

Aus der Chirurgischen Klinik
der Medizinischen Fakultät Mannheim
Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Post

Etablierung und Charakterisierung der neuen cholangiozellulären
Zelllinie CCC-5

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Johanna Luisa Grün

aus
Bergisch Gladbach
2016

Dekan: Prof. Dr. Sergij Goerd
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Felix Rückert

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	3
1.1 Das cholangiozelluläre Karzinom	3
1.1.1 Einteilung	3
1.1.2 Epidemiologie	5
1.1.3 Risikofaktoren	6
1.1.4 Stadieneinteilung	8
1.1.5 Therapie	10
1.2 CCC-Zelllinien	16
1.2.1 Vorhandene CCC-Zelllinien	18
1.2.2 Übliche Verfahren zur Charakterisierung von Zelllinien	22
1.3 Zielsetzung	23
2 MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 Patienten	24
2.2 Isolationsmethode	24
2.3 Zellkultur	26
2.3.1 Mediumwechsel	26
2.3.2 Kontaminationen und Fremdwuchs	26
2.3.3 Passagieren	28
2.3.4 Einfrieren, Auftauen und Qualitätskontrolle	29
2.4 Zellmorphologie	30
2.4.1 Fixierung	30
2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	30
2.4.3 May-Grünwald-Giemsa-Färbung	31
2.4.4 PAS-Reaktion	31
2.5 Zellverdopplungszeit	32

2.6	Western Blot.....	33
2.7	Immunhistochemie	35
2.8	Chemosensitivitätstestung.....	36
3	ERGEBNISSE	39
3.1	Patienten	39
3.2	Zellmorphologie	40
3.3	Zellverdopplungszeit.....	42
3.4	Western Blot.....	42
3.5	Immunhistochemie	43
3.6	Chemosensitivitätstestung.....	44
4	DISKUSSION	48
4.1	Morphologie.....	49
4.2	Proteinanalyse.....	50
4.3	Chemosensitivität	57
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	61
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	62
7	LEBENS LAUF	83
8	DANKSAGUNG	84

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CCC:	cholangiozelluläres Karzinom
iCCC:	intrahepatisches cholangiozelluläres Karzinom
eCCC:	extrahepatisches cholangiozelluläres Karzinom
HCC:	hepatozelluläres Karzinom
HCC/CCC:	gemischt hepatozelluläres/cholangiozelluläres Karzinom
ICD:	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (englisch)
OR:	Odds Ratio
PSC:	primäre sklerosierende Cholangitis
PBC:	primäre biliäre Zirrhose
CED:	chronisch entzündliche Darmerkrankung
HCV:	Hepatitis C
HBV:	Hepatitis B
AJCC:	American Joint Committee on Cancer (englisch)
IORT:	intraoperative Radiotherapie
PORT:	postoperative Radiotherapie
5-JÜR:	5-Jahresüberlebensrate
MÜ:	medianes Überleben
Mo.:	Monate
5-FU:	5-Fluoruracil
EBRT:	external beam radiation therapy (englisch)
MMC:	Mitomycin C
MTX:	Mitoxantrone
RT:	Radiotherapie
ERC:	endoskopische retrograde Cholangiographie
PTC:	perkutane transhepatische Cholangiographie
PTCD:	perkutane transhepatische Cholangiodrainage
PTBC:	perkutaner transhepatischer biliärer Stent
EGFR:	endothelial growth factor receptor (englisch)
VEGF:	vascular endothelial growth factor (englisch)
PDT:	photodynamische Therapie
IL-6:	Interleukin-6
AKT:	v-akt murine thymoma viral oncogene (englisch)
STAT:	signal transducer and activator of transcription (englisch)
Mcl-1:	myeloid cell leukemia sequence 1 (englisch)
mTor:	mechanistic target of rapamycin (englisch)
PIK:	Proteinkinase
KRAS:	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (englisch)
RAF:	rapidly accelerated fibrosarcoma (englisch)
MEK:	mitogen-activated protein kinase kinase (englisch)
ERK:	extracellular signal-regulated kinase (englisch)
CAF:	cancer-associated fibroblasts (englisch)
FBS:	fetales Kälberserum
AA:	Antibiotika
Ham's F12:	Ham's F12 – Medium
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (englisch)
RPMI 1640:	Rosewell Park Memorial Institute - Medium

W/E:	William's Medium E
CMRL:	Connaught Medical Research Laboratories – Medium (englisch)
α -MEM:	α - Minimal Essential Medium (englisch)
CP-Medium:	DMEM + 20% FBS
DBPS:	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (englisch)
KSFM:	Keratinocyte Serum-free Medium (englisch)
HE:	Hämatoxylin/Eosin
PAS:	periodic acid Schiff (englisch)
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
DMSO:	Dimethylsulfoxid
RIPA:	Radioimmunopräzipitationsassay
SDS-PAGE:	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (englisch)
TBST:	Tris-buffered saline with Tween 20 (englisch)
MTT:	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
CEA:	karzinoembryonales Antigen
CA19-9:	carboanhydrate antigen 19-9 (englisch)
EMT:	epithelial-mesenchymale Transition
rER:	raues endoplasmatisches Retikulum
sER:	glattes endoplasmatisches Retikulum
Sox9:	SRY (sex determining region Y)-box 9 (englisch)
CK:	Cytokeratin
HNF:	hepatocyte nuclear factor (englisch)
RBP J κ :	Rekombinationssignal-bindendes Protein J κ
P53:	Protein 53
CREB:	cyclic AMP response element-binding protein (englisch)

1 EINLEITUNG

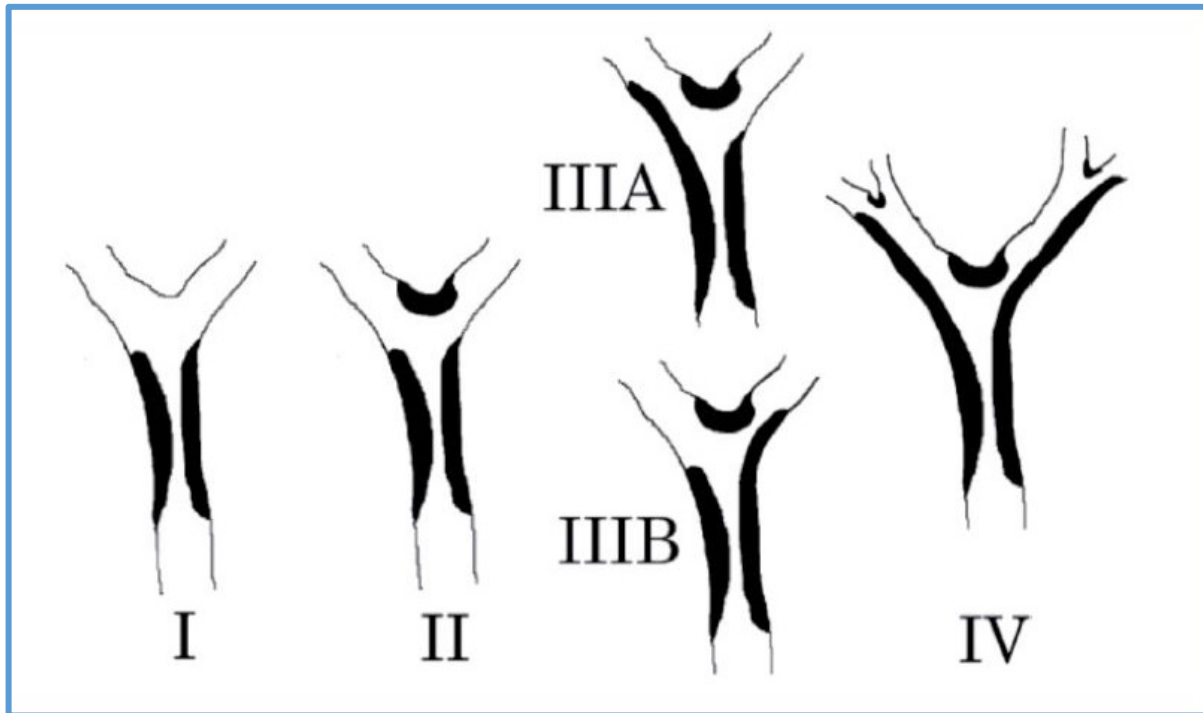
1.1 Das cholangiozelluläre Karzinom

Das cholangiozelluläre Karzinom (CCC) ist ein maligner Tumor der Gallenwegsepithelien, welcher an jeder Stelle des biliären Gangsystems entstehen kann.¹

1.1.1 Einteilung

Anhand der Tumorlokalisation unterscheidet man intrahepatische (iCCC) von extrahepatischen Cholangiokarzinomen (eCCC).² Intrahepatische CCC entstehen im Leberparenchym, wohingegen extrahepatische CCC das biliäre System unterhalb der Hepatikusgabel involvieren.³

5-10% der CCC sind intrahepatisch lokalisiert. 20-30% der CCC sind distale Tumoren und ungefähr 60-70% der CCC entstehen an der hepatischen Bifurkation bzw. perihilär und wurden erstmals von Klatskin 1965 beschrieben und klassifiziert und werden heutzutage allgemein nach ihm benannt.^{4,5} Bismuth *et al.* teilte die Klatskin-Karzinome anhand der Beteiligung des Ductus hepaticus noch weiter ein (Bismuth 1-4).⁶ Die modifizierte Bismuth-Corlette-Klassifikation ist in **Abbildung 1** dargestellt.

Abb. 1 Bismuth-Corlette-Klassifikation für eCCC^{6,198}

I: Tumor liegt knapp unter der Hepatikusgabel; II: Tumor bezieht die Hepatikusgabel mit ein; IIIA: Tumor infiltriert den rechten Hepatikusast, der linke ist frei; IIIB: Tumor infiltriert den linken Hepatikusast, der rechte ist frei; IV: Der Tumor infiltriert beide Hepatikusäste.

Da der Großteil der CCC perihilär entsteht, ist eine andere Einteilung in intrahepatisch, perihilär (Klatskin) und extrahepatisch ebenfalls häufig in der Literatur zu finden.^{5,7}

Die Unterscheidung zwischen intra- und extrahepatischen CCC ist nicht nur anatomisch relevant, sondern hängt auch mit epidemiologischen, klinischen und pathologischen Unterschieden zwischen diesen beiden Unterarten zusammen.⁷ Mehrere Studien zeigten deutliche Unterschiede zwischen iCCC und eCCC hinsichtlich Überlebensraten, Resektabilität, biologischer Charakteristika und Risikofaktoren.^{5,8} Im Folgenden werden wir auf diese Unterschiede eingehen.

Die Einteilung der Cholangiokarzinome ist in der Literatur als teils sehr schwierig beschrieben, da zu den eCCC oft auch Gallenblasenkarzinome gezählt wurden und Klatskintumore fälschlicherweise gelegentlich zu den iCCC gezählt wurden. Topografisch werden die Cholangiokarzinome von der International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) eingeteilt. Durch Änderungen in der ICD-Klassifikation wurden zwischen 1992 und 2000 91% aller hilären CCC fälschlicherweise intrahepatischen CCC zugeordnet, obwohl anatomisch diese hilären CCC den extrahepatischen CCC zuzuordnen sind. In den Jahren 2001 und 2002 wurden noch

54% falsch zugeordnet. Somit kam es häufig zu einer Überbewertung der Anzahl von intrahepatischen und einer Unterbewertung der Anzahl von extrahepatischen CCC.⁹

1.1.2 Epidemiologie

Weltweit macht das Cholangiokarzinom ungefähr 3% aller gastrointestinalen Karzinome aus und ist nach dem hepatozellulären Karzinom das zweithäufigste primäre Malignom der Leber.^{10,11} Aufgrund der relativen Seltenheit des Tumors, der regional stark variierenden Inzidenz und der unterschiedlichen anatomischen Lage sind epidemiologische Aussagen sehr schwierig zu treffen.

Die Inzidenz des Cholangiokarzinoms ist je nach Land sehr unterschiedlich und unterscheidet sich auch noch einmal, wenn man intrahepatische von extrahepatischen Cholangiokarzinomen unterscheidet. In den westlichen Staaten und Japan ist die Inzidenz von eCCC höher als die von iCCC. Dahingegen lässt sich in den östlichen Staaten das Gegenteil beobachten.¹² Gemäß Shaib *et al.* liegt die iCCC-Inzidenz in Nordost-Thailand bei 96/100.000 bei Männern und 38/100.000 bei Frauen. Dahingegen ist die iCCC-Inzidenz in Australien nur 0,2 bzw 0,1/100.000.¹³ Eine Studie von Strom *et al.* untersuchte die Inzidenzen von eCCC in verschiedenen Datenbanken der USA, Kanada und westeuropäischer Staaten. Die Inzidenz des eCCC variierte zwischen 0,53/100.000 im Vereinigten Königreich (UK) und 1,14/100.000 in Manitoba, Kanada.¹⁴

Dass die Inzidenzen von Cholangiokarzinomen in verschiedenen Ländern so unterschiedlich sind, liegt vermutlich zum Großteil an unterschiedlichen Risikofaktoren, wie chronischen Hepatitiden oder Leberparasiten, welche in Asien deutlich häufiger auftreten als in anderen Ländern.

Verschiedene Studien berichten von einer weltweit steigenden Inzidenz von intrahepatischen Cholangiokarzinomen und einer sinkenden oder gleichbleibenden Inzidenz von extrahepatischen Cholangiokarzinomen.^{3,12,13,15} iCCC zeigen in den letzten Jahrzehnten steigende Mortalitätsraten, welche mit den ansteigenden Inzidenzraten übereinstimmen.¹⁶

Generell ist eine Beurteilung der Inzidenzen von iCCC und eCCC jedoch schwierig, da bisher ein einheitliches internationales klinisches Klassifikationssystem für Cholangiokarzinome fehlt.^{7,9,17}

Die Überlebensraten von Patienten mit CCC variieren deutlich zwischen resektablen und unresektablen Tumoren. Das mediane Gesamtüberleben liegt bei CCC zwischen 20 und 36 Monaten.¹⁸ Da jedoch nur 5-35% der Patienten mit CCC in einem resektablen Stadium diagnostiziert werden und die radikale R0-Resektion bisher die einzige kurative Therapieoption darstellt, liegt die Prognose eines unresektablen CCC nur bei 6-12 Monaten.¹⁸⁻²⁰ Seit 2010 ist die Kombination von Gemcitabin und Cisplatin die Standardtherapie bei metastasierten CCC. Im Vergleich zu einer Monotherapie mit Gemcitabin konnte das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben zwar signifikant gesteigert werden, doch liegt das Gesamtüberleben von Patienten mit unresektablen CCC immer noch deutlich unter 20 Monaten.^{18,21}

Bei Patienten mit einem resektablen CCC liegt das mediane Gesamtüberleben nach einer radikalen R0-Resektion bei bis zu 65 Monaten und eine neue Metaanalyse stellte für eCCC eine mediane 5-Jahresüberlebensrate von 44% nach R0-Resektion fest.^{18,22-24} Jedoch liegt die 30-Tages-Mortalität nach einer solchen Leberresektion, welche in Kapitel 1.1.5 genauer erläutert wird, zwischen 2% und 25%.^{18,20,25} Rezidive zeigen sich nach zwei Jahren nach Resektion in 63% der Fälle.^{18,22}

Insgesamt ist das Gesamtüberleben von Patienten mit CCC immer noch gering. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Resektion aufgrund der ungünstigen anatomischen Lage oft nicht mehr möglich ist und für irresektable CCC bisher noch kein Therapeutikum gefunden wurde, das die Überlebensraten stark verbessern konnte.^{13,18}

1.1.3 Risikofaktoren

Die größten Risikofaktoren für cholangiozelluläre Karzinome sind chronische Entzündung der Leber, genetische Prädisposition und kongenitale Abnormalitäten des biliären Gangsystems.¹⁵

Daneben gibt es aber auch weitere Einflussfaktoren, welche in **Tabelle 1** aufgeführt sind.

Tabelle 1 Risikofaktoren für iCCC und eCCC mit Odds Ratio für erhöhtes Risiko³

Risikofaktor	iCCC (OR)	eCCC (OR)
Choledochuszysten	10,7-36,9	47,1

PSC	64,2	45,2
PBC	19,8	11,8
Choledocholithiasis	22,5-34	34
Cholezystitis	8,5	5,9
Clonorchis sinensis Infektion	8,6-13,6	6,5
CED	4	2
Duodenalulzera	3,4	1,9
Chronische Pankreatitis	5,9	9,3
Diabetes mellitus Typ II	1,8-3,2	1,5-3,2
Thyreotoxikose	1,5	1,7
Alkoholkonsum >80g/Tag	5,9-6,6	3,6
Adipositas	1,7	-
Rauchen	1,8	-
Alkoholische Lebererkrankung	3,1	4,5
Nichtspezifische Zirrhose	10-16,5	5,4
Hämochromatose	2,6	-
Bilharziose	11	-
Nichtalkoholische Lebererkrankung	3	-
HCV Infektion	4,4-9,7	-
HCV Infektion plus Zirrhose	8,5	-
HBV Infektion	2,3-9,7	-
HBV Infektion plus Zirrhose	13-18	-

OR: Odds Ratio; PSC: Primäre sklerosierende Cholangitis; PBC: Primäre biliäre Zirrhose; CED: Chronisch entzündliche Darmerkrankung; HCV: Hepatitis C; HBV: Hepatitis B

PSC gilt als der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung eines Cholangiokarzinoms in den westlichen Staaten und die Prävalenz bei Patienten mit PSC liegt zwischen 8% und 40%.^{1,26,27} Das Risiko dieser Patienten, an einem CCC zu erkranken, steigt, wenn diese zusätzlich zur PSC noch unter einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung leiden. Bei zusätzlicher Colitis ulcerosa liegt das Risiko, an einem CCC zu erkranken, bei 65%. Bei Morbus Crohn liegt es bei 25%. Diese Zahlen sind viermal höher als bei Patienten, die nur an PSC leiden.²⁸

Infektionen mit Clonorchis sinensis oder mit Opisthorchis viverrini sind unabhängige Risikofaktoren für CCC.²⁹⁻³² Diese Infektionen sind vor allem in Südostasien

problematisch, da diese Lebererkrankung dort in einigen Regionen endemisch vorkommen und somit zu einer deutlich höheren Inzidenz von CCC führen.¹³

Da Cholelithiasis und Cholezystektomien vor allem das extrahepatische biliäre Gangsystem betreffen, sind diese auch hauptsächlich Risikofaktoren für eCCC. Diese Risikofaktoren müssen allerdings kritisch gesehen werden, da keine sicheren Aussagen zu Ursache und Wirkung getroffen werden können.³³

Chronische Lebererkrankungen, die sich auf das Leberparenchym beschränken, erwiesen sich vor allem als Risikofaktoren für iCCC. Dazu zählen Hämochromatose, Bilharziose, nicht-alkoholische Lebererkrankung, Hepatitis C-Infektion und Hepatitis B-Infektion mit eventueller Zirrhose.^{34–39} Auch Adipositas und Tabakkonsum konnten bisher nur für iCCC als unabhängige Risikofaktoren identifiziert werden.^{33,34,39} Eine neuere Metaanalyse von Li *et al.* stellte ebenfalls dar, dass Übergewicht und Adipositas Risikofaktoren für CCC seien, doch wurde dabei nicht zwischen iCCC und eCCC differenziert.⁴⁰

1.1.4 Stadieneinteilung

Die Stadien von iCCC und eCCC werden unterschiedlich eingeteilt.

iCCC

iCCC werden als primäre Lebermalignome bezeichnet und nach den Vorgaben des neuen American Joint Committee on Cancer (AJCC) mittels der TNM-Klassifikation in Stadien eingeteilt (**Tabelle 2**).^{41,42}

Tabelle 2 TNM-Klassifikation für iCCC ⁴²			
Stadium	Tumor	Lymphknoten	Mestastasierung
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
IIIA	T3	N0	M0
IIIB	T4	N0	M0
IIIC	Jedes T	N1	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1

T1: Einzelner Tumor ohne Gefäßinfiltration; T2: Einzelner Tumor mit Gefäßinfiltration oder multiple Tumoren <5cm; T3: Multiple Tumoren >5cm oder Tumor, der den Hauptast der Vena porta oder die Vena hepatica infiltriert; T4: Tumor(en) mit direkter Infiltration anliegender Organe (außer der Gallenblase) oder mit Perforation des viszeralen Peritoneums; N0: keine regionalen Lymphknotenmetastasen; N1: Regionale Lymphknotenmetastasen; M0: Keine Fernmetastasen; M1: Fernmetastasen

eCCC

Für eCCC gibt es verschiedene Systeme zur Stadieneinteilung.

Das älteste und weltweit vermutlich am häufigsten verwendete System ist die Bismuth-Corlette Klassifikation (**Abb.1**).^{6,43} Diese Einteilung ist sinnvoll, um die Tumorlokalisierung und seine Ausbreitung im biliären Gangsystem zu beschreiben, doch ist sie nicht prädiktiv für die Resektabilität oder das Gesamtüberleben.²⁰

Wie die intrahepatischen CCC werden auch die Stadien des extrahepatischen CCC nach Kriterien der AJCC aufgrund von pathologischen Daten eingeteilt (**Tabelle 3**).^{41,42}

Für das hiläre Cholangiokarzinom gibt es noch ein anderes System zur Stadieneinteilung, das des Memorial Sloan-Kettering Cancer Centers (MSKCC), welches im Gegensatz zu dem System des AJCC mit dem Gesamtüberleben korreliert. Diese sogenannten T-Stage Kriterien orientieren sich an der Resektabilität des Tumors (**Tabelle 4**).⁴⁴

Tabelle 3 AJCC-Stadien Einteilung für eCCC⁴²

Stadium	Tumor	Lymphknoten	Metastasierung
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T1-T3	N1	M0
III	T4	Jedes N	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1

Tis: Carcinoma in situ; T1: Histologisch dem Gallengang zuzuordnender Tumor; T2: Tumor übertritt die Wand des Gallengangs; T3: Tumor infiltriert die Leber, die Gallenblase, das Pankreas und/oder die rechte oder die linke Vena porta oder die rechte oder die linke Arteria hepatica; T4: Tumor infiltriert eine der folgenden Strukturen: Hauptast der Vena porta oder ihre Äste beidseits, Arteria hepatica communis, Kolon, Magen, Duodenum oder die Abdominalwand; N0: Keine regionalen Lymphknotenmetastasen; N1: Regionale Lymphknotenmetastasen; M0: Keine Fernmetastasen; M1: Fernmetastasen

Tabelle 4 MSKCC-Kriterien für hiläre Cholangiokarzinome⁴⁴

Stadium	Kriterien
T1	Tumor involviert die biliäre Konfluenz mit oder ohne unilaterale Ausbreitung in biliäre Wurzeln zweiter Ordnung
T2	Tumor involviert die biliäre Konfluenz mit oder ohne unilaterale Ausbreitung in biliäre Wurzeln zweiter Ordnung und ipsilaterale Portalveneninfiltration mit oder ohne ipsilaterale Atrophie eines Leberlappens
T3	Tumor involviert die biliäre Konfluenz mit bilateraler Ausbreitung in biliäre Wurzeln zweiter Ordnung; oder mit unilateraler Ausbreitung in biliäre Wurzeln zweiter Ordnung mit kontralateraler Portalveneninfiltration; oder mit unilateraler Ausbreitung in biliäre Wurzeln zweiter Ordnung mit kontralateraler Atrophie eines Leberlappens; oder Infiltration des Hauptastes oder beider Portalvenen.

1.1.5 Therapie

1.1.5.1 Chirurgische Therapie

Die bisher einzige potentiell kurative Therapie ist die chirurgische R0-Resektion des Tumors, also die komplette Exzision des Tumors mit histologisch negativen Absetzungsrändern. Die hauptsächlichen Determinanten für Resektabilität sind die Ausbreitung des Tumors im biliären Gangsystem, das Ausmaß der Infiltration des Leberparenchyms, die vaskuläre Infiltration, die Atrophie der Leberlappen und Metastasen.¹⁵

Nakeeb *et al.* führten eine retrospektive Studie mit 294 Patienten durch, welche Unterschiede in Resektabilität, 5-Jahres-Überlebensrate und medianem Überleben zwischen intrahepatischen, Klatskin- und distalen CCC herausstellte. Das iCCC zeigte in dieser Studie die niedrigste Resektabilitätsrate, jedoch wenn eine Resektion möglich war, hatten die Patienten dieser Kohorte die höchste 5-Jahres-Überlebensrate (44%) und das längste mediane Überleben (26 Monate). Klatskin-Karzinome, mit 67% das häufigste Gallengangskarzinom, zeigte im Vergleich zu iCCC und distalen eCCC die geringste 5-Jahres-Überlebensrate (11%) und das geringste mediane Überleben (19

Monate). Das distale CCC war am häufigsten resektabel. Jedoch waren die 5-Jahres-Überlebensrate und das mediane Überleben geringer als bei iCCC (28% und 22 Monate).⁵

Die chirurgische Therapie der iCCC erfolgt ähnlich wie die der hepatozellulären Karzinome oder sekundärer Lebertumoren. Dabei werden die Tumoren abhängig von Lokalisation und Größe reseziert. Die Ausmaße der Operation reichen dabei von atypischen Leberresektionen bis hin zu erweiterten Hemihepatektomien. Lymphknotendissektion wird nicht empfohlen, da diese nicht das Überleben der Patienten verbessert.⁴⁵

Die chirurgische Therapie des distalen eCCC erfordert eine Pankreatikoduodenektomie, jedoch ebenfalls keine Lymphadenektomie.^{46,47}

Das Klatskin-Karzinom stellt eine besondere Herausforderung dar, da bei diesem größere Leberresektionen mit schwierigen Gefäßrekonstruktionen notwendig werden können. Das Ausmaß richtet sich dabei nach der Lokalisation des Klatskin-Tumors.⁴⁸

Auch wenn in den letzten Jahrzehnten Fortschritte in den chirurgischen Techniken gemacht wurden, sind aufgrund der Nähe wichtiger anatomischer Leitstrukturen viele CCC nicht mehr resektabel. Das Gleiche gilt auch für Patienten mit Metastasen, welche oft schon früh auftreten.

Für Patienten ohne Lymphknotenbefall und Fernmetastasen ist die Lebertransplantation eine Alternative, die immer mehr diskutiert wird. Eine Studie aus den USA konnte nach sorgfältiger Selektion der Patienten und neoadjuvanter Therapie eine 5-Jahres-Überlebensrate von >50% nach Lebertransplantation aufweisen.⁴⁹

Auch andere Studien beobachteten 5-Jahres-Überlebensraten zwischen 30 und 80% nach Transplantation, besonders gute Ergebnisse gab es mit zusätzlicher neoadjuvanter Therapie.¹⁵ Zurzeit wird diese Indikation zur Transplantation in der Eurotransplant-Region anhand einer Multicenter-Studie untersucht.⁵⁰ Derzeit ist eine Lebertransplantation jedoch keine gängige Praxis.

1.1.5.2 Neoadjuvante und adjuvante Therapie

Da es bei bis zu 85% der CCC-Patienten nach Resektion innerhalb von drei Jahren zu einem Rezidiv kommt⁵¹, werden neoadjuvante und adjuvante Therapien viel diskutiert. Problematisch ist jedoch auch hier die niedrige Inzidenz des Tumors, welche prospektive Studien schwierig macht.

Bisher konnte noch keine signifikante Verbesserung der Überlebensraten durch adjuvante Chemotherapie beobachtet werden.⁵⁰ Eine Studie aus dem Jahre 2002 evaluierte den Effekt von postoperativer Gabe von Mitomycin C und 5-Fluoruracil im Gegensatz zu alleiniger chirurgischer Therapie. Nach einer R0-Resektion war kein Überlebensvorteil durch die postoperative Chemotherapie zu erkennen.⁵²

Die Effektivität einer postoperativen Radiotherapie ist ebenfalls noch nicht geklärt.

