

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PATHOLOGIE  
PROF. DR. MATTHIAS EVERT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Untersuchung von PD-L1 Expression sowie *KRAS*-, *NRAS*- und *BRAF*-  
Mutationen und ihre Auswirkung auf das Outcome von Patienten mit  
intrahepatischem cholangiozellulärem Karzinom**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Alexandra Muggli



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PATHOLOGIE  
PROF. DR. MATTHIAS EVERT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Untersuchung von PD-L1 Expression sowie *KRAS*-, *NRAS*- und *BRAF*-  
Mutationen und ihre Auswirkung auf das Outcome von Patienten mit  
intrahepatischem cholangiozellulärem Karzinom**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Alexandra Muggli

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: PD Dr. Katja Evert

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Brunner

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2026

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>- 9 -</b>
1.1	Das cholangiozelluläre Karzinom .....	- 9 -
1.1.1	Epidemiologie und Risikofaktoren.....	- 9 -
1.1.2	Klinik und Diagnostik .....	- 11 -
1.1.3	Tumorklassifikation .....	- 12 -
1.1.3.1	Makroskopische Einteilung.....	- 12 -
1.1.3.2	Histologische Einteilung .....	- 14 -
1.1.3.3	TMN-Klassifikation und Grading .....	- 16 -
1.1.4	Therapie und Prognose.....	- 17 -
1.2	PD-1/PD-L1 .....	- 20 -
1.2.1	PD-1/PD-L1 Signalweg.....	- 20 -
1.2.2	Bedeutung von PD-1/PD-L1 für Autoimmunität und Infektion .....	- 22 -
1.2.3	Tumorimmunologie und PD-L1-Expression auf iCCA .....	- 23 -
1.2.4	PD-1/PD-L1 Inhibitoren in der Immuntherapie .....	- 24 -
1.3	<i>RAS-</i> ( <i>KRAS/NRAS</i> ) und <i>BRAF</i> -Mutationen in iCCA.....	- 27 -
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	- 28 -
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>- 29 -</b>
2.1	Erstellung einer iCCA-Datenbank .....	- 29 -
2.1.1	Erhebung der Patientendaten.....	- 29 -
2.1.2	Auswahl der Paraffinblöcke .....	- 30 -
2.2	Immunhistochemie .....	- 30 -
2.2.1	Grundlagen der Methodik .....	- 30 -
2.2.2	Immunhistochemische PD-L1 Färbung .....	- 31 -
2.2.3	Auswertung der PD-L1 Färbungen .....	- 32 -
2.3	DNA- und RNA-Extraktion aus den Tumorproben .....	- 33 -
2.3.1	Arbeits- und Verbrauchsmaterialien .....	- 34 -

2.3.2	Entparaffinierung und Mikrodissektion .....	- 34 -
2.3.3	Isolierung mittels AllPrep DNA/RNA FFPE Kit.....	- 35 -
2.4	DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung.....	- 35 -
2.5	High Resolution Melting (HRM) .....	- 37 -
2.5.1	Grundlagen der Methodik .....	- 37 -
2.5.2	Arbeits- und Verbrauchsmaterialien .....	- 39 -
2.5.3	HRM-Untersuchung der Patienten-DNA .....	- 40 -
2.6	DNA-Sequenzierung .....	- 40 -
2.6.1	Sanger-Sequenzierung.....	- 41 -
2.6.1.1	Grundlagen der Methodik .....	- 41 -
2.6.1.2	Arbeits- und Verbrauchsmaterialien .....	- 41 -
2.6.1.3	Polymerasekettenreaktion und Aufreinigung des Produkts .....	- 43 -
2.6.1.4	Herstellung des Agarose-Gels und Gelelektrophorese.....	- 44 -
2.6.1.5	Sanger-Seguenzierungsreaktion und Aufreinigung des Produkts.....	- 45 -
2.6.1.6	Sequenzierung mittels Genetic Analyzer .....	- 45 -
2.6.2	Pyrosequenzierung .....	- 46 -
2.6.2.1	Grundlagen der Methodik .....	- 46 -
2.6.2.2	Arbeits- und Verbrauchsmaterialien .....	- 47 -
2.6.2.3	Polymerasereaktion und HRM .....	- 48 -
2.6.2.4	Pyrosequenzierung mittels LightCycler .....	- 48 -
2.7	Statistische Auswertung .....	- 50 -
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>- 51 -</b>
3.1	Auswertung der Patientendaten.....	- 51 -
3.1.1	Geschlechts- und Altersverteilung .....	- 51 -
3.1.2	Tumorstadium und Differenzierungsgrad .....	- 52 -
3.1.3	Leberstatus .....	- 53 -
3.1.4	Vorerkrankungen.....	- 55 -

3.1.5	Risikoverhältnisse .....	- 55 -
3.1.5.1	Tumorgröße und Überlebenszeit .....	- 56 -
3.1.5.2	Diabetes mellitus und Überlebenszeit .....	- 57 -
3.2	Auswertung der PD-L1 Färbung .....	- 58 -
3.2.1	PD-L1 Expression auf den Tumorzellen .....	- 58 -
3.2.2	PD-L1 Expression auf den tumorspezifischen Immunzellen .....	- 63 -
3.3	Auswertung der Mutationsanalyse .....	- 67 -
3.4	Überlebenszeitanalysen .....	- 71 -
3.4.1	PD-L1 Expression auf Tumorzellen .....	- 71 -
3.4.2	PD-L1 Expression auf tumorspezifischen Immunzellen .....	- 73 -
3.4.3	Mutationsstatus .....	- 74 -
3.4.4	PD-L1 Expression auf Tumorzellen und Mutationsstatus .....	- 77 -
3.5	Korrelation zwischen PD-L1 Expression und anderen Variablen .....	- 79 -
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>- 80 -</b>
4.1	Bewertung der DNA-Qualität und der Schmelzkurven .....	- 80 -
4.2	PD-L1 Expression in iCCA .....	- 81 -
4.3	Rolle der Begleiterkrankungen .....	- 84 -
4.4	Mutationsstatus .....	- 85 -
4.5	Hemmung von PD-1/PD-L1 in CCA .....	- 88 -
4.6	Hemmung des Ras-Raf-MEK-ERK Signalweges in iCCA .....	- 91 -
4.7	Ausblick in die Zukunft .....	- 94 -
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>- 96 -</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>- 97 -</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>- 111 -</b>
7.1	Danksagung .....	- 111 -
7.2	Erklärung .....	- 112 -

## Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
BilIN	biliary intraepithelial neoplasm
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaare
<i>BRAF</i>	B (Isoform B1) rat fibrosarcoma
BSA	bovine serum albumin
BTC	biliary tract cancer
CEA	carcinoembryonales Antigen
CA 19-9	Carbohydrat Antigen 19-9
CCA	cholangiozelluläres Karzinom
CD	cluster of differentiation
CK2	casein kinase 2
CRC	Kolorektales Karzinom
CT	Computertomografie
dCCA	distales cholangiozelluläres Karzinom
DM	Diabetes mellitus
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DWI	diffusion weighted imaging
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
<sup>18</sup> FDG	18-Fluoro-Desoxyglukose
FFPE	formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
HAI	hepatisch-arterielle Infusion
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	hepatocellular carcinoma
HCV	Hepatitis C Virus

HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HR	Hazard Ratio
HRM	High Resolution Melting
iCCA	intrahepatisches cholangiozelluläres Karzinom
IC	Immune Cell Score
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IG	intraductal growth
IL-2	Interleukin-2
IPNB	intraepithelial papillary neoplasm of the bile duct
<i>KRAS</i>	Kirsten rat sarcoma
MEK	MAPK/ERK Kinase
MF	mass-forming
MHC	major histocompatibility complex
miRNA	Mikro-RNA
MRT	Magnetresonanztomografie
<i>NRAS</i>	neuroblastoma RAS
pCCA	perihiläres cholangiozelluläres Karzinom
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD-1	programmed cell death protein 1
PD-L1	programmed death ligand 1
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
PI	periductal infiltrating
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC $\theta$	Proteinkinase C $\theta$
PLC- $\gamma$	Phospholipase C- $\gamma$
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
PTEN	Phosphatase und Tensin homolog
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
RFA	Radiofrequenzablation
SHP-1/2	Src homology 2 domain–containing tyrosine phosphatase 1/2

SIRT	selektive interne Radiotherapie
SSC	sekundär sklerosierende Cholangitis
TACE	transarterielle Chemoembolisation
TC	Tumor Cell Score
TCR	T-Zellrezeptor
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung
wt	Wildtyp
ZAP70	Zeta-assoziiertes Protein von 70 kD

# 1 Einleitung

## 1.1 Das cholangiozelluläre Karzinom

Das cholangiozelluläre Karzinom (CCA) ist ein primärer maligner Lebertumor, der dem Gallenganssystem entspringt. Je nach anatomischer Lage des Primärtumors lässt er sich unterteilen in das intrahepatische (iCCA) und das extrahepatische cholangiozelluläre Karzinom (eCCA). Letzteres lässt sich erneut in das perihiläre (pCCA) und das distale cholangiozelluläre Karzinom (dCCA) einteilen. Unabhängig von der Unterteilung ist der Tumor mit einer schlechten Prognose und begrenzten Behandlungsmöglichkeiten assoziiert. Aufgrund der geringen Symptomatik in den Frühstadien, wird die Krankheit meist zu spät diagnostiziert (1). Die intra- und extrahepatischen CCAs unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Entität, und damit auch ihrer histologischen und klinischen Erscheinung. In dieser Arbeit wird der Schwerpunkt auf das intrahepatische cholangiozelluläre Karzinom gelegt.

### 1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das cholangiozelluläre Karzinom ist ein seltener Tumor, welcher für 3% aller gastrointestinalen Malignome verantwortlich ist. Die Prävalenz zeigt geografische Unterschiede, mit den höchsten Zahlen in den Südostasiatischen Ländern (2). So lässt sich die höchste Inzidenz im Nordosten Thailands mit 85 Neuerkrankten pro 100.000 Einwohnern im Jahr auffinden. Weitere Länder mit einer hohen Inzidenz sind China mit 7,6 oder Südkorea mit 8,8 pro 100.000 Einwohner (3). Die Inzidenz in den westlichen Ländern fällt im Vergleich dazu deutlich geringer aus. In Deutschland beträgt die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen 3,2, in den USA 2,05, in Frankreich 2,94 und England 3,10 pro 100.000 Einwohner (4). Weltweit steigt die Inzidenz und die Mortalität für das intrahepatische cholangiozelluläre Karzinom deutlich an, während bei dem extrahepatischen cholangiozellulären Karzinom eine Abnahme der Inzidenz beobachtet wird (5). Das Risiko der Erkrankung nimmt mit dem Alter zu und ist in der 7. Lebensdekade am höchsten. Männer sind dabei etwas häufiger betroffen als Frauen (6).

Von allen Gallengangskarzinomen macht das iCCA 5-10% aus. 15-20% beträgt der Anteil an den primären Leberkarzinomen (6). In den meisten Fällen wird von einer *de novo* Entstehung ausgegangen. Dennoch existieren bereits bekannte Risikofaktoren, welche die Ausbildung eines iCCA begünstigen können (7). Dazu gehört eine Infektion mit Leberegel (*Opisthorchis*

*viverrini* und *Clonorchis sinensis*), welche vor allem in den asiatischen Ländern den wichtigsten Risikofaktor darstellt (8). Dieser Parasit ist in Japan und Südostasien endemisch, wobei geschätzt 8-10% der chronisch Infizierten im Verlauf einen CCA entwickeln (9).

Als weiterer Risikofaktor ist die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) zu nennen. So beträgt für Patienten mit PSC das kumulative Jahresrisiko, einen CCA zu entwickeln, 1,5% (10). Die CCA Prävalenz unter PSC-Erkrankten beträgt dabei 10-20% (11). Das Risiko im Laufe ihres Lebens einen CCA zu entwickeln ist für diese Patienten im Vergleich zu der Normalbevölkerung um den Faktor 398 erhöht (12).

Eine chronische Infektion mit dem Hepatitis B (HBV) oder Hepatitis C Virus (HCV) birgt das Risiko, sowohl ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) als auch ein iCCA zu entwickeln (13). Dabei gibt es auch hier regionale Unterschiede: Während in den westlichen Ländern eine stärkere Assoziation mit HCV besteht, ist in Asien die endemische Infektion mit HBV für das iCCA verantwortlich (14).

Angeborene Fehlbildungen des Gallengangsystems wie Gallengangszysten oder das Caroli-Syndrom sowie Hepatolithiasis als Folge chronischer biliärer Infektionen, stellen weitere Risikofaktoren dar. Laut einer Metaanalyse erhöht die Leberzirrhose nicht nur das Risiko eines HCC, sondern ebenfalls das eines iCCA (14). Eine weitere Metaanalyse zeigte, dass 16% aller iCCA-Patienten eine Leberzirrhose aufweisen (15).

Zu den metabolischen Risikofaktoren zählen unter anderem Diabetes Mellitus (DM) Typ 2, Übergewicht, arterielle Hypertonie, die nichtalkoholische Fettlebererkrankung und schwerer Alkoholkonsum (mehr als 80 g/Tag) sowie das Rauchen; Thorotrast, Nitrosamine, Dioxin, Asbest, Vinylchlorid und 1,2-Dichlorpropan-haltige Lösungsmittel gehören dabei zu den umweltbezogenen Risikofaktoren (2, 7, 14).

Den meisten Faktoren gemein ist ihr Potenzial, eine chronische Entzündung im Lebergewebe und den Gallengängen hervorzurufen. Die damit einhergehende Zellproliferation erhöht ihrerseits die Wahrscheinlichkeit einer malignen Entartung. In den westlichen Ländern besteht in 50% der CCA-Fälle kein eindeutiger Zusammenhang zwischen den Risikofaktoren und der Krebsentstehung. Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass es weitere, bislang unentdeckte Risikofaktoren gibt, die einen Einfluss auf die steigende Inzidenz ausüben (2).

### 1.1.2 Klinik und Diagnostik

Die Klinik des iCCA ist unspezifisch. Im Frühstadium der Erkrankung sind die Patienten häufig asymptomatisch. Im Verlauf können sich Symptome wie abdominale Schmerzen, Nachtschweiß und Gewichtsverlust zeigen (3). Zeichen einer Cholestase wie dunkler Urin, Hellfärbung des Stuhls, Pruritus und Ikterus sind selten und erst zu beobachten, wenn bereits eine Obstruktion größerer Gallenwege vorliegt (6, 3). So ist beispielsweise Ikterus als Erstsymptom lediglich in 10-15% der Fälle nachweisbar (16). Die Diagnose eines iCCA wird in 20-25% zufällig gestellt (17).

Die iCCA Diagnostik stützt sich einerseits auf die Klinik und andererseits auf die bildgebenden Verfahren und die Biopsie (16). Zu der Bildgebung gehören Ultraschall, Computertomografie (CT), Magnetresonanztomografie (MRT) und 18-Fluoro-Desoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomografie (<sup>18</sup>FDG-PET). Ultraschall hat eine hohe Detektionsrate für iCCA, ist allerdings nicht sehr zuverlässig. Außer einer Erweiterung der Gallenwege oberhalb der Läsion existieren keine weiteren spezifischen Faktoren, die eine Unterscheidung von einem HCC ermöglichen könnten (18). Auch in der Kontrastmittelsonografie weisen ca. 50% der iCCA-Fälle ein ähnliches Verhalten zum hepatozellulären Karzinom auf: Hypervaskularität in der arteriellen Phase gefolgt von einem Wash-out in der späten Phase (19). Allerdings zeigt das iCCA im Gegensatz zum HCC ein schnelleres Einsetzen (<60 Sekunden) und auch eine stärkere Intensität des Auswaschphänomens (19, 20).

In CT erscheint das iCCA als eine hypodense Läsion mit randständiger Kontrastmittel-Anreicherung in der arteriellen Phase und fortschreitender homogener Kontrastmittelaufnahme in der späten Phase (21). Dies lässt sich durch den aktiven Tumorwachstum in der Peripherie und dem fibrotischen Zentrum eines iCCA erklären (22). Zu weiteren Charakteristika gehören Kapselretraktion, Gefäßinfiltration, periphere Cholangiektasien oder Satellitenläsionen (16).

Dank eines leberspezifischen Kontrastmittels und diffusionsgewichteten Sequenzen (DWI) ist die MRT eine weitere Art der Bildgebung, die zur Differenzierung zwischen iCCA und HCC genutzt werden kann. In der T1-Wichtung erscheint das iCCA hypointens, in der T2-Wichtung hyperintens (16).

