

Aus der Chirurgischen Klinik
der Medizinischen Fakultät Mannheim
Direktor: Prof. Dr. med. C. Reißfelder

Etablierung und Charakterisierung zweier Zelllinien des cholangiozellulären Karzinoms

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT MANNHEIM
der
RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT
ZU HEIDELBERG

vorgelegt von
Christopher Fabian Maier
aus Bad Mergentheim

2020

Dekan: **Prof. Dr. med. Sergij Goerd**t
Referent: **Prof. Dr. med. Sebastian Schölch**

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	v
1 Einleitung	1
1.1 Das cholangiozelluläre Karzinom	1
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	1
1.1.2 Diagnostik und Staging	2
1.1.3 Karzinogenese	4
1.1.4 Histopathologischer Hintergrund	5
1.1.5 Therapie und Prognose	6
1.2 Experimentelle Modelle des cholangiozellulären Karzinoms . . .	7
1.3 DNA-Kopienzahlveränderungen	9
1.4 Zielstellung	10
2 Materialien	11
2.1 Chemikalien	11
2.2 Zellkulturmedien und -zusätze	11
2.3 Kitsysteme	12
2.4 Labormaterialien	13
2.5 Geräte	13
2.6 Antikörper	14
2.7 In-vitro Kulturen	15
2.7.1 Kommerzielle Zelllinien	15
2.7.2 Organoide	15
3 Methoden	16
3.1 Zellkulturtechniken	16
3.1.1 Klassische Zelllinien	16
3.1.2 Organoide	18
3.2 Immunfluoreszenz	19

3.3	Zellviabilitätsassays	20
3.3.1	Proliferationsassay	20
3.3.2	Drug Assays	21
3.4	Array-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH) . . .	22
3.4.1	DNA-Isolation	22
3.4.2	aCGH-Durchführung	23
3.4.3	aCGH-Auswertung	23
4	Ergebnisse	24
4.1	Zellkulturen	24
4.2	Immunfluoreszenz	25
4.3	Zellviabilitätsassays	25
4.3.1	Proliferation	25
4.3.2	Drug Assay	31
4.4	Array-based Comparative Hybridization (aCGH)	32
5	Diskussion	36
5.1	In-vitro-Kultivierung	36
5.2	Immunhistochemisches Profil	37
5.3	Probleme der medikamentösen Tumorthherapie	39
5.4	Kopienzahlveränderungen des Cholangiokarzinoms	41
5.5	Fazit und Ausblick	44
	Zusammenfassung	46
	Literaturverzeichnis	48
	Danksagung	72

Abkürzungsverzeichnis

aCGH	array-based comparative genomic hybridization	DEPC	Diethylpyrokarbonat
AJCC	American Joint Committee on Cancer	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
BAM	Basismedium A	DMSO	Dimethylsulfoxid
BBM	Basismedium B	DNA	Desoxyribonukleinsäure
BSA	bovines Serumalbumin	EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
CCC	cholangiozelluläres Karzinom	EGF	epidermal growth factor
dCCC	distales CCC	EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
eCCC	extrahepatisches CCC	FGF	fibroblast growth factor
iCCC	intrahepatisches CCC	FBS	fetal bovine serum
pCCC	perihiläres CCC	H	heavy chain
CCL	cancer cell line	HCC	hepatozelluläres Karzinom
CK	Zytokeratin	HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
cHCC-CCC	combined hepatocellular-cholangiocellular carcinoma	IgG	Immunglobulin G
CM	CCC-Organoid-Medium	IgG	Immunglobulin G
CNV	copy number variation	K-SFM	keratinocyte – serum-free medium
CNL	copy number loss	KCM	KSFM containing medium
CNG	copy number gain	L	light chain
CRC	kolorektales Karzinom	PBS	phosphate buffered saline
CSC	cancer stem cell	Pen Strep	Penicillin Streptomycin
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane	RT	Raumtemperatur
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindole	UICC	International Union against Cancer

1 Einleitung

1.1 Das cholangiozelluläre Karzinom

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das cholangiozelluläre Karzinom (CCC) ist eine maligne Erkrankung, die sich vom Epithel der Gallenwege ableitet und charakterisiert ist durch eine äußerst schlechte Prognose.^{25,92} Entsprechend der Anatomie der Gallenwege wird das CCC in intrahepatische (iCCC), perihiläre (pCCC) und distale extrahepatische (dCCC) Subtypen unterteilt.^{21,92,132} Zwar ist das CCC die häufigste maligne Erkrankung der Gallenwege und seine Subform iCCC repräsentiert nach dem hepatozellulären Karzinom (HCC) die zweithäufigste primäre Tumorerkrankung der Leber, dennoch machen die Gallengangstumoren nur 3 % der gastrointestinalen Tumoren aus und sind folglich vergleichbar selten.¹⁷ Die Krebserkrankungen des hepatobiliären Systems sind global verantwortlich für 13 % der krebisbedingten Todesfälle, von diesen wiederum können 10–20 % den CCC zugeschrieben werden.¹³⁵ Zum Diagnosezeitpunkt sind die Patienten im weltweiten Durchschnitt über 50 Jahre alt; In westlichen Industrienationen macht sich die Krankheit durchschnittlich erst im siebten Lebensjahrzent klinisch bemerkbar, dabei ist eine Diagnosestellung vor dem 40. Lebensjahr sehr selten.^{21,169} Männer haben gegenüber Frauen ein leicht erhöhtes Lebenszeitrisiko (m:w = 1,2–1,5:1).^{91,149,169} In Südostasien, insbesondere in Thailand, werden die höchsten CCC-Inzidenzen registriert (50–113/100.000 Einwohner); westliche Industrienationen liegen dagegen deutlich niedriger (Australien: 0,1–0,2/100.000 Einwohner).^{149,158} Die verschiedenen lokalen CCC-Häufigkeiten beruhen möglicherweise auf der unterschiedlichen Verteilung und Ausprägung spezifischer genetischer und umweltbezogener Risikofaktoren.^{17,169} In den letzten Jahrzehnten konnte ein globaler

Anstieg der Inzidenzen und Mortalitätsraten der iCCC beobachtet werden. Die Häufigkeiten und Sterblichkeitsraten der extrahepatischen CCC (eCCC) zeigten sich dabei unverändert oder sogar rückläufig.^{55,79,135} Einige Risikofaktoren und ihre Assoziation zu den spezifischen CCC-Typen konnten aufgedeckt werden. So gehen Erkrankungen der Gallenwege sowie Störungen des Galleflusses mit einem erhöhten CCC-Risiko einher. Zu dieser Gruppe zählen beispielsweise die primär sklerosierende Cholangitis,^{27,36,41,76} Gallengangszysten^{157,190} und die Hepatolithiasis.^{82,88,93} Die Prävalenz der Gallengangszysten sowie der Hepatolithiasis ist in asiatischen Ländern erhöht.^{96,167} Auch chronische Entzündungen des Leberparenchyms gehen mit einem erhöhten iCCC-Risiko einher. Dies trifft vor allem auf parasitäre Infektionen durch Saugwürmer wie *Opisthorchis viverrini* und *Clonorchis sinensis* zu, die endemisch in asiatischen Ländern vorkommen und dort ein großes gesundheitliches Problem darstellen.^{74,156} Weitere mögliche Risikofaktoren wie beispielsweise die Leberzirrhose, Nikotin- sowie Alkoholabusus, das metabolische Syndrom sowie Diabetes mellitus sind Gegenstand aktueller Forschung.^{118,169} Die meisten CCC sind sporadischen Ursprungs und das Vorliegen eines der bekannten oder vermuteten Risikofaktoren kann nicht ausgemacht werden.^{25,80,169}

1.1.2 Diagnostik und Staging

Die klinische Präsentation der Gallengangstumoren ist unspezifisch und zur endgültigen Diagnose müssen verschiedene diagnostische Verfahren kombiniert werden.¹²³ CCC sind initial meist asymptomatisch und werden erst im Verlauf klinisch auffällig. Dies führt zu einer späten Diagnose und aufgrund des fortgeschritteneren Erkrankungsstadiums zu einer schlechten Prognose.^{122,155} ICCC-Patienten präsentieren sich am häufigsten mit abdominellen Schmerzen (38–51,7 %) gefolgt von Ikterus (28 %).^{100,180} Klinisch manifeste Tumoren sind verglichen mit asymptomatischen iCCC weitaus seltener resektabel (25 % vs. 58 %).⁴⁸ Das Leitsymptom der eCCC ist der schmerzlose, obstruktive Ikterus oder eine obstruktionsbedingte Cholangitis.^{21,57} Die meisten Patienten mit CCC weisen zusätzlich systemische Zeichen einer malignen Erkrankung auf, wie Gewichtsverlust und Nachtschweiß.^{21,100,180} Zum breiten Spektrum der Differenzi-

aldiagnosen gehören unter anderen das HCC, Pankreastumoren, Lebermetastasen, Gallensteine, biliäre Strikturen sowie Cholangitiden.⁵⁷ Durch die Heterogenität der CCC bezüglich des unterschiedlichen Wachstumsverhaltens und Lokalisation im Gallengangssystem gestalten sich eine frühe Diagnose und ein genaues Staging als herausfordernd.⁷¹ Da die chirurgische Entfernung des Tumors die einzige kurative Option darstellt, ist eine rasche Klärung der Resektabilität für das Überleben des Patienten entscheidend.^{78,113} Eine histologische Aufarbeitung von Gewebeprobe n aus verdächtigen Läsionen und Lymphknoten ist trotz moderner bildgebender Verfahren zur Diagnosesicherung und zur Planung des weiteren therapeutischen Prozederes unerlässlich.¹¹² In vielen chirurgischen Zentren wird bei Patienten mit in der Bildgebung resektabel erscheinenden Tumoren zum Ausschluss lokaler Metastasierung eine Staging-Laparoskopie durchgeführt.^{19,139} Carbohydrate associated antigen 19-9 (CA 19-9) ist ein Serummarker für Tumoren des oberen Gastrointestinaltraktes und der am meisten untersuchte Tumormarker für maligne Erkrankungen der Gallenwege.⁶⁰ Dieses Glykoprotein kann allerdings auch bei gutartigen Erkrankungen der Leber, der Gallenblase oder des Pankreas im Serum erhöht sein und fällt bei CCC-Patienten mit Lewis-Antigen-negativer Blutgruppe falsch negativ aus.^{95,116} Neben der diagnostischen Rolle in der Detektion von CCC und Unterscheidung von iCCC und HCC besitzt dieser Serummarker für Patienten mit CCC auch eine prognostische Aussagekraft.^{121,165,166} Der diagnostische Nutzen anderer Tumormarker wie beispielsweise CEA und CA-125 ist aufgrund der niedrigen Spezifität ebenfalls eingeschränkt.²¹ Zum Staging von CCC stehen je nach Subtyp verschiedene Klassifikationssysteme zur Verfügung.^{3,20,21,45,46,65,112,144,191} Bei dem häufig verwendeten System der American Joint Committee on Cancer (AJCC)/International Union Against Cancer (UICC) handelt es sich um ein primär pathologisches Stagingssystem, welches auf die chirurgische Gewinnung von Gewebe angewiesen ist und bis dato als einziges eine tatsächliche Korrelation zwischen den jeweiligen Stadien und der Überlebenszeit der Patienten bietet.^{22,50}

1.1.3 Karzinogenese

Die molekularen Mechanismen der cholangiozellulären Karzinogenese und Tumordprogression sind noch nicht genau geklärt.⁶⁶ Biliäre Entzündung und chronische Cholestase sowie das Zusammenspiel der beiden spielen bei der malignen Transformation der Cholangiozyten eine Schlüsselrolle.^{21,91} Unter diesen Milieus kommt es zur Freisetzung von Zytokinen und reaktiven Sauerstoffspezies, welches zu ausgedehntem zellulärem Stress und irreversibler DNA-Schädigung führt.⁵⁹ In iCCC konnten zwei verschiedene genomische Typen charakterisiert werden: ein inflammatorischer Typ mit Überwiegen der Aktivierung inflammatorischer Signalwege und ein proliferativer Typ mit vorherrschender Onkogenaktivierung einhergehend mit einer schlechteren Prognose.¹⁵³ In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Aktivierung von NOTCH und AKT in reifen Hepatozyten zur iCCC-Bildung führt.¹⁴⁷ Rezeptortyrosinkinasen, wie der IL-6-Rezeptor, c-MET sowie die EGFR-Familienmitglieder ERBB2 und ERBB1/EGFR sind ebenfalls entscheidend an der Cholangiokarzinogenese beteiligt.²¹ Zahlreiche somatische Alterationen in Onkogenen (z.B. KRAS), Tumorsuppressor-Genen (z.B. TP53, SMAD4), epigenetischen Faktoren (IDH1/2) und chromatinmodifizierenden Genen (z.B. ARID1A, BAP1 und PBM1) wurden in CCC beschrieben.^{13,24,26,35,72,114} Dabei unterscheiden sich die CCC je nach unterschiedlicher Ätiologie, Ethnizität, anatomischer Lokalisation und Tumorstadium in ihrem Mutationsprofil.^{9,26,72,102,114} KRAS-Mutationen sind beispielsweise häufiger in pCCC (22–53 %) als in iCCC (9–17 %) anzutreffen, während IDH1/2-Mutationen charakteristischer für iCCC sind.^{9,35}

Krebsursprungszellen und Krebsstammzellen

Die Krebsursprungszelle ist diejenige normale Zelle, welche die erste(n) krebsinitiiierende(n) Mutation(en) erhalten hat.^{140,176} Bei den sogenannten Krebsstammzellen (CSC) handelt es sich um eine zelluläre Untergruppe innerhalb des Tumors, welche die Fähigkeit der Selbsterneuerung sowie Bildung heterogener Zelllinien besitzt und damit das maligne Wachstum unterhält.^{13,140,176} Beide Zelltypen müssen nicht zwingend miteinander verwandt sein und können sich phänotypisch wesentlich von einander unterscheiden.^{32,140,176} CCC unterschiedlicher Lokalisati-

on im Gallengangssystem präsentieren eine ausgeprägte Heterogenität, die die Frage nach potentiell unterschiedlichen zellulären Ursprüngen der CCC-Subtypen aufwirft.⁸⁴ Die Ergebnisse verschiedener Studien untermauern die Annahme, dass sich nicht nur Cholangiozyten alleine sondern verschiedene Zelltypen zu CCC transformieren können.^{63,147} Zu den potenziellen Ursprungszellen zählen hepatische Stammzellen, Cholangiozyten und peribiliäre Drüsenzellen.³² Hepatische Stammzellen können sich sowohl in Hepatozyten als auch in Cholangiozyten differenzieren und so können Tumoren mit unterschiedlichen Phänotypen aus ihnen hervorgehen.⁸⁶ CSC können von verschiedenen Stammzellnischen abstammen, dazu zählen die hepatischen Stammzellen in den Heringkanälen und die Stammzellen innerhalb der peribiliären Drüsen.³² Diese Zellen sind hochgradig tumorigen und werden für die Chemoradioresistenz und Tumorrekurrenz der CCC mitverantwortlich gemacht.^{13,176} Normalerweise machen CSC in soliden Malignomen weniger als 3 % der Zellpopulation aus, in CCC sind es mehr als 30 % der Tumormasse.³³

1.1.4 Histopathologischer Hintergrund

CCC lassen sich anhand ihrer anatomischen Lokalisation im Gallengangssystem kategorisieren, hierzu stehen mehrere Systeme zur Verfügung.^{2,3,25,86} Man unterscheidet grob intrahepatische von extrahepatischen Tumoren.⁹² Nach AJCC / UICC und dem College of American Pathologists (CAP) werden die eCCC weiter in perihiläre und distale Tumoren unterteilt.³ Die früher als Klatskintumoren bezeichneten pCCC umfassen danach Malignome, welche zwischen den Gallengängen zweiter Ordnung und der Vereinigung des Ductus cysticus mit dem Ductus hepaticus communis (DHC) lokalisiert sind und beziehen häufig die Hepatikusgabel mit ein.^{3,131} Gallengangstumoren des Ductus choledochus werden als dCCC bezeichnet, dabei werden die Karzinome der Papilla Vateri und der Gallenblase beziehungsweise des Ductus cysticus nicht zu den CCC gezählt, sondern als eigenständige Entitäten behandelt.^{130,186} CCC treten am häufigsten in perihilärer Lage, am seltensten intrahepatisch und in ca. 5 % multifokal auf (50–67 % pCCC, 27–42 % dCCC, 6–8 % iCCC).^{44,78,106}

Für die mikroskopische Einteilung der CCC, bei denen es sich meistens um

Adenokarzinome handelt, existieren ebenfalls mehrere Systeme.^{86,103–105,175} Da verschiedene histologische Subtypen mit unterschiedlichen klinisch-pathologischen und molekularen Eigenschaften assoziiert sind, ist die Unterscheidung nicht nur im histopathologischen Sinne von Bedeutung.^{77,84,86} Darüber hinaus gibt es die gemischten oder kombiniert hepatozellulär-cholangiozellulären Karzinome (cHCC-CCC), welche erst seit jüngerer Vergangenheit als eigener CCC-Subtyp angesehen werden, eindeutige phänotypische Charakteristiken von sowohl CCC als auch HCC präsentieren und ca. 0,4–14,5 % der primären Lebermalignome ausmachen.^{84,104,112,132,159} Einige Autoren schlagen vor, CCC anhand ihrer vermuteten Ursprungszellen einzuteilen.^{6,32,84}

Aufgrund der großen Ähnlichkeit der CCC zu den Neoplasien des Pankreas sowie zu den Neoplasien des oberen Gastrointestinaltrakts präsentiert sich das immunhistochemische Profil der CCC als wenig spezifisch und somit kann sich die immunhistochemische Differenzierung der CCC schwierig gestalten.¹¹² Dies trifft besonders auf die Unterscheidung zwischen iCCC und Metastasen des Pankreaskarzinoms oder anderer Adenokarzinome zu.⁹² Die Verwendung eines Panels aus verschiedenen immunhistochemischen Markern kann zwar die Differenzierung, vor allem der intrahepatischen Raumforderungen, erleichtern, dennoch sind andere diagnostische Modalitäten und insbesondere die bildgebenden Verfahren essenziell.¹⁴⁸ CCC exprimieren häufig die Zytokeratine (CK) 7 und 19 (CK 7: 90 %, CK 19: 84 %) sowie EpCAM.^{5,90} Typischerweise sind CCC negativ für Hep Par1; genau das Gegenteil gilt für HCC, so dass unter anderem dieser Marker zur Differenzierung zwischen iCCC und HCC herangezogen werden kann.⁹⁰

1.1.5 Therapie und Prognose

Die amerikanische Krebsgesellschaft berichtet ein 5-Jahres-Überleben von 24 % für lokalisierte (auf die Gallengänge begrenzte) iCCC, 13 % für lokalisierte eCCC sowie 1 % für metastasierte CCC unabhängig vom Subtyp.¹ In bis zu 50 % der Patienten besteht bei Diagnosestellung bereits eine Lymphknotenbeteiligung, in 10–20 % eine Peritonealkarzinomatose.⁷⁸ Jüngerer Lebensalter gilt als starker Prädiktor für eine potenzielle, kurative Behandlung; im Gegensatz dazu erhalten ältere Patienten wahrscheinlicher endoskopische Therapien in palliativer

Intention.¹⁵⁰ Zwar stellt die chirurgische Resektion aktuell die einzige kurative Therapieoption dar, allerdings kommen dafür weniger als ein Drittel der Patienten zum Diagnosezeitpunkt in Frage.^{22,78,150} Die mittlere Überlebenszeit für Patienten in nicht-resektablen Stadien liegt zwischen 6 und 12 Monaten und für Patienten, die keinerlei Therapie erhalten bei 3,9 Monaten.^{55,86} Bis zu 85 % der operierten Patienten erleiden innerhalb von 3 Jahren ein Rezidiv und die 5-Jahres-Überlebensraten nach erfolgter Resektion liegen für iCCC und dCCC bei 22–44 % sowie für pCCC bei 11–41 %.^{109,129,143,150,163,164,171} Zum jetzigen Zeitpunkt existieren keine klaren Empfehlungen für den Einsatz adjuvanter Therapien. Die Ergebnisse der kürzlich veröffentlichten BILCAP-Studie sprechen dafür, dass eine sechsmonatige adjuvante Monotherapie mit Capecitabin sowohl das Gesamtüberleben als auch die postoperativ rezidivfreie Zeit verlängern kann.¹²⁸ Für Patienten mit metastasierten oder lokal fortgeschrittenen CCC entspricht aktuell die Kombination aus Gemcitabin und Cisplatin der Chemotherapie der ersten Wahl.^{21,54,78,136,172} Aktuell existieren verschiedene Richtlinien für die Therapie und Versorgung von Patienten mit CCC, die sich in einigen Bereichen widersprechen.³¹ Um die schlechte Prognose dieser Krebserkrankung zu verbessern, bedarf es etablierten Behandlungsrichtlinien.

1.2 Experimentelle Modelle des cholangiozellulären Karzinoms

Präklinische Krebsmodelle stellen notwendige Werkzeuge zur Erforschung der Biologie maligner Erkrankungen dar und können nicht nur wichtige Erkenntnisse über die molekularen Prozesse der Karzinogenese liefern, sondern im Idealfall auch das in-vivo-Ansprechen der Krebszellen auf spezifische Therapeutika vorhersagen.^{141,183,192} Man unterscheidet Tiermodelle von Modellen humanen Ursprungs. Letztere entsprechen menschlichen Malignomen, welche außerhalb ihres Wirtskörpers untersucht werden; Hierzu zählen die klassischen Zelllinien (cancer cell lines, CLL) und Primärkulturen, die Sphäroide sowie die Tumor-Organoiden.^{111,141,174,183} Die Xenografts nehmen eine Sonderstellung ein, da sie zu beiden Modelltypen gezählt werden können.

