. Diagnostic microbiology and infectious disease 82:201–202. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2015.04.001

Khalaf AM, Fuentes D, Morshid AI, Burke MR, Kaseb AO, Hassan M, Hazle JD, Elsayes KM (2018) Role of Wnt/β-catenin signaling in hepatocellular carcinoma, pathogenesis, and clinical significance. Journal of hepatocellular carcinoma 5:61–73. doi:10.2147/JHC.S156701

Khuroo MS, Khuroo MS, Khuroo NS (2016) Hepatitis E: Discovery, global impact, control and cure. World journal of gastroenterology 22:7030–7045. doi:10.3748/wjg.v22.i31.7030

Kim IH, Xu J, Liu X, Koyama Y, Ma H-Y, Diggle K, You Y-H, Schilling JM, Jeste D, Sharma K, Brenner DA, Kisseleva T (2016) Aging increases the susceptibility of hepatic inflammation, liver fibrosis and aging in response to high-fat diet in mice. Age (Dordrecht, Netherlands) 38:291–302. doi:10.1007/s11357-016-9938-6

Kleiner DE, Brunt EM, van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu Y-C, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ (2005) Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology (Baltimore, Md.) 41:1313–1321. doi:10.1002/hep.20701

Klion FM, Schaffner F (1966) The ultrastructure of acidophilic "Councilman-like" bodies in the liver. The American journal of pathology 48:755–767

Klisic A, Isakovic A, Kocic G, Kavaric N, Jovanovic M, Zvrko E, Skerovic V, Ninic A (2018) Relationship between Oxidative Stress, Inflammation and Dyslipidemia with Fatty Liver Index in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. Experimental and clinical

endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association 126:371–378. doi:10.1055/s-0043-118667

Kneiseler G, Bachmann HS, Bechmann LP, Dechene A, Heyer T, Baba H, Saner F, Jochum C, Gerken G, Canbay A (2010) A Rare Case of Propofol-Induced Acute Liver Failure and Literature Review. Case reports in gastroenterology 4:57–65. doi:10.1159/000262448

Koh KC, Lee H, Choi MS, Lee JH, Paik SW, Yoo BC, Rhee JC, Cho JW, Park CK, Kim HJ (2005) Clinicopathologic features and prognosis of combined hepatocellular cholangiocarcinoma. American journal of surgery 189:120–125. doi:10.1016/j.amjsurg.2004.03.018

Kohjima M, Tsai T-H, Tackett BC, Thevananther S, Li L, Chang BH-J, Chan L (2013) Delayed liver regeneration after partial hepatectomy in adipose differentiation related protein-null mice. Journal of hepatology 59:1246–1254. doi:10.1016/j.jhep.2013.07.025

Kohli A, Shaffer A, Sherman A, Kottilil S (2014) Treatment of hepatitis C: a systematic review. JAMA 312:631–640. doi:10.1001/jama.2014.7085

Koike K (2009) Steatosis, liver injury, and hepatocarcinogenesis in hepatitis C viral infection. Journal of gastroenterology 44 Suppl 19:82–88. doi:10.1007/s00535-008-2276-4

Kozusko K, Patel S, Savage DB (2013) Human congenital perilipin deficiency and insulin resistance. Endocrine development 24:150–155. doi:10.1159/000342511

Krahmer N, Farese RV, Walther TC (2013) Balancing the fat: lipid droplets and human disease. EMBO molecular medicine 5:973–983. doi:10.1002/emmm.201100671

Krawczynski K (1993) Hepatitis E. Hepatology (Baltimore, Md.) 17:932–941

Ku C-Y, Liu Y-H, Lin H-Y, Lu S-C, Lin J-Y (2016) Liver fatty acid-binding protein (L-FABP) promotes cellular angiogenesis and migration in hepatocellular carcinoma. Oncotarget 7:18229–18246. doi:10.18632/oncotarget.7571

Kupin WL (2017) Viral-Associated GN: Hepatitis C and HIV. Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN 12:1337–1342. doi:10.2215/CJN.04320416

Kuramoto K, Okamura T, Yamaguchi T, Nakamura TY, Wakabayashi S, Morinaga H, Nomura M, Yanase T, Otsu K, Usuda N, Matsumura S, Inoue K, Fushiki T, Kojima Y, Hashimoto T, Sakai F, Hirose F, Osumi T (2012) Perilipin 5, a lipid droplet-binding protein, protects heart from oxidative burden by sequestering fatty acid from excessive oxidation. The Journal of biological chemistry 287:23852–23863. doi:10.1074/jbc.M111.328708

Kutami R, Nakashima Y, Nakashima O, Shiota K, Kojiro M (2000) Pathomorphologic study on the mechanism of fatty change in small hepatocellular carcinoma of humans. Journal of hepatology 33:282–289. doi:10.1016/s0168-8278(00)80369-4

Lang CA, Conrad S, Garrett L, Battistutta D, Cooksley WGE, Dunne MP, Macdonald GA (2006) Symptom prevalence and clustering of symptoms in people living with chronic hepatitis C infection. Journal of pain and symptom management 31:335–344. doi:10.1016/j.jpainsymman.2005.08.016

Lassen S, Grüttner C, van Nguyen-Dinh, Herker E (2019) Perilipin-2 is critical for efficient lipoprotein and hepatitis C virus particle production. Journal of cell science 132. doi:10.1242/jcs.217042

Lavillette D, Pécheur E-I, Donot P, Fresquet J, Molle J, Corbau R, Dreux M, Penin F, Cosset F-L (2007) Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. Journal of virology 81:8752–8765. doi:10.1128/JVI.02642-06

Layerenza JP, González P, García de Bravo MM, Polo MP, Sisti MS, Ves-Losada A (2013) Nuclear lipid droplets: a novel nuclear domain. Biochimica et biophysica acta 1831:327–340. doi:10.1016/j.bbalip.2012.10.005

Leo MA, Lieber CS (1982) Hepatic vitamin A depletion in alcoholic liver injury. The New England journal of medicine 307:597–601. doi:10.1056/NEJM198209023071006

Lhomme S, Marion O, Abravanel F, Izopet J, Kamar N (2020) Clinical Manifestations, Pathogenesis and Treatment of Hepatitis E Virus Infections. Journal of clinical medicine 9. doi:10.3390/jcm9020331

Liang TJ (2009) Hepatitis B: the virus and disease. Hepatology (Baltimore, Md.) 49:S13-21. doi:10.1002/hep.22881

Liang JQ, Teoh N, Xu L, Pok S, Li X, Chu ESH, Chiu J, Dong L, Arfianti E, Haigh WG, Yeh MM, Ioannou GN, Sung JJY, Farrell G, Yu J (2018) Dietary cholesterol promotes steatohepatitis related hepatocellular carcinoma through dysregulated metabolism and calcium signaling. Nature communications 9:1–13. doi:10.1038/s41467-018-06931-6

Liaw Y-F (2002) Hepatitis C virus superinfection in patients with chronic hepatitis B virus infection. Journal of gastroenterology 37 Suppl 13:65–68. doi:10.1007/BF02990102

Liaw YF (1995) Role of hepatitis C virus in dual and triple hepatitis virus infection. Hepatology (Baltimore, Md.) 22:1101–1108. doi:10.1016/0270-9139(95)90615-0

Lin K-Y, Chen G-J, Lee Y-L, Huang Y-C, Cheng A, Sun H-Y, Chang S-Y, Liu C-E, Hung C-C (2017) Hepatitis A virus infection and hepatitis A vaccination in human immunodeficiency virus-positive patients: A review. World journal of gastroenterology 23:3589–3606. doi:10.3748/wjg.v23.i20.3589

Lin C-L, Kao J-H (2017) Natural history of acute and chronic hepatitis B: The role of HBV genotypes and mutants. Best practice & research. Clinical gastroenterology 31:249–255. doi:10.1016/j.bpg.2017.04.010

Linder KA, Malani PN (2017) Hepatitis A. JAMA 318:2393. doi:10.1001/jama.2017.17244