Bisher konnte keine Studie einen signifikanten Überlebensvorteil durch adjuvante Radiotherapie bei R0-resezierten CCC-Patienten nachweisen.^{50,53,54}

Jedoch konnten einige Studien bei Patienten mit R1-Resektion signifikant bessere Überlebensraten nach Resektion mit anschließender Radiotherapie beobachten als ohne Radiotherapie.^{55,56} Für solche Patienten könnte eine adjuvante Radiotherapie sinnvoll sein.

Auch die Rolle einer adjuvanten Radiochemotherapie ist noch nicht geklärt. Zwar gibt es Studien, die signifikante Verbesserungen der Überlebensraten bei Patienten mit distalen eCCC durch adjuvante Radiochemotherapie beobachten konnten⁵⁷⁻⁵⁹, doch gibt es in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse zu der Wirksamkeit einer Radiochemotherapie, insbesondere bei iCCC und perihilären CCC.¹⁵

Die Effektivität von neoadjuvanter Therapie wurde bisher nur in kleinen Fallserien beschrieben, und nur bei Lebertransplantationen konnten signifikant bessere Überlebensraten beobachtet werden.⁴⁹

Tabelle 5 Adjuvante Therapien und verbesserte Überlebensraten

Studie (Jahr)	Autor	Patientenzahl	Verwendete Therapie	Überleben
2000	Todoroki <i>et al.</i> ⁵⁵	47	Nach R1-Resektion; IORT/PORT	5-JÜR 33,9 vs 13,5%
2001	Serafini <i>et al.</i> ⁵⁷	77	FU, EBRT	5-JÜR 35 vs 25%
2002	Takada <i>et al.</i> ⁵²	508 (insg.); 118 (CCC)	MMC, FU	5-JÜR 26,7 vs 24,1%
2007	Hughes <i>et al.</i> ⁵⁸	34	FU, EBRT	5-JÜR 35%
2008	Morak <i>et al.</i> ⁶⁰	58	FU, MTX, Cisplatin, EBRT	MÜ 19 vs 18 Mo.
2009	Murakami <i>et al.</i> ⁶¹	103	Gemcitabine + S-1	5-JÜR 57 vs 24%

2011	Vern-Gross <i>et al.</i> ⁵³	1491 (eCCC)	RT	MÜ 28 vs 36 Mo. (lokalisiert); 18 vs 18 Mo. (regional)
-------------	--	-------------	----	--

IORT: Intraoperative Radiotherapie; PORT: Postoperative Radiotherapie; 5-JÜR: 5-Jahresüberlebensrate; MÜ: Medianes Überleben; Mo.: Monate; FU: 5-Fluoruracil; EBRT: External beam radiation therapy; MMC: Mitomycin C; MTX: Mitoxantrone; RT: Radiotherapie

1.1.5.3 Palliative Therapie

Biliäre Drainage

Die biliäre Obstruktion ist der Hauptgrund für Morbidität und Mortalität bei Patienten mit CCC. Die Ziele der Dekompression sind den Ikterus zu beheben, Schmerz- und Pruritusreduktion und das Verhindern von Cholangitis und cholestatischem Leberversagen.¹⁵

Die Gallengangsdrainage mittels endoskopischer retrograder Cholangiographie (ERC) und Stenteinlage oder mittels perkutaner transhepatischer Cholangiographie (PTC) werden heutzutage am häufigsten durchgeführt, da diese Methoden zu vergleichbaren Ergebnissen wie biliodigestive Anastomosen führen und mit weniger Komplikationen und kürzeren Krankenhausaufenthalten assoziiert ist.^{62,63}

Bei der perkutanen Methode kann die Galle entweder über eine externe Drainage in einen Beutel (perkutane transhepatische Cholangiodrainage; PTCD) oder über einen Stent in den Darm abgeleitet werden (perkutaner transhepatischer biliärer Stent; PTBC). Mit beiden Methoden konnte eine Verbesserung der Leberfunktion festgestellt werden.⁶⁴ Die perkutane Anlage eines Gallengangstents konnte zwar in einer retrospektiven Studie eine länger Überlebenszeit als die PTCD zeigen, doch treten bei internen Systemen mittels Stent oft früh Komplikationen auf und diese können nicht so schnell erkannt und behandelt werden können wie bei einer externen Drainage mittels PTCD. Insgesamt zeigen sich jedoch auch bei PTCD häufig Komplikationen. Daher ist die am häufigsten verwendete Art der biliären Drainage bei biliären Tumoren die Einlage von Stents, die eine Drainage der Galle in den Darm ermöglichen.^{64–66} Selbstexpandierende Metallstents erwiesen sich in verschiedenen Studien in einer palliativen Situation als langlebiger und kosteneffizienter gegenüber Plastikstents.^{67,68}

Palliative Radiotherapie

Von einer palliativen Radiotherapie können Patienten mit lokal fortgeschrittenen Tumoren und ohne Fernmetastasen profitieren. Die Radiotherapie hat positive Effekte

auf Schmerzreduktion, biliäre Drainage und Gesamtüberleben der Patienten. Im Vergleich zur externen Radiotherapie hat sich die Brachytherapie bisher vor allem beim iCCC als erfolgreicher erwiesen und wird daher in einigen Zentren schon als führende Modalität der Palliation verwendet.^{69,70}

Palliative Chemotherapie

Die Monotherapie mit Gemcitabin war lange Zeit die Standardpalliation für fortgeschrittene CCC, auch wenn randomisierte Phase III-Studien dazu fehlten.⁵⁰

Valle *et al.* zeigten, dass die Kombination von Gemcitabin mit Cisplatin zu einem signifikant höheren Überleben führte, als Gemcitabin allein.^{71,72}

Somit ist seit 2010 die Kombination von Gemcitabin und Cisplatin die Therapie der Wahl für fortgeschrittene, nicht resektable CCC bei Patienten mit einem guten Allgemeinzustand. Bei einer renalen Insuffizienz ist diese Standardtherapie jedoch kontraindiziert und Cisplatin kann gegen Oxaliplatin ausgetauscht werden.⁷³

Oxaliplatin ist ein Platinderivat, dessen genauer Wirkmechanismus noch nicht geklärt ist, doch scheint das aktivierte Oxaliplatin Platin-DNA-Addukte zu erzeugen, die die Replikation der DNA unterbrechen.^{74,75}

Da derzeit die mittlere Überlebenszeit unter Chemotherapie bei CCC lediglich 14 Monate beträgt, werden stets Alternativen untersucht. Somit wurden viele Studien zu Chemotherapien mit anderen Chemotherapeutika wie 5-Fluoruracil (5-FU) und Irinotecan durchgeführt. 5-FU zeigte vor allem in Kombination mit Platinderivaten und Epirubicin gute Ergebnisse bei biliären Tumoren, doch konnte bisher kein Vorteil gegenüber der Standardtherapie mit Gemcitabin und Cisplatin festgestellt werden.⁷⁶

Irinotecan, ein DNA-Topoisomerase-1-Inhibitor, zeigte gute Effekte bei Kolonkarzinomen und konnte in Kombination mit anderen Chemotherapeutika, wie Gemcitabin, Capecitabin, Oxaliplatin und 5-FU, auch bei Pankreas- und biliären Karzinomen ein gutes Ansprechen erzielen. Jedoch konnten mit dieser Therapie bei CCC bisher keine Überlebensvorteile gegenüber der Standardtherapie festgestellt werden.^{77,78} In Kombination mit Gemcitabin und einem EGFR-Inhibitor wurden vielversprechende Ergebnisse erzielt.⁷⁹ Daher ist auch Irinotecan immer noch Gegenstand aktueller Studien und wird vor allem als Zweitlinientherapeutikum bei Versagen der Standardchemotherapie diskutiert.^{80,81}

Photodynamische Therapie

Photodynamische Therapie (PDT) kann verwendet werden, um die biliäre Drainage zu verbessern. Dabei wird dem Patienten ein Photosensitizer injiziert und danach mittels endoskopisch retrograder Cholangiographie der Tumor mit einem Laser gezielt bestrahlt.⁵⁰ Eine deutsche Metaanalyse belegte den Vorteil der photodynamischen Therapie plus Stenteinlage gegenüber einer alleinigen Stenteinlage. Es ergaben sich bessere Ergebnisse in Hinsicht auf den biliären Abfluss, die Lebensqualität und die Lebenserwartung.⁸² Eine asiatische Studie beobachtete ein signifikant längeres Überleben der Patienten, wenn die PDT zusammen mit einer Chemotherapie angewendet wurde, als wenn man nur die PDT verwendete (17 Monate vs. 8 Monate).⁸³

1.1.5.4 Neue zielgerichtete Therapiestrategien

Anhand von molekularen Veränderungen in Tumoren sind in den letzten Jahren immer mehr gezielte Therapieansätze entwickelt worden, welche sich teilweise schon in der klinischen Testung befinden.

Cytokine spielen in der Karzinogenese des CCC eine wichtige Rolle. Der inflammatorische Botenstoff IL-6 wird von Cholangiozyten in inflammatorischen Situationen und auch von CCC-Zellen sekretiert.⁸⁴ IL-6 vermittelt über den AKT- oder den STAT-Signalweg in Tumoren einen Wachstumsstimulus und über das antiapoptotische Protein Mcl-1 (myeloid cell leukemia sequence 1) eine Apoptoseresistenz.⁸⁵ Durch IL-6-Inhibitoren konnte in experimentellen Studien die Apoptosesensibilität in CCC-Zellen erhöht und das Tumorstadium gesenkt werden.^{84,86} Antikörper gegen IL-6 befinden sich derzeit in klinischer Testung. In der Therapie der rheumatoiden Arthritis konnten in einer Phase-IIb-Studie schon vielversprechende Ergebnisse mit IL-6-Inhibitoren beobachtet werden.^{84,87,88}

Der Notch-Signalweg spielt ebenfalls in der Karzinogenese eine wichtige Rolle und eine Hochregulation von Notch-1 wurde bei PSC und im Cholangiokarzinom beobachtet.⁸⁹ Somit sind viele Notch-Inhibitoren derzeit in Testung.

Rezeptortyrosinkinasen wie ERBB2, EGFR, HER-2, MET oder FGFR sind ebenfalls Ansatzpunkte für gezielte Therapien. Diese Tyrosinkinasen können durch verschiedene Mechanismen in Tumoren und auch in CCC zu Tumorstadium, Zellproliferation, Tumorstadium und Angiogenese führen. Da die Wirkungswege dieser Moleküle stark miteinander vernetzt sind, könnte die Inhibition einer der

Tyrosinkinase zu einer Hemmung der anderen führen und bei Patienten mit entsprechenden Mutationen zu einem langsameren Tumorwachstum führen. Die Rezeptortyrosinkinase können beispielsweise den PI3K-Signalweg aktivieren. Die Phosphoinositid-3-Kinase aktiviert AKT und dieses wiederum den mTOR-Signalweg. Wenn diese Signalwege durch PIK3CA-Mutationen dereguliert sind, führt dies zu der obengenannten vermehrten Tumorproliferation und somit zu einer aggressiveren Tumorbilologie. PIK3CA-Mutationen wurden in mehreren Studien bei Patienten mit CCC nachgewiesen.^{90,91} Daher sind derzeit viele PI3K-Signalweg-Inhibitoren in der Testung und einige, wie zum Beispiel Everolimus, befinden sich schon in klinischen Phase-I-Studien.^{84,92,93}

KRAS-Mutationen wurden bei vielen Tumorentitäten und auch bei CCC häufig nachgewiesen. Therapeutisch wird an den durch KRAS ausgelösten Signalwegen, wie Raf/MEK/ERK und PI3K/AKT, angesetzt.

Weiterhin scheint das Tumormikroenvironment eine wichtige Rolle im Tumorwachstum zu spielen. Das durch tumor-assoziierte Fibroblasten (CAF = cancer-associated fibroblasts) charakterisierte Tumorstroma scheint eine Grundvoraussetzung für Migration und Invasion der epithelialen Tumorzellen zu sein, da in seinem hypovaskulären, desmoplastischen Milieu für den Tumor wichtige Faktoren produziert werden. Deswegen könnten CAF ein wichtiges Ziel für neue Therapieansätze sein.⁸⁴

1.2 CCC-Zelllinien

Um weitere biologische Eigenschaften und diagnostische sowie therapeutische Ansätze für Patienten mit CCC zu erforschen, ist Grundlagenforschung essentiell. Ohne das Verständnis von Signalwegen, Wirkungen verschiedener Proteine, Tumorsuppressoren und Onkogenen können keine neuen Ansätze für Therapeutika gefunden werden. Es ist wichtig, genau zu verstehen, inwiefern sich iCCC von eCCC unterscheiden und welche Unterschiede es zu anderen Tumorentitäten gibt, wie sie Apoptose- und Medikamentenresistenzen entwickeln und welche Mutationen ihnen dabei helfen.

Für die Grundlagenforschung ist eine Vielzahl von Zelllinien notwendig, um die Heterogenität der einzelnen Tumoren so gut wie möglich in der *in-vitro*-Forschung zu repräsentieren. Jeder Tumor ist in seiner Biologie einzigartig und auch die Tumoren einer Entität unterscheiden sich voneinander. Versuche, die nur an einer oder wenigen

Zelllinien durchgeführt werden, lassen somit nicht immer generelle Rückschlüsse auf die gesamte Tumorentität zu. Daher ist es wichtig, stets neue Zelllinien zu etablieren, um einen größtmöglichen Überblick über die Tumorbiologie einer Entität zu gewinnen. Tumorzelllinien sind einerseits eine wichtige Quelle für Proteine, DNA und RNA. Andererseits können Zelllinien als *in-vitro*-Modelle funktionelle Studien ermöglichen, die unser Verständnis der Tumorbiologie verbessern.⁹⁴

Zwar können auch frische Tumorpräparate und Patientenblut zu Forschungszwecken genutzt werden, doch können diese Materialien nicht dauerhaft gelagert werden und sie sind oft nicht in ausreichender Menge für wiederholte Versuche vorhanden. Zelllinien dahingegen können immer wieder aufgetaut, kultiviert und vermehrt werden. Ein weiteres Problem ist, dass es bei Zelllinien in Langzeitkulturen zu Kreuzkontamination kommen kann. Wenn eine Zelllinie für sehr viele Versuche verwendet wird, kann es schnell zu einer Kontamination durch stabilere und aggressiver wachsende Zelllinien kommen, welche dann veränderte Ergebnisse bewirkt.⁹⁵⁻⁹⁷ Aus Angst vor solchen Kreuzkontaminationen und somit verfälschten Ergebnissen sind viele Forschungsgruppen dazu übergegangen, ihre eigenen Zelllinien zu etablieren und nur an diesen ihre Versuche durchzuführen. Doch wenn Zelllinien nicht kommerziell verfügbar sind und nur für die eigenen Versuche verwendet werden, stellt sich wieder das Problem der Heterogenität der Tumore und somit der Aussagekraft dieser Versuche. Vor allem von seltenen Tumorentitäten, wie dem CCC, von dem es ohnehin schon wenig Zelllinien gibt, sollten stets neue Zelllinien etabliert werden und auch kommerziell verfügbar sein, damit Versuche an möglichst großen Mengen von Zelllinien durchgeführt werden können.

Wenn Zelllinien sehr lange in Kultur sind und immer weiter passagiert werden, kann es auch zu einem Gendrift kommen. Diese Entstehung neuer Mutationen durch vielfaches Passagieren und lange Lagerung führt dazu, dass früher gemachte Aussagen zu einer Zelllinie heute eventuell nicht mehr gültig sind. Primäre Zelllinien mit einer geringen Anzahl an Passagen sind somit weniger anfällig für diese genetischen Veränderungen und so besser zur Abbildung der Tumorbiologie geeignet als schon lange etablierte Zelllinien.⁹⁸

Aus den oben genannten Gründen ist es besonders bei seltenen Tumorentitäten wichtig, neue Zelllinien zu etablieren.¹⁹

1.2.1 Vorhandene CCC-Zelllinien

Die erste CCC-Zelllinie wurde 1984 von Yamaguchi aus einem intrahepatischen CCC nach Autopsie etabliert. Das Tumorgewebe wurde in ungefähr 1mm große Stücke zerschnitten und daraus durch mechanische Zerkleinerung eine grobe Zellsuspension hergestellt. Die Zelllinie wurde HChol-Y1 genannt.⁹⁹ Die bisher in der Literatur am häufigsten beschriebenen und in Versuchen am meisten verwendeten Zelllinien EGI-1 und TFK-1 wurden 1987 von Scherdin *et al.* und 1995 von Saijyo *et al.* etabliert.^{100,101} Die bisher in der Literatur beschriebenen CCC-Zelllinien sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 6 Bisher in der Literatur erschienene CCC-Zelllinien¹⁹

Jahr	Autor	Zelllinie	Methode, Herkunft	Medium
1985	Yamaguchi ⁹⁹	Hchol-Y1	Explant, iCCC	Ham's F12 + 0,1% FBS
1985	Knuth ¹⁰²	Mz-ChA-1	Explant, Abdominalwandmetastasen	CMRL + 15% FBS + AA
1987	Murakami ¹⁰³	KMCH-1	Explant, CCC/HCC	DMEM + 20% FBS + AA
1987	Scherdin ¹⁰⁰	EGI-1	Explant, eCCC	DMEM + 10% FBS
1987	Homma ¹⁰⁴	Oz	Aszites, ICC-Metastase	W/E + 10% FBS + AA
1988	Kusaka ¹⁰⁵	HuH-28	Explant, iCCC	RPMI 1640 + 20% FBS
1988	Katoh ¹⁰⁶	CHGS	CCC	
1989	Miyagiwa ¹⁰⁷	HuCC-T1	Aszites, iCCC-Metastase	RPMI 1640 + 10% FBS + AA
1990	Storto ¹⁰⁸	PCI:SG231	Explant, iCCC	α-MEM + 15% FBS + AA
1990	Yoshida ¹⁰⁹	MEC	Pleuraerguss, eCCC-Metastase	-
1991	Sirisinha ¹¹⁰	HuCCA-1	Explant, iCCC	Ham's F12 + 10% FBS + AA

1992	Iemura ¹¹¹	KMC-1	Xenograft, iCCC	DMEM + 20% FBS
1992	Shimizu ¹¹²	CC-SW-1	Explant, iCCC	DMEM + 15% FBS + AA
		CC-LP-1	Explant, iCCC	DMEM + 15% FBS + AA
1992	Yano ¹¹³	KMBC	Explant, eCCC	RPMI 1640 + 5% FBS + AA
1993	Purdum ¹¹⁴	BDC	Explant, Gallenblasen-CA	DMEM + 10% FBS + AA
1995	Saijyo ¹⁰¹	TFK-1	Explant, eCCC	RPMI 1640 + 10% FBS + AA
1995	Yamada ¹¹⁵	OCUCh- LM1	Explant, eCCC- Lebermetastase	DMEM + 10% FBS + AA
1996	Yano ¹¹⁶	KMCH-2	Explant, HCC/CCC	DMEM + 20% FBS + AA
1997	Enjoji ^{117,118}	ETK-1	Aszites, iCCC-Metastase	RPMI 1640 + 10% FBS
		RBA	Explant, iCCC	RPMI 1640 + 10% FBS
		SSP-25	Explant, iCCC	RPMI 1640 + 10% FBS
1997	Wang ¹¹⁹	QBC939	eCCC	DMEM + 10% FBS + AA
1998	Takiyama ¹²⁰	ICBD-1	Explant, eCCC	DMEM + 10% FBS
2000	Watanabe ¹²¹	TK	Aszites, eCCC-Metastase	RPMI 1640 + 15% FBS
2000	Jiao ¹²²	HBDC	Aszites, Klatskin- Metastase	W/E + 10% FBS
2001	Kim ¹²³	SCK	Explant, eCCC	DMEM + 10% FBS + AA
		JCK	Explant, eCCC	DMEM + 10% FBS + AA

		Cho-CK	Explant, eCCC	DMEM + 10% FBS + AA
		Choi-CK	Explant, eCCC	DMEM + 10% FBS + AA
2001	Steffen ¹²⁴ (von Kalthoff <i>et al.</i> etabliert – Jahr unbekannt)	RPMI 7451	Explant, -	DMEM + 8% FBS + AA
2002	Ku ⁹⁴	SNU-245	Explant, eCCC	RPMI 1640 + 10% FBS
		SNU-308	Explant, Gallenblasen-CA	RPMI 1640 + 10% FBS
		SNU-478	Explant, Ampulla Vateri- CA	RPMI 1640 + 10% FBS
		SNU-869	Explant, Ampulla Vateri- CA	RPMI 1640 + 10% FBS
		SNU-1079	Explant, iCCC	RPMI 1640 + 10% FBS
		SNU-1196	Explant, Klatskin	RPMI 1640 + 10% FBS
2003	Emura ^{125,126}	TGBC-47	Explant, eCCC	DMEM + 10% FBS
2005	Ghosh ¹²⁶	TGBC-51	Aszites, Ampulla Vateri-CA	DMEM + 10% FBS
		TBCN6	Explant, eCCC, Lebermetastase	DMEM + 10% FBS
2005	Sripa ¹²⁷	KKU-100	Explant, Klatskin	Ham's F12 + 20% FBS + AA
2006	Rattana- singanchan ¹²⁸	RMCCA-1	Explant, eCCC	Ham's F12 + 20% FBS + AA
2007	Ma ¹²⁹	HKGZ-CC	Explant, iCCC	DMEM + 10% FBS + AA

2010	Ojima ¹³⁰	NCC-BD1	Xenograft/Explant, eCCC	RPMI 1640 + 10% FBS + AA
		NCC-BD2	Xenograft/Explant, eCCC	RPMI 1640 + 10% FBS + AA
		NCC-CC1	Xenograft/Explant, iCCC	RPMI 1640 + 10% FBS + AA
		NCC-CC3-1	Xenograft/Explant, iCCC	RPMI 1640 + 10% FBS + AA
		NCC-CC3-2	Xenograft/Explant, iCCC	RPMI 1640 + 10% FBS + AA
		NCC-CC4-1	Xenograft/Explant, iCCC	RPMI 1640 + 10% FBS + AA
2013	Liu ¹³¹	HCCC-9810	Explant, iCCC	DMEM + 10% FBS

iCCC: intrahepatisches Cholangiokarzinom; eCCC: extrahepatisches Cholangiokarzinom; HCC/CCC: gemischt hepatozelluläres/cholangiozelluläres Karzinom; FBS: fetales Kälberserum; AA: Antibiotika; Ham's F12: Ham's F12 – Medium; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium; RPMI 1640: Rosewell Park Memorial Institute – Medium; W/E: William's Medium E; CMRL: Connaught Medical Research Laboratories – Medium; α -MEM: Alpha – Minimal Essential Medium

Ein großes Problem des CCC stellen die schon im Kapitel 1.1 beschriebenen Klassifikationsunterschiede in verschiedenen Studien dar. Diese haben dazu geführt, dass sich in der Literatur immer wieder CCC-Zelllinien finden, welche bei genauerem Hinschauen eigentlich keine Zelllinien von Cholangiokarzinomen sind, sondern Gallenblasenkarzinome^{94,102}, Karzinome der Ampulla Vateri^{94,126} oder gemischte Karzinome aus HCC und CCC¹⁰³.

Diese falschen Zuordnungen der Tumorentitäten trugen dazu bei, dass es derzeit nur ungefähr 40 Zelllinien gibt, die sicher aus einem CCC etabliert wurden.

An den drei am häufigsten verwendeten CCC-Zelllinien TFK-1, EGI-1 und HuH-28 wurden bisher schon viele Studien durchgeführt.^{124,132–137} Viele der in Tabelle 5 aufgeführten CCC-Zelllinien wurden jedoch nach Veröffentlichung nicht weiter für publizierte Studien genutzt. Somit beruht ein Großteil des in der wissenschaftlichen Forschung erlangten Wissens zur Biologie und Morphologie von Cholangiokarzinomen auf Untersuchungen an weniger als fünf Zelllinien.

Aufgrund all der obengenannten Tatsachen ist die Etablierung neuer Zelllinien sinnvoll und notwendig, um valide Aussagen über die Beschaffenheit von Cholangiokarzinomen machen zu können.

1.2.2 Übliche Verfahren zur Charakterisierung von Zelllinien

Um Zelllinien adäquat zu charakterisieren, werden in der Literatur verschiedene Methoden angeführt.

Zuerst wird meist die Morphologie und das Wachstumsverhalten der Zelllinie betrachtet. Hierzu werden die Zelllinien zuerst ungefärbt und dann gefärbt mit dem Phasenkontrastmikroskop untersucht. Die gängigsten Färbungen sind hierbei die Hämatoxylin/Eosin-(HE)-Färbung, mit welcher saure bzw. basophile Strukturen, wie z.B. DNA, Zellkerne, Ribosomen und rER, von basischen bzw. acidophilen Strukturen, wie z.B. Proteine des Zytoplasmas, Mitochondrien, das sER und Kollagen, unterschieden werden können. Bei der May-Grünwald-Giemsa-Färbung werden Granula angefärbt und es kann das Verhältnis von Zytoplasma und Zellkernen betrachtet werden, was Hinweise zu Malignität beziehungsweise Benignität geben kann. Bei biliären Tumorzellen ist auch interessant zu wissen, ob die Zellen Mucus produzieren. Dazu kann die sogenannte PAS-Reaktion verwendet werden, die Mucopolysaccharide anfärbt. Durch einen Nachweis von Mucusproduktion können beispielsweise CCC-Zellen von HCC-Zellen unterschieden werden. Diese morphologischen Beobachtungen lassen schon viele Schlüsse über die Zellen und ihren zugehörigen Primarius zu.

Um genau zu wissen, ob die Zelllinie tatsächlich dem vermuteten Primarius entstammt, können mittels Immunhistochemie verschiedene tumorentitätspezifische Proteine untersucht werden. Hierzu werden meist Antikörper gegen Zytokeratine oder andere Intermediärfilamente verwendet, die für die entsprechende Tumorentität spezifisch sind. Die immunhistochemische Untersuchung der exprimierten Proteine kann auch noch beispielsweise durch einen Western Blot unterstützt werden, bei dem die Proteinexpression noch besser quantifiziert werden kann als bei der rein optischen Kontrolle mittels Immunhistochemie.¹³⁸

Um Mutationen in den Zellen der Zelllinie nachzuweisen, kann eine Chromosomenanalyse durchgeführt werden, welche jedoch eine etwas ältere Methode darstellt. Heutzutage wird häufiger eine Mutationsanalyse der am häufigsten vorkommenden Mutationen der entsprechenden Tumorentität durchgeführt.^{19,138}

1.3 Zielsetzung

Aufgrund der Seltenheit des Cholangiokarzinoms, seiner schlechten Prognose und aufgrund weniger verfügbarer Zelllinien erachteten wir es als wichtig, mehr cholangiozelluläre Primärzelllinien zur weiteren Erforschung der biologischen Diversität dieser Tumorentität zur Verfügung zu haben. Das Ziel unserer Studie war es, eine neue cholangiozelluläre Zelllinie zu etablieren, diese zu charakterisieren und mit schon vorhandenen Zelllinien zu vergleichen. Somit wollten wir zum weiteren Verständnis der Tumorbiologie des Cholangiokarzinoms beitragen und anderen Forschungsgruppen die Möglichkeit geben, an einer weiteren CCC-Zelllinie Studien durchzuführen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patienten

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg genehmigt (Aktenzeichen 2012-293N-MA). Nach Unterzeichnung einer Einverständniserklärung durch die Patienten zur Verwertung des Tumormaterials zu Forschungszwecken wurden folgende Patientengruppen für die Etablierung von CCC-Zelllinien eingeschlossen:

Patienten, die an einem CCC leiden, Patienten, die Metastasen eines CCC aufweisen, und Patienten, die aufgrund eines CCC malignen Aszites oder malignen Pleuraerguss aufweisen. Die Indikation zur Operation bzw. zur Punktion wurde stets auf klinischer Grundlage und durch einen Arzt gestellt. Die klinische Diagnose wurde anschließend durch das pathologische Institut der Universitätsmedizin Mannheim bestätigt. Falls es sich doch nicht um ein CCC handelte, wurde die Zellkultur verworfen.