Klassische CCL stellen seit langem einen Grundpfeiler für die Erforschung der Biologie maligner Erkrankungen dar.^{87,192} Die Vorteile liegen in ihrer Homogenität, ihrer guten Charakterisierbarkeit, ihrem guten Zugang für genetische Modifikationen sowie ihrer leichten Erhaltung und ihrem fast unerschöpflichen Wachstum in einfachen Medien.^{97,183} Aufgrund der guten Vermehrbarkeit und leichten experimentellen Handhabung bilden die CCL die Basis für diverse Assays mit hohem Zelldurchsatz, beispielsweise für ausgedehnte Arzneimittel-Screenings und für umfangreiche genetische Untersuchungen.¹⁴ Die Zellen unterliegen jedoch in langfristigen serum-basierten Kulturbedingungen einer starken Selektion. Diese Selektion führt einerseits zu einer sehr niedrigen Erfolgsrate mit der permanente Zelllinien ausgehend von soliden Tumoren etabliert werden können und andererseits vermindert sie die Ähnlichkeit der CCL zum ursprünglichen Primärtumor.¹⁷⁴ Viele der etablierten CCL stammen von metastasierenden oder schnell wachsenden Tumoren und folglich besteht eine deutliche Unterrepräsentation der langsam wachsenden Malignome.¹⁴¹ Da sich CCC nur schwer *in vitro* kultivieren lassen, ist die Anzahl der verfügbaren CCL ausgesprochen gering.^{34,87} So wurden die meisten Untersuchungen mit der kommerziell erhältlichen CCC-CCL TFK-1 durchgeführt, welche von einem eCCC eines 63-jährigen Patienten stammt.^{142,192} Da die begrenzte Anzahl an CCC-CCLs in ihrer Gesamtheit nicht die außerordentliche Heterogenität der CCC widerspiegeln kann und die artifiziellen Kulturbedingungen zu einer starken Selektion führen, resultiert eine nur eingeschränkte Übertragbarkeit der *in-vitro*-Resultate auf die *in-vivo*-Situation.^{174,183,192} Deshalb zeigen viele Verbindungen mit vielversprechenden Behandlungserfolgen in CCC-CCLs in klinischen Studien nur eingeschränkte anti-tumorale Wirksamkeit.^{15,47,58} Um die Spannweite genetischer und epigenetischer Variationen der CCC und ihrer Subtypen in der Erforschung potenzieller medikamentöser Therapien miteinzubeziehen, ist die Verwendung einer suffizienten Anzahl an CCL grundlegend wichtig.¹⁸³

Bei den Organoiden handelt es sich um eine recht neue Kultivierungsmethode, welche auf der Einbettung von adulten Stammzellen in einer dreidimensionalen, die Basalmembran-imitierenden Hydrogelmatrix beruht.¹⁴⁵ Daraus ergeben sich dreidimensionale, selbst-organisierende Kulturen, die bezüglich Struktur, Funktion und Zelltypen dem Ursprungsorgan ähnlicher sind als die CCL.¹² Or-

ganoide ahmen die Komplexität des Ursprungsgewebes bezüglich Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen nach, was unter zweidimensionalen Kulturbedingungen nicht möglich ist.^{12,174} Im Gegensatz zu den CCL können Organoide effizient ausgehend von resezierten CCC-Biopsien (100 % Erfolg für Tumore mit > 5 % proliferierenden Zellen)²⁹ und Stanzbiopsien (60 % Erfolg)¹⁰⁸ etabliert werden. Bei allen Vorteilen darf nicht außer Acht gelassen werden, dass 3D-Organoidsysteme deutlicher zeitaufwendiger und teurer als CCL sind.⁹⁹ Die Komplexität der Organoide macht diese Modelle weniger zugänglich für Screenings mit hohem Probendurchsatz und erschwert die Durchführung von in-vitro-Assays.⁴⁹ Da es sich bei der Organoidkultur um ein recht junges Kultivierungssystem handelt und viele der in-vitro-Anwendungen für Organoidsysteme schwierig zu etablieren sind, muss die Rolle in der präklinischen Forschung noch weiter eruiert werden.

Tiermodelle sind essentielle Werkzeuge zur Entwicklung von neuen therapeutischen Strategien und diagnostischen Instrumenten, denn sie erlauben die Erforschung der Pathophysiologie und des Ansprechens auf medikamentöse Therapien innerhalb eines lebenden Organismus.^{83,174} Für das CCC stehen mehrere präklinische in-vivo-Modelle zur Verfügung, dazu zählen Karzinogen-basierten Modelle, gentechnisch veränderte Mausmodelle und Xenograft-Modelle.⁹⁴ Die Mausmodelle trugen zwar einen immensen Beitrag zum grundlegenden Verständnis von Krebserkrankungen bei, aber der wissenschaftliche Gebrauch von Tieren gestaltet sich als sehr arbeits- und zeitaufwendig, teuer sowie ethisch problematisch.^{37,51,141}

1.3 DNA-Kopienzahlveränderungen

DNA-Kopienzahlveränderungen (CNV) können zahlreich in soliden Tumoren gefunden werden.⁷ CNV werden dabei in Kopienzahlverluste (CNL) und Kopienzahlgewinne (CNG) eingeteilt. CNL bezeichnen dabei eine reduzierte Anzahl von Gen- oder Sequenzfragmentkopien im Genom und CNG bezeichnen dabei das Vorhandensein von zusätzlichen Genkopien.¹⁹⁴ Dabei wird angenommen, dass es sich bei CNV um frühe Ereignisse der Karzinogenese handelt, welche die Bildung und das Wachstum eines Tumors vorantreiben.⁴² Viele dieser Aberrationen betreffen dabei bekannte Onkogene oder Tumorsuppressorgene, deren

Expressionslevel durch die CNV verändert werden.^{8,127} Die Detektion und die vergleichende Interpretation dieser Aberrationen vereinfacht die Identifikation von Genen und Signalwegen, die in biologischen Prozessen oder Krankheiten grundlegende Rollen spielen.¹²⁵ Als Folge entgleister mitotischer Ereignisse treten nach vielen Zellzyklen zu den kausalen und progressiven CNV weitere sogenannte "Passenger Alterations" hinzu und folglich beherbergen CNV-Profile untersuchter Tumoren nicht nur tumorspezifische Muster sondern eben auch zufällige Aberrationen.⁴² Trotz der großen Vielfalt an beobachteten CNV verschiedener Tumoren, können CNV-Profile tumor- und gewebespezifische Charakteristiken aufweisen.^{38,52,181} Tumor-Subtypen des selben Ursprungsgewebes können teilweise durch charakteristische CNV-Spektren unterschieden werden und damit liegt nahe, dass unterschiedliche Mechanismen genomischer Instabilität der jeweiligen Pathogenese zugrunde liegen könnten.¹⁶ Die große Bandbreite an genomischen Veränderungen, die aus der für Krebs charakteristischen, genomischen Instabilität resultiert, führt dazu, dass nur für gewisse Tumoren die CNV-Analyse wertvolle Informationen über die Lokalisation von Krebsgenen liefert und dass sie für andere Tumoren informationslos bleibt.¹²⁵ Bezüglich Krebserkrankungen können DNA-CNV einerseits nützliche molekulare Marker darstellen, um prognostische Aussagen zu treffen sowie für die Vorhersage von Behandlungserfolgen, andererseits sind bestimmte CNV-Muster eines Tumortyps mit spezifischen klinisch-pathologischen Merkmalen assoziiert.⁴²

1.4 Zielstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zwei, aus humanem cholangiozellulärem Karzinomgewebe generierte Organoidzelllinien in klassische zweidimensionale Krebszelllinien überführt werden. Nachdem adäquate Kulturbedingungen geschaffen werden konnten, sollten die neuen Zelllinien charakterisiert und auf ihre Eignung für in-vitro-Versuche untersucht werden. Zur besseren Vergleichbarkeit und Interpretation der Ergebnisse sollten die Experimente zusammen mit der kommerziell erhältlichen Gallengangskrebszelllinie TFK-1 durchgeführt werden.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Albumin Fraction V (Bovine Serum Albumin, BSA)	Carl Roth
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO, TED)	Sigma-Aldrich
4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI)	Sigma-Aldrich
Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltes Wasser UltraPure	Thermo Fisher Scientific
Dimethylsulfoxid (DMSO)	WAK-Chemie GmbH
Formaldehydlösung 4 %	SAV LP GmbH
Gemcitabin (40 mg/ml)	Hexal
Mowiol 4-88	Sigma-Aldrich
Phosphate Buffered Saline (PBS), ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Life Technologies
Prestoblue Cell Viability Reagent	Thermo Fisher Scientific
Propan-2-ol, Isopropanol	VWR
Sorafenib Tosylat	Selleckchem
Tris-Hcl-Buffer, pH 8.5	Carl Roth
Triton X-100	Sigma-Aldrich
0,25 % Trypsin-EDTA (1 x)	Life Technologies
Ultrapure Dnase/Rnase-Free Distilled Water	Thermo Fisher Scientific

2.2 Zellkulturmedien und -zusätze

Medien und Zusätze	Hersteller
A 83-01	Tocris
Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium (A-DMEM)	Life Technologies
B-27 Supplement (50 x)	Life Technologies

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies
Cell Recovery Solution	Corning
Epidermal Growth Factor (EGF)	Invitrogen
Fetal Bovine Serum (FBS), Fetal Cow Serum (FCS)	Life Technologies
Forskolin	Tocris
Freezing Medium	Life Technologies
Gastrin (1 μ M)	Sigma-Aldrich
Glutamax (100 x)	Life Technologies
Growth Factor Reduced (GFR) Matrigel Matrix	Corning
HEPES (1 M)	Life Technologies
ITS Liquid Media Supplement (100 x)	Sigma-Aldrich
Keratinocyte Serum-free Medium (K-SFM)	Life Technologies
N-Acetylcysteine	Sigma-Aldrich
Nicotinamide	Sigma-Aldrich
Noggin	Thermo Fisher Scientific
Penicillin Streptomycin (Pen Strep) 10.000 U/mL	Life Technologies
Primocin	Invivogen
Recombinant Human FGF-10	Peprotech
RPMI 1640	Gibco
Rspodin	R&D Systems
Wnt3A	Merck
Y-27632 dihydrochloride	Sigma-Aldrich

2.3 Kitsysteme

Kitsysteme	Hersteller
DNeasy Blood & Tissue Kit	QIAGEN
Oligo aCGH/ChIP-on-chip Hybridization Kit	Agilent Technologies
SureTag Complete DNA Labeling Kit	Agilent Technologies
QIAamp DNA Mini Kit	QIAGEN

2.4 Labormaterialien

Labormaterialien	Hersteller
Biosphere Filter Tips (10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l)	Eppendorf
CELLSTAR 96-Lochplatten mit schwarzen Lochwänden	Greiner
Counting Slides	Bio-Rad
Costar Multiloehplatten, steril (6–48-Loch)	Corning
Costar Stripette, steril (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Corning
Glaspipetten	VWR
Hybridization Chamber	Agilent Technologies
iSpacer 0,2 mm	SunJin Lab
Konische Zentrifugenröhrchen (Falcon-Tubes) (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one
Kryoröhrchen	Greiner bio-one
Nunc/Lab-Tek II Chamber Slide w/Cover	Thermo Fisher Scientific
Objektträger	Engelbrecht
Präzisionsdeckgläser	Carl Roth
QIAamp DNA Mini QIAcube Kit	QIAGEN
Reaktionsgefäße (1 ml, 2 ml)	Eppendorf
Zellkulturflaschen Nunc/EasYFlask (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Thermo Fisher Scientific

2.5 Geräte

Geräte	Hersteller
Biofuge fresco	Heraeus
Einfrierbehälter Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific
FEP20-Five Easy Plus pH-Meter	Mettler Toledo
Inkubator	Thermo Fisher Scientific
Konfokales Mikroskop TCS SP5	Leica
Magnetrührer RCTB	IKA
MSC-Adavantage Werkbank	Thermo Fisher Scientific
Megafuge 1.0R	Heraeus
Mikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss

NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific
Präzisionswaage	Sartorius
Pipett Boy Easypet	Eppendorf
Röhrchen(Tube)-Rotator	Thermo Fisher Scientific
QIAcube	QIAGEN
SureScan microarray scanner	Agilent Technologies
TC20 Automated Cell Counter	Bio-Rad
Vakuum-Sicherheits-Absaugsysteme	DITABIS
Varioskan Lux multimode microplate reader	Thermo Fisher Scientific
Vortex 1	IKA
Wasserbad	Memmert

2.6 Antikörper

Primäre Antikörper

Bei allen primären Antikörpern handelt es sich um monoklonale Mausantikörper mit Reaktivität gegen humane Antigene. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde Alexa Fluor 488 (AF 488) verwendet.

Antigen	Klon	Verd.	Order
CK 7	OV-TL 12/30 [AF 488]	1:100	Novus Biologicals/ NBP2-47940AF488
CK 19	RCK108	1:50–100	DAKO/ M088801-2
EpCAM	9C4 [AF 488]	1:500	Biolegend/ 324210
TP53	1C12	1:2000	Cell Signaling/ 2524

Sekundäre Antikörper

sek. Antikörper	Konjugat	Verd.	Order
Goat anti-Mouse IgG	AF 488	1:200	Invitrogen/A-11001

2.7 In-vitro Kulturen

2.7.1 Kommerzielle Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz	Order
TFK-1	humanes Gallengangskarzinom	Saijyo u. a. ¹⁴²	DSMZ / ACC 344

2.7.2 Organoide

Alle Organoidkulturen wurden aus menschlichem Tumorgewebe nach Broutier u. a. erzeugt.²⁹ Die verwendeten Tumorgewebe wurden durch die pathologische Abteilung des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus Dresden analysiert und als Cholangiokarzinome identifiziert. Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis (Ethikkommissionsvotum EK 120032016). Bei P68 handelte es sich ursprünglich um ein metastasiertes iCCC und bei P83 um ein dCCC.

3 Methoden

3.1 Zellkulturtechniken

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Wenn nicht explizit anders angegeben, wurden die eukaryotischen Zellen jeweils für 5 min bei 500 x g zum Pelletieren abzentrifugiert. Die Organoide und CCL wurden bei 37 °C in einer 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. In den Tabellen 3.1 und 3.2 sind die verwendeten Zellkulturmedien mit den Inhaltsstoffen aufgelistet.

Medium	Inhaltsstoffe
Basismedium A (BAM)	DMEM, 20 % FBS, 1 % Pen Strep
KSFM Containing Medium (KCM)	2/3 BAM, 1/3 KSFM
Basismedium B (BBM)	A-DMEM, 1 % Glutamax (100 x), 1 % HEPES, 1 % Pen Strep
CCC-Organoid-Medium (CM)	siehe Tabelle 3.2

Tabelle 3.1: Verwendete Zellkulturmedien

3.1.1 Klassische Zelllinien

Erzeugung klassischer Zelllinien aus Organoidkulturen

Wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben, wurden die CCC-Organoide in Matrigel auf einer 48-Lochplatte kultiviert. Pro Organoid-Linie (P68 und P83) wurden 3 volle Wells verwendet und in 200–500 μ l Basismedium B (BBM) überführt. Es erfolgte 4- bis 6-maliges Auf- und Abpipettieren der Organoidsuspensionen durch enger geschmolzene Glaspipetten. Die Zellen wurden mit 7–9 ml BBM gewaschen. Das erhaltene Pellet wurde in 1 ml cell recovery solution resuspendiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit 7–9 ml BBM wurden

Zusatz	Volumenverhältnis
Wnt3A	1:2
BBM	1:4
Rspondin	1:10
Noggin	1:10
B27	1:50
Nicotinamide	1:100
ITS Liquid Media Supplement (100 x)	1:100
N-Acetylcysteine	1:500
FGF 10	1:500
Primocin	1:500
A83-01 (500 μ M)	1:625
Y-27632	1:1000
Egf (1:10)	1:1000
Gastrin (1 μ M)	1:1000
Forskolin	1:1000

Tabelle 3.2: CCC-Organoid-Medium (CM)

sie in 2 ml CCC-Organoid-Medium (CM) auf einer 6-Wellplatte ausgesät. Nach Adhärenz der Zellen wurde das Medium mit einer Mischung aus 50 % CM und 50 % KSFM Containing Medium (KCM) ersetzt. Ab der nächsten Passage wurde nur noch KCM als Kulturmedium verwendet. TFK-1 wurde initial in RPMI/10 % FBS kultiviert, bei der nächsten Passage in 50 % KCM und 50 % RPMI/10 % FBS und anschließend ausschließlich in KCM.

Passagieren der Zelllinien

Das Medium wurde mindestens 2-mal wöchentlich gewechselt und die Zellen ab einer Konfluenz von 80–90 % gesplittet. P68 wurde im Splittingverhältnis 1:2–3 alle 4–5 Tage gesplittet, P83 1:2–3 alle 5–8 Tage und TFK-1 1:10 alle 4–5 Tage. Zum Ablösen der Zellen wurde Trypsin-EDTA verwendet (T175-Flaschen: 4 ml, T75 Flaschen: 2 ml, T25-Flaschen: 1 ml Trypsin-EDTA). Die Reaktion wurde mit Basismedium A (BAM) gestoppt und die in KCM resuspendierten Zellen entsprechend ausgesät.

Kryokonservierung

In Freezing Medium resuspendierte Zellpellets wurden in Kryoröhrchen überführt und in mit Isopropylalkohol gefüllten Gefrierbehälter mindestens 24 Stunden auf -80 °C gekühlt. Anschließend erfolgte die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entfernt und in einem 37 °C warmen Wasserbad erwärmt. Es wurden 9–10 ml BAM hinzugegeben und anschließend zentrifugiert. Die Zellen wurden in KCM resuspendiert und in einer T25-Zellkulturflasche ausgesät.

Zellzählung

Jeweils 10 μ l einer trypsinisierten und gemischten Zellsuspension wurden auf spezielle Zählplättchen übertragen und mit dem TC20 automatisierten Zellzähler (Bio-Rad) gemessen. Jede Zellsuspension wurde 4-mal hintereinander gemessen und der daraus errechnete Mittelwert für das weitere Vorgehen verwendet.

3.1.2 Organoide

Passagieren von Organoidzelllinien

Organoide wurden 1- bis 2-mal pro Woche passagiert. Volle Wells wurden im Verhältnis 1:2 gesplittet, ansonsten im Verhältnis 1:1. Es wurden maximal 4 gerntete Wells in 200–500 μ l BBM überführt. Die Zellsuspensionen wurden 4- bis 6-mal durch enger geschmolzene Glaspipettenöffnungen pipettiert. Die Organoide wurden mit 7–9 ml BBM gewaschen. Die erhaltenen Pellets wurden in verflüssigtem Matrigel resuspendiert (20–30 μ l Matrigel/kalkuliertem Well). 20–30 μ l der Matrigel-Zellsuspension wurde in die Mitte eines Wells einer 37 °C vorgewärmten 48-Wellplatte gegeben und 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Den ausgehärteten Matrigeltröpfchen wurden jeweils 300 μ l CCM langsam hinzugegeben.

Kryokonservierung

Das Verfahren ist äquivalent zu dem der 2D-Zelllinien (siehe 3.1.1). Für ein Kryoröhrchen wurden 2–4 volle Wells gesammelt und 700–1000 μ l Gefriermedium verwendet.

3.2 Immunfluoreszenz

Die für die Immunofluoreszenzfärbungen verwendeten Lösungen sind in Tabelle 3.3 aufgelistet. Ein Mowiol 4-88 basiertes Eindeckmedium wurde nach den Empfehlungen des Herstellers (Carl Roth) zubereitet und verwendet. Alle Immunfluoreszenzbilder wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskopes (Leica TCS SP5) angefertigt.

Lösungen	Inhaltstoffe
Fixationslösung	2 % Formaldehyd in PBS
Permeabilisationslösung	0,2 % Triton X-100 in PBS
Blocklösung	1 % BSA in PBS
Antikörperlösung	benötigte Menge an Antikörperstocklösung in Blocklösung
DAPI-Lösung	0,1 % DAPI in Blocklösung

Tabelle 3.3: Immunfluoreszenz: Lösungen

Die Färbungen wurden auf 8-Well-Kammerplättchen durchgeführt und es wurden immer 200 μl von jeder benötigten Lösung pro Kammer verwendet. Bevor die Lösungen getauscht wurden, wurden die Zellen jeweils 3-mal mit PBS gewaschen. Jeweils 10.000 Zellen wurden in 200 μl Medium in jede Kammer überführt und anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden für 30 Minuten auf Eis in Fixationslösung inkubiert und danach für 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) in Permeabilisationslösung. Nach dem die Blocklösung wurde 30–60 min bei RT angewendet wurde, wurde die Lösung ohne zu Waschen mit der jeweiligen spezifischen Antikörperlösung getauscht. Alle Antikörper wurden für 60 Minuten bei RT unter Lichtausschluß inkubiert. Falls die Anwendung von Sekundärantikörpern notwendig war, wurde nach 3-maligem Waschen mit Blocklösung die Sekundärantikörperlösung aufgetragen. Die Antikörperlösung wurde verworfen und die Zellen wurden mit DAPI-Lösung für 10 Minuten bei RT im Dunkeln gegengefärbt. Nach Auftragen des Eindeckmediums und Montage des Deckglässchens wurden die fertigen Plättchen bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert.