Liu J, Yang H-I, Lee M-H, Lu S-N, Jen C-L, Wang L-Y, You S-L, Iloeje UH, Chen C-J (2010) Incidence and determinants of spontaneous hepatitis B surface antigen seroclearance: a community-based follow-up study. Gastroenterology 139:474–482. doi:10.1053/j.gastro.2010.04.048

Lonardo A, Adinolfi LE, Loria P, Carulli N, Ruggiero G, Day CP (2004) Steatosis and hepatitis C virus: mechanisms and significance for hepatic and extrahepatic disease. Gastroenterology 126:586–597. doi:10.1053/j.gastro.2003.11.020

Londos C, Brasaemle DL, Gruia-Gray J, Servetnick DA, Schultz CJ, Levin DM, Kimmel AR (1995) Perilipin: unique proteins associated with intracellular neutral lipid droplets in adipocytes and steroidogenic cells. Biochemical Society transactions 23:611–615. doi:10.1042/bst0230611

Long J, Lang Z-W, Wang H-G, Wang T-L, Wang B-E, Liu S-Q (2010) Glutamine synthetase as an early marker for hepatocellular carcinoma based on proteomic

analysis of resected small hepatocellular carcinomas. Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT 9:296–305

Longerich T, Flechtenmacher C, Schirmacher P (2008) Mass und Zahl in der Hepatopathologie; Diagnostisch und klinisch relevante Graduierungen bei nichttumorösen Lebererkrankungen. Der Pathologe 29:15–26. doi:10.1007/s00292-007-0963-1

Lozano R, Naghavi M, Foreman K et al (2012) Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet (London, England) 380:2095–2128. doi:10.1016/S0140-6736(12)61728-0

Lu X, Gruia-Gray J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Londos C, Kimmel AR (2001) The murine perilipin gene: the lipid droplet-associated perilipins derive from tissue-specific, mRNA splice variants and define a gene family of ancient origin. Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society 12:741–749. doi:10.1007/s00335-01-2055-5

MacSween RN, Burt AD (1986) Histologic spectrum of alcoholic liver disease. Seminars in liver disease 6:221–232. doi:10.1055/s-2008-1040605

Mak KM, Ren C, Ponomarenko A, Cao Q, Lieber CS (2008) Adipose differentiation-related protein is a reliable lipid droplet marker in alcoholic fatty liver of rats. Alcoholism, clinical and experimental research 32:683–689. doi:10.1111/j.1530-0277.2008.00624.x

Mani H, Kleiner DE (2009) Liver biopsy findings in chronic hepatitis B. Hepatology (Baltimore, Md.) 49:S61–S71. doi:10.1002/hep.22930

Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, Forlani G, Melchionda N (1999) Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. The American journal of medicine 107:450–455

Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M (2003) Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. Hepatology (Baltimore, Md.) 37:917–923. doi:10.1053/jhep.2003.50161

Marrone G, Biolato M, Mercurio G, Capobianchi MR, Garbuglia AR, Liguori A, Vassallo G, Gasbarrini A, Miele L, Grieco A (2019) Acute HEV hepatitis: clinical and

laboratory diagnosis. European review for medical and pharmacological sciences 23:764–770. doi:10.26355/eurrev_201901_16891

Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ (1999) Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. Gastroenterology 116:1413–1419

Mavrelis PG, Ammon HV, Gleysteen JJ, Komorowski RA, Charaf UK (1983) Hepatic free fatty acids in alcoholic liver disease and morbid obesity. Hepatology (Baltimore, Md.) 3:226–231. doi:10.1002/hep.1840030215

Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, Montalto F, Ammatuna M, Morabito A, Gennari L (1996) Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. The New England journal of medicine 334:693–699. doi:10.1056/NEJM199603143341104

McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S, Albrecht JK (1998) Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. The New England journal of medicine 339:1485–1492. doi:10.1056/NEJM199811193392101

Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, Barnes E (2015) Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. Hepatology (Baltimore, Md.) 61:77–87. doi:10.1002/hep.27259

Miura S, Gan J-W, Brzostowski J, Parisi MJ, Schultz CJ, Londos C, Oliver B, Kimmel AR (2002) Functional conservation for lipid storage droplet association among Perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, Drosophila, and Dictyostelium. The Journal of biological chemistry 277:32253–32257. doi:10.1074/jbc.M204410200

Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K (2007) The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. Nature cell biology 9:1089-1097. doi:10.1038/ncb1631

Mohanty S, Shah I, Bhatnagar S (2012) Neonatal hepatitis with toxoplasmosis. Journal of clinical neonatology 1:96–97. doi:10.4103/2249-4847.96772

Mokdad AA, Lopez AD, Shahraz S, Lozano R, Mokdad AH, Stanaway J, Murray CJL, Naghavi M (2014) Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. BMC medicine 12:145. doi:10.1186/s12916-014-0145-y

Monto A, Alonzo J, Watson JJ, Grunfeld C, Wright TL (2002) Steatosis in chronic hepatitis C: relative contributions of obesity, diabetes mellitus, and alcohol. Hepatology (Baltimore, Md.) 36:729–736. doi:10.1053/jhep.2002.35064

Moreno A, Ramón y Cajal S, Marazuela M, Carreño V, Milicua JM, Cerezo E, Cuesta C, Oliva H (1989) Sanded nuclei in delta patients. Liver 9:367–371. doi:10.1111/j.1600-0676.1989.tb00425.x

Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Ishibashi K, Matsuura Y, Miyamura T, Koike K (1997) Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. The Journal of general virology 78 (Pt 7):1527–1531. doi:10.1099/0022-1317-78-7-1527

Mortimer CE, Müller U, Beck J (2015) Chemie; Das Basiswissen der Chemie. Thieme, Stuttgart

Mosnier JF, Degott C, Marcellin P, Hénin D, Erlinger S, Benhamou JP (1993) The intraportal lymphoid nodule and its environment in chronic active hepatitis C: an immunohistochemical study. Hepatology (Baltimore, Md.) 17:366–371

Motomura W, Inoue M, Ohtake T, Takahashi N, Nagamine M, Tanno S, Kohgo Y, Okumura T (2006) Up-regulation of ADRP in fatty liver in human and liver steatosis in mice fed with high fat diet. Biochemical and biophysical research communications 340:1111–1118. doi:10.1016/j.bbrc.2005.12.121

Moucari R, Asselah T, Cazals-Hatem D, Voitot H, Boyer N, Ripault M-P, Sobesky R, Martinot-Peignoux M, Maylin S, Nicolas-Chanoine M-H, Paradis V, Vidaud M, Valla D, Bedossa P, Marcellin P (2008) Insulin resistance in chronic hepatitis C: association with genotypes 1 and 4, serum HCV RNA level, and liver fibrosis. Gastroenterology 134:416–423. doi:10.1053/j.gastro.2007.11.010

Mukhopadhyay P, Horváth B, Rajesh M, Varga ZV, Gariani K, Ryu D, Cao Z, Holovac E, Park O, Zhou Z, Xu M-J, Wang W, Godlewski G, Paloczi J, Nemeth BT, Persidsky Y, Liaudet L, Haskó G, Bai P, Boulares AH, Auwerx J, Gao B, Pacher P (2017) PARP inhibition protects against alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis. Journal of hepatology 66:589–600. doi:10.1016/j.jhep.2016.10.023

Muratori P, Granito A, Quarneti C, Ferri S, Menichella R, Cassani F, Pappas G, Bianchi FB, Lenzi M, Muratori L (2009) Autoimmune hepatitis in Italy: the Bologna experience. Journal of hepatology 50:1210–1218. doi:10.1016/j.jhep.2009.01.020

Nakamura H, Arai Y, Totoki Y, Shirota T, Elzawahry A, Kato M, Hama N, Hosoda F, Urushidate T, Ohashi S, Hiraoka N, Ojima H, Shimada K, Okusaka T, Kosuge T, Miyagawa S, Shibata T (2015) Genomic spectra of biliary tract cancer. Nature genetics 47:1003–1010. doi:10.1038/ng.3375