<sup>18</sup>FDG-PET eignet sich am besten zur Darstellung okkultes Fernmetastasen, Lymphknotenmetastasen oder Rezidiven (23). Aufgrund ähnlicher, zur Entstehung von HCC

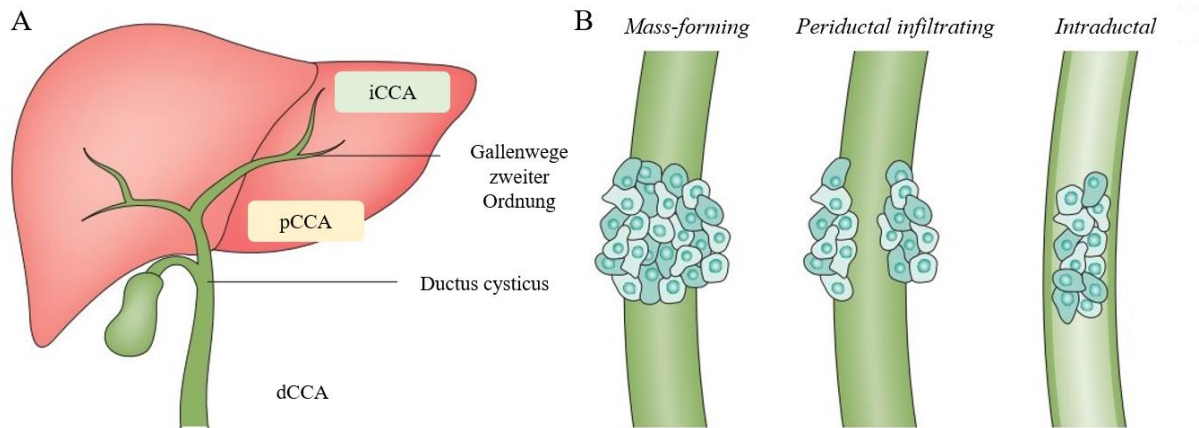
und iCCA beitragender Risikofaktoren, benötigt es zur weiteren Differenzierung bei bereits bestehendem bildgebendem Verdacht auf ein intrahepatisches Karzinom einer weiteren histologischen Differenzierung. Hierfür ist eine Feinnadelbiopsie unerlässlich (3, 24). Diese ist minimal invasiv und wird mit Ultraschall durchgeführt (16).

Tumormarker wie das Carbohydrat Antigen 19-9 (CA 19-9) und das carcinoembryonale Antigen (CEA) finden derzeit Anwendung in der Diagnostik des iCCA. Allerdings weisen sie weder eine hohe Sensitivität noch eine hohe Spezifität auf und eignen sich somit nicht zum Tumornachweis. So beträgt die Sensitivität des CA 19-9 für iCCA 62% und die Spezifität 63% (25). Auch finden sich erhöhte Werte von CA 19-9 bei Patienten mit Gallengangsobstruktion oder bakterieller Cholangitis, 10% aller Patienten sind sogar nicht in der Lage, diesen Marker zu synthetisieren (26, 27). Dennoch stehen sehr hohe CA 19-9 Spiegel (1000 U/ml; normal <37 U/ml) im Zusammenhang mit metastasierten oder nicht resektablen iCCA, und könnten damit dem Staging der Erkrankung dienen (3, 26). In den letzten Jahren wurden immer mehr potenzielle Biomarker wie Nukleinsäuren (cell free DNA, RNA), Zytokine (Zytokeratin-19-Fragmente, Matrix-Metalloproteinase-7) oder zirkulierende Tumorzellen zur Früherkennung eines iCCA vorgeschlagen. Diese müssen jedoch weiter untersucht werden (27).

### *1.1.3 Tumorklassifikation*

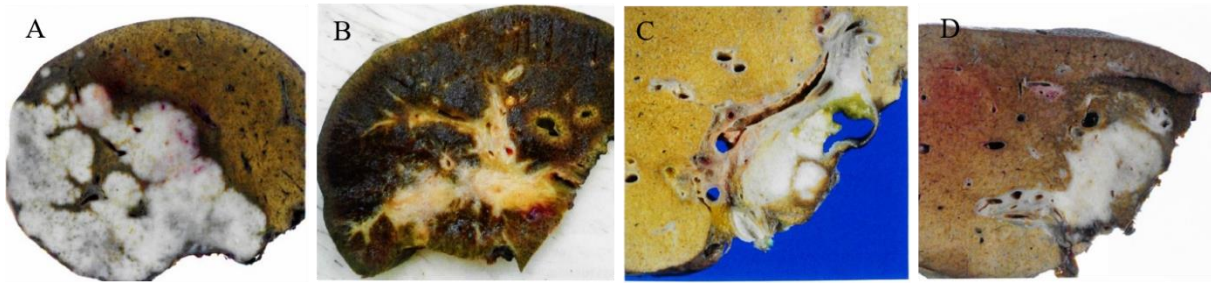
#### *1.1.3.1 Makroskopische Einteilung*

Abhängig vom Entstehungsort lässt sich das CCA in das intrahepatische (iCCA), das perihiläre (pCCA) und das distale cholangiozelluläre Karzinom (dCCA) einteilen. Das iCCA ist ein Malignom, das definitionsgemäß in der Peripherie der Gallenwege zweiter Ordnung entsteht (28). Je nach Wachstumsmuster und äußerer Erscheinung lässt es sich wiederum in drei Hauptgruppen unterteilen: *Mass-forming* (MF), *Periductal infiltrating* (PI) und *Intraductal growth* (IG) (29, 30) (Abbildung 1 und Abbildung 2).



**Abbildung 1: Klassifikation der CCAs;** A: Die Unterteilung der CCAs je nach anatomischer Lage der Läsion. B: Die unterschiedlichen Wachstumstypen des iCCA (7)

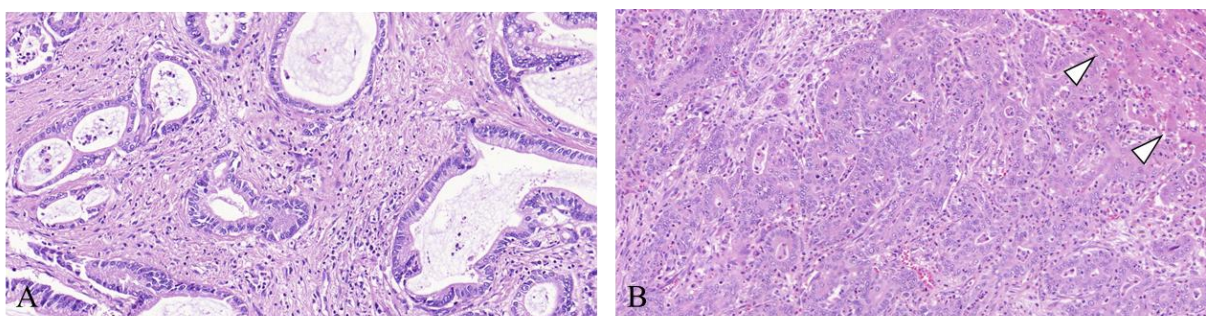
Der MF-Typ stellt dabei den häufigsten Typ dar (ca. 65% der iCCAs) und zeichnet sich durch eine gut umschriebene, knotenartige Läsion mit fester, grauer Konsistenz aus. Satellitenknoten und intrahepatische Metastasen können im selben oder kontralateralen Leberlappen vorhanden sein (6, 28). Der Ursprung liegt in kleineren Gallengängen. Der MF-Typ kann relativ große Maße annehmen, auf der Schnittfläche kann man zentrale Nekrosen oder Muzin sehen (30). Für diese Form sind keine präinvasiven Läsionen bekannt (6, 7). Der PI-Typ (6% der iCCAs) hingegen wächst entlang größerer Gallengänge. Dies führt zur Obstruktion der betroffenen und gleichzeitiger Dilatation peripherer Gallenwege. Vorausgehende Präkanzerose ist häufig die biliäre intraepitheliale Neoplasie (BilIN). Der IG-Typ (4% der iCCAs) entwickelt sich aus einer intraduktalen papillären Neoplasie der Gallenwege (IPNB). Der Tumor zeigt polypoides oder papilläres Wachstum und findet sich innerhalb eines Gallenganges. Sowohl der PI- als auch der IG-Typ entspringen den größeren Gallengängen. Alle drei Wachstumsarten existieren ebenfalls in Mischformen. Die mit Abstand häufigste Kombination wird aus dem MF- und dem PI-Wachstum gebildet (25% der iCCAs) (28, 30).



**Abbildung 2: Verschiedene Wachstumstypen in der makroskopischen Darstellung;** A: *Mass-forming*-Typ; zu sehen ist ein multinoduläres, das Leberparenchym einnehmendes Wachstum. B: *Periductal infiltrating*-Typ; Tumor hat sich entlang größerer Gallengänge bei einem Patienten mit PSC ausgebreitet. C: *Intraductal growth*-Typ; Tumor zeigt papilläres Wachstum in dem dilatierten Lumen eines intrahepatischen Gallengangs. D: Gemischter Tumor mit MF- und PI-Wachstum (6)

### 1.1.3.2 Histologische Einteilung

Histologisch findet man in der Regel ein mäßig- bis hochdifferenziertes tubuläres Adenokarzinom (31). Dennoch ist das intrahepatische cholangiozelluläre Karzinom ein heterogenes Karzinom, das histologisch in zwei Subtypen eingeordnet werden kann: Tumoren, die aus größeren Gallengängen entspringen und eine zentrale Lage aufweisen (*Large bile duct type*) (Abbildung 3A) und die, die ihren Ursprung in kleinen Gallengängen haben und in der Peripherie zu finden sind (*Small bile duct type*) (Abbildung 3B) (30). Beide Typen unterscheiden sich in ihren klinischen, pathologischen und molekularen Eigenschaften. Diese sind in Tabelle 1 aufgelistet.



**Abbildung 3: Histologische Subtypen des iCCA;** A: *Large bile duct* Typ; die zylindrischen Tumorzellen sind in großen papillären Drüsen arrangiert. Das desmoplastische Stroma ist sehr ausgeprägt, während die Kern-Plasma-Relation niedrig ist. In den großen Lumina ist extrazelluläres Muzin zu sehen. B: CCA vom *small bile duct* Typ; der Tumor zeigt typischerweise tubuläres bis kleindrüsiges Wachstum und ist reich an Zellen. Das Stroma ist spärlich ausgebildet, die kuboidalen Tumorzellen enthalten wenig Zytoplasma. Das angrenzende Leberparenchym ist in der rechten oberen Ecke sichtbar (Pfeilspitzen). 200-fache Vergrößerung

<b>Histologischer Subtyp</b>	<i>Large bile duct type</i>	<i>Small bile duct type</i>
<b>Wachstumsmuster</b>	PI, IG	MF
<b>Ursprung</b>	große intrahepatische Gallengänge	kleinere interlobuläre oder septale Gallengänge
<b>Ursprungszellen</b>	Cholangiozyten und peribiliäre Drüsen	muzin-negative kuboidale Cholangiozyten, hepatische Stammzellen, reife Hepatozyten
<b>Klinische Symptome</b>	schmerzloser Ikterus, dunkle Urinfarbe, abdominale Schmerzen	unspezifische abdominale Symptome, oft Zufallsbefund
<b>Assoziierte Risikofaktoren</b>	PSC, Hepatolithiasis, Leberegel	chronische virale Hepatitis, Leberzirrhose
<b>Präkanzerosen</b>	BilIN, IPNB	unbekannt
<b>Tumorzellen</b>	zylindrische Zellen	niedrig zylindrisch bis kuboidal
<b>Morphologie</b>	papilläres oder papillotubuläres Adenokarzinom; diffuse Tumorfibrose	tubuläres Adenokarzinom, mit oder ohne trabekuläre Foci; zentrale Tumorsklerose
<b>Muzin Produktion</b>	++	+/-
<b>Perineuralscheideninfiltration</b>	++	-
<b>Lymphgefäßinvasion</b>	++	+/-
<b>Tumornekrose</b>	+	+/-

**Tabelle 1: Die Einteilung der iCCAs in die histologischen Subtypen und ihre Charakteristika (6, 26, 32–34);** PI: pediductal infiltrating; IG: intraductal growth; MF: mass-forming; PSC: primär sklerosierende Cholangitis; BilIN: biliäre intraepitheliale Neoplasie; IPNB: intraduktale papilläre Neoplasie der Gallenwege

### 1.1.3.3 TMN-Klassifikation und Grading

Die TNM-Klassifikation und die Stadieneinteilung für das intrahepatische cholangiozelluläre Karzinom sind folgendermaßen definiert (35):

#### **T - Primärtumor:**

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> (intraduktaler Tumor)
T1a	Solitärer Tumor 5 cm oder weniger in größter Ausdehnung ohne Gefäßinvasion
T1b	Solitärer Tumor mehr als 5 cm in größter Ausdehnung ohne Gefäßinvasion
T2	Solitärer Tumor mit intrahepatischer Gefäßinvasion <i>oder</i> multiple Tumoren mit oder ohne Gefäßinvasion
T3	Tumor(en) mit Perforation des viszeralen Peritoneums
T4	Tumor mit direkter Invasion extrahepatischer Strukturen

#### **N - regionäre Lymphknoten:**

NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen

#### **M - Fernmetastasen:**

M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Stadium I	T1	N0	M0
Stadium IA	T1a	N0	M0
Stadium IB	T1b	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium IIIA	T3	N0	M0
Stadium IIIB	T4	N0	M0
	Jedes T	N1	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

**Tabelle 2: UICC/AJCC Einteilung des intrahepatischen cholangiozellulären Karzinoms (8. Auflage) (35);** UICC: Union for International Cancer Control; AJCC: American Joint Committee on Cancer; T: Tumor; N: Nodus; M: Metastasen

Das Grading beschreibt den Differenzierungsgrad der Tumorzellen. Beim iCCA gibt es drei Stufen, die laut WHO folgendermaßen definiert sind (36):

G1	gut differenziert	uniforme Tubuli, gut differenziertes Adenokarzinom mit oder ohne mikropapilläre Strukturen
G2	mäßig differenziert	mäßig unregelmäßige tubuläre Drüsen mit kribriformen Arealen und/oder Strängen
G3	schlecht differenziert	hochgradig unregelmäßige verzweigte tubuläre Strukturen mit ausgeprägter Kernpolymorphie

#### *1.1.4 Therapie und Prognose*

Das intrahepatische CCA ist insgesamt mit einer schlechten Prognose verbunden. Die meisten Patienten weisen zum Zeitpunkt der Diagnose bereits eine fortgeschrittene Erkrankung auf und sterben innerhalb der ersten 12 Monate an Leberversagen, Tumorkachexie oder Sepsis. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt dabei weniger als 5% (37).

Die einzige Therapie mit kurativem Ansatz stellt die chirurgische Resektion des iCCA dar (38). Diese kommt aber nur in Frage, wenn sowohl die technische als auch die funktionelle Operabilität des Patienten gewährleistet ist (26). Üblicherweise hat weniger als ein Drittel aller iCCA-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose einen resektablen Tumor (39). Nach der Resektion beträgt die mediane krankheitsfreie Überlebenszeit 26 Monate, die Rezidivrate liegt bei 60-65% (40, 41). Die 5-Jahres-Überlebensrate nach der operativen Entfernung des Tumors beträgt zwischen 22% und 44% (39). Gründe für die schlechte Prognose und das hohe Rezidivrisiko stellen unter anderem die Tumorgröße, Gefäßinvasion, Lymphknotenmetastasen, multiple Tumoren, Leberzirrhose, schlechte Differenzierung der Tumorzellen und ein positiver Resektionsrand dar (42, 43).

Aufgrund der hohen Rezidiv- und der schlechten 5-Jahres-Überlebensrate (< 25%) ist die Lebertransplantation als potenziell kurativer Ansatz irresektabler iCCAs sehr umstritten. Dennoch kann sie bei Patienten mit begleitender Leberzirrhose oder einer Tumorgröße  $\leq 2$  cm unter Studienbedingungen erwogen werden (24, 44, 45).

Das cholangiozelluläre Karzinom ist ein chemoresistenter Tumor. Die Mechanismen dieser Chemoresistenz sind physiologisch und bereits in gesunden Cholangiozyten zu beobachten, die sich vor toxischen Verbindungen aus dem Blut und Galle schützen (46). Nichtsdestotrotz kann

eine systemische Chemotherapie sowohl zur Verbesserung der Lebensqualität als auch zu einer Verlängerung der Lebensdauer der Patienten mit fortgeschrittener CCA-Erkrankung beitragen (47). In der Vergangenheit wurde die Effizienz verschiedener Chemotherapeutika in mehreren Studien untersucht. Allerdings schlossen diese meist auch extrahepatische cholangiozelluläre Karzinome ein, was die Aussagekraft der Ergebnisse für das iCCA allein einschränkt. Die BILCAP (Adjuvant Capecitabine for Biliary Tract Cancer) Phase III Studie zeigte eine Verbesserung des Gesamtüberlebens bei Patienten, die nach einer Resektion eine adjuvante Chemotherapie mit Capecitabin erhielten (48). Seit 2019 wird von den internationalen Leitlinien eine adjuvante Therapie mit Capecitabin für 6 Monate nach der Resektion empfohlen (24, 49). Die systemische Chemotherapie findet auch bei nicht resektablen oder metastasierten Tumoren in Form einer palliativen Therapie Anwendung. Dabei zeigen die neuesten Studien eine Überlegenheit einer Kombinationstherapie von Gemcitabin und Cisplatin mit einer spezifischen Antikörpertherapie entweder mit Durvalumab oder Pembrolizumab, was sich in den neuesten Empfehlungen der deutschen Leitlinie widerspiegelt (24). In der Placebo-kontrollierten Phase-III Doppelblindstudie TOPAZ-1 beispielsweise konnte eine bessere Ansprechrate der Therapie in der Gruppe Gemcitabin + Cisplatin und Durvalumab (26,7%) gegenüber der alleinigen Therapie mit Gemcitabin + Cisplatin (18,7%) aufgezeigt werden (50). Auch die Kombinationstherapie mit dem zweiten bisher zugelassenen Antikörper Pembrolizumab erwies sich als überlegen. Dabei zeigte die randomisierte, ebenfalls Placebo-kontrollierte Phase-III Doppelblindstudie KEYNOTE-966 ein erhöhtes medianes Gesamtüberleben von 12,7 Monaten in der Pembrolizumab und Gemcitabin + Cisplatin Gruppe verglichen mit der Gemcitabin + Cisplatin Gruppe mit 10,9 Monaten (51).