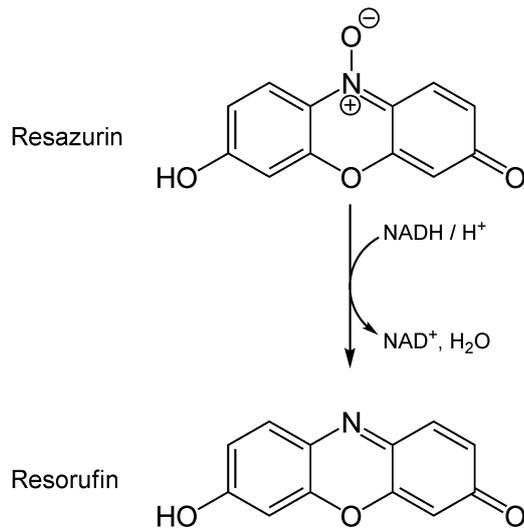


Abbildung 3.1: **Reduktion von Resazurin zu Resorufin**

3.3 Zellviabilitätsassays

Lebende Zellen besitzen die intrinsische Fähigkeit zur chemischen Reduktion, dies bedingt einen aktiven und funktionierenden Zellmetabolismus. Wie in Abbildung 3.1 dargestellt, wird die chemische Verbindung Resazurin in metabolisch aktiven Zellen absorbiert und durch Reduktion in das stark fluoreszierende Resorufin überführt.¹¹⁷ Die bei der Resazurinmetabolisierung auftretende, messbare Intensitätsänderung der Fluoreszenz ist proportional mit der Anzahl an metabolisch aktiven Zellen.^{4,134} Die nachfolgenden Zellviabilitätsexperimente wurden mit dem auf Resazurin basierenden Presto Blue-Reagenz durchgeführt. Die Zellen wurden auf 96-Wellplatten mit durchsichtigen, für Fluoreszenzmessungen geeigneten Böden ausgesät. Das Presto Blue-Reagenz wurde im Verhältnis 1:10 bezogen auf das Gesamtvolumen pro Well zu den Zellen gegeben und vor der Messung für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die eigentliche Analyse wurde mithilfe eines geeigneten Mikroplattenlesegerätes (Varioskan Lux) durchgeführt.

3.3.1 Proliferationsassay

Die metabolische Aktivität jeder Zelllinie sollte an fünf aufeinanderfolgenden Tagen gemessen werden. Da die CCL P68 und P83 mehr als 24 h benötigten

um vollständig adhären zu wachsen, konnte das Medium nicht täglich ohne signifikante Zellverluste gewechselt werden. Daher wurden fünf 96-Wellplatten vorbereitet, wobei jede Platte für den jeweiligen Tag stand. Jeder Platte enthielt ein Triplet mit Medium für den Leerwert und für jede Zelllinie wurden 3 Wells mit jeweils 10.000 Zellen in 90 μl befüllt. Die fertigen Platten wurden bei 37 °C inkubiert. Die erste Messung fand 6 Stunden nach Inkubationsstart statt, die weiteren in jeweils 24 Stunden Intervallen.

Aus den jeweiligen Triplets wurde nach erfolgter Leerwertkorrektur die Mittelwerte M_{1-5} und die zugehörige Standardabweichungen SD_{1-5} berechnet. Das Proliferationsassay wurde für jede Zelllinien 3-mal durchgeführt und die jeweiligen erhaltenen Mittelwerte der einzelnen Versuchsreihen wurden ebenfalls gemittelt $M_{tot;1-5}$. Die zu den jeweiligen $M_{tot;1-5}$ gehörenden Standardabweichungen $SD_{tot;1-5}$ wurden mit Hilfe der Gauß'schen Fehlerfortpflanzung berechnet. Für die graphische Darstellung wurde der erste Wert $M_{tot;1}$ als 100 % definiert und die übrigen $M_{tot;2-5}$ inklusive Standardabweichungen im Verhältnis zu diesem Wert bestimmt ($Proliferationsindex = M_{tot;2-5}/M_{tot;1}$; $SD_{\%;1-5} = SD_{tot;1-5}/M_{tot;1}$).

3.3.2 Drug Assays

Alle Drug Assays wurden als Einzeltestungen mit Sorafenib oder Gemcitabin durchgeführt. Die antitumorale Wirkung von Sorafenib konnte bereits in mehreren In-Vitro-Modellen des CCC, TFK-1 eingeschlossen, gezeigt werden.^{68,81,161} Gemcitabin entspricht der aktuellen Erstlinientherapie für Patientin mit nicht resektablen Tumoren.^{21,78,136} In jedes benötigte Well wurden 10.000 Zellen in 90 μl Medium transferiert und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Dann wurden die Arzneimittel (Sorafenib und Gemcitabin) zu den jeweiligen Zellsuspensionen gegeben. Folgende Konzentrationen wurden verwendet:

- Gemcitabin: 0, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM , 10 μM , 100 μM , 200 μM
- Sorafenib: 0, 1 μM , 10 μM , 20 μM , 30 μM , 40 μM , 50 μM , 60 μM

Jede Konzentration wurde als Triplet angesetzt und nach 72 h Inkubation wurde die Zellviabilität gemessen. Nach Abzug der Leerwerte wurde aus den

Triplettwerten die Mittelwerte M_{conc} und Standardabweichungen SD_{conc} berechnet. Die Drug Assays wurden 3-mal durchgeführt und die M_{conc} der jeweiligen Messreihen miteinander gemittelt $M_{conc;tot}$ sowie die Standardabweichungen über die Gauß'sche Fehlerfortpflanzung bestimmt. Dabei wurden die Mittelwerte ohne Chemotherapeutikum als 100 % definiert und die relativen Zellviabilitäten wurden äquivalent zum Proliferationsindex wie in 3.3.1 berechnet.

3.4 Array-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH)

Die Microarray-basierte vergleichende genomische Hybridisierung (aCGH) ist ein Verfahren zur Detektion von CNV; somit kann genomweit sowohl ein Verlust (Deletion) als auch ein Zugewinn (Duplikation) an genomischen Bereichen nachgewiesen werden.¹¹⁵ Bei der aCGH werden Normal- und Tumor-DNA-Proben isoliert und mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Anschließend werden die markierten Proben gemischt und simultan auf einem Array cohybridisiert. Bei dem Array handelt es sich um einen Trägerchip mit kartierten DNA-Fragmenten (z.B. Oligonukleotide). Die beiden DNA-Proben konkurrieren um die Bindungsstellen auf dem Array, welches nach der Hybridisierung mit Hilfe eines Microarray Scanners ausgewertet werden kann. Anhand der unterschiedlichen Intensitäten der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe ergeben sich die relativen Kopienzahlveränderungen zwischen der Normal- und der Tumor-DNA.

3.4.1 DNA-Isolation

Genomische DNA der Zelllinien (TFK-1, Pat68, Pat83) wurde mithilfe des Kits QIAamp DNA Mini für den QIAcube (beides QIAGEN) isoliert und in DEPC-behandeltes Wasser eluiert. Als Referenzproben wurde genomische DNA aus dem Blut der Patienten 68 und 83 mit Hilfe des Kits DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN) gewonnen und ebenfalls in DEPC-behandeltes Wasser eluiert. Die Isolation wurde streng nach den Handbucharweisungen des Kitherstellers durchgeführt. Für TFK-1 wurde Normal-DNA von Patient 68 als Referenz verwendet.

3.4.2 aCGH-Durchführung

Die aCGH-Versuche wurden nach den Anweisungen des Nutzerhandbuchs von Agilent Technologies durchgeführt.¹⁶⁸ Für die Fluoreszenzmarkierung wurde das SureTag Complete DNA Labeling Kit verwendet und für die Hybridisierung das Oligo aCGH/ChIP-on-chip Hybridization Kit und die Hybridisierungskammer Hybridization Chamber (alles Agilent Technologies). Als Plattenlesegerät kam der SureScan Microarray Scanner (Agilent Technologies) zum Einsatz.

3.4.3 aCGH-Auswertung

Die aus den gescannten Assays erhaltenen Daten wurden mit dem Programm Feature Extraction Software (Agilent Technologies) extrahiert und anschließend in das Programm Agilent Genomic Workbench (Agilent Technologies) überführt. Zur Detektion von CNV wurde der aberration detection method-2 (ADM-2)-Algorithmus mit einem Schwellenwert von 6,0 und diploid peak-Zentralisation verwendet. Als Abberationsfilter wurde ein Minimum von log₂ratio von ± 0.25 und ein Minimum an betroffenen Oligonucleotiden von 100 definiert.

4 Ergebnisse

4.1 Zellkulturen

Ausgehend von zwei Cholangiokarzinom-Organoidlinien konnten zwei klassische, zweidimensionale Zelllinien P68 und P83 generiert werden. Die meisten etablierten primären CCC-Zelllinien können in DMEM- oder RPMI-Medien mit unterschiedlichen Konzentrationen an FBS, typischerweise 10–20 %, kultiviert werden.¹⁹² Dies gelang nicht für P68 sowie P83, welche in diesen Medien nach einigen Passagen starben. Auch der Zusatz von Y-27632, einem ROCK-Inhibitor, erbrachte keine Änderung. Alle Zelllinien wuchsen schließlich in KCM, einer Mischung aus DMEM mit 20 % FBS und KSFM. Hierfür wurden die Organoide initial ohne Matrigel kultiviert und anschließend wurde sukzessiv über zwei Passagen das Organoidmedium CM durch KCM ersetzt. Äquivalent dazu wurde die Zelllinie TFK-1, welche standardmäßig in RPMI mit 10 % FBS kultiviert wird, in KCM überführt. Der Wechsel des Mediums von CM beziehungsweise RPMI/10 % FBS in KCM ging bei allen Zelllinien nicht mit morphologischen Veränderungen einher. Die Verdopplungszeit von TFK-1 lag bei ca. 40 h, die von P68 bei ca. 55 h und die von P83 bei ca. 60 h (siehe hierzu auch 4.3.1).

Morphologie

Abbildung 4.1 zeigt die phasenkontrast-mikroskopischen Aufnahmen der jeweiligen Zelllinien, welche alle als adhärente, epitheliale Monolayer für CCC typisch pflastersteinartig wuchsen. TFK-1 präsentierte sich, übereinstimmend mit Saijyo u. a., als polygonale Zellen, welche manchmal zytoplasmatische Vakuolen beinhaltenen.¹⁴² Die P68-Zellen waren eher schmal, teilweise polygonal und wuchsen zum größten Teil zügig adhärent mit einer kleinen Fraktion frei flottierender, vitaler

Zellen. Es fanden sich ebenfalls Zellen mit zytoplasmatischen Vakuolen. P83 hingegen wies einmal große, polygonale Zellen neben kleineren, dicht gepackten, rundlichen oder polygonal-strukturierten Zellen auf. Bei beiden konnten teilweise viele zytoplasmatische Vakuolen gefunden werden.

4.2 Immunfluoreszenz

Die drei Zelllinien TFK-1, P68 und P83 wurden auf die Expression von für CCC typische immunhistochemische Marker Zytokeratin (CK) 7 und 19 sowie EpCAM untersucht. Zusätzlich wurde die intrazelluläre Verteilung des Tumorsuppressors p53 beurteilt. Als Verfahren kam die Immunfluoreszenz zum Einsatz und zur Gegenfärbung wurde DAPI verwendet. Die gefärbten Proben wurden mit einem konfokalen Mikroskop analysiert: Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.2–4.5 aufgezeigt. Alle drei Zellreihen präsentierten sich ausgesprochen positiv für die Zytokeratine 7 und 19 (Abb. 4.2 und 4.3). In Übereinstimmung mit dem epithelialen Wachstum exprimierten alle Zelllinien EpCAM (Abb. 4.4). Der Tumorsuppressor p53 konnte in allen Zelllinien vor allem in nukleärer Lokalisation aber auch geringfügig in zytoplasmatischer Lage gefunden werden (Abb. 4.5). Der zytoplasmatische p53-Anteil war bei P83 deutlich ausgeprägter als bei den anderen beiden CCL.

4.3 Zellviabilitätsassays

4.3.1 Proliferation

Abbildung 4.6 zeigt die Wachstumskurven der Zelllinien im Verlauf von 96 Stunden. Für die Proliferationsbestimmung wurde der jeweils initial gemessene Intensitätswert als 100 % definiert und die übrigen Messwerte in Relation dazu aufgetragen (= Proliferationsindex). TFK-1 präsentierte eine Verdopplungszeit (im Bereich 200–400 %) von ca. 40 h, P68 (im Bereich 150–300 %) von ca. 55 h und P83 (im Bereich 100–200 %) von ca. 60 h.

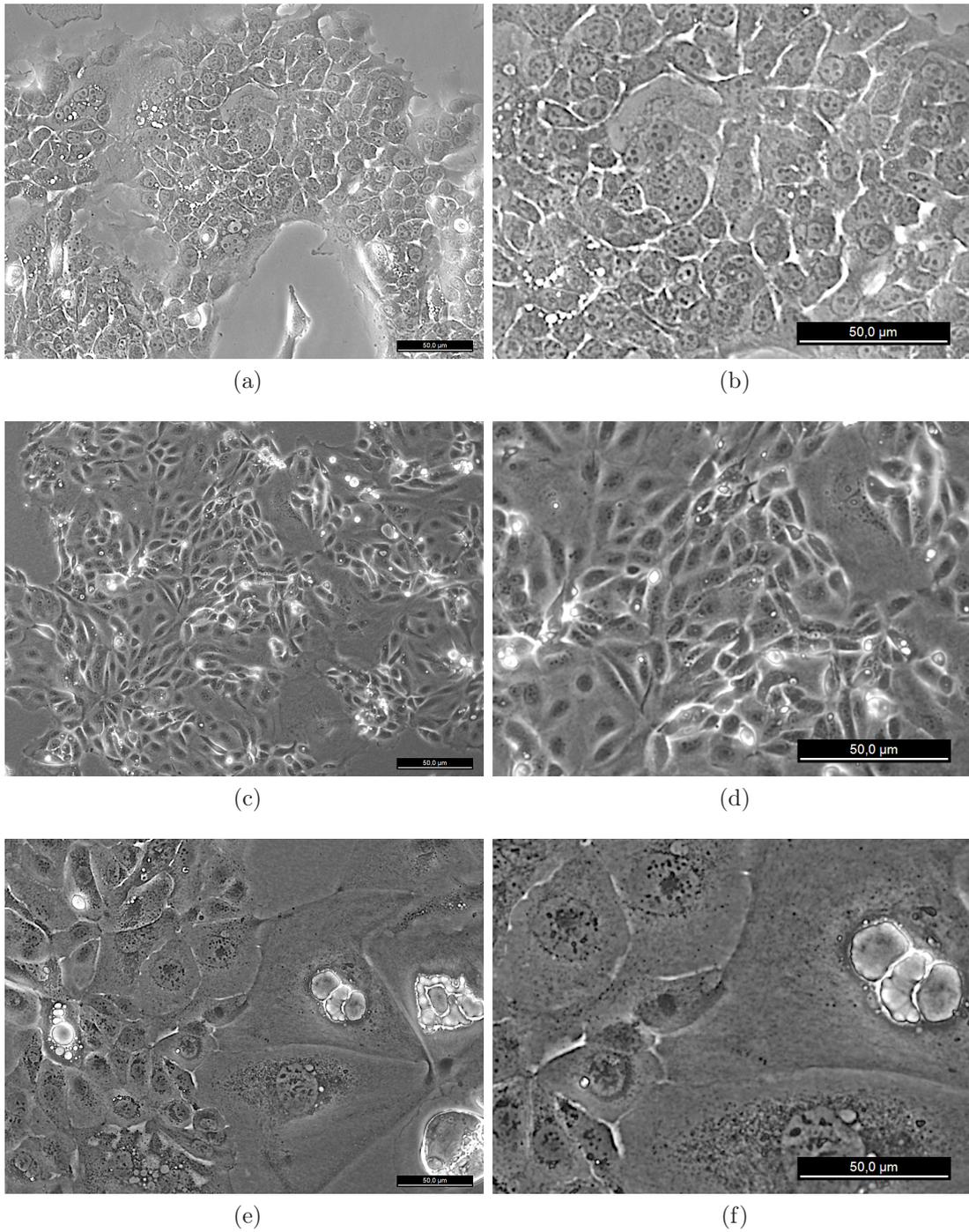


Abbildung 4.1: **Phasenkontrast-mikroskopische Aufnahmen der Gallengangskrebszelllinien TFK-1 (a, b), P68 (c, d) und P83 (e, f):** einmal Übersichtsbilder (linke Spalte) sowie vergrößerte, repräsentative Ausschnitte (rechte Spalte). Alle Zelllinien wuchsen als epitheliale Monolayer mit typischer pflastersteinartiger Konfiguration.

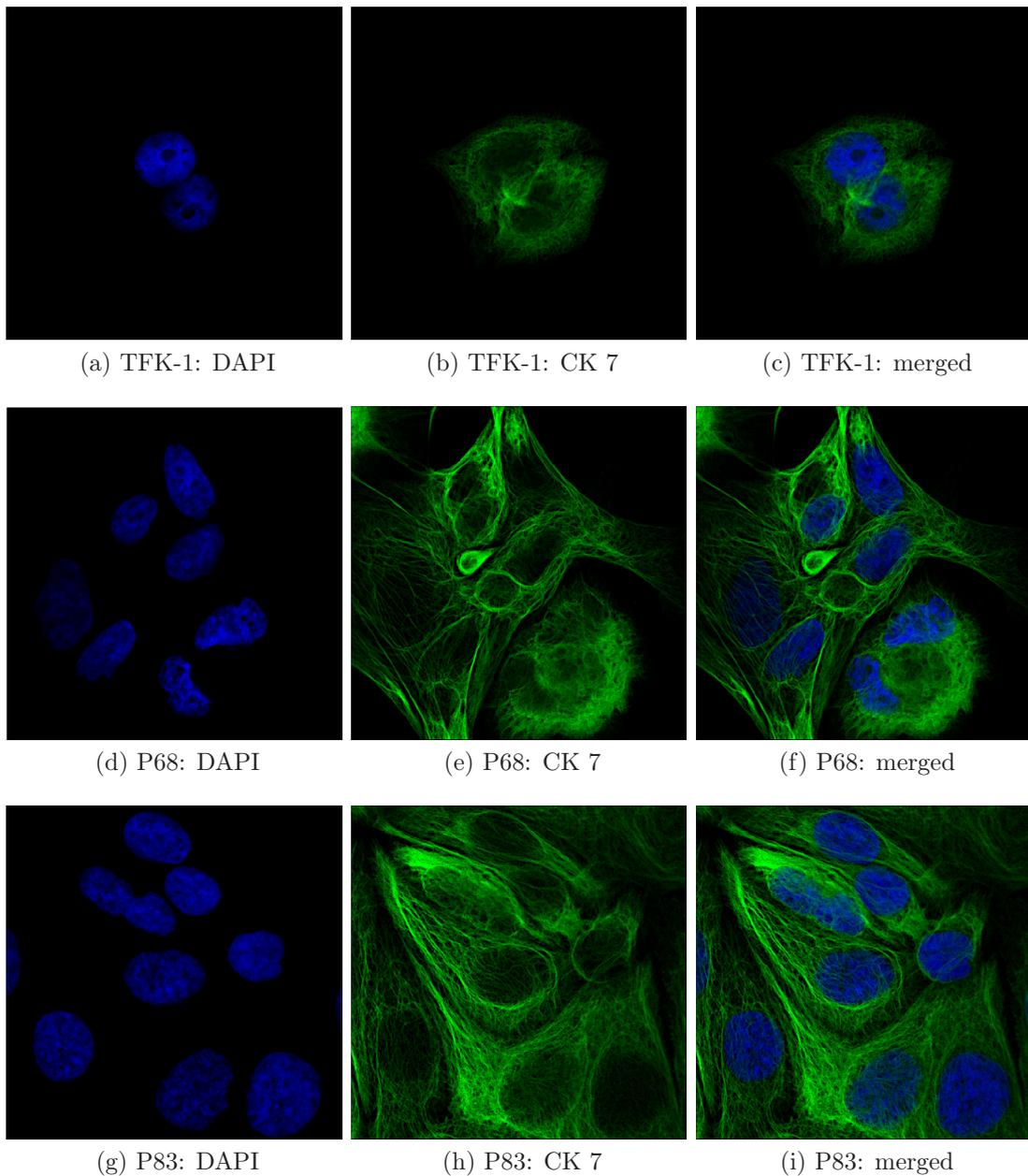


Abbildung 4.2: **Zytokeratin (CK) 7 - Immunfluoreszenzfärbung der Zelllinien TFK-1, P68 und P83:** Alle Zelllinien wiesen eine starke Positivität für CK 7 auf. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die zusammengesetzten Bilder (merged) sind in der rechten Spalte dargestellt.

