

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Genomweite molekulargenetische Untersuchung von DNA
Copy Number Variations (CNVs) in cholangiozellulären
Karzinomen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Alexander Arnold

aus Ramenskoje

Datum der Promotion: 09.09.2016

Abstract

In order to study molecular similarities and differences of intrahepatic (IH-CCA) and extrahepatic (EH-CCA) cholangiocarcinoma, 24 FFPE tumor samples (13 IH-CCA, 11 EH-CCA) were analyzed for whole genome copy number variations (CNVs) using a new high-density Molecular Inversion Probe Single Nucleotide Polymorphism (MIP SNP) assay.

For both tumor subtypes, the most frequent losses were detected on chromosome 1p, 3p, 6q and 9 while gains were mostly seen in 1q, 8q as well as complete chromosome 17 and 20. Applying the statistical GISTIC (Genomic Identification of Significant Targets In Cancer) tool we identified potential novel candidate tumor suppressor- (*DBC1*, *FHIT*, *PPP2R2A*) and oncogenes (*LYN*, *FGF19*, *GRB7*, *PTPN1*) within these regions of chromosomal instability.

Next to shared aberrations in IH-CCA and EH-CCA, we additionally found significant differences in copy number variations on chromosome 3 and 14. Moreover, due to the fact that mutations in the *Isocitrate dehydrogenase* (*IDH-1* and *IDH-2*) genes are more frequent in our IH-CCA than in our EH-CCA samples, we suggest that the tumor subtypes have a different molecular profile.

In conclusion, new possible target genes within regions of high significant copy number aberrations were detected using a high-density Molecular Inversion Probe Single Nucleotide Polymorphism (MIP SNP) assay, which opens a future perspective of fast routine copy number and marker gene identification for gene targeted therapy.

Abstrakt

Um Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen intrahepatischen (IH-CCC) und extrahepatischen (EH-CCC) Cholangiokarzinomen zu untersuchen, wurden 24 Formalin-fixierte (13 IH-CCC, 11 EH-CCC) Tumorproben hinsichtlich genomweiter Copy Number Variations (CNVs) mit Hilfe der hochauflösenden Molecular Inversion Probe Single Nucleotide Polymorphism (MIP SNP) Technologie analysiert.

In beiden Tumorsubtypen wurden die häufigsten DNA Verluste auf Chromosom 1p, 3p, 6q und 9 detektiert, während die DNA Gewinne auf Chromosom 1q, 8q und den kompletten Chromosomen 17 und 20 lokalisiert waren. Mit Hilfe des statistischen Algorithmus GISTIC (Genomic Identification of Significant Targets In Cancer) konnten innerhalb dieser Regionen mit chromosomaler Instabilität mögliche neue Tumorsuppressor- (*DBC1*, *FHIT*, *PPP2R2A*) und Onkogene (*LYN*, *FGF19*, *GRB7*, *PTPN1*) identifiziert werden.

Neben den gemeinsamen Copy Number Aberrationen in IH-CCC und EH-CCC wurden signifikante Unterschiede bezüglich der DNA-Kopienzahl zwischen den Tumorsubtypen auf Chromosom 3 und 14 gefunden. Des Weiteren wurden im vorliegenden Tumorkollektiv Mutationen in den *Isocitrate dehydrogenase (IDH-1 und IDH-2)* Genen häufiger in IH-CCC als in EH-CCC detektiert, sodass ein unterschiedliches subtypenspezifisches molekularpathologisches Profil der Tumorsubtypen angenommen werden kann.

Zusammenfassend konnten mit Hilfe der Molecular Inversion Probe Single Nucleotide Polymorphism (MIP SNP) Technologie innerhalb signifikanter Copy Number Aberrationen neue potentielle Zielgene in Cholangiokarzinomen identifiziert werden. Durch diese Methode wird die Perspektive einer zukünftigen schnellen, in der Routine einsetzbaren Bestimmung von DNA Copy Number Status und Markergen-Identifizierung zur individualisierten, Marker-basierten Therapie eröffnet.

Inhalt

1	Einleitung.....	5
1.1	Grundlagen der Karzinogenese.....	5
1.2	Definition des Cholangiokarzinoms	6
1.3	Epidemiologie des Cholangiokarzinoms.....	7
1.4	Risikofaktoren des Cholangiokarzinoms.....	8
1.5	Klinik und Diagnostik des Cholangiokarzinoms	9
1.6	Makro- und mikroskopische Einteilung des Cholangiokarzinoms.....	10
1.7	Molekulare Pathogenese des Cholangiokarzinoms.....	13
1.8	Therapie des Cholangiokarzinoms	18
2	Zielsetzung	20
3	Material und Methoden	21
3.1	Patienten und Tumorproben.....	21
3.2	Isolierung genomischer DNA aus Tumorgewebe	23
3.3	Konzentrationsbestimmungen genomischer DNA	23
3.4	Molecular Inversion Probe (MIP) Technologie.....	24
3.5	Analyse der Copy Number Daten mittels Nexus Copy Number Software	27
3.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	31
3.7	Agarose-Gelelektrophorese.....	33
3.8	Aufreinigung der PCR für die Sequenzierung.....	33
3.9	DNA-Sequenzierung.....	34
3.10	RNA Isolierung aus Tumorgewebe.....	35
3.11	cDNA-Synthese	35
3.12	Real Time quantitative PCR	36
3.13	Erstellung eines Tissue-Microarrays (TMA).....	38
3.14	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH).....	39
3.15	Immunfärbung mittels Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode	40
4	Ergebnisse.....	43
4.1	Genomweite Analyse von chromosomalen Amplifikationen und Deletionen mit Hilfe der Molecular Inversion Probe (MIP) Technologie	43
4.2	Identifizierung neuer Zielgene innerhalb signifikanter Copy Number Aberrationen mittels GISTIC Algorithmus.....	44

4.3	Nachweis der Copy Number Aberrationen innerhalb der GISTIC definierten Zielgene mittels Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)	46
4.4	Bestimmung der mRNA Expression in GISTIC definierten Zielgenen mittels Real-Time PCR	47
4.5	Immunhistochemische Untersuchung der Proteinexpression von ErbB2	48
4.6	Identifizierung eines unterschiedlichen subtypenspezifischen Copy Number Aberrationsmusters	51
4.7	Unterschiedliches Mutationsprofil im <i>IDH-1</i> und <i>IDH-2</i> Gen in intrahepatischen und extrahepatischen Cholangiokarzinomen	52
5	Diskussion	55
5.1	Genomweite Untersuchung von chromosomalen Amplifikationen und Deletionen mittels Molecular Inversion Probe (MIP) in Cholangiokarzinomen	55
5.2	Identifizierung neuer Zielgene innerhalb signifikanter Copy Number Aberrationen mittels GISTIC Algorithmus	57
5.3	Verifikation von Copy Number Aberrationen innerhalb GISTIC definierter Zielgene mittels Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH), Real-Time PCR und Immunhistochemie	60
5.4	Detektion molekularpathologischer Unterschiede zwischen intra- und extrahepatischen Cholangiokarzinomen	63
5.5	Ausblick	66
6	Zusammenfassung	68
7	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	70
8	Literaturverzeichnis	71
9	Eidesstattliche Versicherung	80
10	Lebenslauf	82
11	Danksagung	84
12	Abkürzungsverzeichnis	85

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Karzinogenese

Der Vorgang der Entstehung eines malignen Tumors, in dessen Rahmen verschiedene genetische Transformationen stattfinden, wird als Karzinogenese bezeichnet (1). Als Auslöser für die entscheidenden genetischen Veränderungen, die zur Tumorigenese führen, werden neben einer erblichen Disposition vielfältige chemische, physikalische und biologische Noxen verantwortlich gemacht (1).

Fundamentale genetische Mechanismen der Tumorentstehung umfassen eine veränderte Regulierung von Genen, die für die Zellteilung und Differenzierung zuständig sind. Die entscheidenden Gentyten stellen hierbei die Protoonkogene und Tumorsuppressorgene dar (2). Protoonkogene kodieren für Zellwachstum, kontrollierende oder überwachende Proteine und den programmierten Zelltod (Apoptose) (3), während Tumorsuppressorgene eine proliferationshemmende und differenzierungsfördernde Wirkung auf ein bestimmtes Zielgewebe ausüben (4). Eine veränderte Aktivität dieser beiden Gentyten führt somit zu einer unkontrollierten zellulären Dauerproliferation mit (maligner) Entartung des Ursprungsgewebes (4).

Für die Entstehung der Veränderungen in den betroffenen Gentyten wurden verschiedene Mechanismen identifiziert. So können Punktmutationen, Genamplifikationen oder Gendeletionen zu einer Aktivierung von Onkogenen oder zum Funktionsausfall von Tumorsuppressorgenen führen (3). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass eine Vervielfältigung (Amplifikation) des *ERBB2* Gens über eine verstärkte Ausbildung von Wachstumsfaktoren zur Tumorentstehung und Progression des Mammakarzinoms führen kann (5).

Die zuvor erwähnten Genamplifikationen und Gendeletionen werden unter dem Begriff Copy Number Variations (CNVs) zusammengefasst, welcher die strukturelle Variation in der Kopienzahl einzelner DNA Abschnitte beschreibt. Diese beinhalten DNA Gewinne (Amplifikationen) oder Verluste (Deletionen), welche größer als eine Kilobase (kb) groß sind (6). Trotz vielfältiger Reparatursmechanismen treten CNVs 100 bis 10.000 mal häufiger auf als Punktmutationen (7). Obwohl deren Entstehungsmechanismus noch nicht endgültig geklärt ist, nimmt man sowohl Fehler bei der nicht-allelischen homologen Rekombination, als auch Non-homologous End Joining (NHEJ) als mögliche Ursachen an (8).

Ein weiterer Mechanismus, der zum Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen führen kann, wird als Loss of Heterozygosity (LOH) bezeichnet. Grundsätzlich bezeichnet Heterozygotie den Zustand eines in verschiedenen Merkmalsausprägungen (Allelen) vorliegenden Gens. Ein Verlust der Heterozygotie entsteht Knudsons 2-Hit-Hypothese zur Folge, wenn beide Allele durch verschiedene Defekte (erbliche oder somatische Mutation) ausfallen (9).

1.2 Definition des Cholangiokarzinoms

Gallengangskarzinome, sog. cholangiozelluläre Karzinome, sind hochmaligne Tumoren, die von einer neoplastischen Transformation des Gallengangsepithels ausgehen. Die Tumoren werden anhand ihrer anatomischen Lage in intrahepatische und extrahepatische Cholangiokarzinome unterteilt, von denen die letzteren wiederum in proximale (perihiläre oder sog. Klatskin Tumoren) und distale subtypisiert werden (10). Trotz der allgemeinen Unterscheidung von intra- und extrahepatischen (perihilären und distalen) Cholangiokarzinomen bestehen seitens der Union internationale contre le cancer (UICC) und der World Health Organization (WHO) verschiedene Definitionen dieser Tumorsubtypen anhand ihrer anatomischen Lokalisation (10, 11). So grenzt die UICC Klassifikation perihiläre von intrahepatischen Cholangiokarzinomen proximal durch Gallengänge zweiter Ordnung ab. Die distalen Cholangiokarzinome werden wiederum durch den einsetzenden Ductus cysticus in die extrahepatischen Gallengänge vom perihilären Subtyp getrennt. Auf der anderen Seite definiert die WHO perihiläre Cholangiokarzinome als Tumoren, die vom rechten oder linken Ductus hepaticus ausgehen ohne den Ansatzpunkt des Ductus cysticus zu berücksichtigen. Andererseits gehören nach WHO Einteilung auch perihiläre Cholangiokarzinome zu den intrahepatischen Tumoren, die vom intrahepatischen Gallengangsepithel ausgehen. Diese uneinheitlichen Klassifikationen haben teilweise zu einer unterschiedlichen Gruppierung der verschiedenen Subtypen des Cholangiokarzinoms beigetragen (10).

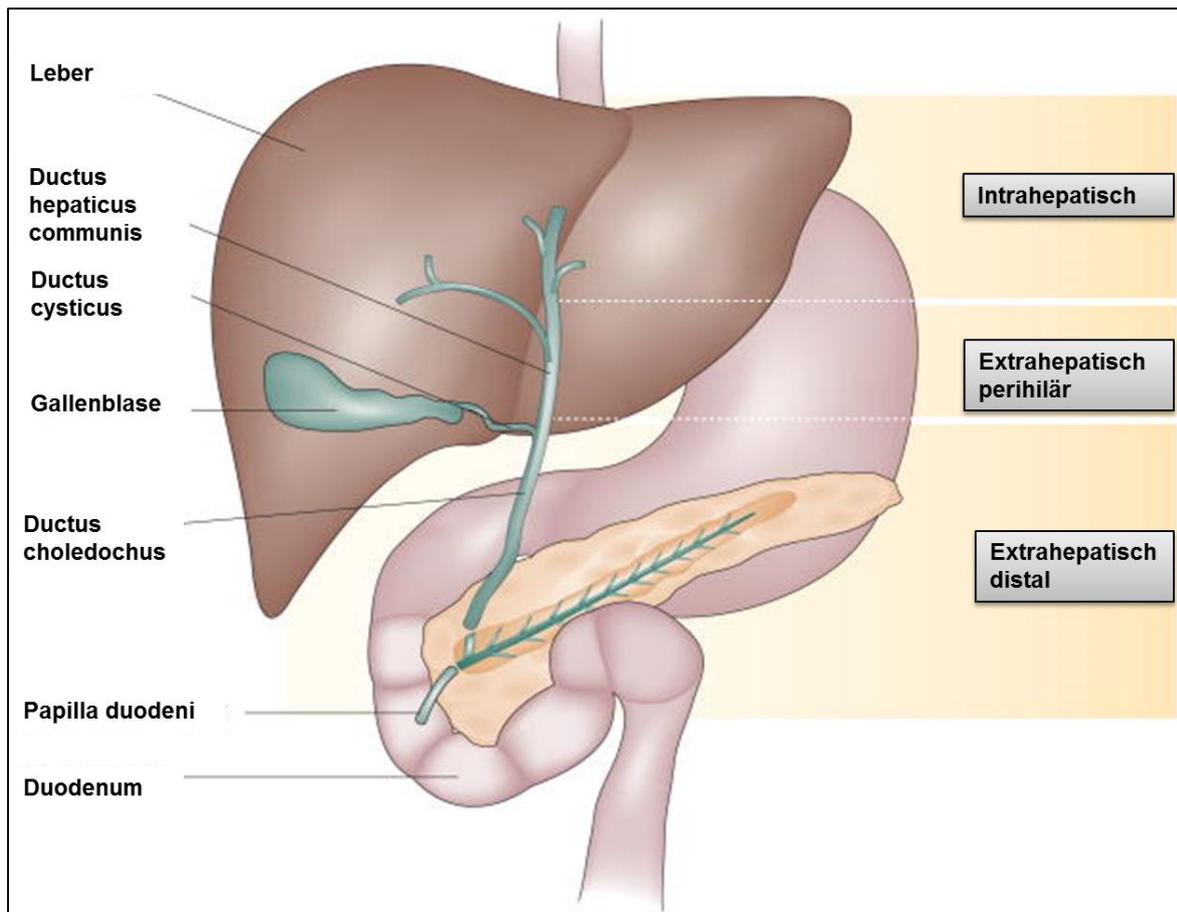


Abbildung 1-1

Einteilung der Subtypen des Cholangiokarzinoms in intrahepatisch und extrahepatisch (perihilär und distal) basierend auf der anatomischen Lokalisation nach der UICC Klassifikation.

Modifiziert nach Blechacz et al, 2011 (10)

1.3 Epidemiologie des Cholangiokarzinoms

Die Inzidenz des cholangiozellulären Karzinoms, welches 3% der gesamten gastrointestinalen Tumoren darstellt, steigt weltweit (12, 13). Jedoch variiert die Inzidenz in den verschiedenen Ländern sehr stark mit einer Rate von 1-2/100.000 in Westeuropa und einer bis zu hundertfach höheren Rate in Südostasien (14). Für diese Diskrepanz werden unterschiedliche lokale Risikofaktoren und genetische Voraussetzungen verantwortlich gemacht (15). Sowohl bei den intra- als auch extrahepatischen Cholangiokarzinomen sind Männer weltweit mit einem Verhältnis von 1.5 häufiger betroffen als Frauen (14).

Bei beiden Subtypen sind die meisten Betroffenen bei Diagnosestellung über 65 Jahre alt (16). Jedoch sind Patienten in Ländern mit einer höheren Inzidenz (Südostasien)

aufgrund deutlich definierter lokaler Risikofaktoren häufig schon früher betroffen (14). Unterschiede zwischen den intra- und extrahepatischen Gallengangskarzinomen zeigen sich vor allem bei den Überlebenswahrscheinlichkeiten: Während die Überlebensrate von 5 Jahren bei den intrahepatischen meist unter 5% liegt, ist diese bei den extrahepatischen Tumoren bei bis zu 17.3% (14).

Auch in der Inzidenz variieren die unterschiedlichen Subtypen: Die Großzahl der Tumoren sind extrahepatisch (90%) lokalisiert, von denen wiederum die perihilären (Klatskin Tumoren) mit über 50% häufiger als die distalen Gallengangskarzinome sind. Intrahepatische Cholangiokarzinome sind mit 10% deutlich seltener (17, 18).

Interessanterweise zeigte sich in den letzten 30 Jahren eine deutliche Inzidenzsteigerung des intrahepatischen Subtyps, während für das extrahepatische Cholangiokarzinom ein Rückgang der Inzidenz verzeichnet werden konnte (19, 20). Parallel zur Inzidenz findet sich auch eine Zunahme der Mortalitätsrate für die intrahepatischen Gallengangskarzinome bei einer stabilen bis abnehmenden Mortalitätsrate für die extrahepatischen cholangiozellulären Karzinome (21). Gegenwärtig herrscht immer noch eine Debatte, ob es sich hierbei um einen tatsächlichen Zuwachs von intrahepatischen Cholangiokarzinomen handelt. Studien aus den USA und England weisen auf eine mögliche Missklassifikation der perihilären Gallengangskarzinome (Klatskin Tumore) zum intrahepatischen anstelle zum extrahepatischen Subtyp, eine exaktere Bildgebung und bessere histologische Nachweistechiken als Ursache der veränderten Inzidenz hin (22). Andere Forschungsgruppen konnten trotz Berücksichtigung dieser Faktoren in Langzeitstudien einen realen Zuwachs in der Inzidenz des intrahepatischen Subtyps verzeichnen (23, 24). Diese unterschiedliche Auftretswahrscheinlichkeit und zunehmende Inzidenz eines Subtyps des Cholangiokarzinoms lässt Gatto et al, 2010 sowohl unterschiedliche Ätiologien als auch Risikofaktoren für die intrahepatischen im Gegensatz zu den extrahepatischen Tumoren vermuten (25).

1.4 Risikofaktoren des Cholangiokarzinoms

Obwohl inzwischen verschiedene Risikofaktoren für die Entstehung von Cholangiokarzinomen identifiziert wurden, können diese nur bei einer Minderheit der betroffenen Patienten gefunden werden (26). So besitzen in westlichen Ländern vor allem Patienten mit primär sklerosierender Cholangitis (PSC) ein erhöhtes Risiko für die

Entstehung eines Gallengangskarzinoms (27). Die Prävalenz von cholangiozellulären Karzinomen bei Patienten mit PSC liegt bei 32-42%, sodass diese Patienten nach der Erstdiagnose einer PSC möglichst sorgfältig sowohl auf Cholangiokarzinome gescreent als auch regelmäßig einer Nachsorge unterzogen werden sollten (28). Im asiatischen Raum sind häufig Leberegel als lokaler Risikofaktor identifiziert worden (29). So nimmt man an, dass die Parasiten (*Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis* and *Schistosomiasis japonica*) sich im biliären System festsetzen und eine chronische Entzündungsreaktion auslösen, welche zu einer malignen Transformation führt (30).

Des Weiteren werden verschiedene toxische Verbindungen als Auslöser des Gallengangskarzinoms aufgeführt, von denen Thorotrast, ein ehemaliges Kontrastmittel, besonders hervorzuheben ist (31). Weiterhin sind das Caroli-Syndrom, hereditäre Choledochuszysten und Hepatholithiasis als Risikofaktoren bekannt (32). Ebenso erhöhen infektiöse Lebererkrankungen wie Hepatitis B und C das Risiko am Cholangiokarzinom zu erkranken, wie eine US-Studie zeigen konnte (33). Dabei stellte man fest, dass eine Infektion mit dem Hepatitis Virus C einen Risikofaktor für die Entstehung eines intrahepatischen cholangiozellulären Karzinoms darstellt, nicht aber für den extrahepatischen Subtyp (34). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Leberzirrhose mit intrahepatischen, nicht jedoch mit extrahepatischen Gallengangskarzinomen assoziiert ist. Beruhend auf den letztgenannten Unterschieden weist Tyson et al, 2012 auf möglicherweise unterschiedliche Risikofaktoren für die Genese der beiden Subtypen des Cholangiokarzinoms hin (35).

1.5 Klinik und Diagnostik des Cholangiokarzinoms

Die klinischen Symptome sind jeweils abhängig von der Tumorlokalisation. So sind extrahepatisch distal oder perihilär gelegene Cholangiokarzinome geprägt durch Zeichen einer biliären Obstruktion mit Ikterus, Hellfärbung des Stuhls und Pruritus. Intrahepatische Gallengangskarzinome dagegen werden erst spät durch Allgemeinsymptome wie Gewichtsverlust, Nachtschweiß, fehlenden Appetit und abdominelle Schmerzen auffällig (36) .

Die Diagnostik bedient sich vor allem verschiedener Modalitäten der bildgebenden Verfahren, welche durch laborchemische Parameter unterstützt werden. Zunächst wird meist die Ultraschalldiagnostik verwendet, um Zeichen der Cholestase abzuklären. Zur

weiteren Bestimmung der Lokalisation einer möglichen Läsion wird die Computertomographie (CT) angewandt. Neben der Darstellung des Tumors mit der Magnetresonanztomographie (MRT), erlaubt die Magnetresonanzcholangiopankreatikografie (MRCP) sowohl eine Entnahme von Probenmaterial mittels Feinnadelaspiration oder transpapillären Biopsie als auch einen therapeutischen Eingriff bei Cholestase (37).

Die Darstellung der Läsion durch bildgebende Verfahren wird durch den Einsatz von Tumormarkern ergänzt, welche vor allem CEA, CA-125 und CA 19-9 beinhalten. Hierbei wird CA 19-9 am häufigsten verwendet, obwohl dieser auch in Pankreastumoren, Magentumoren und bei primär biliärer Zirrhose erhöht sein kann (38). Nichtsdestotrotz zeigt CA 19-9 von den erwähnten Markern die höchste Sensitivität und Spezifität zur Detektion von cholangiozellulären Karzinomen (39).

1.6 Makro- und mikroskopische Einteilung des Cholangiokarzinoms

In der makroskopischen Einteilung der intrahepatischen Cholangiokarzinome, die im Wesentlichen das Wachstumsmuster des Tumors beschreibt, bestehen Differenzen zwischen der Liver Cancer Study Group of Japan (LCSGJ) und der American Joint Cancer Committee/Union internationale contre le cancer (AJCC/UICC) (11, 40). Beiden Systemen gemeinsam ist die Einteilung der Tumoren in einen „mass forming type“, der dazu neigt das Leberparenchym über das Portalvenensystem und zusätzlich Lymphknoten zu infiltrieren, und einen „periductal-infiltrating type“, der sich vor allem innerhalb der Gallengänge ausbreitet. Während die LCSGJ noch einen zusätzlichen „intraductal-growth type“ unterscheidet, der einem intraduktalen Thrombus ähnlich ins Gallengangslumen hineinwächst, bezeichnet die AJCC/UICC nur noch einen „mixed type“. Der „intraductal-growth type“ zeichnet sich durch die beste Prognose aus, der „periductal-infiltrating type“ ist dagegen mit der schlechtesten Prognose assoziiert (41).

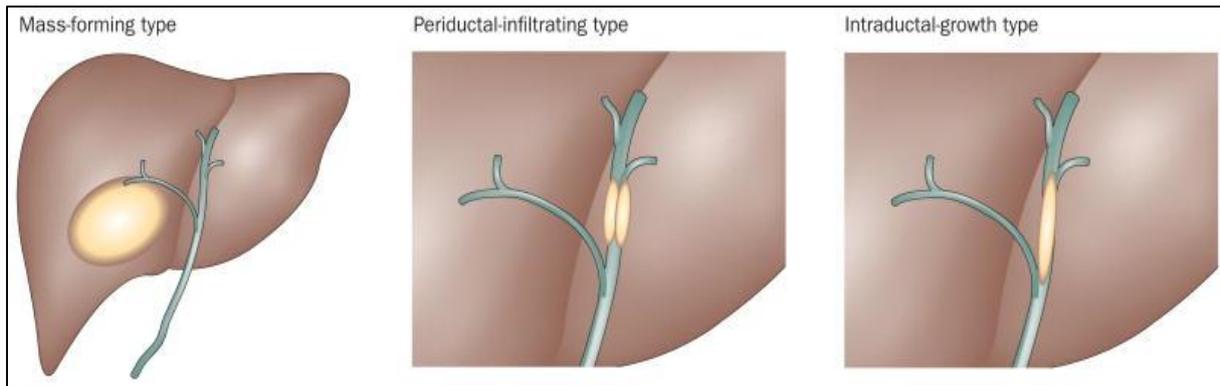


Abbildung 1-2

Makroskopische Einteilung der intrahepatischen Cholangiokarzinome nach der Liver Cancer Study Group of Japan (LCSGJ). Blehazc et al, 2011 (10)

Bei den extrahepatischen Cholangiokarzinomen unterscheidet man wiederum zwischen einem exophytischen und intraduktalen Wachstumsmuster (42), wobei beide Typen mit einer perineuralen Invasion und Lymphknotenbeteiligung einhergehen (10).

Zur histologischen Einteilung der Cholangiokarzinome besteht neben der WHO Klassifikation die aktuelle Edition des AJCC/UICC, welche als häufigste Form die Adenokarzinome, sowie selteneren Formen (adenosquamöse und squamöse Karzinome, muzinöse-, siegelringzellartige-, sarkomatöse-, lymphoepitheliomatöse- und Klarzellvarianten) beschreibt (43, 44).

Die gängigste Form des cholangiozellulären Karzinoms stellt das mäßig bis gut differenzierte Adenokarzinom dar, welches durch eine glanduläre oder tubuläre Struktur geprägt ist. Hierbei zeigen die kubischen oder säulenartigen anaplastisch veränderten Epithelzellen ein eosinophiles Zytoplasma mit runden zentralen Nukleoli. Die heterogenen Tumorzellen breiten sich häufig entlang der Gallengangswände und Nervenscheiden aus (45).