Nakanuma Y, Kakuda Y (2015) Pathologic classification of cholangiocarcinoma: New concepts. Best practice & research. Clinical gastroenterology 29:277–293. doi:10.1016/j.bpg.2015.02.006

Nakanuma Y, Sudo Y (2017) Biliary tumors with pancreatic counterparts. Seminars in diagnostic pathology 34:167–175. doi:10.1053/j.semdp.2016.12.013

Nayak NC, Sachdeva R (1975) Localization of hepatitis B surface antigen in conventional paraffin sections of the liver. Comparison of immunofluorescence, immunoperoxidase, and orcein staining methods with regard to their specificity and reliability as antigen marker. The American journal of pathology 81:479–492

NCD Risk Factor Collaboration (2017) Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. Lancet (London, England) 390:2627–2642. doi:10.1016/S0140-6736(17)32129-3

Neeff HP, Holzner PA, Menzel M, Bronsert P, Klock A, Lang SA, Fichtner-Feigl S, Hopt UT, Makowiec F (2018) Das intrahepatische Cholangiokarzinom : Ergebnisse nach 84 Resektionen. Der Chirurg; Zeitschrift fur alle Gebiete der operativen Medizen 89:374–380. doi:10.1007/s00104-018-0609-2

Ngu JH, Gearry RB, Frampton CM, Stedman CAM (2013) Predictors of poor outcome in patients w ith autoimmune hepatitis: a population-based study. Hepatology (Baltimore, Md.) 57:2399–2406. doi:10.1002/hep.26290

Nikias GA, Batts KP, Czaja AJ (1994) The nature and prognostic implications of autoimmune hepatitis with an acute presentation. Journal of hepatology 21:866–871. doi:10.1016/s0168-8278(94)80251-3

Nissenbaum M, Chedid A, Mendenhall C, Gartside P (1990) Prognostic significance of cholestatic alcoholic hepatitis. VA Cooperative Study Group #119. Digestive diseases and sciences 35:891–896. doi:10.1007/bf01536804

Okamura H, Nio Y, Akahori Y, Kim S, Watashi K, Wakita T, Hijikata M (2016) Fatty acid biosynthesis is involved in the production of hepatitis B virus particles. Biochemical and biophysical research communications 475:87–92. doi:10.1016/j.bbrc.2016.05.043

Olzmann JA, Carvalho P (2019) Dynamics and functions of lipid droplets. Nature reviews. Molecular cell biology 20:137–155. doi:10.1038/s41580-018-0085-z

Onal G, Kutlu O, Gozuacik D, Dokmeci Emre S (2017) Lipid Droplets in Health and Disease. Lipids in health and disease 16. doi:10.1186/s12944-017-0521-7

Orlicky DJ, Roede JR, Bales E, Greenwood C, Greenberg A, Petersen D, McManaman JL (2011) Chronic ethanol consumption in mice alters hepatocyte lipid droplet properties. Alcoholism, clinical and experimental research 35:1020–1033. doi:10.1111/j.1530-0277.2011.01434.x

Papatheodoridi M, Cholongitas E (2018) Diagnosis of Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): Current Concepts. Current pharmaceutical design 24:4574–4586. doi:10.2174/1381612825666190117102111

Pawella LM, Hashani M, Eiteneuer E, Renner M, Bartenschlager R, Schirmacher P, Straub BK (2014) Perilipin discerns chronic from acute hepatocellular steatosis. Journal of hepatology 60:633–642. doi:10.1016/j.jhep.2013.11.007

Peng Y, Qi X, Guo X (2016) Child-Pugh Versus MELD Score for the Assessment of Prognosis in Liver Cirrhosis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. Medicine 95:e2877. doi:10.1097/MD.0000000000002877

Peron J-M, Danjoux M, Kamar N, Missoury R, Poirson H, Vinel J-P, Mansuy J-M, Bureau C, Izopet J, Brousset P, Selves J (2007) Liver histology in patients with sporadic acute hepatitis E: a study of 11 patients from South-West France. Virchows Archiv : an international journal of pathology 450:405–410. doi:10.1007/s00428-007-0382-y

Petrescu F, Petrescu OI, Taisescu CI, Comănescu MV, Forţofoiu MC, Predescu IO, Roşu AF, Gheonea C, Biciuşcă V (2015) Histopathological aspects described in

patients with chronic hepatitis C. Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie 56:439–444

Pham ST, Bull RA, Bennett JM, Rawlinson WD, Dore GJ, Lloyd AR, White PA (2010) Frequent multiple hepatitis C virus infections among injection drug users in a prison setting. Hepatology (Baltimore, Md.) 52:1564–1572. doi:10.1002/hep.23885

Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, Jong YP de, Rice CM (2009) Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. Nature 457:882–886. doi:10.1038/nature07684

Purtilo DT, Sakamoto K (1981) Epstein-Barr virus and human disease: immune responses determine the clinical and pathologic expression. Human pathology 12:677–679. doi:10.1016/s0046-8177(81)80162-1

Quiroga AD, Ceballos MP, Parody JP, Comanzo CG, Lorenzetti F, Pisani GB, Ronco MT, Alvarez MdL, Carrillo MC (2016) Hepatic carboxylesterase 3 (Ces3/Tgh) is downregulated in the early stages of liver cancer development in the rat. Biochimica et biophysica acta 1862:2043–2053. doi:10.1016/j.bbadis.2016.08.006

Raoul J-L, Kudo M, Finn RS, Edeline J, Reig M, Galle PR (2018) Systemic therapy for intermediate and advanced hepatocellular carcinoma: Sorafenib and beyond. Cancer treatment reviews 68:16–24. doi:10.1016/j.ctrv.2018.05.006

Rappaport AM, Borowy ZJ, Lougheed WM, Lotto WN (1954) Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology. The Anatomical record 119:11–33. doi:10.1002/ar.1091190103

Rehm J, Mathers C, Popova S, Thavorncharoensap M, Teerawattananon Y, Patra J (2009) Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. Lancet (London, England) 373:2223–2233. doi:10.1016/S0140-6736(09)60746-7

Rehm J, Gmel GE, Gmel G, Hasan OSM, Imtiaz S, Popova S, Probst C, Roerecke M, Room R, Samokhvalov AV, Shield KD, Shuper PA (2017) The relationship between different dimensions of alcohol use and the burden of disease-an update. Addiction (Abingdon, England) 112:968–1001. doi:10.1111/add.13757

Reig M, Mariño Z, Perelló C, Iñarrairaegui M, Ribeiro A, Lens S, Díaz A, Vilana R, Darnell A, Varela M, Sangro B, Calleja JL, Forns X, Bruix J (2016) Unexpected high rate of early tumor recurrence in patients with HCV-related HCC undergoing

interferon-free therapy. Journal of hepatology 65:719–726. doi:10.1016/j.jhep.2016.04.008

Rein DB, Stevens GA, Theaker J, Wittenborn JS, Wiersma ST (2012) The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. Hepatology (Baltimore, Md.) 55:988–997. doi:10.1002/hep.25505

Reinert CP, Albtoush OM, Bitzer M, Horger M, Ioanoviciu SD (2017) Differenzialdiagnose benigner, multifokaler, nicht infektiöser Leberläsionen. RöFo 189:921–926. doi:10.1055/s-0043-113134

Remmele W, Stegner HE (1987) Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Ostrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. Der Pathologe 8:138–140

Ribback S, Calvisi DF, Cigliano A, Sailer V, Peters M, Rausch J, Heidecke C-D, Birth M, Dombrowski F (2013) Molecular and metabolic changes in human liver clear cell foci resemble the alterations occurring in rat hepatocarcinogenesis. Journal of hepatology 58:1147–1156. doi:10.1016/j.jhep.2013.01.013

Robert Koch-Institut (2019) Epidemiologisches Bulletin des Robert Koch-Instituts Ausgabe 34/2019 - Impfkalender. https://www.rki.de/DE/Content/Kommissionen/STIKO/Empfehlungen/Aktuelles/Impfkalender.pdf?__blob=publicationFile. Zugegriffen: 04. Januar 2020