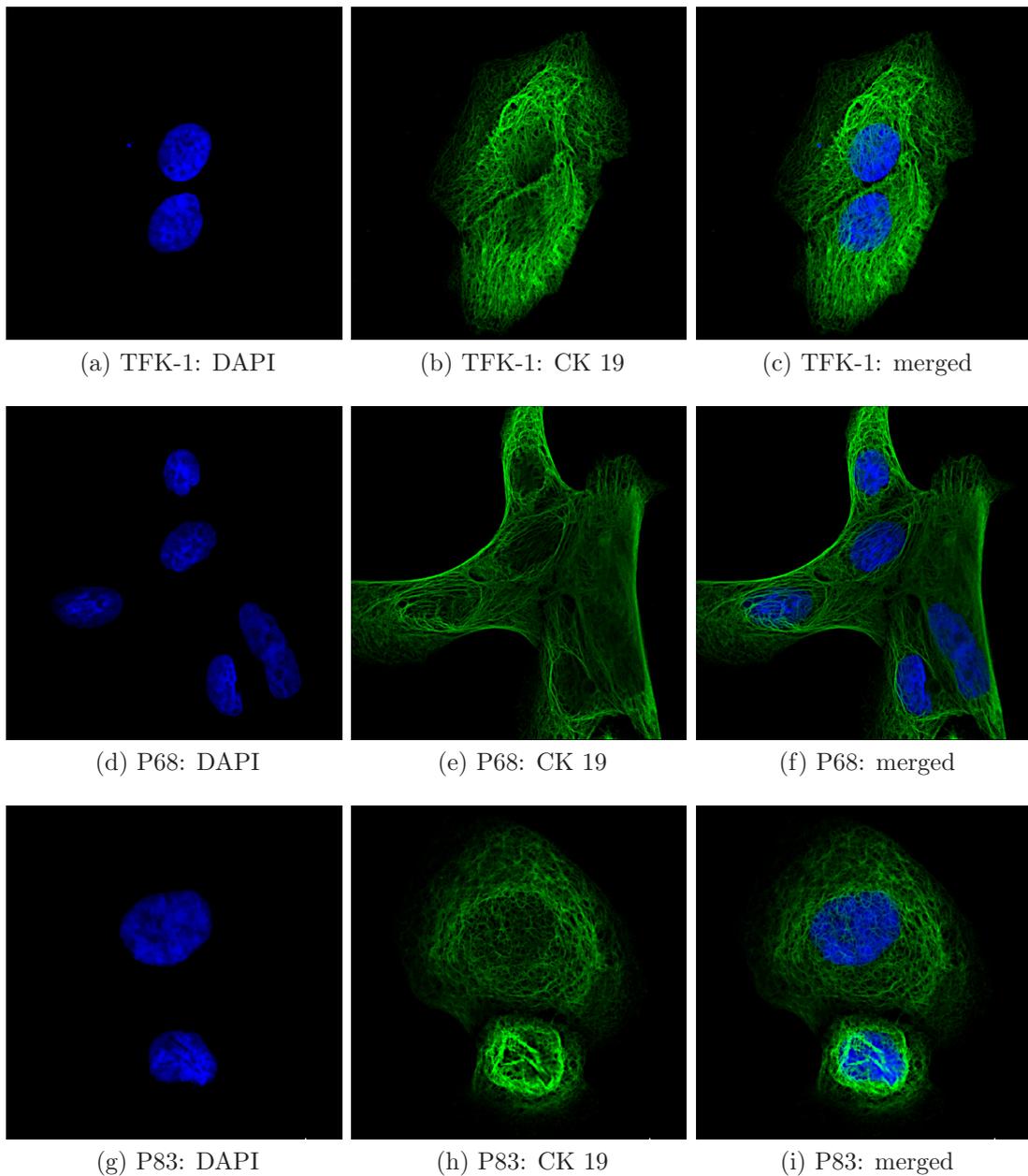


Abbildung 4.3: **Zytokeratin (CK) 19 - Immunfluoreszenzfärbung der Zelllinien TFK-1, P68 und P83:** Alle Zelllinien wiesen eine starke Positivität für CK 19 auf. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die zusammgelegten Bilder (merged) sind in der rechten Spalte dargestellt.

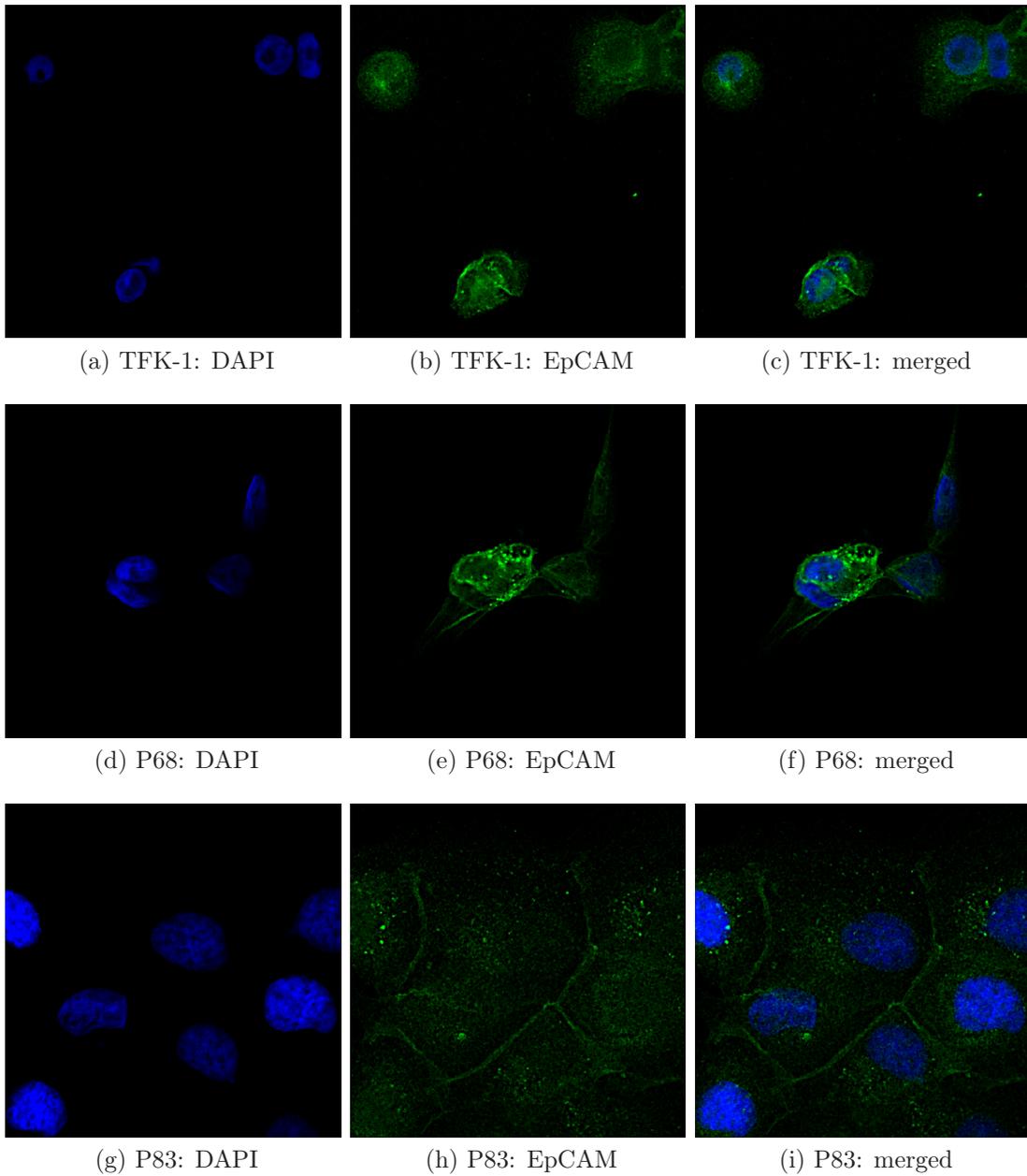


Abbildung 4.4: **EpCAM - Immunfluoreszenzfärbung der Zelllinien TFK-1, P68 und P83:** Alle Zelllinien zeigten eine positive Färbung für EpCAM. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die zusammengesetzten Bilder (merged) sind in der rechten Spalte dargestellt.

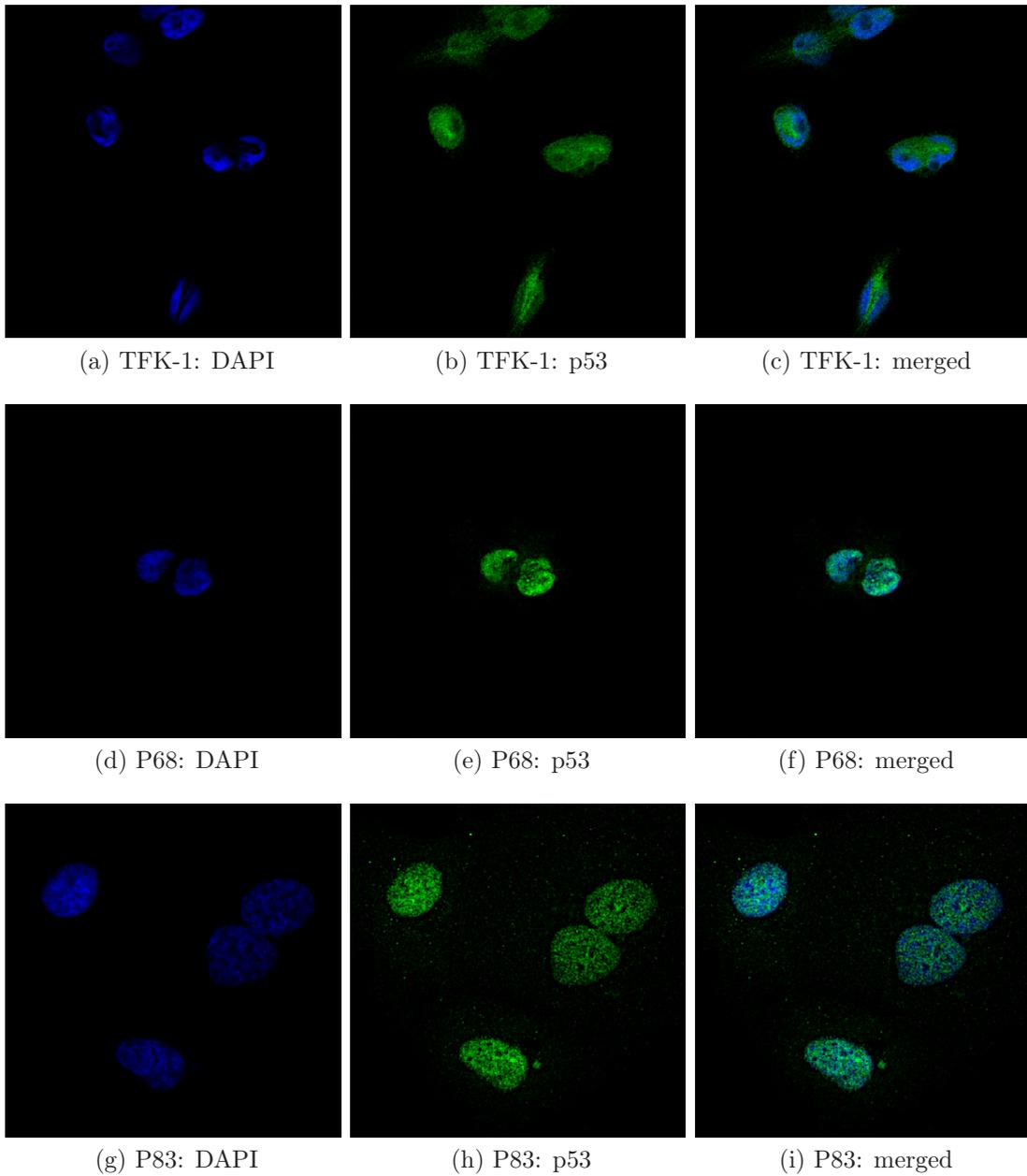


Abbildung 4.5: **p53** - Immunfluoreszenzfärbung der Zelllinien **TFK-1**, **P68** und **P83** Alle Zelllinien zeigten eine nukleäre Akkumulation von p53. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die zusammengesetzten Bilder (merged) sind in der rechten Spalte dargestellt.

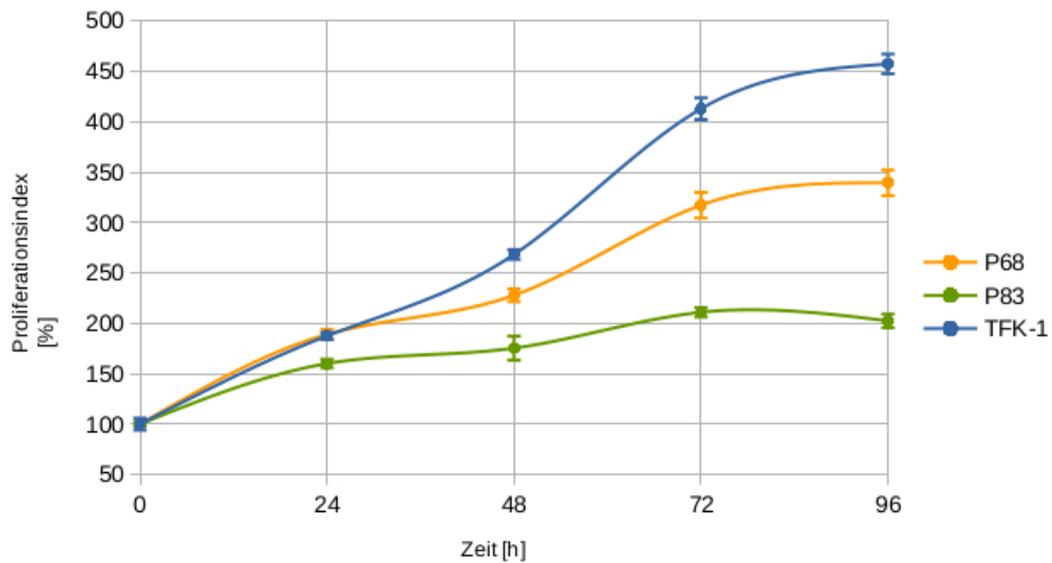


Abbildung 4.6: **Proliferations-Assay:** Bei den dargestellten Werten handelt es sich um die gemittelten Ergebnisse aus drei verschiedenen Messungen. Jede Messung wurde zuvor als Triplet-Bestimmung durchgeführt und ebenfalls gemittelt. TFK-1 zeigte die kürzesten Verdopplungszeiten.

4.3.2 Drug Assay

Es wurde der Einfluss von Sorafenib und Gemcitabin auf die Viabilität der Zellen untersucht. Hierzu wurden die Zellen für 72 h mit den jeweiligen Chemotherapeutika in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.7 und 4.8 dargestellt.

Gemcitabin führte schon bei Konzentrationen im nanomolaren Bereich zu einem starken Abfall der Zellviabilität aller Zelllinien. Der stärkste Abfall war in einem Konzentrationsbereich von 0,01–0,1 nM zu verzeichnen. Die zytostatische Wirkung erreichte bei einer Konzentration von ca. 10 μM ein Plateau mit nur merklichen Viabilitätsreduktionen bei erheblich höheren Dosen und nur die Zellviabilität von TFK-1 konnte im gewählten Konzentrationsbereich unter 50 % gesenkt werden.

Sorafenib führte mit steigenden Konzentrationen zu einem sukzessiven Zellviabilitätsabfall, der bei allen Zelllinien in einem Konzentrationsbereich von 1–20 μM sein Maximum erreichte (Abbildung 4.8). Eine Viabilitätsreduktion von 50

% konnte bei TFK-1 schon ab einer Konzentration von ca. 10 μM , bei P68 und P83 bei einer Konzentration von ca. 13 beziehungsweise 15 μM erreicht werden. Ab einer Konzentration ca. 50 μM näherte sich bei allen Zelllinien die relative Zellviabilität stark 0 % an.

4.4 Array-based Comparative Hybridization (aCGH)

Alle Zelllinien wurden mithilfe der Array-based Comparative Hybridization (aCGH) auf Kopienzahlveränderungen (CNV) untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.9 dargestellt, wobei signifikante CNV als waagrechte Striche markiert sind. Es konnte bei allen CCC-CCL ausgeprägte CNV beobachtet werden, was für den malignen Ursprung der Zellen sprach. Dabei unterschieden sich die CNV-Profile der jeweiligen Zelllinien deutlich voneinander. Das CNV-Profil von TFK-1 zeigte gleichermaßen das Vorhandensein von Hinzugewinnen und Verlusten, während das von P83 vor allem Hinzugewinne aufwies und das Profil von P68 überwiegend Verluste präsentierte. Tabelle 4.1 fasst die CNV der einzelnen Zelllinien zusammen, welche sich in Art und Lokalisation identisch waren. Bei allen Zelllinien konnten Verluste auf den Chromosomenabschnitten 4q, 9p, 18p sowie 18q und Hinzugewinne auf dem Chromosomenabschnitt 14q gefunden werden.

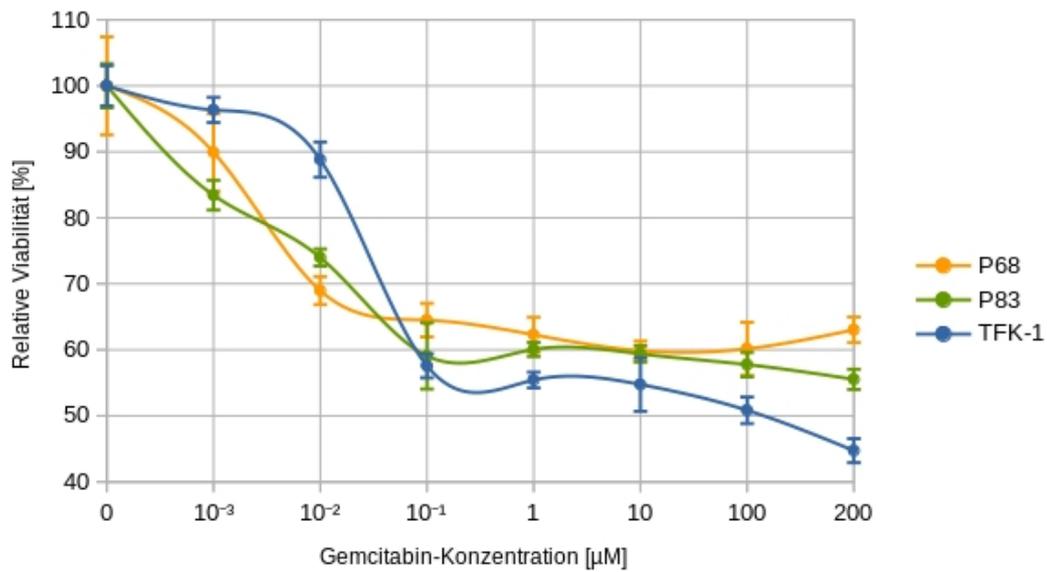


Abbildung 4.7: **Gemcitabin-Assay:** In dieser Grafik ist die relative Zellviabilität abgebildet. Diese entspricht dem Quotient aus den reduktiven Aktivitäten der mit Gemcitabin behandelten Proben und der unbehandelten Probe. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um die gemittelten Ergebnisse aus drei verschiedenen Messungen. Jede Messung wurde zuvor als Triplet-Bestimmung durchgeführt und ebenfalls gemittelt. Alle Zelllinien wiesen eine mittelgradige Gemcitabin-Resistenz auf.

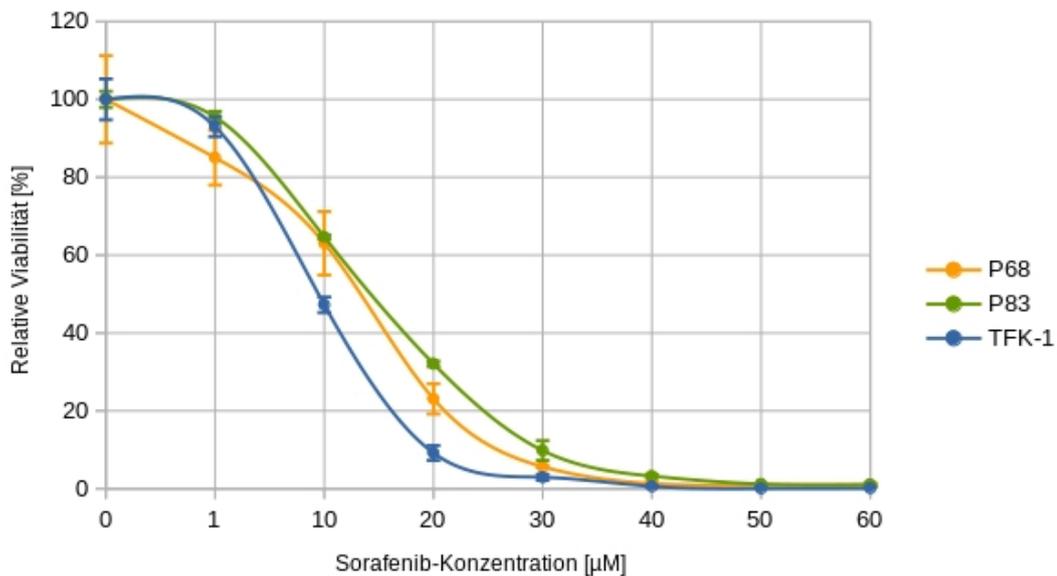


Abbildung 4.8: **Sorafenib-Assay:** In dieser Grafik ist die relative Zellviabilität abgebildet. Diese entspricht dem Quotient aus den reduktiven Aktivitäten der mit Sorafenib behandelten Proben und der unbehandelten Probe. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um die gemittelten Ergebnisse aus drei verschiedenen Messungen. Jede Messung wurde zuvor als Triplet-Bestimmung durchgeführt und ebenfalls gemittelt.