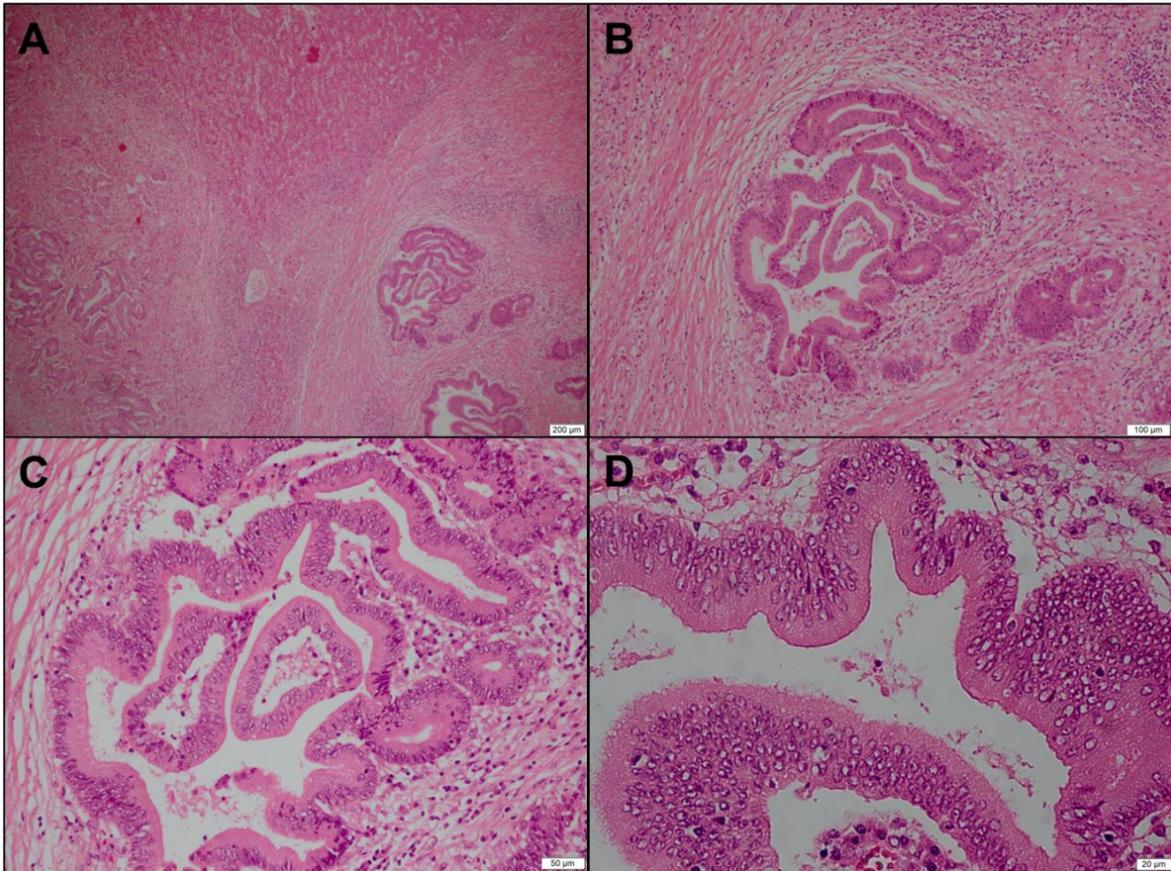


Abbildung 1-3

Darstellung eines perihilären Cholangiokarzinoms (A081) in der HE-Färbung. A: Drüsenförmig wachsendes Cholangiokarzinom mit angrenzendem Lebergewebe (2fache Vergrößerung). B: Deutliche Vermehrung von kollagenfaserreichem, zellarmem Bindegewebe sowie kräftige, lymphozytär betonte Begleitentzündung um die tubulär wachsende Neoplasie (5fache Vergrößerung). C: Mäßige Differenzierung des Adenokarzinoms (10fache Vergrößerung). D: Auskleidung durch ein hochprismatisches Epithel mit stiftchenförmigen, opaken Zellkernen und prominenten Nukleolen.

Weiterhin wird eine Graduierung des histologischen Bildes anhand der Differenzierung des Tumors vorgenommen, wobei man gut-, moderat und schlecht differenzierte Adenokarzinome unterscheidet. Obwohl diese Graduierung eine Korrelation zum postoperativen Verlauf zeigt, scheint die Tumorausbreitung (Staging) eine größere Rolle zu spielen (41).

Neben der Morphologie spielt der Einsatz von immunhistochemischen Verfahren eine zunehmende Rolle in der histologischen Diagnose des Cholangiokarzinoms. Dies liegt zum einen an der häufig geringen Tumormenge innerhalb der diagnostischen Probe, die keine zuverlässige morphologische Aussage erlaubt. Zusätzlich können hiermit Metastasen anderer Adenokarzinome mit überlappender Morphologie besser

differenziert werden. Hierzu beschreiben Länger et al, 2006 folgende Antikörper als immunphänotypisch für das Cholangiokarzinom: CK7 pos., CK17 pos., CD7 pos, CDX2 neg. (46).

1.7 Molekulare Pathogenese des Cholangiokarzinoms

Die Karzinogenese des Cholangiokarzinoms wird als ein mehrstufiger Prozess beschrieben, welcher von einer chronischen biliären Entzündungsreaktion mit Schädigung der Cholangiozyten ausgeht. Daraufhin werden Zytokine wie Interleukin-6 (IL-6) und Transforming Growth Factor- β (TGF- β) freigesetzt, die sowohl zu einem erhöhten Zellumsatz der Cholangiozyten, als auch zu einer Förderung der Karzinogenese durch Schäden der DNA Mismatch Reparatur Gene, Protoonkogene und Tumorsuppressorgene führen (47). Die von diesem Prozess betroffenen Mechanismen, die in intra- und extrahepatischen Cholangiokarzinomen bekannt sind, sollen im folgenden Abschnitt ausführlicher dargestellt werden. Hierbei handelt es sich um häufig bei Cholangiokarzinomen vorliegende somatische Mutationen, epigenetische Veränderungen und Copy Number Variations.

Inzwischen wurden durch die Untersuchung einzelner Gene (Single Gene Studies) und das Whole-Exome Sequencing verschiedene somatische Mutationen in Cholangiokarzinomen identifiziert. In diesem Zusammenhang scheinen einige Gengruppen aufgrund ihrer Häufigkeit eine herausragende Rolle zu spielen, sodass sie besonderer Aufmerksamkeit bedürfen. Zu diesen zählen Veränderungen in der ErbB2-Rezeptor Familie, die zwar selten Mutationen in Cholangiokarzinomen aufweist, aber durch eine erhöhte Genexpression und Genamplifikation geprägt ist (48). Es konnte gezeigt werden, dass ErbB2-Rezeptoren über eine Aktivierung der intrazellulären ras-raf-MEK-MAPK und PI3K-Akt Kaskaden die Zelldifferenzierung und die maligne Zelltransformation beeinflussen (49). Sowohl in Zellkulturexperimenten als auch in Mausmodellen führte eine Überexpression des *ERBB2* Gens zur Tumorentwicklung (50, 51). Zusätzlich konnten Andersen et al., 2012 eine schlechtere Prognose bei Patienten mit einer Aktivierung des ErbB2-Rezeptors nachweisen (52). Zu der ErbB2-Rezeptor Familie gehört auch das *EGFR* (*ERBB1*) Gen, welches ebenfalls die zuvor beschriebene Signalwegskaskade auslösen kann. Obwohl die Aktivierung der *EGFR* down-stream gelegenen Signalwege ein typisches Geschehen in Cholangiokarzinomen darstellt,

wurden nur selten aktivierende Mutationen im *EGFR* Gen oder den sich im Signalweg anschließenden Genfamilien wie *BRAF* (53) oder *PIK3CA* (54) gefunden.

Ein weiteres häufig von somatischen Mutationen betroffenes Gen in Gallengangskarzinomen stellt *KRAS* dar, welches ebenfalls über den ras-raf-MEK-MAPK Signalweg Wachstums- und Differenzierungsprozesse reguliert (55). Hierbei fanden sich die Mehrzahl der Mutationen in einem fortgeschrittenen Tumorstadium (56). Interessanterweise ließen sich entsprechende Veränderungen auch in der Gallenflüssigkeit von Patienten mit primär sklerosierender Cholangitis feststellen, die darauf hinweisen, dass *KRAS* Mutationen frühe Ereignisse in der Tumorigenese des Cholangiokarzinoms darstellen (57). Des Weiteren führte eine Albumin-Cre-vermittelte somatische Aktivierung von *KRAS* in einem Mausmodell zur Ausbildung eines Gallengangskarzinoms (58). Trotz dieses kausalen Zusammenhangs konnte die *KRAS* Mutation nicht als unabhängiger prognostischer Faktor für das Cholangiokarzinom etabliert werden (52).

Neben *KRAS* Mutationen konnten O`Dell et al, 2012 in ihrem Mausmodell Veränderungen im *TP53* Gen als Ursache für die Entstehung des cholangiozellulären Karzinoms identifizieren (58). Doch im Gegensatz zu *KRAS* treten Mutationen im *TP53* Gen als ein spätes Ereignis in der Tumorentwicklung des Cholangiokarzinoms auf (59). *TP53* stellt ein Tumorsuppressorgen dar, welches bei Akkumulation Mechanismen der DNA-Reparatur oder bei fortgeschrittenen DNA-Schäden die Apoptose (programmierten Zelltod) einleitet. Der Verlust von *TP53* führt somit über einen fehlenden Zellarrest zu einer unkontrollierten Zellproliferation (60). In Cholangiokarzinomen wurden über 90 verschiedene Mutationen für *TP53* beschrieben, die durch abnorme Proteinexpression in der Immunhistochemie oder durch Sequenzierungsstudien nachgewiesen wurden (61). Insbesondere fand sich eine starke Assoziation zwischen Thorotrast-induzierten Cholangiokarzinomen und *TP53* Mutationen (62). Tannapfel et al, 2000 konnten zudem Mutationen in *TP53* neben der Tumorausdehnung, dem Befall der Lymphknoten und der Tumorgraduierung als einen wichtigen prognostischen Faktor für das Patientenüberleben identifizieren (63)

Neben den schon beschriebenen charakteristischen Mutationen für das Cholangiokarzinom rückte seit kurzem das *IDH-1* und *IDH-2* Gen vermehrt in das Interesse der Forschung. Es konnte gezeigt werden, dass veränderte Idh Proteine über

eine abnorme enzymatische Aktivität α -Ketoglutarat (α KG) zu 2-Hydroxyglutarat (2HG) konvertieren. Dieses inhibiert daraufhin die Funktion verschiedener α -Ketoglutarat abhängiger Dioxygenasen, die zu Veränderungen der Zelldifferenzierung- und Reifung führen (64, 65). Borger et al, 2011 fanden zum ersten Mal Veränderungen im *IDH-1* und *IDH-2* Gen in Cholangiokarzinomen, wobei diese die häufigsten somatischen Mutationen innerhalb ihrer breit angelegten Tumor Genotypisierungsstudie darstellten (66). Darüber hinaus zeigten Wang et al, 2012, dass Mutationen im *IDH-1* und *IDH-2* Gen in Cholangiokarzinomen mit einem längeren Überleben der Patienten gegenüber der Vergleichsgruppe ohne entsprechende Aberration einhergingen (67). Zusätzlich fanden sie in Cholangiokarzinomen, welche Mutationen im *IDH-1* und *IDH-2* Gen aufwiesen, eine erhöhte DNA Hypermethylierung mit vergleichbarer Ausprägung wie bei *IDH*- mutierten Glioblastomen. Daraus folgern sie Veränderungen der Genexpression verschiedener Gengruppen in unterschiedlichen Tumoren als Folge einer Mutation im *IDH-1* und *IDH-2* Gen. Interessanterweise variierte die Häufigkeit der Mutation in Abhängigkeit von der Ethnizität, wobei diese bei 7,5% der chinesischen Patienten gegenüber 25% der kaukasischen Patienten einer amerikanischen Studie gezeigt werden konnte (66, 68, 69).

Neben den somatischen Mutationen wird auch der Einfluss epigenetischer Veränderungen auf die Genese des Cholangiokarzinoms beschrieben (70). Bei diesen Alterationen handelt es sich vor allem um Promotor Hypermethylierungen und Histon Deacetylierungen, die somit die Transkription einzelner Abschnitte der DNA regulieren können. Hierbei wurde festgestellt, dass das epigenetische Silencing durch Promotor Hypermethylierung oft in Tumorsuppressorgenen vorkommt, die unterschiedlich häufig betroffen sind (71-73). In einer aktuellen genomweiten Methylierungsanalyse von Cholangiokarzinomen zeigten Goeppert et al, 2014 eine veränderte epigenetische Regulierung von Genen, die am Wnt- Signalweg beteiligt sind (74). Am Beispiel der Inaktivierung des Cytokin Signaling 3 (*SOCS3*) durch Promotor Hypermethylierung wird der Zusammenhang zwischen epigenetischen Einflüssen und durch proinflammatorische Zytokine induzierten Signalwegen deutlich. Die Suppression von *SOCS3* durch eine Promotor Hypermethylierung aktiviert den IL-6/STAT3 Signalweg, der wiederum in einer Resistenz der Tumorzellen gegenüber Apoptose mündet (75).

Weiterhin sind an der epigenetischen Regulation in Cholangioakarzinomen micro-RNAs beteiligt, welche ähnlich wie Transkriptionsfaktoren die Genexpression modulieren können. Hierbei konnte ein unterschiedliches Expressionsmuster der micro-RNA in

maligne entarteten Cholangiozyten im Vergleich zu gesundem Gallengangsepithel gezeigt werden (76).

Eine weitere Säule molekulargenetischer Veränderungen stellen die in der Einleitung beschriebenen Copy Number Variations (CNVs) dar. Zur Detektion von CNVs in Cholangiokarzinomen wurden in der letzten Dekade schon einige Comparative Genomics Hybridization (CGH) Untersuchungen durchgeführt (77-80). Zum größten Teil wurden hierbei intrahepatische Gallengangskarzinome analysiert, aber auch vergleichende Studien zwischen dem intra- und extrahepatischen Subtyp als auch von Gallenblasentumoren unternommen. In einer Metaanalyse von 5 Studien konnten Andersen et al, 2012 zwar häufige übereinstimmende Alterationen hinsichtlich der CNVs aufzeigen, aber auch wesentliche Unterschiede in der Komplexität der Karyotypen aufgrund genetischer Imbalancen feststellen (77-80). Des Weiteren sind die Studien auf wenige untersuchte Fälle limitiert und beinhalten Patienten unterschiedlicher Ethnizität (81). In allen durchgeführten Studien wurde das Comparative Genomics Hybridization (CGH) zur Identifizierung der CNVs verwendet, welche eine genomweite, spezifische Analyse einzelner Gene erlaubt (82). Sensitive und quantitative Aussagen hinsichtlich der Amplifikation bestimmter Gene, dem Nachweis von LOHs und einem genomweiten Screening von SNPs sind allerdings auch mit diesen Technologien nur begrenzt möglich. Eine aktuelle Studie führte erstmals eine integrative molekulare Untersuchung an intrahepatischen Cholangiokarzinomen durch, in der sowohl mittels eines modernen high-density SNP Arrays die Copy Number Aberrations untersucht, als auch mit einem Genexpressionsprofil eine neue molekulare Subklassifizierung des Tumors vorgenommen wurde (83).

Trotz der gemeinsamen, zuvor beschriebenen Mechanismen der Cholangiokarzinogenese wurden auch molekulargenetische Unterschiede zwischen den intra- und extrahepatischen Gallengangskarzinomen identifiziert. Zunächst stützen sich die Überlegungen zur unterschiedlichen Genese der beiden Subtypen auf epidemiologische Daten, die eine häufigere Inzidenz der extrahepatischen Cholangiokarzinome zeigten (14). Abhängig von der Tumorlokalisation scheinen auch unterschiedliche Risikofaktoren die Entstehung eines Cholangiokarzinoms zu beeinflussen (35). Obwohl man davon ausgeht, dass Cholangiokarzinome aus einer malignen Transformation des Gallengangsepithels entstehen, wiesen neue Studien auch auf eine Entwicklung von cholangiozellulären Karzinomen aus Stammzellen in

peribiliären Drüsen und/oder in den Hering Kanälen/Gallengängen hin (84). Des Weiteren postuliert Cardinale et al, 2012 aufgrund von unterschiedlichen Reifeprozessen zweier Stammzellreihen in der Leberentwicklung die Hypothese von verschiedenen Ursprungszellen in intrahepatischen und extrahepatischen Cholangiokarzinomen (85). Jedoch bedarf es für eine mögliche Klassifizierung der Cholangiokarzinome, welche auf den Ursprungszellen der Subtypen basiert, die Identifizierung definitiver Zellmarker. Dennoch bietet diese Hypothese einen Erklärungsansatz für die Heterogenität in der Morphologie der Cholangiokarzinome, sowie die damit einhergehenden molekulargenetischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Subtypen des Tumors.

So fanden sich zunächst Unterschiede in der Häufigkeit einzelner somatischer Mutationen. Während in extrahepatischen Cholangiokarzinomen Mutationen des *KRAS* Gens in über 50% der Fälle vorkommen, werden diese beim intrahepatischen Subtyp in weniger als 20% beobachtet (52). Im Gegensatz dazu scheinen *IDH*-Mutationen ein Charakteristikum der intrahepatischen Gallengangskarzinome zu sein, die in den extrahepatischen Tumoren kaum vorkommen (66).

Weitere Arbeitsgruppen untersuchten mögliche Unterschiede zwischen den Subtypen der Cholangiokarzinome, in dem sie die Expression Zellzyklus- regulierender Proteine zwischen den Entitäten verglichen. Hierbei fanden Jarnagin et al, 2006 eine häufigere Expression des Cyclin-dependent kinase inhibitors P27 in intrahepatischen und hilären gegenüber den distalen Cholangiokarzinomen (86). Eine Untersuchung von Karamitopoulou et al, 2008 bestätigte die Ergebnisse durch eindeutig unterschiedliche Expressionsprofile intra- gegenüber extrahepatischen Cholangiokarzinomen (87). Die eingangs genannte Annahme von unterschiedlichen Ursprungszellen der beiden Subtypen des Cholangiokarzinoms wird von Komuta et al, 2012 geteilt. Sie fanden gemeinsame Genexpressionsmuster einer Subgruppe intrahepatischer und hilär gelegener Cholangiokarzinome, die sie als Mucin-produzierende Gallengangskarzinome klassifizieren. Demgegenüber stellen sie eine Subgruppe intrahepatischer Mucin-negativer Cholangiokarzinome mit histologischer Diversität, die sie zum Spektrum kombinierter hepatozellulärer Karzinome zählen (88). Durch eine breite Metaanalyse der Expressionsprofile bestätigen Wiggers et al, 2014 die Ergebnisse vorhergehender Studien. Des Weiteren betonen sie die Notwendigkeit einer differenzierten Betrachtung der unterschiedlichen Tumorigenese für intra- und extrahepatische Cholangiokarzinome in Anbetracht zukünftiger Gen-gezielter Therapien (89).

Im Gegensatz zur zuvor erwähnten Studie von Goeppert et al, 2014 zeigten Yang et al, 2005 unterschiedliche Methylierungsprofile von intra- gegenüber den extrahepatischen Cholangiokarzinomen. Hinsichtlich der Copy Number Variations wurden bislang in einer vergleichenden Studie von McKay et al, 2011 keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Subtypen gefunden (90).

1.8 Therapie des Cholangiokarzinoms

Trotz intensiver Forschung zur Etablierung neuer Behandlungsansätze besteht eine schlechte Prognose für das Cholangiokarzinom. Derzeit stellt die chirurgische Tumorresektion den einzigen kurativen Ansatz dar, welcher aber nur bei lokal beschränkten Stadien, fehlender Metastasierung und der Möglichkeit eines tumorfreien Resektionsrandes zur Anwendung kommt (91). Für erfolgreich resezierte Patienten konnte eine 5- Jahresüberlebensrate von 25-30% erreicht werden, während für Patienten mit einem nicht resezierbaren Tumor die Lebenserwartung nur 6 bis 12 Monate beträgt (92). Neuerdings wird eine präoperative Portalvenenembolisation (PVE) vor Leberteileresektion eingesetzt, indem ein Portalvenenast des zu resezierenden Leberlappens okkludiert wird (93). Damit wird das Volumen der verbleibenden Leber um 12-20% erhöht, wodurch die Rate an postoperativen Leberfunktionsstörungen gesenkt werden kann (94).

Neue vielversprechende Ergebnisse für Patienten mit nicht resezierbaren Tumoren wurden zuletzt mit einer Lebertransplantation geliefert. Durch eine strenge Patientenauswahl basierend auf ihre Ansprache auf eine prä-Transplantat durchgeführten Chemotherapie wurden 5-Jahres Überlebensraten von bis zu 76% erreicht (95, 96).

Eine weitere Therapieoption für nicht operationsfähige Patienten stellt die Photodynamische Therapie (PDT) dar. Mittels intravenöser Injektion erhalten die Patienten eine photosensitive Substanz, die vor allem an die Tumorzellen bindet, um diese für eine anschließende Bestrahlung gegenüber dem umliegenden Gewebe zu sensibilisieren (97).

Für die pharmakologische Therapie des Cholangiokarzinoms gab es aufgrund ungenügender Datenlage bis 2010 keine standardisierte Chemotherapie. Unter einer vielfach verwendeten Monotherapie mit Gemcitabin zeigten sich nur unzufriedenstellende Ergebnisse (98). Mit den NCRI ABC-01 und ABC-02 Studien aus England wurde jedoch eine möglicherweise richtungweisende Therapie bestehend aus Gemcitabin und Cisplatin für nicht-resezierbare Tumoren des Gallengangssystems etabliert (99, 100). Die Ergebnisse dieser Studien konnten auch durch eine vergleichbare Untersuchung in Japan bestätigt werden (101).

Neue Therapieansätze stellen auch monoklonale Antikörper dar, welche gezielt in molekulare Prozesse eingreifen (102). Deren aktuelle Ansatzpunkte und neuere Untersuchungsergebnisse werden im Diskussionsteil weiter beleuchtet.

2 Zielsetzung

Cholangiokarzinome sind hochmaligne epitheliale Tumoren mit sehr schlechter Prognose. Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung bislang unbekannter genetischer Faktoren, die an der Entstehung von Gallengangskarzinomen beteiligt sein können.

1. Mit Hilfe der Molecular Inversion Probe (MIP)-Technologie (OncoScan™; Affymetrix) soll an einem Tumorkollektiv von humanen Cholangiokarzinomen eine genomweite Untersuchung von Copy Number Variations (CNVs) durchgeführt werden, um chromosomale Veränderungen in Gallengangskarzinomen wie DNA-Gewinne (Amplifikationen) und DNA-Verluste (Deletionen) zu identifizieren.

2. Daraufhin sollen innerhalb der betroffenen chromosomalen Veränderungen (Amplifikationen/Deletionen) durch eine statistische Auswertung mögliche Kandidaten- und Zielgene, die an der Cholangiokarzinogenese beteiligt sein könnten, bestimmt werden.

3. Im Anschluss sollen die mittels der Molecular Inversion Probe (MIP)-Technologie identifizierten Copy Number Variations, und von diesen Veränderungen betroffene Gene, anhand weiterer molekularbiologischer (FISH, RT-PCR) und immunhistochemischer Methoden verifiziert werden.

4. Des Weiteren sollen Gemeinsamkeiten oder Unterschiede bezüglich der Copy Number Variations zwischen intra- und extrahepatischen Cholangiokarzinomen untersucht werden.

5. Zuletzt gilt es Unterschiede zwischen den beiden Subtypen des Cholangiokarzinoms auch auf verschiedene Mutationsprofile im *IDH-1* und *IDH-2* Gen zu bestätigen.

3 Material und Methoden

3.1 Patienten und Tumorproben

Für die einzelnen Untersuchungen lagen verschiedene Kollektive an Tumorproben vor, die im Einzelnen dargelegt werden.

1. Zur Analyse mittels Molecular Inversion Probe (MIP), Immunhistochemie und Fluoreszenz-in-Situ Hybridisierung (FISH) wurden 24 Formalin-fixierte, in Paraffin (FFPE) eingebettete Tumorproben aus den Archiven des Instituts für Pathologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin verwendet. Hiervon wurden alle vorliegenden Proben für die MIP und immunhistochemische Untersuchung und 20 ausgewählte Proben für die FISH Analyse bestimmt (**Tabelle 3-1**).

DNA Nr.	Geschlecht	Alter bei Diagnose	Histologische Diagnose	TNM Stadium	MIP	Immun-histochemie	FISH
A01II	männlich	62	gering differenziertes EH-CCA	pT2b, pN1	✓	✓	✓
A02 II	weiblich	63	gering differenziertes EH-CCA	pT2a, pN0	✓	✓	✓
A03 II	männlich	66	mäßig differenziertes EH-CCA	pT3, pN1	✓	✓	✓
A05 II	männlich	52	gut differenziertes EH-CCA	pT2a, pN0	✓	✓	-
A06 II	männlich	34	gering differenziertes EH-CCA	pT2b, pN1	✓	✓	✓
A07 II	weiblich	81	gering differenziertes EH-CCA	pT2b, pN1	✓	✓	✓
A08 II	weiblich	69	mäßig differenziertes EH-CCA	pT3, pN1	✓	✓	✓
A05 I	weiblich	73	gering differenziertes EH-CCA	pT3, pN0	✓	✓	✓
A06 I	weiblich	66	mäßig differenziertes EH-CCA	pT3, pN1	✓	✓	-
A08 I	männlich	70	mäßig differenziertes EH-CCA	pT3, pN1	✓	✓	✓
A09 I	weiblich	46	mäßig differenziertes EH-CCA	pT3, pN1	✓	✓	-
B01 II	männlich	77	gering differenziertes IH-CCA	pT1, pN0	✓	✓	✓
B02 II	weiblich	71	gering differenziertes IH-CCA	pT1, pN0	✓	✓	✓
B03 II	weiblich	73	gering differenziertes IH-CCA	pT1, pN0	✓	✓	✓
B04 II	weiblich	71	gering differenziertes IH-CCA	pT2a, pN0	✓	✓	✓
B05 II	weiblich	63	mäßig differenziertes IH-CCA	pT3, pN1	✓	✓	✓
B06 II	männlich	45	gering differenziertes IH-CCA	pT3, pN1	✓	✓	✓
B07 II	männlich	46	mäßig differenziertes IH-CCA	pT3, pN0	✓	✓	✓
B08 II	weiblich	67	gering differenziertes IH-CCA	pT3, pN1	✓	✓	✓
A10 I	männlich	76	mäßig differenziertes IH-CCA	pT3, pN0	✓	✓	✓
A11 I	weiblich	70	gering differenziertes IH-CCA	pT3, pN1	✓	✓	-
B01 I	männlich	80	gering differenziertes IH-CCA	pT2, pN0	✓	✓	✓
B02 I	männlich	51	mäßig differenziertes IH-CCA	pT4, pN1	✓	✓	✓
B03 I	weiblich	76	mäßig differenziertes IH-CCA	pT1, pN1	✓	✓	✓

Tabelle 3-1

FFPE Tumorkollektiv.