2.2 Isolationsmethode

Die Primärkulturen wurden entweder aus operativ gewonnenem Tumormaterial hergestellt oder aus malignen Körperflüssigkeiten.

Die Gewebeentnahme aus dem Operationspräparat wurde von einer speziell geschulten medizinisch-technischen Assistentin oder von einem Chirurgen vorgenommen. Das Präparat wurde unter fließendem Wasser von groben Verunreinigungen befreit. Anschließend wurde das Präparat innerhalb von 45 min in einem sterilen konischen 15ml-Röhrchen (BD Falcon, Franklin Lake, New Jersey, USA) mit 5 ml CP-Medium, welches sich aus 500ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza, Basel, Schweiz), 100ml Fetal Bovine Serum (FBS, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) und 5ml Antibiotischer Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) zusammensetzt, ins Labor gebracht.⁹⁸ Hier wurde das Präparat aufgearbeitet, indem es in einer Sicherheitswerkbank (Hera Safe HS 12, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland) mit einem sterilen Einwegskalpell (Feather®, pfm medical, Köln, Deutschland) in 1-2mm³ große Stücke zerkleinert wurde. Je nach Größe des Präparates konnten in ein bis zwei 6 Well-Zellkulturplatten (Cellstar®, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen,

Deutschland) je drei bis sechs Gewebestücke pro Well verbraucht werden. Zur besseren Haftung der Gewebestücke trockneten diese etwas an. Als Indikator für die Trockenheit diente der Flüssigkeitssaum rund um das Gewebestück. Wenn dieser nicht mehr das Licht der Sicherheitswerkbank reflektierte, war das Gewebestück genügend an der 6-Well-Zellkulturplatte fixiert. Anschließend wurden mit einer 1000 µl Pipettenspitze (Eppendorf Research® Plus, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) 2ml CP-Medium und 1ml Keratinozyten-freies Medium (KSFM, Gibco® Life Technologies GmbH, Carlsbad, Kalifornien, USA) tröpfchenweise hinzugegeben. Diese Mischung aus CP-Medium und KSFM im Verhältnis 2:1 nennt sich „Dresden Medium“.⁹⁸ Um ein Abschwemmen der leicht angetrockneten Gewebestückchen zu vermeiden, geschah das Substituieren des Mediums sehr vorsichtig.

Punktionen von Körperflüssigkeiten fanden, wie oben bereits erwähnt, aufgrund klinischer Indikationen statt. Ungefähr 20ml des malignen Ergusses wurden in sterile konische 15ml-Röhrchen (BD Falcon) gegeben und innerhalb von 45 Minuten ins Labor gebracht. Dort wurde das Präparat verarbeitet, indem der Erguss in der Sicherheitswerkbank mit einer 1000 µl Pipettenspitze (Eppendorf Research® Plus) in zwei 6-Well-Zellkulturplatten (Cellstar®) gegeben wurde. Pro Well wurden 1000 µl maligner Pleuraerguss verwendet. Anschließend wurden mit einer 1000 µl Pipettenspitze pro Well 3ml „Dresden-Medium“ tröpfchenweise hinzugegeben.

Zum Schluss wurden die 6-Well-Zellkulturplatten stets in den CO₂-Inkubator (Heraeus BB 6220, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) gestellt, der standardmäßig auf 37°C und 5% CO₂ sowie 95% Luftfeuchtigkeit eingestellt war.

In der ersten Woche wurde die neue Kultur mindestens einmal täglich unter dem inversen Lichtmikroskop (Leica DM IRBE, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) betrachtet, um frühzeitig Kontaminationen bakterieller oder mykotischer Art begegnen zu können. Beim ersten Mediumwechsel wurde das alte Medium nicht verworfen, sondern in eine sterile Zellkulturflasche (Cellstar® Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) gegeben. In diese sogenannte „Backup“-Flasche wurde noch zusätzliches „Dresden Medium“ gegeben. Das hinzugegebene Volumen richtete sich nach der Menge des alten Mediums. Die Hälfte des Volumens des alten Mediums wurde durch frisches Medium ersetzt. Diese Zellkulturflasche diente als Sicherung, falls in der 6-Well-Zellkulturplatte Kontaminationen auftreten sollten.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Mediumwechsel

Alle zwei bis drei Tage, je nach Aktivität der Zellen und somit Verbrauch des Mediums, wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Dazu wurde die Zellkultur zuerst unter dem inversen Lichtmikroskop betrachtet, um einen Überblick über die Vitalität, das Wachstum und die Morphologie der Zellen zu erhalten. Eine mögliche bakterielle oder mykotische Kontamination hätte so ebenfalls entdeckt werden können. In der Sicherheitswerkbank mit Laminarflow wurde dann der Mediumwechsel durchgeführt. Zum Pipettieren wurden anfangs, als die Zellkultur noch instabil und die Zellen teilweise noch nicht komplett adhärent waren, Pipetten (Eppendorf Research® Plus, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) mit 1000 µl-Pipettenspitzen verwendet. Nach einigen Tagen wurden dann eine elektrische Pipettierhilfe (Eppendorf Easypet® 3, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und sterile serologische Pipetten (Corning Incorporated - Life Sciences, Durham, USA) mit den Volumina 25ml und 10 ml verwendet.

Für den Mediumwechsel wurde das alte Medium vorsichtig abpipettiert und durch frisches Medium ersetzt. Hierbei wurde stets die oben beschriebene Mischung aus CP-Medium und KSFM im Verhältnis 2:1 („Dresden Medium“) verwendet. Meist wurde kein kompletter Mediumswechsel durchgeführt, sondern nur die Hälfte des Mediums ausgetauscht, um allzu starke Schwankungen in der Zusammensetzung des Mediums zu vermeiden.

2.3.2 Kontaminationen und Fremdwuchs

2.3.2.1 Prävention von Kontaminationen

Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden Grundregeln des sterilen Arbeitens angewendet. Dazu wurden im Labor stets unsterile Handschuhe (Semperguard, Nitrile Powder Free, Semperit Technische Produkte GmbH, Wien, Österreich) getragen und die Zellkulturen vor jeder Manipulation lichtmikroskopisch auf Kontaminationen untersucht. Zur Prävention von Kontaminationen durch den Menschen wurden vor Arbeitsbeginn die Hände gewaschen und desinfiziert. Vor und nach dem Arbeiten wurden die Arbeitsflächen und Materialien mit dem Desinfektionspräparat Antifect® N

Liquid (Schülke, Norderstedt, Deutschland) behandelt. Zur Reduzierung der Keimzahl in der Raumluft wurde ultraviolettes Licht mit der Wellenlänge von 254nm für 30min je vor und nach Arbeiten in der Sicherheitswerkbank eingesetzt. Die Eppendorfpipettenspitzen wurden mit einem Autoklav (Systec GmbH, Wettenberg, Deutschland) sterilisiert.

2.3.2.2 Bakterielle Kontamination

Im Falle von leichten bakteriellen Kontaminationen in der ersten Woche wurden diese durch einen häufigeren durchgeführten Mediumwechsel bekämpft, da die Bakterien manchmal sensibel auf das dem Medium zugesetzte Antibiotikum reagierten. Eine weitere Möglichkeit der Bakterienbekämpfung war die Erhöhung der Antibiotikakonzentration im Medium auf 10ml oder eine gezielte Antibiotikagabe, 200µl pro Well, in die befallenen Wells. Jedoch ist eine bakterielle Kontamination aus verschiedenen Gründen, wie zum Beispiel der häufigen Resistenz der Erreger gegenüber Penicillin und Streptomycin, schwierig zu bekämpfen und sollte vorrangig durch angemessene Hygienemaßnahmen vermieden werden.¹³⁸ Je nach individueller Situationseinschätzung wurden kontaminierte Platten bzw. Zellkulturflaschen bei fehlendem Ansprechen auf Antibiotika zeitnah entsorgt, um ein Übergreifen der Kontamination zu verhindern.

2.3.2.3 Mykotische Kontamination

Falls es zu einer mykotischen Kontamination kam, wurden mit einer Eppendorf Pipette 2 µL Voriconazol (VFend, Pfizer, New York, USA) in jedes Well der 6-Well-Zellkulturplatte hinzugefügt. In den folgenden 6 Mediumwechseln wurden 2 µL VFend erneut hinzugegeben, um alle Sporen zu beseitigen. Wenn mit einer mykotisch kontaminierten Zellkultur gearbeitet wurde, sollte die Sicherheitswerkbank für 45min mit UV-Licht bei 254nm ausgeleuchtet werden, bevor mit anderen Zellkulturen weiter gearbeitet wird, um ein Ausbreiten der Kontamination zu vermeiden.¹³⁸

2.3.2.4 Fremdwuchs Fibroblasten

Ein häufiges Problem stellen Fibroblasten da. Um ein Überwachsen der Kultur durch Fibroblasten zu verhindern, wurden diese bei exzessivem Wachstum mit einem Einwegzellschaber (BD Falcon, Franklin Lakes, New Jersey, USA) oder einer Pipettenspitze unter visueller Kontrolle am Lichtmikroskop manuell entfernt. Nach diesem Vorgang wurde sofort ein Mediumwechsel durchgeführt, um ein erneutes Anwachsen der gelösten Fibroblasten zu verhindern.

Da Fibroblasten weniger adhärent sind als Tumorzellen, kann man alternativ zur mechanischen Methode auch mit Trypsin (0,25% Trypsin-EDTA, Gibco® Life Technologies GmbH, Carlsbad, Kalifornien, USA) arbeiten, um die Anzahl der Fibroblasten zu verringern. Jedoch ist hierbei zu beachten, dass das Trypsin nach dem Hinzufügen zur Zellkultur schon nach sehr kurzer Zeit wieder entfernt werden sollte, da sonst die Tumorzellen geschädigt werden können.¹³⁸ Die Wirkung von Trypsin wurde daher unter dem Lichtmikroskop überprüft.

2.3.3 Passagieren

Wenn die gesamte Fläche eines Wells oder einer Zellkulturflasche mit adhärenen Zellen bedeckt war, wurde die Kultur passagiert, da ansonsten die Proliferationsrate der Zellen abgesunken wäre und dies eventuell zum Absterben der Kultur geführt hätte. Um die Zellkultur zu passagieren, wurde das alte Medium abpipettiert und die Zellkultur mit auf 37°C vorgewärmtem Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, Gibco® Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA) dreimal gewaschen. Anschließend wurde vorgewärmtes 0,25 prozentiges Trypsin-EDTA in die Kultur gegeben, sodass ein dünner Flüssigkeitsfilm den Boden vollständig bedeckte. Trypsin spaltet die Adhärenzproteine, mit denen die Zellen an der Plastikoberfläche anhaften, EDTA bindet die zweiwertigen Kationen, welche zur Stabilisierung der Adhärenzproteine beitragen.

Die Zellkulturflasche oder 6-Well-Zellkulturplatte wurde einige Sekunden geschwenkt und dann für einige Minuten in den Inkubator gestellt. Lichtmikroskopisch wurde dann die Ablösung der Zellen beobachtet. Wenn sich alle Zellen abgelöst hatten, wurde das Trypsin mit den abgelösten Zellen mit einer Pipette abgezogen und in ein 15ml-Röhrchen (BD Falcon) gegeben. Zur Neutralisierung des Trypsin/EDTA-Gemisches,

welches bei zu langer Inkubation zur Zellschädigung bzw. zum Zelltod geführt hätte, wurde das 15ml-Röhrchen mit CP-Medium aufgefüllt. Anschließend wurde es bei 1500rpm und 20°C für 5 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge Rotanta 96 RC, Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet vorsichtig mit CP-Medium resuspendiert und anschließend in ein Well einer 6-Well-Zellkulturplatte oder in eine Zellkulturflasche überführt. Abschließend wurden pro Well 2ml und pro Zellkulturflasche 12ml neues „Dresden-Medium“ hinzugefügt.

Teilweise wurde die alte Zellkulturflasche wieder mit „Dresden-Medium“ aufgefüllt, da manchmal noch kleinere Kolonien in der Flasche verblieben waren und nach Mediumzugabe die Zellkultur so vervielfältigt werden konnte.

2.3.4 Einfrieren, Auftauen und Qualitätskontrolle

Vor dem Einfrieren wurde die Zellkultur lichtmikroskopisch auf Kontaminationen und ihre Vitalität überprüft, der letzte Mediumswechsel davor lag weniger als 24 Stunden zurück. Wie beim Passagieren wurden die Zellen trypsinisiert und die Zellsuspension wurde in ein 15ml-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 1500rpm und 20°C 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 1500µl Einfriermedium, welches aus 5ml CryoSure-DMSO (WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach, Deutschland), 15ml FBS und 30ml CP-Medium bestand, pro zu befüllendem Kryoröhrchen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) resuspendiert. Je nach Zelldichte der trypsinisierten Flasche wurden 3-5 Kryoröhrchen befüllt. In jedes vorbeschriftete 1,8ml Kryoröhrchen wurden 1500µl Einfriermedium mit suspendierten Zellen gegeben. Die Kryoröhrchen wurden in einer Einfrierbox (Nalgene Cryo Freezing Container, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in einen -80°C Tiefkühlschrank gestellt. Durch die mit Isopropanol gefüllte Einfrierbox wird ein standardisiertes Herunterkühlen von 1°C pro Stunde gewährleistet. Innerhalb von 2 Wochen werden die eingefrorenen Zellkulturen in einen Flüssigstickstofflagerbehälter überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die aufgetaute Zellkultur in einem 15ml-Röhrchen mit 10ml CP-Medium vermischt, um eine Verdünnung des zytotoxischen Agens DMSO zu erreichen. Dieses Röhrchen wurde dann zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 2ml CP-Medium

resuspendiert und in ein Well einer 6-Well-Zellkulturplatte gegeben. Abschließend wurde die Zellkulturplatte im Brutschrank inkubiert.

Im Rahmen einer Qualitätskontrolle wurden von der eingefrorenen Zellkultur regelmäßig stichprobenartig einzelne Kryo-Röhrchen aufgetaut, um die Vitalität der Zellkultur zu überprüfen.

2.4 Zellmorphologie

Das Wachstumsverhalten und die Zellmorphologie der Kulturen wurden *in vitro* mit einem Phasenkontrastmikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) beurteilt. Die Zellen wurden mit Hämatoxylin-Eosin, May-Grünwald-Giemsa und PAS (Periodic acid-Schiff reaction) gefärbt. Die Fixierung und Färbung wurde freundlicherweise von OA Dr. T. Gaiser aus dem Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Mannheim durchgeführt.

2.4.1 Fixierung

Zuerst wurde eine Zellkulturflasche trypsiniert und die in Trypsin gelösten Zellen zentrifugiert, bis ein Zellpellet am Grund des 15ml-Röhrchens zu sehen war (Verfahren siehe 2.3.4). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 2ml DPBS bedeckt. Nach circa einer halben Stunde wurde das Pellet in Formalin fixiert. Die Einbettung erfolgte nach 24-stündiger Fixierung in laborüblicher Paraffintechnik. Das Gewebe wurde dazu mit Paraffin durchtränkt und im Anschluss plan in einem Paraffinblock eingebettet. Nach Aushärten der Blöcke wurden mit einem Schlittenmikrotom 3-5 µm dünne Serienschnitte angefertigt.

2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung stellt eine Routinefärbung in der konventionellen Histologie dar. Ziel ist die Darstellung von Gewebestrukturen im Organschnitt durch den Kernfarbstoff Hämatoxylin und Kontrastierung durch den Plasmafärbstoff Eosin.

Vor der Färbung musste der Schnitt entparaffiniert werden.

Dazu wurde der Schnitt mit einer absteigenden Alkoholreihe (Xylol) drei Mal fünf Minuten und zuletzt noch einmal mit Aqua dest. inkubiert. Für die Färbung wurde

zuerst eine Hämalaunlösung nach Mayer (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verwendet. In der Hämalaunlösung wurde der Schnitt 10 Minuten lang inkubiert. Danach erfolgte eine fließende Wässerung für 10 Minuten. Mit 1% Eosin wurde dann fünf Minuten inkubiert und dann wiederum fünf Minuten mit Wasser gespült. Abschließend wurde der Schnitt mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (Xylol: 80%, 96%, 100%) inkubiert und dann eingedeckt.

2.4.3 May-Grünwald-Giemsa-Färbung

Die May-Grünwald-Giemsa-Färbung, oder auch Pappenheim-Färbung genannt, besteht aus der Kombination von zwei Färbelösungen. Die May-Grünwald-Lösung besteht aus einer Mischung von mit Eosin angesäuertem Methylenblau und Methanol, die in Wasser gelöst wird. Die Giemsa-Lösung besteht aus einer Mischung der Farbstoffe Azur-A-Eosinat, Azur-B-Eosinat, Methylenblau-Eosinat und Methylenblauchlorid, in einer Mischung aus Methylalkohol mit Glycerin als Stabilisator. Die May-Grünwald-Giemsa-Färbung dient der Darstellung basophiler, eosinophiler und neutraler Granula, des Zytoplasmas und der Zellkerne.

Für die May-Grünwald-Giemsa-Färbung wurde ein Well einer 6-Well-Platte trypsinisiert und die Zellsuspension zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit PBS resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurde dann ein Tropfen auf einen Objektträger gegeben. Anschließend wurde der Objektträger nach der Trocknung nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt. Dazu wurde der Objektträger mit May-Grünwald-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) bedeckt. Nach drei Minuten wurde mit Aqua dest. gespült. Daraufhin wurde verdünnte Giemsa-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben und 20 Minuten lang inkubiert. Abschließend wurde noch einmal mit Aqua dest. gespült, und nach der Trocknung konnte der Objektträger und dem Phasenkontrastmikroskop begutachtet werden.

2.4.4 PAS-Reaktion

Die PAS-Reaktion dient der Anfärbung von Kohlehydraten wie Glykogen, Cellulose, neutralen Mukopolysacchariden, Muko- und Glykoproteinen sowie Glykolipiden. Zur Gegenfärbung der Zellkerne wird mit Hämalaun gefärbt.

Tabelle 7 Verwendete Lösungen bei der PAS-Reaktion

Lösungen	Inhaltsstoffe
1% wässrige Periodsäure	3g Periodsäure (Merck) 300ml Aqua dest.
Schiffs-Reagenz (Sigma)	1% Pararosanilin 4% Natriummetabisulfate Gelöst in 0.25 mol/l Salzsäure
Hämalaun nach Mayer	Färbelösung 1 (Apotheke) Mayers Hämalaunlösung (Merck) Im Verhältnis 1:1

Zuerst wurde der Schnitt mit einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Dann wurde für fünf Minuten in 1% wässriger Periodsäure inkubiert und danach in Aqua dest. gespült. Daraufhin wurde für fünf Minuten das Schiffs-Reagenz hinzugefügt und danach für circa fünf Minuten fließend gewässert (Leitungswasser). Zur Gegenfärbung der Kerne wurde dann für fünf Minuten in Hämalaun nach Mayer inkubiert und anschließend wieder fließend gewässert, wodurch die Bläungsreaktion ausgelöst wurde. Abschließend wurde mit einer aufsteigenden Xylolreihe inkubiert und wasserfrei eingedeckt.

2.5 Zellverdopplungszeit

Um die Zellverdopplungszeit zu ermitteln, wurden die Zellen aus einer frisch trypsinierten Zellkultur gezählt. Dazu wurden zuerst in sieben 6-Well-Platten 50.000 Zellen pro Well ausgesät. Nach 24 Stunden wurden dann die Zellen der ersten 6-Well-Platte mit Trypsin von der Platte gelöst (Verfahren siehe **2.3.3**) und die Zellen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer (Karl Hecht „Assistent“ GmbH, Altnau, Schweiz) gezählt. Dazu wurde die Zellsuspension eines jeden Wells in der Sicherheitswerkbank gut durchmischt, bevor 100µl davon in ein steriles Safe Lock Tube 2ml (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt wurden. Am Lichtmikroskop wurde das Deckglas auf die vorher gereinigte Neubauer-Zählkammer aufgesetzt. Anschließend wurde das Deckglas mit leichtem Druck parallel zur Oberfläche an die Kammer gedrückt, bis Newtonsche Ringe erkennbar waren. Mit einer 200µl Pipette (Eppendorf) wurden dann

20µl der Zellsuspension aus dem Eppendorf Tube entnommen und vorsichtig an den Rand des Deckglases pipettiert, bis das Volumen unter dem Deckglas gerade gefüllt war. Unter dem Mikroskop wurden bei dieser Methode mit 5-facher Vergrößerung nacheinander vier Eck-Großquadrate mäanderförmig ausgezählt, von denen jedes in 16 Kleinquadrate unterteilt war. Aus den in den vier Eck-Großquadraten gezählten Zellzahlen wurde der Mittelwert errechnet und dann mithilfe der Formel *Zellkonzentration = Zellzahl/Volumen des Mediums* ($c = N/V$) die Zellkonzentration berechnet. Um eventuelle Mängel bei der Durchmischung der Zellsuspension zu beseitigen, wurde jede Zählung und Berechnung dreimal durchgeführt und aus den drei Ergebnissen der Mittelwert berechnet.

Dieses Verfahren wurde alle 24 Stunden für fünf Tage durchgeführt. Das Zellkulturmedium wurde nach zwei Tagen vorsichtig gewechselt. Aus den fünf Zellkonzentrationen wurde anschließend die Verdopplungszeit der Zellpopulation mithilfe folgender Formel berechnet:

$$v = \lg N - \lg N_0 / \lg 2 (t - t_0), \text{ Verdopplungszeit} = 1/v.$$

2.6 Western Blot

Die Proteinanalyse wurde in freundlicher Zusammenarbeit mit Honglei Weng, PhD aus der II. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Mannheim durchgeführt.

Zuerst wurde das Totalprotein auf Eis extrahiert, und zwar mittels eines Radioimmunopräzipitationsassay(RIPA)-Puffers (1× Tris-Puffer-Kochsalzlösung, 1% Nonidet P40, 0.5% Natriumdeoxycholat und 0.1% Natriumdodecylsulfat). Protease- und Phosphataseinhibitoren (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wurden zum RIPA-Puffer hinzugefügt, bevor dieser nach Herstelleranweisung verwendet wurde. Die Proteinkonzentration des Totalproteinlysates wurde mithilfe der Bradford-Methode und eines Bio-Rad-Proteinassays bestimmt. Das Totalproteinlysate wurde in einem Ladepuffer mit Dithiothreitol 50mM (Sigma-Aldrich) im Verhältnis 1:4 aufgearbeitet. 20µg des im RIPA-Puffer gewonnenen Totalproteinlysates wurde mit Gelelektrophorese auf einem 12%-SDS-PAGE-Gel (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), NuPAGE® Novex Bis-Tris Gels 1.0 mm, 10-Well-SDS Gel (Invitrogen, Carlsbad, USA) aufgetrennt. Die Elektrophorese der Proteine

wurde mit NuPAGE MOPS Running Buffer 20X (Invitrogen) durchgeführt. Nachdem der Running Buffer eingefüllt wurde, wurden 3µl des SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard in den ersten Slot gefüllt und dann 20µg des Proteinlysates in jeden Slot pipettiert. Die Elektrophorese lief bei 200V konstant für ca. 35 Minuten.

Die Proteine wurden anschließend mit dem NuPAGE Transfer Buffer 20X (Invitrogen) auf eine Nitrozellulosemembran, MF Protran BA 83 0,2µm (Schleicher&Schuell BioScience, München, Deutschland), transferiert. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde die Membran mit einer 5%-Blocklösung (5% Top Block von Sigma-Aldrich GmbH) für phosphorylierte Proteine, 5% Magermilchpulver für unphosphorylierte Proteine und 5% BSA für empfindliche Proteine) eine Stunde lang inkubiert. Die Verdünnung erfolgte mit TBST (Tris-buffered saline with Tween 20), bestehend aus 100ml 10X Tris, 890ml Aqua dest. und 10ml Tween20 (Bio Rad, Hercules, Kalifornien, USA).

Nach dem Blockvorgang wurden die primären Antikörper im Verhältnis 1:1000 mit der 5%-Blocklösung verdünnt und die Membran über Nacht bei 4°C in der Antikörper-Blocklösung inkubiert. Die verwendeten primären Antikörper sind in Tabelle 8 aufgelistet. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurden auch die sekundären Antikörper in der 5%-Blocklösung im Verhältnis 1:3000 verdünnt und die Membran für circa eine Stunde darin inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurden HRP (horseradish peroxidase)-gekoppelte Anti-Maus- und Anti-Kaninchen-Antikörper verwendet (Santa Cruz Biotechnology). Alpha-Tubulin wurde als Ladekontrolle (Verdünnung 1:5000) verwendet. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBST wurden die Proteine mithilfe von Luminol/Enhancer-Lösung und Peroxidpuffer im Verhältnis 2:1 visualisiert (Thermo Fisher, Rockford, USA). Zum Vergleich wurden humane Hepatozyten, die HCC-Zelllinie HepG2 und die CCC-Zelllinien HCCC-9810 und EGI-1 verwendet.

Tabelle 8 Verwendete primäre Antikörper beim Western Blot

Antikörper	Isotyp	Firma	Katalognummer
HNF-4α	Kaninchen	Cell Signaling	C11F12
Sox9	Kaninchen	Sigma	HPA001758
Cytokeratin 19 AK (A53-B/A2)	Maus	Santa Cruz Biotechnology	sc-6278

phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7)	Kaninchen	Cell Signaling	9145
STAT3	Kaninchen	Cell Signaling	9132
pERK	Maus	Santa Cruz Biotechnology	sc-7383
ERK ½	Maus	Santa Cruz Biotechnology	sc-135900
A-Tubulin	Kaninchen	Abcam	ab4074

HNF-4 α : Hepatocyte nuclear factor 4 α ; Sox9: Sex determining region Y-box 9; STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3; phospho-STAT3: phosphoryliertes STAT3; ERK: extracellular signal-regulated kinase; pERK: phosphoryliertes ERK; GapDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

2.7 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde in Zusammenarbeit mit OA Prof. Dr. Gaiser, Pathologisches Institut Universitätsklinikum Mannheim, durchgeführt.

Zuerst wurde eine Zellsuspension mit ungefähr 6×10^7 Zellen/ml hergestellt und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde für zehn Minuten in Methanol fixiert. Danach wurde das Pellet in Paraffin eingebettet. Nach der Einbettung und dem Erkalten der Blöcke wurden die Schnitte wie oben angegeben entparaffiniert. Vor der Inkubation mit den primären Antikörpern wurde zunächst ein pH9-Puffer im Dampfgerär erhitzt und die Schnitte dann ca. 15 Minuten darin gekocht. Danach wurde eine Target Retrieval Solution (Dako, Agilent Technologies, Glostrup, Dänemark, 1:10 verdünnt) ebenfalls erhitzt und die Schnitte darin ca. 35 Minuten gekocht. Dann wurden 500ml Aqua dest. in einen Druckkochtopf (Dako) gegeben und Küvetten mit pH6,1-Puffer (Dako) ohne Deckel mit den Schnitten dort hineingestellt. Nach mindestens 15 Minuten Abkühlzeit wurden die Schnitte für fünf Minuten in Proteinase K (Dako) bei 37°C inkubiert und danach mit Aqua dest. gespült.

Daraufhin wurden die Schnitte in TBS-Puffer (Dako) gespült und für fünf Minuten in Peroxidase Blocking Solution (Dako) inkubiert. Nach erneutem Spülen mit Aqua dest. wurden die Schnitte in TBS-Puffer gestellt. Nun wurden die Schnitte für 30 Minuten mit den Primärantikörpern inkubiert. In Tabelle 9 sind die verwendeten primären monoklonalen Antikörper aufgelistet. Danach wurde mit TBS-Puffer gespült und 15

Minuten mit Sekundärantikörpern (Dako Detektionskit Rel TM Peroxidase K5001) inkubiert. Nach erneutem Spülen mit TBS-Puffer wurde dann ca. acht Minuten in DAB-Chromogen (1ml Verdünnungspuffer + 0,02ml Chromogen) inkubiert und danach mit Leitungswasser gespült. Zur Kerngegenfärbung wurde fünf Minuten mit Hämalaun (Dako) inkubiert und dann in Leitungswasser gebläut. Abschließend wurde in einer aufsteigenden Xylolreihe inkubiert und mit Eukitt eingedeckt. Die Protein-Antikörper-Bindung wurde mit dem EnVision System-HRP-3,3'-Diaminobenzidin Chromogen Lösungssystem (Dako) visualisiert. Hämatoxylin/Eosin-, PAS- und Masson-Goldner-Färbungen wurden nach oben beschriebenen Protokollen durchgeführt.