Chr.	TFK-1	P68	P83
1p	–	–	
1q	+		+
4q	–	–	–
7q	–	–/+	+
9p	–	–	–
9q	–	–	
10p		–	–
11q		+	+
13q	–	–	
14q	+	+	+
15q	+		+
17p	–	–	
17q	+		+
18p	–	–	–
18q	–	–	–

Tabelle 4.1: **Gemeinsame CNV-Lokalisationen der Zelllinien TFK-1, P68 und P83:** Zugewinne + , Verluste – ; gleiche CNV, die bei allen Zelllinien vorkamen, sind rot markiert.

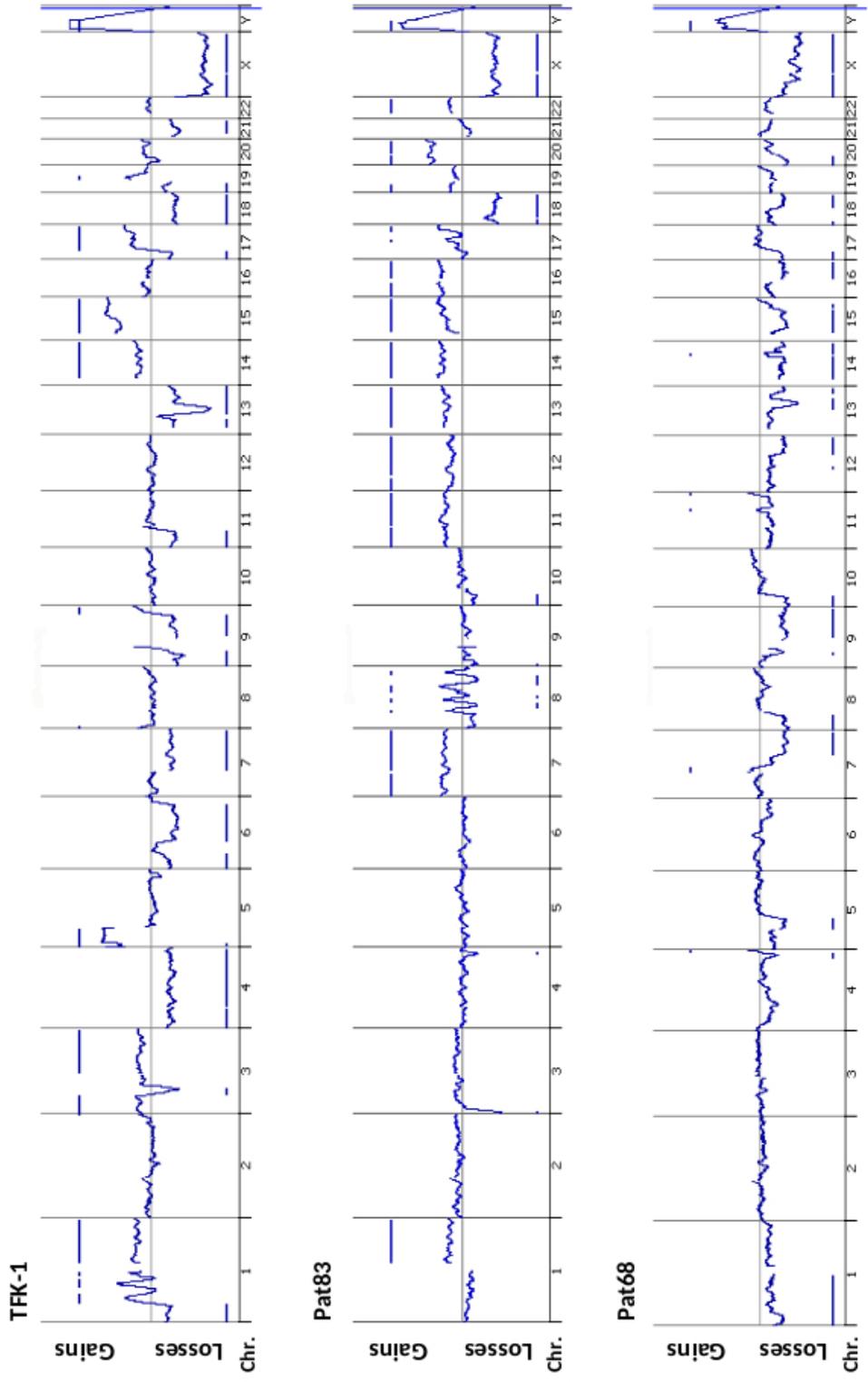


Abbildung 4.9: CNV-Profile der Zelllinien TFK-1, P68 und P83: Signifikante Zugewinne und Verluste sind durch waagrechte Striche markiert

5 Diskussion

Für das CCC gibt es verschiedene Definitionen, unterschiedliche Systeme zur mikroskopischen und makroskopischen Klassifikation, mehrere Stagingssysteme und neue beschriebene Subtypen.⁸⁶ Aus diesen Gründen bringt die Erforschung dieser äußerst heterogenen Erkrankung viele Schwierigkeiten mit sich und neue Behandlungsstrategien sind dringend gefragt. Trotz immer neuerer Erkenntnisse über die molekularen Hintergründe dieser Erkrankung bleiben viele Fragen über die genauen Abläufe der cholangiozellulären Karzinogenese und Tumorprogression offen.⁶⁶ Zur Beantwortung eben dieser Fragen bedarf es geeigneter in-Vitro- und in-Vivo-Modelle, welche experimentelle Ansätze mit hohem Probendurchsatz ermöglichen, damit rasch Einblicke hinter die biologischen Abläufe gewonnen und neue Therapieoptionen erhalten werden können.¹⁷⁴ Allerdings lassen sich CCC als klassische, zweidimensionale In-Vitro-Modelle nur mit wenig Erfolg kultivieren und deswegen ist die Anzahl an verfügbaren CCL limitiert.^{34,87} Zwar lassen sich humane CCC-Organotide mit hoher Effizienz etablieren, die Arbeit mit ihnen ist im Vergleich zu den CCL aber deutlich zeitaufwendiger und kostenintensiver und aufgrund ihrer Komplexität ist ihr Einsatz in vielen in-Vitro-Anwendungen, insbesondere Versuche mit hohem Probendurchsatz, eingeschränkt.^{29,49,99,108}

5.1 In-vitro-Kultivierung

In dieser Arbeit werden zwei neue etablierte cholangiozelluläre Krebszelllinien P68 und P83 präsentiert, welche ausgehend von Organoidkulturen als Zwischenstufe, erfolgreich erzeugt werden konnten. P68 stammte dabei von einem metastasiertem iCCC ab und P83 von einem nicht-metastasiertem pCCC. Bei der kommerziell erhältliche Zelllinie TFK-1 handelt es sich um Zellen eines dCCC.¹⁴² Die initiale Kultivierung als Organoidzelllinie geht mit einer größerer Erfolgsquote einher mit

der in-Vitro-Modelle ausgehend von Primärtumoren etabliert werden können.²⁹ Zwar ähneln Organoidkulturen dem Ursprungsgewebe mehr als CCL¹², dennoch findet bei der Überführung von Tumorzellen in Organoidkulturbedingungen ein Selektionsprozess statt, an den sich im vorliegenden Versuchsaufbau noch ein zweiter Selektionsschritt, nämlich die Transformation in 2D, anschloss. Diese doppelte Selektion könnte die Ähnlichkeit der CCL zum Primärtumor noch mehr reduzieren, als es unter den Kulturbedingungen einer klassischen Zelllinie alleine der Fall wäre. Die sich häufig als schwierig gestaltende Etablierbarkeit von CCC-CCL zeigte sich auch dadurch, dass eine längerfristige Kultivierung der Zelllinien P68 und P83 in für CCC-CCL typische Medien, bestehend aus RPMI oder DMEM mit FBS als Zusatz, erfolglos blieb. Letztendlich konnten alle Zellen in dem substratreicheren KCM kultiviert werden. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde auch die CCL TFK-1, welche normalerweise in RPMI/10 % FBS kultiviert wird, ebenfalls in KCM überführt. Der Wechsel des Mediums hatte dabei keine Einflüsse auf die Morphologie und die Verdopplungszeit, welche bei TFK-1 mit ca. 40 h dem publizierten Wert entsprach.¹⁴² Alle drei Zelllinien wuchsen als epitheliale, adhärenzte Monolayer. Zwar wiesen alle das für CCC-CCL typische pflastersteinartige Wachstumsmuster auf, sie unterschieden sich dennoch deutlich in der Morphologie und der Wachstumsgeschwindigkeit von einander. Ku u. a. berichteten Verdopplungszeiten von 48–72 h von ihren 6 etablierten Gallengangskrebszelllinien.⁸⁷ Für P68 und P83 konnten vergleichbare Werte von 55 h beziehungsweise 60 h beobachtet werden.

5.2 Immunhistochemisches Profil

Die Gallengangsepithelien und ihre malignen Tumoren exprimieren verschiedene Zytokeratine in großen Mengen, darunter auch die Zytokeratine 7 und 19.⁵ HCC und Lebermetastasen anderer Adenokarzinome stellen die wichtigsten Differenzialdiagnosen des iCCC dar und präsentieren typischerweise ein anderes immunhistochemisches Profil, zu dem CK 7 und 19 in den meisten Fällen nicht gehören.⁹⁰ Alle Zelllinien zeigten eine kräftigte Reaktivität in der immunhistochemischen Färbung gegen CK 7 und 19. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) ist ein Zell-Zell-Adhäsionsmolekül, das von vielen epithelialen Maligno-

men in großer Menge und von verschiedenen einfachen Epithelien in niedrigeren Leveln exprimiert wird.¹⁴⁶ EpCAM zählt darüber hinaus zu den spezifischen CSC-Markern und findet sich typischerweise während aktiver embryonaler Zellproliferation und in frühen Stadien der Karzinogenese.^{185,188} Die Überexpression von EpCAM ist bei vielen Krebsarten assoziiert mit Zellexpansion und schlechter Prognose.^{67,101} EpCAM wird von den meisten CCC exprimiert, die genaue Rolle von EpCAM in der Karzinogenese und Progression von CCC konnte aber noch nicht genau geklärt werden.^{23,90,188} Es konnte gezeigt werden, dass das EpCAM-Gen in iCCC hochreguliert ist und dass eine Überexpression von EpCAM im Tumorstroma einen Risikofaktor für eine schlechtere Prognose und ein reduziertes krankheitsfreies Überleben darstellt.¹⁶² Typischerweise findet sich EpCAM zwar nicht in reifen Hepatozyten, es kann aber in manchen HCC nachgewiesen werden, so dass seine alleinige Aussagekraft zur Differenzierung zwischen CCC und HCC eingeschränkt ist.^{23,90} Mit der Literatur übereinstimmend wiesen alle Zelllinien eine für EpCAM positive Immunfluoreszenzfärbung auf.³³ Der Tumorsuppressor p53 befindet sich in einem Großteil der Malignome in einem mutierten oder inaktivierten Zustand.¹¹⁰ Welche Rolle p53 in den Krebserkrankungen biliären Ursprungs spielt, ist immer noch umstritten, dabei ähneln sich die Mutationsraten der jeweiligen Typen (iCCC, eCCC und Gallenblasenkrebs) und variieren von 10–65 %.^{87,107} Bei den meisten Tp53-Mutationen handelt es sich um Missense-Mutationen, welche die Halbwertszeit des veränderten p53-Proteins erhöhen und somit die immunhistochemische Detektion des nun nukleär akkumulierten, mutierten p53-Proteins möglich machen.^{30,137} Die drei untersuchten CCC-CCL wiesen jeweils eine nukleäre Akkumulation des p53-Proteins auf, was auf eine Mutation im Tp53-Gen hindeutet. P83 zeigte zusätzlich noch ein deutliches zytoplastmatisches Auftreten des Proteins, während die zytoplasmatische Fraktion bei TFK-1 und P68 gering ausfiel.

5.3 Probleme der medikamentösen Tumorthherapie

Bis jetzt existieren keine klaren Richtlinien für eine adjuvante Therapie des CCC, deshalb bleibt die Chemotherapie zum jetzigen Zeitpunkt außerhalb von Studien der palliativen Behandlung von CCC-Patienten vorbehalten. Die mittlere Gesamtüberlebenszeit fällt bei Patienten mit fortgeschrittenem CCC, die keinerlei Therapie erhalten, mit 3,9 Monaten äußerst schlecht aus.¹²⁰ Für Patienten, die für eine Chemotherapie in Frage kommen, stellt aktuell eine Behandlung mit Gemcitabin mit oder ohne Cisplatin die effektivste Therapieoption dar.³⁹ Das mittlere Gesamtüberleben kann dadurch zwar signifikant verbessert werden, aber Überlebenszeiten von 11,7 Monate für eine Therapie mit Gemcitabin und Cisplatin beziehungsweise von 8,1 Monate für Gemcitabin allein sind nach wie vor kurz und spiegeln die ausgeprägte Chemoresistenz der CCC wieder.¹⁷³ Gemcitabin wird in der Behandlung biliärer Malignome typischerweise in Einzeldosen von 1000 mg pro m² Körperoberfläche verabreicht.¹⁷² Dabei ergibt eine Dosis von 800 mg/m² eine mittlere Spitzenplasmakonzentration von 24 µM, eine Dosis von 1000 mg/m² ergeben eine mittlere Spitzenplasmakonzentration von 32 µM und eine Dosis von 2350 mg/m² ergeben ca. 68-79 µM.⁴⁰ Die drei Zelllinien zeigten jeweils eine mittelgradige Gemcitabinresistenz; so ließen sich die relativen Zellviabilitäten in einem Gemcitabin-Konzentrationsbereich von 10–100 µM nicht unter 50 % senken. Deutlich höhere Gemcitabin-Konzentrationen wie 200 µM zeigten nur eine geringfügige Wirkungssteigerung gegen TFK-1 und P83, während kein zusätzlicher Einfluss auf P68 beobachtet werden konnte. Zellen mit CSC-Eigenschaften sind nicht nur widerstandsfähiger gegen Chemotherapeutika, sondern besitzen ebenfalls die Fähigkeit Tumore nach abgeschlossener Therapie erneut zu bilden.^{61,133} Die hohe Rate an Tumorrezidiv und Chemoresistenz der CCC kann somit möglicherweise durch den hohen Anteil der CSC an der Gesamttumormasse erklärt werden. Micro-RNAs (miRNAs) scheinen wichtige Steuereinheiten in der Bildung von CSC-Phänotypen zu sein und stehen damit konsequent ebenfalls in enger Beziehung zur Chemoresistenz.¹⁷⁹ Einige miRNAs, welche in Zusammenhang mit Gemcitabinresistenz in Pankreaskarzinomen stehen, konnten bereits identifiziert werden, aber es gibt nur wenige Veröffentlichungen

über den Einfluss von miRNAs in CCC.¹¹ Die Identifikation CCC-spezifischer miRNAs könnte zukünftig wichtige Angriffspunkte in der medikamentösen Therapie liefern.

Es wird angenommen, dass die antitumorale Wirkung des Multi-Kinase-Inhibitors Sorafenib durch die Hemmung des Ras-Raf-Erk-Signalweges vermittelt wird, welcher eine Rolle in der Zellproliferation spielt, sowie durch die Hemmung der vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) 2-assoziierten Angiogenese.^{47,184} Sorafenib zählt somit zu den gezielten Krebstherapien, welche ein oder mehrere bestimmte molekulare Ziele blockieren und somit beispielsweise bestimmte Signalwege hemmen können, welche für die Karzinogenese und Zellproliferation entscheidend sind. Es konnte die Effektivität von Sorafenib auf mehrere Krebsarten gezeigt werden und dieses Medikament zählt beispielsweise bei der Therapie des fortgeschrittenen HCC zu den Erstlinienmedikamenten.¹⁷⁷ Allerdings wird die Effektivität dieses Zytostatikums in der Behandlung von biliären Malignomen kontrovers diskutiert. Die übliche tägliche Gesamtdosis Sorafenib beträgt in der klinischen Praxis meist 400–800 mg (aufgeteilt in zwei oralen Einzeldosen), welche eine durchschnittliche Blutplasmakonzentration von 6,27–8,35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (= 13,49–17,96 μM) ergibt.⁵³ In diesem Konzentrationsbereich konnte bei jeder Zellreihe der größten Viabilitätsabfall mit weniger als 50 % proliferierende Zellen beobachtet werden. Ab einer Konzentration von 40 μM näherte sich bei den drei Zelllinien der Anteil vitaler Zellen stark 0 % an. In Übereinstimmung mit den hier präsentierten Daten, konnte schon in mehreren in-Vitro- und Xenograft-Modellen eine vielversprechende Wirkung von Sorafenib auf CCC-Zellen beobachtet werden.^{68,81,161,178} Die klinische Realität präsentiert sich jedoch komplizierter. So zeigte eine Sorafenib-Monotherapie in einigen Phase-II-Studien bei Patienten mit fortgeschrittenem CCC nur eine geringe klinische Aktivität.^{15,47} Mehrere Fallberichte und Studien kleinerer Kohorten kamen jedoch zu potenziell vielversprechenden Ergebnissen einer palliativen Therapie mit Sorafenib.^{89,119,126} Die Ergänzung von Sorafenib zu Gemcitabin konnte die Effektivität der Behandlung in Patienten mit fortgeschrittenem Gallengangskrebs nicht verbessern.⁹⁸ Sorafenib scheint also nur für eine spezielle Subpopulation der CCC-Patienten eine effektive Therapieoption darzustellen.

Zwar entstammten alle verwendeten Zelllinien Tumoren unterschiedlicher Lo-

kalisierung im Gallengangssystem (P68: iCCC; P83: pCCC; TFK-1: dCCC), sie präsentierten interessanterweise dennoch ein vergleichbares Ansprechen auf die verwendeten Chemotherapeutika Gemcitabin und Sorafenib. Die hier gezeigten Daten verdeutlichen sehr anschaulich die eingeschränkte Übertragbarkeit von Ergebnissen aus in-Vitro- und Xenograft-Arzneimitteltestungen auf die klinische Situation. Da bei jeder Form von in-Vitro-Modellen gewisse Selektionsprozesse ablaufen, können diese Modelle die Komplexität des Primärtumors nur bedingt widerspiegeln. Des Weiteren wurde in vielen klinischen Studien Patienten mit unterschiedlichen Subtypen biliärer Tumoren unter der sehr breiten Definition Gallengangskrebs zusammen gruppiert, anstatt die Patienten anhand des Vorhandenseins relevanter, onkogener Treiber einzuteilen.¹³⁶ Dabei unterscheiden sich nicht nur die verschiedenen Subtypen deutlich in ihren Genomveränderungen, sondern ein Großteil der Patienten (40–66 %) weist für die gezielte Krebstherapie geeignete genetische Alterationen auf.^{102,138} CCL eignen sich hervorragend für Assays mit hohem Probendurchsatz und ermöglichen somit Versuchsreihen mit einer großen Anzahl an Arzneimittelkombinationen. Um die begrenzte Aussagekraft der zellbasierten Drug-Assays zu verbessern, muss die genetische und epigenetische Vielfalt der verschiedenen Tumore ausreichend repräsentiert werden. Daher ist es nicht nur notwendig eine genügend große Anzahl an Zelllinien in die Versuchsreihen einzuschließen, die einzelnen Zelllinien sollten auch in Subtypen unterteilt und auf vorherrschende Treibermutationen untersucht werden.¹⁸³ Der Mangel an reproduzierbaren humanen CCC-Modellen schränkt die Untersuchungsmöglichkeiten potenzieller therapeutischer Substanzen oder Substanzkombinationen ein und behindert somit die Entwicklung effektiver Behandlungen.¹⁵² Es ist ausserdem unrealistisch dieses Ausmaß an Probendurchsatz allein mit Tiermodellen bewältigen zu können.¹⁸³

5.4 Kopienzahlveränderungen des Cholangiokarzinoms

Die personalisierte Krebstherapie basiert auf der genauen Identifizierung von angreifbaren molekularen Alterationen zum Zeitpunkt der Diagnose beziehungs-

weise zum Zeitpunkt eines Rezidivs und nachfolgender Kombinationsbehandlung bestehend aus standardmäßiger Chemotherapie und dem Einsatz gezielter Wirkstoffe.^{18,160} Für viele Krebsarten erbrachte die Einführung der gezielten Krebstherapien vielversprechende Ergebnisse. Aufgrund der Seltenheit und Komplexität, welche die Malignome der Gallenwege mit sich bringen, hinken sowohl die Erkenntnisse über die zugrundeliegende Tumorbiologie als auch die Fortschritte der personalisierten Therapie der Gallengangstumore den häufigeren Krebserkrankungen hinterher.⁵⁶ Die Detektion von DNA-CNV leistet einen wichtigen Beitrag zur Identifizierung von Mutationen sowie konsekutiv von alterierten Signalwegen und stellt somit ein wertvolles Werkzeug im Bereich der personalisierten Medizin dar. Die aCGH ist heutzutage ein akzeptierter Standard zur präzisen Detektion von CNV und ermöglicht einen hohen Probendurchsatz bei gleichzeitig niedrigen Kosten.^{69,125} Somit stellt die aCGH eine alternative Methode für das genetische Profiling, insbesondere bei der Verwendung einer großen Anzahl an Proben, zu den teuren DNA-Sequenzierungsmethoden der nächsten Generation dar und führte aufgrund der großen Anwendungsvielfalt zu einem tieferen Verständnis der Tumorbiologie. CNV haben oft einen tiefgreifenden Einfluss auf die Genexpression und können folglich die Funktion der betroffenen Gene beeinflussen.⁶² Shao u. a. konnten zeigen, dass sich dieser Einfluss von CNV auf die Expression der meisten Gene positiv linear verhält.¹⁵¹ Somit führen CNV zur Steigerung und CNV zur Erniedrigung der Expressionslevel. Veränderte Genexpressionslevel können wiederum auch Arzneimittelresistenzen hervorrufen und so kann die CNV-Analyse neben prognostischen Aussagen auch Vorhersagen über das Therapieansprechen liefern.^{42,182} CCL sind, sofern sie einmal etabliert wurden, nicht nur leicht zu vervielfältigen, sondern gleichen auch in ihrem CNV-Mustern den Ursprungstumoren¹⁸³ und eignen sich deshalb exzellent für aCGH-Studien.