2. Für die Untersuchung mittels RT-PCR wurden 30 kryoasservierte Tumorproben, welche nach operativer Entfernung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt wurden, aus den Archiven der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie, Charité - Universitätsmedizin Berlin verwendet (**Tabelle 3-2**). Dieses Kollektiv umfasst ausschließlich intrahepatische Cholangiokarzinome.

RNA Nr.	Geschlecht	Histologische Diagnose	Alter bei Diagnose	TNM Stadium
4	männlich	mäßig differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	64	pT4, pN0
8	weiblich	mäßig differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	37	pT2, pN0
10	weiblich	mäßig differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	43	pT3, pN0
18	weiblich	gering differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	74	pT4, pN1
20	weiblich	gering differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	60	pT3, pN1
22	weiblich	mäßig differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	78	pT2, pN1
28	weiblich	niedrig differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	68	pT2, pN1
30	männlich	mäßig differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	68	pT1, pN1
31	weiblich	mäßig differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	72	pT4, pN0
32	männlich	mäßig differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	66	pT4, pN0
38	weiblich	mäßig differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	67	pT1, pN0
39	männlich	mäßig differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	51	pT4, pN1
42	weiblich	gering differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	74	pT3, pN1
45	weiblich	gering differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	44	pT4, pN1
48	weiblich	mäßig differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	54	pT3, pN1
53	weiblich	mäßig differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	76	pT1, pN1
54	weiblich	mäßig differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	67	pT3, pN1
55	weiblich	mäßig differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	73	pT3, pN1
57	männlich	mäßig differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	39	pT1, pN1
58	männlich	mäßig differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	70	pT1, pN0
59	männlich	mäßig differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	41	pT1, pN0
60	weiblich	mäßig differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	71	pT3, pN0
61	männlich	mäßig differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	76	pT3, pN0
64	männlich	mäßig differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	46	pT3, pN0
65	männlich	mäßig differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	46	pT4, pN0
69	weiblich	gering differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	55	pT2, pN1
73	männlich	gering differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	80	pT1, pN0
74	weiblich	gering differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	48	pT3, pN1
75	weiblich	mäßig differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	63	pT3, pN1
76	weiblich	mäßig differenziertes cholangiozelluläres Karzinom	58	pT1, pN1

Tabelle 3-2

Kryoasserviertes Tumorkollektiv.

Zur histopathologischen Begutachtung der cholangiozellulären Karzinome wurden am Mikrotom 3µm Schnitte von den Formalin-fixierten Paraffinproben und am Kryostaten 5µm Dünnschnitte der kryoasservierten Tumorproben erstellt, mit Eosin und Hämatoxin gefärbt und histologisch charakterisiert. Somit konnten bei den Tumorfragmenten Kontaminationen mit nekrotischem oder normalem Gewebe identifiziert werden.

Zur Durchführung der molekulargenetischen Analyse wurde vor dem operativen Eingriff eine Einverständniserklärung aller Patienten eingeholt.

3.2 Isolierung genomischer DNA aus Tumorgewebe

Zunächst wurden die Tumorproben mit Xylen deparaffinisiert und anschließend mit 100% Ethanol behandelt. Die darauffolgende Extraktion der DNA wurde mit dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.3 Konzentrationsbestimmungen genomischer DNA

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels PicoGreen (Invitrogen, Carlsbad, CA). Das PicoGreen® dsDNA Quantitation Reagent ist ein hochsensitiver Fluoreszenzfarbstoff, der zur Quantifizierung von doppelsträngiger DNA verwendet wird. Hierzu wird das PicoGreen® dsDNA Quantitation Reagent zunächst 1:200 in 1xTE pH 7,5 verdünnt und daraufhin unter Lichtabschluss auf Eis aufbewahrt. Anschließend wird ebenfalls der PicoGreen® Lambda-DNA-Standard (100µg/ml) in 1xTE pH 7,5 auf folgende Konzentrationen verdünnt: 0,001ng/µl, 0,003 ng/µl, 0,007ng/µl, 0,010ng/µl, 0,020ng/µl, 0,050ng/µl und 0,075ng/µl. Die DNA-Proben werden laut den photometrisch vermessenen Konzentrationen auf 400ng/ml mit 1xTE pH 7,5 verdünnt. Die Messung erfolgt in Mikrotiterplatten, wobei jeweils 100µl PicoGreen® dsDNA Quantitation Reagent zu 100µl Probe hinzugefügt wird. Bei den Standards werden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Vor der Messung wird die Mikrotiterplatte mit einem Optical Adhesive Cover (Life Technologies, Darmstadt, Germany) abgedeckt. Der Plate Read erfolgt bei 5, 10 und 25ms. Die Fluoreszenz wird für die Exzitation bei 480nm, die Emission bei 520nm gemessen. Anschließend werden über die ΔR_n -Werte anhand der Standardkurven unter Berücksichtigung der Verdünnungen die Konzentrationen der einzelnen DNA-Proben berechnet.

3.4 Molecular Inversion Probe (MIP) Technologie

Zur genomweiten Untersuchung von Copy Number Variations (CNVs), die zur Identifizierung von chromosomalen Gewinnen (Amplifikationen) und Verlusten (Deletionen) sowie Loss of Heterozygosity (LOH) dient, wurde die Molecular Inversion Probe (MIP) Methode eingesetzt.

Ein Vorteil dieser Technologie gegenüber anderen Oligonukleotid-Arrays besteht in der Möglichkeit Multiplex Analysen von mehr als 20.000 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in einer einzigen Probe durchzuführen. Diese sind durch eine hohe Spezifität, die aufgrund der Kombination aus dem unimolekularen Proben-Design und den selektionierenden enzymatischen Prozessen resultiert, gekennzeichnet (103). Darüber hinaus werden zur Detektion eines SNPs lediglich 40 Basenpaar lange Fragmente benötigt, aufgrund dessen Analysen an äußerst fragmentierten DNA-Proben möglich sind. Dies erlaubt die Verwendung von Tumor-DNA aus Paraffin-eingebetteten Gewebeproben (104).

Die Methode des Molecular Inversion Probe erlaubt die Identifizierung und Anreicherung von spezifischen Genabschnitten. Die hierzu verwendeten Proben bestehen aus einem einzelsträngigen DNA Molekül, welches an seinen Enden zwei homologe Sequenzen von jeweils 20bp beinhaltet. Zwischen diesen beiden Sequenzen liegen 2 universelle PCR Primer Stellen, eine Erkennungsmarkierung (engl.: tag) zur späteren Detektion der Probe und 2 Molekül Spaltstellen (engl.: cleavage sites). Bei der Hybridisierung der MIP an einen komplementären genomischen DNA Abschnitt entsteht durch die Anlagerung der homologen Sequenzen an die Zielsequenz eine Schleifenbildung der Probe (**Abbildung 3-1**).

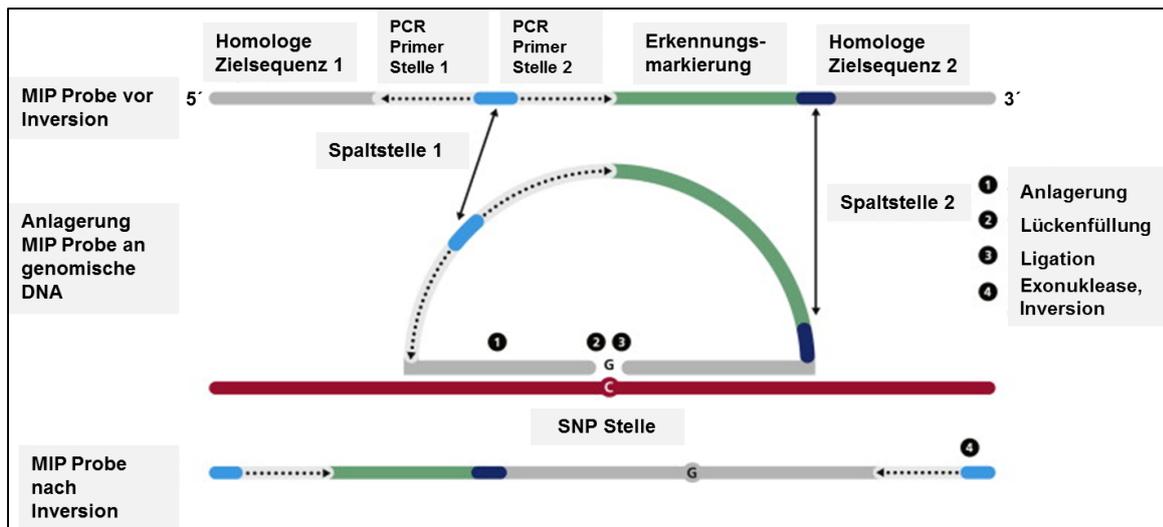


Abbildung 3-1

Schematische Darstellung der einzelnen Komponenten einer Molecular Inversion Probe (MIP). Oben: MIP Probe vor der Inversion bestehend aus 2 homologen Zielsequenzen an beiden Enden, 2 PCR Primer Stellen, einer dazwischenliegenden Spaltstelle (engl. cleavage site) und einer Erkennungsmarkierung (engl. Tag). Mitte: MIP Probe bei Anlagerung an genomische DNA mit Schleifenbildung (Zirkulierung) durch homologe Sequenzen an der SNP Position. Unten: MIP Probe nach Inversion mit erneuter Linearisierung der Probe. Modifiziert nach Wang et al, 2012 (103)

Zunächst wird die genomische DNA denaturiert, um eine Anlagerung der MIPs an die nun einzelsträngig vorliegenden DNA Zielsequenzen zu ermöglichen. Nach Bindung an die genomische DNA durchläuft die MIP die zuvor beschriebene Schleifenbildung. Innerhalb dieses Prozesses entsteht eine Lücke gegenüber der Zielsequenz, welche von den beiden Probenenden eingerahmt wird. Daraufhin wird der Reaktionsansatz auf 4 Proben verteilt, in denen jeweils einer der vier Nukleotide zugegeben wird. Im darauffolgenden Schritt wird die Lücke mittels DNA Polymerase gefüllt und die beiden Probenenden durch eine Ligase verbunden, sodass eine Ringbildung erfolgt. Nicht reagierende Proben, welche keine Zirkulierung und Lückenfüllung durchlaufen, werden währenddessen durch eine Exonuklease entfernt. Daraufhin wird die Probe durch einen Schnitt der an der Spaltstelle 1 wieder linearisiert, sodass eine Vervielfältigung der Probe mittels PCR ablaufen kann. Nun werden die 4 Reaktionsansätze wieder zusammengeführt und die erfassten Zielsequenzen können nun über einen Array, welcher die komplementäre Sequenz der Erkennungsmarkierung trägt, identifiziert werden. Dazu werden die fluoreszenzmarkierten Erkennungsmarkierungen durch Restriktionsenzyme an der Spaltstelle 2 herausgeschnitten und daraufhin auf einen MIP Array hybridisiert (**Abbildung 3-2, Abbildung 3-3**).

Durch die moderne Multiplex Technologie können mehr als 20.000 MIPs in einem Ansatz gleichzeitig den Prozess durchlaufen und somit analysiert werden.

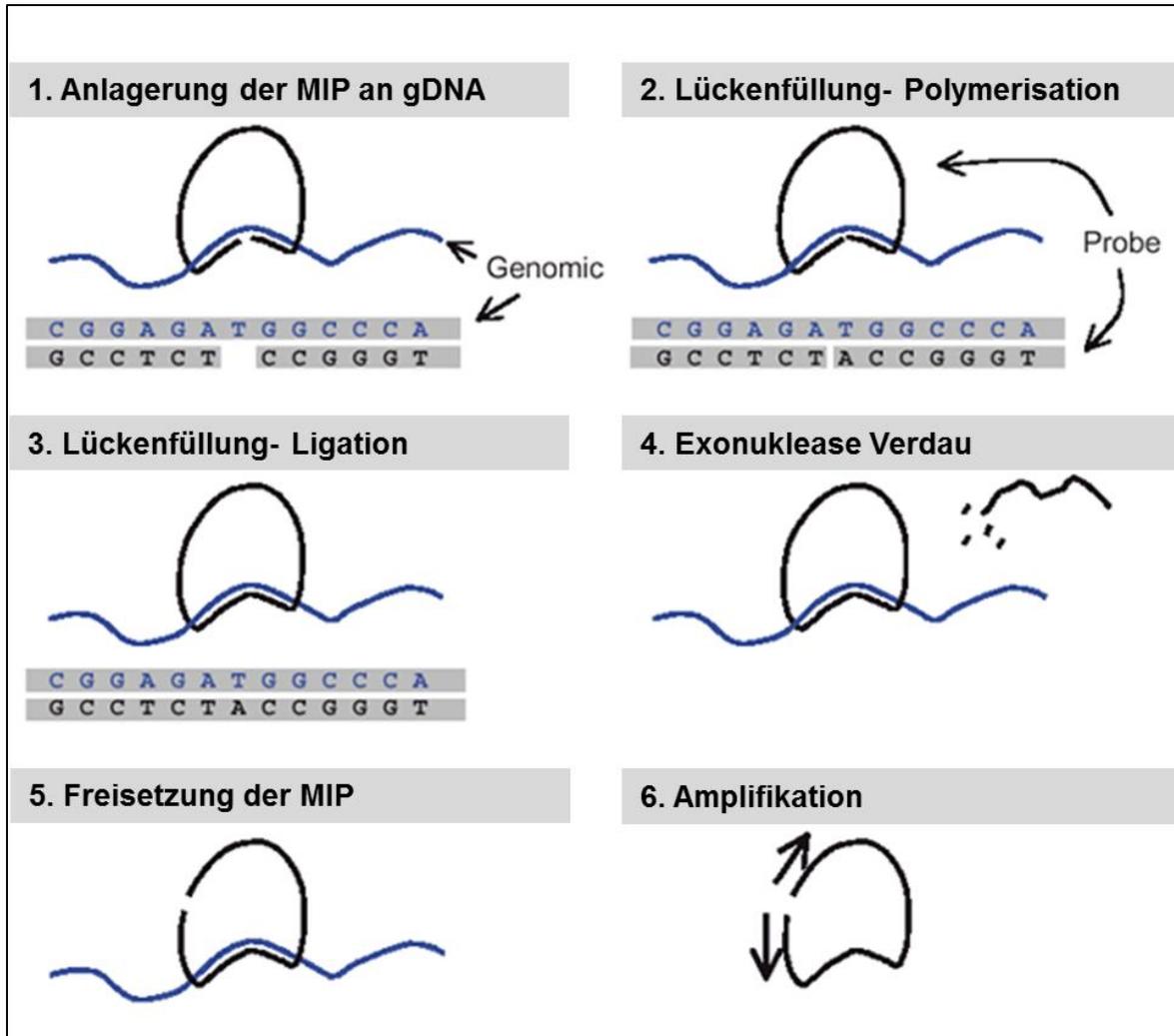


Abbildung 3-2

Reaktionsablauf des MIP Ansatzes: (1) Bindung der MIP an die genomische DNA (2) Lückenfüllung durch Polymerisation (3) Ligation der homologen Enden des MIPs (4) Exonuklease entfernt nicht reagierte Proben (5) Freisetzung der Probe (6) Vervielfältigung der MIP mittels PCR. Modifiziert nach Hardenbol et al, 2003 (105)

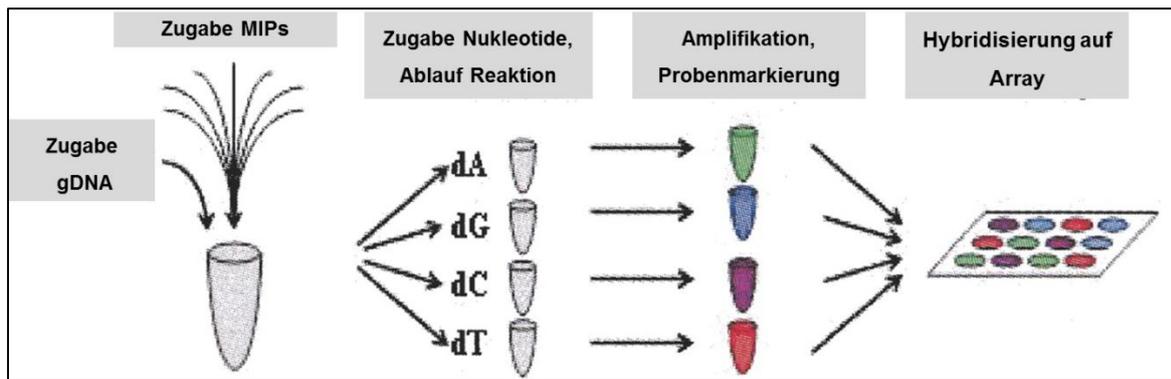


Abbildung 3-3

Zusammenfassung des MIP Arbeitslaufs. Modifiziert nach Hardenbol et al, 2003 (105)

Material und Lösungen:

Zur Durchführung der MIP-Untersuchung wurde 75ng der zuvor extrahierten genomischen Tumor DNA in eine wässrige Lösung überführt.

Durchführung:

Hybridisierung auf den OncoScan™ FFPE Express 2.0 Array. Die Durchführung der Molecular Inversion Probe Methode erfolgte durch die Firma Affymetrix (Santa Clara, USA)

3.5 Analyse der Copy Number Daten mittels Nexus Copy Number Software

Jede Probe des MIP Arrays definiert eine Lokalisation entlang des Genoms, welche durch die Fluoreszenz-Intensität der MIPs bestimmt werden. Die Transformation der Signalintensität in Copy Number Veränderungen wird als Segmentation bezeichnet. Der SNP-FASST2 Algorithmus, welcher von der Nexus Software benutzt wird, setzt hierbei die Intensität des Arrays im Experiment zu einer internen Kontrolle ins Verhältnis und transformiert dieses durch Anwendung des Logarithmus zur Basis 2 (\log_2). Hierbei werden nur nicht- Tumorproben als Kontrollen geclustert, die dann als Referenzsignal dienen, mit dem jede Tumorprobe in einem schrittweisen Prozess abgeglichen wird. Dementsprechend resultiert eine Deletion an einer gegebenen Lokalisation eines SNPs

in einer geringeren Signalintensität gegenüber der Referenz, während eine Amplifikation zu einem erhöhten Signal führt (**Abbildung 3-4**).

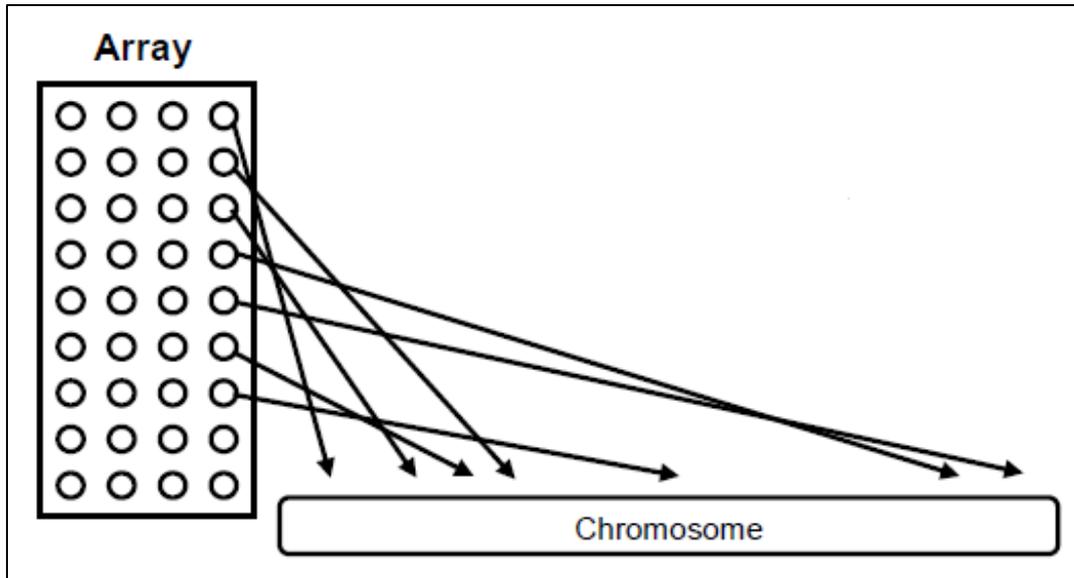


Abbildung 3-4

Schematische Darstellung der Zuordnung Signalintensität einer MIP zu einer Lokalisation entlang des Chromosoms. Nexus Copy Number Manual (NEXUS COPY NUMBER™, Biodiscovery, Hawthorne, USA)

Für jede Probe werden diese log₂ Werte auf der x-Achse als Proben Lokalisation und auf der y-Achse als Wert des Logarithmus Verhältnisses dargestellt (**Abbildung 3-5**).

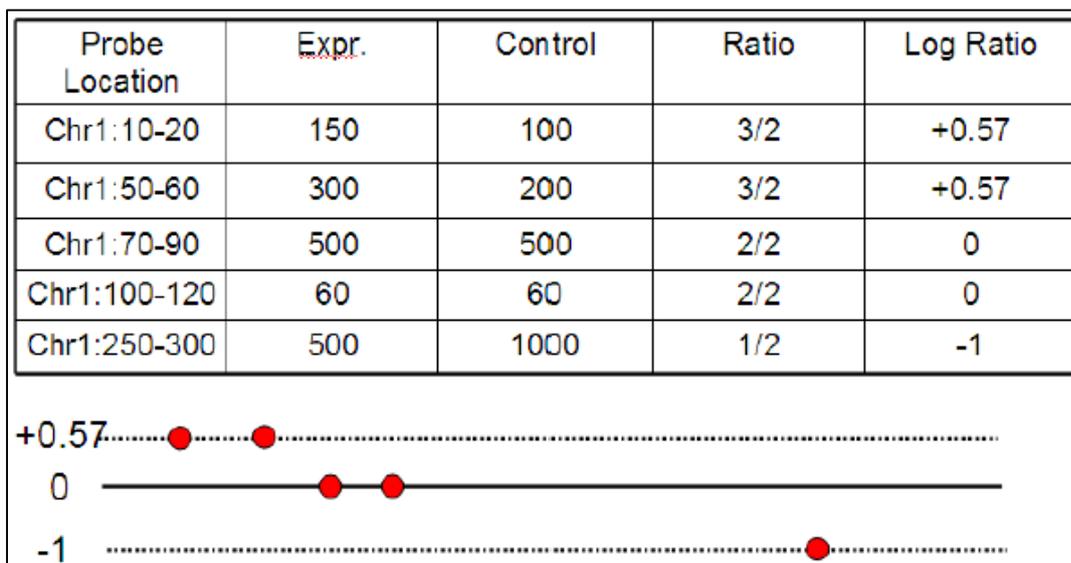


Abbildung 3-5

Beispiel der Ergebnisse eines Experiments und dessen Darstellung als Graph entlang des Genoms. Nexus Copy Number Manual (NEXUS COPY NUMBER™, Biodiscovery, Hawthorne, USA)

Zur Identifikation von heterozygoten SNPs innerhalb von Regionen der Copy Number Variations als auch zur Definition der absoluten Copy Number Höhe bedarf es des Allel Verhältnisses oder der sogenannten B Allel Frequency (Nexus Copy Number Bezeichnung). Denn diese geben Auskunft über das Vorliegen einer allelischen Imbalanz oder eines Loss of Heterozygosity (LOH).

Diese Definitionen lassen sich am folgenden Diagramm (**Abbildung 3-6**) erklären. Hierbei findet sich oben die Abbildung der elterlichen Allele, wobei sich die 0% und 100% Angaben auf die Frequenz des B Allels bezieht. Bei einer Weitergabe eines Allels von jeweils einem Elternteil entsteht ein normaler Genotyp mit drei Banden im Diagramm (grün eingekreist). Denn einer Allelkonstellation AA liegt die B Allelfrequenz bei 0%, im Fall von AB bei 50%. Falls nur ein Allel von einem Elternteil weitergegeben wird, (in diesem Fall vom Vater, weil eine Deletion auf dem mütterlichen Chromosom vorliegt) entsteht ein LOH. Hierbei sieht man im Diagramm nur 2 Banden, eine bei 0% und eine weitere bei 100%.

Die blau eingekreisten Areale kennzeichnen einen Zustand der allelischen Imbalanz, in der zu den beiden elterlichen Allelen ein weiteres hinzukommt (in dem gezeigten Beispiel handelt es sich um eine Amplifikation eines väterlichen Allelsegments). Solche Veränderungen zeigen dann 4 Banden im Diagramm.