Tabelle 9 Verwendete primäre Antikörper bei der Immunhistochemie

Antikörper	Firma	Verdünnung
P53	Dianova	1:500
CK7	Dako	1:2000
CK8-18	Dako	1:50
CK20	Dako	1:200

P53: Protein 53; CK: Cytokeratin

2.8 Chemosensitivitätstestung

Für eine Zellviabilitätsmessung nach Zytostatikagabe wurde die mitochondriale Aktivität der Zellen mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT)- Reduktionsassays^{139,140} gemessen. Der Nachweis der Zellvitalität mittels MTT-Assay beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Die Reduktion von MTT erfolgt durch mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen und durch Enzyme des Endoplasmatischen Retikulums. Anhand der mitochondrialen Aktivität nach Zytostatikagabe und der somit erfolgten Reduktion von MTT kann die Zellvitalität gemessen werden.¹³⁹

Es wurden jeweils drei verschiedene Konzentrationen von Irinotecan, Gemcitabin und Oxaliplatin verwendet. Die Konzentrationen der Irinotecan-Testreihe waren 13, 130 und 1300ng/ml. Die Konzentrationen von Gemcitabin waren 0,45, 4,5 und 45µg/ml. Die Konzentrationen von Oxaliplatin waren 1, 10 und 100µg/ml. Die gewählten

Konzentrationen wurden durch Literaturrecherche ermittelt.^{141–144} Für die Zellviabilitätsmessung wurde zuerst die Zellkonzentration der verwendeten Kultur mittels Zellzählung mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dann wurden in drei 96-Well-Platten 15.000 Zellen pro Well ausgesät und mit CP-Medium auf 100µl pro Well aufgefüllt. Nach 48 Stunden Inkubation im CO₂-Inkubator wurden dann pro 96-Well-Platte in jeweils fünf Wells 100µl einer Konzentration eines Zytostatikums pipettiert. Als Positiv-Kontrolle dienten fünf Wells mit Zellen und 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich GmbH). Als Referenz bzw. als Negativ-Kontrolle dienten unbehandelte Zellen mit CP-Medium. Das Pipettierschema der 96-Well-Platten ist in Abbildung 2 dargestellt. Nach 24 Stunden wurde die erste 96-Well-Platte getestet. Dazu wurden zuerst 100µl des Gemischs pro Well abgezogen und verworfen. Pro Well wurden dann 30µl MTT-Reagenz, bestehend aus 7,5mg/ml MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma-Aldrich GmbH) gelöst in PBS, hinzugegeben und die Platte wurde für vier Stunden wieder in den CO₂-Inkubator gestellt. Nach diesen vier Stunden wurden pro Well 70µl Stopplösung, bestehend aus 10g 10% SDS (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 99,4ml DMSO (Sigma-Aldrich GmbH) und 0,6ml 100% Essigsäure hinzugegeben. Nach kurzer Inkubation wurden die Absorptionen im Photometer (BioTek GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland) bei 570nm Wellenlänge gemessen und als relative Werte im Vergleich zu den unbehandelten Negativ-Kontrollen angegeben.

Abb. 2 Pipettierschema MTT-Assay

I1	I2	I3	G1	G2	G3	O1	O2	O3	Control (-)
I1	I2	I3	G1	G2	G3	O1	O2	O3	Control (-)
I1	I2	I3	G1	G2	G3	O1	O2	O3	Control (-)
I1	I2	I3	G1	G2	G3	O1	O2	O3	Control (-)
I1	I2	I3	G1	G2	G3	O1	O2	O3	Control (-)

Control (+)	Control (+)	Control (+)	Control (+)	Control (+)	I2 (pur)	G2 (pur)	O2 (pur)	X	X
----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	-------------	-------------	-------------	---	---

1: Niedrige Konzentration; 2: Mittlere Konzentration; 3: Hohe Konzentration; I: Irinotecan; G: Gemcitabin; O: Oxaliplatin; Control (+): Positivkontrolle mit Triton-X 1:100; Control (-): Negativkontrolle mit unbehandelten Zellen und CP-Medium; I2/G2/O2 pur: Mittlere Konzentration des jeweiligen Zytostatikums ohne Zellen; X: leere Wells

3 ERGEBNISSE

3.1 Patienten

Von 2013 bis 2015 wurden durch die oben genannten Einschlusskriterien neun Patienten des Universitätsklinikums Mannheim in die Studie eingeschlossen. Fünf Patienten wurden nachträglich ausgeschlossen, da sie histologisch nicht den Einschlusskriterien entsprachen. Ein Tumor stellte sich histologisch als hepatozelluläres Karzinom heraus, einer war eine kolorektale Lebermetastase, einer war ein Gallenblasenkarzinom und ein weiterer war ein undifferenziertes Karzinom der Leber. Ein Aszitesbefund stellte sich als frei von Tumorzellen heraus und wurde daher ebenfalls nicht weiter verwendet.

Tabelle 10 gibt einen Überblick über die Patientencharakteristika und die Zellkulturen.

Tabelle 10 CCC-Zellkulturen 2013-2015

Zellkultur- name	Tumor- klassifikation	Material- gewinnung	Datum	Alter/ Geschlecht
CCC-2	iCCC	OP (retropankrea- tische Metastase)	11.02.13	63 Jahre/m
CCC-3	eCCC (Klatskin)	OP (atypische Resektion einer hep. Metastase)	29.05.13	73 Jahre/w
CCC-5	eCCC (distal)	Pleurapunktion	19.09.13	58 Jahre/m
CCC-6	eCCC (Klatskin)	OP (Hemi- hepatektomie re.)	08.10.13	49 Jahre/w
CCC-8	iCCC	OP (Hemi- hepatektomie li.)	20.12.13	68 Jahre/m
CCC-9	iCCC	OP (Tri- segmentektomie)	20.12.13	59 Jahre/m
CCC-10	eCCC (Klatskin)	OP	04.01.14	58 Jahre/w
CCC-12	eCCC (Klatskin)	OP (Hemi- hepatektomie re.)	02.07.14	69 Jahre/w
CCC-14	iCCC	OP (Hemi- hepatektomie re.)	16.07.14	78 Jahre/w

iCCC: intrahepatisches Cholangiokarzinom; eCCC: extrahepatisches Cholangiokarzinom

Die meisten der Zellkulturen mussten nach einiger Zeit aufgrund von zu starkem Fibroblastenwuchs, Seneszenz der Tumorzellen oder fehlendem Anwachsen der Tumorzellen verworfen werden. Eine Kultur wies eine Pilzinfektion auf.

Unsere neue cholangiozelluläre Zelllinie CCC-5 wurde aus dem malignen Pleuraerguss eines 59-jährigen Patienten, der an einem distalen cholangiozellulären Karzinom litt, etabliert. Das primär metastasierte CCC (Bismuth I) wurde drei Jahre vor der Etablierung der Zelllinie diagnostiziert. Zu diesem Zeitpunkt konnten Carcinoembryonales Antigen (CEA) mit einem Wert von 7,4µg/l und CA 19-9 mit einem Wert von 18510kU/l nachgewiesen werden. Biliäre Stents wurden 14-mal gewechselt und der Patient erhielt zuerst eine Chemotherapie mit Gemcitabin und Cisplatin für sieben Monate. Nach gutem initialen Ansprechen auf diese Chemotherapie zeigte der Tumor eine Wachstumsprogression. Daraufhin wurde Cisplatin abgesetzt und eine Monotherapie mit Gemcitabin für 9 Monate angeordnet.

Nach dieser Periode erhielt der Patient Capecitabin und Oxaliplatin für weitere 12 Monate. Weitere sieben Monate wurde der Patient mit Mitomycin und Doxetacel behandelt. Der Patient wurde intermittierend mit photodynamischer Therapie behandelt.

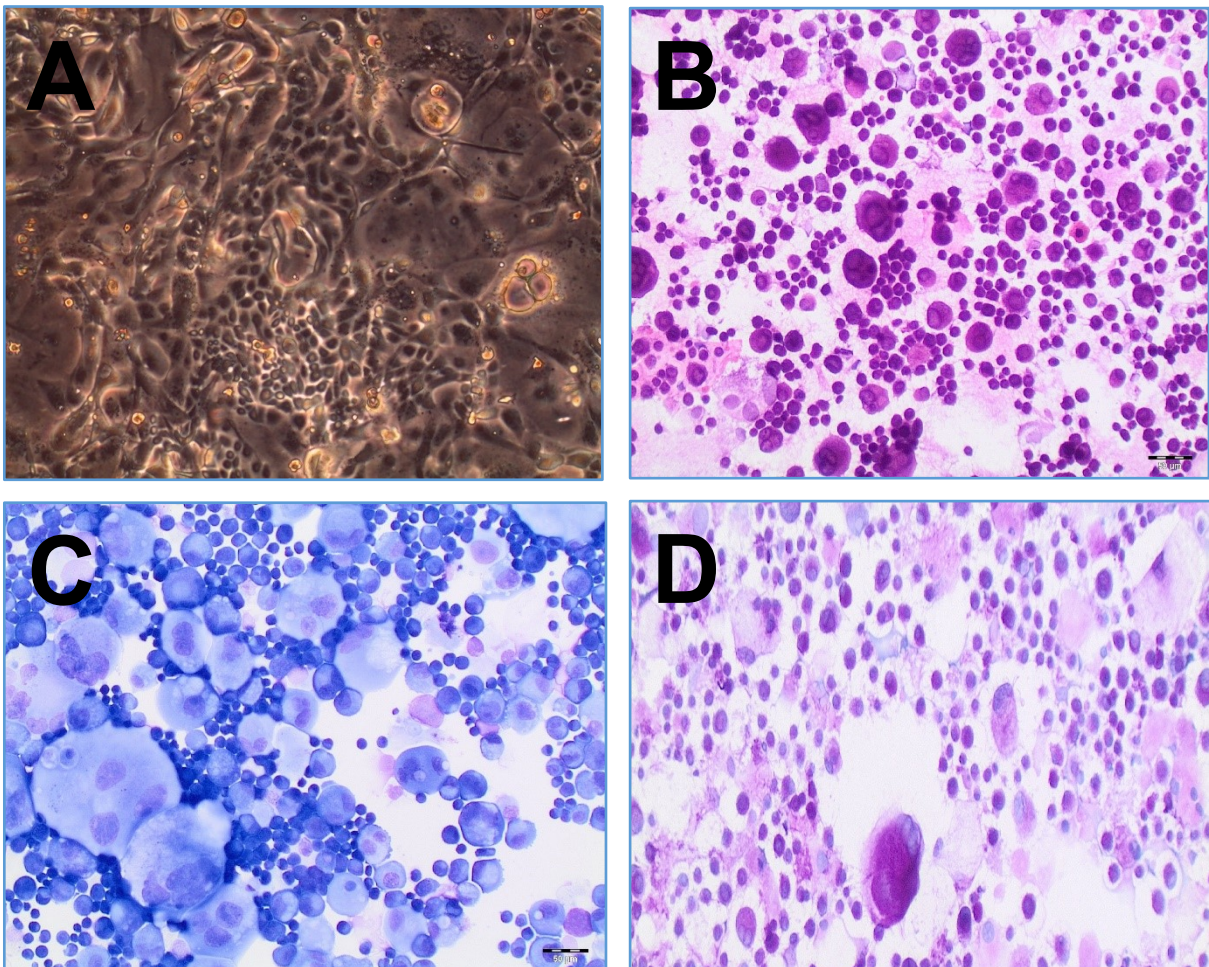
3.2 Zellmorphologie

Die Hämatoxylin/Eosin-, PAS- und die May-Grünwald-Giemsa-Färbungen sowie die mikroskopische Aufnahme ohne Färbung unserer Zelllinie CCC-5 sind in **Abbildung 3** dargestellt. Die Zelllinie wächst als typische epitheliale Zellkultur mit engem Zell-Zellkontakt in Kolonien. CCC-5 wächst in Monolayern im Pflastersteinmuster mit kleinen homogenen polygonalen Zellen mit zwischengelagerten großen Zellen. Man erkennt schon in der Abbildung ohne Färbung (**Abbildung 3A**), dass die Zellen von CCC-5 Zellkernatypien wie Anisonukleose und Pleiomorphie aufweisen. Es sind einige Mitosen zu erkennen. Auch ein sogenanntes "Budding" von Tumorzellen, die Abschnürung neuer Zellen während der Zellteilung, ist zu beobachten.

Bei der Hämatoxylin/Eosin-Färbung werden durch das Hämatoxylin alle sauren bzw. basophilen Strukturen blau gefärbt, z.B. DNA, Zellkerne, Ribosomen und rER, und durch das Eosin werden alle basischen bzw. acidophilen Strukturen rot gefärbt, z.B. Proteine des Zytoplasmas, Mitochondrien, das sER und Kollagen. In **Abbildung 3B** sind vor allem in den großen Zellen Polyploidien und große Nuklei zu beobachten. Die

May-Grünwald-Giemsa-Färbung stellt Granula und das Verhältnis zwischen Zytoplasma (hellblau) und Zellkernen (dunkelblau) dar. In **Abbildung 3C** kann so ein sehr geringer Anteil an Zytoplasma in den kleinen Zellen gezeigt werden, wohingegen die großen Zellen einen höheren Anteil an Zytoplasma aufweisen. Bei der PAS-Färbung werden saure Mucopolysaccharide blau, neutrale Mucopolysaccharide rotviolett und Zellkerne dunkelblau dargestellt. Zur Kontrastierung wird eine Kernfärbung mit Hämalaun durchgeführt. Somit können in **Abbildung 3D** prominente Zellkerne und Mucusproduktion in den Zellen von CCC-5 dargestellt werden.

Abb. 3 Histochemische Färbungen von CCC-5



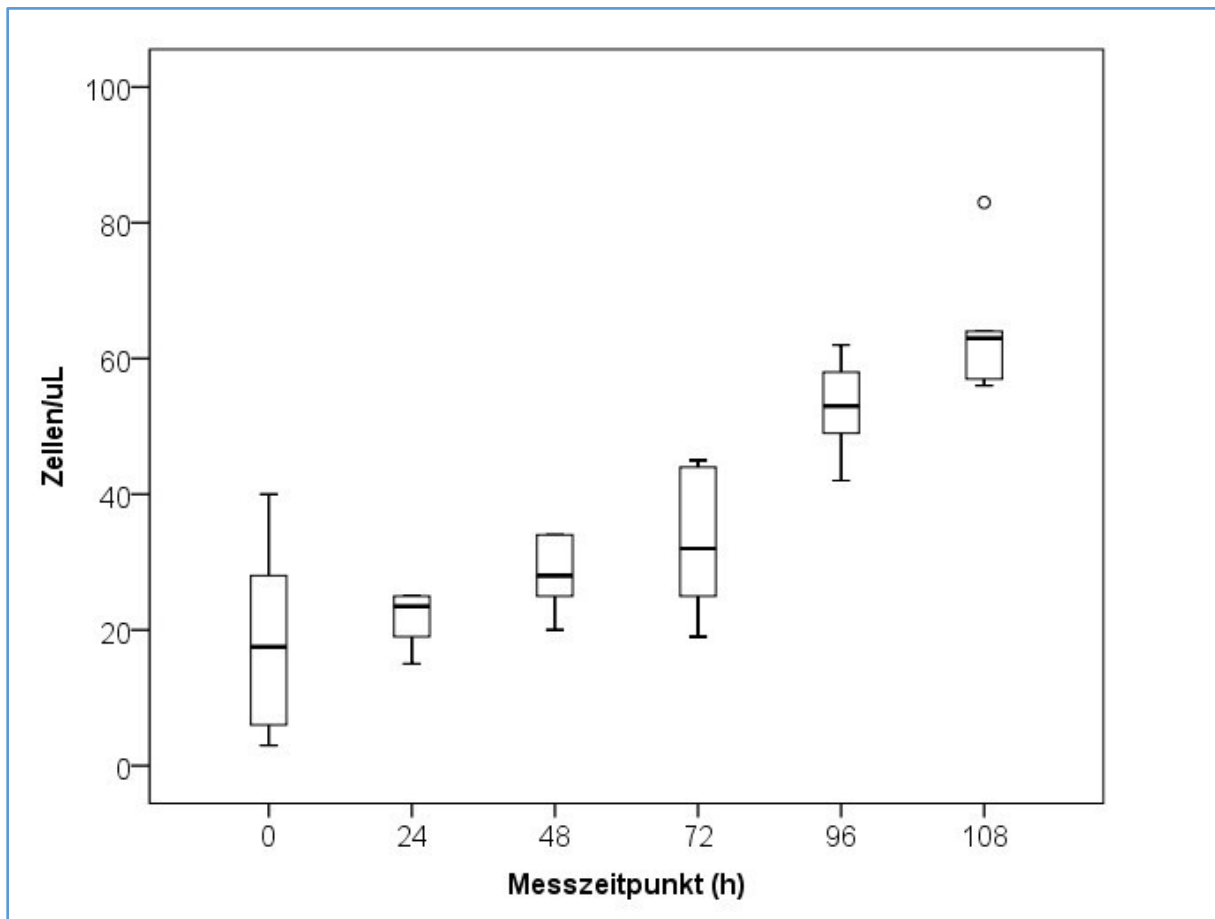
Die Bilder aus Abbildung 3 zeigen unsere neue cholangiozelluläre Zelllinie CCC-5.

A: ohne Färbung; B: Hämatoxylin/Eosin-Färbung; C: May-Grünwald-Giemsa-Färbung; D: PAS-Färbung

3.3 Zellverdopplungszeit

Die Ergebnisse der Messung des Zellwachstums sind in **Abbildung 4** dargestellt. Die mittlere Zellverdopplungszeit von CCC-5 betrug 60,5 Stunden.

Abb. 4 Zellwachstum von CCC-5



3.4 Western Blot

Im Western Blot wurde die Expression von Proteinen untersucht.

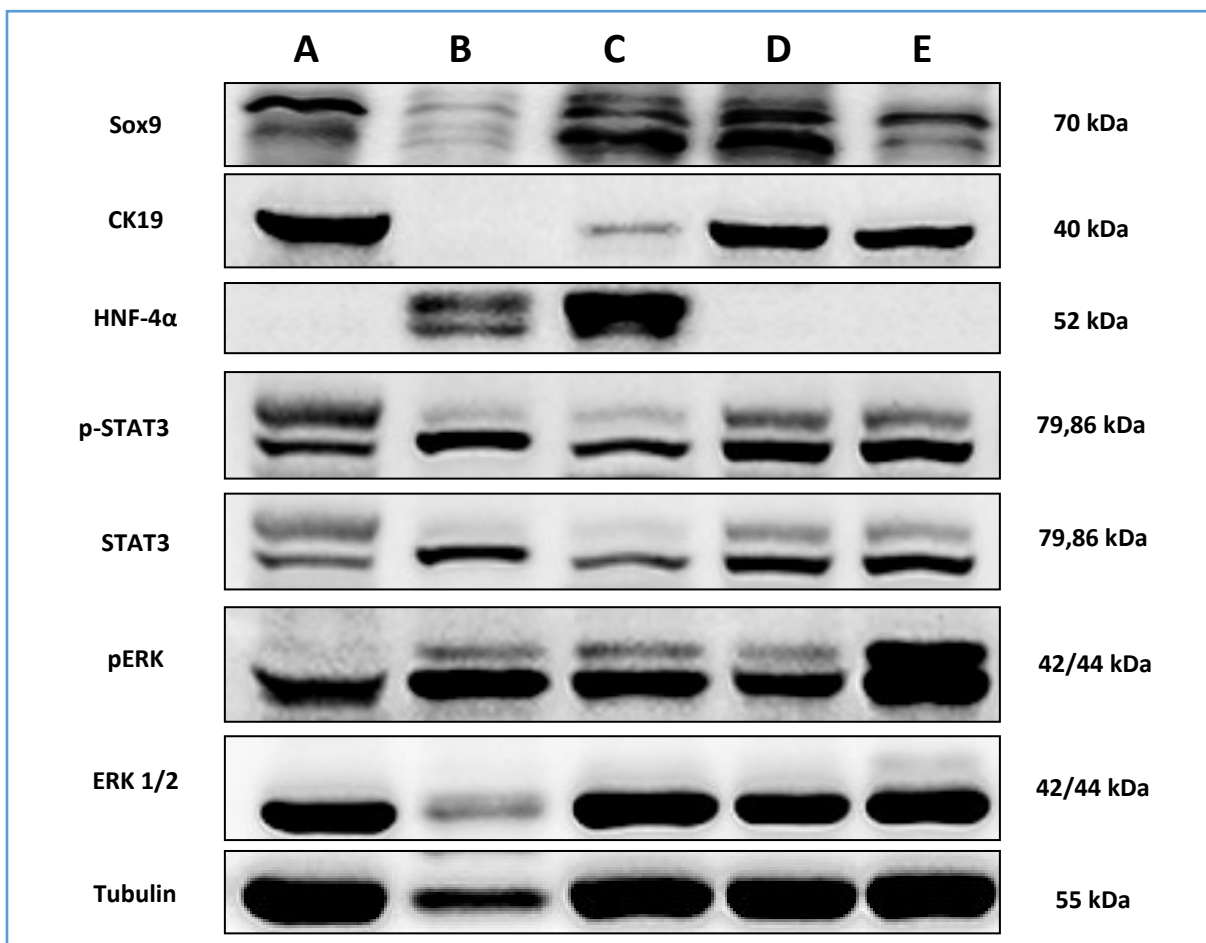
CCC-5 weist einige differierende Expressionen von Kandidatengenen im Vergleich zu den Kontrollen HCCC-9810, EGI-1, HepG2 und humanen Hepatozyten auf.

Abbildung 5 zeigt das Ergebnis des Western Blots.

Sox9 und unphosphoryliertes ERK werden in den Tumorzelllinien CCC-5, HCCC-9810, HepG2 und EGI-1 stark exprimiert, jedoch nicht in humanen Hepatozyten. CK19

ist in den CCC-Zelllinien CCC-5, HCCC-9810 und EGI-1 exprimiert. Bei HepG2 und humanen Hepatozyten zeigen sich keine Expressionen von CK19. Alle Zelllinien exprimieren p-STAT3 und STAT3, doch HepG2 und humane Hepatozyten zeigen deutlich geringere Expressionen als die CCC-Zelllinien. Alle Zelllinien exprimieren p-ERK. HNF-4 α ist positiv in humanen Hepatozyten und HepG2.

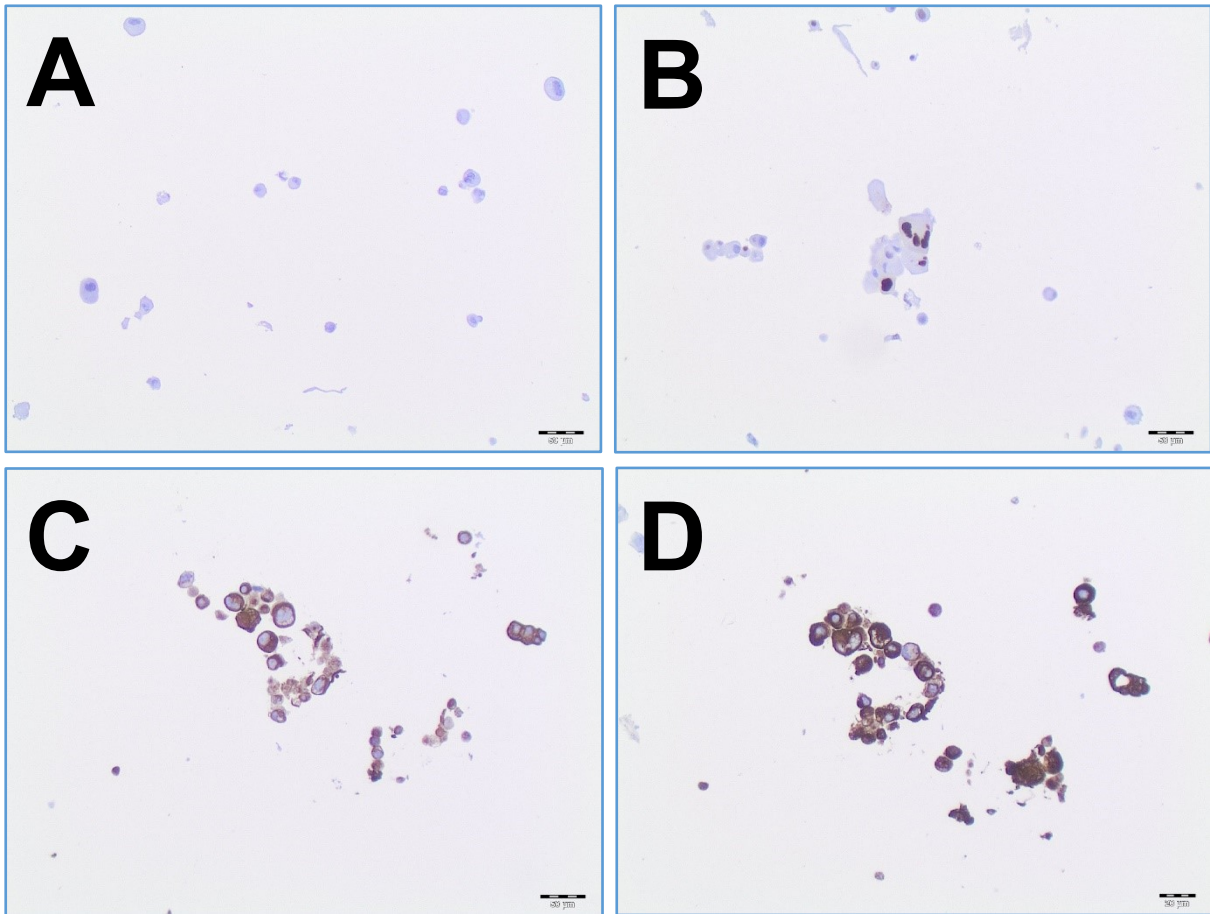
Abb. 5 Proteinanalyse von CCC-5



A: CCC-5; B: Humane Hepatozyten; C: HepG2; D: HCCC-9810; E: EGI-1

3.5 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen von CCC-5 ergaben keine Expression von CK20 (**Abb. 6A**). Die Expression von p53 war schwach, aber sichtbar (**Abb. 6B**). Die Expressionen von CK18-8 und CK7 waren dahingegen sehr deutlich sichtbar (**Abb. 6C** und **6D**).

Abb. 6 Immunhistochemische Färbungen von CCC-5

Die Bilder aus Abbildung 6 zeigen CCC-5 mit verschiedenen immunhistochemischen Färbungen. A: CK20; B: p53; C: CK 18-8; D: CK7

3.6 Chemosensitivitätstestung

Zur Messung der Chemosensitivität wurden jeweils drei verschiedene Konzentrationen der Chemotherapeutika Irinotecan, Gemcitabin und Oxaliplatin verwendet. Die Konzentrationen der Irinotecan-Testreihe waren 13, 130 und 1300 ng/ml. Die Konzentrationen von Gemcitabin waren 0,45, 4,5 und 45 µg/ml. Die Konzentrationen von Oxaliplatin waren 1, 10 und 100 µg/ml. Die Chemosensitivität wurde mittels MTT-Assay nach 24, 48 und 96 Stunden gemessen.

Dabei konnte lediglich in der Irinotecan-Gruppe ein statistisch signifikanter Abfall der relativen Zellviabilität nach 48 und nach 72 Stunden beobachtet werden.