Robert Koch-Institut (2020) Epidemiologisches Bulletin - Virushepatitis B und D sowie Virushepatitis C im Jahr 2019. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2020/Ausgaben/30-31_20.pdf?__blob=publicationFile. Zugegriffen: 23. Januar 2021

Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, Totsuka A, Nainan OV, Siegl G, Widell A, Margolis HS, Isomura S, Ito K (1992) Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. The Journal of general virology 73 (Pt 6):1365–1377. doi:10.1099/0022-1317-73-6-1365

Roeb E, Steffen HM, Bantel H, Baumann U, Canbay A, Demir M, Drebber U, Geier A, Hampe J, Hellerbrand C, Pathil-Warth A, Schattenberg JM, Schramm C, Seitz HK, Stefan N, Tacke F, Tannapfel A, Lynen Jansen P, Bojunga J (2015) S2k-Leitlinie nicht alkoholische Fettlebererkrankungen; AWMF Register Nr. 021-025 Version

Januar 2015, Erstauflage. Zeitschrift für Gastroenterologie 53:668–723. doi:10.1055/s-0035-1553193

Roingeard P (2013) Hepatitis C virus diversity and hepatic steatosis. Journal of viral hepatitis 20:77–84. doi:10.1111/jvh.12035

Romanelli RG, Stasi C (2016) Recent Advancements in Diagnosis and Therapy of Liver Cirrhosis. Current drug targets 17:1804–1817. doi:10.2174/1389450117666160613101413

Rubbia-Brandt L, Quadri R, Abid K, Giostra E, Malé PJ, Mentha G, Spahr L, Zarski JP, Borisch B, Hadengue A, Negro F (2000) Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. Journal of hepatology 33:106–115. doi:10.1016/s0168-8278(00)80166-x

Rubbia-Brandt L, Fabris P, Paganin S, Leandro G, Male P-J, Giostra E, Carlotto A, Bozzola L, Smedile A, Negro F (2004) Steatosis affects chronic hepatitis C progression in a genotype specific way. Gut 53:406–412. doi:10.1136/gut.2003.018770

Salomao M, Yu WM, Brown RS, Emond JC, Lefkowitch JH (2010) Steatohepatitic hepatocellular carcinoma (SH-HCC): a distinctive histological variant of HCC in hepatitis C virus-related cirrhosis with associated NAFLD/NASH. The American journal of surgical pathology 34:1630–1636. doi:10.1097/PAS.0b013e3181f31caa

Sarrazin C, Zimmermann T, Berg T, Neumann UP, Schirmacher P, Schmidt H, Spengler U, Timm J, Wedemeyer H, Wirth S, Zeuzem S (2018) S3-Leitlinie „Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-C-Virus (HCV) -Infektion“. Zeitschrift fur Gastroenterologie 56:756–838. doi:10.1055/a-0599-1320

Sawada N, Ishikawa T (1988) Reduction of potential for replicative but not unscheduled DNA synthesis in hepatocytes isolated from aged as compared to young rats. Cancer research 48:1618–1622

Schaffer JE (2003) Lipotoxicity: when tissues overeat. Current opinion in lipidology 14:281–287. doi:10.1097/00041433-200306000-00008

Schirmacher P (2018) Das hepatozelluläre Karzinom – pathologische und molekularpathologische Diagnostik | The hepatocellular carcinoma—pathological and molecular pathological diagnosis. Der Onkologe 24:659–673. doi:10.1007/s00761-018-0452-6

Schuppan D, Afdhal NH (2008) Liver cirrhosis. Lancet (London, England) 371:838–851. doi:10.1016/S0140-6736(08)60383-9

Sebastiani G, Gkouvatsos K, Pantopoulos K (2014) Chronic hepatitis C and liver fibrosis. World journal of gastroenterology 20:11033–11053. doi:10.3748/wjg.v20.i32.11033

Sekiya S, Suzuki A (2012) Intrahepatic cholangiocarcinoma can arise from Notch-mediated conversion of hepatocytes. The Journal of clinical investigation 122:3914–3918. doi:10.1172/JCI63065

Sell S (2001) Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. Hepatology (Baltimore, Md.) 33:738–750. doi:10.1053/jhep.2001.21900

Sherlock S (1983) Acute fatty liver of pregnancy and the microvesicular fat diseases. Gut 24:265–269. doi:10.1136/gut.24.4.265

Shi Q, Jiang J, Luo G (2013) Syndecan-1 serves as the major receptor for attachment of hepatitis C virus to the surfaces of hepatocytes. Journal of virology 87:6866–6875. doi:10.1128/JVI.03475-12

Shih Y-F, Liu C-J (2020) Hepatitis C Virus and Hepatitis B Virus Co-Infection. Viruses 12. doi:10.3390/v12070741

Sia D, Losic B, Moeini A, Cabellos L, Hao K, Revill K, Bonal D, Miltiadous O, Zhang Z, Hoshida Y, Cornella H, Castillo-Martin M, Pinyol R, Kasai Y, Roayaie S, Thung SN, Fuster J, Schwartz ME, Waxman S, Cordon-Cardo C, Schadt E, Mazzaferro V, Llovet JM (2015) Massive parallel sequencing uncovers actionable FGFR2-PPHLN1 fusion and ARAF mutations in intrahepatic cholangiocarcinoma. Nature communications 6:1–11. doi:10.1038/ncomms7087

Slade D (2020) PARP and PARG inhibitors in cancer treatment. Genes & development 34:360–394. doi:10.1101/gad.334516.119

Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, Simmonds P (2014) Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. Hepatology (Baltimore, Md.) 59:318–327. doi:10.1002/hep.26744

Spahr L, Rubbia-Brandt L, Genevay M, Hadengue A, Giostra E (2011) Early liver biopsy, intraparenchymal cholestasis, and prognosis in patients with alcoholic steatohepatitis. BMC gastroenterology 11:1–9. doi:10.1186/1471-230X-11-115

Stanaway JD, Flaxman AD, Naghavi M et al (2016) The global burden of viral hepatitis from 1990 to 2013: findings from the Global Burden of Disease Study 2013. Lancet (London, England) 388:1081–1088. doi:10.1016/S0140-6736(16)30579-7

Starko KM, Mullick FG (1983) Hepatic and cerebral pathology findings in children with fatal salicylate intoxication: further evidence for a causal relation between salicylate and Reye's syndrome. Lancet (London, England) 1:326–329. doi:10.1016/s0140-6736(83)91629-x

Stättermayer AF, Traussnigg S, Dienes H-P, Aigner E, Stauber R, Lackner K, Hofer H, Stift J, Wrba F, Stadlmayr A, Datz C, Strasser M, Maieron A, Trauner M, Ferenci P (2015) Hepatic steatosis in Wilson disease--Role of copper and PNPLA3 mutations. Journal of hepatology 63:156–163. doi:10.1016/j.jhep.2015.01.034

Strassburg CP, Beckebaum S, Geier A, Gotthardt D, Klein R, Melter M, Schott E, Spengler U, Tacke F, Trauner M, Weiler-Normann C, Weismüller TJ, Tannapfel A, Tischendorf JJ, Schramm C (2017) S2k Leitlinie Autoimmune Lebererkrankungen. Zeitschrift fur Gastroenterologie 55:1135–1226. doi:10.1055/s-0043-120199

Straub BK, Herpel E, Singer S, Zimbelmann R, Breuhahn K, Macher-Goeppinger S, Warth A, Lehmann-Koch J, Longerich T, Heid H, Schirmacher P (2010) Lipid droplet-associated PAT-proteins show frequent and differential expression in neoplastic steatogenesis. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc 23:480–492. doi:10.1038/modpathol.2009.191

Straub BK, Witzel HR, Pawella LM, Renner M, Eiteneuer E, Hashani M, Schirmacher P, Roth W, Mechtersheimer G (2019) Perilipin 1 Expression Differentiates Liposarcoma from Other Types of Soft Tissue Sarcoma. The American journal of pathology 189:1547–1558. doi:10.1016/j.ajpath.2019.04.017