Es existieren aktuell nur wenig Informationen über CNV in CCC und die verwendeten Proben stammen zum Großteil von intrahepatischen Tumoren.^{43,64,70,153} Studien aus östlichen Ländern offenbarten, dass untersuchte iCCC ein gemeinsames Muster an Alterationen aufweisen, darunter häufige Hinzugewinne in den Bereichen 8q, 17q und 20q sowie häufige Verluste bei 4q, 17p und 18q.^{85,170,187} Die Ergebnisse von Studien mit europäischen iCCC-Patienten ergaben dagegen vorwiegend Amplifikationen bei 1q, 7p und 8q sowie Verluste bei 1p, 3p, 4q,

6q, 9pq, 13q und 14q.^{43,64,70} Eine von Sia u. a. durchgeführte Studie mit 149 in Formalin fixierten iCCC aus Europa und den USA konnte eine Vielzahl an chromosomalen Alterationen aufdecken, darunter häufige Hinzugewinne bei 1q und 7p sowie Verluste bei 3p, 4q, 6q, 8p, 9pq, 13q, 14q, 17p und 21q.¹⁵³ Dabei decken sich die Ergebnisse von Sia u. a. zu einem signifikanten Teil mit denen der europäischen Studien, dies lässt vermuten, dass die unterschiedlichen Ethnizitäten und den damit verbundenen Einfluss anderer Risikofaktoren zu den beobachtbaren Diskrepanzen zwischen den östlichen und westlichen Studien führen könnten.¹⁵⁴ Alle in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien zeigten ein individuelles CNV-Profil. Die intrahepatische CCC-CCL P68 zeigte dabei deutliche Überschneidungen mit den in den europäischen beziehungsweise US-amerikanischen Studien verwendeten iCCC-Proben mit gemeinsamen Hinzugewinnen bei 7q sowie Verluste bei 1p, 4q, 8p, 9pq, 13q, 14q und 17p. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Jansen u. a. präsentierte P68 mehr CNL als CNG.⁷⁰ Alterationen, die mindestens zwei von drei der untersuchten Zelllinien aufwiesen, beinhalteten CNG bei 1q, 7q, 11q, 14q (3/3), 15q und 17q sowie CNL bei 1p, 4q (3/3), 7q, 9p (3/3), 9q, 10p, 13q, 17p und 18pq (3/3). Besonders die gemeinsamen Verluste waren auch in den westlichen Studien häufig vertreten (bis ca. 50 % 4q⁴³, 25–55 % 9p^{43,64,153} und 15–25 % 18q^{43,153}). Diese genomischen Bereiche könnten für wichtige Tumorsuppressorgenen (TSG) codieren. So konnten Broens u. a. in Ihrer Studie zeigen, dass CNL im Bereich 4q22.1-35.2 assoziiert war mit einem schlechteren Ausgang für Kolonkarzinom-Patienten.²⁸ Die Rolle, die CNL von TSG in der Entstehung von Krebserkrankungen spielen, ist noch nicht geklärt. Es ist aber bemerkenswert, dass sich die beobachteten CNL von TSG in menschlichen Krebserkrankungen nur in wenigen genomischen Bereichen gruppieren.¹⁹⁴ Eine dieser Regionen befindet sich bei 17p13.1–13.3, welche 14 TSG, darunter TP53 (17p13.1), beinhaltet.¹⁹⁴ P68 und TFK-1 zeigten jeweils CNL im Bereich 17p11.2–13.3, welche genau diesen CNL-Hotspot umfasst. Da bei beiden CCL auch eine nukleäre p53-Akkumulation beobachtet wurde, lässt sich schlussfolgern, dass nicht nur ein mutiertes p53-Protein vorliegt, sondern auch die Genexpression dieses TSG reduziert sein könnte. Ein TP53-CNL konnte bei P83 nicht nachgewiesen werden. Diese CCL präsentierte dagegen CNG im Bereich 7p11.2–22.3, welcher das KRAS-Gen (12p12.1) enthält. Jung u. a.

konnten zeigen, dass ein erheblicher Anteil (13 %) der von ihnen untersuchten dCCC entweder EGFR (7p11.2)- oder ERBB2 (17q12)-CNG aufwiesen und dass die EGFR-Expression und EGFR-CNG unabhängig von einander mit einer schlechten Prognose assoziiert waren.⁷³ Die beiden eCCC-CCL P83 und TFK-1 präsentierten ebenfalls CNG, welche die Bereiche 7p11.2–22.3 (P83) beziehungsweise 17q11.2–25.3 (TFK-1) umfassten. Anti-ErbB-Therapien waren bis jetzt nur in präklinischen Versuchen effektiv mit enttäuschenden Ergebnissen in klinischen Studien.¹²⁴ Jede der untersuchten CCC-CCL präsentierte Kopienzahlverluste im Bereich 18q21.1–23.0. Dieser chromosomale Bereich enthält unter anderem auch das SMAD4-Gen (18q21.1). SMAD4 spielt eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion, insbesondere innerhalb des TGF- β -Signalwegs, und wird als Tumorsuppressor in CCC angesehen.^{189,193} Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust von SMAD4 einerseits mit dem Tumorstadium in iCCC korrelierte (25 % in Stadium I und II versus 58 % in Stadium III und IV)⁷⁵ und andererseits invers mit der Prognose.¹⁰ Um genaue Aussagen über den Einfluss der hier beschriebenen CNV auf die Genexpression sowie die mitbetroffenen Signalwege treffen zu können, ist weiterführende Forschung notwendig.

5.5 Fazit und Ausblick

Wir befinden uns aktuell im Zeitalter der "Targeted Therapies" mit immer mehr Möglichkeiten der personalisierten antitumoralen Therapie. Die Fortschritte im Bereich der Therapie- und Diagnosemöglichkeiten der Gallengangstumoren sind aufgrund ihrer Heterogenität, Seltenheit und dem Mangel an genügend in-Vitro-Modellen nach wie vor gering.^{34,56,87} Klassische Krebszelllinien eignen sich aufgrund ihrer einfachen Handhabung sehr für Versuche mit großem Probendurchsatz; sie sind aber für CCC schwierig zu etablieren.^{14,29} Um die eingeschränkte Übertragbarkeit von in-Vivo-Arzneimitteltestungen mit CCC-CCL auf die klinische Situation zu verbessern, müssen nicht nur genügend CCL verwendet werden sondern die CCL sollten anhand ihrer Lokalisation des Primärtumors im Gallengangssystem, ihrer Treibermutationen und der alterierten Signalwege in Subtypen unterteilt werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CCC-CCL ausgehend von humanen Tumoren über den Zwischenschritt als Organoidkulturen

erzeugt werden können. Damit könnten zukünftig mehr CCC-CCL generiert werden, welche dann für in-Vitro-Testungen zur Verfügung stehen. Die Identifikation von CNV kann wichtige Hinweise über mögliche Treibermutationen und alterierte Signalwege liefern¹²⁵ und somit mögliche Ziele für die personalisierte Tumorthherapie aufdecken. CCL gleichen in ihren CNV-Profilen den Ursprungstumoren und eignen sich somit hervorragend für aCGH-Studien.¹⁸³ Die beiden Zelllinien P68 und P83 zeigten individuelle CNV-Profile, welche sich zu einem signifikanten Teil mit den Ergebnissen veröffentlichter Studien deckten. Dabei befassten sich die meisten der veröffentlichten CNV-Studien mit intrahepatischen Tumoren mit einer begleitenden Unterrepräsentation der extrahepatischen CCC. Um die Aussagekraft der CNV-Analysen zu verbessern muss ein breiteres Spektrum an CCC-Proben verwendet werden.

Zusammenfassung

Das cholangiozelluläre Karzinom ist charakterisiert durch eine schlechte Prognose und neue Behandlungsstrategien sind dringend gefragt. Aufgrund der Heterogenität und Seltenheit der Gallengangstumore hinken die Fortschritte im Bereich der Therapie- sowie Diagnosemöglichkeiten den häufigeren Krebsarten hinterher. Klassische Krebszelllinien eignen sich für experimentelle Ansätze mit hohem Probendurchsatz. Diese sind allerdings für das cholangiozelluläre Karzinom schwierig zu etablieren und folglich ist die Anzahl verfügbarer Zelllinien gering.

In dieser Arbeit konnten zwei cholangiozelluläre Krebszelllinien P68 und P83 ausgehend von humanen Tumoren über den Zwischenschritt als Organoidkulturen erzeugt und anschließend charakterisiert werden. Der Zwischenschritt einer Organoidkultur erbrachte hierbei eine höhere Etablierungseffizienz. Das anschließende Überführen in klassische zweidimensionale Zelllinien hat den Vorteil der leichteren Zugänglichkeit für Versuche mit hohem Probendurchsatz und einer besseren Kosten- und Zeiteffizienz. Für die bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden die Experimente ebenfalls mit der häufig verwendeten Gallengangskrebszelllinie TFK-1 durchgeführt. Die Zelllinien präsentierten das klassische pflastersteinartige Wachstumsverhalten und die für Gallengangskrebs typischen immunhistochemischen Marker Zytokeratin 7 und 19 sowie EpCAM. Alle Zelllinien demonstrierten eine nukleäre Akkumulation von P53, welches auf einen mutierten Zustand dieses Tumorsuppressors hinwies. Trotz der unterschiedlichen Ursprünge im Gallengangssystem zeigten die Zelllinien ein vergleichbares Ansprechen auf Gemcitabin und Sorafenib. Sorafenib präsentierte dabei eine gute antitumorale Wirkung, wohingegen sich die Zelllinien mittelgradig resistent gegen Gemcitabin verhielten.

Die vergleichende genomische Hybridisierung (Array-Comparative-Genomic-Hybridization) ist ein effektives Verfahren zur Detektion von DNA-Kopienzahl-

veränderungen. Solche Kopienzahlveränderung können einen tiefgreifenden Effekt auf die Genexpression der betroffenen Zelle haben und die Identifizierung alterierter Signalwege kann potenzielle Angriffspunkte für die personalisierte gezielte Krebstherapie liefern. Jede Zelllinie wies ein individuelles Profil an DNA-Kopienzahlveränderungen auf mit gemeinsamen Hinzugewinnen bei 14q sowie gemeinsamen Verlusten bei 4q, 9p und 18pq. Dabei deckten sich die Ergebnisse zu einem großen Teil mit denen von bereits publizierten Studien. Es konnten Verluste in den genomischen Bereichen gefunden werden, welche für SMAD4 (alle Zelllinien) und P53 (P68, TFK-1) codieren. Hinzugewinne umfassten Genombereiche, welche KRAS (P83), EGFR (P83) und ERBB2 (TFK-1) beinhalteten.

Literaturverzeichnis

- [1] *The American Cancer Society - Survival Rates for Bile Duct Cancer.* <https://www.cancer.org/cancer/bile-duct-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-by-stage.html>. – Stand: 29.05.2020
- [2] *WHO Classification of Tumours of the Digestive System.* 4. Auflage. IARC, 2010
- [3] *AJCC Cancer Staging Manual.* 8. Auflage. Springer, 2017
- [4] Ahmed, SA, Gogal, RM J., Walsh, JE: A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H]thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods* 170(2): 211–4, 1994.
- [5] Aishima, S, Asayama, Y, Taguchi, K, Sugimachi, K, Shirabe, K, Shimada, M, Sugimachi, K, Tsuneyoshi, M: The utility of keratin 903 as a new prognostic marker in mass-forming-type intrahepatic cholangiocarcinoma. *Mod Pathol* 15(11): 1181–90, 2002.
- [6] Aishima, S, Oda, Y: Pathogenesis and classification of intrahepatic cholangiocarcinoma: different characters of perihilar large duct type versus peripheral small duct type. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 22(2): 94–100, 2015.
- [7] Albertson, DG, Collins, C, McCormick, F, Gray, JW: Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* 34(4): 369–76, 2003.

- [8] Albertson, DG, Ylstra, B, Seagraves, R, Collins, C, Dairkee, SH, Kowbel, D, Kuo, WL, Gray, JW, Pinkel, D: Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nat Genet* 25(2): 144–6, 2000.
- [9] Andersen, JB, Spee, B, Blechacz, BR, Avital, I, Komuta, M, Barbour, A, Conner, EA, Gillen, MC, Roskams, T, Roberts, LR, Factor, VM, Thorgerirsson, SS: Genomic and genetic characterization of cholangiocarcinoma identifies therapeutic targets for tyrosine kinase inhibitors. *Gastroenterology* 142(4): 1021–31, 2012.
- [10] Argani, P, Shaikat, A, Kaushal, M, Wilentz, RE, Su, GH, Sohn, TA, Yeo, CJ, Cameron, JL, Kern, SE, Hruban, RH: Differing Rates of Loss of DPC4 Expression and of p53 Overexpression Among Carcinomas of the Proximal and Distal Bile Ducts. *Cancer* 91(7): 1332–41, 2001.
- [11] Asukai, K, Kawamoto, K, Eguchi, H, Konno, M, Asai, A, Iwagami, Y, Yamada, D, Asaoka, T, Noda, T, Wada, H, Gotoh, K, Nishida, N, Satoh, T, Doki, Y, Mori, M, Ishii, H: Micro-RNA-130a-3p Regulates Gemcitabine Resistance via PPAR γ in Cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 24(8): 2344–52, 2017.
- [12] Augustyniak, J, Bertero, A, Coccini, T, Baderna, D, Buzanska, L, Caloni, F: Organoids are promising tools for species-specific in vitro toxicological studies. *J Appl Toxicol* 39(12): 1610–22, 2019.
- [13] Banales, JM, Cardinale, V, Carpino, G, Marzioni, M, Andersen, JB, Invernizzi, P, Lind, GE, Folseraas, T, Forbes, SJ, Fouassier, L, Geier, A, Calvisi, DF, Mertens, JC, Trauner, M, Benedetti, A, Maroni, L, Vaquero, J, Macias, RI, Raggi, C, Perugorria, MJ, Gaudio, E, Boberg, KM, Marin, JJ, Alvaro, D: Expert consensus document: Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA). *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 13(5): 261–80, 2016.

- [14] Barretina, J, Caponigro, G, Stransky, N, Venkatesan, K, Margolin, AA, Kim, S, Wilson, CJ, Lehár, J, Kryukov, GV, Sonkin, D, Reddy, A, Liu, M, Murray, L, Berger, MF, Monahan, JE, Morais, P, Meltzer, J, Korejwa, A, Jané-Valbuena, J, Mapa, FA, Thibault, J, Bric-Furlong, E, Raman, P, Shipway, A, Engels, IH, Cheng, J, Yu, GK, Yu, J, Aspesi, P J., Silva, M de, Jagtap, K, Jones, MD, Wang, L, Hatton, C, Palescandolo, E, Gupta, S, Mahan, S, Sougnez, C, Onofrio, RC, Liefeld, T, MacConaill, L, Winckler, W, Reich, M, Li, N, Mesirov, JP, Gabriel, SB, Getz, G, Ardlie, K, Chan, V, Myer, VE, Weber, BL, Porter, J, Warmuth, M, Finan, P, Harris, JL, Meyerson, M, Golub, TR, Morrissey, MP, Sellers, WR, Schlegel, R, Garraway, LA: The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modeling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483(7391): 603–7, 2012.
- [15] Bengala, C, Bertolini, F, Malavasi, N, Boni, C, Aitini, E, Dealis, C, Zironi, S, Depenni, R, Fontana, A, Del Giovane, C, Luppi, G., Conte, P.: Sorafenib in patients with advanced biliary tract carcinoma: a phase II trial. *Br J Cancer* 102(1): 68–72, 2010.
- [16] Bergamaschi, A, Kim, YH, Wang, P, Sørli, T, Hernandez-Boussard, T, Lonning, PE, Tibshirani, R, Børresen-Dale, AL, Pollack, JR: Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 45(11): 1033–40, 2006.
- [17] Bergquist, A, Seth, E von: Epidemiology of cholangiocarcinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 29(2): 221–32, 2015.
- [18] Bertucci, F, Finetti, P, Guille, A, Adélaïde, J, Garnier, S, Carbuccia, N, Monneur, A, Charafe-Jauffret, E, Goncalves, A, Viens, P, Birnbaum, D., Chaffanet, M.: Comparative genomic analysis of primary tumors and metastases in breast cancer. *Oncotarget* 7(19): 27208–19, 2016.
- [19] Bird, N, Elmasry, M, Jones, R, Elniel, M, Kelly, M, Palmer, D, Fenwick, S, Poston, G, Malik, H: Role of staging laparoscopy in the stratification of patients with perihilar cholangiocarcinoma. *Br J Surg* 104(4): 418–25, 2017.

- [20] Bismuth, H, Castaing, D: *Hepatobiliary Malignancy*. Edward Arnold, 1994. – 416–24 S
- [21] Blechacz, B: Cholangiocarcinoma: Current Knowledge and New Developments. *Gut Liver* 11(1): 13–26, 2017.
- [22] Blechacz, B, Gores, GJ: Cholangiocarcinoma: advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Hepatology* 8(1): 308–21, 2008.
- [23] Boer, CJ de, Krieken, JH van, Janssen-van Rhijn, CM, Litvinov, SV: Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *J Pathol* 188(2): 201–6, 1999.
- [24] Borger, DR, Tanabe, KK, Fan, KC, Lopez, HU, Fantin, VR, Straley, KS, Schenkein, DP, Hezel, AF, Ancukiewicz, M, Liebman, HM, Kwak, EL, Clark, JW, Ryan, DP, Deshpande, V, Dias-Santagata, D, Ellisen, LW, Zhu, AX, Iafrate, AJ: Frequent mutation of isocitrate dehydrogenase (IDH)1 and IDH2 in cholangiocarcinoma identified through broad-based tumor genotyping. *Oncologist* 17(1): 72–9, 2012.
- [25] Bridgewater, J, Galle, PR, Khan, SA, Llovet, JM, Park, JW, Patel, T, Pawlik, TM, Gores, GJ: Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 60(6): 1268–89, 2014.
- [26] Brito, AF, Abrantes, AM, Encarnação, JC, Tralhão, JG, Botelho, MF: Cholangiocarcinoma: from molecular biology to treatment. *Med Oncol* 32(11): 245, 2015.
- [27] Broomé, U, Olsson, R, Lööf, L, Bodemar, G, Hultcrantz, R, Danielsson, A, Prytz, H, Sandberg-Gertzén, H, Wallerstedt, S, Lindberg, G: Natural history and prognostic factors in 305 Swedish patients with primary sclerosing cholangitis. *Gut* 38(4): 610–5, 1996.
- [28] Brosens, RP, Belt, EJ, Haan, JC, Buffart, TE, Carvalho, B, Grabsch, H, Quirke, P, Cuesta, MA, Engel, AF, Ylstra, B, Meijer, GA: Deletion of chromosome 4q predicts outcome in stage II colon cancer patients. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 33(2): 95–104, 2010.