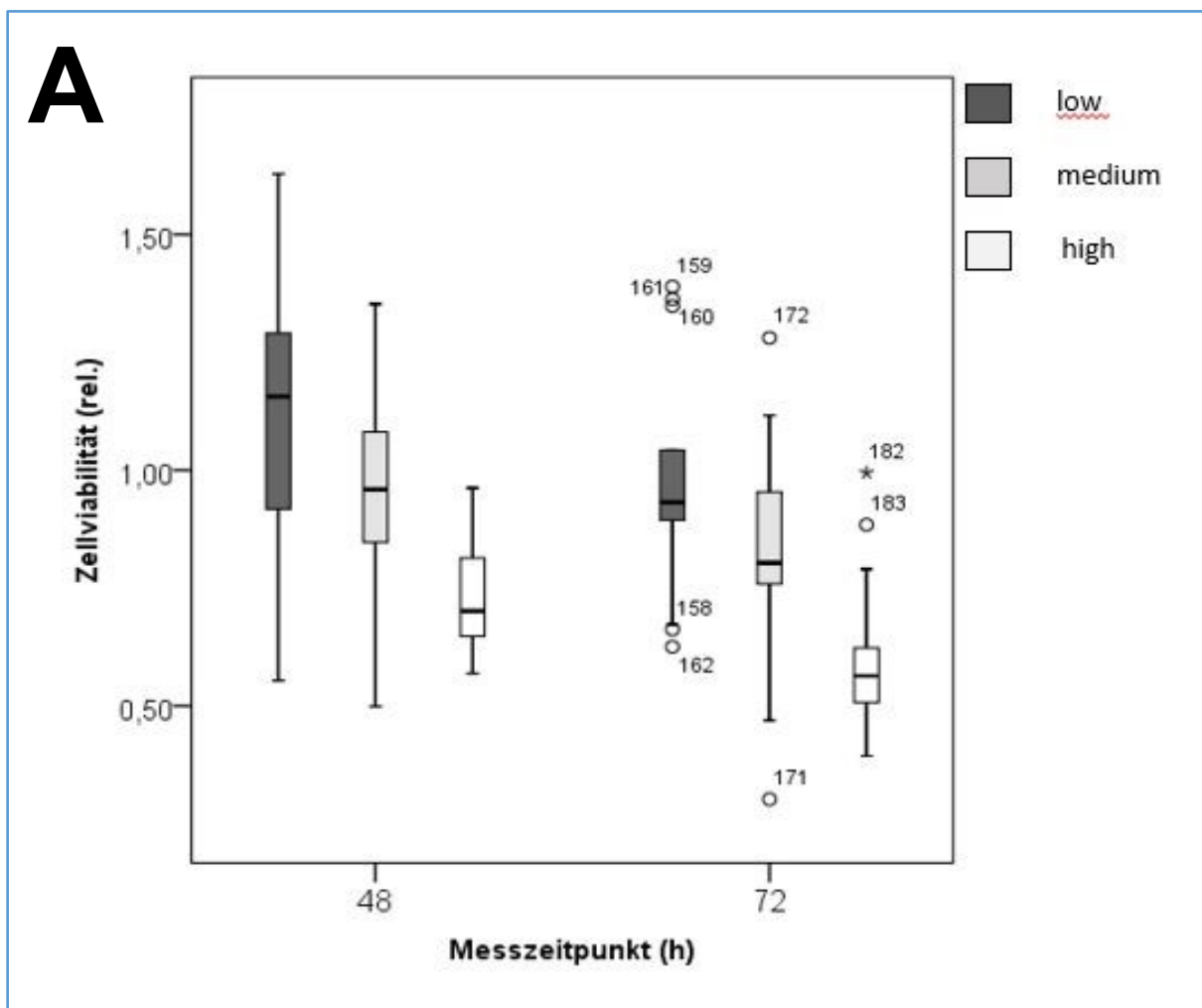
Nach 48 Stunden zeigte sich ein signifikanter Abfall der Zellviabilität bei der höchsten Konzentration von Irinotecan im Vergleich zur niedrigsten Konzentration ($p < 0,01$). Zu dieser Zeit zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen der höchsten

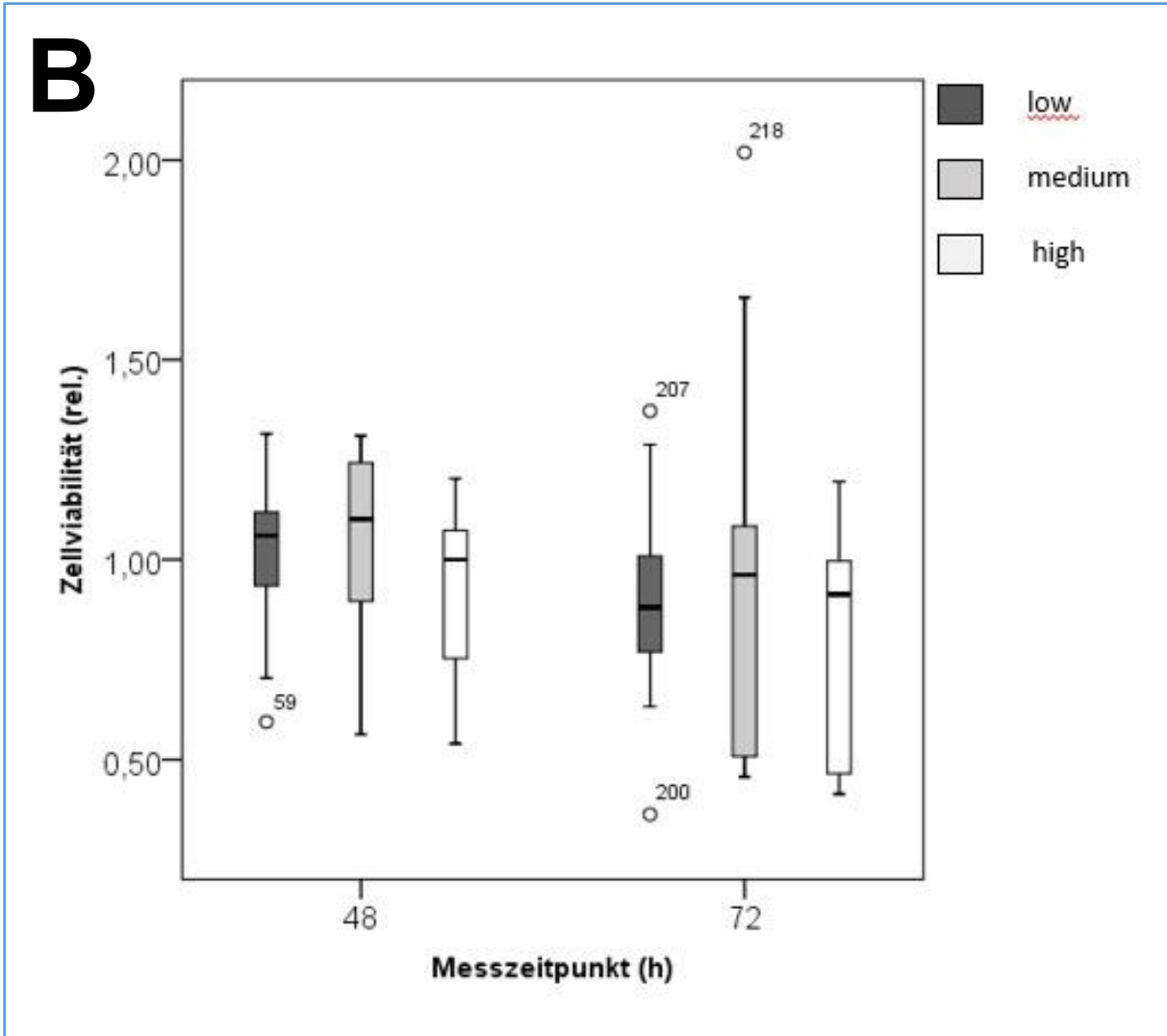
Konzentration von Irinotecan und den unbehandelten Zellen, welche als Negativ-Kontrolle verwendet wurden ($p=0,035$). In der Gemcitabin-Gruppe konnten nach 48 Stunden keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. In der Oxaliplatin-Gruppe ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen der höchsten und der niedrigsten Konzentration nach 48 Stunden.

Nach 72 Stunden konnten wiederum nur in der Irinotecan-Gruppe signifikante Abfälle der Zellviabilitäten zwischen der höchsten und der niedrigsten Konzentration nachgewiesen werden ($p<<0,01$). Ebenso zeigte sich nach 72 Stunden ein signifikanter Unterschied zwischen den Zellviabilitäten der Zellen, die der höchsten Konzentration von Irinotecan ausgesetzt waren, und der Negativ-Kontrolle ($p=0,04$). In der Gemcitabin-Gruppe und auch in der Oxaliplatin-Gruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Die Ergebnisse sind in **Abbildung 7** dargestellt.

Abb. 7 Chemosensitivitätstestung mittels MTT-Assay





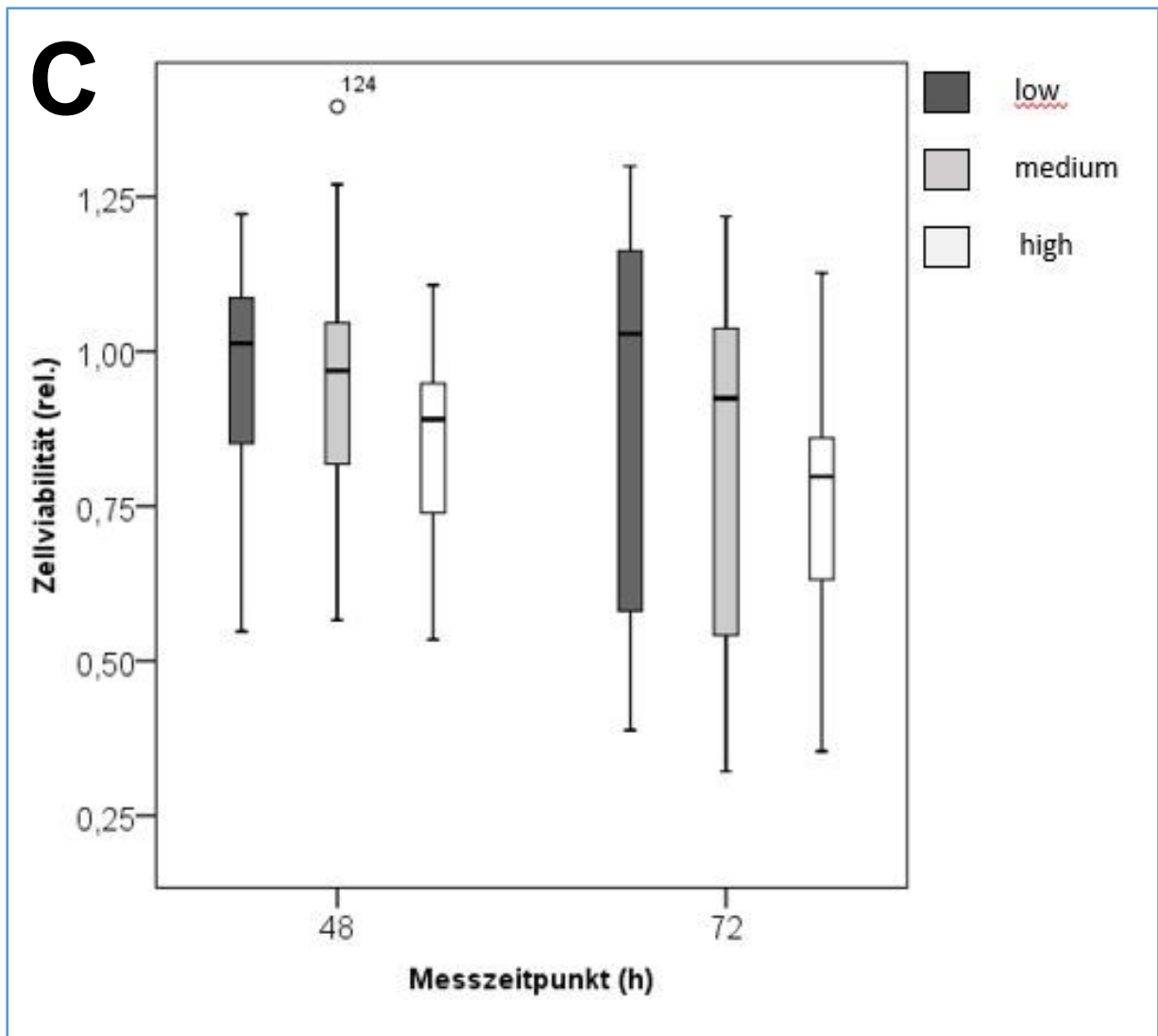


Abbildung 7 zeigt die relative Zellviabilität von CCC-5 nach Applikation verschiedener Chemotherapeutika nach 48 und nach 72 Stunden mittels MTT-Assay.

A: Irinotecan; B: Gemcitabin; C: Oxaliplatin; low: niedrige Konzentration des jeweiligen Chemotherapeutikums; medium: mittlere Konzentration des jeweiligen Chemotherapeutikums; high: hohe Konzentration des jeweiligen Chemotherapeutikums

4 DISKUSSION

Ohne Zelllinien wäre die onkologische Grundlagenforschung nicht möglich. Zwar können auch frische Tumorpräparate und Patientenblut zu Forschungszwecken genutzt werden, doch ist naturgegeben diese Ressource nicht unbegrenzt verfügbar und deshalb für wiederholte Versuche nicht geeignet. Zelllinien hingegen können immer wieder aufgetaut, kultiviert und vermehrt werden und stellen damit eine nahezu unbegrenzte Ressource dar. Jedoch haben Zelllinien durch wiederholte Passagen auch das Potential neue Mutationen zu entwickeln und zu akkumulieren. Dieser Vorgang nennt sich „Genetic Drift“. Dadurch sind die Zelllinien letztlich molekularbiologisch nur noch begrenzt mit dem Primarius vergleichbar. Außerdem sind mittlerweile viele Zelllinien kontaminiert mit aggressiv wachsenden Zellen aus anderen Zelllinien, wie zum Beispiel mit HeLa-Zellen.^{19,98} Somit sind Resultate von Analysen, die mit seit langer Zeit verwendeten Zelllinien gemacht werden, kritisch zu bewerten. Ein weiterer wichtiger Faktor in der Forschung ist die Tumoreheterogenität. Obwohl sich Tumoren derselben Tumorentität histologisch gleichen, zeigen sie zum Teil erhebliche Unterschiede in der molekulargenetischen Ausstattung. Dies wiederum bedeutet aber, dass eine geringe Anzahl Zelllinien nicht die genetische Heterogenität einer Tumorentität widerspiegeln kann. Durchgeführte Versuche lassen so nur sehr begrenzte Verallgemeinerungen auf die gesamte Tumorentität zu und sind somit in ihrer Aussagekraft eingeschränkt. Aus diesen Gründen wird die Etablierung neuer, primärer Zelllinien empfohlen. All diese Probleme potenzieren sich bei seltenen Tumorentitäten, wie zum Beispiel dem Cholangiokarzinom. Gerade bei seltenen Tumorentitäten gibt es nur sehr wenige Zelllinien, die zu Forschungszwecken genutzt werden können (**Tabelle 6**).

Aus diesen Gründen ist es besonders bei seltenen Tumorentitäten wichtig, neue Zelllinien zu etablieren und diese mit den schon vorhandenen zu vergleichen.¹⁹

Ziel dieser Studie war daher, eine neue cholangiozelluläre Zelllinie zu etablieren und strukturiert zu charakterisieren, damit diese bestmöglich mit schon vorhandenen CCC-Zelllinien verglichen werden kann. Mit einer weiteren, auch für andere Forschungsgruppen zugängliche CCC-Zelllinie sollten Studien ermöglicht werden, die gemeinsam mit den schon vorhandenen CCC-Zelllinien die genetische Heterogenität des CCC erforschen und so in der Zukunft eventuell neue Therapieansätze schaffen könnten.

Das Zellkulturlabor der Chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Mannheim etabliert seit 2012 zur Ergänzung der bereits verfügbaren Biobank Zelllinien aus chirurgischen Tumorpräparaten, Pleuraergüssen und Aszites.

Seit 2013 konnten neun Patienten in die Studie eingeschlossen werden. Die Tumorzellen wurden entweder aus frischen Tumorpräparaten oder aus malignen Ergüssen gewonnen. Aus einem malignen Pleuraerguss konnte unsere Zelllinie CCC-5 etabliert werden. Die anderen acht Zellkulturen gingen entweder in Seneszenz, wuchsen nicht an oder zeigten Kontaminationen, woraufhin sie verworfen wurden. Die Erfolgsquote von 11,1% unseres Zellkulturlabors bei der Etablierung von seltenen Tumorzelllinien ist damit vergleichbar mit früheren Studien zur Zelllinienetablierung.^{19,98}

Aus einem Pleuraerguss eines 59-jährigen Patienten mit einem primär metastasierten, distalen eCCC konnte die Zelllinie CCC-5 etabliert werden, welche daraufhin charakterisiert wurde. Das CCC des Patienten konnte histologisch nicht gesichert werden, doch wies der Patient bei Diagnose stark erhöhte CA19-9 Werte auf und das Karzinom konnte in der Bildgebung eindeutig als eCCC identifiziert werden.

Um die neue Zelllinie sinnvoll für die Grundlagenforschung nutzen zu können, erfolgte die weitere Analyse wichtiger Charakteristika. Zuerst musste morphologisch sichergestellt werden, dass es sich um ein Karzinom handelt. Dazu führten wir Färbungen und mikroskopische Untersuchungen durch. Auch die Abgrenzung zu einer Metastase einer anderen Tumorentität und die Differenzierung zwischen HCC und CCC waren zur weiteren Charakterisierung von CCC-5 nötig. Dazu führten wir eine Proteinanalyse mittels Immunhistochemie und Western Blot durch. Um die Zelllinie noch weiter zu charakterisieren, untersuchten wir zuletzt ihr Ansprechen auf verschiedene Chemotherapeutika. Dazu verwendeten wir einen MTT-Assay und die gängigen Chemotherapeutika Irinotecan, Gemcitabin und Oxaliplatin.

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Versuche mit der Literatur und mit früheren Zelllinien verglichen.

4.1 Morphologie

Die morphologischen Eigenschaften von CCC-5 entsprechen denen einer typischen Zelllinie eines Adenokarzinoms und entsprechen in vielerlei Hinsicht denen anderer CCC-Zelllinien. Die wenigen Zelllinien, die in der Literatur genau charakterisiert wurden, weisen wie auch CCC-5 ein epithelartiges Wachstumsmuster als Monolayer

auf.^{94,111,121,123,126} Das Wachstumsmuster des Monolayers ist typisch für Karzinome, da diese aus Epithelzellen bestehen, die über verschiedene Integrine stets starken Zell-Zell-Kontakt haben und daher im Gegensatz zu z.B. Sarkomen als eine konfluierende Schicht wachsen.

CCC-5 zeigt wie auch andere CCC-Zelllinien kleine homogene, polygonale Zellen mit wenig Zytoplasma und großen Zellkernen und zwischengelagerte größere Zellen.^{94,105,111,126} Die Zellkerne weisen häufig Atypien wie Anisonukleose und Pleiomorphie auf, was ein Zeichen für Malignität ist. In einigen Zellen sind Mitosen zu erkennen, doch nur in wenigen. Die wenigen Mitosen und die zwischengelagerten großen Zellen lassen darauf schließen, dass die Zelllinie eher langsam wächst. Dies stimmt mit der klinischen Beobachtung überein, dass der Patient, aus dessen Pleuraerguss CCC-5 etabliert wurde, ein Langzeitüberlebender ist. Auch die mittlere Verdopplungszeit der Zelllinie von 60,5 Stunden stimmt mit dieser Vermutung überein. Die in der Literatur beschriebenen Verdopplungszeiten von CCC-Zelllinien schwanken zwischen 29 und 180 Stunden, doch liegen die meisten Verdopplungszeiten unter 50 Stunden.^{94,99,101–103,105,111–113,115,117,121,122,126–129} Daher ist die Verdopplungszeit von 60,5 Stunden als normal bis lang einzustufen.

Die in der PAS-Reaktion nachgewiesene Mucusproduktion unserer Zelllinie ist typisch für eine CCC-Zelllinie, da Cholangiozyten im Gegensatz zu Hepatozyten Mucus produzieren und sezernieren. Dies stellt ein Kriterium zur Unterscheidung zwischen HCC und CCC dar.^{102,111,126,145}

Insgesamt lässt sich sagen, dass CCC-5 wichtige Merkmale aufweist, die für eine Karzinomzelllinie eines CCC typisch sind.

4.2 Proteinanalyse

Zur weiteren Charakterisierung von CCC-5 wurden mittels Immunhistochemie und Western Blot die Expression verschiedener Proteine untersucht.

Zytokeratine sind die wichtigsten Intermediärfilamente epithelialer Zellen. Da es über 20 Subtypen von ihnen gibt und diese in verschiedenen Organsystemen und in verschiedenen Tumorentitäten unterschiedlich häufig exprimiert sind, sind Zytokeratine gut zur immunhistochemischen Analyse von Karzinomen geeignet. Zwar gibt es zwischen verschiedenen Organsystemen Überlappungen im Zytokeratinmuster, doch einige Zytokeratine konnten in der Vergangenheit als

spezifisch für Organsysteme oder Karzinomarten identifiziert werden.^{145,146} Cholangiozyten exprimieren im physiologischen Zustand, unabhängig von ihrer Lokalisation im Gallengangsystem, die Zytokeratine CK7, CK8, CK18, CK19 und in geringem Ausmaß auch CK20. Hepatozyten dahingegen exprimieren meist kein CK7 und CK19. Im Falle eines Cholangiokarzinoms bleibt die Expression der Zytokeratine CK7, CK8, CK18 und CK19 häufig erhalten.¹⁴⁵

CCC-5 zeigt ein für ein Cholangiokarzinom typisches Zytokeratinmuster. Da nur ungefähr 17% aller CCC CK20 exprimieren, ist eine fehlende Expression dieses Zytokeratins bei CCC-5 nicht ungewöhnlich. Eine Expression von CK20 zusammen mit einer fehlenden Expression von CK7 würde eher auf eine Metastase eines Karzinoms des unteren Gastrointestinaltraktes hinweisen.^{146,147}

Es konnten starke Expressionen von CK7 und CK18 mittels Immunhistochemie und eine Expression von CK19 mittels Western Blot nachgewiesen werden. Dieses Zytokeratinmuster entspricht ebenfalls dem eines typischen Cholangiokarzinoms.

CK7 wird von 93% aller CCC exprimiert und ist zusammen mit CK19, welches in 86% aller CCC exprimiert wird, ein Hauptkriterium zur Unterscheidung zwischen HCC und CCC.¹⁴⁵ Kongruent zu diesen Angaben zeigte sich im Western Blot bei der HCC-Zelllinie HepG2 und den humanen Hepatozyten keine Expression von CK19. In der Literatur werden Häufigkeiten von CK7 bei HCC zwischen 8% und 21% angegeben.^{145,148} CK19 wird in der Literatur in unter 10% der HCC nachgewiesen.^{145,148} Zur Unterscheidung zu anderen Adenokarzinomen sind CK7 und CK19 jedoch allein nicht ausreichend, da sie auch zum Beispiel häufig in Adenokarzinomen des Magens, der Mamma oder des Pankreas exprimiert werden.^{145–}

148

CK18 wird in 80% aller neoplastisch transformierten Cholangiozyten nachgewiesen, jedoch auch in ungefähr 70% aller anderen Karzinome von Gallenblase, Pankreas, Leber, Lunge, Magen, Kolon, Nieren, Harnblase, Mamma und Ovar.^{145,147} Somit ist CK18 kein Unterscheidungskriterium zu anderen Karzinomarten, da dieser Zytokeratinsubtyp ein globaler Marker der epithelialen Differenzierung ist.

Durch das Zytokeratinmuster CK7+/CK20-/CK19+ ist die Unterscheidung zu einem HCC und auch zu einer kolorektalen Metastase deutlich nachgewiesen und es bestätigt die in der Literatur für ein CCC als typisch beschriebenen Expressionen von Zytokeratinen.

p53 ist ein Tumorsuppressor, der in gesunden Zellen nicht überexprimiert wird. In unserer Zelllinie konnte eine geringe Expression von p53 festgestellt werden.

Bei zellulärem Stress, wie zum Beispiel durch DNA-Schädigung hervorgerufen, wird p53 aktiviert und führt zu einem Zellzyklusarrest in den Zellzyklusphasen G1 oder G2. Durch diesen Zellzyklusarrest ist die Zelle in der Lage, DNA-Reparaturmechanismen zu aktivieren und die DNA-Schäden zu beseitigen. Ebenfalls kann die p53-Aktivierung zu einer Zellapoptose führen und so die Weitergabe von Mutationen verhindern. Bei einer p53-Mutation, welche am häufigsten eine Punktmutation ist, kann die Zellproliferation nicht mehr kontrolliert und die DNA-Reparatur nicht mehr aktiviert werden. Dies führt zu instabilen und apoptoseresistenten Zellen, die zu Tumorzellen entarten können. In 40-45% aller Karzinome kann eine solche p53-Mutation detektiert werden. Sie ist damit die häufigste genetische Veränderung in Karzinomen.^{149,150}

Für Cholangiokarzinome werden unterschiedliche Häufigkeiten der p53-Expression in der Literatur genannt. Generell ist jedoch deutlich, dass CCC weniger häufig p53-Mutationen und aberrante Expressionsmuster aufweisen als beispielsweise Kolon-, Magen-, Lungen-, Ösophagus- oder Gallenblasenkarzinome (zwischen 60 und 70%).^{149,151} Die Häufigkeiten von p53-Mutationen und -Überexpressionen bei CCC schwanken in der Literatur zwischen 18 und 48%.^{145,152–155} Eine Überexpression von p53 zeigt sich nur bei Cholangiokarzinomen und noch nicht bei den Karzinomvorstufen. Eine starke p53-Überexpression zeigt sich bei CCC vor allem in späteren Stadien und bei aggressiven Tumoren.^{145,156} Somit konnte p53 als unabhängiger Prognosefaktor für CCC identifiziert werden, da eine p53-Überexpression bei CCC-Patienten meist mit einem späten Tumorstadium und einer ungünstigen Tumorhistologie assoziiert ist.¹⁵² Zwischen iCCC und eCCC gibt es ebenfalls häufig Unterschiede in der p53-Expression. Simbolo *et al.* erläuterten 2014 in ihrer Studie, dass nur 8,6% der iCCC eine p53-Mutation aufwiesen. Dahingegen waren es bei eCCC 17,5%.¹⁵² Und sogar innerhalb der eCCC konnten Unterschiede der p53-Expressionen nachgewiesen werden, da Diamantis *et al.* in ihrer Studie herausfanden, dass je distaler das eCCC liegt, die aberranten p53-Expressionen steigen.¹⁵⁷ Somit lässt sich vermuten, dass die Häufigkeit einer aberranten p53-Expression bei einem CCC mit der Entfernung zum Leberparenchym steigt.