Bei Kontraindikationen für eine Antikörpertherapie mit den beiden oben genannten Chemotherapeutika soll auf die alleinige Kombination aus Gemcitabin und Cisplatin zurückgegriffen werden (24). In einer Studie mit 410 Patienten wurde die Wirksamkeit einer Gemcitabin/Cisplatin Therapie mit einer Gemcitabin-Monotherapie verglichen. In der Gemcitabin/Cisplatin Gruppe zeigte sich ein signifikant längeres Gesamtüberleben als in der Vergleichsgruppe (11,7 vs. 8,1 Monate) (52). In einer Metaanalyse dieser Studie zusammen mit einer Phase-II-Studie aus Japan erwies sich die Kombination aus den beiden Chemotherapeutika ebenfalls als wirksam (53, 54). Falls Cisplatin beispielsweise wegen Niereninsuffizienz kontraindiziert ist, ist eine Kombination aus Gemcitabin und Oxaliplatin möglich (55, 56). Als Zweitlinientherapie kann eine Kombination aus drei Chemotherapeutika: Folinsäure, 5-Fluorouracil und Oxaliplatin (FOLFOX) in Erwägung gezogen werden. In einer

Phase III Studie aus England wurde an 162 Patienten mit fortgeschrittenem CCA gezeigt, dass eine Zweittherapie mit FOLFOX das Gesamtüberleben der Patienten verbessert (57).

Lokoregionale Therapieverfahren wie die Radiofrequenzablation (RFA), die transarterielle Chemoembolisation (TACE) oder die selektive interne Radiotherapie (SIRT) mit Yttrium-90 (<sup>90</sup>Y) können zur Therapie kleiner irresektabler iCCA-Läsionen geeignet sein (58). Patienten, die beispielsweise eine TACE mit Cisplatin erhielten, zeigten im Vergleich zu denjenigen, die symptomatisch behandelt wurden, ein signifikant längeres Gesamtüberleben (12,2 versus 3,3 Monate) (59). Auch die hepatisch-arterielle Infusion (HAI) von Floxuridin ist eine vielversprechende Methode. Laut einer Studie mit 104 iCCA-Patienten zeigte die Kombination von HAI mit systemischer Chemotherapie ein medianes Gesamtüberleben der Patienten von 30,8 Monaten; das Gesamtüberleben der Patienten, die ausschließlich Chemotherapie erhielten betrug dagegen lediglich 18,4 Monate (60).

In zahlreichen Tumorentitäten hat der zusätzliche Einsatz der sogenannten zielgerichteten Therapien zu der Standardchemotherapie die Ansprechrate des Tumors und die Gesamtüberlebenszeit der Patienten signifikant erhöht. Für das cholangiozelluläre Karzinom empfiehlt die deutsche Leitlinie bei einem fortgeschrittenen Tumorleiden sowie bei Versagen der Erstlinientherapie die Vorstellung in einem molekularen Tumorboard mit dem Ziel einer molekularen Charakterisierung des Tumors. So soll beispielsweise bei einer Isocitrat-Dehydrogenase 1 (IDH1) Mutation eine Therapie mit dem spezifischen IDH1-Inhibitor Ivosidenib erfolgen. Auch Patienten mit genetischen Alterationen im Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) sollen der Leitlinie zufolge eine Therapie mit einem der beiden zugelassenen FGFR-Inhibitoren Futibatinib oder Pemigatinib erhalten (24). Den Hintergrund bilden Daten aus verschiedenen Studien, in welchen molekular gerichtete Therapien in cholangiozellulären Karzinomen einen Überlebensvorteil für die betroffenen Patienten darstellten. In einer Phase-III Studie konnte ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben (2,7 Monate vs. 1,4 Monate) sowie Gesamtüberleben (10,3 vs. 7,5 Monate) in der Gruppe derjenigen Patienten, die Ivosidenib Therapie erhielten, festgehalten werden (61). Der FGFR-Inhibitor Futibatinib wurde in einer Phase-II Studie mit insgesamt 103 iCCA-Patienten mit einer Mutation im *FGFR2*-Gen getestet. Dabei wiesen 42% aller Patienten ein gutes Ansprechen auf die Therapie auf, das mediane Gesamtüberleben betrug 21,7 Monate (62). Auch der zweite zugelassene FGFR-Inhibitor Pemigatinib wurde in einer Phase-II Studie an 108 Patienten mit überwiegend intrahepatischen cholangiozellulären Karzinomen untersucht. Dabei zeigten 35,5% der Patienten ein Ansprechen auf die Therapie (63). Andere bisher untersuchte

zielgerichtete Substanzen richten sich unter anderem gegen Angio- und Lymphangiogenese, Tumormikromilieu, Signaltransduktionswege oder andere genetische Alterationen wie Mikrosatelliteninstabilität oder BRAF V600E Mutation.

Ein weiterer Ansatz stützt sich auf das Immunsystem. Antikörper, die sich gegen Immuncheckpoint-Rezeptoren wie CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) oder PD-1 (programmed cell death protein 1) und seinen Liganden PD-L1 richten, haben sich bei der Therapie von einigen Tumoren (malignes Melanom, nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom, Nierenzellkarzinom, klassisches Hodgkin-Lymphom oder Urothelkarzinom) bewährt und etabliert. Eine Studie, die eine molekulare Phenotypisierung von 239 Gallengangs- und Gallenblasentumoren vorgenommen hat, fand heraus, dass in 45,2% der Fälle eine erhöhte Ausprägung von Immuncheckpoint-Molekülen vorliegt (64). Eine weitere Studie zeigt eine Überexpression von PD-1/PD-L1 in intrahepatischen CCA (65). Im Folgenden werden die Prinzipien der PD-1/PD-L1 Immuncheckpoint-Therapie genauer erläutert.

## 1.2 PD-1/PD-L1

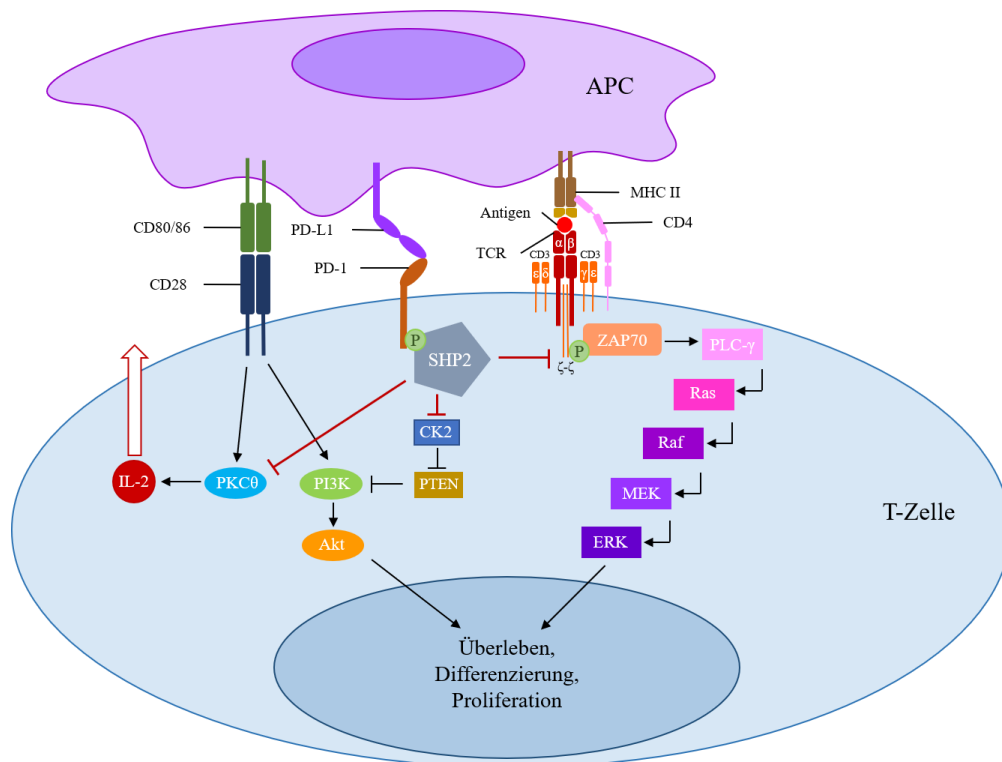
Der PD-1/PD-L1 Signalweg ist ein Kontrollmechanismus, dessen Aufgabe es ist, eine übermäßige Immunantwort des Körpers zu unterbinden, welche ihrerseits zur Gewebszerstörung oder Autoimmunität führen kann.

### 1.2.1 PD-1/PD-L1 Signalweg

Der PD-1 Rezeptor, auch bekannt als CD279, ist ein Transmembranprotein vom Typ I, das auf den aktivierten T-Zellen, B-Zellen, natürlichen Killerzellen, Monozyten und dendritischen Zellen zu finden ist. Es besteht aus 288 Aminosäuren und ist 55 kDa schwer (66, 67). Der *programmed death ligand 1* (PD-L1 oder B7-H1, CD274) ist der Ligand zu PD-1. Er ist ebenfalls ein Transmembranprotein vom Typ I und umfasst 290 Aminosäuren, bei einem Gewicht von 40 kDa (67). Die konstitutive, also dauerhafte, Expression des PD-L1 findet man in unterschiedlichen Konzentrationen auf T- und B-Lymphozyten, antigenpräsentierenden Zellen oder Makrophagen. Der Ligand ist außerdem auf nicht hämatopoetischen Zelltypen wie Gefäßendothel, Herzmuskelzellen, pankreatischen Inselzellen, Hepatozyten und immunprivilegierten Zellen wie sie in der Plazenta, im Hoden oder in der Cornea zu finden

sind, vorhanden. Die induzierte Expression findet im Rahmen einer Entzündung auf hämatopoetischen Zellen, Endothel- und Epithelzellen statt (68, 69). Als Induktoren dienen dabei proinflammatorische Zytokine wie Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) oder Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (68).

Bindet der Ligand PD-L1 an seinen Rezeptor PD-1 während einer gleichzeitigen Aktivierung des T-Zellrezeptors, wird eine Signalkaskade ausgelöst (Abbildung 4). Dabei werden zunächst die Tyrosinreste der zwei intrazellulären Domänen von PD-1 phosphoryliert, was zu der Bindung der beiden Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 (Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 1/2) führt. Diese wiederum sorgen für eine Dephosphorylierung des Proteinkomplexes CD3 $\zeta$  (cluster of differentiation 3  $\zeta$ ) und der Kinasen PKC $\theta$  (Proteinkinase C $\theta$ ) und ZAP70 (Zeta-assoziiertes Protein von 70 kD), welche ihrerseits das T-Rezeptorsignal inhibieren. Zum einen geschieht dies durch die Hemmung der für die Proliferation und Differenzierung der T-Zelle wichtigen ERK (extrazellulär regulierte Kinase) - Signalkaskade (70, 71). Zum anderen wirkt PD-1 den kostimulatorischen Effekten des CD28 - Rezeptors (cluster of differentiation 28) entgegen. Durch die Dephosphorylierung der CK2 (casein kinase 2) kommt es zur Aktivierung von PTEN (Phosphatase und Tensin homolog). Diese ist ein physiologischer Antagonist zu der PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) und der Serin/Threoninkinase Akt und inhibiert somit die von dieser Signalkaskade abhängigen Glukosestoffwechsel, Zytokinsynthese und Überleben der Zelle (72). Durch die Inhibition der Proteinkinase C $\theta$  wird die Interleukin-2 (IL-2) Produktion gehemmt (71).



**Abbildung 4: Die PD-1/PD-L1 Signalkaskade in einer T-Zelle während einer Antigenpräsentation von einer APC (67, 68);** APC: Antigenpräsentierende Zelle; CD: cluster of differentiation; CK2: Caseinkinase 2; IL-2: Interleukin-2; ERK: extrazellulär regulierte Kinase; MEK: MAPK/ERK Kinase; MHC: major histocompatibility complex; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; PKC $\theta$ : Proteinkinase C $\theta$ ; PLC- $\gamma$ : Phospholipase C- $\gamma$ ; PTEN: Phosphatase und Tensin homolog; Raf: rapidly accelerated fibrosarcoma; Ras: Rat sarcoma; SHP2: Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 2; TCR: T-Zellrezeptor; ZAP70: Zeta-assoziiertes Protein von 70 kD

### 1.2.2 Bedeutung von PD-1/PD-L1 für Autoimmunität und Infektion

Der PD-1/PD-L1 Signalweg ist für die Entwicklung der zentralen und peripheren Immuntoleranz wesentlich. Dabei werden die autoreaktiven Lymphozyten in einer negativen Selektion sowohl in primären (Thymus, Knochenmark) als auch in sekundären lymphatischen Organen (Lymphknoten, Milz) eliminiert (73). In einer Reihe von Studien mit Knockoutclustern Mäusen fand man heraus, dass das Fehlen des PD-1 Rezeptors zur Autoimmunität mit Krankheitsbildern wie Arthritis, Glomerulonephritis oder dilatative Kardiomyopathie mit Myokarditis führt (74, 75). In einer anderen Studie wurde der PD-1/PD-L1 Signalweg bei Mäusen, die genetisch für die Entstehung eines autoimmunen Diabetes mellitus Typ 1 prädisponiert sind, blockiert. Hier zeigte sich eine Induktion und Progression der Erkrankung (76). Beim menschlichen Organismus wird ein Zusammenhang zwischen einigen autoimmunen

Erkrankungen und genetischem Polymorphismus in den PD-1/PD-L1 Genen vermutet. Dazu gehören unter anderem systemischer Lupus erythematoses, multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis oder Morbus Basedow (77–80).

Auch für virale und bakterielle Infektionen spielt der PD-1/PD-L1 Signalweg eine wichtige Rolle. So kommt es etwa während einer chronischen Entzündung der Magenschleimhaut durch eine *Helicobacter pylori* Infektion zu einer verstärkten PD-L1 Expression auf den gastralen Epithelzellen. Dadurch wird die T-Zellproliferation und IL-2 Produktion unterdrückt und infolgedessen die Immunantwort abgeschwächt (81). Nicht-parenchymale Leberzellen wie Kupffer-Zellen oder sinusoidale Endothelzellen sorgen mit ihrer PD-L1 Expression für eine langsamere Reduktion der viralen Last im Rahmen einer Hepatitis (82). Bei HIV (humanes Immundefizienz-Virus) Infizierten korreliert die Ausprägung des PD-1 Rezeptors mit der Funktion der virus-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, der Schwere der Krankheit und der Viruslast (83, 84).

### 1.2.3 Tumorimmunologie und PD-L1-Expression auf iCCA

Bereits 1909 beschrieb Paul Ehrlich die Fähigkeit des Immunsystems, die Entstehung und das Wachstum entarteter Zellen einzudämmen (85). Das Verständnis für die Tumorimmunologie wuchs in den darauffolgenden Jahren stark. So stellten Sir Macfarlane Burnet und Lewis Thomas im Jahre 1970 die Theorie von der sogenannten „Immunüberwachung“ (*Immune Surveillance*) auf, laut welcher das Immunsystem mittels tumor-assoziierten Antigenen Tumorzellen erkennen und eliminieren kann (86). In der Tat sind die tumorinfiltrierenden Lymphozyten in der Lage dazu, in das Tumorgewebe einzudringen und dieses in Schach zu halten oder gar eine Regression zu induzieren. Dadurch wird ein Selektionsdruck auf die Tumorzellen ausgeübt, dem sie sich zu entziehen versuchen. Aufgrund der genetischen Instabilität gelingt es manchen Tumoren, einen „*Tumor-Escape*“ Phänotyp zu entwickeln. Dies erlaubt ihnen, sich der Überwachung durch das Immunsystem zu entziehen und ungehindert weiterzuwachsen (87). Eine dieser Entkommensstrategien ist die Expression des PD-L1 Liganden auf der Tumor-Zelloberfläche und die somit eintretende Suppression der umgebenden Immunozyten.

Die PD-L1 Expression wurde bereits auf verschiedenen Tumorentitäten wie zum Beispiel dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, malignen Melanom, Ovarialkarzinom, Mammakarzinom oder Urothelkarzinom nachgewiesen. Auch das cholangiozelluläre Karzinom macht sich diesen

Mechanismus zunutze. In einer Studie mit 54 iCCA-Patienten zeigten 39 (72%) eine positive immunhistochemische PD-L1 Färbung auf den Tumorzellen und 34 (63%) auf den tumorassoziierten Makrophagen (88). Hier konnte man auch einen direkten Zusammenhang zwischen der Ausprägung des Liganden auf den Tumorzellen und dem schlechteren Überleben der Patienten nachweisen. In einer weiteren Studie mit 58 iCCA-Patienten zeigten die typische Färbung lediglich 5 Fälle (9%) auf den Tumorzellen und 31 Fälle (53%) auf den Immunzellen (89). In beiden Studien wurden allerdings ausschließlich diejenigen Proben als positiv gewertet, bei welchen mindestens 5% der Tumorzellen eine positive Färbung aufwiesen.