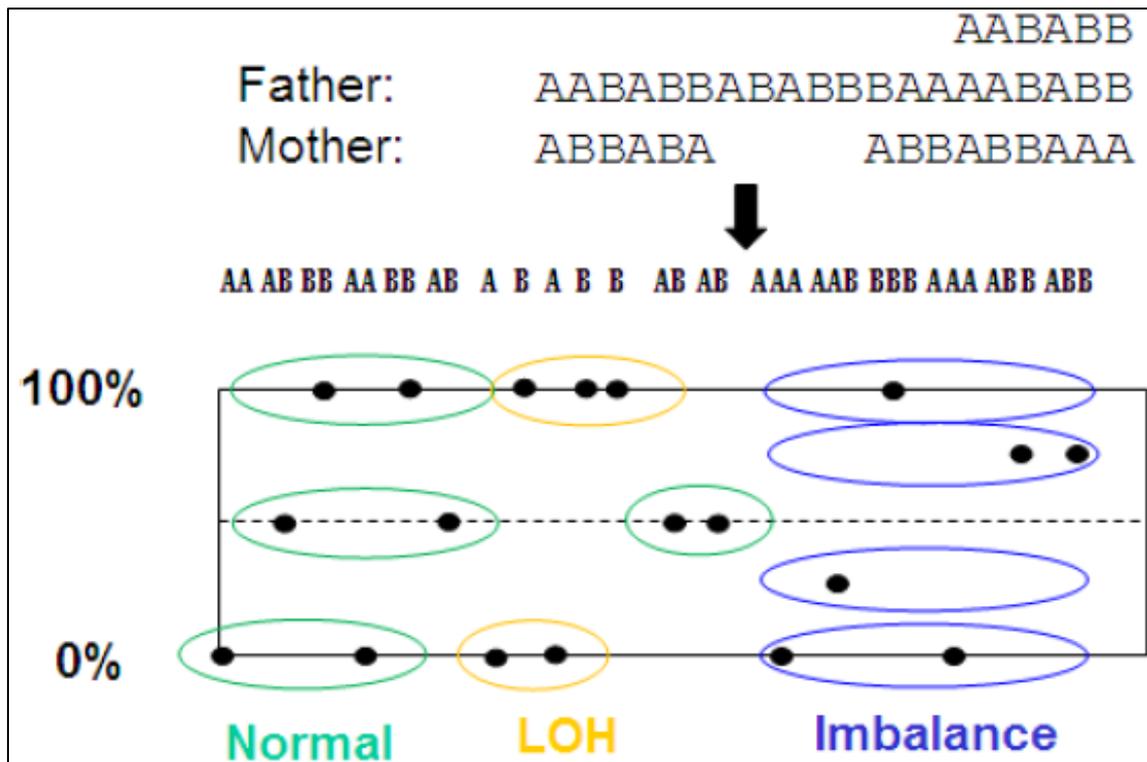


Abbildung 3-6

Schematische Darstellung der B Allel Frequenz. Nexus Copy Number Manual (NEXUS COPY NUMBER™, Biodiscovery, Hawthorne, USA)

Diese Angaben zum Copy Number Status als auch dem Allelverhältnis erlauben es der Software Intensitätssignale abzurufen. Die folgende **Tabelle 3-3** erläutert wie die Signale zu deuten sind.

So erwartet man im Falle eines einfachen oder vielfachen Copy Number Gewinns eine allelische Imbalanz im Allel Frequenz Diagramm zu sehen. Selten kann der Zugewinn so stark sein, dass er die Präsenz des anderen Allels annähernd verdrängt, sodass sich das Bild eines LOHs bietet.

Der Verlust einer Kopie eines Allels wird sich als ein LOH offenbaren während sich ein homozygoter Verlust als ein totaler allelischer Verlust zeigen würde.

Die Kombination aus einem unveränderten Copy Number Status und einem LOH im Allel Frequenz Diagramm deutet auf einen Copy Neutral LOH hin. Dieser auch uniparentale Disomie (UPD) genannte Vorgang entsteht bei einer Weitergabe beider Allele durch ein Elternteil.

		Allelic Loss		Allelic Imbalance	Normal
		LOH	Total Allelic Loss	Allelic Imbalance	
Gain	High Copy Gain	X		X	
	One Copy Gain			X	
Loss	One Copy Loss	X			
	Homozygous Loss		X		
Normal		X			

Tabelle 3-3

Zu erwartende Ergebnisse bei der Kombination von Copy Number Status und B Allel Frequenz. Nexus Copy Number Manual (NEXUS COPY NUMBER™, Biodiscovery, Hawthorne, USA)

Durchführung:

Die Rohdaten wurden mittels Nexus 6 Copy Number Software (Biodiscovery, El Segundo, CA) mit NCBI build 36.1 des humanen Genoms analysiert. Dazu wurde der SNP-FASST2 Segmentations Algorithmus gewählt.

3.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die *in vitro*-Technik der PCR ermöglicht eine gezielte Vervielfältigung von DNA-Sequenzen, welche von bekannten DNA-Abschnitten eingerahmt werden. Der zu replizierende Bereich der DNA wird durch künstlich hergestellte Primer, die als Starthilfe dienen, eingegrenzt. Bei den Primern handelt es sich um kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize (Template) sind. Nach anfänglicher Denaturierung der doppelsträngigen DNA in zwei Einzelstränge und anschließender Primeranlagerung (Annealing) verlängert die DNA-Polymerase unter vorbestimmten Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von

Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPS) die Primer entlang der einzelsträngigen DNA-Matrize und synthetisiert die neuen DNA-Stränge (Extension). Das Temperaturoptimum der für die Reaktion verwendeten Taq-Polymerase (aus *Thermophilus aquaticus*) liegt bei ca. 72°C. Durch mehrfache Wiederholung dieses Reaktionszyklus ist eine exponentielle Anreicherung der Zielsequenz möglich. Eine anschließende Extension führt die einzelsträngige DNA wieder zusammen und beendet die Reaktion.

Material und Lösungen:

7,5 µL	aqua bidest
10 µL	GoTaq Polymerase (Promega)
0,75 µL	Primer forward (TP362)
0,75 µL	Primer reverse (TP363)
1 µL	DNA

Durchführung:

Die PCR-Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20µL. Dabei wurde ein DNA-Template mit einer Konzentration von 10-400 ng/µL eingesetzt. Bei Konzentrationen unter 10ng/µL wurde das im PCR-Reaktionsansatz eingesetzte DNA-Volumen verdoppelt oder verdreifacht. Alle PCR-Reaktionen beinhalteten einen initialen Denaturierungsschritt von 2 min. bei 94°C. Darauf folgten jeweils 35 Zyklen, die 30 sec. dauerten, der Denaturierung bei 94°C, der Annealing Phase bei 57,3°C, der Extension bei 72°C. Im Anschluss erfolgte eine abschließende Extension von 10 min. bei 72°C.

Primersequenzen:

IDH-1 forward: 5´-CGCTTTCTGCATAATGAGCTCTA-3´

IDH-1 reverse: 5´-AACGAATTACCCACATCTATGGTT-3´

IDH-2 forward: 5´-AGAATTTTAGGACCCCCGTCTG-3´

IDH-2 reverse: 5´-AAAACCCCCTTCTGGTAAA-3´

3.7 Agarose-Gelelektrophorese

Das entstandene PCR-Produkt wird durch Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels der Gelelektrophorese nachgewiesen. Dabei führt das Anlegen eines elektrischen Feldes an das Gel zur Wanderung der DNA-Abschnitte aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatreste zur Anode. Mit Hilfe eines Standards lassen sich nach Anfärbung der DNA-Banden mit Ethidiumbromid, einem fluoreszierenden Farbstoff, der mit der DNA interkaliert, die einzelnen DNA-Banden einer bestimmten Größe zuordnen.

Material und Lösungen:

2%iges Agarosegel (SERVA, Heidelberg, Germany) mit 100µL Ethidiumbromid pro 100ml Gellösung 50 x TAE Puffer (AppliChem, Darmstadt, Germany).

Durchführung:

Die PCR-Produkte wurden auf ein 2%iges Agarosegel geladen und nach Anlegen einer Spannung von 100V für ca. 20 min. gelelektrophoretisch aufgetrennt.

3.8 Aufreinigung der PCR für die Sequenzierung

Um Signalüberlagerungen bei der Sequenzierung zu vermeiden, muss vor der Sequenzierreaktion das PCR-Produkt von Primern, überschüssigen Nukleotiden, Salzen sowie der Taq-Polymerase gereinigt werden.

Material und Lösungen:

- 3,85 μL aqua bidest
- 0,1 μL 1U/ μL SAP
- 0,05 μL 1U/ μL 200U/ μL Exo I
- 0,5 μL Exo I Puffer
- 0,5 μL SAP Puffer
- 5 μL PCR-Produkt

Durchführung:

Zur enzymatischen Reinigung wurde der Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 μL im Thermocycler für 30 min. auf 37°C und anschließend für 15 min. auf 85°C erhitzt.

3.9 DNA-Sequenzierung

Durch die Sequenzier-Methode nach Sanger et al. (106, 107), die auch als Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotidverfahren bezeichnet wird, besteht die Möglichkeit, einzelsträngige cDNA und gDNA, die durch Denaturierung als Einzelstrang in der Sequenzierreaktion vorliegt, zu analysieren. Durch den Einsatz von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (jedes der vier ddNTPs ist mit einem anderen Fluoreszenzmarker gekoppelt), kann die Sequenzierreaktion in einem Reaktionsgemisch stattfinden, da die Detektion der Banden für jedes der vier ddNTPs ein anderes Farbsignal ergibt.

Material und Lösungen:

- 2 μL 10 mM Primer TP362/ TP363
- 2 μL enzymatisch gereinigtes PCR-Produkt
- 8 μL aqua bidest

Durchführung:

Die Sequenzierung des Reaktionsansatzes erfolgte mit dem automatischen DNA Sequenzierer durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany). Die von der Firma Eurofins MWG Operon durchgeführte Sequenzierung der amplifizierten DNA-Sequenzen wurde mit der Analysesoftware SeqMan Pro (DNA Star, Madison, USA) untersucht.

3.10 RNA Isolierung aus Tumorgewebe

Die Extraktion der RNA wurde mit dem RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurde die RNA mit DNA-free™ Kit (Life Technologies, Darmstadt, Germany) zur Beseitigung von Verunreinigungen mit genomischer DNA behandelt. Die Reverse Transkription der RNA fand mit Hilfe des High Capacity cDNA Archive Kit (Life Technologies, Darmstadt, Germany) nach Herstellerangaben statt.

3.11 cDNA-Synthese

Zur Umschreibung der mRNA in komplementäre DNA (cDNA) werden Oligo-dT18-Primer eingesetzt, welche sich an die Poly(A)-Sequenz der mRNA anlagern und diese mit Hilfe des Enzyms Reverse-Transkriptase in cDNA umschreiben.

Vor der eigentlichen cDNA-Synthese erfolgt eine DNase-Vorbehandlung mit dem DNA-free™ Kit (Life Technologies, Darmstadt, Germany) nach Herstellerangaben. Die anschließende cDNA Synthese wurde mit Hilfe des High Capacity cDNA Archive Kit (Life Technologies, Darmstadt, Germany) durchgeführt. Hierbei werden zu jeder DNase-behandelten RNA (50µl) folgende Reagenzien zugegeben:

Material und Lösungen:

10 µl	RT-Buffer 10x
4 µl	dNTPs 25x
10 µl	Random Primer 10x
5 µl	MultiScribe RT enzyme (50 U/ml)
21 µl	RNAse freies Wasser

Durchführung:

Die 100 µl Reaktionslösung durchlaufen im PCR-Cycler folgende Inkubationsbedingungen:

25°C für 10 min

37°C für 2 h

85°C für 5 sec

Die so gewonnene cDNA steht dann als Template für die RT-PCR zur Verfügung.

3.12 Real Time quantitative PCR

Die quantitative Real Time PCR beruht auf dem gleichen Prinzip wie die herkömmliche Polymerase-Kettenreaktion, die zu einer Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnittes führt, und dient der Quantifizierung des dabei entstehenden DNA-Amplifikats. Die Quantifizierung erfolgt durch die Messung der Fluoreszenz, welche proportional zur Menge der amplifizierten Nukleinsäuren zunimmt. Um die optimalen Reaktionsbedingungen zu gewährleisten, findet die Fluoreszenzmessung während der exponentiellen Phase der PCR statt.

In dieser Arbeit wurden zur Visualisierung des PCR Produkts TaqMan-Sonden verwendet, welche sequenzspezifisch an das Amplifikat binden. Am 5'-Ende tragen die Sonden ein fluoreszenzmarkiertes Molekül (Reporter), welches von einem Laser ausgestrahltes Licht absorbiert und wieder emittiert wird. Ein am 3'-Ende der Sonde liegender Quencher besitzt die Eigenschaft, das vom Reporter emittierte Licht zu

absorbieren, falls er sich in räumlicher Nähe zum Reporter befindet. Dies verhindert eine Fluoreszenzdetektion beim Vorliegen von unversehrten TaqMan-Sonden. Während der Elongationsphase der PCR baut die Polymerase aufgrund ihrer 5'-3'-Exonucleaseaktivität das 5'-Ende der Sonde zunehmend ab, sodass eine Freisetzung des Reporter-Farbstoffes stattfindet. In diesem Zustand wird dessen Fluoreszenz nicht mehr unterdrückt und kann gemessen werden.

Dazu wird die mit der DNA-Amplifikation zunehmende Menge des freien Fluoreszenzfarbstoffes mit der Kamera in der Real-Time PCR Maschine gemessen. Die in den ersten Zyklen auftretende Hintergrundfluoreszenz wird als Schwellenwert (Threshold) festgelegt. Der Zeitpunkt, bei dem ein Fluoreszenzsignal diesen Schwellenwert übersteigt, definiert somit den *threshold cycle* (CT) des entsprechenden Reaktionsansatzes. Um die Startkopienzahl der DNA-Sequenz zu bestimmen, werden die in der exponentiellen Amplifikationsphase gemessenen CT-Werte ausgewertet. Je niedriger der CT-Wert, desto größer die Menge der Startkopienzahl der DNA-Sequenz.

Zur Durchführung der Real Time quantitativ PCR wurde der Gene Expression TaqMan Assays und TaqMan PCR Master Mix (Life Technologies, Darmstadt, Germany) genutzt.

Material und Lösungen:

10 µl	Taq Man Fast Universal Master Mix 2x
1 µL	Taq Man Gene Expression Assay
7 µl	nuklease freies Wasser
2 µl	cDNA (entspricht 44ng)

Durchführung:

Das Reaktionsgemisch samt Probe wurde jeweils in ein Well eines Fast 96-well Reaction Plate (Life Technologies, Darmstadt, Germany) übertragen, mit einem Optical Adhesive Cover (Life Technologies, Darmstadt, Germany) abgeklebt und zentrifugiert. Die anschließende Messung erfolgte mit dem ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (ABI by Life Technologies, Darmstadt, Germany) nach den Angaben des

Herstellers. Folgendes Temperaturprogramm wurde für 45 Zyklen für alle Taq Man Gene Expression Assays verwendet:

1. Initiale Denaturierung bei 95°C für 10 min
2. Denaturierung bei 95°C für 1 min
3. Annealing/ Elongation bei 60°C für 20 min

Zur Auswertung der Genexpression wurde die Comparative C_T oder auch sogenannte $2^{-\Delta\Delta C_T}$ - Methode verwendet wie sie von Schmittgen und Livak beschrieben wurde (108, 109). Hierbei handelt es sich um eine relative Quantifizierung der Genexpression, in der die Daten der Real-Time PCR des Zielgens mit denen einer internen Kontrolle verrechnet werden. Somit können die Ergebnisse der relativen Genexpression als individuelle Datenpunkte in Form von $2^{-\Delta C_T}$ Werten dargestellt werden. In dieser Arbeit wurde das Housekeeper Gen *$\beta 2$ -Mikroglobulin* als interne Kontrolle ausgewählt. Eine weitere Art der Darstellung einer relativen Genexpression stellt die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode dar, bei der der ΔC_T Wert des Tumorgewebes zum ΔC_T einer Kontrollprobe (in dieser Arbeit: Gallengangsgewebe) ins Verhältnis gesetzt wird. Aus der Gesamtgleichung $2^{-\Delta\Delta C_T} = (C_T \text{ Kandidaten-Gen} - C_T \text{ interne Kontrolle})_{\text{Tumorprobe}} - (C_T \text{ Kandidaten-Gen} - C_T \text{ interne Kontrolle})_{\text{gesundes Gewebe}}$ lässt sich der sog. RQ-Wert berechnen, der die vielfache Änderung (fold change) des Zielgens im Tumorgewebe gegenüber dem Zielgen im gesunden Gewebe ausdrückt.

3.13 Erstellung eines Tissue-Microarrays (TMA)

Bei der Herstellung eines Tissue-Microarrays (TMA) können aus vielen Paraffin eingebetteten Gewebestücken Stenzen mit einer Länge von 0,6 mm und einem Durchmesser von 2 mm entnommen und in einem neuen Paraffinblock zusammengesetzt werden. Dies bietet die Möglichkeit unter geringem Materialverbrauch eine hohe Anzahl von Proben gleichzeitig für verschiedene Untersuchungen wie Immunhistochemie oder Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung (FISH) zur Verfügung zu stellen (110).

Zunächst werden Paraffinblöcke ausgewählt, auf denen repräsentatives Tumorgewebe enthalten ist, das mit Hilfe einer HE-Färbung und anschließender Begutachtung unter dem Mikroskop identifiziert wird. Daraufhin werden die entsprechenden Tumorareale im

HE-Schnitt markiert, mit dem entsprechenden Gebiet auf dem Paraffinblock abgeglichen und ausgestanzt. Die ausgestanzten Säulen der Donor-Blöcke werden danach in einen Akzeptor-Block überführt, von dem wiederum Schnitte für weitere Untersuchungen angefertigt werden (**Abbildung 3-7**).

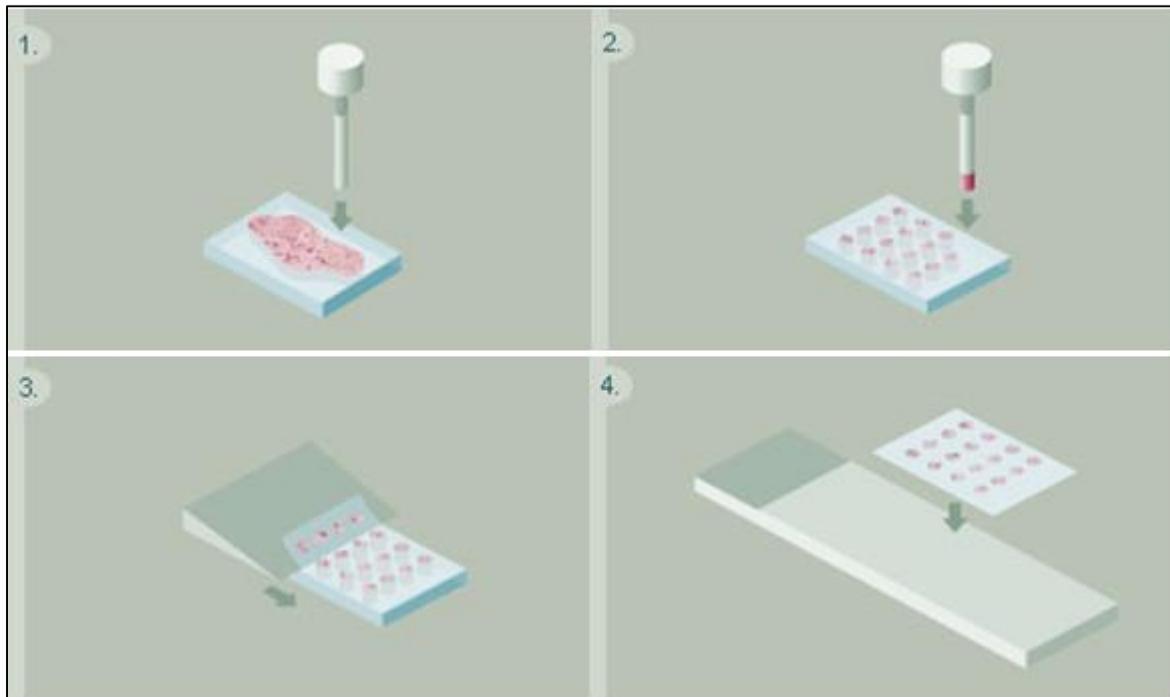


Abbildung 3-7

Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses eines Tissue-Microarrays (TMA). 1. Ausstanzen eines Zylinders aus einem in Paraffin eingebetteten Gewebe 2. Übertragen des Gewebezylinders in einen neuen Paraffinblock 3. Präparation eines Gewebeschnittes 4. Übertragen des Zuschnittes des TMA auf einen Objektträger. Modifiziert nach: <http://www.provitro.de/Herstellungsprozess.105.0.html>

3.14 Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)

Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) bezeichnet ein häufig verwendetes molekularbiologisches Verfahren, welches genutzt wird, um Nukleinsäuren in Zellen oder auf Metaphasen-Chromosomen nachzuweisen.

Dazu wird die DNA der zu untersuchenden Probe zunächst denaturiert, sodass eine fluoreszenz-markierte Sonde bekannter DNA an den entstandenen DNA-Einzelstrang hybridisieren kann. Daraufhin wird der Fluoreszenzfarbstoff der Sonde durch eine Lichtquelle zum Leuchten angeregt, sodass die gebundenen Sondenmoleküle lichtmikroskopisch ausgewertet werden können. Durch diese Methode lassen sich somit

Amplifikationen und Verluste in DNA-Abschnitten verifizieren. Die Interphasen FISH wurde an TMA Schnitten unter Verwendung des Histology FISH Accessory Kits (Dako, Hamburg, Germany) nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Detektion von Amplifikationen und Deletionen wurde die in **Tabelle 3-4** aufgeführten FISH Sonden verwendet. Die Hybridisierung fand in automatischen Hybridisiermaschinen (Dako, Hamburg Germany) statt und wurde freundlicher Weise von Frau Dr. Dido Lenze, Institut für Pathologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin, durchgeführt.

CNV	DNA- Abschnitt	FISH Sonde	FISH Sonden Art	Hersteller
Amplifikation	8q21	<i>MYC/CEP8</i>	Gen/Zentromer (CEP)	Abbott, Wiesbaden, Germany
Amplifikation	17p13.1	<i>TP53/CEP17</i>	Gen/Zentromer (CEP)	Abbott, Wiesbaden, Germany
Amplifikation	11q33	<i>CCND1/IGH</i>	Dual Color Dual Fusion Translocation	Abbott, Wiesbaden, Germany
Deletion	17q12	<i>ERBB2/CEP17</i>	Gen/Zentromer (CEP)	Abbott, Wiesbaden, Germany
Deletion	8p21.2	<i>PNOC-ZNF395/CEP8</i>	Gen/Zentromer (CEP)	Agilent, Santa Clara, USA
Deletion	3p14.2	<i>FHIT/CEN3</i>	Dual Color Dual Fusion Translocation	ZytoLight, Bremerhaven, Germany

Tabelle 3-4

Zusammenfassung der verwendeten FISH-Sonden

Die Signal Detektion und Quantifizierung erfolgte am Axio Imager Z1 (Zeiss, Jena, Germany) und der Isis software (version 5.3.1, MetaSystems, Altlussheim, Germany). Zur Evaluation der Copy Number jeder einzelnen Probe wurden die Gen- und Zentromer-spezifischen Signale in 20 nicht-überlappenden Tumorzellkernen ausgezählt. Nun wurden die Gen-spezifischen Signale im Vergleich zu den Zentromer-spezifischen Signalen ins Verhältnis gesetzt (Anzahl Genkopie: Anzahl Chromosom Kopie). Hierbei wurde ein Quotient $>2,2$ als Amplifikation und ein Quotient < 0.8 als Deletion gewertet.

3.15 Immunfärbung mittels Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode

Die Immunfärbung mittels ABC-Methode beruht auf der Fähigkeit des Eiweißglykoproteins Avidin, 4 Moleküle Biotin physikalisch zu binden. Hierzu werden 3 Reagenzien benötigt. Es bedarf eines Primärantikörpers, der spezifisch gegen das zu bestimmende Antigen gerichtet ist. Das zweite Reagenz (Sekundärantikörper), welches mit Biotin konjugiert ist, detektiert den Primärantikörper. Das dritte Reagenz besteht aus

einem Komplex aus Avidin und Biotin, an den eine Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist. Durch die freien Stellen des Avidinmoleküls wird die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers ermöglicht. Das Enzym Peroxidase und damit das gesuchte Antigen wird mit dem Chromogen DAB (Diaminobenzidin) sichtbar gemacht.

Material und Lösungen:

10 mM	Citratpuffer, pH 6,0
9 ml	0,1M Zitronensäure
41 ml	0,1M Natriumcitrat
450 ml	aqua dest.

DAB-Substratlösung:

100 ml	0,05M Tris (pH 7,5) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany)
0,1 g	DAB (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany)
50 ml	30% H ₂ O ₂

Durchführung:

Zunächst wurden mit einem Mikrotom 3 µm dünne Gewebeschnitte von den FFPE Tumorproben angefertigt und auf positiv geladene Objektträger (superfrost +, Menzel, Braunschweig, Germany) aufgetragen. Anschließend wurden diese in einem Inkubator bei 42°C für 24 Stunden getrocknet und danach durch Waschen in Xylol deparaffinisiert. Nach weiteren Waschschritten mit 95%igem Ethanol wurden die Schnitte zur Blockade der endogene Peroxidase für 30 min. bei Raumtemperatur in Methanol und 1% H₂O₂ inkubiert. Anschließend folgte eine Rehydratisierung der Schnitte in aqua bidest. Um die Zugänglichkeit der Antigen-Epitope zu verbessern, wurden die Schnitte für 30 min. in 10mM Na-Citratpuffer (pH 6) in einer Mikrowelle bei 180W erhitzt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären monoklonalen Antikörper bei 4°C über Nacht. Nach Entfernung des Erstantikörpers durch mehrere Waschschritte mit PBS, wurden die Schnitte für 30 min. mit einem Kaninchen-anti-Maus-biotinyliertem-IgG-Antikörper inkubiert und nach erneutem Waschen mit PBS mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase-

Komplex (Avidin/Biotin-blocking Kit, Vector, Burlingame, USA) für 30 min. bei Raumtemperatur überschichtet. Nach dem Entfernen ungebundener Antikörper durch mehrmaliges Waschen mit Triton X100 (0,1%) enthaltendem PBS, wurden die Schritte durch Zugabe von 3 Tropfen Diaminobenzidin -Substrat (DAB) gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte mit einer Hämatoxylinlösung gegengefärbt und daraufhin mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, mit Xylol fixiert und einem Deckglas versiegelt.

4 Ergebnisse

Um die molekularen Entstehungsmechanismen von Cholangiokarzinomen besser zu verstehen, sollten im Rahmen dieser Promotionsarbeit Cholangiokarzinome genomweit auf Veränderungen (Copy Number Variations) in der Tumor-DNA mit Hilfe der Molecular Inversion Probe (MIP) Technologie untersucht und die identifizierten genetischen Veränderungen (chromosomale Amplifikationen und Deletionen) mit unabhängigen molekulargenetischen und immunhistochemischen Methoden verifiziert werden.

4.1 Genomweite Analyse von chromosomalen Amplifikationen und Deletionen mit Hilfe der Molecular Inversion Probe (MIP) Technologie

Zur genomweiten Untersuchung von Veränderungen der DNA-Kopienzahl in intra- und extrahepatischen Cholangiokarzinomen wurde die DNA aus 24 in Paraffin eingebetteten Tumorproben auf einen MIP SNP Array der Firma Affymetrix hybridisiert und mit 6 Kontrollgeweben (Gallengangsgewebe von nicht-Tumorproben) verglichen.

Mit der Software Nexus Copy Number konnten in allen 24 untersuchten Tumorproben über das gesamte Genom verteilt Regionen mit veränderten DNA-Kopienzahlen (Gewinne und Verluste) identifiziert werden, welche in der **Abbildung 4-1a** zusammengefasst werden. Hierbei zeigen sich im Kontrollgewebe (Gallengang) nur vereinzelte Veränderungen, die als physiologische genomische Variationen zu werten sind (**Abbildung 4-1b**). Insgesamt überwiegen in dem untersuchten Tumorkollektiv die chromosomalen Verluste deutlich gegenüber den Gewinnen der DNA-Kopien.