All diese Studien unterstützen die Aussage, dass es sich bei der mäßigen Expression von p53 in unserer neuen Zelllinie CCC-5 um einen typischen Befund handelt. CCC-5 wurde aus einem eCCC eines langzeitüberlebenden Patienten etabliert. Ein Vergleich

mit den bisher in der Literatur erschienenen Zelllinien ist schwierig, da nur zwei dieser Studien die p53-Expression untersuchten. Jedoch konnten auch Ojima *et al.* und Ku *et al.* bei all ihren Zelllinien eine p53-Expression nachweisen.^{94,130}

Weiterhin erfolgte die Analyse von Sox9 (Sex-determining region Y-box gene 9), einem Zielgen des Notch-Signalweges. Sox9 ist als Protoonkogen bekannt und konnte schon in mehreren Tumorentitäten nachgewiesen werden.^{158–160} Die Rolle des Notch-Signalwegs in der embryonalen Differenzierung von Gallengängen und in der Karzinogenese verschiedener Tumorentitäten wurde in den letzten Jahren vielfach untersucht.^{161–163} Der Notch-Signalweg führt über Zell-Zell-Kommunikation zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Bindet ein Notch-Ligand an seinen Rezeptor, führt dies zur proteolytischen Abspaltung der Notch-Intrazellulär-Domäne (NICD). Diese transloziert dann in den Nukleus, wo sie an das DNA-bindende Rekombinations-Signal-bindende Protein J_κ (RBP J_κ) bindet und dieses von einem inaktiven in einen aktiven Zustand konvertiert. Dies resultiert dann in der Transkription von Notch-Zielgenen, wie zum Beispiel Sox9.¹⁶⁴ Sox9 ist ein Transkriptionsfaktor der HMG-Superfamilie und ist normalerweise während der Embryogenese in verschiedenen Organen exprimiert. Seine physiologische Aufgabe besteht darin, Zellen während der embryonalen Entwicklung der Organe in einem undifferenzierten Zustand zu halten.¹⁶⁵ Da wir eine Expression von Sox9 in CCC-5 nachweisen konnten, sprechen unsere Ergebnisse also für eine Aktivierung des Notch-Signalweges in CCC. Dies steht in Übereinstimmung mit Studien, die zeigten, dass Notch in HCC, PSC und auch in CCC häufig hochreguliert ist.^{162,166,167} El Khatib *et al.* wiesen nach, dass Notch in der Lage ist, Hepatozyten zu iCCC-Zellen zu transformieren. Ebenfalls stellten sie eine Notch-Aktivierung in den Zelllinien TFK-1, EGI-1 und SZ1 fest. Eine Notch-Aktivierung kann, gemeinsam mit einer p53-Inaktivierung, *in vivo* zu einer erhöhten Tumorlast führen auch die epithelial-mesenchymale Transition fördern, welche eine Rolle bei der Tumorinvasivität und bei Chemotherapieresistenzen spielt.¹⁶² Yoon *et al.* wiesen sogar nach, dass eine Notch-Hochregulation zu einer schlechteren Prognose bei eCCC führt.¹⁶⁸ Zwar ist die Rolle von Sox9 bei CCC noch nicht eindeutig geklärt, doch spricht die nachgewiesene Expression von Sox9 bei unserer Zelllinie CCC-5 ebenfalls dafür, dass Sox9 bei der Proliferation von CCC-Zellen eine Rolle spielt und der Notch-Signalweg bei CCC hochreguliert ist.

Ebenfalls konnten wir in CCC-5 eine Expression von STAT3 und p-STAT3 nachweisen. STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) ist ein

Transkriptionsfaktor der STAT-Familie. STAT3 ist Teil der JAK-STAT-Kaskade, welche in verschiedenen soliden Tumoren und bei Leukämie als hochreguliert nachgewiesen werden konnte.¹⁶⁹ JAK wird von verschiedenen Zytokinen und Hormonen aktiviert, zum Beispiel IL-6 und Prolaktin. Dies ist interessant, da Prolaktin im Rahmen einer Obstruktion von Gallenwegen vermehrt von Cholangiozyten produziert wird. IL-6 ist ein wichtiges inflammatorisches Zytokin, welches ebenfalls bei Gallenwegsinfektionen produziert wird.¹⁶⁹ Ebenfalls kann STAT3 durch Wachstumsfaktoren und deren Rezeptortyrosinkinasen aktiviert werden. Wird der STAT-Rezeptor aktiviert, phosphoryliert STAT, dimerisiert an seiner SH2-Domäne und kann sich so von seinem Rezeptor lösen. Das STAT-Dimer transloziert daraufhin in den Nukleus, wo es an die DNA bindet und die Transkription bestimmter Gene auslöst.^{169,170} Die Bedeutung von STAT3 für die Kanzerogenese wurde in den letzten Jahren vermehrt untersucht, da STAT3 zu Proliferation, Antiapoptose und zellulärer Transformation führt. Dies konnte dadurch erklärt werden, dass die Zielgene von STAT3 für antiapoptotische und proliferationssteigernde Proteine wie Bcl-xl, Mcl-1, Bcl-2, Cyclin-D1, Myc oder VEGF kodieren.^{171,172} Als typischer, in Tumoren aktivierter „second messenger“ konnte STAT3 auch in Cholangiokarzinomen als vermehrt exprimiert nachgewiesen werden.^{85,169,173,174} Dokduang *et al.* konnten 2014 bei CCC-Patienten und -Zelllinien nicht nur eine gesteigerte Expression von STAT3 und einen Zusammenhang zwischen inflammatorischen Reaktionen und STAT3-Aktivierung nachweisen, sondern auch eine signifikante Assoziation zwischen STAT3-Expression und kürzerer Überlebenszeit. Dies könnte STAT3 in der Zukunft zu einem prognostischen Marker für Cholangiokarzinome machen.¹⁷³

Somit ist die Expression von STAT3 und p-STAT3 in CCC-5 kongruent zu den Ergebnissen der bisher durchgeführten Studien an CCC-Zelllinien und lässt stark vermuten, dass die JAK-STAT-Kaskade und STAT3 im Besonderen beteiligt sind an der Karzinogenese von Cholangiokarzinomen und somit auch als Marker für CCC eine Rolle spielen können.

Wie auch schon die CCC-Zelllinien EGI-1, SKChA-1, TFK-1, M156, M214, OCA-17 und KKU-100^{174,175} konnten in unserer Zelllinie CCC-5 Expressionen von ERK1/2 und der aktiven, phosphorylierten Form p-ERK nachgewiesen werden. Die „Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase“ (ERK) ist eine Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), die als Haupteffektor des Ras-Onkoproteins agiert. Die MAPK-Signalwege werden alle durch eine GTPase-regulierte Kinase (MAPKKK) initiiert. Diese aktiviert eine weitere

Kinase (MAPKK) und diese wiederum aktiviert die Effektor kinase (MAPK). In dem ERK-MAPK-Signalweg sind die GTPase Ras und die Kinasen Raf, MEK und ERK1/2.¹⁷⁶ Der ERK-MAPK-Signalweg wird durch Wachstumsfaktoren, Cytokine und durch Inflammation aktiviert. Auch Gallensäuren können ERK und den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) aktivieren.¹⁷⁷ Die Aktivierung von ERK führt zu einer Phosphorylierung und Aktivierung von verschiedenen zytoplasmatischen Signalproteinen und von Transkriptionsfaktoren, die wiederum die Genexpression von Genen induzieren, die für Proteine wie CREB (cyclic AMP response element-binding protein), Elk-1 (ternary complex factor), STAT1/3 und c- und n-Myc kodieren. Diese Proteine führen zu Zellüberleben, -motilität und -teilung.^{176,178} Der ERK-MAPK-Signalweg hat auch Verbindungen zu anderen Signalwegen, wie dem PI3K-AKT-mTOR-Signalweg, der ebenfalls durch Zytokine und Inflammation aktiviert wird und auch einen wichtigen Signalweg für Zellteilung, -metabolismus und -überleben darstellt.¹⁷⁶ Die beiden Signalwege sind sehr wichtige Bestandteile der Karzinogenese verschiedener Tumorentitäten und konnten schon mehrfach als übermäßig aktiviert in Tumoren nachgewiesen werden.¹⁷⁸⁻¹⁸¹ Auch bei Cholangiokarzinomen wurde die Bedeutung von ERK und AKT in den letzten Jahren viel untersucht. In verschiedenen CCC-Zelllinien und auch in Tumorgewebe konnten Aktivierungen der PI3K-AKT-mTOR- und ERK-MAPK-Signalwege festgestellt werden.^{174,175} Eine übermäßige Expression von ERK konnte in ca. 58% aller untersuchten CCC festgestellt werden.^{175,178} Dies lässt sich damit erklären, dass in CCC viele Signalwege aktiviert werden, wie zum Beispiel über EGFR oder IL-6, sowie aktivierende Mutationen bei Ras, K-ras und Braf vorliegen, welche ERK aktivieren.^{174,175,178,182} Auch kommt es im Falle eines CCC häufig zu einem Gallestau, welcher durch die erhöhte Gallensäureexposition zu einer erhöhten ERK-Aktivierung in den Cholangiozyten führt.^{177,183} Trotz der nachgewiesenen Aktivierung von ERK im CCC konnte bisher kein signifikanter Überlebensnachteil bei Patienten mit erhöhtem ERK1/2 und AKT nachgewiesen werden, wie dies zum Beispiel bei Mamma-, Kolorektal- oder Pankreaskarzinomen der Fall ist.¹⁷⁸ Jedoch könnte sich aus der Erkenntnis, dass die ERK-MAPK- und PI3K-AKT-mTOR-Signalwege in CCC hochreguliert sind, eine neue Therapieoption ergeben, da es möglich ist mit Multikinaseinhibitoren, wie zum Beispiel Sorafinib und Sunitinib, beide Signalwege zu blockieren und so das Tumorzellwachstum zu inhibieren. Tatsächlich zeigen experimentelle Daten, dass dies möglich ist.^{174,175,184} Neben CCC-5 zeigten auch die anderen von uns getesteten

Tumorzelllinien Expressionen von ERK 1/2 und p-ERK, wohingegen die getesteten humanen Hepatozyten keine Expression von ERK aufwiesen. Dies bestätigt die Annahme, dass der ERK-MAPK-Signalweg einen wichtigen Bestandteil der Karzinogenese von Lebertumoren darstellt.^{177,178,184}

HNF-4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α) ist ein nuklearer Rezeptor, der Metabolismus, Zellverbindungen, -differenzierung und -proliferation in Epithelien der Leber und des Darms reguliert. Auch in den Epithelien von Pankreas, Nieren und Magen wird HNF-4 α physiologisch exprimiert. Es gibt zwei verschiedene Isoformen, die in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden. Hepatozyten beispielsweise exprimieren nur die Isoform P1, wohingegen Darmepithelien P1 und P2 exprimieren können.¹⁸⁵ HNF-4 α ist essentiell für die frühe embryologische Entwicklung und die Funktion der adulten Leber.¹⁸⁶ Jedoch spielt HNF-4 α auch eine Rolle bei der inflammatorischen Karzinogenese verschiedener Tumorentitäten und vor allem bei der Entwicklung und Progression des HCC.^{185,187–189} HNF-4 α ist normalerweise in der Lage, inflammatorische Signalwege wie den IL-6/STAT3-Signalweg zu inhibieren. Kommt es jedoch zu einer Mutation von HNF-4 α , kann es diese Signalwege nicht mehr inhibieren und es kommt zur Karzinogenese.¹⁸⁹ Auch inflammatorische Zytokine wie TGF- β oder TNF- α können HNF-4 α inhibieren und so die Tumorprogression beschleunigen.^{188,190} Lazarevich *et al.* beobachteten 2004, dass der Verlust von HNF-4 α bei HCC zu einem progressiveren Phänotyp und somit zu einer schlechteren Prognose führt.¹⁹¹ Bei HCC konnten Tanaka *et al.* beobachten, dass meist die Isoform P1 zwar inhibiert wird, jedoch im neoplastischen Zustand die Hepatozyten nun häufig die Isoform P2 exprimieren. Dies könnte darauf hinweisen, dass die beiden Isoformen unterschiedliche Signalwege ansteuern und unterschiedlich aktiviert werden können.¹⁸⁷

Von den von uns untersuchten Zelllinien zeigten nur die humanen Hepatozyten und die HCC-Zelllinie HepG2 eine Expression von HNF-4 α . Dies lässt sich dadurch erklären, dass Hepatozyten HNF-4 α physiologischerweise exprimieren und die Zelllinie HepG2, wie schon in früheren Studien bestätigt, ebenfalls HNF-4 α exprimiert.^{186,192} Zwar ist HNF-4 α in Tumorzellen häufig inhibiert, doch könnte die Expression bei HepG2 zustande kommen, dass in HCC die Isoform P2 häufig reexprimiert wird. Die untersuchten CCC-Zelllinien zeigten dahingegen keine Expression von HNF-4 α , was ebenfalls zu erwarten war, da bisher nicht bekannt ist, dass Cholangiozyten HNF-4 α exprimieren.

4.3 Chemosensitivität

Zwar ist die chirurgische Resektion die einzige potentiell kurative Therapie für Cholangiokarzinome, doch sind nur wenige Tumoren bei der Diagnosestellung noch resektabel. Daher ist die Verwendung von Chemotherapeutika ein wichtiger Bestandteil der Therapie von CCC, obwohl die biliären Tumoren allgemein als resistent gegenüber Chemotherapeutika gelten.⁷⁶ Trotzdem konnte in einer Studie von Glimelius *et al.* festgestellt werden, dass eine Chemotherapie bei CCC und Pankreaskarzinomen einer palliativen supportiven Therapie (best supportive care, BSC) in Hinsicht auf Überleben und Lebensqualität überlegen ist.^{73,193} Lange Zeit war Gemcitabin als Monotherapie das Standardtherapieregime.⁵⁰ Doch 2010 konnten Valle *et al.* in ihrer ABC-02-Studie belegen, dass die Kombination von Gemcitabin und Cisplatin, ein Platinderivat, das durch Alkylierung der DNA zu einem Abbruch der Replikation führt¹⁹⁴, im Vergleich zu einer Monotherapie mit Gemcitabin bessere Ergebnisse bei der medianen Überlebenszeit (11,7 vs. 8,1 Monate) und bei dem progressionsfreien Überleben (8,0 vs. 5,0 Monate) lieferte.^{71,72} Seit 2010 besteht die Standardtherapie für fortgeschrittene, nicht-resektable CCC daher in einer Kombination aus Gemcitabin und Cisplatin.^{71,73} Bei Patienten mit renaler Insuffizienz ist die Kombinationstherapie mit Gemcitabin und Cisplatin kontraindiziert. In einem solchen Fall kann Cisplatin durch Oxaliplatin ersetzt werden.⁷³ Oxaliplatin ist ein Platinderivat mit einem Diaminocyclohexyl-Ligand. Der genaue Wirkmechanismus von Oxaliplatin ist noch nicht geklärt, doch scheint das aktivierte Oxaliplatin Platin-DNA-Addukte zu erzeugen, die die Replikation der DNA unterbrechen.^{74,75}

Da derzeit die mittlere Überlebenszeit unter Chemotherapie bei CCC lediglich 14 Monate beträgt, werden stets viele Alternativen untersucht. 5-Fluoruracil (5-FU) ist wie auch Gemcitabin ein Pyrimidinanalogon und hemmt durch den Einbau in die DNA unter anderem die Thymidilatsynthase.¹⁹⁴ 5-FU konnte vor allem in Kombination mit anderen Chemotherapeutika wie Cisplatin oder Epirubicin recht gute Ergebnisse bei der Therapie von biliären Tumoren erzielen.⁷⁶ Vor allem eine Kombinationstherapie aus 5-FU, Cisplatin, $\alpha 2b$ -Interferon und Doxorubicin konnte eine Ansprechrate von 21% und eine gute mediane Überlebenszeit von 14 Monaten aufweisen.¹⁹⁵ Jedoch konnte nachgewiesen werden, dass eine modifizierte Kombinationstherapie aus Gemcitabin und Oxaliplatin (mGEMOX) bessere Überlebenszeiten bei Gallenblasenkarzinomen

erzielen konnte als eine Therapie mit 5-FU oder eine supportive Therapie.⁷⁶ Eine Kombination aus Capecitabin, ein 5-FU Prodrug, und Oxaliplatin zeigte nur gute Ergebnisse bei eCCC und Karzinomen der Ampulla Vateri, nicht aber bei iCCC.⁷⁶ Irinotecan ist ein semisynthetisches Derivat von Camptothecin, das aus dem *Camptotheca acuminata*-Baum gewonnen wird. Nach der Konversion in seine aktive Form inhibiert Irinotecan die DNA-Topoisomerase-1 und stoppt somit die DNA-Synthese und führt zu Einzelstrangbrüchen und zum Zelltod von Tumorzellen.^{75,194} Irinotecan erwies sich als effektives Therapeutikum bei Colonkarzinomen und konnte in einer Studie auch bei Pankreaskarzinomen, in Kombination mit Oxaliplatin, Leucovorin und 5-FU bessere Überlebenszeiten, längeres progressionsfreies Überleben und besseres Ansprechen als Gemcitabin allein aufweisen. Jedoch zeigte Irinotecan auch eine erhöhte Toxizität und scheint daher eher für junge, gesunde Patienten geeignet zu sein.⁷⁷ Sun *et al.* konnten zwar nachweisen, dass sich bei einer Kombinationstherapie aus Gemcitabin und Irinotecan zur Behandlung fortgeschrittener CCC und Pankreaskarzinomen das Ansprechen auf die Therapie verbessert, doch konnten sie keinen Überlebensvorteil gegenüber der Monotherapie mit Gemcitabin beobachten.⁷⁸ Als Kombinationstherapie mit Oxaliplatin konnte Irinotecan nicht empfohlen werden, da Karachaliou *et al.* 2010 zeigten, dass diese Kombination nur eine mäßige Antitumoraktivität aufwies und die mediane Überlebenszeit nur 9,2 Monate betrug.⁷⁵ Eine Kombinationstherapie aus Irinotecan, Gemcitabin und dem EGFR-Antikörper Panitumab zeigte 2013 eine mediane Überlebenszeit von 12,9 Monaten und ein medianes progressionsfreies Überleben von 9,7 Monaten. Diese Kombinationstherapie wurde von den untersuchten Patienten recht gut vertragen und es zeigten sich im Vergleich zu anderen Therapieschemata gute Ergebnisse.^{73,79} Somit könnte, bei Versagen einer Kombinationstherapie aus Gemcitabin und Cisplatin, Irinotecan in Kombination mit anderen Chemotherapeutika als zweite Therapie (second-line) verwendet werden. Die Anwendung zweiter und sogar dritter Chemotherapieschemata bei Versagen der ersten Therapie wird bezüglich des CCC kontrovers diskutiert. Einerseits konnten zum Beispiel Wiazzane *et al.* 2013 in einer kleinen Studie mit 23 iCCC-Patienten nachweisen, dass die Anzahl der Chemotherapien mit einem besseren Überleben assoziiert waren.⁸⁰ Andererseits konnten Lamarca *et al.* 2014 in ihrem systematischen Review keine klare Empfehlung für eine Zweitlinien-Chemotherapie aussprechen, da diese nur für einige

Patientengruppen Vorteile zu haben scheint und bei diesen der Evidenzgrad zu niedrig war.⁸¹

In der vorliegenden Studie wurden drei Agenzien mit wie oben erwähnt unterschiedlichem Wirkmechanismus untersucht: Irinotecan, Oxaliplatin und Gemcitabin.

Es ist interessant zu beobachten, dass unsere Zelllinie CCC-5 im MTT-Assay nur ein signifikantes Ansprechen auf Irinotecan zeigte. Der Patient, aus dessen Pleuraerguss CCC-5 etabliert wurde, zeigte initial auch ein gutes Ansprechen auf eine Kombinationstherapie aus Gemcitabin und Cisplatin. Nach einem Tumorprogress konnte nochmals ein gutes Ansprechen auf eine Monotherapie mit Gemcitabin erreicht werden. Ferner erhielt der Patient wie eingangs aufgeführt eine Kombinationstherapie aus Oxaliplatin und Capecitabin. Es könnte sein, dass es durch die Behandlungen mit Gemcitabin und Oxaliplatin zu einer Selektion von Tumorzellen kam, die Resistenzen gegen diese beiden Chemotherapeutika aufweisen und daher *in vitro* kein Ansprechen der Zellen auf Gemcitabin und Oxaliplatin nachzuweisen war. Das ist zwar noch ungesichert, doch weiß man, dass sich unter chemotherapeutischer Behandlung Resistenzen gegen Chemotherapeutika durch Mutationen in verschiedenen Signalwegen entwickeln können. Die Mechanismen sind derzeit noch nicht vollends nachvollziehbar, jedoch deuten Studien auf die wichtige Rolle hin, die PI3K-AKT- und Raf-MEK-ERK-Signalwege bei der Entstehung von Chemotherapieresistenzen zu spielen scheinen.¹⁹⁶ Eine Studie von Zhang *et al.* zeigte, dass das Protein 14-3-3- ζ in Cholangiokarzinomen in der Lage ist, den ERK-Signalweg konstant zu aktivieren und zu Chemotherapieresistenzen zu führen.¹⁹⁷ Eine übermäßige Aktivierung des Raf-MEK-ERK-Signalweges kann in einigen Tumorentitäten auch über die Überexprimierung von Raf zu Resistenzen gegen bestimmte Chemotherapeutika führen.¹⁹⁶ Auch PI3K und Akt konnten in einigen Studien als auslösende Faktoren von Chemotherapieresistenzen bei verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden.¹⁹⁶ Auch der Notch-Signalweg kann zu einer epithelial-mesenchymalen Transformation von Cholangiozyten führen und so zu einer Therapieresistenz beitragen, auch wenn die genauen Mechanismen hierbei noch nicht geklärt sind.¹⁶² Da in unserer Zelllinie CCC-5 sowohl ERK als auch Sox9 stark exprimiert sind, darf man annehmen, dass zumindest einer der angesprochenen Signalwege bei CCC-5 Mutationen aufweist, die zu einer Chemotherapieresistenz geführt haben könnten.

Unsere Ergebnisse und der klinische Verlauf des Patienten bestätigen die bereits erwähnte Studie von *Wiazzane et al.*, in der gezeigt wurde, dass bei Resistenzen gegenüber Erstlinientherapie eine Zweit- und Drittlinienchemotherapie sinnvoll sein kann.⁸⁰ Unter insgesamt vier unterschiedlichen Chemotherapieregimen überlebte der Patient mehr als 35 Monate.

Weiterführende Untersuchungen erscheinen sinnvoll, um zu untersuchen, ob Irinotecan, in Kombination mit anderen Chemotherapeutika oder eventuell einem EGFR-Inhibitor, für Patienten mit Resistenz gegenüber einer Erstlinientherapie eine mögliche Alternative zu den Standardtherapieregimen darstellen könnte.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Es ist uns gelungen, aus dem Pleuraerguss eines langzeitüberlebenden Patienten mit CCC eine neue cholangiozelluläre Zelllinie zu etablieren. Die CCC-Zelllinie CCC-5 zeigt eine für ein Cholangiokarzinom typische Morphologie, typische Proteinexpressionen und eine Chemosensitivität für Irinotecan. Zwar können aus den Ergebnissen unserer Untersuchungen an CCC-5 noch keine neuen therapeutischen oder pathophysiologischen Erkenntnisse abgeleitet werden, doch ist die Etablierung neuer CCC-Zelllinien für die Grundlagenforschung an Cholangiokarzinomen eine sehr wichtige Maßnahme. Mit neuen Zelllinien kann die Heterogenität dieser Tumorentität besser dargestellt werden und wir stellen anderen Forschungsgruppen mit Fokus auf das CCC ein neues *in-vitro*-Modell zur Verfügung, welches durch seine niedrige Passagenzahl sehr wahrscheinlich noch viele ursprüngliche Tumorcharakteristika abbildet. Außerdem konnten wir durch unsere Ergebnisse viele Studien an anderen CCC-Zelllinien und an CCC-Patienten bestätigen. Zusätzlich können wir durch die Beobachtung des klinischen Verlaufs unseres Patienten die Beobachtung unterstützen, dass eine Zweit- und Drittlinientherapie für CCC-Patienten zu einem längeren Überleben führen kann.⁸⁰ Insbesondere Irinotecan könnte als Zweitlinientherapie in Frage kommen und sollte in weiteren Studien diesbezüglich untersucht werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Pitt HA, Dooley WC, Yeo CJ, Cameron JL: Malignancies of the biliary tree. *Curr. Probl. Surg.* [Internet] 32: 1–90, 1995 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7528652> [cited 2014 Nov 20]
2. De Groen PC, Gores GJ, LaRusso NF, Gunderson LL, Nagorney DM: Biliary tract cancers. *N. Engl. J. Med.* [Internet] 341: 1368–78, 1999 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10536130> [cited 2014 Dec 2]
3. Cardinale V, Semeraro R, Torrice A, Gatto M, Napoli C, Bragazzi MC, Gentile R, Alvaro D: Intra-hepatic and extra-hepatic cholangiocarcinoma: New insight into epidemiology and risk factors. *World J. Gastrointest. Oncol.* [Internet] 2: 407–16, 2010 Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3000454&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract> [cited 2014 Nov 3]
4. Klatskin G: Adenocarcinoma of the hepatic duct at its bifurcation within the Porta Hepatis. An unusual tumor with distinctive clinical and pathological features. *Am. J. Med.* [Internet] 38: 241–56, 1965 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14256720> [cited 2014 Nov 20]
5. Nakeeb A, Pitt HA, Sohn TA, Coleman J, Abrams RA, Piantadosi S, Hruban RH, Lillemoe KD, Yeo CJ, Cameron JL: Cholangiocarcinoma. A spectrum of intrahepatic, perihilar, and distal tumors. *Ann. Surg.* [Internet] 224: 463–73; discussion 473–5, 1996 Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1235406&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract> [cited 2014 Nov 13]
6. Bismuth H, Nakache R, Diamond T: Management strategies in resection for hilar cholangiocarcinoma. *Ann. Surg.* [Internet] 215: 31–8, 1992 Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1242367&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract> [cited 2015 Jan 7]
7. Patel T: Cholangiocarcinoma. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* [Internet] 3: 33–42, 2006 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16397610> [cited 2014 Nov 20]
8. He X, Wu X: Difference in biological characteristics and sensitivity to chemotherapy and radiotherapy between intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma cells in vitro. *Chin. Med. Sci. J.* [Internet] 23: 54–9, 2008 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18437912> [cited 2014 Nov 20]
9. Welzel TM, Katherine A, Hsing AW, Thomas R, Brien O, Pfeiffer RM: Impact of Classification of Hilar Cholangiocarcinomas (Klatskin Tumors) on the Incidence of Intra- and Extrahepatic Cholangiocarcinoma in the United States. *J. Natl. Cancer Inst.* 98: 873–875, 2006