- [29] Broutier, L, Mastrogiovanni, G, Versteegen, MM, Francies, HE, Gavarró, LM, Bradshaw, CR, Allen, GE, Arnes-Benito, R, Sidorova, O, Gaspersz, MP, Georgakopoulos, N, Koo, BK, Dietmann, S, Davies, SE, Praseedom, RK, Lieshout, R, IJzermans, JNM, Wigmore, SJ, Saeb-Parsy, K, Garnett, MJ, Laan, LJ van der, Huch, M: Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nat Med* 23(12): 1424–35, 2017.
- [30] Caca, K, Feisthammel, J, Klee, K, Tannapfel, A, Witzigmann, H, Wittekind, C, Mössner, J, Berr, F: Inactivation of the INK4a/ARF locus and p53 in sporadic extrahepatic bile duct cancers and bile tract cancer cell lines. *Int J Cancer* 97(4): 481–8, 2002.
- [31] Cai, Y, Cheng, N, Ye, H, Li, F, Song, P, Tang, W: The current management of cholangiocarcinoma: A comparison of current guidelines. *Biosci Trends* 10(2): 92–102, 2016.
- [32] Cardinale, V, Carpino, G, Reid, L, Gaudio, E, Alvaro, D: Multiple cells of origin in cholangiocarcinoma underlie biological, epidemiological and clinical heterogeneity. *World J Gastrointest Oncol* 4(5): 94–102, 2012.
- [33] Cardinale, V, Renzi, A, Carpino, G, Torrice, A, Bragazzi, MC, Giuliante, F, DeRose, AM, Fraveto, A, Onori, P, Napoletano, C, Franchitto, A, Cantafora, A, Grazi, G, Caporaso, N, D’Argenio, G, Alpini, G, Reid, LM, Gaudio, E, Alvaro, D: Profiles of Cancer Stem Cell Subpopulations in Cholangiocarcinomas. *Am J Pathol* 185(6): 1724–39, 2015.
- [34] Cavalloni, G, Peraldo-Neia, C, Varamo, C, Casorzo, L, Dell’Aglia, C, Bernabei, P, Chiorino, G, Aglietta, M, Leone, F: Establishment and characterization of a human intrahepatic cholangiocarcinoma cell line derived from an Italian patient. *Tumour Biol* 37(3): 4041–52, 2016.
- [35] Chan-On, W, Nairismägi, M L., Ong, CK, Lim, WK, Dima, S, Pairojkul, C, Lim, KH, McPherson, JR, Cutcutache, I, Heng, HL, Ooi, L, Chung, A, Chow, P, Cheow, PC, Lee, SY, Choo, SP, Tan, IB, Duda, D, Nastase, A, Myint, SS, Wong, BH, Gan, A, Rajasegaran, V, Ng, CC, Nagarajan,

- S, Jusakul, A, Zhang, S, Vohra, P, Yu, W, Huang, D, Sithithaworn, P, Yongvanit, P, Wongkham, S, Khuntikeo, N, Bhudhisawasdi, V, Popescu, I, Rozen, SG, Tan, P, Teh, BT: Exome sequencing identifies distinct mutational patterns in liver fluke-related and non-infection-related bile duct cancers. *Nat Genet* 45(12): 1474–8, 2013.
- [36] Chapman, R, Fevery, J, Kalloo, A, Nagorney, DM, Boberg, KM, Shneider, B, Gores, GJ: Diagnosis and management of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 51(2): 660–78, 2010.
- [37] Cheon, DJ, Orsulic, S: Mouse Models of Cancer. *Annu Rev Pathol* 6(1): 95–119, 2011.
- [38] Chin, K, DeVries, S, Fridlyand, J, Spellman, PT, Roydasgupta, R, Kuo, WL, Lapuk, A, Neve, RM, Qian, Z, Ryder, T, Chen, F, Feiler, H, Tokuyasu, T, Kingsley, C, Dairkee, S, Meng, Z, Chew, K, Pinkel, D, Jain, A, Ljung, BM, Esserman, L, Albertson, DG, Waldman, FM, Gray, JW: Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. *Cancer Cell* 10(6): 529–41, 2006.
- [39] Chun, YS, Javle, M: Systemic and Adjuvant Therapies for Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Cancer Control* 24(3): 1–7, 2017.
- [40] Ciccolini, J, Serdjebi, C, Peters, GJ, Giovannetti, E: Pharmacokinetics and pharmacogenetics of Gemcitabine as a mainstay in adult and pediatric oncology: an EORTC-PAMM perspective. *Cancer Chemother Pharmacol* 78(1): 1–12, 2016.
- [41] Claessen, MM, Vlegaar, FP, Tytgat, KM, Siersema, PP, Buuren, HR van: High lifetime risk of cancer in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 50(1): 158–64, 2009.
- [42] Costa, JL, Meijer, G, Ylstra, B, Caldas, C: Array Comparative Genomic Hybridization Copy Number Profiling: A New Tool for Translational Research in Solid Malignancies. *Semin Radiat Oncol* 18(2), 2008.

- [43] Dalmaso, C, Carpentier, W, Guettier, C, Camilleri-Broët, S, Borelli, WV, Campos Dos Santos, CR, Castaing, D, Duclos-Vallée, JC, Broët, P: Patterns of chromosomal copy-number alterations in intrahepatic cholangiocarcinoma. *BMC Cancer* 15(126): 126, 2015.
- [44] DeOliveira, ML, Cunningham, SC, Cameron, JL, Kamangar, F, Winter, JM, Lillemoe, KD, Choti, MA, Yeo, CJ, Schulick, RD: Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. *Ann Surg* 245(5): 755–62, 2007.
- [45] DeOliveira, ML, Schulick, RD, Nimura, Y, Rosen, C, Gores, GJ, Neuhaus, P, Clavien, PA: New staging system and a registry for perihilar cholangiocarcinoma. *Hepatology* 53(4): 1363–71, 2011.
- [46] Edge, SB, Compton, CC: The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* 17(6): 1471–4, 2010.
- [47] El-Khoueiry, AB, Rankin, CJ, Ben-Josef, E, Lenz, HJ, Gold, PJ, Hamilton, RD, Govindarajan, R, Eng, C, Blanke, CD: SWOG 0514: a phase II study of sorafenib in patients with unresectable or metastatic gallbladder carcinoma and cholangiocarcinoma. *Invest New Drugs* 30(4): 1646–51, 2012.
- [48] 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* 248(1): 84–96, 2008.
- [49] Fang, Y, Eglén, RM: Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS Discov* 22(5): 456–72, 2017.
- [50] Farges, O, Fuks, D, Le Treut, YP, Azoulay, D, Laurent, A, Bachellier, P, Nuzzo, G, Belghiti, J, Pruvot, FR, Regimbeau, JM: AJCC 7th edition of TNM staging accurately discriminates outcomes of patients with resectable

- intrahepatic cholangiocarcinoma: By the AFC-IHCC-2009 study group. *Cancer* 117(10): 2170–7, 2011.
- [51] Frese, KK, Tuveson, DA: Maximizing mouse cancer models. *Nat Rev Cancer* 7(9): 645–58, 2007.
- [52] Fridlyand, J, Snijders, AM, Ylstra, B, Li, H, Olshen, A, SeGRAves, R, Dairkee, S, Tokuyasu, T, Ljung, BM, Jain, AN, McLennan, J, Ziegler, J, Chin, K, DeVries, S, Feiler, H, Gray, JW, Waldman, F, Pinkel, D, Albertson, DG: Breast tumor copy number aberration phenotypes and genomic instability. *BMC Cancer* 6(96), 2006.
- [53] Fucile, C, Marenco, S, Bazzica, M, Zuccoli, ML, Lantieri, F, Robbiano, L, Marini, V, Di Gion, P, Pieri, G, Stura, P, Martelli, A, Savarino, V, Mattioli, F, Picciotto, A: Measurement of sorafenib plasma concentration by high-performance liquid chromatography in patients with advanced hepatocellular carcinoma: is it useful the application in clinical practice? A pilot study. *Med Oncol* 32(1): 335, 2015.
- [54] Furuse, J, Okusaka, T, Bridgewater, J, Taketsuna, M, Wasan, H, Koshiji, M, Valle, J: Lessons from the comparison of two randomized clinical trials using gemcitabine and cisplatin for advanced biliary tract cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 80(1): 31–9, 2011.
- [55] Gatto, M, Bragazzi, MC, Semeraro, R, Napoli, C, Gentile, R, Torrice, A, Gaudio, E, Alvaro, D: Cholangiocarcinoma: Update and future perspectives. *Dig Liver Dis* 42(4): 253–60, 2010.
- [56] Geynisman, DM, Catenacci, DV: Toward personalized treatment of advanced biliary tract cancers. *Discov Med* 14(74): 41–57, 2012.
- [57] Ghouri, YA, Mian, I, Blechacz, B: Cancer review: Cholangiocarcinoma. *J Carcinog* 14(1), 2015.
- [58] Gillet, JP, Calcagno, AM, Varma, S, Marino, M, Green, LJ, Vora, MI, Patel, C, Orina, JN, Eliseeva, TA, Singal, V, Padmanabhan, R, Davidson, B, Ganapathi, R, Sood, AK, Rueda, BR, Ambudkar, SV, Gottesman, MM:

- Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(46): 18708–13, 2011.
- [59] Gores, GJ: Cholangiocarcinoma: current concepts and insights. *Hepatology* 37(5): 961–9, 2003.
- [60] Grunnet, M, Mau-Sørensen, M: Serum tumor markers in bile duct cancer – a review. *Biomarkers* 19(6): 437–43, 2014.
- [61] Hanahan, D, Weinberg, RA: Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144(5): 646–74, 2011.
- [62] Henrichsen, CN, Chaignat, E, Reymond, A: Copy number variants, diseases and gene expression. *Hum Mol Genet* 18(R1): R1–8, 2009.
- [63] Holczbauer, Á, Factor, VM, Andersen, JB, Marquardt, JU, Kleiner, DE, Raggi, C, Kitade, M, Seo, D, Akita, H, Durkin, ME, Thorgeirsson, SS: Modeling pathogenesis of primary liver cancer in lineage-specific mouse cell types. *Gastroenterology* 145(1): 221–31, 2013.
- [64] Homayounfar, K, Gunawan, B, Cameron, S, Haller, F, Baumhoer, D, Uecker, S, Sander, B, Ramadori, G, Lorf, T, Füzesi, L: Pattern of chromosomal aberrations in primary liver cancers identified by comparative genomic hybridization. *Hum Pathol* 40(6): 834–42, 2009.
- [65] Hong, SM, Pawlik, TM, Cho, HJ, Aggarwal, B, Goggins, M, Hruban, RH, Anders, RA: Depth of tumor invasion better predicts prognosis than the current American Joint Committee on Cancer T classification for distal bile duct carcinoma. *Surgery* 146(2): 250–7, 2009.
- [66] Hu, J, Yin, B: Advances in biomarkers of biliary tract cancers. *Biomed Pharmacother* 81: 128–35, 2016.
- [67] Hu, Y, Wu, Q, Gao, J, Zhang, Y, Wang, Y: A meta-analysis and The Cancer Genome Atlas data of prostate cancer risk and prognosis using epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) expression. *BMC Urol* 19(1): 67, 2019.

- [68] Huether, A, Höpfner, M, Baradari, V, Schuppan, D, Scherübl, H: Sorafenib alone or as combination therapy for growth control of cholangiocarcinoma. *Biochem Pharmacol* 73(9): 1308–17, 2007.
- [69] Idris, SF, Ahmad, SS, Scott, MA, Vassiliou, GS, Hadfield, J: The role of high-throughput technologies in clinical cancer genomics. *Expert Rev Mol Diagn* 13(2): 167–81, 2013.
- [70] Jansen, R, Moehlendick, B, Bartenhagen, C, Tóth, C, Lehwald, N, Stoecklein, NH, Knoefel, WT, Lachenmayer, A: ACGH detects distinct genomic alterations of primary intrahepatic cholangiocarcinomas and matched lymph node metastases and identifies a poor prognosis subclass. *Sci Rep* 8(1): 10637, 2018.
- [71] Jhaveri, KS, Hosseini-Nik, H: MRI of Cholangiocarcinoma. *J Magn Reson Imaging* 42(5): 1165–79, 2015.
- [72] Jiao, Y, Pawlik, TM, Anders, RA, Selaru, FM, Streppel, MM, Lucas, DJ, Niknafs, N, Guthrie, VB, Maitra, A, Argani, P, Offerhaus, GJA, Roa, JC, Roberts, LR, Gores, GJ, Popescu, I, Alexandrescu, ST, Dima, S, Fassan, M, Simbolo, M, Mafficini, A, Capelli, P, Lawlor, RT, Ruzzenente, A, Guglielmi, A, Tortora, G, Braud, F de, Scarpa, A, Jarnagin, W, Klimstra, D, Karchin, R, Velculescu, VE, Hruban, RH, Vogelstein, B, Kinzler, KW, Papadopoulos, N, Wood, LD: Exome sequencing identifies frequent inactivating mutations in BAP1, ARID1A and PBRM1 in intrahepatic cholangiocarcinomas. *Nat Genet* 45(12): 1470–3, 2013.
- [73] Jung, MJ, Woo, CG, Lee, S, Chin, S, Kim, HK, Kwak, JJ, Koh, ES, Lee, B, Jang, KT, Moon, A: Gene copy number variation and protein overexpression of EGFR and HER2 in distal extrahepatic cholangiocarcinoma. *Pathology* 49(6): 582–8, 2017.
- [74] Kaewpitoon, N, Kaewpitoon, SJ, Pengsaa, P: Opisthorchiasis in Thailand: review and current status. *World J Gastroenterol* 14(15): 2297–302, 2008.

- [75] Kang, YK, Kim, WH, Jang, JJ: Expression of G1-S Modulators (p53, p16, p27, Cyclin D1, Rb) and Smad4/Dpc4 in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Hum Pathol* 33(9): 877–83, 2002.
- [76] Karlsen, TH, Folseraas, T, Thorburn, D, Vesterhus, M: Primary sclerosing cholangitis – a comprehensive review. *J Hepatol* 7(6): 1298–1323, 2017.
- [77] Kendall, T, Verheij, J, Gaudio, E, Evert, M, Guido, M, Goeppert, B, Carpino, G: Anatomical, histomorphological and molecular classification of cholangiocarcinoma. *Liver Int* 39(S1): 7–18, 2019.
- [78] Khan, SA, Davidson, BR, Goldin, RD, Heaton, N, Karani, J, Pereira, SP, Rosenberg, WMC, Tait, P, Taylor-Robinson, SD, Thillainayagam, AV, Thomas, HC, Wasan, H: Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update. *Gut* 61(12): 1657–69, 2012.
- [79] Khan, SA, Taylor-Robinson, SD, Toledano, MB, Beck, A, Elliot, P, Thomas, HC: Changing international trends in mortality rates for liver, biliary and pancreatic tumours. *J Hepatol* 37(6): 806–13, 2002.
- [80] Khan, SA, Toledano, MB, Taylor-Robinson, SD: Epidemiology, risk factors, and pathogenesis of cholangiocarcinoma. *HPB (Oxford)* 10(2): 77–82, 2008.
- [81] Kim, DH, Jeong, YI, Chung, CW, Kim, CH, Kwak, TW, Lee, HM, Kang, DH: Preclinical evaluation of sorafenib-eluting stent for suppression of human cholangiocarcinoma cells. *Int J Nanomedicine* 8: 1697–1711, 2013.
- [82] Kim, HJ, Kim, JS, Joo, MK, Lee, BJ, Kim, JH, Yeon, JE, Park, JJ, Byun, KS, Bak, YT: Hepatolithiasis and intrahepatic cholangiocarcinoma: A review. *World J Gastroenterol* 21(48): 13418–31, 2015.
- [83] Ko, KS, Peng, J, Yang, H: Animal models of cholangiocarcinoma. *Curr Opin Gastroenterol* 29(3): 312–8, 2013.
- [84] Komuta, M, Govaere, O, Vandecaveye, V, Akiba, J, Van Steenberghe, W, Verslype, C, Laleman, W, Pirenne, J, Aerts, R, Yano, H, Nevens, F,

- Topal, B, Roskams, T: Histological diversity in cholangiocellular carcinoma reflects the different cholangiocyte phenotypes. *Hepatology* 55(6): 876–88, 2012.
- [85] Koo, SH, Ihm, CH, Kwon, KC, Park, JW, Kim, JM, Kong, G: Genetic alterations in hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma. *CCancer Genet Cytogenet* 130(1): 22–8, 2001.
- [86] Krasinskas, AM: Cholangiocarcinoma. *Surg Pathol Clin* 11(2): 403–29, 2018.
- [87] Ku, JL, Yoon, KA, Kim, IJ, Kim, WH, Jang, JY, Suh, KS, Kim, SW, Park, YH, Hwang, JH, Yoon, YB, Park, JG: Establishment and characterisation of six human biliary tract cancer cell lines. *Br J Cancer* 87(2): 187–93, 2002.
- [88] Kubo, S, Kinoshita, H, Hirohashi, K, Hamada, H: Hepatolithiasis Associated with Cholangiocarcinoma. *World J Surg* 19(4): 637–41, 1995.
- [89] LaRocca, RV, Hicks, MD, Mull, L, Foreman, B: Effective Palliation of Advanced Cholangiocarcinoma with Sorafenib: a Two-Patient Case Report. *J Gastrointest Cancer* 38: 154–6, 2007.
- [90] Lau, SK, Prakash, S, Geller, SA, Alsabeh, R: Comparative Immunohistochemical Profile of Hepatocellular Carcinoma, Cholangiocarcinoma, and Metastatic Adenocarcinoma. *Hum Pathol* 33(12): 1175–81, 2002.
- [91] Lazaridis, KN, Gores, GJ: Cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 128(6): 1655–67, 2005.
- [92] Lendvai, G, Szekerczés, T, Illyés, I, Dóra, R, Kontsek, E, Gógl, A, Kiss, A, Werling, K, Kovalszky, I, Schaff, Z, Borka, K: Cholangiocarcinoma: Classification, Histopathology and Molecular Carcinogenesis. *Pathol Oncol Res* 26(1): 3–15, 2020.
- [93] Lesurtel, M, Regimbeau, JM, Farges, O, Colombat, M, Sauvanet, A, Belghiti, J: Intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatolithiasis: an

- unusual association in Western countries. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 14(9): 1025–7, 2002.
- [94] Loeuillard, E, Fischbach, SR, Gores, GJ, Rizvi, S: Animal models of cholangiocarcinoma. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1865(5): 982–92, 2019.
- [95] Luo, G, Liu, C, Guo, M, Cheng, H, Lu, Y, Jin, K, Liu, L, Long, J, Xu, J, Lu, R, Ni, Q, Yu, X: Potential Biomarkers in Lewis Negative Patients With Pancreatic Cancer. *Ann Surg* 265(4): 800–5, 2017.
- [96] Mabrut, JY, Bozio, G, Hubert, C, Gigot, JF: Management of Congenital Bile Duct Cysts. *Dig Surg* 27(1): 12–8, 2010.
- [97] Masters, JR: Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(3): 233–6, 2000.
- [98] Moehler, M, Maderer, A, Schimanski, C, Kanzler, S, Denzer, U, Kolligs, FT, Ebert, MP, Distelrath, A, Geissler, M, Trojan, J, Schütz, M, Berie, L, Sauvigny, C, Lammert, F, Lohse, A, Dollinger, MM, Lindig, U, Duerr, EM, Lubomierski, N, Zimmermann, S, Wachtlin, D, Kaiser, AK, Schadmand-Fischer, S, Galle, PR, Woerns, M, Oncology, Internal Working G. of: Gemcitabine plus sorafenib versus gemcitabine alone in advanced biliary tract cancer: a double-blind placebo-controlled multicentre phase II AIO study with biomarker and serum programme. *Eur J Cancer* 50(18): 3125–35, 2014.
- [99] Moreira, L, Bakir, B, Chatterji, P, Dantes, Z, Reichert, M, Rustgi, AK: Pancreas 3D Organoids: Current and Future Aspects as a Research Platform for Personalized Medicine in Pancreatic Cancer. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 5(3): 289–98, 2017.
- [100] Morimoto, Y, Tanaka, Y, Ito, T, Nakahara, M, Nakaba, H, Nishida, T, Fujikawa, M, Ito, T, Yamamoto, S, Kitagawa, T: Long-term survival and prognostic factors in the surgical treatment for intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 10(6): 432–40, 2003.

- [101] Munz, M, Baeuerle, PA, Gires, O: The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res* 69(14): 5627–9, 2009.
- [102] Nakamura, H, Arai, Y, Totoki, Y, Shiota, T, Elzawahry, A, Kato, M, Hama, N, Hosoda, F, Urushidate, T, Ohashi, S, Hiraoka, N, Ojima, H, Shimada, K, Okusaka, T, Kosuge, T, Miyagawa, S, Shibata, T: Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nat Genet* 47(9): 1003–10, 2015.
- [103] Nakanuma, Y, Kakuda, Y: Pathologic classification of cholangiocarcinoma: New concepts. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 29(2): 277–93, 2015.
- [104] Nakanuma, Y, Sato, Y, Harada, K, Sasaki, M, Xu, J, Ikeda, H: Pathological classification of intrahepatic cholangiocarcinoma based on a new concept. *World J Hepatol* 2(12): 419–27, 2010.
- [105] Nakanuma, Y, Sato, Y, Ojima, H, Kanai, Y, Aishima, S, Yamamoto, M, Ariizumi, S, Furukawa, T, Hayashi, H, Unno, M, Ohta, T: Clinicopathological characterization of so-called “cholangiocarcinoma with intraductal papillary growth” with respect to “intraductal papillary neoplasm of bile duct (IPNB)”. *Int J Clin Exp Pathol* 7(6): 3112–22, 2014.
- [106] 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* 224(4): 463–73, 1996.
- [107] Nault, JC, Zucman-Rossi, J: Genetics of hepatobiliary carcinogenesis. *Semin Liver Dis* 31(2): 173–87, 2011.
- [108] Nuciforo, S, Fofana, I, Matter, MS, Blumer, T, Calabrese, D, Boldanova, T, Piscuoglio, S, Wieland, S, Ringnald, F, Schwank, G, Terracciano, LM, Ng, CKY, Heim, MH: Organoid Models of Human Liver Cancers Derived from Tumor Needle Biopsies. *Cell Rep* 24(5): 1363–76, 2018.
- [109] Nuzzo, G, Giuliante, F, Ardito, F, De Rose, AM, Vellone, M, Clemente, G, Chiarla, C, Giovannini, I: Intrahepatic cholangiocarcinoma: prognostic factors after liver resection. *Updates Surg* 62(1): 11–9, 2010.