Ebenfalls interessant ist die Tatsache, dass höhere PD-L1 Expression auf den Tumorzellen mit einer schlechteren Zelldifferenzierung und fortgeschrittenerem Tumorstadium in Verbindung steht (65).

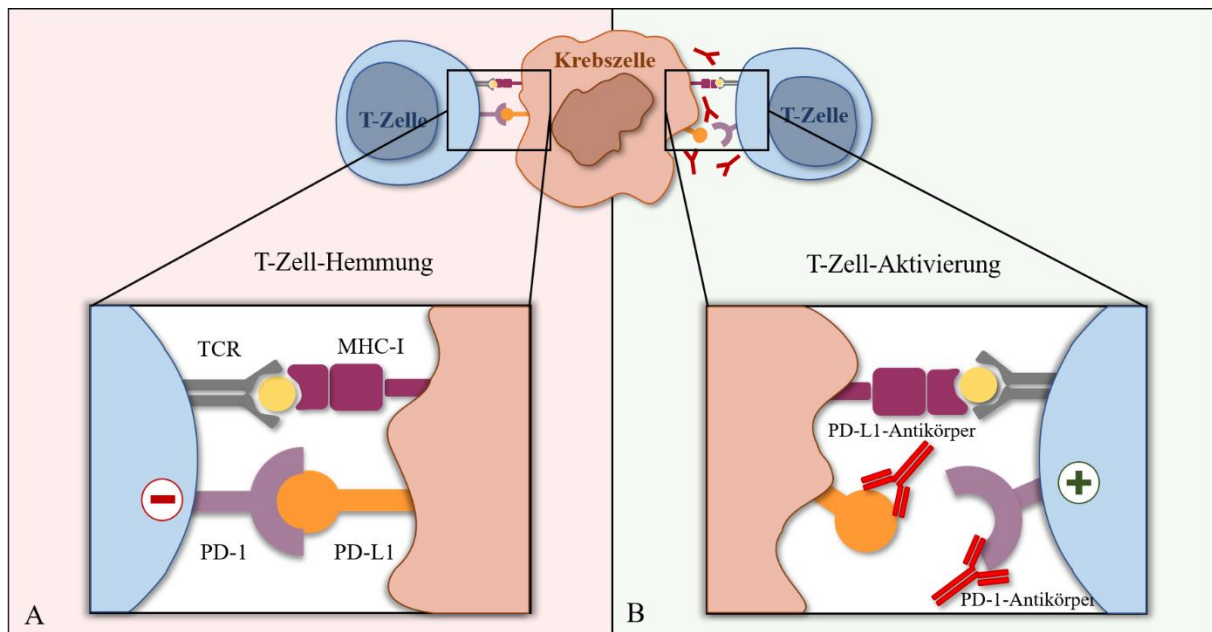
#### 1.2.4 PD-1/PD-L1 Inhibitoren in der Immuntherapie

Die Interaktion zwischen dem Rezeptor PD-1 und seinem Liganden PD-L1 kann mit spezifischen Antikörpern unterbunden werden (Abbildung 5). In zwei größeren Studien zu Anti-PD-1-Antikörpern und Anti-PD-L1-Antikörpern zeigten die darin untersuchten soliden Tumoren (unter anderem malignes Melanom, nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom und Nierenzellkarzinom) gute Ansprechraten auf die Therapie (90, 91). Die derzeit zugelassenen PD-1/PD-L1-Immuncheckpoint-Inhibitoren sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Wirkstoff	Handelsname	Zielstruktur	Indikation	Zulassungsjahr
Nivolumab	Opdivo®	PD-1	kolorektales Karzinom, Ösophaguskarzinom, Magenkarzinom, klassisches Hodgkin-Lymphom, malignes Melanom, Kopf-Halstumoren, nichtkleinzelliges Lungenkarzinom, malignes Pleuramesotheliom, Nierenzellkarzinom, Urothelkarzinom	2015
Pembrolizumab	Keytruda®	PD-1	kolorektales Karzinom, Ösophaguskarzinom, Magenkarzinom, klassisches	2015

			Hodgkin-Lymphom, malignes Melanom, Kopf-Halstumoren, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Nierenzellkarzinom, Urothelkarzinom, Zervixkarzinom, Endometriumkarzinom, dreifach negatives Mammakarzinom	
Avelumab	Bavencio®	PD-L1	Merkelzellkarzinom, Nierenzellkarzinom, Urothelkarzinom	2017
Atezolizumab	Tecentriq®	PD-L1	hepatozelluläres Karzinom, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Kleinzelliges Lungenkarzinom, Urothelkarzinom, dreifach negatives Mammakarzinom	2017
Durvalumab	Imfinzi®	PD-L1	hepatozelluläres Karzinom, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, kleinzelliges Lungenkarzinom, biliäre Tumoren	2018
Cemiplimab	Libtayo®	PD-1	Basalzellkarzinom, Plattenepithelkarzinom, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Zervixkarzinom	2019
Dostarlimab	Jemperli®	PD-1	Endometriumkarzinom	2021
Tislelizumab	Tevimbra®	PD-1	Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus, Adenokarzinomen des Magens oder gastroösophagealen Übergangs	2023
Toripalimab	Loqtorzi®	PD-1	Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus, Nasopharynxkarzinom	2024
Retifanlimab	Zynyz®	PD-1	Merkelzellkarzinom	2024

**Tabelle 3: Derzeit in der EU zugelassene PD1/PD-L1-Immuncheckpoint-Inhibitoren (92–97)**



**Abbildung 5: Blockade des PD-1 bzw. des PD-L1 durch spezifische Antikörper (98);** A: Regelrechtes Andocken des PD-L1 am PD-1 Rezeptor mit der dazugehörigen hemmenden Wirkung auf die T-Zelle; B: Hemmung des PD-1 Rezeptors bzw. des PD-L1 mit spezifischen Antikörpern. Die Inhibition der T-Zelle entfällt somit.

Die Immuncheckpoint-Inhibitoren verursachen unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) autoimmuner Art und können somit alle Organsysteme betreffen. In einer Übersichtsarbeit wird berichtet, dass insgesamt 86% aller Patienten unter Nivolumab Behandlung Nebenwirkungen jeden Grades aufzeigen, 17-21% der Patienten erleiden schwerwiegende bis lebensbedrohliche Nebenwirkungen. Die häufigsten Nebenwirkungen betreffen die Haut (46%) und äußern sich in Pruritus oder einem Exanthem. Auch die Autoimmunkolitis (22%) und Endokrinopathien wie Thyreoiditis oder Hypophysitis (17%) zählen zu den UAWs. Zu den selteneren Nebenwirkungen gehören Pankreatitis, Hepatitis, Pneumonitis, Nephritis und neurologische Störungen. Durch den frühzeitigen Einsatz von Glukokortikoiden lassen sich schwerwiegende Komplikationen vermeiden und die Dauer der Nebenwirkungen verkürzen. Die meisten UAWs lassen sich jedoch mit gutem Management beherrschen (92).

### 1.3 RAS- (*KRAS/NRAS*) und *BRAF*-Mutationen in iCCA

Der Ras-Raf-MEK-ERK Signalweg ist eine Signaltransduktionskaskade. Sie ist für die Proliferation und Differenzierung jeder Körperzelle unabdingbar (Abbildung 4) und ist in etwa 30% der menschlichen Krebserkrankungen überaktiv (99). Die für die Ras- und Raf-Proteine kodierenden Gene wie *KRAS* (Kirsten rat sarcoma), *NRAS* (neuroblastoma RAS) und *BRAF* (B (Isoform B1) rat fibrosarcoma) können dabei mutieren und zu einer Daueraktivierung der Proteine führen. Dies veranlasst die Zelle dazu, sich unkontrolliert zu teilen und zu entarten.

Ungefähr 62% aller iCCAs gehören zu einem proliferativen Typ, mit Aktivierung von onkogenen Signalkaskaden und der daraus resultierenden schlechteren Prognose (100). *KRAS*-Mutationen gehören dabei zu den häufigeren Mutationen in iCCA (9-25%) (64, 101, 102). Erwähnenswert ist, dass *KRAS*-Mutationen eher im *Large bile duct* Typ (23%) als im *Small bile duct* Typ (1%) entstehen (103). Andere Mutationen wie *NRAS* und *BRAF* sind deutlich seltener. *NRAS* ist in 3-9% (101, 102) und *BRAF* in etwa 3-6% der Fälle mutiert (102, 104). Dabei beschränkt sich die *BRAF*-Mutation interessanterweise auf das intrahepatische CCA (104).

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das intrahepatische cholangiozelluläre Karzinom tritt zwar selten auf, ist jedoch mit einer sehr schlechten Prognose verbunden. Die Therapiemöglichkeiten sind aufgrund einiger Besonderheiten des Tumors begrenzt, nicht zuletzt, weil der Großteil der Patienten sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits in einem fortgeschrittenen Tumorstadium befindet. Die weltweit steigende Inzidenz des Tumors macht es notwendig, das Wissen darüber zu erweitern und neue Therapieansätze zu erforschen. Neue Hoffnung bringen die zielgerichteten Therapien, darunter auch die Inhibition des Immuncheckpoint-Rezeptors PD-1 und seines Liganden PD-L1. In Anbetracht der komplexen Tumorbiologie des iCCA und dem bisher wenig erforschten Zusammenspiel mit dem Immunsystem, ergaben sich in dieser Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Welche klinischen Charakteristika zeigen die Patienten und üben diese einen Einfluss auf die Überlebenszeit aus?
2. Wie hoch ist die PD-L1 Expression auf Tumorzellen und auf den tumorspezifischen Immunzellen im iCCA?
3. Besteht ein Zusammenhang zwischen der unterschiedlichen PD-L1 Expression auf den Tumorzellen bzw. auf den tumorspezifischen Immunzellen und der Überlebenszeit der Patienten?
4. Ab welcher Expressionsstärke von PD-L1 auf den Tumorzellen bzw. auf den tumorspezifischen Immunzellen ist ein schlechteres Outcome der Patienten zu erwarten?
5. Wie häufig sind *KRAS*-, *NRAS*- und *BRAF*-Mutationen bei iCCA vorhanden und haben diese einen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten?

So sollen in einem ersten Schritt die histopathologischen und klinischen Daten zu 190 Patienten zusammengetragen und retrospektiv analysiert werden. Der *RAS*- bzw. *RAF*-Mutationsstatus wird mittels Sequenzierung als zusätzliche Variable erhoben. In einem weiteren Schritt soll in dieser Arbeit mittels Immunhistochemie die PD-L1 Expression auf den Tumorzellen und Immunzellen ausgewertet werden. Mit den Überlebensdaten einer vorhergehenden Dissertation vom selben Patientengut soll zum Schluss der Zusammenhang zwischen den klinischen Charakteristika, der PD-L1 Ausprägung und dem Outcome der Patienten untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Erstellung einer iCCA-Datenbank

Gegenstand der Untersuchung waren 190 intrahepatische CCA-Patientenproben, die im Zeitraum von 1996 bis 2018 im Institut für Pathologie der Universität Regensburg diagnostiziert wurden.

#### 2.1.1 Erhebung der Patientendaten

Zunächst wurde aus den bereits vorhandenen Patientendaten (gesammelt von Fr. Dr. Simone Stock im Rahmen ihrer Promotion (105)) von Patienten mit Lebertumoren aus dem Institut für Pathologie der Universität Regensburg eine Excel-Datei mit den iCCA-Fällen erstellt. Dabei wurden Daten wie Alter, Geschlecht und Tumoreigenschaften (Tumorgröße, TNM-Klassifikation, Grading) erfasst. Außerdem wurden folgende Vorerkrankungen berücksichtigt: PSC, sekundär sklerosierende Cholangitis (SSC), Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und Hepatitis B. Die Excel-Tabelle wurde zudem um folgende Informationen aus der vorhergehenden Doktorarbeit ergänzt: Vorerkrankungen wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, aber auch Adipositas, wobei die Letztgenannte anhand des BMI des Patienten (errechnet basierend auf den jeweiligen Größen- und Gewichtsangaben) festgestellt wird. Ebenfalls wurde mithilfe der Sterbedaten aus dem Tumorzentrum die Überlebenszeit der einzelnen Patienten ab dem Zeitpunkt der Resektion berücksichtigt.

Im nächsten Schritt wurden alle 190 Fälle erneut histologisch beurteilt. Dabei wurde besonders auf den Zustand der umgebenden Leber, sowie auf Besonderheiten des Tumors geachtet. Folgende Daten wurden zusätzlich in der Tabelle aufgenommen:

- Fibrosegrad der Leber, Einteilung nach dem Ishak-Score (Tabelle 4)
- Vorhandensein einer Steatosis hepatis oder einer Hepatitis
- Vorhandensein von Alpha-1-Antithrypsin-Mangel oder einer Eisenüberladung
- Vorhandensein von Präneoplasien (BilIN, IPNB)
- Weitere Auffälligkeiten (Cholestase, Cholangitis, von-Meyenburg-Komplexe)

<b>Score</b>	<b>Beschreibung</b>
0	Keine Fibrose
1	Fibröse Expansion einzelner Portalfelder mit oder ohne kurze fibröse Septen
2	Fibröse Expansion der meisten Portalfelder mit oder ohne kurze fibröse Septen
3	Fibröse Expansion der meisten Portalfelder mit einzelnen portoportal Septen
4	Fibröse Expansion der meisten Portalfelder mit deutlicher Brückenbildung porto-portal und porto-zentral
5	Deutliche Brückenbildung (porto-portal und/oder porto-zentral) mit einzelnen Knoten (inkomplette Zirrhose)
6	Zirrhose (wahrscheinlich oder definitiv)

**Tabelle 4: Ishak-Score (106)**

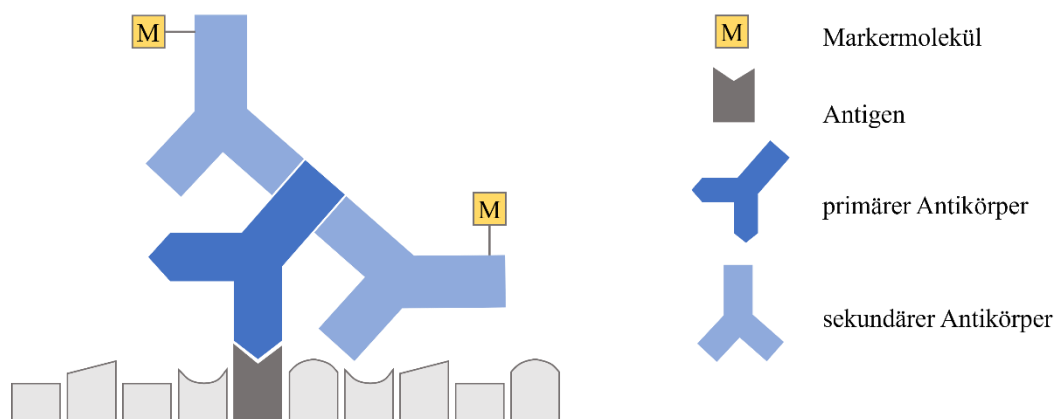
### *2.1.2 Auswahl der Paraffinblöcke*

Nachdem jeder Fall einzeln unter dem Mikroskop betrachtet wurde, wurden die ausgewählten Paraffinblöcke mit Tumorgewebe der iCCA aus dem Archiv entnommen und einer gesonderten Sammlung hinzugefügt.

## 2.2 Immunhistochemie

### *2.2.1 Grundlagen der Methodik*

Die Immunhistochemie stellt eine in der Pathologie häufig angewandte Methode dar, welche vor allem in der Tumordiagnostik nicht mehr wegzudenken ist. Die Immunhistochemie macht sich die Spezifität und Affinität immunologischer Reaktionen zunutze. So wird es möglich, die Epitope gesuchter Antigene präzise zu lokalisieren und sichtbar zu machen. Das Prinzip lässt sich in zwei Schritte aufteilen. Im ersten Schritt wird der primäre Antikörper auf das Gewebe gegeben. Dieser bindet spezifisch an das Epitop des gesuchten Antigens. Im zweiten Schritt werden diese Antigen-Antikörper-Bindungsstellen sichtbar gemacht. Dies wird durch die Zugabe eines zweiten Antikörpers, der spezifisch an den primären Antikörper bindet und aufgrund seiner Markierung visualisiert werden kann, möglich (Abbildung 6) (107).



**Abbildung 6: Grundlagen der Immunhistochemie (107).** Sowohl der primäre als auch der sekundäre, markierte Antikörper binden an ihren spezifischen Antigenen.