10. Vauthey JN, Blumgart LH: Recent advances in the management of cholangiocarcinomas. *Semin. Liver Dis.* [Internet] 14: 109–14, 1994 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8047893> [cited 2014 Dec 2]
11. Olnes MJ, Erlich R: A review and update on cholangiocarcinoma. *Oncology* [Internet] 66: 167–79, 2004 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15218306> [cited 2014 Dec 2]
12. Bragazzi MC, Cardinale V, Carpino G, Venere R, Semeraro R, Gentile R, Gaudio E, Alvaro D: Cholangiocarcinoma: Epidemiology and risk factors [Internet]. *Transl. Gastrointest. Cancer.* 1: 21–32, 2011 Available from: <http://www.amepc.org/tgc/article/view/74/64> [cited 2014 Dec 5]
13. Shaib Y, El-Serag HB: The epidemiology of cholangiocarcinoma. *Semin. Liver Dis.* [Internet] 24: 115–25, 2004 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15192785> [cited 2014 Nov 13]
14. Strom BL, Hibberd PL, Soper KA, Stolley PD, Nelson WL: International variations in epidemiology of cancers of the extrahepatic biliary tract. *Cancer Res.* [Internet] 45: 5165–8, 1985 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4027991> [cited 2014 Dec 2]
15. Aljiffry M, Walsh MJ, Molinari M: Advances in diagnosis, treatment and palliation of cholangiocarcinoma: 1990-2009. *World J. Gastroenterol.* [Internet] 15: 4240–62, 2009 Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2744180&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [cited 2014 Nov 13]
16. Patel T: Worldwide trends in mortality from biliary tract malignancies. *BMC Cancer* [Internet] 2: 10, 2002 Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=113759&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [cited 2014 Dec 5]
17. Cardinale V, Bragazzi MC, Carpino G, Torrice A, Fraveto A, Gentile R, Pasqualino V, Melandro F, Aliberti C, Bastianelli C, Brunelli R, Berloco PB, Gaudio E, Alvaro D: Cholangiocarcinoma: increasing burden of classifications. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* [Internet] 2: 272–80, 2013 Available from: [/pmc/articles/PMC3924690/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC3924690/?report=abstract) [cited 2014 Dec 5]
18. Skipworth JRA, Keane MG, Pereira SP: Update on the management of cholangiocarcinoma. *Dig. Dis.* [Internet] 32: 570–8, 2014 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25034290> [cited 2014 Nov 13]
19. Zach S, Birgin E, Rückert F: Primary Cholangiocellular Carcinoma Cell Lines. *J Stem Cell Res Transplant. J Stem Cell Res Transpl.* 2: 1013–1, 2015
20. Jarnagin WR, Fong Y, DeMatteo RP, Gonen M, Burke EC, Bodniewicz BS J, Youssef BA M, Klimstra D, Blumgart LH: Staging, resectability, and outcome in 225 patients with hilar cholangiocarcinoma. *Ann. Surg.* [Internet] 234: 507–17; discussion 517–9, 2001 Available from:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1422074&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [cited 2015 Jan 7]
21. Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthoney A, Maraveyas A, Madhusudan S, Iveson T, Hughes S, Pereira SP, Roughton M, Bridgewater J: Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N. Engl. J. Med.* 4: 395–397, 2010
 22. Endo I, Gonen M, Yopp AC, Dalal KM, Zhou Q, Klimstra D, D'Angelica M, DeMatteo RP, Fong Y, Schwartz L, Kemeny N, O'Reilly E, Abou-Alfa GK, Shimada H, Blumgart LH, Jarnagin WR: Intrahepatic cholangiocarcinoma: rising frequency, improved survival, and determinants of outcome after resection. *Ann. Surg.* [Internet] 248: 84–96, 2008 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18580211>
 23. Ito F, Agni R, Rettammel RJ, Been MJ, Cho CS, Mahvi DM, Rikkers LF, Weber SM: Resection of Hilar Cholangiocarcinoma. *Ann. Surg.* [Internet] 248: 273–279, 2008 Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=0000658-200808000-00018>
 24. Zhou Y, Liu S, Wu L, Wan T: Survival after surgical resection of distal cholangiocarcinoma: A systematic review and meta-analysis of prognostic factors. *Asian J. Surg.* [Internet] 2015 Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1015958415000858>
 25. Van den Broek MJ, van Dam RM, Malagó M, Dejong CHC, van Breukelen GJP, Olde Damink SWM: Feasibility of randomized controlled trials in liver surgery using surgery-related mortality or morbidity as endpoint. *Br. J. Surg.* [Internet] 96: 1005–1014, 2009 Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/bjs.6663>
 26. Bergquist A, Ekblom A, Olsson R, Kornfeldt D, Löf L, Danielsson A, Hultcrantz R, Lindgren S, Prytz H, Sandberg-Gertzén H, Almer S, Granath F, Broomé U: Hepatic and extrahepatic malignancies in primary sclerosing cholangitis. *J. Hepatol.* [Internet] 36: 321–7, 2002 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11867174> [cited 2014 Dec 23]
 27. Bergquist A, Broomé U: Hepatobiliary and extra-hepatic malignancies in primary sclerosing cholangitis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* [Internet] 15: 643–56, 2001 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11492973> [cited 2015 Jan 5]
 28. Erichsen R, Jepsen P, Vilstrup H, Ekblom A, Sørensen HT: Incidence and prognosis of cholangiocarcinoma in Danish patients with and without inflammatory bowel disease: a national cohort study, 1978-2003. *Eur. J. Epidemiol.* [Internet] 24: 513–20, 2009 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19557525> [cited 2015 Mar 8]
 29. Choi D, Lim JH, Lee KT, Lee JK, Choi SH, Heo JS, Jang K-T, Lee NY, Kim S, Hong S-T: Cholangiocarcinoma and *Clonorchis sinensis* infection: a case-

- control study in Korea. *J. Hepatol.* [Internet] 44: 1066–73, 2006 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16480786> [cited 2015 Jan 5]
30. Watanapa P, Watanapa WB: Liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Br. J. Surg.* [Internet] 89: 962–70, 2002 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12153620> [cited 2014 Nov 13]
31. Watanapa P: Cholangiocarcinoma in patients with opisthorchiasis. *Br. J. Surg.* [Internet] 83: 1062–64, 1996 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8869303> [cited 2015 Jan 5]
32. Haswell-Elkins MR, Mairiang E, Mairiang P, Chaiyakum J, Chamadol N, Loapaiboon V, Sithithaworn P, Elkins DB: Cross-sectional study of *Opisthorchis viverrini* infection and cholangiocarcinoma in communities within a high-risk area in northeast Thailand. *Int. J. Cancer* [Internet] 59: 505–9, 1994 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7960220> [cited 2015 Jan 5]
33. Tao L-Y, He X-D, Qu Q, Cai L, Liu W, Zhou L, Zhang S-M: Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma: a case-control study in China. *Liver Int.* [Internet] 30: 215–21, 2010 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19840244> [cited 2015 Jan 5]
34. Welzel TM, Graubard BI, El-Serag HB, Shaib YH, Hsing AW, Davila JA, McGlynn KA: Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a population-based case-control study. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* [Internet] 5: 1221–8, 2007 Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2083573&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract> [cited 2015 Jan 5]
35. Yamamoto S, Kubo S, Hai S, Uenishi T, Yamamoto T, Shuto T, Takemura S, Tanaka H, Yamazaki O, Hirohashi K, Tanaka T: Hepatitis C virus infection as a likely etiology of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Sci.* [Internet] 95: 592–5, 2004 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15245596> [cited 2015 Jan 5]
36. Lee TY, Lee SS, Jung SW, Jeon SH, Yun S-C, Oh H-C, Kwon S, Lee SK, Seo DW, Kim M-H, Suh DJ: Hepatitis B virus infection and intrahepatic cholangiocarcinoma in Korea: a case-control study. *Am. J. Gastroenterol.* [Internet] 103: 1716–20, 2008 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18557716> [cited 2015 Jan 5]
37. Lee CH, Chang CJ, Lin YJ, Yeh CN, Chen MF, Hsieh SY: Viral hepatitis-associated intrahepatic cholangiocarcinoma shares common disease processes with hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer* [Internet] 100: 1765–70, 2009 Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2695699&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract> [cited 2015 Jan 5]
38. Zhou H, Wang H, Zhou D, Wang H, Wang Q, Zou S, Tu Q, Wu M, Hu H: Hepatitis B virus-associated intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma may hold common disease process for

- carcinogenesis. *Eur. J. Cancer* [Internet] 46: 1056–61, 2010 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20202823> [cited 2015 Jan 5]
39. Shaib YH, El-Serag HB, Nooka AK, Thomas M, Brown TD, Patt YZ, Hassan MM: Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma: a hospital-based case-control study. *Am. J. Gastroenterol.* [Internet] 102: 1016–21, 2007 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17324130> [cited 2015 Jan 5]
40. Li J-S, Han T-J, Jing N, Li L, Zhang X-H, Ma F-Z, Liu J-Y: Obesity and the risk of cholangiocarcinoma: a meta-analysis. *Tumour Biol.* [Internet] 35: 6831–8, 2014 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24729126> [cited 2015 Jan 6]
41. Schmoll H-J: F.L. Greene, D.L. Page, I.D. Fleming et al. (eds). AJCC Cancer Staging Manual, 6th edition. *Ann. Oncol.* [Internet] 14: 345–a–346, 2003 Available from: <http://annonc.oxfordjournals.org/content/14/2/345.2.full> [cited 2015 Jan 6]
42. Egner JR: AJCC Cancer Staging Manual. *JAMA* [Internet] 304: 1726, 2010 Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=186724> [cited 2015 Jan 6]
43. Bismuth H, Corlette MB: Intrahepatic cholangioenteric anastomosis in carcinoma of the hilus of the liver. *Surg. Gynecol. Obstet.* [Internet] 140: 170–8, 1975 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1079096> [cited 2014 Nov 20]
44. Zaydfudim VM, Clark CJ, Kendrick ML, Que FG, Reid-Lombardo KM, Donohue JH, Farnell MB, Nagorney DM: Correlation of staging systems to survival in patients with resected hilar cholangiocarcinoma. *Am. J. Surg.* [Internet] 206: 159–65, 2013 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23746658> [cited 2015 Jan 7]
45. Shimada K, Sano T, Nara S, Esaki M, Sakamoto Y, Kosuge T, Ojima H: Therapeutic value of lymph node dissection during hepatectomy in patients with intrahepatic cholangiocellular carcinoma with negative lymph node involvement. *Surgery* [Internet] 145: 411–6, 2009 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19303990> [cited 2014 Dec 30]
46. Seiler CA, Wagner M, Bachmann T, Redaelli CA, Schmied B, Uhl W, Friess H, Büchler MW: Randomized clinical trial of pylorus-preserving duodenopancreatectomy versus classical Whipple resection-long term results. *Br. J. Surg.* [Internet] 92: 547–56, 2005 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15800958> [cited 2015 Jan 7]
47. Fong Y, Blumgart LH, Lin E, Fortner JG, Brennan MF: Outcome of treatment for distal bile duct cancer. *Br. J. Surg.* [Internet] 83: 1712–5, 1996 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9038548> [cited 2015 Jan 7]

48. Seehofer D, Kamphues C, Neuhaus P: Resection of Klatskin tumors.[Article in German] *Chirurg.* [Internet] 83: 221–8, 2012 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22406679> [cited 2015 Jan 7]
49. Darwish Murad S, Kim WR, Harnois DM, Douglas DD, Burton J, Kulik LM, Botha JF, Mezrich JD, Chapman WC, Schwartz JJ, Hong JC, Emond JC, Jeon H, Rosen CB, Gores GJ, Heimbach JK: Efficacy of neoadjuvant chemoradiation, followed by liver transplantation, for perihilar cholangiocarcinoma at 12 US centers. *Gastroenterology* [Internet] 143: 88–98.e3; quiz e14, 2012 Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3846443&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [cited 2015 Jan 8]
50. Vogel A, Wege H, Caca K, Nashan B, Neumann U: The diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma. *Dtsch. Arztebl. Int.* [Internet] 111: 748–54, 2014 Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4239580&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [cited 2014 Dec 17]
51. Tamandl D, Herberger B, Gruenberger B, Puhalla H, Klinger M, Gruenberger T: Influence of hepatic resection margin on recurrence and survival in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* [Internet] 15: 2787–94, 2008 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18685896> [cited 2015 Jan 8]
52. Takada T, Amano H, Yasuda H, Nimura Y, Matsushiro T, Kato H, Nagakawa T, Nakayama T: Is postoperative adjuvant chemotherapy useful for gallbladder carcinoma? A phase III multicenter prospective randomized controlled trial in patients with resected pancreaticobiliary carcinoma. *Cancer* [Internet] 95: 1685–95, 2002 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12365016> [cited 2015 Jan 8]
53. Vern-Gross TZ, Shivnani AT, Chen K, Lee CM, Tward JD, MacDonald OK, Crane CH, Talamonti MS, Munoz LL, Small W: Survival outcomes in resected extrahepatic cholangiocarcinoma: effect of adjuvant radiotherapy in a surveillance, epidemiology, and end results analysis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* [Internet] 81: 189–98, 2011 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20971573> [cited 2015 Jan 8]
54. Horgan AM, Amir E, Walter T, Knox JJ: Adjuvant therapy in the treatment of biliary tract cancer: a systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Oncol.* [Internet] 30: 1934–40, 2012 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22529261> [cited 2015 Jan 8]
55. Todoroki T, Ohara K, Kawamoto T, Koike N, Yoshida S, Kashiwagi H, Otsuka M, Fukao K: Benefits of adjuvant radiotherapy after radical resection of locally advanced main hepatic duct carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* [Internet] 46: 581–7, 2000 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10701737> [cited 2015 Jan 8]
56. Stein DE, Heron DE, Rosato EL, Anné PR, Topham AK: Positive microscopic margins alter outcome in lymph node-negative cholangiocarcinoma when

- resection is combined with adjuvant radiotherapy. *Am. J. Clin. Oncol.* [Internet] 28: 21–3, 2005 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15685030> [cited 2015 Jan 8]
57. Serafini FM, Sachs D, Bloomston M, Carey LC, Karl RC, Murr MM, Rosemurgy AS: Location, not staging, of cholangiocarcinoma determines the role for adjuvant chemoradiation therapy. *Am. Surg.* [Internet] 67: 839–43; discussion 843–4, 2001 Available from: <http://europepmc.org/abstract/med/11565760> [cited 2015 Jan 10]
58. Hughes MA, Frassica DA, Yeo CJ, Riall TS, Lillemoe KD, Cameron JL, Donehower RC, Laheru DA, Hruban RH, Abrams RA: Adjuvant concurrent chemoradiation for adenocarcinoma of the distal common bile duct. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* [Internet] 68: 178–82, 2007 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17276614> [cited 2014 Dec 7]
59. Nelson JW, Ghafoori AP, Willett CG, Tyler DS, Pappas TN, Clary BM, Hurwitz HI, Bendell JC, Morse MA, Clough RW, Czito BG: Concurrent chemoradiotherapy in resected extrahepatic cholangiocarcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* [Internet] 73: 148–53, 2009 Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4142576&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract> [cited 2015 Jan 10]
60. Morak MJM, van der Gaast A, Incrocci L, van Dekken H, Hermans JJ, Jeekel J, Hop WCJ, Kazemier G, van Eijck CHJ: Adjuvant intra-arterial chemotherapy and radiotherapy versus surgery alone in resectable pancreatic and periampullary cancer: a prospective randomized controlled trial. *Ann. Surg.* [Internet] 248: 1031–41, 2008 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19092348> [cited 2015 Mar 12]
61. Murakami Y, Uemura K, Sudo T, Hayashidani Y, Hashimoto Y, Nakamura H, Nakashima A, Sueda T: Adjuvant gemcitabine plus S-1 chemotherapy improves survival after aggressive surgical resection for advanced biliary carcinoma. *Ann. Surg.* [Internet] 250: 950–6, 2009 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19953713> [cited 2015 Mar 12]
62. Speer AG, Cotton PB, Russell RC, Mason RR, Hatfield AR, Leung JW, MacRae KD, Houghton J, Lennon CA: Randomised trial of endoscopic versus percutaneous stent insertion in malignant obstructive jaundice. *Lancet* [Internet] 2: 57–62, 1987 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2439854> [cited 2015 Jan 11]
63. Andersen JR, Sørensen SM, Kruse A, Rokkjaer M, Matzen P: Randomised trial of endoscopic endoprosthesis versus operative bypass in malignant obstructive jaundice. *Gut* [Internet] 30: 1132–5, 1989 Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1434171&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract> [cited 2015 Jan 11]
64. Xu C, Lv P, Huang X, Wang S, Sun L, Wang A: Analysis of different ways of drainage for obstructive jaundice caused by hilar cholangiocarcinoma. 15: 5617–5620, 2014

65. Westwood D, Fernando C, Connor S: Internal-external percutaneous transhepatic biliary drainage for malignant biliary obstruction: a retrospective analysis. *J. Med. Imaging Radiat. Oncol.* [Internet] 54: 108–110, 2010 Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1754-9485.2010.02147.x>
66. Yu F-X, Ji S-Q, Su L-F, Zhang S-C, Zhang Q-Y: Effectiveness and safety of preoperative percutaneous transhepatic cholangiodrainage with bile re-infusion in patients with hilar cholangiocarcinoma: a retrospective controlled study. *Am. J. Med. Sci.* [Internet] 346: 353–7, 2013 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23276892>
67. Uppal DS, Wang AY: Advances in endoscopic retrograde cholangiopancreatography for the treatment of cholangiocarcinoma. *World J. Gastrointest. Endosc.* 7: 675–687, 2015
68. Tsuyuguchi T, Takada T, Miyazaki M, Miyakawa S, Tsukada K, Nagino M, Kondo S, Furuse J, Saito H, Suyama M, Kimura F, Yoshitomi H, Nozawa S, Yoshida M, Wada K, Amano H, Miura F: Stenting and interventional radiology for obstructive jaundice in patients with unresectable biliary tract carcinomas. *J. Hepatobiliary. Pancreat. Surg.* [Internet] 15: 69–73, 2008 Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00534-007-1282-x>
69. Kamphues C, Seehofer D, Colletini F, Bahra M, Neuhaus P, Wust P, Denecke T, Gebauer B, Schnapauff D: Preliminary experience with CT-guided high-dose rate brachytherapy as an alternative treatment for hepatic recurrence of cholangiocarcinoma. *HPB (Oxford)*. [Internet] 14: 791–7, 2012 Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3521906&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract> [cited 2015 Jan 10]
70. Schnapauff D, Denecke T, Grieser C, Colletini F, Colletini F, Seehofer D, Sinn M, Banzer J, Lopez-Hänninen E, Hamm B, Wust P, Gebauer B: Computed tomography-guided interstitial HDR brachytherapy (CT-HDRBT) of the liver in patients with irresectable intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cardiovasc. Intervent. Radiol.* [Internet] 35: 581–7, 2012 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21833806> [cited 2015 Jan 10]
71. Valle JW, Furuse J, Jitlal M, Beare S, Mizuno N, Wasan H, Bridgewater J, Okusaka T: Cisplatin and gemcitabine for advanced biliary tract cancer: a meta-analysis of two randomised trials. *Ann. Oncol.* [Internet] 25: 391–8, 2014 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24351397> [cited 2015 Jan 6]
72. Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthoney A, Maraveyas A, Madhusudan S, Iveson T, Hughes S, Pereira SP, Roughton M, Bridgewater J: Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N. Engl. J. Med.* [Internet] 362: 1273–81, 2010 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20375404> [cited 2015 Jan 10]
73. Schweitzer N, Vogel a.: Systemic therapy of cholangiocarcinoma: From chemotherapy to targeted therapies. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*

- [Internet] 29: 345–353, 2015 Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521691815000281>
74. Raymond E, Faivre S, Woynarowski JM, Chaney SG: Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin. Oncol.* [Internet] 25: 4–12, 1998 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9609103> [cited 2015 Sep 3]
 75. Karachaliou N, Polyzos A, Kentepozidis N, Kakolyris S, Ziras N, Vardakis N, Kalykaki A, Milaki G, Georgoulas V, Androulakis N: A multicenter phase II trial with irinotecan plus oxaliplatin as first-line treatment for inoperable/metastatic cancer of the biliary tract. *Oncology* 78: 356–360, 2010
 76. Romiti A, D’Antonio C, Zullo A, Sarcina I, Di Rocco R, Barucca V, Durante V, Marchetti P: Chemotherapy for the biliary tract cancers: Moving toward improved survival time. *J. Gastrointest. Cancer* 43: 396-404, 2012
 77. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul J-L, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, Bennouna J, Bachet J-B, Khemissa-Akouz F, Péré-Vergé D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C, Ducreux M: FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 364: 1817–1825, 2011
 78. Sun W, Hewitt MR, Theobald MR, Hershock D, Haller DG: A phase 1 study of fixed dose rate gemcitabine and irinotecan in patients with advanced pancreatic and biliary cancer. *Cancer* 110: 2768–2774, 2007
 79. Sohal DPS, Mykulowycz K, Uehara T, Teitelbaum UR, Damjanov N, Giantonio BJ, Carberry M, Wissel P, Jacobs-Small M, O’Dwyer PJ, Sepulveda A, Sun W: A phase II trial of gemcitabine, irinotecan and panitumumab in advanced cholangiocarcinoma. *Ann. Oncol.* 24: 3061–3065, 2013
 80. Wiazzane N, Chauffert B, Ghiringhelli F: Retrospective analysis of survival benefits of chemotherapy for metastatic or non-resectable intrahepatic cholangiocarcinoma. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 37: 614-618, 2013
 81. Lamarca A, Hubner RA, David Ryder W, Valle JW: Second-line chemotherapy in advanced biliary cancer: a systematic review. *Ann. Oncol.* [Internet] 25: 1–11, 2014 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24769639>
 82. Leggett CL, Gorospe EC, Murad MH, Montori VM, Baron TH, Wang KK: Photodynamic therapy for unresectable cholangiocarcinoma: a comparative effectiveness systematic review and meta-analyses. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* [Internet] 9: 189–95, 2012 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22959798> [cited 2015 Jan 10]
 83. Park DH, Lee SS, Park SE, Lee JL, Choi JH, Choi HJ, Jang JW, Kim HJ, Eum JB, Seo D-W, Lee SK, Kim M-H, Lee JB: Randomised phase II trial of photodynamic therapy plus oral fluoropyrimidine, S-1, versus photodynamic therapy alone for unresectable hilar cholangiocarcinoma. *Eur. J. Cancer*

- [Internet] 50: 1259–68, 2014 Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24485665> [cited 2015 Jan 10]
84. Rizvi S, Borad MJ, Patel T, Gores GJ: Cholangiocarcinoma: molecular pathways and therapeutic opportunities. *Semin. Liver Dis.* [Internet] 34: 456–64, 2014 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25369307> [cited 2014 Nov 20]
85. Zheng T, Hong X, Wang J, Pei T, Liang Y, Yin D, Song R, Song X, Lu Z, Qi S, Liu J, Sun B, Xie C, Pan S, Li Y, Luo X, Li S, Fang X, Bhatta N, Jiang H, Liu L: Gankyrin promotes tumor growth and metastasis through activation of IL-6/STAT3 signaling in human cholangiocarcinoma. *Hepatology* 59: 935-946, 2014
86. Aneknan P, Kukongviriyapan V, Prawan A, Kongpetch S, Sripa B, Senggunprai L: Luteolin arrests cell cycling, induces apoptosis and inhibits the JAK / STAT3 pathway in human cholangiocarcinoma cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 15: 5071–5076, 2014
87. Tanaka Y, Martin Mola E: IL-6 targeting compared to TNF targeting in rheumatoid arthritis: studies of olokizumab, sarilumab and sirukumab. *Ann. Rheum. Dis.* [Internet] 73: 1595–7, 2014 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24833786> [cited 2015 Jan 1]
88. Genovese MC, Fleischmann R, Furst D, Janssen N, Carter J, Dasgupta B, Bryson J, Duncan B, Zhu W, Pitzalis C, Durez P, Kretsos K: Efficacy and safety of olokizumab in patients with rheumatoid arthritis with an inadequate response to TNF inhibitor therapy: outcomes of a randomised Phase IIb study. *Ann. Rheum. Dis.* [Internet] 73: 1607–1615, 2014 Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3812864&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
89. Ishimura N, Bronk SF, Gores GJ: Inducible nitric oxide synthase up-regulates Notch-1 in mouse cholangiocytes: implications for carcinogenesis. *Gastroenterology* [Internet] 128: 1354–68, 2005 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15887117> [cited 2015 Jan 10]
90. Voss JS, Holtegaard LM, Kerr SE, Fritcher EGB, Roberts LR, Gores GJ, Zhang J, Highsmith WE, Halling KC, Kipp BR: Molecular profiling of cholangiocarcinoma shows potential for targeted therapy treatment decisions. *Hum. Pathol.* [Internet] 44: 1216–1222, 2013 Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2012.11.006>
91. Xu RF, Sun JP, Zhang SR, Zhu GS, Li LB, Liao YL, Xie JM, Liao WJ: KRAS and PIK3CA but not BRAF genes are frequently mutated in Chinese cholangiocarcinoma patients. *Biomed. Pharmacother.* 65: 22–26, 2011
92. Liu N, Rowley BR, Bull CO, Schneider C, Haegebarth A, Schatz C, Fracasso PR, Wilkie DP, Hentemann M, Wilhelm SM, Scott WJ, Mumberg D, Ziegelbauer K: BAY 80-6946 is a highly selective intravenous PI3K inhibitor with potent p110 α and p110 δ activities in tumor cell lines and xenograft

- models. *Mol. Cancer Ther.* [Internet] 12: 2319–30, 2013 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24170767>
93. Costello B, Borad MJ, Qi Y, Kim GP, Northfelt DW, Erlichman C, Alberts SR: Phase I trial of everolimus, gemcitabine and cisplatin in patients with solid tumors. *Invest. New Drugs* 32: 710–716, 2014
94. Ku J-L, Yoon K, Kim I-J, Kim W-H, Jang J-Y, Suh K-S, Kim S-W, Park Y-H, Hwang J-H, Yoon Y-B, Park J-G: Establishment and characterisation of six human biliary tract cancer cell lines. *Br. J. Cancer* [Internet] 87: 187–193, 2002 Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2376107&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [cited 2014 Nov 3]
95. Nelson-Rees WA, Flandermeyer RR, Hawthorne PK: Banded marker chromosomes as indicators of intraspecies cellular contamination. *Science* [Internet] 184: 1093–1096, 1974 Available from: <http://www.sciencemag.org.ezproxy.medma.uni-heidelberg.de/content/184/4141/1093> [cited 2015 Mar 8]
96. Kniss DA, Summerfield TL: Discovery of HeLa cell contamination in HES cells: call for cell line authentication in reproductive biology research. *Reprod. Sci.* [Internet] 21: 1015–1019, 2014 Available from: <http://rsx.sagepub.com.ezproxy.medma.uni-heidelberg.de/content/21/8/1015.full> [cited 2015 Mar 8]
97. Stürzl M, Gaus D, Dirks WG, Ganem D, Jochmann R: Kaposi's sarcoma-derived cell line SLK is not of endothelial origin, but is a contaminant from a known renal carcinoma cell line. *Int. J. Cancer* [Internet] 132: 1954–8, 2013 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22987579> [cited 2015 Mar 8]
98. Rückert F, Aust D, Böhme I, Werner K, Brandt A, Diamandis EP, Krautz C, Hering S, Saeger H-D, Grützmann R, Pilarsky C: Five primary human pancreatic adenocarcinoma cell lines established by the outgrowth method. *J. Surg. Res.* [Internet] 172: 29–39, 2012 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21683373> [cited 2015 Jan 28]
99. Yamaguchi N, Morioka H, Ohkura H, Hirohashi S, Kawai K: Establishment and characterization of the human cholangiocarcinoma cell line HChol-Y1 in a serum-free, chemically defined medium. *J. Natl. Cancer Inst.* [Internet] 75: 29–35, 1985 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2989602> [cited 2014 Nov 13]
100. Scherdin U, Garbrecht M KM: In vitro interaction of α -difluoromethyl-ornithine (DFMO) and human recombinant interferon- α (rIFN- α) on human cancer cell lines. *Immunobiology* 175: 1–143, 1987
101. Saijyo S, Kudo T, Suzuki M, Katayose Y, Shinoda M, Muto T, Fukuhara K, Suzuki T, Matsuno S: Establishment of a new extrahepatic bile duct carcinoma

- cell line, TFK-1. *Tohoku J. Exp. Med.* [Internet] 177: 61–71, 1995 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8693487> [cited 2014 Nov 13]
102. Knuth A, Gabbert H, Dippold W, Klein O, Sachsse W, Bitter-Suermann D, Prellwitz W, Meyer zum Büschenfelde KH: Biliary adenocarcinoma. Characterisation of three new human tumor cell lines. *J. Hepatol.* [Internet] 1: 579–96, 1985 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4056357> [cited 2014 Nov 13]
103. Murakami T, Yano H, Maruiwa M, Sugihara S, Kojiro M: Establishment and characterization of a human combined hepatocholangiocarcinoma cell line and its heterologous transplantation in nude mice. *Hepatology* [Internet] 7: 551–6 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3032760> [cited 2015 Jan 16]
104. Homma S, Nagamori S, Fujise K, Yamazaki K, Hasumura S, Sujino H, Matsuura T, Shimizu K, Kameda H, Takaki K: Human bile duct carcinoma cell line producing abundant mucin in vitro. *Gastroenterol. Jpn.* [Internet] 22: 474–9, 1987 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2889643> [cited 2015 Jan 17]
105. Kusaka Y, Tokiwa T, Sato J: Establishment and characterization of a cell line from a human cholangiocellular carcinoma. *Res Exp Med.* 188: 367–375, 1988
106. Katoh H, Shinbo T, Otagiri H, Saitoh M, Saitoh T, Ishizawa S, Shimizu T, Satoh A, Tazawa K, Fujimaki M: Character of a human cholangiocarcinoma CHGS, serially transplanted to nude mice. *Hum. Cell* [Internet] 1: 101–5, 1988 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2856440> [cited 2015 Jan 17]
107. Miyagiwa M, Ichida T, Tokiwa T, Sato J, Sasaki H: A new human cholangiocellular carcinoma cell line (HuCC-T1) producing carbohydrate antigen 19/9 in serum-free medium. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* [Internet] 25: 503–10, 1989 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2544546> [cited 2015 Jan 16]
108. Storto PD, Saidman SL, Demetris AJ, Letessier E, Whiteside TL, Gollin SM: Chromosomal breakpoints in cholangiocarcinoma cell lines. *Genes. Chromosomes Cancer* [Internet] 2: 300–10, 1990 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2176543> [cited 2015 Jan 16]
109. Yoshida K, Tomizawa H, Ota T, Nagashima T, Kikuchi H, Watanabe H, Hashizaki K, Yonaha A: [Establishment and characterization of human cholangiocarcinoma, MEC, producing carbohydrate antigen 19-9]. *Hum. Cell* [Internet] 3: 346–51, 1990 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1965684> [cited 2015 Jan 16]
110. Sirisinha S, Tengchaisri T, Boonpucknavig S, Prempracha N, Ratanarapee S, Pausawasdi A: Establishment and characterization of a cholangiocarcinoma cell line from a Thai patient with intrahepatic bile duct cancer. *Asian Pac. J.*