Die häufigsten Gewinne finden sich in Chromosom 1q und Chromosom 8, wobei diese Veränderungen in etwa 50% der Tumorproben vorliegen. Dagegen zeigen sich Verluste am häufigsten auf Chromosom 1p, 3p, 4, 6 und 9. Hierbei finden sich die Aberrationen auf Chromosom 9 in bis zu 80% der Tumorproben, während die weiteren Veränderungen zumeist bei etwa 50% der untersuchten Proben bestehen.

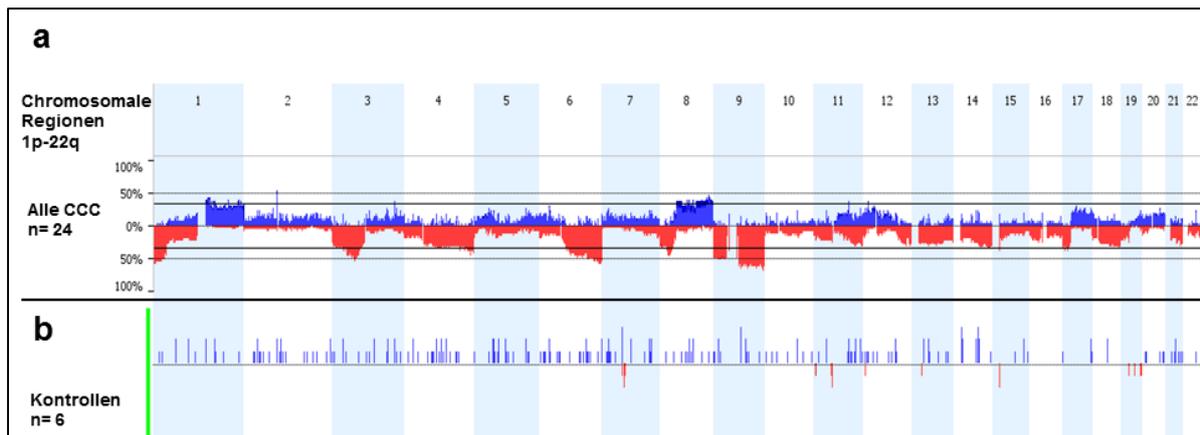


Abbildung 4-1

Identifikation von Copy Number Aberrationen im gesamten Genom (Chromosomen 1p-22q) von 24 cholangiozellulären Karzinomen (CCC) und 6 Kontrollgeweben (Gallengang). a: Frequenzdiagramm mit Darstellung von chromosomalen Verlusten in rot und chromosomalen Gewinnen in blau mit prozentualer Angabe der Veränderung. b: Copy Number Aberrationen im Kontrollgewebe mit im Vergleich nur geringen chromosomalen Veränderungen

4.2 Identifizierung neuer Zielgene innerhalb signifikanter Copy Number Aberrationen mittels GISTIC Algorithmus

Nach dem Aufdecken genomweiter Veränderungen der DNA-Kopienzahl in Cholangiokarzinomen, wurde ein statistischer Algorithmus **Genomic Identification of Significant Targets In Cancer** (GISTIC) angewandt. Dieser dient dazu innerhalb der zuvor identifizierten Copy Number Aberrationen funktionell signifikante Regionen nachzuweisen und von den entscheidenden genomischen Veränderungen betroffene Zielgene herauszukristallisieren. Die hiermit identifizierten Gene, die möglicherweise bei der Tumorentwicklung des Cholangiokarzinoms eine Rolle spielen, können dann anschließend mit weiteren Methoden untersucht werden.

Der **Genomic Identification of Significant Targets In Cancer** (GISTIC) Algorithmus wurde zuvor schon in Studien zur Beurteilung von Copy Number Variations bei anderen Tumoren eingesetzt (111). In diesen Algorithmus fließen sowohl die Frequenz einer Veränderung als auch deren Amplitude (die log₂ transformierte Signalintensität) mit ein.

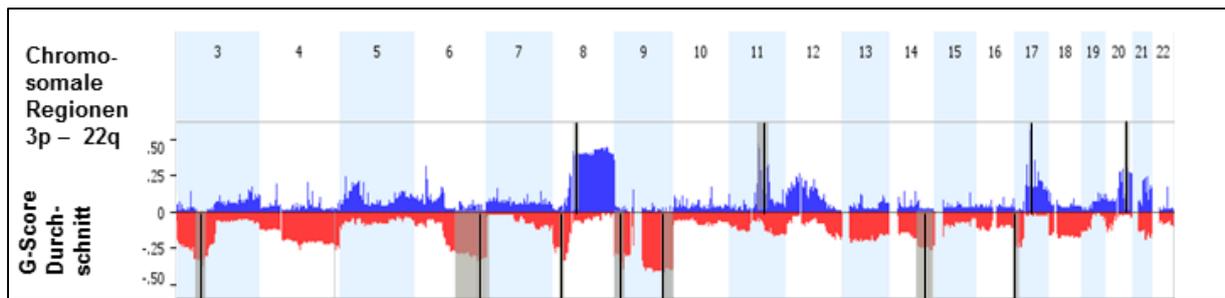


Abbildung 4-2

Visualisierung des GISTIC Algorithmus. Die y-Achse stellt einen Quotienten aus dem G-Score und Anzahl der untersuchten Proben ($n=24$) dar, somit bildet die y-Achse den Durchschnittswert des G-Scores bezogen auf jede Lokalisation ab. Regionen mit grauem Hintergrund kennzeichnen Lokalisationen mit dem höchsten G-Score, bzw. in schwarz die „Peak“-Regionen. Anmerkung: G-Score ist das Produkt aus Frequenz und Amplitude einer Aberration an einer spezifischen Lokalisation.

Mit dem GISTIC Algorithmus konnten 11 signifikante Regionen mit einer Amplifikation oder einer Deletion basierend auf ihrem G-Score identifiziert werden. Innerhalb dieser Regionen wurde jeweils ein Kandidatengenen ausgewählt, um die Veränderung in dieser Lokalisation mit unabhängigen Methoden nachzuweisen (**Abbildung 4-2**).

Hierbei wurden im Rahmen der Gewinne auf Chromosom 8 das Gen *v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog (LYN)*, auf Chromosom 11 das Gen *Fibroblast growth factor 19 (FGF19)*, auf Chromosom 17 das Gen *Growth factor receptor-bound protein 7 (GRB7)* und auf Chromosom 20 das Gen *Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1 (PTPN1)* ausgewählt. Zur weiteren Analyse der Verluste wurden auf Chromosom 9 das Gen *Deleted in bladder cancer protein (DBC1)*, auf Chromosom 8 das Gen *Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B alpha isoform (PPP2R2A)* und auf Chromosom 3 das Gen *Fragile histidine triad protein (FHIT)* ausgewählt. Die zur weiteren Untersuchung ausgewählten Kandidatengene, welche innerhalb der signifikant durch Copy Number Aberrationen veränderten Regionen lagen, sollten möglichst im Rahmen von Cholangiokarzinomen nicht beschriebene Gene beinhalten. Denn in den durch GISTIC identifizierten Regionen sind durchaus auch schon in der Literatur intensiv behandelte Tumorsuppressor- und Onkogene lokalisiert. **Tabelle 4-1** fasst die durch GISTIC identifizierten und für weitere Analysen ausgesuchten Kandidatengene zusammen.

Copy Number Gewinne			
Region	Gen	G-Score	Frequenz in %
8q21	<i>LYN</i>	11	40
11q33	<i>FGF19</i> <i>CCND1</i>	10	20
17q12	<i>GRB7</i> <i>ERBB2</i>	13	37
20q13.13	<i>PTPN1</i>	7	25-30

Copy Number Verluste			
Region	Gen	G-Score	Frequenz in %
9q33	<i>DBC1</i> <i>CDKN2A</i> <i>CDKN2B</i>	10	80
3p14.2	<i>FHIT</i>	9	60-70
8p21.2	<i>PPP2R2A</i>	8	60
17p13.1	<i>TP53</i>	6	40

Tabelle 4-1

Tabellarische Übersicht der Kandidatengene. Auswahl basierend auf Signifikanz durch GISTIC Algorithmus (G-Score). Neben den neuen Zielgenen werden in der Tabelle auch schon bekannte in der gleichen Regionen lokalisierte Tumoronko- (*CCND1*, *ERBB2*,-) und Tumorsuppressorgene (*TP53*, *CDKN2A/B*) mitaufgeführt.

4.3 Nachweis der Copy Number Aberrationen innerhalb der GISTIC definierten Zielgene mittels Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)

Zur Verifizierung der zuvor mittels MIP SNP identifizierten Amplifikationen und Deletionen innerhalb der mit GISTIC definierten Zielgene wurden Untersuchungen mittels Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) durchgeführt.

Hierbei konnte an 20 Fällen, die auch schon für die MIP SNP Analyse verwendet wurden, größtenteils eine Übereinstimmung der Copy Number Aberrationen in der MIP SNP Methode mittels Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) gezeigt werden (**Abbildung 4-2**). Differenzen betrafen vor allem die Amplifikationen. Hierbei fanden sich in der Mehrzahl der Fälle im Rahmen der FISH Analyse überwiegend Polysomien, welche mittels MIP SNP als Amplifikationen identifiziert worden waren. Interessanterweise

fanden sich *ERBB2* Amplifikationen in der FISH Analyse häufiger als zunächst aufgrund der MIP SNP Untersuchung vermutet.

	<i>ERBB2</i> (17q12) Amplifikation oder Polysomie	<i>CCND1</i> (11q33) Amplifikation oder Polysomie	<i>LYN</i> (8q21) Amplifikation oder Polysomie	<i>FHIT</i> (3p14.2) Deletion oder Monosomie	<i>PPP2R2A</i> (8p21.2) Deletion oder Monosomie	<i>TP53</i> (17p13.1) Deletion oder Monosomie
Fälle= n (FISH)	14/20	7/20	8/19	11/20	10/19	7/18
Aberration in Prozent (FISH)	70	35	42,1	55	52,3	38,8
Aberration in Prozent (MIP SNP)	37	20	40	60-70	60	40

Tabelle 4-2

Bestätigung der von MIP SNP identifizierten Amplifikationen und Deletionen mittels Fluoreszenz-In-Situ Hybridisierung (FISH) in GISTIC definierten Kandidatengenen in 20 Cholangiokarzinomen.

4.4 Bestimmung der mRNA Expression in GISTIC definierten Zielgenen mittels Real-Time PCR

Die Veränderungen in der DNA-Kopienzahl (Gewinne und Verluste), in den zunächst mit GISTIC identifizierten Onko- und Tumorsuppressorgenen, wurden anschließend mittels der Fluoreszenz-In-Situ Hybridisierung (FISH) weitgehend bestätigt. Zur weiteren Charakterisierung dieser Zielgene wurde untersucht wie sich deren Expression im Tumor- und Normalgewebe verhält. Hierzu wurde die mRNA-Expression der Kandidatengene in 30 zuvor nicht verwendeten Tumorproben von intrahepatischen Cholangiokarzinomen und 6 Kontrollgeweben (Gallengangsgewebe) mittels Real-time PCR bestimmt.

In den Kandidatengenen *FHIT* (3.6-fach), *DBC1* (0.6-fach) and *FGF19* (29-fach) wurde eine erniedrigte Genexpression bezüglich der Mittelwerte der relativen Expression beobachtet. Eine erhöhte Genexpression konnte für *LYN* (2.9-fach), *GRB7* (2.2-fach) und *PTPN1* (1.3 fach) nachgewiesen werden (**Abbildung 4-3**).

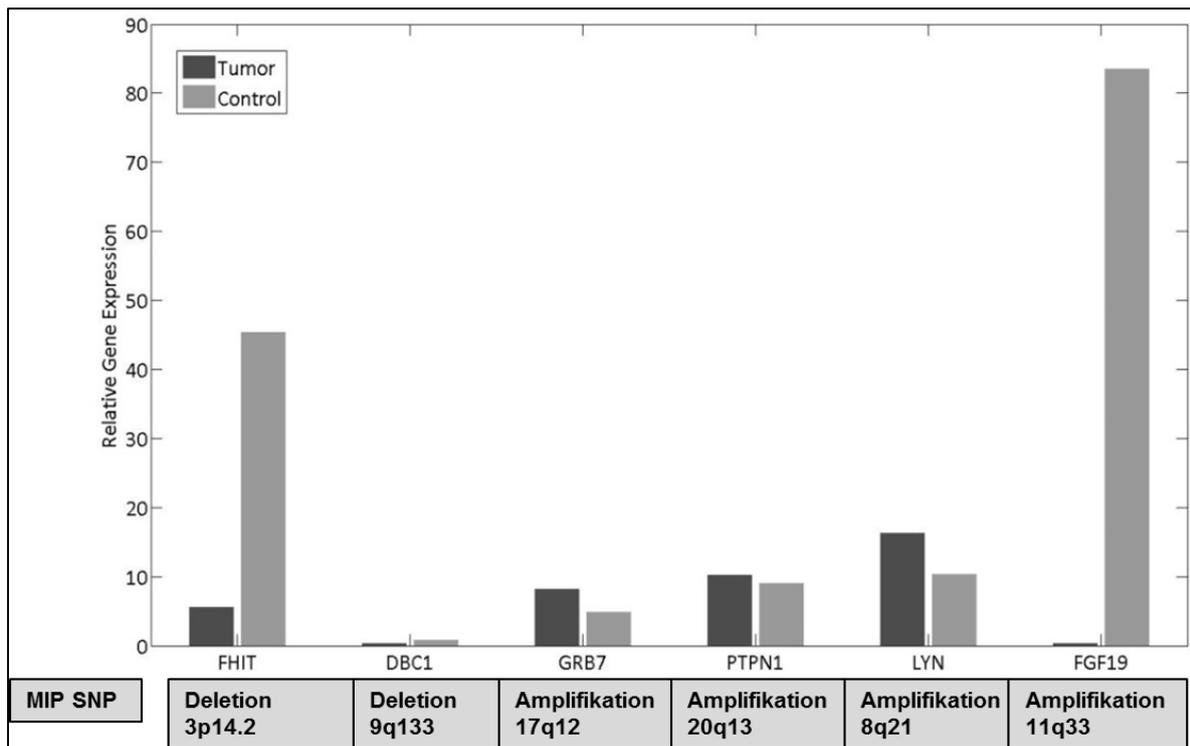


Abbildung 4-3

Darstellung der mittels Real-Time PCR bestimmten mRNA Expression der Zielgene in intrahepatischen Cholangiokarzinomen (schwarz) gegenüber nicht-pathologischem Gallengangsgewebe (grau) im Vergleich zu den mit MIP SNP bestimmten DNA-Kopienzahlen (Deletionen oder Amplifikationen) in den entsprechenden chromosomalen Regionen. In den Genen *FHIT* und *DBC1* wurde eine erniedrigte Genexpression entsprechend den Deletionen in den chromosomalen Region detektiert. Für *GRB7*, *PTPN1*, *LYN* ließ sich den Amplifikation dieser Regionen entsprechend eine erhöhte Genexpression beobachten. Trotz einer mittels MIP SNP nachgewiesenen Amplifikation des *FGF19* zeigt sich eine erniedrigte Genexpression.

4.5 Immunhistochemische Untersuchung der Proteinexpression von ErbB2

Zur Bestätigung des hohen Amplifikationsstatus von *ERBB2*, welcher im Rahmen der FISH Analyse aufgedeckt wurde, wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Hierbei zeigte sich in den Fällen, in denen zuvor mittels FISH eine Amplifikation oder hochgradige Polysomie von *ERBB2* identifiziert wurde, eine intensive Protein Expression in den immunhistochemischen Färbungen. Des Weiteren konnte bei der Bewertung der Protein Expression analog des etablierten DAKO Bewertungssystems bei Mammakarzinomen eine starke Übereinstimmung zwischen Amplifikationen, welche im Rahmen der MIP SNP Untersuchung identifiziert worden waren, und einer starken Protein Expression (DAKO 2+, 3+) beobachtet werden (**Abbildung 4-4, Tabelle 4-3**).

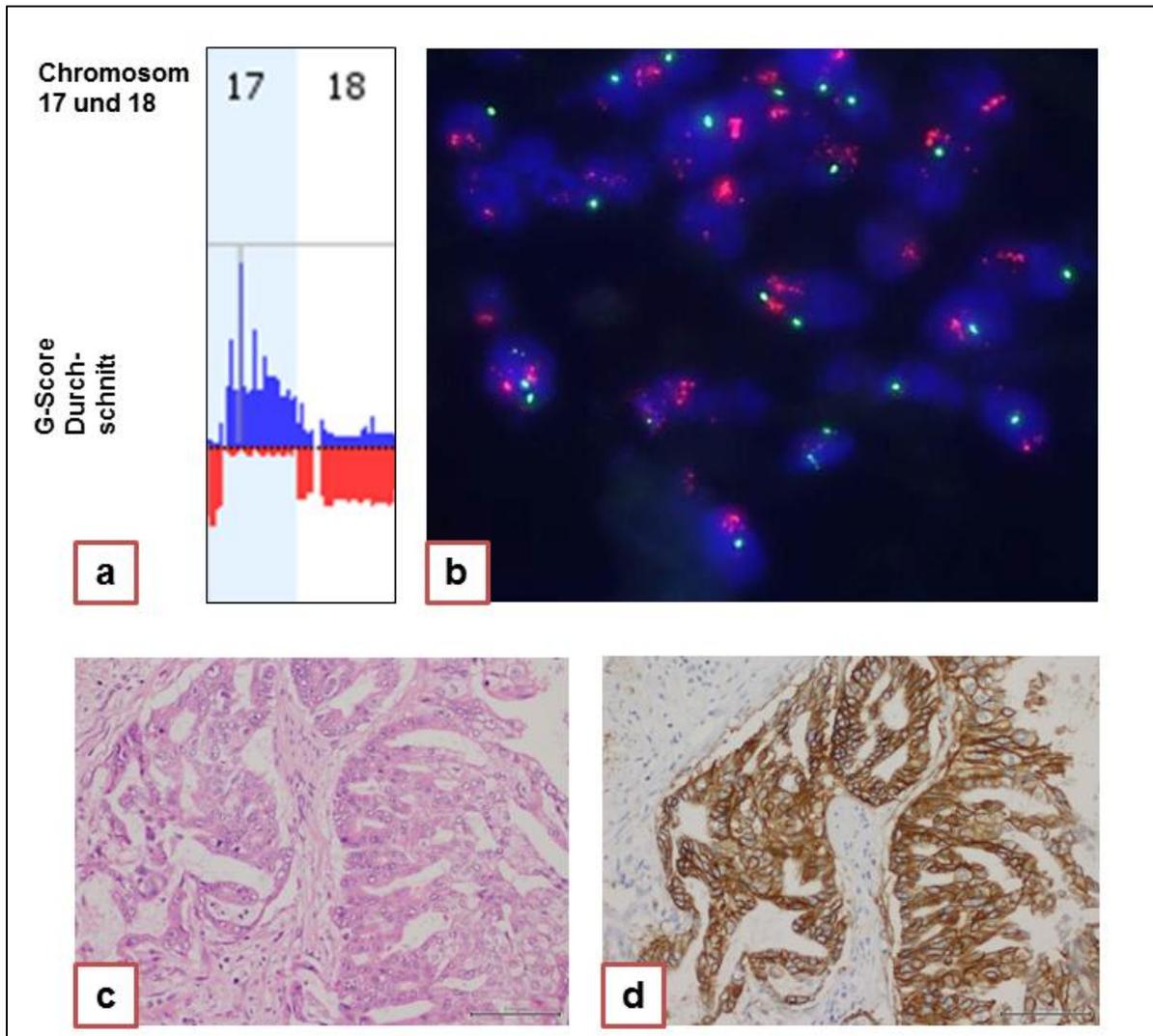


Abbildung 4-4

a: Ausschnitt des GISTIC Algorithmus von Chromosom 17 und 18 mit Darstellung der hoch signifikanten Amplifikation der 17q12 Region, in welchem *ERBB2* lokalisiert ist. b: FISH Analyse Tumorprobe A01 II: Die Zentromer Signale sind in grün, die Gen Signale in rot dargestellt. Die roten Gen Signalcluster repräsentieren somit eine Vervielfältigung (Amplifikation) des *ERBB2*-Gens. c: HE-Färbung der Tumorprobe A01 II mit repräsentativen Tumorareal. d: Immunhistochemie: Intensive membranständige Färbung als Ausdruck von ErbB2 Protein Überexpression in Tumorprobe A01 II.

DNA Nr.	MIP Status 17q12	ErbB2 Färbung
A01II	hohe Amplifikation	3+
A02 II	keine Veränderung	negativ
A03 II	Amplifikation	2+
A05 II	hohe Amplifikation	3+
A06 II	keine Veränderung	1+
A07 II	keine Veränderung	2+
A08 II	keine Veränderung	negativ
A05 I	keine Veränderung	1+
A06 I	Amplifikation	2+
A08 I	Amplifikation	2+
A09 I	Amplifikation	2+
B01 II	keine Veränderung	1+
B02 II	keine Veränderung	2+
B03 II	keine Veränderung	1+
B04 II	keine Veränderung	negativ
B05 II	Amplifikation	2+
B06 II	keine Veränderung	1+
B07 II	keine Veränderung	negativ
B08 II	keine Veränderung	negativ
A10 I	keine Veränderung	negativ
A11 I	keine Veränderung	negativ
B01 I	Amplifikation	2+
B02 I	Amplifikation	1+
B03 I	keine Veränderung	negativ

Tabelle 4-3

Korrelation des Molecul Inversion Probe (MIP) Status der Region 17q12 und der immunhistochemischen Analyse mit weitestgehender Übereinstimmung zwischen Amplifikation und intensiver zirkumferenter membranständiger Protein Expression (2+, 3+). Definition des Bewertungssystems der Immunohistologie: negativ=keine Expression, 1+= fokale schwache zirkumferente Expression, 2+= intensive zirkumferente Expression< 50%, 3+=intensive zirkumferente Expression> 50%.

In anderen Genen, welche in der MIP SNP und FISH Untersuchung Amplifikationen zeigten, konnte immunhistochemisch keine erhöhte Protein Expression nachgewiesen werden. Des Weiteren waren Gene, in denen Deletionen identifiziert wurden, nicht durch eine verminderte Proteinexpression charakterisiert.

4.6 Identifizierung eines unterschiedlichen subtypenspezifischen Copy Number Aberrationsmusters

Mittels der MIP SNP Analyse konnten genomweite Veränderungen der DNA-Kopienzahl gegenüber dem Normalgewebe nachgewiesen werden und anschließend mit dem statistischen Algorithmus GISTIC signifikant aberrante Regionen innerhalb der beschriebenen Copy Number Variationen identifiziert werden. Mit Hilfe weiterer molekularbiologischer und immunhistochemischer Methoden wurden die innerhalb dieser chromosomalen Regionen lokalisierten Zielgene, die an der Entstehung von Gallengangskarzinomen beteiligt sein könnten, weiter analysiert.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob intra- und extrahepatische Cholangiokarzinome Unterschiede bezüglich der Copy Number Aberrationen als Hinweis auf ein subtypenspezifisches molekularpathologisches Profil aufweisen.

Hierzu wurde die „Comparison“-Funktion der Nexus Copy Number Software verwendet. In dieser gepaarten Analyse dienten die Copy Number Variationen der extrahepatischen Cholangiokarzinome als Messbasislinie (baseline), zu der Abweichungen CNVs der intrahepatischen Tumoren kalkuliert wurden. Die auf **Abbildung 4-5** dargestellten Ergebnisse implizieren signifikante Unterschiede bezüglich der Copy Number Aberrationen in mehreren kleineren und mindestens 2 größeren chromosomalen Regionen.

Besonders Chromosom 3 und 14 zeigen die größten Unterschiede bezüglich der Aberrationen. Intrahepatische Cholangiokarzinome sind in diesen Regionen häufiger von Deletionen betroffen als die extrahepatisch lokalisierten Tumoren. In der abgebildeten Region des Chromosom 3 und Chromosom 14 sind 70% der intrahepatischen Gallengangskarzinome von Verlusten charakterisiert, während der extrahepatische Subtyp nur in 10% diese Veränderung aufweist (**Abbildung 4-5**).

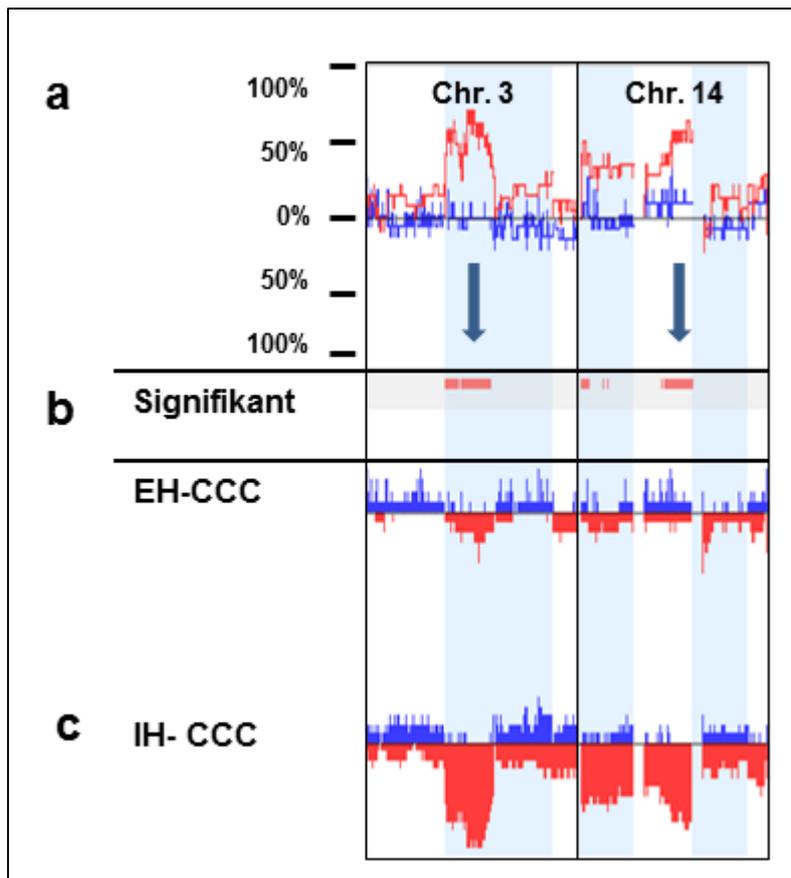


Abbildung 4-5

Identifizierung von Unterschieden zwischen intrahepatischen (IH-CCC) und extrahepatischen (EH-CCC) cholangiozellulären Karzinomen unter Anwendung der "Comparison"-Funktion der Nexus Copy Number Software. a: Ausschnitt des Frequenzdiagramms von Chromosom 3 und 14. In blau die Messbasislinie der extrahepatischen Copy Number Alterationen und in rot die Abweichung der intrahepatischen CNVs. b: Regionen mit signifikanten Unterschieden mit Pfeil markiert. c: Copy Number Aberrationen von Chromosom 3 und 14 der extrahepatischen und intrahepatischen cholangiozellulären Karzinome (CCC).