Straub BK, Schirmacher P (2010) Pathology and biopsy assessment of non-alcoholic fatty liver disease. Digestive diseases (Basel, Switzerland) 28:197–202. doi:10.1159/000282086

Straub BK, Stoeffel P, Heid H, Zimbelmann R, Schirmacher P (2008) Differential pattern of lipid droplet-associated proteins and de novo perilipin expression in hepatocyte steatogenesis. Hepatology (Baltimore, Md.) 47:1936–1946. doi:10.1002/hep.22268

Straub BK, Gyoengyoesi B, Koenig M, Hashani M, Pawella LM, Herpel E, Mueller W, Macher-Goeppinger S, Heid H, Schirmacher P (2013) Adipophilin/perilipin-2 as a lipid droplet-specific marker for metabolically active cells and diseases associated with metabolic dysregulation. Histopathology 62:617–631. doi:10.1111/his.12038

Strnad P, Zatloukal K, Stumptner C, Kulaksiz H, Denk H (2008) Mallory-Denk-bodies: lessons from keratin-containing hepatic inclusion bodies. Biochimica et biophysica acta 1782:764–774. doi:10.1016/j.bbadis.2008.08.008

Su Q, Benner A, Hofmann WJ, Otto G, Pichlmayr R, Bannasch P (1997) Human hepatic preneoplasia: phenotypes and proliferation kinetics of foci and nodules of altered hepatocytes and their relationship to liver cell dysplasia. Virchows Archiv : an international journal of pathology 431:391–406. doi:10.1007/s004280050116

Sun X, Kaufman PD (2018) Ki-67: more than a proliferation marker. Chromosoma 127:175–186. doi:10.1007/s00412-018-0659-8

Sunbul M (2014) Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance. World journal of gastroenterology 20:5427–5434. doi:10.3748/wjg.v20.i18.5427

Syn W-K, Teaberry V, Choi SS, Diehl AM (2009) Similarities and differences in the pathogenesis of alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. Seminars in liver disease 29:200–210. doi:10.1055/s-0029-1214375

Synoracki S, Kathemann S, Schmid KW, Jastrow H, Baba HA (2018) Mangel an lysosomaler saurer Lipase (LAL-D). Der Pathologe. doi:10.1007/s00292-017-0400-z

Sztalryd C, Brasaemle DL (2017) The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis. Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids 1862:1221–1232. doi:10.1016/j.bbalip.2017.07.009

Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Gonzalez FJ, Aoyama T (2008) PPARalpha activation is essential for HCV core protein-induced hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma in mice. The Journal of clinical investigation 118:683–694. doi:10.1172/JCI33594

Tang N, Zhang Y, Liu Z, Ai X, Liang Q (2017) Correlation of four potential biomarkers of liver fibrosis with liver function and grade of hepatic fibrosis in a neonatal cholestatic rat model. Molecular medicine reports 16:415–421. doi:10.3892/mmr.2017.6588

Tannapfel A, Wittekind C (2001) Präneoplasien der LeberDefinition – Differenzialdiagnose – klinische Konsequenz : Definition – Differenzialdiagnose – klinische Konsequenz. Der Pathologe 22:399–406. doi:10.1007/s002920100493

Tannapfel A, Grund D, Katalinic A, Uhlmann D, Köckerling F, Haugwitz U, Wasner M, Hauss J, Engeland K, Wittekind C (2000) Decreased expression of p27 protein is associated with advanced tumor stage in hepatocellular carcinoma. International journal of cancer 89:350–355. doi:10.1002/1097-0215(20000720)89:4<350::aid-ijc6>3.0.co;2-3

Tannapfel A, Denk H, Dienes H-P, Langner C, Schirmacher P, Trauner M, Flott-Rahmel B (2011) Histopathological diagnosis of non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease. Virchows Archiv : an international journal of pathology 458:511–523. doi:10.1007/s00428-011-1066-1

Tannapfel A, Dienes H-P, Lohse AW (2012) The indications for liver biopsy. Deutsches Arzteblatt international 109:477–483. doi:10.3238/arztebl.2012.0477

Tansey JT, Sztalryd C, Gruia-Gray J, Roush DL, Zee JV, Gavrilova O, Reitman ML, Deng CX, Li C, Kimmel AR, Londos C (2001) 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 98:6494–6499. doi:10.1073/pnas.101042998

Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, Nakayoshi T, Wakuta M, Miyakawa Y, Mizokami M (2009) A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. Journal of virology 83:10538–10547. doi:10.1128/JVI.00462-09

Tayyab GUN, Rasool S, Nasir B, Rubi G, Abou-Samra A-B, Butt AA (2020) Hepatocellular carcinoma occurs frequently and early after treatment in HCV genotype 3 infected persons treated with DAA regimens. BMC gastroenterology 20:93. doi:10.1186/s12876-020-01249-4

Terada T, Nakanuma Y, Ohta T, Nagakawa T (1992) Histological features and interphase nucleolar organizer regions in hyperplastic, dysplastic and neoplastic epithelium of intrahepatic bile ducts in hepatolithiasis. Histopathology 21:233–240. doi:10.1111/j.1365-2559.1992.tb00381.x

The International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia (2009) Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. Hepatology (Baltimore, Md.) 49:658–664. doi:10.1002/hep.22709

Thomssen R, Bonk S, Propfe C, Heermann KH, Köchel HG, Uy A (1992) Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. Medical microbiology and immunology 181:293–300. doi:10.1007/bf00198849

Tong MJ, el-Farra NS, Grew MI (1995) Clinical manifestations of hepatitis A: recent experience in a community teaching hospital. The Journal of infectious diseases 171 Suppl 1:S15-8. doi:10.1093/infdis/171.supplement_1.s15

Trefts E, Gannon M, Wasserman DH (2017) The liver. Current biology : CB 27:R1147-R1151. doi:10.1016/j.cub.2017.09.019

Tsai T-H, Chen E, Li L, Saha P, Lee H-J, Huang L-S, Shelness GS, Chan L, Chang BH-J (2017) The constitutive lipid droplet protein PLIN2 regulates autophagy in liver. Autophagy 13:1130–1144. doi:10.1080/15548627.2017.1319544

Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK (2014) Liver cirrhosis. Lancet (London, England) 383:1749–1761. doi:10.1016/S0140-6736(14)60121-5

Valdivia AG, Martínez A, Damián FJ, Quezada T, Ortíz R, Martínez C, Llamas J, Rodríguez ML, Yamamoto L, Jaramillo F, Loarca-Piña MG, Reyes JL (2001) Efficacy of N-acetylcysteine to reduce the effects of aflatoxin B1 intoxication in broiler chickens. Poultry science 80:727–734. doi:10.1093/ps/80.6.727

Vaughan G, Goncalves Rossi LM, Forbi JC, Paula VS de, Purdy MA, Xia G, Khudyakov YE (2014) Hepatitis A virus: host interactions, molecular epidemiology and evolution. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases 21:227–243. doi:10.1016/j.meegid.2013.10.023

Vieyres G, Thomas X, Descamps V, Duverlie G, Patel AH, Dubuisson J (2010) Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus. Journal of virology 84:10159–10168. doi:10.1128/JVI.01180-10

Vitaglione P, Mazzone G, Lembo V, D'Argenio G, Rossi A, Guido M, Savoia M, Salomone F, Mennella I, Filippis F de, Ercolini D, Caporaso N, Morisco F (2019)

Coffee prevents fatty liver disease induced by a high-fat diet by modulating pathways of the gut-liver axis. Journal of nutritional science 8:1-11. doi:10.1017/jns.2019.10

Vogel A, Wege H, Caca K, Nashan B, Neumann U (2014) The diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma. Deutsches Arzteblatt international 111:748–754. doi:10.3238/arztebl.2014.0748