- [110] O’Brate, A, Giannakakou, P: The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code? *Drug Resist Updat* 6(6): 313–22, 2003.
- [111] Okada, S, Vaeteewoottacharn, K, Kariya, R: Application of Highly Immunocompromised Mice for the Establishment of Patient-Derived Xenograft (PDX) Models. *Cells* 8(8): 889, 2019.
- [112] Oliveira, IS, Kilcoyne, A, Everett, JM, Mino-Kenudson, M, Harisinghani, MG, Ganesan, K: Cholangiocarcinoma: classification, diagnosis, staging, imaging features, and management. *Abdom Radiol (NY)* 42(6): 1637–49, 2017.
- [113] Olthof, SC, Othman, A, Clasen, S, Schraml, C, Nikolaou, K, Bongers, M: Imaging of Cholangiocarcinoma. *Visc Med* 32(6): 402–10, 2016.
- [114] Ong, CK, Subimerb, C, Pairojkul, C, Wongkham, S, Cutcutache, I, Yu, W, McPherson, JR, Allen, GE, Ng, CC, Wong, BH, Myint, SS, Rajasegaran, V, Heng, HL, Gan, A, Zang, ZJ, Wu, Y, Wu, J, Lee, MH, Huang, D, Ong, P, Chan-on, W, Cao, Y, Qian, CN, Lim, KH, Ooi, A, Dykema, K, Furge, K, Kukongviriyapan, V, Sripana, B, Wongkham, C, Yongvanit, P, Futreal, PA, Bhudhisawasdi, V, Rozen, S, Tan, P, Teh, BT: Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Nat Genet* 44(6): 690–3, 2012.
- [115] Oostlander, AE, Meijer, GA, Ylstra, B: Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics. *Clin Genet* 66(6): 488–95, 2004.
- [116] Osswald, BR, Klee, FE, Wysocki, S: The reliability of highly elevated CA 19-9 levels. *Dis Markers* 11(5-6): 275–8, 1993.
- [117] Page, B, Page, M, Noel, C: A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro. *Int J Oncol* 3(3): 473–6, 1993.
- [118] Palmer, WC, Patel, T: Are common factors involved in the pathogenesis of primary liver cancers? A meta-analysis of risk factors for intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 57(1): 69–76, 2012.

- [119] Pan, TT, Wang, W, Jia, WD, Xu, GL: A single-center experience of sorafenib monotherapy in patients with advanced intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncol Lett* 13(5): 2957–64, 2017.
- [120] Park, J, Kim, MH, Kim, KP, Park, DH, Moon, SH, Song, TJ, Eum, J, Lee, SS, Seo, DW, Lee, SK: Natural History and Prognostic Factors of Advanced Cholangiocarcinoma without Surgery, Chemotherapy, or Radiotherapy: A Large-Scale Observational Study. *Gut Liver* 3(4): 298–305, 2009.
- [121] Patel, AH, Harnois, DM, Klee, GG, LaRusso, NF, Gores, GJ: The utility of CA 19-9 in the diagnoses of cholangiocarcinoma in patients without primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol* 95(1): 204–7, 2000.
- [122] Patel, T: Increasing incidence and mortality of primary intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *Hepatology* 33(6): 1353–7, 2001.
- [123] Patel, T: Cholangiocarcinoma. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3(1): 33–42, 2006.
- [124] Pellat, A, Vaquero, J, Fouassier, L: Role of ErbB/HER family of receptor tyrosine kinases in cholangiocyte biology. *Hepatology* 67(2): 762–73, 2018.
- [125] Pinkel, D, Albertson, DG: Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. *Nat Genet* 37: S11–7, 2005.
- [126] Pinter, M, Sieghart, W, Reisinger, M, Wrba, F, Peck-Radosavljevic, M: Sorafenib in unresectable intrahepatic cholangiocellular carcinoma: a case report. *Wien Klin Wochenschr* 123: 61–4, 2011.
- [127] Pollack, JR, Sørlie, T, Perou, CM, Rees, CA, Jeffrey, SS, Lonning, PE, Tibshirani, R, Botstein, D, Børresen-Dale, AL, Brown, PO: Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(20): 12963–1298, 2002.
- [128] Primrose, JN, Fox, RP, Palmer, DH, Malik, HZ, Prasad, R, Mirza, D, Anthony, A, Corrie, P, Falk, S, Finch-Jones, M, Wasan, H, Ross, P,

- Wall, L, Wadsley, J, Evans, JTR, Stocken, D, Praseedom, R, Ma, YT, Davidson, B, Neoptolemos, JP, Iveson, T, Raftery, J, Zhu, S, Cunningham, D, Garden, OJ, Stubbs, C, Valle, JW, Bridgewater, J, group, BILCAP study: Capecitabine compared with observation in resected biliary tract cancer (BILCAP): a randomised, controlled, multicentre, phase 3 study. *Lancet Oncol* 20(5): 663–73, 2019.
- [129] Ramacciato, G, Nigri, G, Bellagamba, R, Petrucciani, N, Ravaioli, M, Cescon, M, Del Gaudio, M, Ercolani, G, Di Benedetto, F, Cautero, N, Quintini, C, Cucchetti, A, Lauro, A, Miller, C, Pinna, AD: Univariate and multivariate analysis of prognostic factors in the surgical treatment of hilar cholangiocarcinoma. *Am Surg* 76(11): 1260–8, 2010.
- [130] Razumilava, N, Gores, GJ: Combination of gemcitabine and cisplatin for biliary tract cancer: A platform to build on. *J Hepatol* 54(3): 577–8, 2011.
- [131] Razumilava, N, Gores, GJ: Classification, Diagnosis, and Management of Cholangiocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 11(1): 13–21, 2013.
- [132] Razumilava, N, Gores, GJ: Cholangiocarcinoma. *Lancet* 383(9935): 2168–79, 2014.
- [133] Reya, T, Morrison, SJ, Clarke, MF, Weissman, IL: Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414(6859): 105–11, 2001.
- [134] Riss, TL, Moravec, RA, Niles, AL, Duellman, S, Benink, HA, Worzella, TJ, Minor, L: *Cell Viability Assays*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2013
- [135] Rizvi, S, Gores, GJ: Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 145(6): 1215–29, 2013.
- [136] Rizvi, S, Khan, SA, Hallemeier, CL, Kelley, RK, Gores, GJ: Cholangiocarcinoma — evolving concepts and therapeutic strategies. *Nat Rev Clin Oncol* 15(2): 95–111, 2018.

- [137] Rizzi, PM, Ryder, SD, Portmann, B, Ramage, JK, Naoumov, NV, Williams, R: p53 Protein overexpression in cholangiocarcinoma arising in primary sclerosing cholangitis. *Gut* 38(2): 265–8, 1996.
- [138] Ross, JS, Wang, K, Gay, L, Al-Rohil, R, Rand, JV, Jones, DM, Lee, HJ, Sheehan, CE, Otto, GA, Palmer, G, Yelensky, R, Lipson, D, Morosini, D, Hawryluk, M, Catenacci, DV, Miller, VA, Churi, C, Ali, S, Stephens, PJ: New routes to targeted therapy of intrahepatic cholangiocarcinomas revealed by next-generation sequencing. *Oncologist* 19(3): 235–42, 2014.
- [139] Ruys, AT, Busch, OR, Gouma, DJ, Gulik, TM van: Staging laparoscopy for hilar cholangiocarcinoma: is it still worthwhile? *Ann Surg Oncol* 18(9): 2647–53, 2011.
- [140] Rycaj, K, Tang, DG: Cell-of-Origin of Cancer versus Cancer Stem Cells: Assays and Interpretations. *Cancer Res* 75(19): 4003–11, 2015.
- [141] Sachs, N, Clevers, H: Organoid cultures for the analysis of cancer phenotypes. *Curr Opin Genet Dev* 24: 68–73, 2014.
- [142] 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* 177(1): 61–71, 1995.
- [143] Sano, T, Shimada, K, Sakamoto, Y, Yamamoto, J, Yamasaki, S, Kosuge, T: One hundred two consecutive hepatobiliary resections for perihilar cholangiocarcinoma with zero mortality. *Ann Surg* 244(2): 240–7, 2006.
- [144] Sasaki, A, Aramaki, M, Kawano, K, Morii, Y, Nakashima, K, Yoshida, T, Kitano, S: Intrahepatic peripheral cholangiocarcinoma: mode of spread and choice of surgical treatment. *Br J Surg* 85(9): 1206–9, 1998.
- [145] Sato, T, Stange, DE, Ferrante, M, Vries, RG, Van Es, JH, Van den Brink, S, Van Houdt, WJ, Pronk, A, Van Gorp, J, Siersema, PD, Clevers, H: Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma,

- adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 141(5): 1762–72, 2011.
- [146] Schnell, U, Cirulli, V, Giepmans, BN: EpCAM: Structure and function in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1828(8): 1989–2001, 2013.
- [147] Sekiya, S, Suzuki, A: Intrahepatic cholangiocarcinoma can arise from Notch-mediated conversion of hepatocytes. *J Clin Invest* 122(11): 3914–8, 2012.
- [148] Sempoux, C, Jibara, G, Ward, SC, Fan, C, Qin, L, Roayaie, S, Fiel, MI, Schwartz, M, Thung, SN: Intrahepatic Cholangiocarcinoma: New Insights in Pathology. *Semin Liver Dis* 31(1): 49–60, 2011.
- [149] Shaib, Y, El-Serag, HB: The epidemiology of cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis* 24: 115–25, 2004.
- [150] Shaib, YH, Davila, JA, Henderson, L, McGlynn, KA, El-Serag, HB: Endoscopic and Surgical Therapy for Intrahepatic Cholangiocarcinoma in the United States: A Population-based Study. *J Clin Gastroenterol* 41(10): 911–7, 2007.
- [151] Shao, X, Lv, N, Liao, J, Long, J, Xue, R, Ai, N, Xu, D, Fan, X: Copy number variation is highly correlated with differential gene expression: a pancancer study. *BMC Med Genet* 20: 175, 2019.
- [152] Sharma, SV, Haber, DA, Settleman, J: Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 10(4): 241–53, 2010.
- [153] Sia, D, Hoshida, Y, Villanueva, A, Roayaie, S, Ferrer, J, Tabak, B, Peix, J, Sole, M, Tovar, V, Alsinet, C, Cornella, H, Klotzle, B, Fan, JB, Cotsoglou, C, Thung, SN, Fuster, J, Waxman, S, Garcia-Valdecasas, JC, Bruix, J, Schwartz, ME, Beroukhi, R, Mazzaferro, V, Llovet, JM: Integrative molecular analysis of intrahepatic cholangiocarcinoma reveals 2 classes that have different outcomes. *Gastroenterology* 144(4): 829–40, 2013.

- [154] Sia, D, Tovar, V, Moeini, A, Llovet, JM: Intrahepatic cholangiocarcinoma: pathogenesis and rationale for molecular therapies. *Oncogene* 32(41): 4861–70, 2013.
- [155] Siripongsakun, S, Vidhyarkorn, S, Charuswattanakul, S, Mekraksakit, P, Sungkasubun, P, Yodkhunnathum, N, Tangruangkiat, S, Ritlumlert, N, Sricharunrat, T, Jaroenpatarapesaj, S, Soonklang, K., Kulthanmanusorn, A., Auewarakul, C. U., Mahidol, C.: Ultrasound surveillance for cholangiocarcinoma in an endemic area: A prove of survival benefits. *J Gastroenterol Hepatol* 33(7): 1383–8, 2018.
- [156] Sithithaworn, P, Yongvanit, P, Duenngai, K, Kiatsopit, N, Pairojkul, C: Roles of liver fluke infection as risk factor for cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 21(5): 301–8, 2014.
- [157] Söreide, K, Körner, H, Havnen, J, Söreide, JA: Bile duct cysts in adults. *Br J Surg* 91(12): 1538–48, 2004.
- [158] Sripa, B, Pairojkul, C: Cholangiocarcinoma: lessons from Thailand. *Curr Opin Gastroenterol* 24(3): 349–56, 2008.
- [159] Stavra, C, Rush, H, Ross, P: Combined hepatocellular cholangiocarcinoma (cHCC-CC): an update of genetics, molecular biology, and therapeutic interventions. *J Hepatocell Carcinoma* 6: 11–21, 2018.
- [160] Stricker, T, Catenacci, DV, Seiwert, TY: Molecular profiling of cancer—the future of personalized cancer medicine: a primer on cancer biology and the tools necessary to bring molecular testing to the clinic. *Semin Oncol* 38(2): 173–85, 2011.
- [161] Sugiyama, H, Onuki, K, Ishige, K, Baba, N, Ueda, T, Matsuda, S, Takeuchi, K, Onodera, M, Nakanuma, Y, Yamato, M, Yamamoto, M, Hyodo, I, Shoda, J: Potent in vitro and in vivo antitumor activity of sorafenib against human intrahepatic cholangiocarcinoma cells. *J Gastroenterol* 46(6): 779–89, 2011.
- [162] Sulpice, L, Rayar, M, Turlin, B, Boucher, E, Bellaud, P, Desille, M, Meunier, B, Clément, B, Boudjema, K, Coulouarn, C: Epithelial cell adhesion

- molecule is a prognosis marker for intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Surg Res* 192(1): 117–23, 2014.
- [163] Takada, T, Amano, H, Yasuda, H, Nimura, Y, Matsushiro, T, Kato, H, Nagakawa, T, Nakayama, T, the of for of, Tract, Study Group Surgical Adjuvant Therapy Carcinomas Pancreas B.: Is postoperative adjuvant chemotherapy useful for gallbladder carcinoma? A phase III multicenter prospective randomized controlled trial in patients with resected pancreaticobiliary carcinoma. *Cancer* 95(8): 1685–95, 2002.
- [164] 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* 15(10): 2787–94, 2008.
- [165] Tan, X, Xiao, K, Liu, W, Chang, S, Zhang, T, Tang, H: Prognostic factors of distal cholangiocarcinoma after curative surgery: a series of 84 cases. *Hepatogastroenterology* 60(128): 1892–5, 2013.
- [166] Tao, LY, Cai, L, He, XD, Liu, W, Qu, Q: Comparison of Serum Tumor Markers for Intrahepatic Cholangiocarcinoma and Hepatocellular Carcinoma. *Am Surg* 76(11): 1210–3, 2010.
- [167] Tazuma, S: Epidemiology, pathogenesis, and classification of biliary stones (common bile duct and intrahepatic). *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 20(6): 1075–83, 2006.
- [168] Technologies, Agilent: *Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis - Enzymatic Labeling for Blood, Cells, or Tissues (with a High Throughput option) - Protocol.* : , June 2016
- [169] Tyson, GL, El-Serag, HB: Risk Factors of Cholangiocarcinoma . *Hepatology* 54(1): 173–84, 2011.
- [170] Uhm, KO, Park, YN, Lee, JY, Yoon, DS, Park, SH: Chromosomal imbalances in Korean intrahepatic cholangiocarcinoma by comparative

- genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 157(1): 37–41, 2005.
- [171] Ustundag, Y, Bayraktar, Y: Cholangiocarcinoma: A compact review of the literature. *World J Gastroenterol* 14(42): 6458–66, 2008.
- [172] Valle, J, Wasan, H, Palmer, DH, Cunningham, D, Anthoney, A, Maraveyas, A, Madhusudan, S, Iveson, T, Hughes, S, Pereira, SP, Roughton, M, Bridgewater, J, Investigators, ABC-0 T.: Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N Engl J Med* 362(14): 1273–81, 2010.
- [173] 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* 25(2): 391–8, 2014.
- [174] Vicent, S, Lieshout, R, Saborowski, A, Verstegen, MMA, Raggi, C, Recalcati, S, Invernizzi, P, Laan, LJ van der, Alvaro, D, Calvisi, DF, Cardinale, V: Experimental models to unravel the molecular pathogenesis, cell of origin and stem cell properties of cholangiocarcinoma. *Liver Int* 39(S1): 79–97, 2019.
- [175] Vijgen, S, Terris, B, Rubbia-Brandt, L: Pathology of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatobiliary Surg Nutr* 6(1): 22–34, 2017.
- [176] Visvader, JE: Cells of origin in cancer. *Nature* 469(7330): 314–22, 2011.
- [177] Vogel, A, Saborowski, A: Current strategies for the treatment of intermediate and advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer Treat Rev* 82: 101946, 2020.
- [178] Wang, C, Maass, T, Krupp, M, Thieringer, F, Strand, S, Wörns, MA, Barreiros, AP, Galle, PR, Teufel, A: A systems biology perspective on cholangiocellular carcinoma development: focus on MAPK-signaling and the extracellular environment. *J Hepatol* 50(6): 1122–31, 2009.

- [179] Wang, Z, Li, Y, Ahmad, A, Banerjee, S, Azmi, AS, Kong, D, Sarkar, FH: Pancreatic cancer: understanding and overcoming chemoresistance. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8(1): 27–33, 2011.
- [180] Weber, SM, Jarnagin, WR, Klimstra, D, DeMatteo, RP, Fong, Y, Blumgart, LH: Intrahepatic Cholangiocarcinoma: Resectability, Recurrence Pattern, and Outcomes. *J Am Coll Surg* 193(4): 384–91, 2001.
- [181] Weiss, MM, Kuipers, EJ, Postma, C, Snijders, AM, Siccama, I, Pinkel, D, Westerga, J, Meuwissen, SG, Albertson, DG, Meijer, GA: Genomic profiling of gastric cancer predicts lymph node status and survival. *Oncogene* 22(12): 1872–9, 2003.
- [182] Wiel, MA van de, Costa, JL, Smid, K, Oudejans, CB, Bergman, AM, Meijer, GA, Peters, GJ, Ylstra, B: Expression Microarray Analysis and Oligo Array Comparative Genomic Hybridization of Acquired Gemcitabine Resistance in Mouse Colon Reveals Selection for Chromosomal Aberrations. *Cancer Res* 65(22): 10208–13, 2005.
- [183] Wilding, JL, Bodmer, WF: Cancer Cell Lines for Drug Discovery and Development. *Cancer Res* 74(9): 2377–84, 2014.
- [184] Wilhelm, SM, Carter, C, Tang, L, Wilkie, D, McNabola, A, Rong, H, Chen, C, Zhang, X, Vincent, P, McHugh, M, Cao, Y, Shujath, J, Gawlak, S, Eveleigh, D, Rowley, B, Liu, L, Adnane, L, Lynch, M, Auclair, D, Taylor, I, Gedrich, R, Voznesensky, A, Riedl, B, Post, LE, Bollag, G, Trail, PA: BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 64(19): 7099–109, 2004.
- [185] Winter, MJ, Nagelkerken, B, Mertens, AE, Rees-Bakker, HA, Briaire-de Bruijn, IH, Litvinov, SV: Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Exp Cell Res* 285(1): 50–8, 2003.
- [186] Wistuba, I. I., Gazdar, A. F.: Gallbladder cancer: lessons from a rare tumour. *Nat Rev Cancer* 4(9): 695–706, 2004.

- [187] Wong, N, Li, L, Tsang, K, Lai, PB, To, KF, Johnson, PJ: Frequent loss of chromosome 3p and hypermethylation of RASSF1A in cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 37(5): 633–9, 2002.
- [188] Wu, HJ, Chu, PY: Role of Cancer Stem Cells in Cholangiocarcinoma and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci* 20(17): 4154, 2019.
- [189] Xu, X, Kobayashi, S, Qiao, W, Li, C, Xiao, C, Radaeva, S, Stiles, B, Wang, RH, Ohara, N, Yoshino, T, LeRoith, D, Torbenson, MS, Gores, GJ, Wu, H, Gao, B, Deng, CX: Induction of Intrahepatic Cholangiocellular Carcinoma by Liver-Specific Disruption of Smad4 and Pten in Mice. *J Clin Invest* 116(7): 1843–52., 2006.
- [190] Yamaguchi, M: Congenital Choledochal Cyst Analysis of 1,433 Patients in the Japanese Literature. *Am J Surg* 40(5): 653–7, 1980.
- [191] Yamamoto, M, Takasaki, K, Yoshikawa, T, Ueno, K, Nakano, M: Does gross appearance indicate prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma? *J Surg Oncol* 69(3): 162–7, 1998.
- [192] Zach, S, Birgin, E, Rückert, F: Primary cholangiocellular carcinoma cell lines. *J Stem Cell Res Transplant* 2(1): 1–7, 2015.
- [193] Zhao, M, Mishra, L, Deng, CX: The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer. *Int J Biol Sci* 14(2): 111-23, 2018.
- [194] Zhao, M, Zhao, Z: Concordance of copy number loss and down-regulation of tumor suppressor genes: a pan-cancer study. *BMC Genomics* 17(Suppl 7): 532, 2016.

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr.med. Sebastian Schölch für das Vertrauen und die Möglichkeit das vorliegende Thema bearbeiten zu dürfen. Er unterstützte mich von Anfang an bis zur letzten Sekunde dieses Projektes und hatte immer ein offenes Ohr. Ich freue mich bereits auf die nächsten gemeinsamen Projekte.

Mein Dank gilt auch meinen Kolleginnen und Kollegen May-Linn Thepkaysone, Susan Kochall, Alexander Hennig, Beatrix Jahnke, Alexander Rothe, Therese Seidlitz und Kristin Pape für die Hilfe, für die anregenden Diskussionen sowie für die tolle gemeinschaftliche Atmosphäre. Weiterhin danke ich Bianca Behrens (AG Stoecklein, Universität Düsseldorf) für die Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der aCGH.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden und meiner Partnerin Jasmina für die Unterstützung, die Motivation und den Zuspruch in allen Lebenslagen.