### 2.2.2 Immunhistochemische PD-L1 Färbung

2µm dünne Schnitte wurden mit dem Rotationsmikrotom HistoCore AUTOCUT (Leica Biosystems) auf SuperFrost Plus®-Objektträger (Fa R. Langenbrinck GmbH) aufgezogen, getrocknet und anschließend mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Anschließend wurde eine immunhistochemische PD-L1 Färbung (anti-PD-L1 antibody 28.8, abcam, 1:100) (BenchMark ULTRA, Fa Roche Diagnostics) angefertigt. Die immunhistochemische Färbung wurde mit den bereits etablierten Färbeprotokollen durchgeführt. Das ausführliche Färbeprotokoll ist Tabelle 5 zu entnehmen.

Arbeitsschritt	PD-L1 Färbung
1	Entparaffinierung: Objektträger Temperatur von 72°C auf mittlere Temperaturen erhöhen
2	Hitzevorbehandlung
3	Ultra CC1: Erwärme Objektträger auf 95°C und inkubiere für 4 Minuten
4	CC1 48 Minuten
5	Vor-Primärperoxidase-Hemmer
6	Primär Antikörper: Coverslip auftragen, einen Tropfen von Antikörper auftragen und für 44 Minuten inkubieren
7	Gegenfärbung: 1 Tropfen von Hämatoxylin auftragen, liquid coverslip auftragen und für 8 Minuten inkubieren
8	Nach-Gegenfärbung: 1 Tropfen von Bluing Reagent auftragen, liquid coverslip auftragen und für 4 Minuten inkubieren

**Tabelle 5: Färbeprotokoll für die automatisierte PD-L1 Färbung;** CC1: Cell Conditioner Nr.1, Tris/EDTA/Borat-Puffer, pH=8-8,5

### 2.2.3 Auswertung der PD-L1 Färbungen

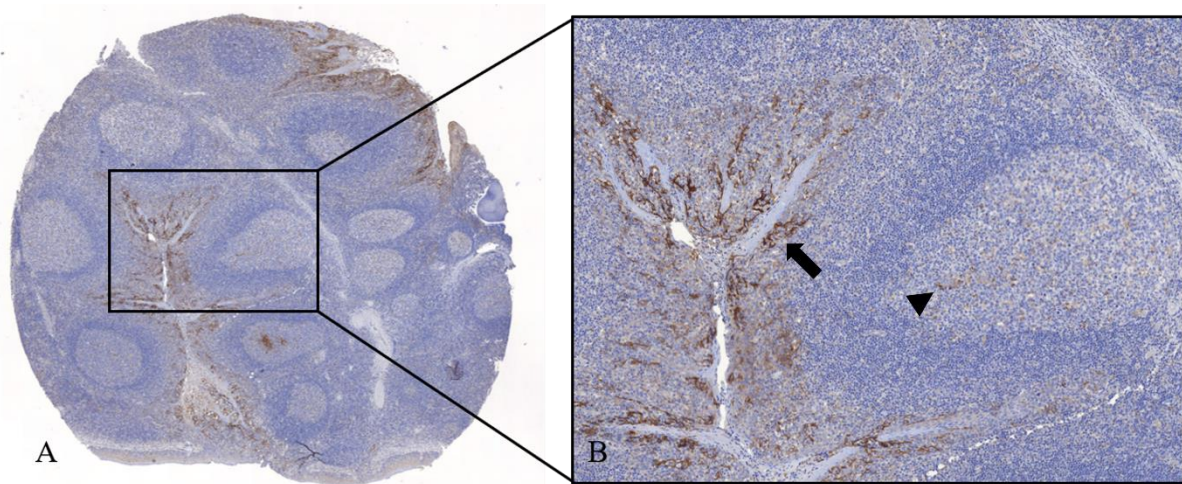
Die Auswertung der Expression von PD-L1 erfolgte anhand der Bestimmung des Tumor Cell Score (TC) und des Immune Cell Score (IC). Der Tumor Proportion Score (TPS)/bzw. TC (Tumor Cells) gibt das Verhältnis der PD-L1 positiv gefärbten Tumorzellen bezogen auf alle vitalen Tumorzellen an und wird in Prozent angegeben.

Bei der Angabe der Immunzellen (Immune Cells; IC) werden alle Immunzellen, die eine PD-L1-Färbung jeglicher Intensität aufweisen und sich im Tumor oder in intratumoralem und benachbartem peritumoralem Stroma befinden, bei der Auswertung berücksichtigt. Der Wert wird in Prozent angegeben und auf das Tumorareal bezogen.

Beide Scores wurden gewählt, um die unterschiedliche Expression von PD-L1 sowohl auf den Tumorzellen als auch auf den tumorspezifischen Immunzellen (Makrophagen, Lymphozyten, dendritischen Zellen) abzudecken. Zu allen immunhistochemischen Reaktionen wurde ein HE-Schnitt angefertigt. So konnte man die Lage, Größe und weitere Eigenschaften des Tumors vergleichen. Die Interpretation der PD-L1-Färbung beinhaltet folgende Regeln:

- Es wird der relative Anteil PD-L1 positiver Tumor- (TC) oder Immunzellen (IC) bezogen auf die gesamte Tumorfläche bewertet.
- Es wird der gesamte Schnitt ausgewertet.
- Als positiv gilt in Tumorzellen eine membranäre Färbung, diese kann partiell oder zirkulär sein.
- Bei Immunzellen gilt neben der membranären Färbung auch eine granuläre Expression als positiv.
- Auch eine schwach positive Färbereaktion wird als positiv gewertet (108).

In Abbildung 7 ist die Positivkontrolle für die PD-L1-Färbung dargestellt.



**Abbildung 7: Positivkontrolle der PD-L1-Färbung der Tonsille.** Deutlich zu erkennen ist der Gradient der Färbung zwischen dem Kryptenepithel (Pfeil), welches eine starke Färbereaktion zeigt, und den Makrophagen (Pfeilspitze) in den Keimzentren mit moderater Färbung (108). A: 20-fache Vergrößerung, B: 100-fache Vergrößerung

Bei der Auswertung von PD-L1 wurde in folgenden Schritten bewertet:

0%

<1%

1 bis  $\leq$  5%

6 bis  $\leq$  10%

11 bis  $\leq$  15%

16 bis  $\leq$  20%

21 bis  $\leq$  25%

26 bis  $\leq$  30

>30%

### 2.3 DNA- und RNA-Extraktion aus den Tumorproben

Für die DNA- und RNA-Extraktion wurde formalin-fixiertes, paraffin-eingebettetes Gewebe (FFPE) von den 190 iCCA-Fällen verwendet.

### 2.3.1 Arbeits- und Verbrauchsmaterialien

Die für die DNA- und RNA-Extraktion verwendeten Arbeitsmaterialien sind in Tabelle 6 aufgeführt.

<b>Verbrauchsmaterialien/Geräte</b>	<b>Firma</b>
AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (50)	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Methylenblau	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Milli-Q 18,2	Millipore, Eschborn, Deutschland
Xylol	VWR Chemicals, Radnor, Pennsylvania, USA
Ethanol absolute	VWR Chemicals, Radnor, Pennsylvania, USA
Ethanol 99%	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland
2-Propanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Nuclease-free water	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Surgical Blade no. 11	Feather, Osaka, Japan
Safe Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ThermoStat Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ThermoMixer® C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5430 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex-Genie 2T	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA

**Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien für die DNA-/RNA-Extraktion**

### 2.3.2 Entparaffinierung und Mikrodisektion

Die zur Verfügung stehenden Paraffinblöcke wurden zunächst mittels eines Microm HM 430 Schlittenmikrotoms (Thermo Scientific) in 5 µm dicke Schnitte geschnitten. Nach einer kurzen Verweildauer auf einer Wärmeplatte wurden die Proben entparaffiniert. Dafür wurden diese einer absteigenden Xylol/Alkoholreihe in der folgend genannten Reihenfolge unterzogen:

- 20 Minuten in Xylol
- 10 Minuten in 100% Ethanol
- 10 Minuten in 98% Ethanol
- 10 Minuten in 70% Ethanol

Anschließend wurden die Schnitte in entionisiertem Wasser abgespült und in einer Methylenblaulösung eingefärbt. Zu einer besseren Orientierung wurden während der Mikrodisektion die bereits angefertigten HE-Schnitte zur Hilfe genommen. Dabei wurde

vorher unter Sicht im Mikroskop der Tumor markiert. Diese Stelle wurde mithilfe eines sterilen Skalpell abgetragen und in einer 1,5 ml Eppendorf Tube mit einer Lösung aus 150 µl PKD-Puffer und 10 µl Proteinkinase K überführt. Die Tubes wurden dann bei 56°C für 15 Minuten inkubiert und anschließend für 3 Minuten auf Eis gelegt. Als nächstes wurden die Proben für 15 Minuten bei 20000 g zentrifugiert. Das hierdurch entstehende Pellet wurde für die Isolation der DNA gebraucht. Der Überstand wurde abpipettiert und zur Isolation der RNA weiterverarbeitet.

### *2.3.3 Isolierung mittels AllPrep DNA/RNA FFPE Kit*

Zur RNA-Extraktion wurde der flüssige Überstand zunächst für 15 Minuten bei 80°C inkubiert. Nach Zugabe von 320 µl RLT-Puffer und 720 µl Ethanol wurde die Probe in eine RNeasy MinElute Spinsäule übertragen, welche in ein 2 ml Sammelröhrchen platziert war. Nach dem abzentrifugieren wurde die Säule mit 350 µl FRN-Puffer gereinigt und anschließend mit DNase-Lösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Gabe von 500 µl FRN-Puffer wurde das Enzym-Puffer-Gemisch abzentrifugiert und erneut auf die Säule gegeben. Es folgte zweimaliges Waschen der Säule mithilfe des RPE-Puffers und anschließendes Trocknen der Säule durch 5 minütiges Zentrifugieren. Eluiert wurde die RNA mit 30 µl nukleasefreiem Wasser.

Für die DNA-Extraktion wurde das Pellet in 40 µl Proteinkinase K und 180 µl ATL-Puffer resuspendiert und erst für 1 Stunde bei 56°C und anschließend für zwei Stunden bei 90°C inkubiert. Als nächstes wurden je 200 µl AL-Puffer und Ethanol hinzugegeben und die gesamte Lösung auf eine QIAmp MinElute Spinsäule übertragen. Nach dem Abzentrifugieren dieser wurden nun nacheinander je 700 µl von dem AW-1-Puffer, AW-2-Puffer und von dem Ethanol aufpipettiert und abzentrifugiert. Nach 5 minütiger Trocknung der Säule durch Zentrifugation wurde die DNA mit 100 µl ATE-Puffer eluiert.

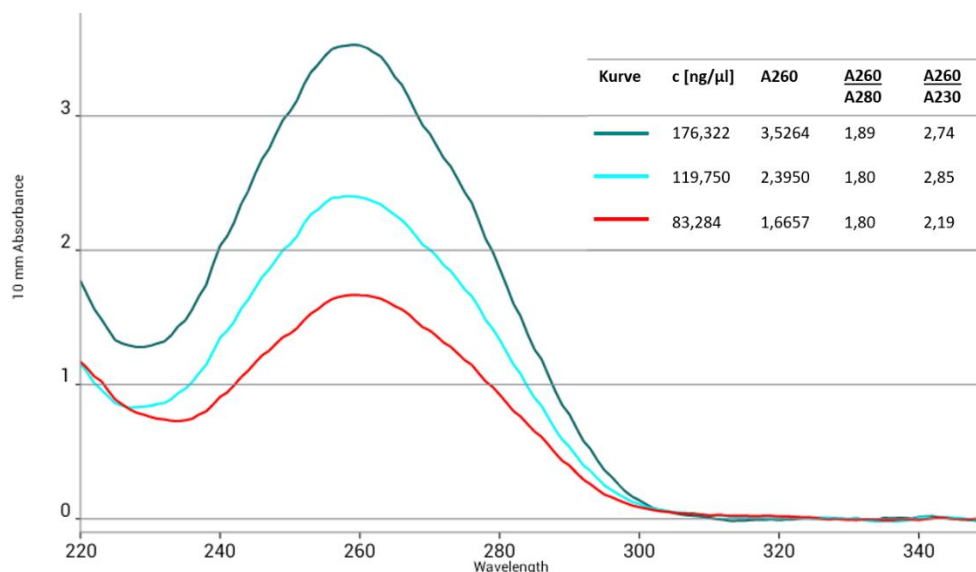
## 2.4 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der eluierten RNA und DNA erfolgte mithilfe des DS-11 FX+ Spectrophotometer/Fluorometer der Firma DeNovix (Wilmington, USA). Dabei wurden 2 µl

des jeweiligen Eluats eingesetzt. Die theoretische Grundlage der photometrischen Konzentrationsbestimmung beruht auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$c = \frac{E}{\varepsilon \cdot d}$$

Dabei steht c für die Konzentration in mol l<sup>-1</sup>, E für die Extinktion (oder Absorption), d für die Schichtdicke der Lösung in cm und ε für den molaren Extinktionskoeffizient in l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Nukleotide absorbieren Licht bei 260 nm. Der gemessene Wert bei dieser Wellenlänge eingesetzt in der oben genannten Gleichung gibt die Konzentration der Probe an. Allerdings macht dieser Wert keine Aussage über die Qualität der Probe. Aus diesem Grund werden zusätzlich die Absorptionswerte bei 230 nm (Absorptionsmaximum von möglichen Kontaminanten wie Zucker, Salze, Phenole oder Detergenzien) und bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) hinzugezogen. Dabei bildet man den Quotienten aus den jeweiligen Werten zu der bei 260 nm gemessenen Absorption. Von einer guten Qualität geht man aus, wenn der Quotient A260/A280 1,8-2,0 beträgt und der Quotient A260/A230 ≥2,0 ist (109). In Abbildung 8 ist der Absorptionsverlauf dreier DNA-Proben dargestellt.



**Abbildung 8: DNA-Konzentrationsbestimmung.** Zu sehen sind die Absorptionskurven dreier DNA-Proben. Daneben ist eine Tabelle mit der Angabe von Konzentration des jeweiligen DNA-Eluats, dessen Absorbanz bei 260 nm und die Quotienten 260/280 und 260/230 zu sehen. Alle drei weisen den typischen Kurvenverlauf einer Nukleinsäure mit einem Höhepunkt bei 260 nm auf. Die Werte des Quotienten 260/280 befinden sich stets zwischen 1,8-2,0. Der Quotient 260/230 ist bei allen Proben >2,0. Man kann bei diesen DNA-Proben also von einer guten Reinheit ausgehen.

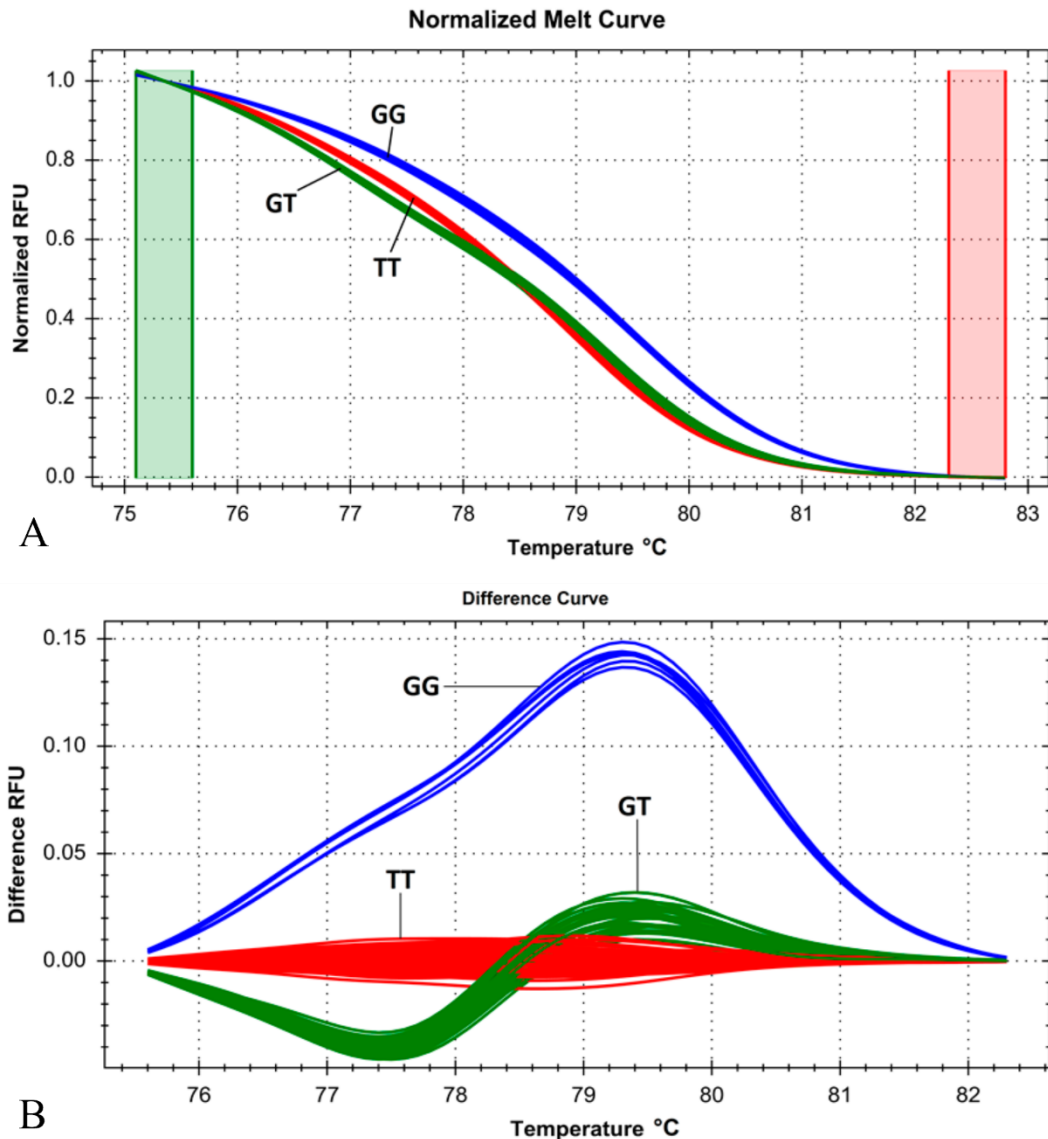
## 2.5 High Resolution Melting (HRM)

Die DNA, die aus den 190 Fällen extrahiert worden ist, wurde als nächstes mittels der HRM-Methode auf das Vorliegen von Mutationen im *KRAS*-Gen, *NRAS*-Gen und *BRAF*-Gen untersucht.