Walker M, El-Serag HB, Sada Y, Mittal S, Ying J, Duan Z, Richardson P, Davila JA, Kanwal F (2016) Cirrhosis is under-recognised in patients subsequently diagnosed with hepatocellular cancer. Alimentary pharmacology & therapeutics 43:621–630. doi:10.1111/apt.13505

Walther TC, Farese RV (2012) Lipid droplets and cellular lipid metabolism. Annual review of biochemistry 81:687–714. doi:10.1146/annurev-biochem-061009-102430

Walther TC, Chung J, Farese RV (2017) Lipid Droplet Biogenesis. Annual review of cell and developmental biology 33:491–510. doi:10.1146/annurev-cellbio-100616-060608

Wanless IR, Lentz JS (1990) Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. Hepatology (Baltimore, Md.) 12:1106–1110

Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. Science (New York, N.Y.) 123:309–314. doi:10.1126/science.123.3191.309

Watanabe S, Okita K, Harada T, Kodama T, Numa Y, Takemoto T, Takahashi T (1983) Morphologic studies of the liver cell dysplasia. Cancer 51:2197–2205. doi:10.1002/1097-0142(19830615)51:12<2197::aid-cncr2820511208>3.0.co;2-5

Werner M, Prytz H, Ohlsson B, Almer S, Björnsson E, Bergquist A, Wallerstedt S, Sandberg-Gertzén H, Hultcrantz R, Sangfelt P, Weiland O, Danielsson A (2008) Epidemiology and the initial presentation of autoimmune hepatitis in Sweden: a nationwide study. Scandinavian journal of gastroenterology 43:1232–1240. doi:10.1080/00365520802130183

Westphal JF, Vetter D, Brogard JM (1994) Hepatic side-effects of antibiotics. The Journal of antimicrobial chemotherapy 33:387–401. doi:10.1093/jac/33.3.387

White DL, Kanwal F, El-Serag HB (2012) Association between nonalcoholic fatty liver disease and risk for hepatocellular cancer, based on systematic review. Clinical

gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association 10:1342-1359.e2. doi:10.1016/j.cgh.2012.10.001

WHO (2017) Global Hepatitis Report, 2017. http://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/. Zugegriffen: 30. September 2017

WHO (2018) Global status report on alcohol and health 2018. https://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/. Zugegriffen: 28. November 2019

WHO (2019) Digestive system tumours; The WHO classification of digestive system tumours presented in this book reflects the views of the WHO Classification Tumours Editorial Board that convened at the International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France, 3-5 July 2018

Wolins NE, Rubin B, Brasaemle DL (2001) TIP47 associates with lipid droplets. The Journal of biological chemistry 276:5101–5108. doi:10.1074/jbc.M006775200

Wolins NE, Skinner JR, Schoenfish MJ, Tzekov A, Bensch KG, Bickel PE (2003) Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets. The Journal of biological chemistry 278:37713–37721. doi:10.1074/jbc.M304025200

Wolins NE, Brasaemle DL, Bickel PE (2006) A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. FEBS letters 580:5484–5491. doi:10.1016/j.febslet.2006.08.040

Yamaguchi T, Matsushita S, Motojima K, Hirose F, Osumi T (2006) 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 281:14232–14240. doi:10.1074/jbc.M601682200

Yang L, Wang Y, Shi Y, Bu H, Ye F (2016a) Deletion of SIP1 promotes liver regeneration and lipid accumulation. Pathology, research and practice 212:421–425. doi:10.1016/j.prp.2016.02.015

Yang W-T, Wu L-W, Tseng T-C, Chen C-L, Yang H-C, Su T-H, Wang C-C, Kuo SF-T, Liu C-H, Chen P-J, Chen D-S, Liu C-J, Kao J-H (2016b) Hepatitis B Surface Antigen Loss and Hepatocellular Carcinoma Development in Patients With Dual Hepatitis B and C Infection. Medicine 95:e2995. doi:10.1097/MD.0000000000002995

Yu VL, Miller WP, Wing EJ, Romano JM, Ruiz CA, Bruns FJ (1982) Disseminated listeriosis presenting as acute hepatitis. Case reports and review of hepatic involvement in listeriosis. The American journal of medicine 73:773–777. doi:10.1016/0002-9343(82)90423-5

Zen Y, Aishima S, Ajioka Y, Haratake J, Kage M, Kondo F, Nimura Y, Sakamoto M, Sasaki M, Shimamatsu K, Wakasa K, Park YN, Chen MF, Atomi Y, Nakanuma Y (2005) Proposal of histological criteria for intraepithelial atypical/proliferative biliary epithelial lesions of the bile duct in hepatolithiasis with respect to cholangiocarcinoma: preliminary report based on interobserver agreement. Pathology international 55:180–188. doi:10.1111/j.1440-1827.2005.01816.x

Zerban H, Radig S, Kopp-Schneider A, Bannasch P (1994) Cell proliferation and cell death (apoptosis) in hepatic preneoplasia and neoplasia are closely related to phenotypic cellular diversity and instability. Carcinogenesis 15:2467–2473. doi:10.1093/carcin/15.11.2467

Zhang W-C, Zhao F-R, Chen J, Chen W-X (2014) Meta-analysis: diagnostic accuracy of antinuclear antibodies, smooth muscle antibodies and antibodies to a soluble liver antigen/liver pancreas in autoimmune hepatitis. PloS one 9:e92267. doi:10.1371/journal.pone.0092267

Zhou B, Cai GFF, Lv HKK, Xu SFF, Wang ZTT, Jiang ZGG, Hu CGG, Di Chen YD (2019) Factors Correlating to the Development of Hepatitis C Virus Infection among Drug Users-Findings from a Systematic Review and Meta-Analysis. International journal of environmental research and public health 16. doi:10.3390/ijerph16132345

Zimmerman HJ, Ishak KG (1982) Valproate-induced hepatic injury: analyses of 23 fatal cases. Hepatology (Baltimore, Md.) 2:591–597. doi:10.1002/hep.1840020513

Ziol M, Poté N, Amaddeo G, Laurent A, Nault J-C, Oberti F, Costentin C, Michalak S, Bouattour M, Francoz C, Pageaux GP, Ramos J, Decaens T, Luciani A, Guiu B, Vilgrain V, Aubé C, Derman J, Charpy C, Zucman-Rossi J, Barget N, Seror O, Ganne-Carrié N, Paradis V, Calderaro J (2018) Macrotrabecular-massive hepatocellular carcinoma: A distinctive histological subtype with clinical relevance. Hepatology (Baltimore, Md.) 68:103–112. doi:10.1002/hep.29762

8 Anhang

Supp. Tab. 1: Steatosegrad und prozentualer Anteil an Leberbiopsien mit Perilipin-positiven Foci von Patienten mit chronischer Hepatitis C