4.7 Unterschiedliches Mutationsprofil im *IDH-1* und *IDH-2* Gen in intrahepatischen und extrahepatischen Cholangiokarzinomen

Wie im vorausgehenden Abschnitt beschrieben zeigten sich im vorliegenden Tumorkollektiv Unterschiede zwischen intra- und extrahepatischen Cholangiokarzinomen bezüglich der Copy Number Aberrationen. Dies weist auf mögliche Unterschiede in der Molekularpathologie zwischen den beiden Tumorsubtypen hin. Dieses Phänomen sollte auch im Rahmen von somatischen Mutationen untersucht werden, da frühere Studien Unterschiede in der Frequenz von Mutationen im *IDH-1*- und *IDH-2*-Gen zwischen intra- und extrahepatischen Cholangiokarzinomen gezeigt haben (66, 69). Hierbei wurden

insbesondere auch populationsbezogene Unterschiede in der Frequenz der Mutation des *IDH*-Gens beschrieben.

Zur Bestätigung eines unterschiedlichen Mutationsprofils des *IDH-1*- und *IDH-2*-Gens in intra- und extrahepatischen Cholangiokarzinomen in unserem westeuropäischen Tumorkollektiv wurden 26 IH-CCA und 34 EH-CCA auf Mutationen in den entsprechenden Genen untersucht.

Zum Nachweis der Mutationen im Exon 4 des *IDH-1*- und *IDH-2*-Gens in cholangiozellulären Karzinomen, wurden die „hotspot“-Regionen, welche sich im Exon 4 des *IDH*-Gens befinden, mittels PCR amplifiziert. Um die Qualität und Größe der amplifizierten PCR Produkte zu kontrollieren, wurden die Produkte auf Agarosegele geladen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Von allen Tumor-DNAs konnten PCR Produkte in ausreichender Menge und mit entsprechend hoher Qualität amplifiziert werden. Aufgrund der dem Exon 4 des *IDH-1*- und *IDH-2*-Gens entsprechenden Größe und einer ausreichenden Konzentration der PCR-Produkte, wurden diese enzymatisch aufgereinigt und sequenziert.

Mittels Sequenzierung der Hotspotregion des Exons 4 des *IDH-1*- und *IDH-2*-Gens von 60 cholangiozellulären Karzinomen (26 IH-CCC, 34 EH-CCA) konnten in 5 Fällen (8%) somatische Mutationen nachgewiesen werden, welche auf die intrahepatischen Cholangiokarzinome beschränkt waren. Die 3 Mutationen im *IDH-1*-Gen lagen in der „hotspot“-Region des Codons 132, welche zu Aminosäurenaustausch von Arginin nach Leucin (R132L, n=2) und Cystein (R132C, n=1) führten. Die 2 heterozygoten Mutationen im *IDH-2*-Gen waren in der „hotspot“-Region des Codons 172 lokalisiert, welche 2 Aminosäuresubstitutionen von Arginin nach Methionin (R172M, n=1) und Lysin (R172K, n=1) beinhalteten (**Abbildung 4-6**).

Weiterhin wurden 3 weitere Veränderungen im Codon 105 identifiziert, welche einen Basentausch von C nach T aufzeigten. Somit änderte sich das Codon 105 zwar von CGC zu CGT ohne dabei aber zu einem Aminosäuretausch zu führen. Die heterozygote Mutation bewirkte keine Änderung der vorhandenen Aminosäure Glycin entsprechend einem Silent Nucleotid Polymorphism.

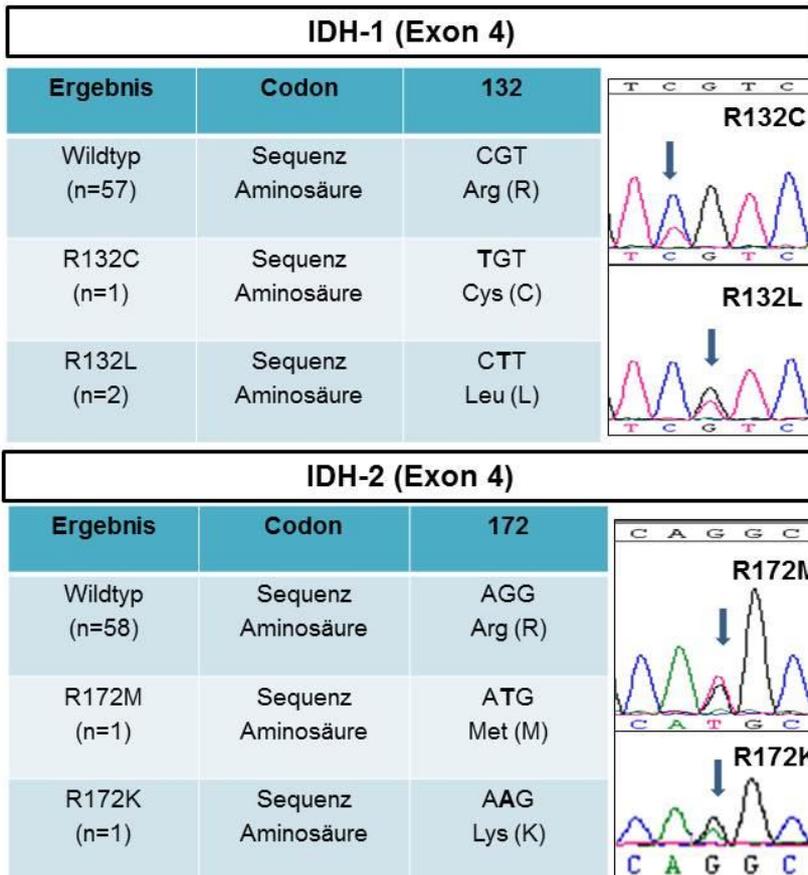


Abbildung 4-6

Zusammenfassung der Mutationsanalyse von *IDH-1* und *IDH-2* mit repräsentativen Beispielen von Mutationen im *IDH-1*- und *IDH-2*-Gen.

5 Diskussion

5.1 Genomweite Untersuchung von chromosomalen Amplifikationen und Deletionen mittels Molecular Inversion Probe (MIP) in Cholangiokarzinomen

Cholangiokarzinome sind hochmaligne Tumoren, die von einer neoplastischen Transformation des Gallengangepithels ausgehen. Basierend auf ihrer anatomischen Lage werden die Tumoren in den intra- und extrahepatischen Subtyp unterteilt (10). Trotz intensiver Forschungsaktivität zur Etablierung neuer Behandlungsmethoden sind Cholangiokarzinome derzeit durch eine sehr schlechte Prognose bei Diagnosestellung charakterisiert (112).

Aus diesem Grund widmen sich die aktuellen Untersuchungen zunehmend dem Ziel, die molekularen Mechanismen der Cholangiokarzinogenese besser zu verstehen. Hierbei wurden Veränderungen der Onko- und Tumorsuppressorgene als fundamentale Vorgänge bei der Entwicklung von Cholangiokarzinomen identifiziert. Es konnte in Maus- und Zellmodellen gezeigt werden, dass Mutationen sowohl im *KRAS*- als auch *TP53*-Gen für die Tumorentwicklung ätiologisch von Bedeutung sind (58). Des Weiteren führten neue genomweite Analysen wie Exom-Sequencing (113), Genexpressions- (83) und Methylierungsprofile (74) zu einer differenzierten Charakterisierung entscheidender kanzerogener Entwicklungssignalkontrollwege in Cholangiokarzinomen. Zuletzt nahmen Sia et al., 2013 durch eine Integration von Genexpressions-, Mutations- und Copy Number Variation-Status eine neue molekulare Subklassifizierung des Tumors in intrahepatischen Cholangiokarzinomen vor. Hierbei wurde zum ersten Mal das Molecular Inversion Probe (MIP) Verfahren zur Untersuchung der DNA-Kopienzahl in Gallengangskarzinomen verwendet, während frühere Untersuchungen mit einem Comparative Genomic Hybridization (CGH) Array durchgeführt wurden.

In der vorliegende Arbeit wurde ebenfalls die Molecular Inversion Probe Methode zur genomweiten Detektion von Copy Number Aberrationen angewandt. Gegenüber den in früheren Studie verwendeten CGH basierten Verfahren zeichnet sich die Molecular Inversion Probe Technologie durch Multiplex-Analysen aus, bei denen mehr als 20.000 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in einer einzigen Probe untersucht werden. Zudem führt das unimolekulare Probendesign und die selektionierenden enzymatischen Prozesse zu einer hohen Spezifität des Reaktionsablaufs (103). Da zur Detektion eines SNPs Fragmente von lediglich 40 Basenpaar benötigt werden, können Analysen an

äußerst fragmentierten DNA-Proben, die aus Paraffin-eingebetteten Gewebeproben extrahiert werden, erfolgen (104).

Frühere CGH basierte Untersuchungen konnten die Copy Number Aberrationen im jeweiligen Kollektiv nur beschreiben und allenfalls durch Abgleich der betroffenen Regionen mit der Genome Data Base mögliche Zielgene identifizieren (90). Dagegen erlaubt die Auswertung der Molecular Inversion Probe Technologie mittels der Software Nexus Copy Number eine detaillierte Visualisierung nicht nur der veränderten genomischen DNA-Kopienzahl, sondern auch die Darstellung der betroffenen Genabschnitte bis auf die Exon-Ebene.

Die genomweite Analyse des in dieser Arbeit untersuchten Kollektivs von 24 Cholangiokarzinomen (13 intra- und 11 extrahepatische Tumoren) mit Hilfe der Molecular Inversion Probe Methode führte zur Identifikation von Copy Number Aberrationen, die über alle chromosomalen Regionen verteilt waren, während das Kontrollgewebe (Gallengangsgewebe aus nicht-Tumorproben) kaum Veränderungen aufzeigte (**Abbildung 4-1**). In der vorliegende Arbeit zeigten sich die häufigsten Copy Number Gewinne auf Chromosom 1q und Chromosom 8 sowohl für intra- als auch extrahepatische cholangiozelluläre Karzinome. Diese Ergebnisse decken sich nur bedingt mit denen der Gruppe von McKay et al. 2011 (90), welche in anderen Regionen die häufigsten Copy Number Gewinne in all ihren untersuchten Fällen zeigen konnten. Zudem stellen in der Untersuchung von McKay et al., 2011 die Gewinne den größeren Anteil der veränderten DNA-Kopienzahlen dar. Wie auch in der Studie von Homayounfar et al, 2009 (77) überwiegen in dem vorliegenden Tumorkollektiv die chromosomalen Verluste gegenüber den Gewinnen. Interessanterweise zeigt sich trotz einer ähnlichen ethnischen Zusammensetzung des Patientenkollektivs der beiden beschriebenen Studien aus England und Deutschland eine große Heterogenität der Copy Number Aberrationen. Sogar innerhalb der drei früheren Untersuchungen aus Südkorea (Koo et al., 2001 (78), Lee et al., 2004 (114) und Uhm et al., 2005 (79)) bestehen erhebliche Unterschiede in der Frequenz der eingetretenen Veränderungen der DNA-Kopienzahlen. Dies weist auf weitere mögliche Einflüsse neben den vermuteten populations- und länderspezifischen karzinogenen Faktoren des betroffenen Patientenkollektivs auf die Copy Number Aberrationen hin.

Trotz großer Unterschiede bestehen auch Überschneidungen zwischen der vorliegenden Analyse und der vorherigen deutschen (Homayounfar et al., 2009 (77)) und den südkoreanischen Untersuchungen: Häufige Amplifikationen auf Chromosom 8q und 20 als auch vorherrschende Deletionen auf Chromosom 1p, 3p und 6q. Dies deutet trotz untersuchungsabhängiger und populationsspezifischer Einflüsse auf entscheidende, charakteristische Veränderungen der DNA-Kopienzahl in Cholangiokarzinomen hin.

5.2 Identifizierung neuer Zielgene innerhalb signifikanter Copy Number Aberrationen mittels GISTIC Algorithmus

Neben den zuvor beschriebenen Vorteilen der Molecular Inversion Probe Technologie ermöglichte die Nexus Copy Number Software auch eine statistische Auswertung der über das gesamte Genom verteilten aberranten DNA-Kopienzahlen. Dazu wurde der statistische Algorithmus **Genomic Identification of Significant Targets In Cancer (GISTIC)** angewandt (**Abbildung 4-2**), der schon zuvor erfolgreich in Adenokarzinomen des Ösophagus (115) und kolorektalen Karzinomen (116) eingesetzt wurde. Durch die Berechnung der Frequenz und der Amplitude (also der log₂ transformierten Signalintensität) einer Copy Number Aberration wird eine „peak region“ chromosomaler Instabilität definiert. Innerhalb dieser „peak region“ wurden Zielgene identifiziert, welche möglicherweise an der Cholangiokarzinogenese beteiligt sind (**Tabelle 4-1**).

Die hierbei vorliegenden Ergebnisse decken sich teilweise mit den Untersuchungen von Sia et al. 2013 (83), die als erste eine genomweite Untersuchung der Copy Number Variationen mittels GISTIC auf relevante Karzinogenese-treibende Gene in intrahepatischen Cholangiokarzinomen durchführten. So wurden auch in der vorliegenden Analyse die Regionen des Chromosoms 11q13.3, welche die Gene *FGF19* und *CCND1* umspannt, und 9p21.3 mit *CDKN2A* (p16) als Zentren chromosomaler Instabilität charakterisiert. Darüber hinaus wurden im vorliegenden Tumorkollektiv weitere zuvor nicht in cholangiozellulären Karzinomen beschriebene Tumorsuppressor- und Onkogene gefunden, welche in Regionen mit einem durch GISTIC bestimmten high-magnitude Copy Number Gewinn oder Verlust liegen (**Tabelle 4-1**). Diese beinhalteten Onko- und Tumorsuppressorgene, deren Rolle schon in anderen soliden Tumoren beschrieben wurde und an dieser Stelle exemplarisch vorgestellt werden sollen.

In 40% des Tumorkollektivs fand sich eine Kopienzahlvervielfältigung in der Region 8q21, in der das Onkogen *Lyn* lokalisiert ist. *Lyn* gehört zur Familie der Src-Tyrosinkinasen, die als Enzyme an verschiedenen zellulären Signalprozessen wie Zellwachstum- und Differenzierung beteiligt sind (117). Eine erhöhte Expression von *Lyn* wurde schon in primären Prostatakarzinomen sowie in Prostatakarzinom Zelllinien beobachtet (118). Hierbei führte die Blockade von *Lyn* durch einen kompetitiven Inhibitor zu einer verringerten Proliferation der entsprechenden Zelllinien *in vitro* sowie bei Prostatakarzinom-tragenden Mäusen (118). Des Weiteren wiesen Sutton et al., 2013 eine Aktivierung der *EGFR*-vermittelten Signalkaskade durch erhöhte *Lyn* Aktivität in Zelllinien von Lungen-Adenokarzinomen nach (119). Durch eine Ausschaltung von *Lyn* mittels interferierender siRNA ließ sich in dieser Studie eine Verminderung der *EGFR* Aktivierung erreichen.

Wie *Lyn* spielt das *Fibroblast Growth Factor (FGF19)* Gen, bei dem in 20% der untersuchten Cholangiokarzinome eine Amplifikation detektiert wurde, eine entscheidende Rolle bei zellaktivitätskontrollierenden Prozessen (120). In hepatozellulären Karzinomen fanden Sawey et al., 2011 wie auch in der vorliegenden Arbeit eine Ko-Amplifikation von *FGF19* neben *CCND1*, welches schon zuvor als ein wichtiges Onkogen bekannt war (121). Hierbei konnte bei Tumor-injizierten Mäusen durch die Gabe eines FGF19 neutralisierenden Antikörpers eine beeindruckende Inhibition des Tumorwachstums erreicht werden. Somit wurde FGF19 als mögliches Zielprotein einer „gene-targeted“ Therapie in hepatozellulären Karzinomen charakterisiert.

Anders als die zuvor durch die beschriebenen Zielgene kodierten Proteine gehört Growth Factor Receptor Bound Protein 7 (*Grb7*) zur Gruppe der Adaptoren (122). Obwohl diese Proteine keine eigene Enzymaktivität besitzen, beeinflussen sie die interzellulären Transduktionsprozesse durch Veränderungen des Konformationszustandes von Komponenten verschiedener Signalkaskaden. Eine Beteiligung von *GRB7* an der Kanzerogenese wurde unter anderem für das Mammakarzinom beschrieben (123), bei dem eine Überexpression von *GRB7* mit vermehrter Genexpression von *ERBB2* einhergeht (124). So konnte auch in der vorliegenden Analyse mittels GISTIC eine Vervielfältigung der DNA-Kopienzahl der Genregion, die sowohl *GRB7* als auch *ERBB2* umfasst, nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Ko-Amplifikation der beiden Gene

schlagen Nadler et al., 2010 eine Inhibition der beiden Moleküle als Therapiestrategie für *HER2-neu* positive Mammakarzinome vor (125).

Als weiteres Zielgen, welches in der Untersuchung von Copy Number Variationen im vorliegenden Tumorkollektiv eine Amplifikation zeigte, wurde das *PTPN1* identifiziert. Die Assoziation zwischen erhöhter Genexpression von *PTPN1* sowie *ERBB2* in Mammakarzinomen ließ eine Interaktion beider Gene an der Tumorigenese vermuten (126). Dazu passend fanden Julien et al., 2007, dass die Inhibition von *PTPN1* in einem Mausmodell mit einem *ERBB2*-aktivierten Mammakarzinom die Tumorprogression verlangsamte und vor Lungenmetastasen schützte (127).

Neben den vorgestellten, zum ersten Mal in Cholangiokarzinomen identifizierten Veränderungen in Onkogenen, ließen sich auch Verluste in Regionen mit Tumorsuppressorgenen nachweisen.

So wurde in 80% des untersuchten Tumorkollektivs eine Deletion im Locus 9q32-33 detektiert. Das dort lokalisierte Gen wurde entsprechend der Erstbeschreibung in Urothelkarzinomen *Deleted in Bladder Cancer 1 (DBC1)* Gen genannt (128). Neben den zunächst beobachteten Verlusten in diesem Gen wurden auch Promotor Hypermethylierungen als Ursache für ein Gene Silencing des *DBC1* beobachtet (129). Auch in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen wurden diese beiden Mechanismen als die 2-Hits des Loss of Heterozygosity (LOH) des *DBC1* identifiziert. Hierbei scheinen die beschriebenen Prozesse zu einem Verlust der Zellzyklus-kontrollierenden Eigenschaften in der G1 Phase von *DBC1* zu führen (130). Zuletzt zeigten Shim et al., 2013 eine starke Assoziation zwischen einer verminderten *DBC1* Expression und einer schlechten Prognose in nicht-invasiven Urothelkarzinomen. Auf Grund dieser Tatsache wird *DBC1* als nützlicher prognostischer Faktor zur individualisierten Therapieentscheidung in diesen Tumoren vorgeschlagen (131).

Das in bis zu 70% der analysierten Cholangiokarzinome deletierte *Fragile Histidine Triad* Gen (*FHIT*) stellt ein Tumorsuppressorgen dar, dessen Verlust als „Genome Caretaker“ zu globaler genomischer Instabilität führt (132). Als Folge dieses Ausfalls entstehen spontane Einzel- und Doppelstrangbrüche aufgrund der fehlenden Stabilisierung der Replikationsgabel durch die enzymatische Aktivität von *FHIT* (133). Des Weiteren beschrieben Suh et al., 2014 den Mechanismus, durch den *FHIT* im physiologischen Zustand eine Tumormetastasierung in Lungenkarzinomen durch eine Modulation von

micro-RNAs supprimiert. Damit wurde der frühe Verlust von *FHIT* als entscheidender Vorgang im Rahmen der Tumor- und Metastasenprogression identifiziert (134), welches dadurch ein mögliches therapeutisches Zielmolekül in fortgeschrittenen Lungenkarzinomen darstellt.

Ein weiteres durch den GISTIC Algorithmus identifiziertes Gen wird als *Protein phosphatase 2, regulatory subunit B, alpha (PPP2R2A)* bezeichnet. Hierbei handelt es sich um ein von diesem Gen kodiertes Enzym, welches zur Familie der Serin-Threonin Phosphatasen gehört (135). Durch eine Phosphorylierung hält PPP2R2A Proteine in einem aktiven Zustand, die an DNA Reparaturmechanismen beteiligt sind (136). Durch diese Funktion wirkt es als Tumorsuppressorgen, dessen Verlust zur Tumorentwicklung in unterschiedlichen epithelialen Zellen beiträgt. So zeigte sich in einer Studie von Cheng et al., 2011 eine Deletion der entsprechenden chromosomalen Region 8p21 in über 60% eines großen Prostatakarzinom-Kollektivs, die jedoch nur in wenigen Fällen beide Allele betraf und keine somatische Mutationen im *PPP2R2A* aufwies (137). Auch in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen wurde eine Down-Regulierung der Expression ohne kompletten Verlust von *PPP2R2A* beobachtet (136). Dies deutet auf eine Haploinsuffizienz von *PPP2R2A* hin, bei der der Verlust eines Allels zu einer Aktivierung des Tumorsuppressorgens ausreicht (138).

5.3 Verifikation von Copy Number Aberrationen innerhalb GISTIC definierter Zielgene mittels Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH), Real-Time PCR und Immunohistochemie

Nach der Identifikation potentieller neuer Zielgene mittels des GISTIC Algorithmus innerhalb der signifikanten Copy Number Aberrationen wurden die entdeckten chromosomalen Veränderungen mit weiteren molekulargenetischen Methoden verifiziert. Mit der FISH-Methode ließen sich die Deletionen in den Zielgenen weitestgehend belegen. Allerdings konnten die durch die Molecular Inversion Probe Technologie identifizierten Amplifikationen nur bedingt mit der FISH nachgewiesen werden (**Tabelle 4-2**). In den meisten Fällen wurde im Rahmen der Untersuchung, neben der Amplifikation des Zielgens in einigen Fällen, eine Polysomie des betroffenen Chromosoms anstelle einer Amplifikation einer Genregion gesehen. Eine mögliche Erklärung für diese Feststellung liegt in der Komplexität der chromosomalen Veränderungen im Tumor und

der Schwierigkeit diesen entsprechend zu analysieren. Vor allem die Durchmischung des untersuchten Gewebes mit nicht-Tumorzellen erschwert die Interpretation der Ergebnisse. Denn tatsächlich kann die Software Nexus Copy Number eine Tetraploidie der Tumorzellen ohne vorherige Normalisierung des Aneuploidie-Status als Amplifikation deuten. Um den Aneuploidie-Status als auch die Kontamination des Tumorgewebes mit nicht-Tumorzellen bei den Analysen mit Nexus Copy Number einzubeziehen, sollte in Zukunft ein Algorithmus wie zum Beispiel der von Oros et al., 2013 (139) präsentierte ASCAT verwendet werden. Dazu bedarf es einer matched-paired Analyse, bei der neben dem Tumorgewebe auch passendes Normalgewebe des Patienten, welches in der vorliegenden Untersuchung leider nicht zur Verfügung stand, zusammen mit der MIP SNP Technologie untersucht wird.

Auch die Ergebnisse der Real-Time PCR decken sich weitgehend mit den zu erwartenden Veränderungen in den Zielgenen, welche durch die Molecular Inversion Probe Technologie gefunden wurden (**Abbildung 4-3**). In den Kandidatengenen, in denen ein Copy Number Verlust in dem Oncoscan Microarray gesehen wurde, ließ sich global gesehen eine verminderte Genexpression des Zielgens in der Real-Time PCR nachweisen. Die Expression war somit in der Mehrzahl der untersuchten Fälle entsprechend den Ergebnissen des Microarrays erniedrigt. Auf der anderen Seite wurde in den Kandidatengenen, in denen ein Copy Number Gewinn identifiziert wurde, eine erhöhte Genexpression nachgewiesen. Im Falle von *FGF19*, bei dem mit der MIP SNP Methode eine Amplifikation festgestellt wurde, ließ sich aber keine erhöhte Genexpression nachweisen. Interessanterweise wurde diese Beobachtung sowohl in Brust- und Lungenkrebs als auch in Melanomen beschrieben. Eine Amplifikation von *FGF19* in hepatozellulären Karzinomen führte dagegen zu einer relevanten Genexpression und Karzinogenese (121).

Nachdem die Copy Number Aberrationen innerhalb der GISTIC definierten Zielgene mittels FISH und qPCR verifiziert wurden, sollte mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen untersucht werden, ob es auch zur Expression der jeweiligen Proteine kommt.

Der angestrebte Nachweis eines erhöhten oder erniedrigten Proteinproduktes in Fällen einer Amplifikation oder Deletion ließ sich jedoch immunhistochemisch in keinem der kodierenden Zielgene bis auf *ERBB2* erzielen. Dies deutet auf weitere, komplexere Regulationsmechanismen hin, die die Proteinexpression der jeweils dafür kodierten

Zielgene steuern. Nur bei *ERBB2* zeigte sich eine Korrelation zwischen Fällen mit Veränderungen, welche mit Nexus Copy Number identifiziert wurden, und den Immunfärbungen (**Abbildung 4-4, Tabelle 4-3**). Hierbei führte eine Amplifikation oder höhergradige Polysomie der Region 17q12 zu einer Anreicherung des Proteinproduktes mit Darstellung einer intensiven membranständigen Färbung bei der immunohistochemischen Untersuchung. Entsprechende Ergebnisse einer ErbB2 Überexpression in Cholangiokarzinomen wurde schon zuvor von anderen Gruppen beobachtet (140). Die Amplifikation dieses Gens wurde vor allem in Mammakarzinomen schon intensiv beschrieben, bei denen der ErbB2 (Her2/neu) Status eine weitreichende klinisch-therapeutische Rolle spielt (141). Hier erfolgt neben weiteren molekularen Untersuchungen in der Routineaufarbeitung einer Biopsie oder eines Resektats eine Untersuchung auf eine Amplifikation des *ERBB2* mittels Immunhistochemie und In-Situ-Hybridisierung. Dies dient einerseits zur Einteilung des Tumors in eine Prognose bestimmende Gruppe als auch zur Vorbereitung einer personalisierten Therapieplanung (141). Bei Patientinnen mit einer Amplifikation von *ERBB2* konnte durch eine gezielte Therapie mit einem *ERBB2*-Blocker (Trastuzumab) in Kombination mit weiterer Chemotherapie das Risiko des Wiederauftretens des Tumors nach Resektion um die Hälfte gegenüber einer alleinigen Chemotherapie gesenkt werden (141).