### 2.5.1 Grundlagen der Methodik

Die High Resolution Melting Methode ist eine quantitative Schmelzkurvenanalyse, die spezifisch und sensitiv genug ist, um Veränderungen in der DNA zu identifizieren. Dabei wird die DNA-Probe zunächst mittels PCR amplifiziert und danach von ca. 50°C auf 95°C erhitzt. Das Schmelzen der DNA wird in 0,5°C-Schritten in einer Schmelzkurve aufgezeichnet. Das Schmelzverhalten wird bestimmt durch den unterschiedlichen Gehalt der Basen Cytosin und Guanin, der DNA-Länge und der Basensequenz (110).

Im menschlichen Organismus existieren jeweils zwei Kopien eines Gens, genannt Allele. Normalerweise hat man auf beiden Allelen einen sogenannten Wildtyp (wt) ohne Mutationen, folglich die gleiche Basenabfolge auf beiden Allelen. Hat ein Individuum eine Mutation in einem bestimmten Genabschnitt, verändert sich die Basenabfolge und somit das Verhalten der zugehörigen DNA während des Schmelzvorgangs. Befindet sich die Mutation in einem der beiden Allele, ist das Individuum heterozygot. Besitzt es die gleiche Mutation auf beiden Allelen, ist es homozygot, unterscheidet sich aber vom wt. Dies kann man mithilfe von HRM-Schmelzkurven darstellen. Homozygote Varianten unterscheiden sich lediglich durch ein X-Achsen-Shift (blaue und rote Kurve in Abbildung 9). Heterozygote Varianten dagegen erscheinen als Veränderungen im Schmelzkurvenverlauf (grüne Kurve). Neben der normalisierten Schmelzkurvendarstellung werden HRM-Daten gerne als Differenzkurven dargestellt, um den Unterschied zwischen den Schmelzprofilen desselben Genotyps visuell zu verdeutlichen (111).



**Abbildung 9: Drei Schmelzkurven in ihrem beispielhaften Verlauf (111);** A: Normalisierte Schmelzkurve. Die blaue Kurve stellt den Wildtyp dar (auf beiden Allelen ist die Base Guanin in einem Genabschnitt zu finden: GG). Die rote Kurve, die einen ähnlichen Verlauf hat, jedoch auf der X-Achse verschoben ist, stellt eine homozygote Variante dar (auf beiden Allelen ist die Base Thymin statt Guanin eingebaut: TT). Die grüne Kurve zeigt eine heterozygote Variante des Wildtyps und unterscheidet sich deutlich in ihrem Verlauf (eines der Allele hat die Base Thymin statt Guanin als Baustein: GT). B: Differenzkurve. Hier sind die unterschiedlichen Kurvenverläufe deutlicher zu erkennen. G: Guanin; T: Thymin; RFU: Relative Fluorescence Units

### 2.5.2 Arbeits- und Verbrauchsmaterialien

Die Arbeits- und Verbrauchsmaterialien für die HRM-Methode sind in Tabelle 7 aufgeführt, in Tabelle 8 sind zusätzlich alle benötigten Primer mit Sequenz aufgeführt.

<b>Verbrauchsmaterialien/Geräte</b>	<b>Firma</b>
<i>KRAS</i> PCR-Primer für Kodon 12-13	Biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
<i>KRAS</i> PCR-Primer für Kodon 59-61	
<i>KRAS</i> PCR-Primer für Kodon 117	
<i>KRAS</i> PCR-Primer für Kodon 146	
<i>NRAS</i> PCR-Primer für Kodon 12-13	
<i>NRAS</i> PCR-Primer für Kodon 59-61	
<i>BRAF</i> PCR-Primer für Kodon 600	
Precision Melt Supermix	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
iTaq DNA Polymerase	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Nuclease-free water	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
ErgoOne® E Mehrkanal-Pipette 0,5-10 µl	STARLAB, Hamburg, Deutschland
Multipette® E3x	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Combitips advanced® 1.0 mL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Cetrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Axygen® Micro und PCR-Plattenzentrifuge	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Hard-Shell® PCR Plates, 96-Well Low-Profile, Semi-Skirted	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Optically Clear Heat Seal	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
PX1™ PCR Plate Sealer	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Precision Melt Analysis™ Software	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
CFX Maestro™ Software	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

**Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien für das High Resolution Melting**

Name	Sequenz (5' → 3')
<i>KRAS</i> -12-13-for	TGTA AAAACGACGGCCAGTNNNGCCTGCTGAAAATGACTGAA
<i>KRAS</i> -12-13-rev	CAGGAAACAGCTATGACCTAAGCTGTATCGTCAAGGCACTCT
<i>KRAS</i> -59-61-for	TGTA AAAACGACGGCCAGTCCTGTCTCTTGGATATTCTCG
<i>KRAS</i> -59-61-rev	CAGGAAACAGCTATGACCCCTCATGTACTGGTCCCTCAT
<i>KRAS</i> -117-for	TGTA AAAACGACGGCCAGTAAGGACTCTGAAGATGTACCTATG
<i>KRAS</i> -117-rev	CAGGAAACAGCTATGACCAGCCTGTTTTGTGTCTACTGTTCT
<i>KRAS</i> -146-for	TGTA AAAACGACGGCCAGTTCAGGACTTAGCAAGAAGTTATGG
<i>KRAS</i> -146-rev	CAGGAAACAGCTATGACCTGCAGAAAACAGATCTGTATTTAT
<i>NRAS</i> -12-13-for	TGTA AAAACGACGGCCAGTCTTGCTGGTGTGAAAATGACTGAG
<i>NRAS</i> -12-13-rev	CAGGAAACAGCTATGACCTGGATTGTCAGTGCCTTTTT
<i>NRAS</i> -59-61-for	TGTA AAAACGACGGCCAGTGAAACCTGTTTGTGGACATACTG
<i>NRAS</i> -59-61-rev	CAGGAAACAGCTATGACCTCGCCTGTCCTCATGTATTG
<i>BRAF</i> -Ex15-for	TGTA AAAACGACGGCCAGTTGAAGACCTCACAGTAAAAATAGG
<i>BRAF</i> -Ex15-rev	CAGGAAACAGCTATGACCTCCAGACA ACTGTTCAA ACTGAT

**Tabelle 8: PCR-Primer für HRM-Mutationsanalyse;** for: forward; rev: reverse

### 2.5.3 HRM-Untersuchung der Patienten-DNA

Insgesamt wurde die eluierte Patienten-DNA auf das Vorhandensein von 7 Mutationen untersucht: *KRAS* 12-13, *KRAS* 59-61, *KRAS* 117, *KRAS* 146, *NRAS* 12-13, *NRAS* 59-61 und *BRAF*. Dabei wurde die DNA zunächst auf eine Mutterplatte pipettiert, aus welcher die Proben dann mittels einer Mehrkanalpipette auf Tochterplatten verteilt wurden. Für jede Mutation wurde eine eigene Tochterplatte genutzt. Bei jedem Durchlauf wurden zusätzlich zwei Positivkontrollen (mit der jeweiligen Mutation belastetes menschliches DNA-Eluat), zwei Negativkontrollen (Wildtyp-DNA) und zwei Kontrollen ohne DNA-Matrizen mituntersucht (Non Template Control). Bei der Auswertung der Schmelzkurven wurden die Proben einzeln mit den Positiv- und Negativkontrollkurven verglichen. Alle DNA-Proben, die ein klares positives Ergebnis oder ein unklares Ergebnis aufwiesen, wurden im Anschluss mittels Sequenzierung aufgeschlüsselt.

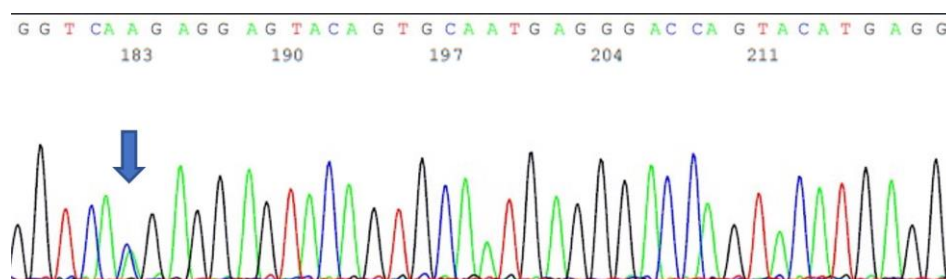
## 2.6 DNA-Sequenzierung

Mithilfe der DNA-Sequenzierung wird die genaue Basenabfolge eines DNA-Abschnittes bestimmt. Für die Sequenzierung der mutierten und unklaren Proben kam in dieser Arbeit hauptsächlich die Sangersequenzierung zum Einsatz. Für 12 *KRAS* 12-13 sowie 3 *BRAF* Fälle wurde aufgrund nicht zufriedenstellender Ergebnisse aus der Sangersequenzierung zusätzlich dazu die Pyrosequenzierung durchgeführt.

## 2.6.1 Sanger-Sequenzierung

### 2.6.1.1 Grundlagen der Methodik

Die Sanger-Sequenzierung, auch als Kettenabbruchmethode bekannt, startet mit der Anlagerung eines Primers an einen DNA-Abschnitt mit bereits bekannter Sequenz. Von diesem markierten Primer ausgehend, katalysiert eine DNA-Polymerase die Replikation mit Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs). Zusätzlich befinden sich in der Lösung in geringer Konzentration Nukleotide, die als Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) vorliegen. Diesen fehlt der 3'-OH-Anteil. Da allerdings eine Kettenverlängerung nur am 3'-OH-Ende eines Nukleotids erfolgen kann, kommt die Synthese an der Einbaustelle eines solchen ddNTP zum Stillstand (Kettenabbruch). Durch das Zufallsprinzip werden die fluoreszenzmarkierten ddNTPs an verschiedenen Stellen der replizierten DNA-Stränge eingebaut, es entstehen so unterschiedlich lange Syntheseprodukte (112). Das Sequenzierungsgerät kann nun mit Kapillarelektrophorese und einem Laser die genaue Sequenz des DNA-Abschnittes ablesen und in einem Chromatogramm darstellen (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Ausschnitt aus einem Chromatogramm.** Das hier replizierte Gen ist *KRAS* 59-61. An der Überlappung eines blauen und eines grünen Peaks auf der Position 183 A>C (Pfeil) kann man die Mutation erkennen.

### 2.6.1.2 Arbeits- und Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien/Geräte	Firma
<i>KRAS</i> PCR-Primer für Kodon 12-13	Biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
<i>KRAS</i> PCR-Primer für Kodon 59-61	
<i>KRAS</i> PCR-Primer für Kodon 146	
<i>NRAS</i> PCR-Primer für Kodon 12-13	
<i>BRAF</i> PCR-Primer für Kodon 600	
M13 Sequenzierungsprimer	Biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
iProof High Fidelity MasterMix	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
iProof High-Fidelity DNA Polymerase	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

DMSO 100%	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Agarose, 2,5 g gelöst in 100 ml TAE-Puffer	Sigma-Aldrich, Life Science, St. Louis, Missouri, USA
GelGreen® Nucleic Acid Stain, 10,000X in Water	Biotium, Fremont, Kalifornien, USA
Tris-Acetate-EDTA-Puffer, 50x Solution	Fischer BioReagents, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ready-to-use 100 BP DNA Ladder	Biotium, Fremont, Kalifornien, USA
6x DNA Loading Buffer (blue)	Biotium, Fremont, Kalifornien, USA
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing RR-100	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
BigDye® Terminator v1.1, v3.1 5xSequencing Buffer	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Nuclease-free water	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
QIAquick® PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
DyeEx® 2.0 SpinKit (250)	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Safe Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Hard-Shell® PCR Plates, 96-Well Low-Profile, Semi-Skirted	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
FrameStar® 96 Well Semi-Skirted PCR Plate ABI® Style	4titude Ltd, Wotton, UK
Optically Clear Heat Seal	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Spezial-Silikon-Septa-96er-Matte, schwarz	nerbe plus GmbH, Winsen, Deutschland
Kern FCB 6K0,02B Tisch-Waage	KERN & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Sub-Cell® GT Cell	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
PowerPac™ 300, Electrophoresis Power Supply	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
FV-2400 Mikro-Spin, Minizentrifuge/-Vortex	Biosan, Medical-Biological Research & Technologies, Riga, Lettland
Heraeus Biofuge Pico	DJB Labcare, Newport Pagnell, UK
Axygen® Micro und PCR-Plattenzentrifuge	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
PX1™ PCR Plate Sealer	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
T100™ Thermal Cycler	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
ChemiDoc™ MP Imaging System	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Foster City, Kalifornien, USA

**Tabelle 9: Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Sanger-Sequenzierung**

Name	Sequenz (5' → 3')
<i>KRAS</i> -12-13-for	TGTA AAAACGACGGCCAGTTGTGACATGTTCTAATATAGTCACATT
<i>KRAS</i> -12-13-rev	CAGGAAACAGCTATGACCACCAGTAATATGCATATTTAAAACAAGA
<i>KRAS</i> -59-61-for	TGTA AAAACGACGGCCAGTGACTGTGTTTCTCCCTTCTC
<i>KRAS</i> -59-61-rev	CAGGAAACAGCTATGACCAGCTTATTATATTCAATTTAAACCCAC
<i>KRAS</i> -146-for	TGTA AAAACGACGGCCAGTAAGGACTCTGAAGATGTACCTATG
<i>KRAS</i> -146-rev	CAGGAAACAGCTATGACCAGAAGCAATGCCCTCTCAAG
<i>NRAS</i> -12-13-for	TGTA AAAACGACGGCCAGTTGATTACTGGTTTCCAACAG
<i>NRAS</i> -12-13-rev	CAGGAAACAGCTATGACCTGGTGGGATCATATTCATCT
<i>BRAF</i> -for	CTAAACTCTTCATAATGCTTGCTC
<i>BRAF</i> -rev	TCTAGTAACTCAGCAGCATCTCA
M13 F	TGTA AAAACGACGGCCAGT
M13 R	CAGGAAACAGCTATGACC
Seq- <i>BRAF</i> -for	ACTCTTCATAATGCTTGCTCTG
Seq- <i>BRAF</i> -rev	ATAGCCTCAATTCTTACCATCCAC

**Tabelle 10: Primer für PCR und die Sanger-Sequenzierung;** for: forward; rev: reverse; F: forward; R: reverse

### 2.6.1.3 Polymerasekettenreaktion und Aufreinigung des Produkts

Für die DNA-Mutationsanalyse muss zunächst der gewünschte DNA-Abschnitt amplifiziert werden. Dafür eignet sich die Polymerasekettenreaktion (PCR), die auf drei sich wiederholenden Schritten beruht (112):

1. Denaturierung: Die DNA wird auf etwa 95°C erhitzt. Dabei trennen sich die komplementären DNA-Stränge voneinander.
2. Annealing (Hybridisierung der Primer): Jeder der beiden Primer nähert sich dem spezifischen Bereich des DNA-Stranges an. Die optimale Temperatur für diesen Vorgang hängt von der Basenzusammensetzung und der Länge der Primer ab. Diese liegt in der Praxis bei 56°C.