- Allergy Immunol.* [Internet] 9: 153–7, 1991 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1666951> [cited 2015 Jan 16]
111. Iemura A, Maruiwa M, Yano H, Kojiro M: A new human cholangiocellular carcinoma cell line (KMC-1). *J. Hepatol.* 15: 288–298, 1992
112. Shimizu Y, Demetris AJ, Gollin SM, Storto PD, Bedford HM, Altarac S, Iwatsuki S, Herberman RB, Whiteside TL: Two new human cholangiocarcinoma cell lines and their cytogenetics and responses to growth factors, hormones, cytokines or immunologic effector cells. *Int. J. Cancer* [Internet] 52: 252–60, 1992 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1355757> [cited 2015 Jan 16]
113. Yano H, Maruiwa M, Iemura A, Mizoguchi A, Kojiro M: Establishment and characterization of a new human extrahepatic bile duct carcinoma cell line (KMBC). *Cancer* [Internet] 69: 1664–73, 1992 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1312890> [cited 2015 Jan 16]
114. Purdum PP, Ulissi A, Hylemon PB, Shiffman ML, Moore EW: Cultured human gallbladder epithelia. Methods and partial characterization of a carcinoma-derived model. *Lab. Invest.* [Internet] 68: 345–53, 1993 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7680730> [cited 2015 Jan 18]
115. Yamada N, Chung YS, Arimoto Y, Sawada T, Seki S, Sowa M: Establishment of a new human extrahepatic bile duct carcinoma cell line (OCUCh-LM1) and experimental liver metastatic model. *Br. J. Cancer* [Internet] 71: 543–8, 1995 Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2033648&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [cited 2015 Jan 16]
116. Yano H, Iemura A, Haramaki M, Momosaki S, Ogasawara S, Higaki K, Kojiro M: A human combined hepatocellular and cholangiocarcinoma cell line (KMCH-2) that shows the features of hepatocellular carcinoma or cholangiocarcinoma under different growth conditions. *J. Hepatol.* [Internet] 24: 413–22, 1996 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8738727> [cited 2015 Jan 16]
117. Enjoji M, Sakai H, Nawata H, Kajiyama K, Tsuneyoshi M: Sarcomatous and adenocarcinoma cell lines from the same nodule of cholangiocarcinoma. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* [Internet] 33: 681–3, 1997 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9358283> [cited 2015 Jan 18]
118. Enjoji M, Nakashima M, Honda M, Sakai H, Nawata H: Hepatocytic phenotypes induced in sarcomatous cholangiocarcinoma cells treated with 5-azacytidine. *Hepatology* [Internet] 26: 288–94, 1997 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9252136> [cited 2015 Jan 18]
119. Wang S, Han B, Duan H, Chen Y, Peng Z: Establishment of the extrahepatic cholangiocarcinoma cell line. *Zhonghua Shiyan Waike Zaizhi (Chinese J. Exp. Surgery)* 14: 67–68, 1997

120. Takiyama I, Terashima M, Ikeda K, Kawamura H, Kashiwaba M, Tamura G, Suto T, Nakashima F, Sasaki R, Saito K: Establishment and characterization of a new human extrahepatic bile duct carcinoma cell line (ICBD-1). *Oncol. Rep.* [Internet] 5: 463–7 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9468580> [cited 2015 Jan 16]
121. Watanabe M, Chigusa M, Takahashi H, Nakamura J, Tanaka H, Ohno T: High level of CA19-9, CA50, and CEA-producible human cholangiocarcinoma cell line changes in the secretion ratios in vitro or in vivo. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* [Internet] 36: 104–9, 2000 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10718366> [cited 2015 Jan 18]
122. Jiao W, Yakushiji H, Kitajima Y, Ogawa A, Miyazaki K: Establishment and characterization of human hilar bile duct carcinoma cell line and cell strain. *J. Hepatobiliary. Pancreat. Surg.* [Internet] 7: 417–25, 2000 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11180864> [cited 2015 Jan 16]
123. Kim DG, Park SY, You KR, Lee GB, Kim H, Moon WS, Chun YH, Park SH: Establishment and characterization of chromosomal aberrations in human cholangiocarcinoma cell lines by cross-species color banding. *Genes. Chromosomes Cancer* [Internet] 30: 48–56, 2001 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11107175> [cited 2015 Jan 16]
124. Steffen M, Zuehlke I, Scherdin U: Motility factors identified in supernatants of human cholangiocarcinoma cell lines. *Int. J. Oncol.* [Internet] 18: 1107–12, 2001 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11295063> [cited 2014 Nov 13]
125. Emura F, Kamma H, Ghosh M, Koike N, Kawamoto T, Saijo K, Ohno T, Ohkohchi N, Todoroki T: Establishment and characterization of novel xenograft models of human biliary tract carcinomas. *Int. J. Oncol.* [Internet] 23: 1293–300, 2003 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14532968> [cited 2015 Jan 17]
126. Ghosh M, Koike N, Tsunoda S-I, Hirano T, Kaul S, Kashiwagi H, Kawamoto T, Ohkohchi N, Saijo K, Ohno T, Miwa M, Todoroki T: Characterization and genetic analysis in the newly established human bile duct cancer cell lines. *Int. J. Oncol.* [Internet] 26: 449–56, 2005 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15645130> [cited 2015 Jan 16]
127. Sripa B, Leungwattanawanit S, Nitta T, Wongkham C, Bhudhisawasdi V, Puapairoj A, Sripa C, Miwa M: Establishment and characterization of an opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma cell line (KKU-100). *World J. Gastroenterol.* [Internet] 11: 3392–7, 2005 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15948244> [cited 2015 Jan 16]
128. Rattanasinganchan P, Leelawat K, Treepongkaruna S, Tocharoentanaphol C, Subwongcharoen S, Suthiphongchai T, Tohtong R: Establishment and characterization of a cholangiocarcinoma cell line (RMCCA-1) from a Thai patient. *World J. Gastroenterol.* [Internet] 12: 6500–6, 2006 Available from:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4100638&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [cited 2015 Jan 16]
129. Ma S, Hu L, Huang X-H, Cao L-Q, Chan KW, Wang Q, Guan X-Y: Establishment and characterization of a human cholangiocarcinoma cell line. *Oncol. Rep.* [Internet] 18: 1195–200, 2007 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17914572> [cited 2015 Jan 16]
130. Ojima H, Yoshikawa D, Ino Y, Shimizu H, Miyamoto M, Kokubu A, Hiraoka N, Morofuji N, Kondo T, Onaya H, Okusaka T, Shimada K, Sakamoto Y, Esaki M, Nara S, Kosuge T, Hirohashi S, Kanai Y, Shibata T: Establishment of six new human biliary tract carcinoma cell lines and identification of MAGEH1 as a candidate biomarker for predicting the efficacy of gemcitabine treatment. *Cancer Sci.* [Internet] 101: 882–8, 2010 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20088962> [cited 2015 Jan 16]
131. Liu J, Han G, Liu H, Qin C: Suppression of cholangiocarcinoma cell growth by human umbilical cord mesenchymal stem cells: a possible role of Wnt and Akt signaling. *PLoS One* [Internet] 8: e62844, 2013 Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3639969&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [cited 2015 Jan 18]
132. Lu Z, Wang J, Zheng T, Liang Y, Yin D, Song R, Pei T, Pan S, Jiang H, Liu L: FTY720 inhibits proliferation and epithelial-mesenchymal transition in cholangiocarcinoma by inactivating STAT3 signaling. *BMC Cancer* [Internet] 14: 783, 2014 Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4221672&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [cited 2015 Jan 27]
133. Wang B, Li H, Yang R, Zhou S, Zou S: Decitabine inhibits the cell growth of cholangiocarcinoma in cultured cell lines and mouse xenografts. *Oncol. Lett.* [Internet] 8: 1919–1924, 2014 Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4186605&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [cited 2015 Jan 27]
134. Shuang Z-Y, Wu W-C, Xu J, Lin G, Liu Y-C, Lao X-M, Zheng L, Li S: Transforming growth factor- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition generates ALDH-positive cells with stem cell properties in cholangiocarcinoma. *Cancer Lett.* [Internet] 354: 320–8, 2014 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25194504> [cited 2015 Jan 27]
135. Nakagawa S, Sakamoto Y, Okabe H, Hayashi H, Hashimoto D, Yokoyama N, Tokunaga R, Sakamoto K, Kuroki H, Mima K, Beppu T, Baba H: Epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A inhibits the growth of cholangiocarcinoma cells. *Oncol. Rep.* [Internet] 31: 983–8, 2014 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24337160> [cited 2015 Jan 27]
136. Cai J-P, Chen W, Hou X, Liang L-J, Hao X-Y, Yin X-Y: Simvastatin enhances the chemotherapeutic efficacy of S-1 against bile duct cancer: E2F-1/TS downregulation might be the mechanism. *Anticancer. Drugs* [Internet] 24:

- 1020–9, 2013 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23941814> [cited 2015 Jan 27]
137. Xu L, Hausmann M, Dietmaier W, Kellermeier S, Pesch T, Stieber-Gunckel M, Lippert E, Klebl F, Rogler G: Expression of growth factor receptors and targeting of EGFR in cholangiocarcinoma cell lines. *BMC Cancer* 10: 302, 2010
138. Schmitz S: Der Experimentator: Zellkultur [Internet]. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-8274-2573-7> [cited 2015 Jan 28]
139. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* [Internet] 65: 55–63, 1983 Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175983903034> [cited 2014 Aug 21]
140. Gerlier D, Thomasset N: Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Methods* [Internet] 94: 57–63, 1986 Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175986902152> [cited 2015 Mar 3]
141. DeVore RF, Johnson DH, Crawford J, Garst J, Dimery IW, Eckardt J, Eckhardt SG, Elfring GL, Schaaf LJ, Hanover CK, Miller LL: Phase II study of irinotecan plus cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* [Internet] 17: 2710–20, 1999 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10561345> [cited 2015 Mar 16]
142. Graham MA, Lockwood GF, Greenslade D, Brienza S, Bayssas M, Gamelin E: Clinical Pharmacokinetics of Oxaliplatin: A Critical Review. *Clin. Cancer Res.* [Internet] 6: 1205–1218, 2000 Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org.ezproxy.medma.uni-heidelberg.de/content/6/4/1205.abstract> [cited 2015 Mar 16]
143. Tempero M, Plunkett W, Ruiz Van Haperen V, Hainsworth J, Hochster H, Lenzi R, Abbruzzese J: Randomized phase II comparison of dose-intense gemcitabine: thirty-minute infusion and fixed dose rate infusion in patients with pancreatic adenocarcinoma. *J. Clin. Oncol.* [Internet] 21: 3402–8, 2003 Available from: <http://jco.ascopubs.org.ezproxy.medma.uni-heidelberg.de/content/21/18/3402> [cited 2015 Mar 16]
144. Wang L, Liu J, Huang M, Xu N: Comparison of pharmacokinetics, efficacy and toxicity profile of gemcitabine using two different administration regimens in Chinese patients with non-small-cell lung cancer. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* [Internet] 8: 307–13, 2007 Available from: <http://pmc/articles/PMC1859870/?report=abstract> [cited 2015 Mar 16]
145. Länger F, Wasielewski R, Kreipe HH: The importance of immunohistochemistry for the diagnosis of cholangiocarcinomas. *Pathologe* 27: 244–250, 2006

146. Kende a. I, Carr NJ, Sobin LH: Expression of cytokeratins 7 and 20 in carcinomas of the gastrointestinal tract. *Histopathology* 42: 137–140, 2003
147. Shimonishi T, Miyazaki K, Nakanuma Y: Cytokeratin profile relates to histological subtypes and intrahepatic location of intrahepatic cholangiocarcinoma and primary sites of metastatic adenocarcinoma of liver. *Histopathology* 37: 55–63, 2000
148. Lau SK, Prakash S, Geller S a., Alsabeh R: Comparative immunohistochemical profile of hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and metastatic adenocarcinoma. *Hum. Pathol.* 33: 1175–1181, 2002
149. Soussi T: The p53 tumor suppressor gene : From molecular biology to clinical investigation. *Ann. New York Acad. Sci.* 60: 121–139, 2000
150. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC: Mutations in the p53 tumor suppressor gene : Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 54: 4855–4878, 1994
151. Chuang SC, Lee KT, Tsai KB, Sheen PC, Nagai E, Mizumoto K, Tanaka M: Immunohistochemical study of DPC4 and P53 proteins in gallbladder and bile duct cancers. *World J. Surg.* 2004
152. Simbolo M, Fassan M, Ruzzenente A, Mafficini A, Wood LD, Corbo V, Melisi D, Malleo G, Vicentini C, Malpeli G, Antonello D, Sperandio N, Capelli P, Tomezzoli A, Iacono C, Lawlor RT, Bassi C, Hruban RH, Guglielmi A, Tortora G, de Braud F, Scarpa A: Multigene mutational profiling of cholangiocarcinomas identifies actionable molecular subgroups. *Oncotarget* [Internet] 5: 2839–52, 2014 Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4058049&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [cited 2015 Jun 15]
153. Suto T, Habano W, Sugai T, Uesugi N, Funato O, Kanno S, Saito K, Nakamura SI: Aberrations of the K-ras, p53, and APC genes in extrahepatic bile duct cancer. *J. Surg. Oncol.* 73: 158–163, 2000
154. Tannapfel A, Weinans L, Geissler F, Schütz A, Katalinic A, Köckerling F, Hauss J, Wittekind C: Mutations of p53 tumor suppressor gene, apoptosis, and proliferation in intrahepatic cholangiocellular carcinoma of the liver. *Dig. Dis. Sci.* 45: 317–324, 2000
155. Ito Y, Takeda T, Sasaki Y, Sakon M, Yamada T, Ishiguro S, Imaoka S, Tsujimoto M, Higashiyama S, Monden M, Matsuura N: Expression and clinical significance of the erbB family in intrahepatic cholangiocellular carcinoma. *Pathol. Res. Pract.* 197: 95–100, 2001
156. Tan G, Yilmaz A, De Young BR, Behling C, Lehman A, Frankel WL: Immunohistochemical analysis of biliary tract lesions. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 12: 193–197, 2004

157. Diamantis I, Karamitopoulou E, Perentes E, Zimmermann a: P53 protein immunoreactivity in extrahepatic bile duct and gallbladder cancer: Correlation with tumor grade and survival. *Hepatology* 22: 774–779, 1995
158. Wang H, McKnight NC, Zhang T, Lu ML, Balk SP, Yuan X: SOX9 is expressed in normal prostate basal cells and regulates androgen receptor expression in prostate cancer cells. *Cancer Res.* [Internet] 67: 528–36, 2007 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17234760> [cited 2015 Aug 27]
159. Wang H, Leav I, Ibaragi S, Wegner M, Hu GF, Lu ML, Balk SP, Yuan X: SOX9 is expressed in human fetal prostate epithelium and enhances prostate cancer invasion. *Cancer Res.* 68: 1625–1630, 2008
160. Aleman A, Adrien L, Lopez-Serra L, Cordon-Cardo C, Esteller M, Belbin TJ, Sanchez-Carbayo M: Identification of DNA hypermethylation of SOX9 in association with bladder cancer progression using CpG microarrays. *Br. J. Cancer* [Internet] 98: 466–73, 2008 Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2361432&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [cited 2015 Aug 27]
161. Morell CM, Strazzabosco M: Notch signaling and new therapeutic options in liver disease. *J. Hepatol.* [Internet] 60: 885–890, 2014 Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2013.11.028>
162. El Khatib M, Bozko P, Palagani V, Malek NP, Wilkens L, Plentz RR: Activation of Notch signaling is required for cholangiocarcinoma progression and is enhanced by inactivation of p53 in vivo. *PLoS One* [Internet] 8: e77433, 2013 Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3813685&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
163. Kodama Y, Hijikata M, Kageyama R, Shimotohno K, Chiba T: The role of notch signaling in the development of intrahepatic bile ducts. *Gastroenterology* 127: 1775–1786, 2004
164. Geisler F, Strazzabosco M: Emerging roles of Notch signaling in liver disease. *Hepatology* [Internet] 005: 382–392, 2014 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24930574>
165. Kawaguchi Y: Sox9 and programming of liver and pancreatic progenitors. *J. Clin. Invest.* 123: 1881–1886, 2013
166. Dill MT, Tornillo L, Fritzius T, Terracciano L, Semela D, Bettler B, Heim MH, Tchorz JS: Constitutive Notch2 signaling induces hepatic tumors in mice. *Hepatology* 57: 1607–1619, 2013
167. Villanueva A, Alsinet C, Yanger K, Hoshida Y, Zong Y, Toffanin S, Rodriguez-Carunchio L, Solé M, Thung S, Stanger BZ, Llovet JM: Notch signaling is activated in human hepatocellular carcinoma and induces tumor formation in mice. *Gastroenterology* [Internet] 143: 1660–1669.e7, 2012 Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2012.09.002>

168. Yoon HA, Noh MH, Kim BG, Han JS, Jang JS, Choi SR, Jeong JS, Chun JH: Clinicopathological significance of altered Notch signaling in extrahepatic cholangiocarcinoma and gallbladder carcinoma. *World J. Gastroenterol.* [Internet] 17: 4023–30, 2011 Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3199562&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [cited 2015 Aug 27]
169. Smirnova O V., Ostroukhova TY, Bogorad RL: JAK-STAT pathway in carcinogenesis: Is it relevant to cholangiocarcinoma progression? *World J. Gastroenterol.* 13: 6478–6491, 2007
170. Hoey T, Schindler U: STAT structure and function in signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8: 582–587, 1998
171. Bromberg J: Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest* 109: 1133–1137, 2002
172. Bromberg J, Darnell JE: The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 19: 2468–2473, 2000
173. Dokduang H, Techasen A, Namwat N, Khuntikeo N, Pairojkul C, Murakami Y, Loilome W, Yongvanit P: STATs profiling reveals predominantly-activated STAT3 in cholangiocarcinoma genesis and progression. *J. Hepatobiliary. Pancreat. Sci.* [Internet] 21: 767–76, 2014 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25044480> [cited 2015 Jun 15]
174. Dokduang H, Juntana S, Techasen A, Namwat N, Yongvanit P, Khuntikeo N, Riggins GJ, Loilome W: Survey of activated kinase proteins reveals potential targets for cholangiocarcinoma treatment. *Tumor Biol.* 34: 3519–3528, 2013
175. Ewald F, Nörz D, Grottke A, Hofmann BT, Nashan B, Jücker M: Dual inhibition of PI3K-AKT-mTOR-and RAF-MEK-ERK- signaling is synergistic in cholangiocarcinoma and reverses acquired resistance to MEK-inhibitors. *Invest. New Drugs* 32: 1144–1154, 2014
176. Mendoza MC, Er EE, Blenis J: The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: Cross-talk and compensation. *Tren* 36: 320–328, 2011
177. Xia X, Francis H, Glaser S, Alpini G, LeSage G: Bile acid interactions with cholangiocytes. *World J. Gastroenterol.* 12: 3553–3563, 2006
178. Schmitz KJ, Lang H, Wohlschlaeger J, Sotiropoulos GC, Reis H, Schmid KW, Baba HA.: AKT and ERK1/2 signaling in intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J. Gastroenterol.* 13: 6470–6477, 2007
179. Schmitz KJ, Otterbach F, Callies R, Levkau B, Hölscher M, Hoffmann O, Grabellus F, Kimmig R, Schmid KW, Baba HA: Prognostic relevance of activated Akt kinase in node-negative breast cancer: a clinicopathological study of 99 cases. *Mod. Pathol.* 17: 15–21, 2004

180. Schmitz KJ, Wohlschlaeger J, Alakus H, Bohr J, Stauder M, Worm K, Winde G, Schmid KW, Baba HA: Activation of extracellular regulated kinases (ERK1/2) but not AKT predicts poor prognosis in colorectal carcinoma and is associated with k-ras mutations. *Virchows Arch.* 450: 151–159, 2007
181. Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Morooka T, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Ishikawa O, Ohigashi H, Nakamori S, Monden M, Aozasa K: Prognostic significance of activated Akt expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* 10: 2846–2850, 2004
182. Yoon J-H, Higuchi H, Werneburg NW, Kaufmann SH, Gores GJ: Bile acids induce cyclooxygenase-2 expression via the epidermal growth factor receptor in a human cholangiocarcinoma cell line. *Gastroenterology* 122: 985–993, 2002
183. Amongyingcharoen S, Suriyo T, Thiantanawat A, Watcharasit P, Satayavivad J: Taurothiocholic acid promotes intrahepatic cholangiocarcinoma cell growth via muscarinic acetylcholine receptor and EGFR/ERK1/2 signaling pathway. *Int. J. Oncol.* [Internet] 2317–2326, 2015 Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2015.2939>
184. Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, Wilhelm S, Lynch M, Carter C: Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res.* 66: 11851–11858, 2006
185. Babeu J-P, Boudreau F: Hepatocyte nuclear factor 4-alpha involvement in liver and intestinal inflammatory networks. *World J. Gastroenterol.* [Internet] 20: 22–30, 2014 Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3886012&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [cited 2015 Mar 8]
186. Parviz F, Matullo C, Garrison WD, Savatski L, Adamson JW, Ning G, Kaestner KH, Rossi JM, Zaret KS, Duncan SA: Hepatocyte nuclear factor 4-alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat. Genet.* 34: 292–296, 2003
187. Tanaka T, Jiang S, Hotta H, Takano K, Iwanari H, Sumi K, Daigo K, Ohashi R, Sugai M, Ikegame C, Umezu H, Hirayama Y, Midorikawa Y, Hippo Y, Watanabe A, Uchiyama Y, Hasegawa G, Reid PC, Aburatani H, Hamakubo T, Sakai J, Naito M, Kodama T: Dysregulated expression of P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4 α in the pathogenesis of human cancer. *J. Pathol.* 208: 662–672, 2006
188. Cozzolino AM, Alonzi T, Santangelo L, Mancone C, Conti B, Steindler C, Musone M, Cicchini C, Tripodi M, Marchetti A: TGFbeta overrides HNF4alpha tumor suppressing activity through GSK3beta inactivation: Implication for hepatocellular carcinoma gene therapy. *J. Hepatol.* [Internet] 58: 65–72, 2013 Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2012.08.023>

189. Hatziapostolou M, Polytarchou C, Aggelidou E, Drakaki A, Poultsides GA, Jaeger SA, Ogata H, Karin M, Struhl K, Hadzopoulou-Cladaras M, Iliopoulos D: An HNF4 α -miRNA inflammatory feedback circuit regulates hepatocellular oncogenesis. *Cell* [Internet] 147: 1233–1247, 2011 Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.043>
190. Nikolaidou-Neokosmidou V, Zannis VI, Kardassis D: Inhibition of hepatocyte nuclear factor 4 transcriptional activity by the nuclear factor kappaB pathway. *Biochem. J.* 398: 439–450, 2006
191. Lazarevich NL, Cheremnova OA, Varga EV., Ovchinnikov DA, Kudrjavitseva EI, Morozova OV., Fleishman DI, Engelhardt NV, Duncan SA: Progression of HCC in mice is associated with a downregulation in the expression of hepatocyte nuclear factors. *Hepatology* 39: 1038–1047, 2004
192. Mizutani A, Koinuma D, Tsutsumi S, Kamimura N, Morikawa M, Suzuki HI, Imamura T, Miyazono K, Aburatani H: Cell type-specific target selection by combinatorial binding of Smad2/3 proteins and hepatocyte nuclear factor 4 α in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* 286: 29848–29860, 2011
193. Glimelius B, Hoffman K, Sjöden PO, Jacobsson G, Sellström H, Enander LK, Linné T, Svensson C: Chemotherapy improves survival and quality of life in advanced pancreatic and biliary cancer. *Ann. Oncol.* 7: 593–600, 1996
194. Herold G: Innere Medizin. [Buch]
195. Patt YZ, Hassan MM, Lozano RD, Waugh KA, Hoque AM, Frome AI, Lahoti S, Ellis L, Vauthey JN, Curley SA, Schnirer II, Rajjman I: Phase II trial of cisplatin, interferon alpha-2b, doxorubicin, and 5-fluorouracil for biliary tract cancer. *Clin. Cancer Res.* 7: 3375–3380, 2001
196. Mccubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong WT, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Alberto M, Franklin RA, Jenkins L, Elena R: Roles of the Raf/Mek pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys acta* 1773: 1263–1284, 2007
197. Zhang C, Liu L-X, Dong Z-R, Shi G-M, Cai J-B, Zhang P-F, Ke A-W, Yu J-X, Zhou J, Fan J: Up-regulation of 14-3-3 ζ expression in intrahepatic cholangiocarcinoma and its clinical implications. *Tumor Biol.* 36: 1781–1789, 2014
198. Schwaighofer H: Interventionell-endoskopische Therapie des Gallengangskarzinoms [Internet]. 2011 Available from: <http://www.medmedia.at/spectrum-onkologie/hepatobiliare-karzinome-interventionell-endoskopische-therapie-des-gallengangskarzinoms/>

7 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Johanna Luisa Grün
Geburtsdatum: 17.10.1992
Geburtsort: Bergisch Gladbach
Familienstand: ledig
Vater: Peter Longin Kurtz
Mutter: Sabine Marianne Grün

SCHULISCHER WERDEGANG

1999-2002 Katholische Grundschule Honschaftsstraße, Köln-Holweide
2002-2011 Gymnasium Thusneldastraße, Köln-Deutz
01.07.2011 Abitur, Note: 1,0

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2011/2012 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
01.09.2013 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
Seit WS 2013 Hauptstudium
Voraussichtl. 2017 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)

8 DANKSAGUNG

Ich möchte mich ganz herzlich bei all jenen bedanken, die mir in den Jahren der Laborarbeit so viel geholfen haben. Besonders sind dabei zu nennen: Dr.rer.nat. Alexander Thomas Bauer, Prof. Dr. med Timo Gaiser, PhD Honglei Wenig und sein PhD Student Xiaodong Yuan, die mir bei Experimenten so sehr geholfen haben, Karin Berner-Leischner, ohne die wir mit Sicherheit nicht einmal die Hälfte der Tumorpräparate bekommen hätten, mein Co-Doktorand Tobias Staib, mit dem ich mich bei jeglichen Problemen stets beraten konnte und natürlich mein Doktorvater, Betreuer und Laborpapa PD Dr. Felix Rückert, der mir Begeisterung für die Forschung, unerschütterlichen Optimismus und viel Unterstützung gab.

Aber in all der Zeit des Laborierens und Schreibens standen mir natürlich noch viele andere Menschen zur Seite, die bei solch einer Danksagung auch keinesfalls zu kurz kommen sollten: Meine Freunde, die mich immer wieder verständnisvoll bemitleidet und aufgemuntert haben, wenn „meine“ Zellen mal wieder nicht so wachsen wollten wie ich mir das vorstellte, meine Familie, die trotz ganz anderer beruflicher Richtungen stets interessiert und hilfsbereit war, und Simon Herrmann, der immer für mich da ist.