Interessanterweise wird auch beim Mammakarzinom die Auswirkung einer Amplifikation im *ERBB2* Gen und dessen Polysomie auf die Pathogenese des Tumors diskutiert. Noch immer bleibt es offen, ob die Fälle mit einer Polysomie dem gleichen Therapieregime wie die mit einer Amplifikation unterworfen werden sollen (142, 143). Obwohl eine Überexpression von ErbB2 in cholangiozellulären Karzinomen schon zuvor in mehreren Studien (48) festgestellt wurde, fehlen bislang vergleichsweise differenzierte Untersuchungen, die sowohl immunhistochemisch als auch per FISH, unter Berücksichtigung des Unterschiedes zwischen Amplifikation und Polysomie von Chromosom 17, den ErbB2 Status bestimmen. Insbesondere vor dem Hintergrund einer neuen molekularen Subklassifizierung des Cholangiokarzinoms durch Andersen et al., 2012 (52), im Rahmen derer eine Gruppe von Cholangiokarzinomen geprägt von einer *EGFR* und *ERBB2* Aktivierung identifiziert wurde, bekommt eine derartige Untersuchung einen besonderen Stellenwert. So weist Andersen et al., 2012 nach dem erfolgreichen Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren an Cholangiokarzinom-Zelllinien mit aktiviertem *EGFR* und *ERBB2* Signalweg auf einen möglichen Einsatz von Lapatinib bei Patienten

mit der entsprechenden molekulargenetischen Veränderungen hin. Zuvor hatten schon Zhang et al., 2010 eine Suppression des Tumorwachstums durch Applikation von Lapatinib von Cholangiokarzinom-Zelllinien und Tumor-injizierten Rattenmodellen demonstriert (144). Trotz dieser erfolgsversprechenden experimentellen Ergebnisse finden sich kaum publizierte klinische Studien, die einen Therapieversuch in Cholangiokarzinomen mit einem dualen *EGFR* und *ERBB2* Inhibitor anwenden. In einer Phase II Studie des California Consortiums wurde eine fehlende Ansprache auf eine Therapie mit Lapatinib bei Patienten mit fortgeschrittenem Tumoren des Gallentraktes und hepatozellulären Karzinomen festgestellt (145). Jedoch wurde zuvor keine Bestimmung des ErbB2 (Her2/neu) Status durchgeführt. Im Rahmen eines Fallreports berichtet Law et al., 2012 hingegen von einer beeindruckenden Metastasenregression eines pulmonal gestreuten Cholangiokarzinoms nach einer Therapie mit Trastuzumab bei einer Patientin mit positivem ErbB2 (Her2/neu) Status (146).

5.4 Detektion molekularpathologischer Unterschiede zwischen intra- und extrahepatischen Cholangiokarzinomen

Cholangiokarzinome werden basierend auf ihrer anatomischen Lokalisation in einen intra- und einen extrahepatischen Subtyp eingeteilt. Allein aufgrund unterschiedlicher Auftretenswahrscheinlichkeiten und der Feststellung verschiedener Risikofaktoren wurde eine subtypspezifische molekularpathologische Ätiologie des Cholangiokarzinoms vermutet (25, 41). Diese Annahme konnte dann durch vergleichende Untersuchungen des Mutations- und Methylierungsstatus sowie mit Hilfe immunhistochemischer Marker in den beiden Tumortypen bestätigt werden (66, 73, 89)

Bis jetzt führten nur McKay et., 2011 eine Studie bezüglich der Copy Number Aberrationen sowohl in intra- als auch extrahepatischen Cholangiokarzinomen durch, während andere Untersuchungen nur einen Subtyp des Gallengangskarzinoms (Rijken et al., 1999 (147), Uhm et al., 2005 Lee et al., 2004, Sia et al., 2013) untersuchten oder Cholangiokarzinome mit hepatozellulären Karzinomen (Koo et al., 2001, Homayounfar et al., 2009) oder mit anderen gastrointestinalen Neoplasien verglichen (Shiraishi et al., 2001 (148)).

Die vorliegende Untersuchung zeigt zum ersten Mal Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen intra- und extrahepatischen Cholangiokarzinomen bezüglich Veränderungen

der DNA-Kopienzahlen mit Hilfe der Molecular Inversion Probe Methode. Mittels der statistischen Analyse durch die Nexus Copy Number Software wurden in mehreren Regionen signifikante Unterschiede zwischen intra- und extrahepatischen Cholangiokarzinomen hinsichtlich der Copy Number Variationen festgestellt (**Abbildung 4-5**). Schon im Rahmen der Auswahl der Fälle für die MIP SNP Methode, fiel die unterschiedliche histologische Ausprägung der Tumoren auf. Während die intrahepatischen Karzinome eine solide Tumormasse bilden, zeigt der extrahepatische Subtyp drüsenartige Formationen, welche in vereinzelt Gruppen das Gewebe infiltrieren. Dementsprechend sank die Ausbeute des Tumorgewebes bei der Aufarbeitung aus dem Formalin-fixierten Material. Um dieser Tatsache bei der Analyse der MIP SNP Daten mittels Nexus Copy Number Rechnung zu tragen, wurde bei den extrahepatischen Proben der Threshold/Schwellenwert zur Erkennung von Copy Number Aberrationen herabgesetzt. Nichtsdestotrotz spielte die Kontamination mit nicht-Tumorzellen wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle in der Akquirierung der Copy Number Veränderungen, da das Copy Number Muster des nicht pathologischen Gallengangsgewebes kaum Copy Number Aberrationen aufwies (**Abbildung 4-1**).

Schon McKay et al., 2011 beobachteten, dass Copy Number Gewinne als auch Verluste in intrahepatischen cholangiozellulären Karzinomen häufiger auftraten als in extrahepatischen Cholangiokarzinomen. Dennoch seien diese Unterschiede nicht signifikant genug, um als Subtypen-spezifisches Merkmal innerhalb des Pre-Screenings für eine gezielte molekulare Therapie zu dienen.

Im Gegensatz dazu zeigen die vorliegenden Ergebnisse signifikante Unterschiede zwischen den beiden Subtypen bezüglich der Copy Number Aberrationen in mindestens 2 größeren chromosomalen Abschnitten. Dennoch bedarf es weiterer Analysen, um die in den identifizierten Regionen lokalisierten Gene auf molekularpathologische Mechanismen zu untersuchen und Unterschiede in der Karzinogenese dieser Subtypen weiter zu differenzieren.

Die These von einer unterschiedlichen molekularen Genese der cholangiozellulären Subtypen wird von Borger et al., 2012 gestützt, die schon Unterschiede zwischen intra- und extrahepatischen Cholangiokarzinomen bezüglich somatischen Mutationen wie *IDH-1/2* und *KRAS* zeigten und somit neue Zielgene für eine spezifische molekulare Therapie

eröffneten. Zur Stärkung und Bestätigung dieser These wurde auch im Rahmen dieser Arbeit eine Mutationsanalyse von *IDH-1/2* durchgeführt.

Die Sequenzierungsanalyse von 60 Cholangiokarzinomen (26 intrahepatische und 34 extrahepatische) zeigte in 5 (8%) Fällen eine relevante somatische Mutation in den *IDH*-Genen in den bekannten Hotspotregionen, welche 3 Veränderungen im *IDH-1*-Gen im Codon 132 und 2 Basensubstitution im Codon 172 des *IDH-2*-Gens umfassten (**Abbildung 4-6**). Somit konnte in der vorliegenden kleinen Kohorte die Ergebnisse von Kipp et al., 2011 (68) und Wang et al., 2012 (69) bestätigt werden, welche zum ersten Mal die Mutationen in den *IDH*-Genen in cholangiozellulären Karzinomen mit einer Frequenz von 21-25% beschrieben haben. Dadurch wird in dem vorliegenden westeuropäischen Kollektiv eine niedrigere Auftretshäufigkeit der Mutation als in der kaukasischen Gruppe der Patienten der amerikanischen Studien gesehen.

Durch das Mutationsscreening in den *IDH*-Genen lässt sich zusätzlich eine Subgruppe der Tumoren definieren, welche durch histologische Unterschiede, eine erhöhte DNA Methylierung und eine verlängerte Zeit bis Wiederauftreten des Tumors nach Resektion im Vergleich zu nicht *IDH*-mutierten Cholangiokarzinomen charakterisiert sind (67). Durch diese Eigenschaften zeigen sich Parallelen der Tumorpathologie, welche zunächst in Glioblastomen beschrieben wurden (149), und somit eine Auswirkung auf die klinische Einschätzung des Tumors besitzen. Des Weiteren beschreiben Kipp et al., 2011 die Aussicht auf eine Neuentwicklung von small-molecule Inhibitoren, welche in Zukunft im Rahmen einer Genotyp-abhängigen Behandlung als neuer Therapieansatz für diese Subgruppe von Tumoren bilden könnte.

Durch die Identifizierung eines subtypspezifischen Copy Number- und *IDH*-Mutations-Status wird die These einer unterschiedlichen molekularpathologischen Ätiologie des Cholangiokarzinoms in dieser Arbeit bestätigt. Die Ergebnisse reihen sich ein in die inzwischen aufgedeckten molekularbiologischen und epigenetischen Unterschiede zwischen intra- und extrahepatischen cholangiozellulären Karzinomen. Diese These spiegelt sich in einer Meta-Analyse von Wiggers et al., 2014 wider, die eine Übersicht über die unterschiedlichen Expressionsprofile von immunohistochemischen Markern der beiden Subtypen liefert (89). Die beschriebenen Unterschiede in der Tumorbiologie und Ätiologie könnten auf unterschiedliche Ursprungszellen als Ausgangspunkt der Karzinogenese von intra- und extrahepatischen Cholangiokarzinomen beruhen (85, 88).

Die Stratifizierung entsprechender Zellmarker dieser Ursprungszellen würde auch eine eindeutige Zuordnung zu einem Subtyp erleichtern, die zur Zeit auf Grund unterschiedlicher Definitionen, schwieriger anatomischen Zuordnung bei fortgeschrittenen Tumoren und fehlender klarer histologischer Kriterien manchmal schwerfällt (85).

Zuletzt erlaubt das Wissen um eine unterschiedliche molekulare Pathogenese der intra- und extrahepatischen Cholangiokarzinome neue Ansätze für eine differenzierte, Subtypen-gezielte Therapie.

5.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden genomweit mit Hilfe der Molecular Inversion Probe (MIP) Technologie veränderte DNA-Kopienzahlen in Cholangiokarzinomen detektiert. Innerhalb dieser Copy Number Aberrationen wurden mit Hilfe des statistischen GISTIC Algorithmus neue Zielgene identifiziert, die an der Karzinogenese des Cholangiokarzinoms beteiligt sein könnten. Deren weitere Charakterisierung zur Beschreibung ihres Einflusses auf die Tumorentstehung in Gallengangskarzinomen sollte Ziel weiterer Untersuchungen sein. Insbesondere zur Bestätigung der neu beschriebenen Tumorsuppressorgene bedarf es der Aufdeckung einer biallelischen Deletion oder zusätzlicher somatischer Mutationen, die den notwendigen "second-Hit" Mechanismus der biallelischen Inaktivierung detektieren.

Zur weiteren Untersuchung der potentiellen Zielgene bedarf es funktioneller Analysen auf Ebene von Tumorzelllinien als auch von Mausmodellen. Trotz Schwierigkeiten bei der Entwicklung und Etablierung von Tiermodellen sind inzwischen erfolgreiche Versuche mit diesen beschrieben (58).

Derartige Experimente sind auch nötig, um die entdeckten Unterschiede zwischen intra- und extrahepatischen Cholangiokarzinomen bezüglich der Copy Number Aberrationen weiter zu differenzieren. Die in diesen chromosomalen Regionen lokalisierten Gene sollten im Hinblick auf kanzerogene und funktionale Eigenschaften hin untersucht werden.

Unter den mittels GISTIC detektierten Zielgenen wurde in der vorliegenden Analyse auch das *ERBB2*-Gen untersucht. Wie schon in vorangehenden Studien (48, 52) konnte

ERBB2 als valider Marker für Cholangiokarzinome sowohl mittels MIP SNP Technologie, der FISH Analyse und immunhistochemischen Nachweis einer erhöhten Protein Expression bestätigt werden. Obwohl es inzwischen erfolgreiche experimentelle Ansätze für eine Gen-gezielte Therapie in Cholangiokarzinomen mit einem dualen *EGFR* und *ERBB2* Inhibitor gibt (52, 144), fehlen bislang klinische Studien, die den ErbB2 (Her2/neu)-Status in diesen Tumoren berücksichtigen.

Hierzu müssten histologisch neu diagnostizierte Cholangiokarzinome analog zum Vorgehen bei Mammakarzinomen immunhistochemisch auf die Expression von ErbB2 untersucht und mittels des etablierten DAKO Score quantifiziert werden. Anschließend müsste der positive ErbB2 (Her2/neu) Status mit Hilfe der FISH verifiziert werden. Daran sollte sich eine zweiarmige Studie anschließen: Im Rahmen dieser sollte ein Vergleich der Behandlungskonzepte einer konventionellen Chemotherapie gegenüber einer Chemotherapie und einem dualen Rezeptortyrosin- Kinase Inhibitor wie Lapatinib erfolgen.

Des Weiteren haben neue Studienergebnisse von Kipp et al., 2011 und Wang et al., 2012 die prognostische Rolle von des *IDH-1* und *IDH-2* Gens für das Cholangiokarzinom beschrieben. Analog zum validen Marker *ERBB2* könnte perspektivisch eine Mutationsanalyse hinsichtlich der *IDH-* Gene nach histopathologischer Standarddiagnostik eines Cholangiokarzinoms erfolgen, um Subgruppen zu identifizieren, die von einer gezielten small molecule Therapie profitieren können.

Durch diesen Einbezug neuer Ergebnisse der molekularpathologischen Analyse von Cholangiokarzinomen könnten sich somit neue Chancen für die Therapie dieser Erkrankung eröffnen.

6 Zusammenfassung

Cholangiokarzinome sind hochmaligne Tumoren, welche von einer neoplastischen Transformation des Gallengangepithels ausgehen.

Basierend auf ihrer anatomischen Lage werden die Tumoren in intrahepatische und extrahepatische Cholangiokarzinome unterteilt.

Um molekularpathologische Gemeinsamkeiten und Unterschiede hinsichtlich chromosomaler Veränderungen wie DNA-Gewinne (Amplifikationen) und DNA-Verluste (Deletionen) in beiden Subtypen zu untersuchen, erfolgte eine genomweite Analyse von Copy Number Variationen (CNVs) mit Hilfe der Molecular Inversion Probe (MIP)-Technologie (OncoScanTM; Affymetrix) an einem Tumorkollektiv von 24 (13 intrahepatische und 11 extrahepatische Tumoren) humanen Cholangiokarzinomen.

In den beiden Subtypen des Cholangiokarzinoms wurden die häufigsten DNA-Verluste auf Chromosom 1p, 3p, 6q und 9 detektiert, während die DNA-Gewinne hauptsächlich auf Chromosom 1q, 8q, 17 und 20 lokalisiert waren.

Mit dem statistischen Algorithmus **Genomic Identification of Significant Targets In Cancer** (GISTIC) konnten innerhalb der zuvor identifizierten Copy Number Aberrationen funktionell signifikante Regionen mit Zielgenen identifiziert werden, die von den entscheidenden genomischen Veränderungen betroffen waren. In den mit GISTIC definierten potentiellen Tumorsuppressor- (*DBC1*, *FHIT*, *PPP2R2A*) und Onkogenen (*LYN*, *FGF19*, *GRB7*, *PTPN1*) wurden daraufhin die chromosomalen Veränderungen mit weiteren molekulargenetischen und immunhistochemischen Methoden verifiziert.

Neben den gemeinsamen Veränderungen in der DNA-Kopienzahl ließen sich auch signifikante Unterschiede bei den beiden Subtypen des Cholangiokarzinoms bezüglich der Copy Number Veränderungen auf Chromosom 3 und 14 nachweisen.

Auch die These eines unterschiedlichen Mutationsprofils im *IDH-1*- und *IDH-2*-Gen in intra- und extrahepatischen Cholangiokarzinomen ließ sich im untersuchten Tumorkollektiv nachweisen, sodass die Annahme einer subtypenspezifischen molekularpathologischen Cholangiokarzinogenese in dieser Arbeit bestätigt wird.

Zusammenfassend wurden in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Molecular Inversion Probe (MIP)-Technologie Regionen chromosomaler Instabilität (Amplifikationen und Deletionen) detektiert und in diesen mittels des GISTIC Algorithmus neue potentielle

Zielgene im Cholangiokarzinom identifiziert. Zudem ließen sich Unterschiede hinsichtlich des Copy Number Variations Musters und des Mutationsprofils im *IDH*-Gen zwischen intrahepatischen und extrahepatischen Gallengangskarzinomen nachweisen, die auf eine subtypenspezifische molekulare Pathogenese des Cholangiokarzinoms hinweisen.

7 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 3-1	21
Tabelle 3-2	22
Tabelle 3-3	31
Tabelle 3-4	40
Tabelle 4-1	46
Tabelle 4-2	47
Tabelle 4-3	50
Abbildung 1-1	7
Abbildung 1-2	11
Abbildung 1-3	12
Abbildung 3-1	25
Abbildung 3-2	26
Abbildung 3-3	27
Abbildung 3-4	28
Abbildung 3-5	28
Abbildung 3-6	30
Abbildung 3-7	39
Abbildung 4-1	44
Abbildung 4-2	455
Abbildung 4-3	48
Abbildung 4-4	49
Abbildung 4-5	52
Abbildung 4-6	54

8 Literaturverzeichnis

1. Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*. 2000;21(6):167-223.
2. Coleman WB, Tsongalis GJ. Multiple mechanisms account for genomic instability and molecular mutation in neoplastic transformation. *Clinical chemistry*. 1995;41(5):644-57.
3. Anderson MW, Reynolds SH, You M, Maronpot RM. Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis. *Environmental health perspectives*. 1992;98:13-24.
4. Klein G. The approaching era of the tumor suppressor genes. *Science (New York, NY)*. 1987;238(4833):1539-45.
5. Herter-Sprue GS, Greulich H, Wong K-K. Activating mutations in ERBB2 and their impact on diagnostics and treatment. *Frontiers in Oncology*. 2013;3.
6. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nature reviews Genetics*. 2006;7(2):85-97.
7. Lupski JR. Genomic rearrangements and sporadic disease. *Nature genetics*. 2007;39(7 Suppl):S43-7.
8. Inoue K, Lupski JR. Molecular mechanisms for genomic disorders. *Annual review of genomics and human genetics*. 2002;3:199-242.
9. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nature genetics*. 1999;21(2):163-7.
10. Blechacz B, Komuta M, Roskams T, Gores GJ. Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;8(9):512-22.
11. Farges O, Fuks D, Le Treut YP, Azoulay D, Laurent A, Bachellier P, et al. AJCC 7th edition of TNM staging accurately discriminates outcomes of patients with resectable intrahepatic cholangiocarcinoma: By the AFC-IHCC-2009 study group. *Cancer*. 2011;117(10):2170-7.
12. Olnes MJ, Erlich R. A review and update on cholangiocarcinoma. *Oncology*. 2004;66(3):167-79.
13. Vauthey JN, Blumgart LH. Recent advances in the management of cholangiocarcinomas. *Seminars in liver disease*. 1994;14(2):109-14.
14. Shaib Y, El-Serag HB. The epidemiology of cholangiocarcinoma. *Seminars in liver disease*. 2004;24(2):115-25.
15. Hammill CW, Wong LL. Intrahepatic cholangiocarcinoma: a malignancy of increasing importance. *Journal of the American College of Surgeons*. 2008;207(4):594-603.
16. de Groen PC, Gores GJ, LaRusso NF, Gunderson LL, Nagorney DM. Biliary tract cancers. *The New England journal of medicine*. 1999;341(18):1368-78.
17. DeOliveira ML, Cunningham SC, Cameron JL, Kamangar F, Winter JM, Lillemoe KD, et al. Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. *Annals of surgery*. 2007;245(5):755-62.
18. Hammill CW, Wong LL. Intrahepatic Cholangiocarcinoma: A Malignancy of Increasing Importance. *Journal of the American College of Surgeons*. 2008;207(4):594-603.
19. Khan SA, Taylor-Robinson SD, Toledano MB, Beck A, Elliott P, Thomas HC. Changing international trends in mortality rates for liver, biliary and pancreatic tumours. *Journal of hepatology*. 2002;37(6):806-13.
20. Patel T. Increasing incidence and mortality of primary intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *Hepatology*. 2001;33(6):1353-7.

21. Nuzzo G, Giuliante F, Ardito F, Giovannini I. Intrahepatic cholangiocarcinoma. *Annals of surgery*. 2009;249(3):541-2; author reply 2.
22. Khan SA, Emadossadaty S, Ladep NG, Thomas HC, Elliott P, Taylor-Robinson SD, et al. Rising trends in cholangiocarcinoma: is the ICD classification system misleading us? *Journal of hepatology*. 2012;56(4):848-54.
23. Shaib YH, Davila JA, McGlynn K, El-Serag HB. Rising incidence of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a true increase? *Journal of hepatology*. 2004;40(3):472-7.
24. Wood R, Brewster DH, Fraser LA, Brown H, Hayes PC, Garden OJ. Do increases in mortality from intrahepatic cholangiocarcinoma reflect a genuine increase in risk? Insights from cancer registry data in Scotland. *European journal of cancer*. 2003;39(14):2087-92.
25. Gatto M, Bragazzi MC, Semeraro R, Napoli C, Gentile R, Torrice A, et al. Cholangiocarcinoma: update and future perspectives. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2010;42(4):253-60.
26. Yachimski P, Pratt DS. Cholangiocarcinoma: natural history, treatment, and strategies for surveillance in high-risk patients. *Journal of clinical gastroenterology*. 2008;42(2):178-90.
27. Abbas G, Lindor KD. Cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Journal of gastrointestinal cancer*. 2009;40(1-2):19-25.
28. Lazaridis KN, Gores GJ. Primary sclerosing cholangitis and cholangiocarcinoma. *Seminars in liver disease*. 2006;26(1):42-51.
29. Shin HR, Lee CU, Park HJ, Seol SY, Chung JM, Choi HC, et al. Hepatitis B and C virus, *Clonorchis sinensis* for the risk of liver cancer: a case-control study in Pusan, Korea. *International journal of epidemiology*. 1996;25(5):933-40.
30. Poomphakwaen K, Promthet S, Kamsa-Ard S, Vatanasapt P, Chaveepojnkamjorn W, Klaewkla J, et al. Risk factors for cholangiocarcinoma in Khon Kaen, Thailand: a nested case-control study. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2009;10(2):251-8.
31. Sahani D, Prasad SR, Tannabe KK, Hahn PF, Mueller PR, Saini S. Thorotrast-induced cholangiocarcinoma: case report. *Abdominal imaging*. 2003;28(1):72-4.
32. de Vries JS, de Vries S, Aronson DC, Bosman DK, Rauws EA, Bosma A, et al. Choledochal cysts: age of presentation, symptoms, and late complications related to Todani's classification. *Journal of pediatric surgery*. 2002;37(11):1568-73.
33. Chuang SC, La Vecchia C, Boffetta P. Liver cancer: descriptive epidemiology and risk factors other than HBV and HCV infection. *Cancer letters*. 2009;286(1):9-14.
34. El-Serag HB, Engels EA, Landgren O, Chiao E, Henderson L, Amaratunge HC, et al. Risk of hepatobiliary and pancreatic cancers after hepatitis C virus infection: A population-based study of U.S. veterans. *Hepatology*. 2009;49(1):116-23.
35. Tyson GL, El-Serag HB. Risk factors for cholangiocarcinoma. *Hepatology*. 2011;54(1):173-84.
36. Friman S. Cholangiocarcinoma--current treatment options. *Scandinavian journal of surgery : SJS : official organ for the Finnish Surgical Society and the Scandinavian Surgical Society*. 2011;100(1):30-4.
37. Radeleff BA, Lopez-Benitez R, Hallscheidt P, Grenacher L, Libicher M, Richter GM, et al. [Treatment of malignant biliary obstructions via the percutaneous approach]. *Der Radiologe*. 2005;45(11):1020-30.
38. Alvaro D. Serum and bile biomarkers for cholangiocarcinoma. *Current opinion in gastroenterology*. 2009;25(3):279-84.

39. Briggs CD, Neal CP, Mann CD, Steward WP, Manson MM, Berry DP. Prognostic molecular markers in cholangiocarcinoma: a systematic review. *European journal of cancer*. 2009;45(1):33-47.
40. Yamasaki S. Intrahepatic cholangiocarcinoma: macroscopic type and stage classification. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*. 2003;10(4):288-91.
41. Khan SA, Davidson BR, Goldin RD, Heaton N, Karani J, Pereira SP, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update. *Gut*. 2012;61(12):1657-69.
42. Yamashita Y, Takahashi M, Kanazawa S, Charnsangavej C, Wallace S. Hilar cholangiocarcinoma. An evaluation of subtypes with CT and angiography. *Acta radiologica (Stockholm, Sweden : 1987)*. 1992;33(4):351-5.
43. Sobin LH, Compton CC. TNM seventh edition: What's new, what's changed. *Cancer*. 2010;116(22):5336-9.
44. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology*. 2010;17(6):1471-4.
45. Nakanuma Y, Sato Y, Harada K, Sasaki M, Xu J, Ikeda H. Pathological classification of intrahepatic cholangiocarcinoma based on a new concept. *World journal of hepatology*. 2010;2(12):419-27.
46. Langer F, von Wasielewski R, Kreipe HH. [The importance of immunohistochemistry for the diagnosis of cholangiocarcinomas]. *Der Pathologe*. 2006;27(4):244-50.
47. Jaiswal M, LaRusso NF, Burgart LJ, Gores GJ. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer research*. 2000;60(1):184-90.
48. Sirica AE. Role of ErbB family receptor tyrosine kinases in intrahepatic cholangiocarcinoma. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2008;14(46):7033-58.
49. Normanno N, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, De Luca A, et al. The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview. *Current drug targets*. 2005;6(3):243-57.
50. Kiguchi K, Carbajal S, Chan K, Beltran L, Ruffino L, Shen J, et al. Constitutive expression of ErbB-2 in gallbladder epithelium results in development of adenocarcinoma. *Cancer research*. 2001;61(19):6971-6.
51. Lai GH, Zhang Z, Shen XN, Ward DJ, Dewitt JL, Holt SE, et al. erbB-2/neu transformed rat cholangiocytes recapitulate key cellular and molecular features of human bile duct cancer. *Gastroenterology*. 2005;129(6):2047-57.
52. Andersen JB, Spee B, Blechacz BR, Avital I, Komuta M, Barbour A, et al. Genomic and genetic characterization of cholangiocarcinoma identifies therapeutic targets for tyrosine kinase inhibitors. *Gastroenterology*. 2012;142(4):1021-31 e15.
53. Goldenberg D, Rosenbaum E, Argani P, Wistuba, II, Sidransky D, Thuluvath PJ, et al. The V599E BRAF mutation is uncommon in biliary tract cancers. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2004;17(11):1386-91.
54. Riener MO, Bawohl M, Clavien PA, Jochum W. Rare PIK3CA hotspot mutations in carcinomas of the biliary tract. *Genes, chromosomes & cancer*. 2008;47(5):363-7.
55. Khosravi-Far R, Der CJ. The Ras signal transduction pathway. *Cancer metastasis reviews*. 1994;13(1):67-89.
56. Xu RF, Sun JP, Zhang SR, Zhu GS, Li LB, Liao YL, et al. KRAS and PIK3CA but not BRAF genes are frequently mutated in Chinese cholangiocarcinoma patients. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2011;65(1):22-6.