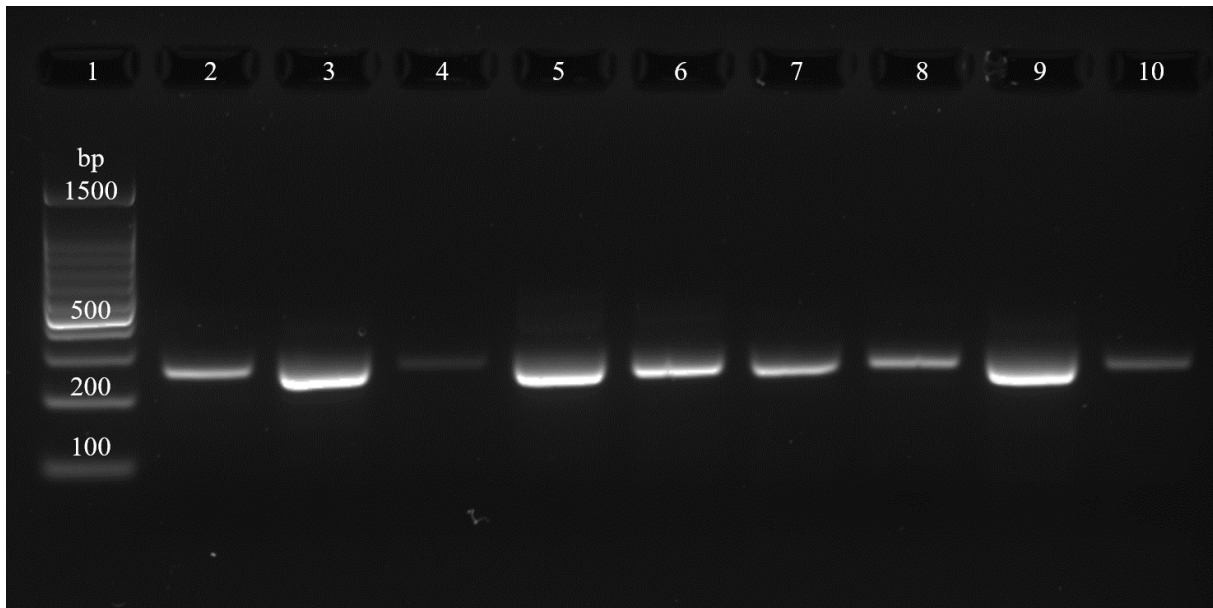
3. Elongation: Mithilfe thermostabiler Polymerase und freier Nukleotide werden die Primer an ihrem freien 3'-OH-Ende verlängert. Dies geschieht bei einer Temperatur von 72°C.

Die 30 µl des Reaktionsvolumens setzten sich in dieser Arbeit aus 15 µl Mastermix und 2 µl Template DNA, je 0,3 µl von den forward bzw. reverse Primern, sowie 1,5 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) und 10,9 µl H<sub>2</sub>O zusammen. Es folgten 35 Amplifikationszyklen mit dem T100™ Thermal Cycler in folgenden Phasen: Denaturierung (10 Sekunden bei 98°C), Annealing (30 Sekunden bei 60°C) und Elongation (30 Sekunden bei 72°C). Mithilfe des QIAquick PCR Purification Kits wurde das PCR-Produkt auf 40 µl Eluat aufgereinigt.

#### *2.6.1.4 Herstellung des Agarose-Gels und Gelelektrophorese*

Die Gelelektrophorese wurde für die Überprüfung des aufgereinigten PCR-Produkts eingesetzt. Diese Methode beruht auf der Wanderung von geladenen Teilchen im elektrischen Feld in einer Matrix aus Agarosepolymeren. Die Laufstrecke der DNA-Fragmente ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Länge (112).

Mittels Agarose, welche zunächst aufgeköcht und anschließend auf 40°C abgekühlt wurde, TAE Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA (Ethylendiamintetraacetat)) und 1,5 µl GelGreen Nukleinsäure Farbstoff wurde ein 2,5%iges Agarosegel hergestellt. In das erste Slot des Gels wurden 5 µl Standard DNA-Leiter bis 100 Basenpaaren (bp) pipettiert. Die restlichen Slots wurden mit einem Gemisch aus 5 µl PCR-Produkt und 3 µl Gelladepuffer beladen. Letzteres erhöht die Dichte der Probe und färbt sie ein. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 110 V für 40 Minuten. Anschließend wurde das Gel mittels ChemiDoc™ MP Imaging System sichtbar gemacht und digital erfasst. In Abbildung 11 ist beispielhaft die Gelelektrophorese von neun *KRAS* 59-61 PCR-Produkten dargestellt.



**Abbildung 11: Gelelektrophorese der *KRAS* 59-61 PCR-Produkte.** Im ersten Slot befindet sich Standard-DNA-Leiter bis 100 bp, in den Slots 2 bis 10 die amplifizierten DNA-Fragmente mit der erwarteten Länge von 246 bp. bp: Basenpaare

#### 2.6.1.5 Sanger-Sequenzierungsreaktion und Aufreinigung des Produkts

Für die Sequenzierungsreaktion wurde eine Lösung mit 20  $\mu$ l Gesamtvolumen vorbereitet. Darin enthalten waren 2  $\mu$ l vom aufgereinigten PCR Produkt als Template (DNA-Template), 2  $\mu$ l von dem M13 F oder R Primer (je 3,2  $\mu$ M), und je nach Länge des DNA-Abschnittes eine Mischung aus Premix (BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing), Sequenzierungspuffer (BigDye Terminator v1.1, v3.1 5x Sequencing Buffer) und H<sub>2</sub>O. Das Sequenzierprogramm erfolgte nach folgenden Angaben: Denaturierung bei 96°C für 15 Sekunden, Annealing bei 50°C für 30 Sekunden und Elongation bei 60°C für 4 Minuten. Dieser Zyklus wurde 25 Mal wiederholt. Das Produkt wurde anschließend nach Angaben des DyeEx 2.0 SpinKits aufgereinigt.

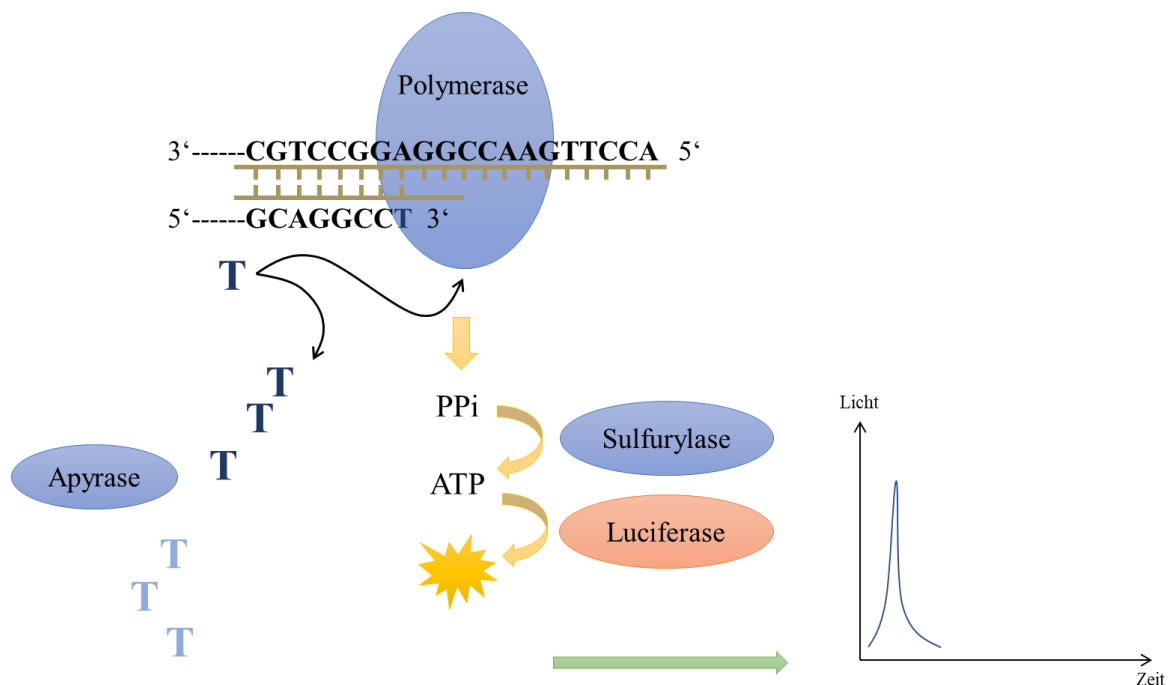
#### 2.6.1.6 Sequenzierung mittels Genetic Analyzer

Für den Sequencer wurden in die Wells einer speziellen Platte je 20  $\mu$ l Formamide und 5  $\mu$ l des aufgereinigten Sequenzierungsprodukts pipettiert. Die Platte wurde mit einer Silikonmatte verschlossen und in den ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer zur Sequenzierung gegeben.

## 2.6.2 Pyrosequenzierung

### 2.6.2.1 Grundlagen der Methodik

Bei der Pyrosequenzierung erfolgt die Neusynthese eines komplementären DNA-Stranges wie bei der Sanger-Sequenzierung mithilfe einer DNA-Polymerase. Dabei wird das 5'-Ende mit spezifischem Primer, an den Biotin gekoppelt wurde, ligiert. Über die Streptavidin-markierten „magnetic beads“ wird der DNA-Strang durch die hohe Affinität zu Biotin festgehalten. Nach dem Binden des Primers beginnt nun der Einbau der einzelnen Nukleotide durch eine Polymerase. Dabei werden die Nukleotide der Reihe nach zugegeben. Ausschließlich durch die Verbindung eines Nukleotides mit dem Template werden Pyrophosphate (PPi) freigesetzt. Das Pyrophosphat wiederum wird von dem Enzym ATP-Sulfurylase in ATP umgewandelt, welches anschließend zur Spaltung von Luciferin zu Oxyluciferin durch das Enzym Luciferase genutzt wird. Die letzte Reaktion produziert eine Lichtemission, welche schließlich als ein Lumineszenzsignal detektiert und als Pyrogramm dargestellt wird (Abbildung 12). Somit wird der Einbau jeder einzelnen Base in Echtzeit aufgezeichnet, bei Homozygotie entsteht entsprechend ein stärkeres, bei Heterozygotie ein in der Fluoreszenzintensität reduzierteres Signal. Somit gelingt die genaue Identifizierung von Mutationen (113).



**Abbildung 12: Schematische Darstellung der Pyrosequenzierungskaskade (114).** Der Einbau des Nukleotids setzt Pyrophosphat (PPi) frei, dieses wird von Sulfurylase zur Synthese von ATP genutzt, welches wiederum von dem Enzym Luciferase unter Emission von Fluoreszenz verbraucht wird. Es entsteht ein Fluoreszenzsignal, welches im Pyrogramm erkennbar wird.

### 2.6.2.2 Arbeits- und Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterialien/Geräte</b>	<b>Firma</b>
<i>KRAS</i> PCR-Primer für Kodon 12-13, for, rev- Biotin und Pseq	Metabion International AG, Planegg, Deutschland
<i>BRAF</i> PCR-Primer für Kodon 600, for, rev- Biotin und Pseq	
BSA (bovine serum albumin)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
High Resolution Melting Master Mix	Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, Schweiz
Taq DNA Polymerase	Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, Schweiz
PyroMark® Annealing Buffer	QIAGEN, Hilden, Deutschland
PyroMark® Binding Buffer	QIAGEN, Hilden, Deutschland
PyroMark® Wash Buffer, concentrate	QIAGEN, Hilden, Deutschland
PyroMark® Denaturation Solution	QIAGEN, Hilden, Deutschland
PyroMark® Gold Q24 Reagenzien	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Streptavidin Sepharose High Performance	Cytiva, Marlborough, Massachusetts, USA
Nuclease-free water	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Sartorius Tacta Pipetten 10-1000 µl	Sartorius AG, Göttingen, Germany
SafeSeal SurPhob Spitzen 10-1250 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Safe Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
AZENTA cap met 24-well	AZENTA Life Sciences, Burlington, Massachusetts, USA
ATENTA PCR Seal, clear adhesive film	AZENTA Life Sciences, Burlington, Massachusetts, USA
PyroMark® Q24 Plate	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Eppendorf Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
IKA C-MAG HP4	IKA Werke GmbH, Staufen im Breisgau, Deutschland
LightCycler® 480	Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, Schweiz
PyroMark® Q24 MDx Vakuum- Arbeitsstation	QIAGEN, Hilden, Deutschland
PyroMark® Q24 MDx	QIAGEN, Hilden, Deutschland
PyroMark® Q24 MDx Software	QIAGEN, Hilden, Deutschland

**Tabelle 11: Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Pyrosequenzierung;** for: forward; rev: reverse; Pseq: Pyrosequenzierung

Name	Sequenz (5' → 3')
<i>KRAS</i> -12-13-for	TGTAACACGACGGCCAGTNNNGGCCTGCTGAAAATGACTGAA
<i>KRAS</i> -12-13-rev-Biotin	CAGGAAACAGCTATGACCTAAGCTGTATCGTCAAGGCACTCT
<i>BRAF</i> -Ex15-for	TGTAACACGACGGCCAGTTGAAGACCTCACAGTAAAAATAGG
<i>BRAF</i> -Ex15-rev-Biotin	CAGGAAACAGCTATGACCTCCAGACAACACTGTTCAAACACTGAT
<i>KRAS</i> -12-13-Pseq	TGTGGTAGTTGGAGCT
<i>BRAF</i> -Ex15-Pseq	GTAAAAATAGGTGATTTTGG

**Tabelle 12: Primer für PCR und die Pyrosequenzierung;** for: forward; rev: reverse; Pseq: Pyrosequenzierung

#### 2.6.2.3 Polymerasereaktion und HRM

Für die Pyrosequenzierung wurden für die nötige Bindung an Streptavidin-Sepharose-Beads biotinylierte PCR-Primer benötigt. Für diese eigens für die Pyrosequenzierung durchgeführte PCR mit anschließender HRM-Analyse zum Nachweis von Sequenzvarianten wurden je 1 µl Primermix, 25 µl HRM Master Reagenz, 1,5 µl BSA (bovine serum albumin), 5 µl MgCl<sub>2</sub> und 7,5 µl H<sub>2</sub>O gemischt. Die entstandenen 40 µl des Reagenzvolumens wurden zusammen mit je 10 µl der Template DNA mit dem LightCycler® 480 in folgenden Schritten amplifiziert. Für die *KRAS 12-13* Fälle erfolgte in den insgesamt 45 Amplifikationszyklen die Denaturierung (20 Sekunden bei 95°C), Annealing (20 Sekunden bei 61°C) und Elongation (40 Sekunden bei 72°C). Die *BRAF* Fälle wurden in 50 Zyklen amplifiziert. Die Denaturierungsphase dauerte hier 20 Sekunden bei 95°C, das Annealing 30 Sekunden bei 60°C und die Elongation 40 Sekunden bei 72°C. Anschließend wurde für die Proben beider Mutationen die HRM-Analyse durchgeführt.

#### 2.6.2.4 Pyrosequenzierung mittels LightCycler

Für die Pyrosequenzierung ist die Immobilisierung des PCR-Produktes auf den Streptavidin-Sepharose-Beads notwendig. Hierfür wurde ein Master-Mix aus insgesamt 1 µl Streptavidin-Sepharose High Performance, 40 µl PyroMark Bindungspuffer und 29 µl H<sub>2</sub>O hergestellt. Von

den insgesamt entstandenen 70 µl wurden je Probe 65 µl des Master-Mixes zusammen mit 15 µl des PCR-Produktes aus der vorangegangenen PCR und HRM auf eine 24-Well-PCR-Platte gegeben. Diese wurde im nächsten Schritt nach vorheriger Versiegelung 5-10 Minuten lang bei 14000 Umdrehungen pro Minute geschüttelt.

Im nächsten Schritt wurde die PyroMark Q24 Vakuum-Arbeitsstation mit den vom Hersteller vorgegebenen Reagenzien befüllt, darunter 70% EtOH, Denaturierungslösung, PyroMark Waschpuffer und nukleasefreiem Wasser. Auf die nun benötigte PyroMark Q24-Platte wurden pro Well 25 µl PyroMark Annealing Buffer und 0,3 µM des Sequenzierungsprimers gegeben. Das folgende Separieren der DNA-Stränge und das Übertragen dieser auf die PyroMark Q24-Platte erfolgte ebenfalls nach den vom Hersteller vorgegebenen Schritten:

1. Der Saugkopf mit den Filternadeln wird durch das Einschalten unter Vakuum gesetzt und mit Wasser gespült.
2. Für ca. 15 Sekunden wird der Saugkopf in die PCR-Platte gesenkt - die Sepharose-Beads mit der immobilisierten DNA werden aufgenommen.
3. Nun erfolgt die Spülung für 5 Sekunden in 70% EtOH, 5 Sekunden in der Denaturierungslösung und 10 Sekunden im Waschpuffer.
4. Der Saugkopf wird in eine 90° senkrechte Position gebracht und anschließend in die PyroMark Q24-Platte gehalten. Für das Übertreten der Beads auf die Platte wird die Vakuumpumpe ausgeschaltet.
5. Der Saugkopf wird im letzten Schritt gereinigt. Hierfür wird er für 10 Sekunden ohne Vakuum im Wasser und danach unter Vakuum in einer weiteren Station mit Wasser gespült.

Die nun mit den Beads befüllte Platte wurde für 2 Minuten auf 80°C für 2 Minuten vorgeheizt und anschließend 14 Minuten lang bei Raumtemperatur wieder abgekühlt.

Für die Inbetriebnahme des PyroMark Q24 wird die entsprechende Software benötigt. Eine neue Datei, passend zu dem geplanten Lauf, sowie der Kartusche wird am Computer erstellt und auf einen USB-Stick übertragen. Die erforderlichen Volumina der Nukleotide zur Befüllung der Kartusche werden vom Programm vorgegeben. Es erfolgt nun die Übertragung der Datei auf das Gerät sowie die Befüllung der Kartusche. Darauffolgend wird der ausgewählte Lauf gestartet. Nach Ablauf der Pyrosequenzierung wird die Information mithilfe des USB-Sticks erneut auf den Computer übertragen und analysiert.

## 2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Statistical Package for Social Science (SPSS, Version: 28.0.0.0, Armonk, NY, USA).