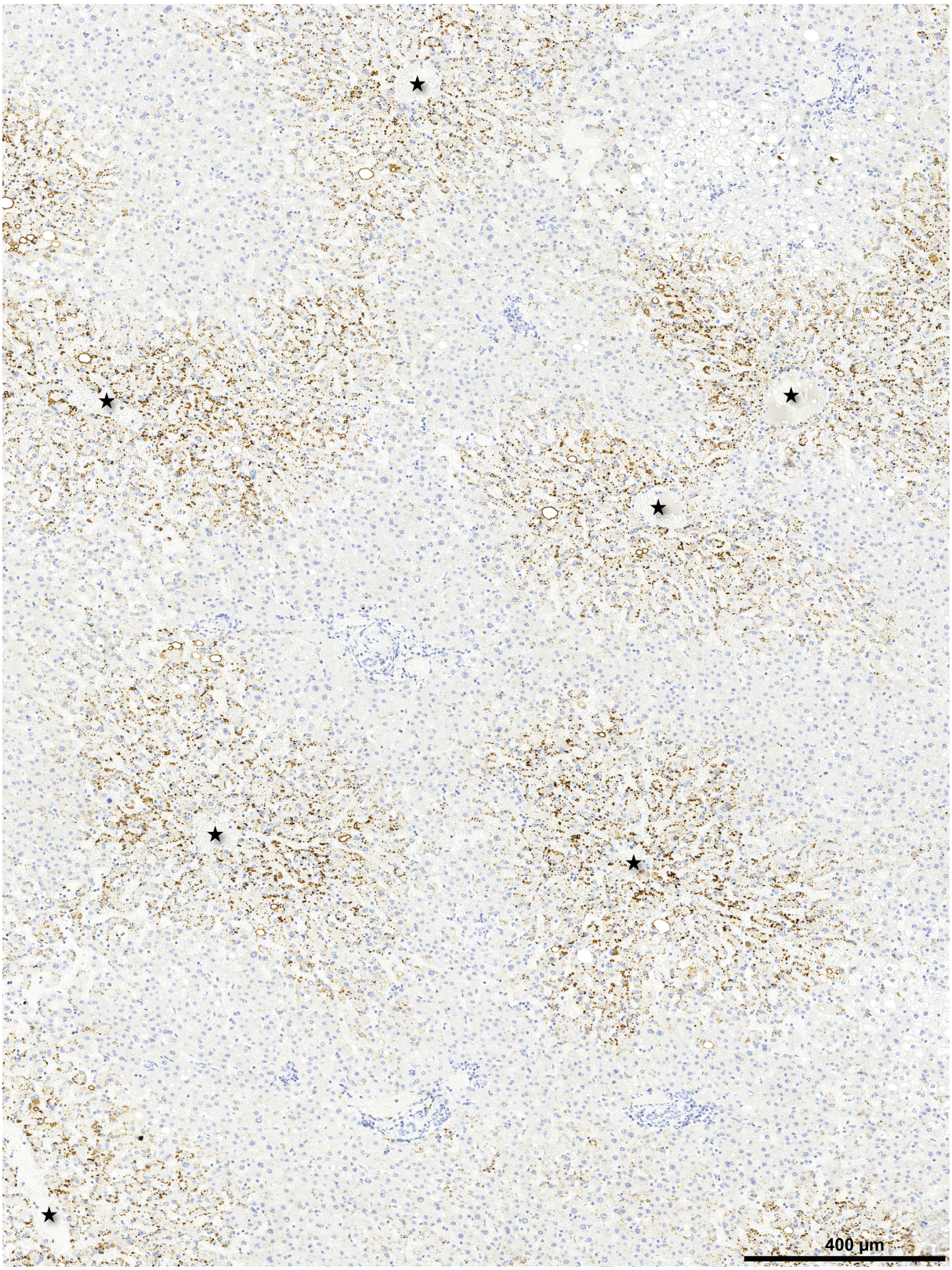
Steatosegrad in % (gemäß H&E)	Stichprobengröße (N)	Biopsien mit PLIN2-positiven Foci [%]	Biopsien mit PLIN1-positiven Foci [%]
<5	89	41,57	25,84
5- 33	94	42,55	27,66
33- 66	27	14,81	3,70
>66	16	0	0

PLIN1: Perilipin 1, PLIN2: Perilipin 2.

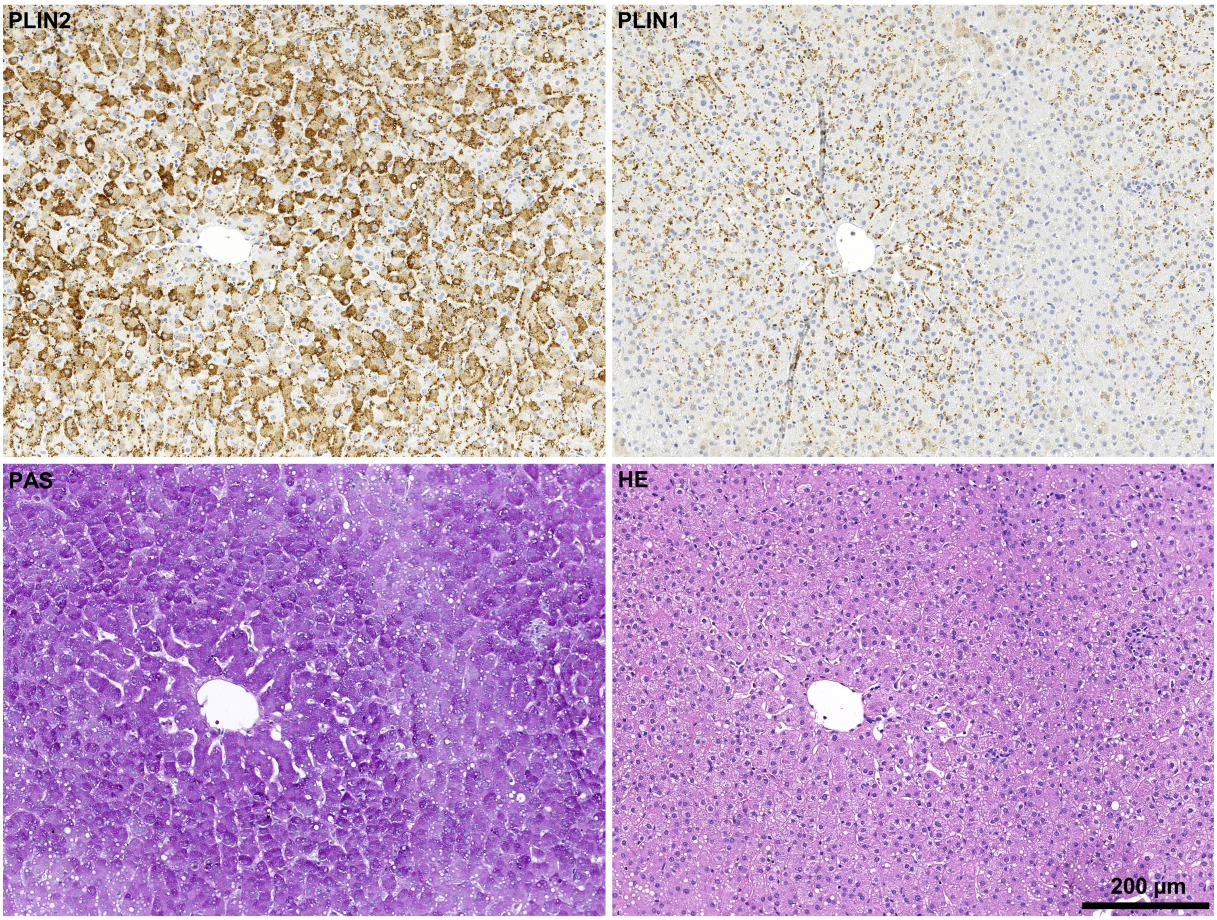
Supp. Tab. 2: Klinische und histologische Parameter von Patienten mit chronischer Hepatitis B

Patienten-ID	Grading (0-4) gemäß Desmet	Staging (0-4) gemäß Desmet	Alter (a)	Geschlecht (♂= 1, ♀ = 2)	HBV-DNA-Viruslast (IU/ml)
201	1	1	43	1	4.000
202*	2	2	23	1	140.000
203	1	1	45	1	70
204*	1	1	34	2	2.200
205*	1,5	2,5	27	1	690.000
206	1,5	1	27	2	180
207	0	0,5	34	1	580
208	1	1,5	66	2	1.700
209	1,5	1,5	48	1	1.600
210	1,5	1,5	27	1	340
211	2	4	42	1	570.000
212*	0	2	33	1	70
213	2	2	51	2	16.000
214	1,5	1,5	48	1	64.000
215	1	0	59	2	1000
216	1	1	61	2	75.000
217	1	0	40	1	1.300
218	2	3,5	35	2	42.000.000
220	2,5	4	48	2	116
221	1	1	45	2	3.100
222	3	2	59	1	150.000.000
223	0,5	0	24	2	99.000
224*	1	0	37	2	76.000
225	1,5	0	34	2	22.000
226*	2	1	30	2	250
227	3	2	59	2	190.000
228	2	1,5	24	1	8.700
229	2	2	47	1	Unbekannt
230	2,5	4	49	1	Unbekannt
231	2	2	48	2	Unbekannt
232	1	1	30	2	Unbekannt
233	3	4	56	2	Unbekannt
234	2	2	43	2	Unbekannt