57. Kubicka S, Kuhnel F, Flemming P, Hain B, Kezmic N, Rudolph KL, et al. K-ras mutations in the bile of patients with primary sclerosing cholangitis. *Gut*. 2001;48(3):403-8.
58. O'Dell MR, Huang JL, Whitney-Miller CL, Deshpande V, Rothberg P, Grose V, et al. Kras(G12D) and p53 mutation cause primary intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer research*. 2012;72(6):1557-67.
59. Hsu M, Sasaki M, Igarashi S, Sato Y, Nakanuma Y. KRAS and GNAS mutations and p53 overexpression in biliary intraepithelial neoplasia and intrahepatic cholangiocarcinomas. *Cancer*. 2013;119(9):1669-74.
60. Stiewe T. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(3):165-8.
61. Khan SA, Thomas HC, Toledano MB, Cox IJ, Taylor-Robinson SD. p53 Mutations in human cholangiocarcinoma: a review. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2005;25(4):704-16.
62. Kamikawa T, Amenomori M, Itoh T, Momoi H, Hiai H, Machinami R, et al. Analysis of genetic changes in intrahepatic cholangiocarcinoma induced by thorostrast. *Radiation research*. 1999;152(6 Suppl):S118-24.
63. Tannapfel A, Weinans L, Geissler F, Schutz A, Katalinic A, Kockerling F, et al. Mutations of p53 tumor suppressor gene, apoptosis, and proliferation in intrahepatic cholangiocellular carcinoma of the liver. *Digestive diseases and sciences*. 2000;45(2):317-24.
64. Losman JA, Kaelin WG, Jr. What a difference a hydroxyl makes: mutant IDH, (R)-2-hydroxyglutarate, and cancer. *Genes & development*. 2013;27(8):836-52.
65. Saha SK, Parachoniak CA, Ghanta KS, Fitamant J, Ross KN, Najem MS, et al. Mutant IDH inhibits HNF-4alpha to block hepatocyte differentiation and promote biliary cancer. *Nature*. 2014;513(7516):110-4.
66. Borger DR, Tanabe KK, Fan KC, Lopez HU, Fantin VR, Straley KS, et al. Frequent mutation of isocitrate dehydrogenase (IDH)1 and IDH2 in cholangiocarcinoma identified through broad-based tumor genotyping. *The oncologist*. 2012;17(1):72-9.
67. Wang P, Dong Q, Zhang C, Kuan PF, Liu Y, Jeck WR, et al. Mutations in isocitrate dehydrogenase 1 and 2 occur frequently in intrahepatic cholangiocarcinomas and share hypermethylation targets with glioblastomas. *Oncogene*. 2013;32(25):3091-100.
68. Kipp BR, Voss JS, Kerr SE, Barr Fritcher EG, Graham RP, Zhang L, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cholangiocarcinoma. *Human pathology*. 2012;43(10):1552-8.
69. Wang P, Dong Q, Zhang C, Kuan PF, Liu Y, Jeck WR, et al. Mutations in isocitrate dehydrogenase 1 and 2 occur frequently in intrahepatic cholangiocarcinomas and share hypermethylation targets with glioblastomas. *Oncogene*. 2012.
70. Kim BH, Cho NY, Choi M, Lee S, Jang JJ, Kang GH. Methylation profiles of multiple CpG island loci in extrahepatic cholangiocarcinoma versus those of intrahepatic cholangiocarcinomas. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2007;131(6):923-30.
71. Lee S, Kim WH, Jung HY, Yang MH, Kang GH. Aberrant CpG island methylation of multiple genes in intrahepatic cholangiocarcinoma. *The American journal of pathology*. 2002;161(3):1015-22.
72. Tannapfel A, Sommerer F, Benicke M, Weinans L, Katalinic A, Geissler F, et al. Genetic and epigenetic alterations of the INK4a-ARF pathway in cholangiocarcinoma. *The Journal of pathology*. 2002;197(5):624-31.

73. Yang B, House MG, Guo M, Herman JG, Clark DP. Promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2005;18(3):412-20.
74. Goeppert B, Konermann C, Schmidt CR, Bogatyrova O, Geiselhart L, Ernst C, et al. Global alterations of DNA methylation in cholangiocarcinoma target the Wnt signaling pathway. *Hepatology.* 2014;59(2):544-54.
75. Isomoto H. Epigenetic alterations in cholangiocarcinoma-sustained IL-6/STAT3 signaling in cholangio- carcinoma due to SOCS3 epigenetic silencing. *Digestion.* 2009;79 Suppl 1:2-8.
76. Chen L, Yan HX, Yang W, Hu L, Yu LX, Liu Q, et al. The role of microRNA expression pattern in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Journal of hepatology.* 2009;50(2):358-69.
77. Homayounfar K, Gunawan B, Cameron S, Haller F, Baumhoer D, Uecker S, et al. Pattern of chromosomal aberrations in primary liver cancers identified by comparative genomic hybridization. *Human pathology.* 2009;40(6):834-42.
78. Koo SH, Ihm CH, Kwon KC, Park JW, Kim JM, Kong G. Genetic alterations in hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer genetics and cytogenetics.* 2001;130(1):22-8.
79. Uhm KO, Park YN, Lee JY, Yoon DS, Park SH. Chromosomal imbalances in Korean intrahepatic cholangiocarcinoma by comparative genomic hybridization. *Cancer genetics and cytogenetics.* 2005;157(1):37-41.
80. Wong N, Li L, Tsang K, Lai PB, To KF, Johnson PJ. Frequent loss of chromosome 3p and hypermethylation of RASSF1A in cholangiocarcinoma. *Journal of hepatology.* 2002;37(5):633-9.
81. Andersen JB, Thorgeirsson SS. Genetic profiling of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Current opinion in gastroenterology.* 2012;28(3):266-72.
82. Barrett MT, Scheffer A, Ben-Dor A, Sampas N, Lipson D, Kincaid R, et al. Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(51):17765-70.
83. Sia D, Hoshida Y, Villanueva A, Roayaie S, Ferrer J, Tabak B, et al. Integrative molecular analysis of intrahepatic cholangiocarcinoma reveals 2 classes that have different outcomes. *Gastroenterology.* 2013;144(4):829-40.
84. Cardinale V, Wang Y, Carpino G, Cui CB, Gatto M, Rossi M, et al. Multipotent stem/progenitor cells in human biliary tree give rise to hepatocytes, cholangiocytes, and pancreatic islets. *Hepatology.* 2011;54(6):2159-72.
85. Cardinale V, Carpino G, Reid L, Gaudio E, Alvaro D. Multiple cells of origin in cholangiocarcinoma underlie biological, epidemiological and clinical heterogeneity. *World journal of gastrointestinal oncology.* 2012;4(5):94-102.
86. Jarnagin WR, Klimstra DS, Hezel M, Gonen M, Fong Y, Roggin K, et al. Differential cell cycle-regulatory protein expression in biliary tract adenocarcinoma: correlation with anatomic site, pathologic variables, and clinical outcome. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2006;24(7):1152-60.
87. Karamitopoulou E, Tornillo L, Zlobec I, Cioccarri L, Carafa V, Borner M, et al. Clinical significance of cell cycle- and apoptosis-related markers in biliary tract cancer: a tissue microarray-based approach revealing a distinctive immunophenotype for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinomas. *American journal of clinical pathology.* 2008;130(5):780-6.

88. Komuta M, Govaere O, Vandecaveye V, Akiba J, Van Steenberghe W, Verslype C, et al. Histological diversity in cholangiocellular carcinoma reflects the different cholangiocyte phenotypes. *Hepatology*. 2012;55(6):1876-88.
89. Wiggers JK, Ruys AT, Groot Koerkamp B, Beuers U, ten Kate FJ, van Gulik TM. Differences in immunohistochemical biomarkers between intra- and extrahepatic cholangiocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2014;29(8):1582-94.
90. McKay SC, Unger K, Pericleous S, Stamp G, Thomas G, Hutchins RR, et al. Array comparative genomic hybridization identifies novel potential therapeutic targets in cholangiocarcinoma. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*. 2011;13(5):309-19.
91. Zhu AX, Hong TS, Hezel AF, Kooby DA. Current management of gallbladder carcinoma. *The oncologist*. 2010;15(2):168-81.
92. Kondo S, Takada T, Miyazaki M, Miyakawa S, Tsukada K, Nagino M, et al. Guidelines for the management of biliary tract and ampullary carcinomas: surgical treatment. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*. 2008;15(1):41-54.
93. Nagino M, Kamiya J, Nishio H, Ebata T, Arai T, Nimura Y. Two hundred forty consecutive portal vein embolizations before extended hepatectomy for biliary cancer: surgical outcome and long-term follow-up. *Annals of surgery*. 2006;243(3):364-72.
94. Abdalla EK, Barnett CC, Doherty D, Curley SA, Vauthey JN. Extended hepatectomy in patients with hepatobiliary malignancies with and without preoperative portal vein embolization. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)*. 2002;137(6):675-80; discussion 80-1.
95. Singal A, Welling TH, Marrero JA. Role of liver transplantation in the treatment of cholangiocarcinoma. *Expert review of anticancer therapy*. 2009;9(4):491-502.
96. Gores GJ, Nagorney DM, Rosen CB. Cholangiocarcinoma: is transplantation an option? For whom? *Journal of hepatology*. 2007;47(4):455-9.
97. Kiesslich T, Wolkersdorfer G, Neureiter D, Salmhofer H, Berr F. Photodynamic therapy for non-resectable perihilar cholangiocarcinoma. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*. 2009;8(1):23-30.
98. Kameda R, Ando T, Kobayashi S, Ueno M, Ohkawa S. A retrospective study of chemotherapy with cisplatin plus gemcitabine after the failure of gemcitabine monotherapy for biliary tract cancer. *Japanese journal of clinical oncology*. 2013;43(6):636-40.
99. Valle JW, Wasan H, Johnson P, Jones E, Dixon L, Swindell R, et al. Gemcitabine alone or in combination with cisplatin in patients with advanced or metastatic cholangiocarcinomas or other biliary tract tumours: a multicentre randomised phase II study - The UK ABC-01 Study. *British journal of cancer*. 2009;101(4):621-7.
100. Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthoney A, Maraveyas A, et al. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *The New England journal of medicine*. 2010;362(14):1273-81.
101. Furuse J, Okusaka T, Bridgewater J, Taketsuna M, Wasan H, Koshiji M, et al. Lessons from the comparison of two randomized clinical trials using gemcitabine and cisplatin for advanced biliary tract cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2011;80(1):31-9.
102. Wiedmann MW, Mossner J. Molecular targeted therapy of biliary tract cancer--results of the first clinical studies. *Current drug targets*. 2010;11(7):834-50.

103. Wang Y, Cottman M, Schiffman JD. Molecular inversion probes: a novel microarray technology and its application in cancer research. *Cancer genetics*. 2012;205(7-8):341-55.
104. Wang Y, Moorhead M, Karlin-Neumann G, Falkowski M, Chen C, Siddiqui F, et al. Allele quantification using molecular inversion probes (MIP). *Nucleic acids research*. 2005;33(21):e183.
105. Hardenbol P, Baner J, Jain M, Nilsson M, Namsaraev EA, Karlin-Neumann GA, et al. Multiplexed genotyping with sequence-tagged molecular inversion probes. *Nature biotechnology*. 2003;21(6):673-8.
106. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology*. 1992;24:104-8.
107. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(12):5463-7.
108. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
109. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols*. 2008;3(6):1101-8.
110. Krenn V, Petersen I, Haupt T, Koepenik A, Blind C, Dietel M, et al. Array technology and proteomics in autoimmune diseases. *Pathology, research and practice*. 2004;200(2):95-103.
111. Beroukhim R, Getz G, Nghiemphu L, Barretina J, Hsueh T, Linhart D, et al. Assessing the significance of chromosomal aberrations in cancer: methodology and application to glioma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(50):20007-12.
112. Vogel A, Wege H, Caca K, Nashan B, Neumann U. The diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma. *Deutsches Arzteblatt international*. 2014;111(44):748-54.
113. Borad MJ, Champion MD, Egan JB, Liang WS, Fonseca R, Bryce AH, et al. Integrated genomic characterization reveals novel, therapeutically relevant drug targets in FGFR and EGFR pathways in sporadic intrahepatic cholangiocarcinoma. *PLoS genetics*. 2014;10(2):e1004135.
114. Lee JY, Park YN, Uhm KO, Park SY, Park SH. Genetic alterations in intrahepatic cholangiocarcinoma as revealed by degenerate oligonucleotide primed PCR-comparative genomic hybridization. *Journal of Korean medical science*. 2004;19(5):682-7.
115. Frankel A, Armour N, Nancarrow D, Krause L, Hayward N, Lampe G, et al. Genome-wide analysis of esophageal adenocarcinoma yields specific copy number aberrations that correlate with prognosis. *Genes, chromosomes & cancer*. 2014;53(4):324-38.
116. Xie T, G DA, Lamb JR, Martin E, Wang K, Tejpar S, et al. A comprehensive characterization of genome-wide copy number aberrations in colorectal cancer reveals novel oncogenes and patterns of alterations. *PLoS One*. 2012;7(7):e42001.
117. Ingle E. Functions of the Lyn tyrosine kinase in health and disease. *Cell communication and signaling : CCS*. 2012;10(1):21.
118. Goldenberg-Furmanov M, Stein I, Pikarsky E, Rubin H, Kasem S, Wygoda M, et al. Lyn is a target gene for prostate cancer: sequence-based inhibition induces regression of human tumor xenografts. *Cancer research*. 2004;64(3):1058-66.
119. Sutton P, Borgia JA, Bonomi P, Plate JM. Lyn, a Src family kinase, regulates activation of epidermal growth factor receptors in lung adenocarcinoma cells. *Molecular cancer*. 2013;12:76.

120. Miura S, Mitsuhashi N, Shimizu H, Kimura F, Yoshidome H, Otsuka M, et al. Fibroblast growth factor 19 expression correlates with tumor progression and poorer prognosis of hepatocellular carcinoma. *BMC cancer*. 2012;12:56.
121. Sawey ET, Chanrion M, Cai C, Wu G, Zhang J, Zender L, et al. Identification of a therapeutic strategy targeting amplified FGF19 in liver cancer by Oncogenomic screening. *Cancer cell*. 2011;19(3):347-58.
122. Lucas-Fernandez E, Garcia-Palmero I, Villalobo A. Genomic organization and control of the *grb7* gene family. *Current genomics*. 2008;9(1):60-8.
123. Kauraniemi P, Barlund M, Monni O, Kallioniemi A. New amplified and highly expressed genes discovered in the ERBB2 amplicon in breast cancer by cDNA microarrays. *Cancer research*. 2001;61(22):8235-40.
124. Bieche I, Onody P, Tozlu S, Driouch K, Vidaud M, Lidereau R. Prognostic value of ERBB family mRNA expression in breast carcinomas. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2003;106(5):758-65.
125. Nadler Y, Gonzalez AM, Camp RL, Rimm DL, Kluger HM, Kluger Y. Growth factor receptor-bound protein-7 (Grb7) as a prognostic marker and therapeutic target in breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2010;21(3):466-73.
126. Wiener JR, Kerns BJ, Harvey EL, Conaway MR, Iglehart JD, Berchuck A, et al. Overexpression of the protein tyrosine phosphatase PTP1B in human breast cancer: association with p185c-erbB-2 protein expression. *Journal of the National Cancer Institute*. 1994;86(5):372-8.
127. Julien SG, Dube N, Read M, Penney J, Paquet M, Han Y, et al. Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis. *Nature genetics*. 2007;39(3):338-46.
128. Habuchi T, Yoshida O, Knowles MA. A novel candidate tumour suppressor locus at 9q32-33 in bladder cancer: localization of the candidate region within a single 840 kb YAC. *Human molecular genetics*. 1997;6(6):913-9.
129. Habuchi T, Takahashi T, Kakinuma H, Wang L, Tsuchiya N, Satoh S, et al. Hypermethylation at 9q32-33 tumour suppressor region is age-related in normal urothelium and an early and frequent alteration in bladder cancer. *Oncogene*. 2001;20(4):531-7.
130. Nishiyama H, Gill JH, Pitt E, Kennedy W, Knowles MA. Negative regulation of G(1)/S transition by the candidate bladder tumour suppressor gene DBCCR1. *Oncogene*. 2001;20(23):2956-64.
131. Shim UJ, Lee IS, Kang HW, Kim J, Kim WT, Kim IY, et al. Decreased DBC1 Expression Is Associated With Poor Prognosis in Patients With Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Korean journal of urology*. 2013;54(9):631-7.
132. Saldivar JC, Miura S, Bene J, Hosseini SA, Shibata H, Sun J, et al. Initiation of Genome Instability and Preneoplastic Processes through Loss of Fhit Expression. *PLoS Genetics*. 2012;8(11):e1003077.
133. Waters CE, Saldivar JC, Hosseini SA, Huebner K. The FHIT gene product: tumor suppressor and genome "caretaker". *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2014;71(23):4577-87.
134. Suh S-S, Yoo JY, Cui R, Kaur B, Huebner K, Lee T-K, et al. FHIT Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Metastasis in Lung Cancer through Modulation of MicroRNAs. *PLoS Genetics*. 2014;10(10):e1004652.
135. Eichhorn PJA, Creyghton MP, Bernards R. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2009;1795(1):1-15.

136. Kalev P, Simicek M, Vazquez I, Munck S, Chen L, Soin T, et al. Loss of PPP2R2A inhibits homologous recombination DNA repair and predicts tumor sensitivity to PARP inhibition. *Cancer research*. 2012;72(24):6414-24.
137. Cheng Y, Liu W, Kim ST, Sun J, Lu L, Sun J, et al. Evaluation of PPP2R2A as a prostate cancer susceptibility gene: a comprehensive germline and somatic study. *Cancer genetics*. 2011;204(7):375-81.
138. Westermarck J, Hahn WC. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends in molecular medicine*. 2008;14(4):152-60.
139. Oros KK, Arcand SL, Bayani J, Squire JA, Mes-Masson AM, Tonin PN, et al. Analysis of genomic abnormalities in tumors: a review of available methods for Illumina two-color SNP genotyping and evaluation of performance. *Cancer genetics*. 2013.
140. Ukita Y, Kato M, Terada T. Gene amplification and mRNA and protein overexpression of c-erbB-2 (HER-2/neu) in human intrahepatic cholangiocarcinoma as detected by fluorescence in situ hybridization, in situ hybridization, and immunohistochemistry. *Journal of Hepatology*. 2002;36(6):780-5.
141. Senkus E, Kyriakides S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Thompson A, Zackrisson S, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2013;24 Suppl 6:vi7-23.
142. Rosenberg CL. Polysomy 17 and HER-2 amplification: true, true, and unrelated. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(30):4856-8.
143. Vanden Bempt I, Van Loo P, Drijkoningen M, Neven P, Smeets A, Christiaens MR, et al. Polysomy 17 in breast cancer: clinicopathologic significance and impact on HER-2 testing. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(30):4869-74.
144. Zhang Z, Oyesanya RA, Campbell DJW, Almenara JA, DeWitt JL, Sirica AE. Preclinical assessment of simultaneous targeting of epidermal growth factor receptor (ErbB1) and ErbB2 as a strategy for cholangiocarcinoma therapy. *Hepatology*. 2010;52(3):975-86.
145. Ramanathan RK, Belani CP, Singh DA, Tanaka M, Lenz HJ, Yen Y, et al. A phase II study of lapatinib in patients with advanced biliary tree and hepatocellular cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2009;64(4):777-83.
146. Law LY. Dramatic response to trastuzumab and paclitaxel in a patient with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic cholangiocarcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(27):e271-3.
147. Rijken AM, Hu J, Perlman EJ, Morsberger LA, Long P, Kern SE, et al. Genomic alterations in distal bile duct carcinoma by comparative genomic hybridization and karyotype analysis. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 1999;26(3):185-91.
148. Shiraishi K, Okita K, Kusano N, Harada T, Kondoh S, Okita S, et al. A comparison of DNA copy number changes detected by comparative genomic hybridization in malignancies of the liver, biliary tract and pancreas. *Oncology*. 2001;60(2):151-61.
149. Sturm D, Witt H, Hovestadt V, Khuong-Quang DA, Jones DT, Konermann C, et al. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer cell*. 2012;22(4):425-37.

9 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Alexander Arnold, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema "Genomweite molekulargenetische Untersuchung von DNA Copy Number Variations (CNVs) in cholangiozellulären Karzinomen" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst."

Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Arnold A, Bahra M, Lenze D, Bradtmöller M, Guse K, Gehlhaar C, Bläker H, Heppner FL, Koch A. Genome wide DNA copy number analysis in cholangiocarcinoma using high resolution molecular inversion probe single nucleotide polymorphism assay.

Exp Mol Pathol. 2015 Oct; 99(2):344-53. doi: 10.1016/j.yexmp.2015.08.003. Epub 2015 Aug 8.

Impact Factor 2,706. Anteil: Planung und Durchführung der Messungen, Datenauswertung, Erstellung der Abbildungen, Verfassen des Manuskripts.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

10 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11 Danksagung

Professor Dr. Frank Heppner danke ich für die Möglichkeit meine Dissertation am Institut für Neuropathologie, Charité Universitätsmedizin Berlin anfertigen zu dürfen. Darüber hinaus möchte ich mich für die konstruktive Diskussion meiner Ergebnisse und für die hervorragende Kooperation bedanken.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Privatdozent Dr. Arend Koch für die wissenschaftliche Betreuung der Promotionsarbeit, die vor Jahren mit einer Hausarbeit zum Thema „Molekulargenetische Untersuchung des β -Catenin Entwicklungskontroll-Signals in cholangiozellulären Karzinomen“ begonnen hat. Vor allem möchte ich für die Zeit des gemeinsamen Mikroskopierens danken, die meine Begeisterung für das Fach Pathologie geweckt und maßgeblich meine Berufsentscheidung geprägt hat.

Ich danke allen Labor-Mitarbeitern des Instituts für Neuropathologie für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre, insbesondere Katrin Guse, Claire Gehlhaar, Alexandra Döser und Maren Bradtmöller. Ein großes Dankeschön auch an Petra Matylewski und das gesamte Team in der neuropathologischen Diagnostik.

Mein Dank gilt auch meinen Eltern und meinem Bruder für den steten Rückhalt.

Ich möchte mich auch bei Alicia für die Unterstützung auf der Zielgeraden dieser Arbeit bedanken.

12 Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
α KG	α -Ketoglutarat
AJCC	American Joint Cancer Committee
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
ASCAT	Allele-specific copy number analysis of tumors
BRAF	B-Raf proto-oncogene
°C	Grad Celsius
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CA-125	Cancer-Antigen 125
CCC	cholangiozelluläres Karzinom, Cholangiokarzinom
CCND1	Cyclin D1
cDNA	complementary DNA, deutsch: komplementäre DNS
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CD7	Cluster of Differentiation 7
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CDKN2B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B
CDX2	Caudal type homeobox 2
CGH	Comparative Genomics Hybridization
CK7	Cytokeratin-7
CK17	Cytokeratin-17
CT	Computertomographie
CT	Threshold cycle
CNV	Copy Number Variation

DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DNAse	Desoxyribonuklease
DNA	Deoxyribonucleic acid, deutsch: Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERBB1	Erb-b2 receptor tyrosine kinase 1
ERBB2	Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
FFPE	Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, deutsch: Formalin-fixierte Paraffinprobe
FGF19	Fibroblast growth factor 19
FHIT	Fragile histidine triad
FISH	Fluoreszenz-in-Situ Hybridisierung
g	Gramm
gDNA	genomic Deoxyribonucleic acid, deutsch: genomische Desoxyribonukleinsäure
GISTIC	Genomic Identification of Significant Targets In Cancer
GRB7	Growth factor receptor-bound protein 7
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
IDH1	Isocitrate dehydrogenase 1
IDH2	Isocitrate dehydrogenase 2
IL-6	Interleukin-6
k	Kilo

kb	Kilobase
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
l	Liter
LCSGJ	Liver Cancer Study Group of Japan
log ₂	Logarithmus zur Basis 2
LOH	Loss of Heterozygosity
LYN	V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog
M	Molare Masse
MAP	Mitogen-activated protein
MEK	Mitogen-activated protein kinase
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
min	Minute
MIP	Molecular Inversion Probe
MRCP	Magnetresonanzcholangiopankreatikografie
MRT	Magnetresonanztomographie
mRNA	messenger RNA, deutsch: Boten-RNA
ng	Nanogramm
NHEJ	Non-homologous end joining
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction /Polymerase-Ketten-Reaktion
PDT	Photodynamische Therapie
pH	Potentia Hydrogenii
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha

PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PPP2R2A	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, alpha
PTPN1	Protein Tyrosin phosphatase non-receptor type 1
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PVE	Portalvenenembolisation
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RNA	Ribonucleic acid, deutsch: Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction, deutsch: Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma oder rat fibrosarcoma
RAS	Rat sarcoma Gen
sec	Sekunde
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TMA	Tissue-Microarray
TP53	Tumor protein p53
UPD	Uniparentale Disomie
UICC	Union internationale contre le cancer
U	Unit
V	Volt
WHO	World Health Organization
2HG	2-Hydroxyglutarat