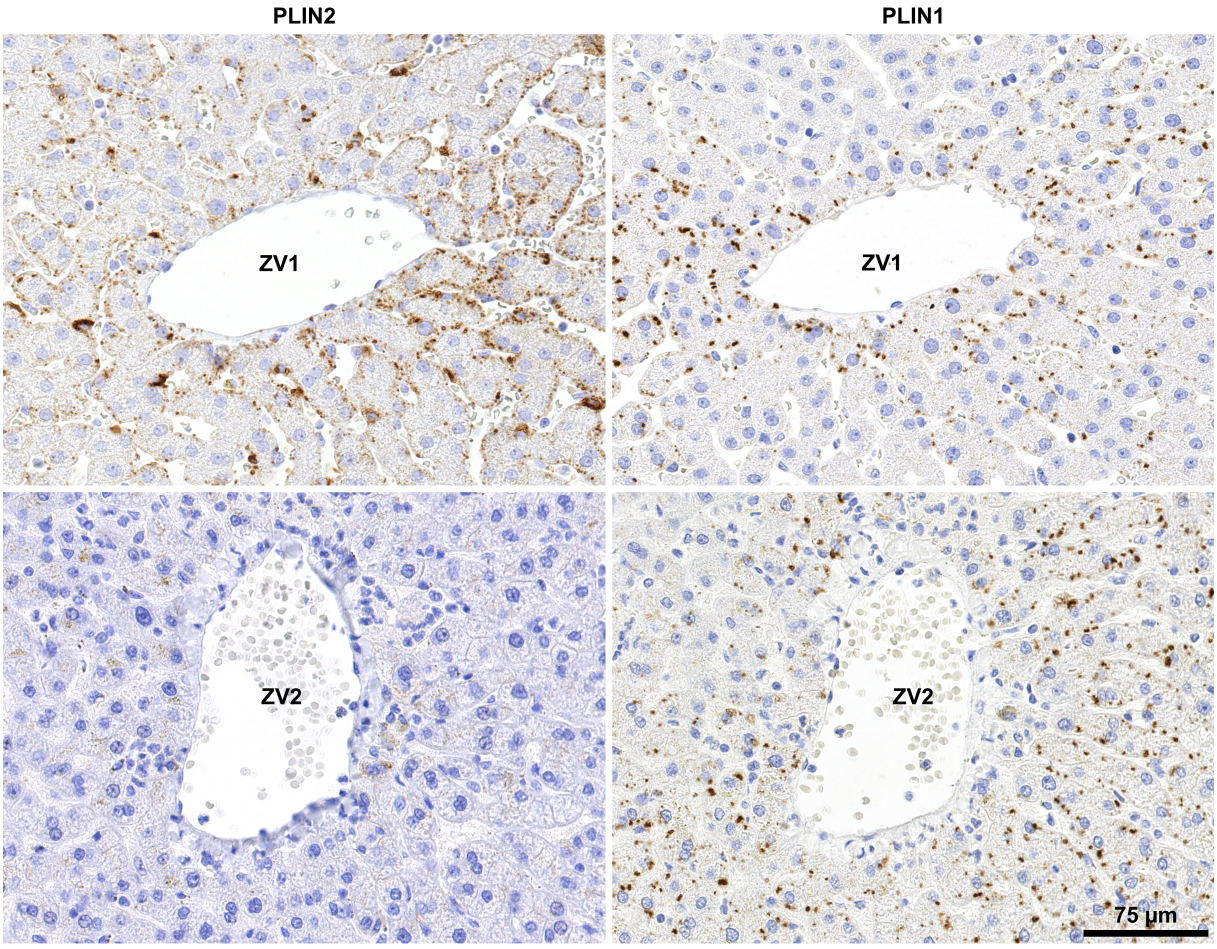
***:** Biopsie mit Perilipin 2-positiven Foci.



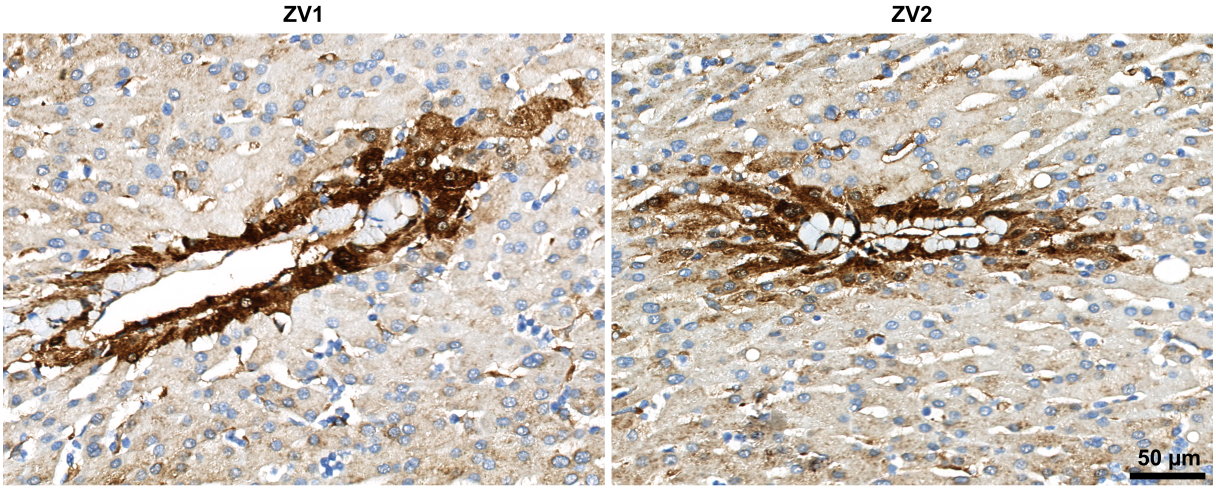
Supp. Abb. 1: Zonale Bevorzugung von Perilipin 1 in Zone 3. *: Zentralvene.



Supp. Abb. 2: Immunhistochemie gegen Perilipin 1 und 2 in einer Leberbiopsie bei PSC. PLIN1: Perilipin 1, PLIN2: Perilipin 2.



Supp. Abb. 3: Perilipin-Immunhistochemie im Leberresektat bei Echinococcus granulosus. ZV1 und ZV2: 2 verschiedene Zentralvenen, PLIN 1: Perilipin 1, PLIN2: Perilipin 2.



Supp. Abb. 4: Glutaminsynthetasefärbung in Zone 3. ZV1 und ZV2: 2 verschiedene Zentralvenen (Zone 3).

Danksagung

Ein besonderer Dank geht an meine Doktormutter , die mir sowohl als Fachärztin für Pathologie als auch als Wissenschaftlerin ein großes Vorbild ist und mir unermüdlich mit Rat und Tat zur Seite stand.

Vielen Dank an für die Möglichkeit im Institut für Pathologie meine Dissertation zu schreiben.

Ich danke für die Bereitstellung des HCV-Kollektivs inklusive klinisch-pathologischer Daten.

Auch möchte ich mich bei bedanken, der uns bei der Zusammenstellung des Kollektivs von Patienten mit chronischer Hepatitis B half.

Vielen Dank an für die Hilfe mit immunhistochemischen Färbungen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Ein besonderer Dank gilt auch , der sowohl mit fachlichem Rat als auch mit seinen umfassenden Kenntnissen im Umgang mit Bildbearbeitungsprogrammen mir jederzeit zur Seite stand.

Vielen Dank an für die Hilfe bei der statistischen Auswertung und graphischen Darstellung der Ergebnisse.

Auch danke ich den Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik für die statistische Beratung.

Ein besonderer Dank geht an die Johannes Gutenberg-Universität sowie die Universitätsmedizin Mainz für die Möglichkeit der Promotion.

Ich danke meiner Familie und für die immerwährende Unterstützung und Motivation bezüglich meiner Doktorarbeit.

Tabellarischer Lebenslauf