Zur Auswertung der Überlebensdaten wurde der Log-Rank Test im Rahmen der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse verwendet. Für die multivariate Analyse der Risikoverhältnisse wurde die Cox-Regression angewendet. Unterschiede wurden als signifikant gewertet, wenn  $p < 0,05$  erreicht wurde. Bei  $p$ -Werten  $< 0,01$  sprach man von hoher und bei Werten  $< 0,001$  von höchster Signifikanz.

Zur Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen zwei nominalskalierten Variablen wurde der Korrelationskoeffizient Cramer's  $V$  verwendet. Dieser basiert auf Chi-Quadrat, zeichnet sich aber durch eine Normierung aus. Bei einem Wert von 0 besteht kein Zusammenhang, bei einem Wert von 1 besteht ein perfekter Zusammenhang zwischen zwei Variablen (115).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Auswertung der Patientendaten

Für die Studie wurden insgesamt 190 Patientinnen und Patienten ausgewählt, deren Tumorproben von 1996 bis 2018 am Institut für Pathologie der Universität Regensburg untersucht wurden.

##### 3.1.1 Geschlechts- und Altersverteilung

Unter den 190 Patientenproben befanden sich 106 Männer und 84 Frauen. Das Alter bezieht sich auf den Zeitpunkt der Resektion und somit auf den Eingang der Probe im Institut für Pathologie. Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Operation lag bei 63,81 Jahren. Die jüngste Person war 27, die älteste 88 Jahre alt. In Abbildung 13 sieht man die Verteilung aller Patienten auf die verschiedenen Altersgruppen bezogen auf das jeweilige Geschlecht.

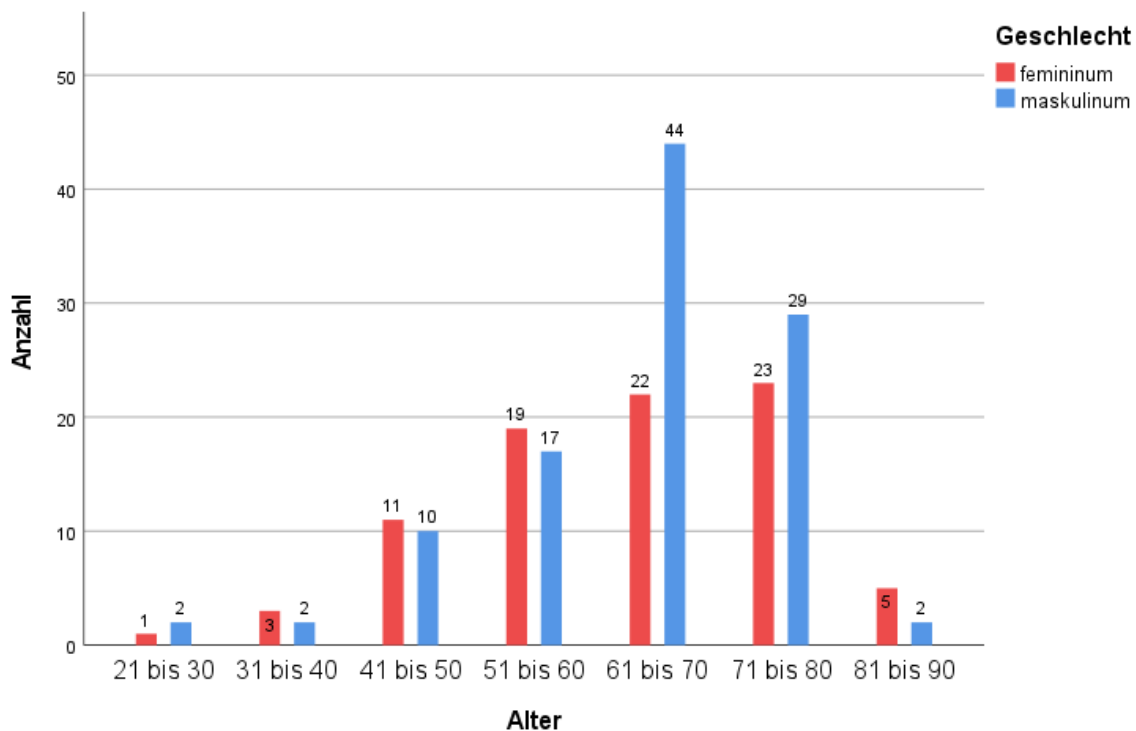
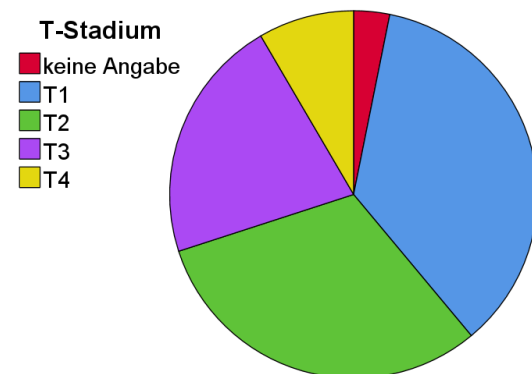


Abbildung 13: Alters- und Geschlechtsverteilung zum Zeitpunkt der Resektion

### 3.1.2 Tumorstadium und Differenzierungsgrad

Das Tumorstadium ist Teil der TNM-Einteilung und wird bestimmt durch die Ausdehnung und das Wachstum des Tumors. Von den 190 Proben waren 6 ohne Angabe und konnten retrospektiv bei fehlenden Angaben im Pathologiebericht auch nicht mehr zugeordnet werden. In Tabelle 13 und Abbildung 14 ist die Verteilung der auswertbaren 184 Proben dargestellt. Der Großteil der Tumorstadien befindet sich im unteren Bereich von pT1 und pT2 (zur Einteilung der Tumorstadien siehe 1.1.3.3).

		Anzahl	Prozent
<b>Gültig</b>	pT1	68	35,8
	pT2	59	31,0
	pT3	41	21,6
	pT4	16	8,4
<b>Keine Angabe</b>		6	3,2
<b>Gesamt</b>		190	100,0

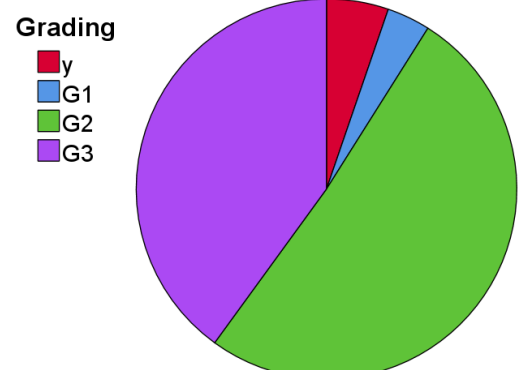


**Tabelle 13: Verteilung des Tumorstadiums auf die untersuchten Proben**

**Abbildung 14: Verteilung des Tumorstadiums auf die untersuchten Proben**

Der Differenzierungsgrad oder das Grading beschreibt die mikroskopische Morphologie des Tumorgewebes und gibt somit an, inwieweit sie vom gesunden Gewebe abweicht (zur Definition und Einteilung siehe 1.1.3.3). Tumoren von Patienten, die bereits eine neoadjuvante Therapie erhalten hatten, werden nicht mehr graduiert. Die Verteilung aller untersuchten Proben auf die drei Gradingstufen ist in Tabelle 14 und Abbildung 15 dargestellt.

		Anzahl	Prozent
<b>Gültig</b>	G1	7	3,7
	G2	97	51,0
	G3	76	40,0
<b>y</b>		10	5,3
<b>Gesamt</b>		190	100,0



**Tabelle 14: Verteilung des Differenzierungsgrades auf die untersuchten Proben; y: neoadjuvante Therapie**

**Abbildung 15: Verteilung des Differenzierungsgrades auf die untersuchten Proben; y: neoadjuvante Therapie**

### 3.1.3 Leberstatus

Während der mikroskopischen Beurteilung der Gewebeproben wurde auch das umgebende Lebergewebe analysiert. Mithilfe von Sonderfärbungen wurde das Lebergewebe auf mögliche Hinweise für eine Eisenüberladung oder einen Alpha-1-Antitrypsin-Mangel untersucht. In der HE-Färbung wurden alle Nebenfunde wie Präneoplasien oder Gallenstau in den Gallengängen beschrieben. Sofern ausreichend Lebergewebe vorhanden war, wurde die Leber ebenfalls auf den Fibrose- oder Verfettungsgrad beurteilt. In Tabelle 15 sind diese Nebenfunde der tumorfreien Leber aufgeführt.

<b>Pathologie</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Prozent</b>
Cholestase	16	8,4
Cholangitis	5	2,6
Eisenüberladung	20	10,5
Von-Meyenburg-Komplex	10	5,3
BilIN	9	4,7
IPNB	1	0,5

**Tabelle 15: Übersicht über die nebenbefundlichen Pathologien einschließlich ihres prozentualen Anteils;** BilIN: biliary intraepithelial neoplasm; IPNB: intraepithelial papillary neoplasm of the bile duct

Der Fibrosegrad wurde mit dem Ishak-Score (Tabelle 4) bewertet. Acht Resektate zeigten kein ausreichendes tumorfreies Lebergewebe, sodass hier keine Aussage bezüglich des Vorliegens einer Fibrose getroffen werden konnte. Tabelle 16 und Abbildung 16 zeigen die Verteilung der verschiedenen Fibrosierungsgrade der ausgewerteten Fälle. Insgesamt lässt sich festhalten, dass im vorliegenden Kollektiv knapp die Hälfte der iCCA (48,9%) keine Leberfibrose hat. Die Mehrheit der verbliebenen Fälle zeigt nur eine leichte Fibrose, während lediglich 7 Fälle (3,7%) eine komplette Leberzirrhose aufwiesen.

	Fibrosegrad	Anzahl	Prozent
<b>Gültig</b>	0	93	48,9
	1	39	20,5
	2	21	11,1
	3	14	7,4
	4	8	4,2
	5	3	1,6
	6	7	3,7
<b>Keine Angabe</b>		5	2,6
<b>Gesamt</b>		190	100,0

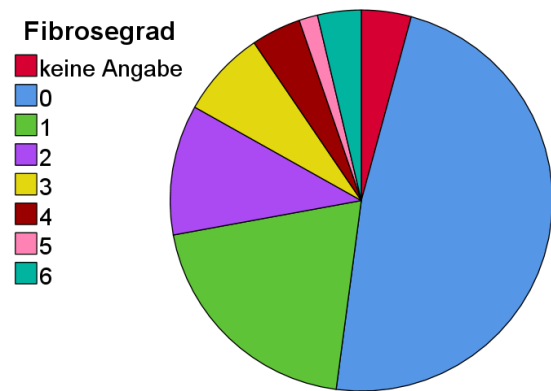


Abbildung 16: Verteilung der Fibrosegrade auf die untersuchten Proben

Tabelle 16: Verteilung der Fibrosegrade auf die untersuchten Proben

Steatosis hepatis beschreibt die Verfettung der Leberzellen ohne begleitende Hepatitis, die je nach Fettanteil in drei Grade eingeteilt wird (116).

<30% = milde Steatosis (< 5% wird als normal beurteilt)

30-60% = moderate Steatosis

>60% = schwere Steatosis

In Tabelle 17 und Abbildung 17 kann man die Verteilung der Verfettungsgrade auf die 190 Proben sehen. Die Mehrheit der Proben zeigt ein unauffälliges Lebergewebe in Bezug auf die Verfettung (142 Fälle, 74,8%). Eine schwere Steatose fand sich nur bei 3 Patienten (1,6%).

		Anzahl	Prozent
<b>Gültig</b>	Keine	142	74,8
	Milde Steatosis	32	16,8
	Moderate Steatosis	13	6,8
	Schwere Steatosis	3	1,6
<b>Gesamt</b>		190	100,0

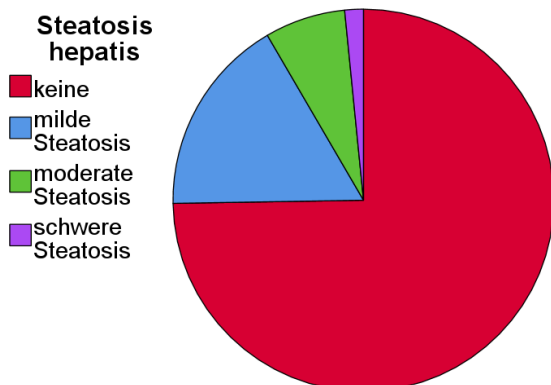


Abbildung 17: Verteilung der Verfettungsgrade auf die untersuchten Proben

Tabelle 17: Verteilung der Verfettungsgrade auf die untersuchten Proben

### 3.1.4 Vorerkrankungen

Eine systematische Auswertung bezüglich Begleiterkrankungen wurde retrospektiv durchgeführt. Aus den Angaben der Patienten zu ihrer Größe und ihrem Gewicht wurde der Body-Mass-Index (BMI) errechnet. Der Durchschnitts-BMI lag bei 27,09 kg/m<sup>2</sup> und somit bereits im übergewichtigen Bereich. Der niedrigste Wert lag bei 12,74 kg/m<sup>2</sup>, der höchste Wert bei 46,07 kg/m<sup>2</sup>. Ab einem BMI von  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> wurde die Variable Adipositas hinzugefügt und berücksichtigt, welche in 28,42% der Fälle bestand. Die arterielle Hypertonie fand sich bei 106 Patienten (55,79%). Diabetes mellitus Typ 2 war bei 45 Patienten (23,68%) vorbekannt. In Tabelle 18 sind die Vorerkrankungen aufgelistet.

<b>Erkrankung</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Prozent</b>
Adipositas	54	28,42
Arterielle Hypertonie	106	55,79
Diabetes mellitus Typ 2	45	23,68
PSC	6	3,16
SSC	2	1,05
Morbus Crohn	1	0,53
Colitis ulcerosa	1	0,53
Hepatitis B	1	0,53

**Tabelle 18: Anzahl der begleitenden Erkrankungen und ihr prozentualer Anteil bezogen auf die 190 Patienten**

### 3.1.5 Risikoverhältnisse

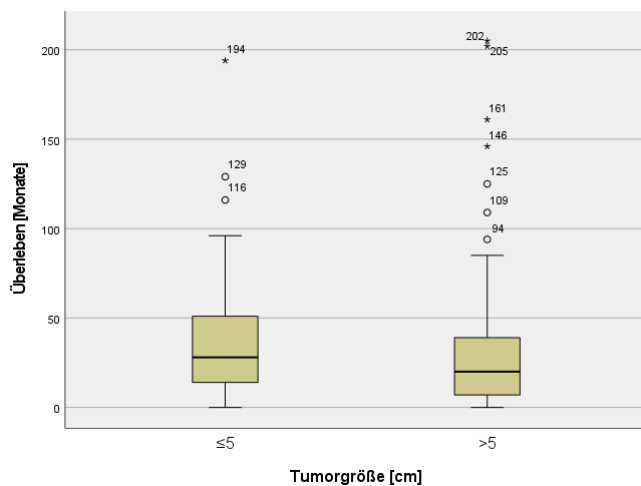
Eine multivariate Analyse verschiedener Faktoren in Bezug auf die Überlebenszeit der 190 Patienten wurde mit Cox-Regression durchgeführt. Folgende Variablen wurden dabei einbezogen: Patientenalter, das männliche Geschlecht, Tumorgröße, Vorerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2, arterielle Hypertonie und Adipositas, Mutationsstatus und PD-L1-Status (TC und IC). Die übrigen Faktoren wie PSC, SSC, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und Hepatitis B wurden in der Analyse aufgrund von zu niedrigen Zahlen nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 dargestellt. Die Cox-Regression ergab folgende Faktoren als signifikante Parameter für die Überlebenswahrscheinlichkeit: Tumorgröße (HR 1,065), Diabetes mellitus (HR 2,363), Mutationsstatus (HR 1,953) und TC  $\geq 1\%$  (HR 2,774).

	<b>HR</b>	<b>95% Konfidenzintervalle</b>	<b>Signifikanz</b>
Patientenalter	0,996	0,975-1,018	0,748
Männliches Geschlecht	1,218	0,769-1,930	0,400
Tumorgröße	<b>1,065*</b>	1,005-1,130	<b>0,034*</b>
Diabetes mellitus Typ 2	<b>2,363*</b>	1,435-3,894	<b>&lt;0,001*</b>
Arterielle Hypertonie	0,921	0,566-1,498	0,740
Adipositas	0,921	0,556-1,527	0,750
Mutationsstatus	<b>1,953*</b>	1,064-3,585	<b>0,031*</b>
TC $\geq$ 1%	<b>2,774*</b>	1,215-6,333	<b>0,015*</b>
IC $\geq$ 1%	0,823	0,508-1,332	0,427

**Tabelle 19: Cox-Regression ausgewählter Variablen mit der Überlebenszeit als Zielvariable; HR: Hazard Ratio; signifikante Ergebnisse sind mit \* gekennzeichnet**

### 3.1.5.1 Tumorgröße und Überlebenszeit

Standardmäßig wird jede Tumorprobe im pathologischen Institut sowohl mikroskopisch als auch makroskopisch beschrieben. Dazu gehört auch die Angabe der größten Tumorausdehnung. Von den 190 Fällen gab es zu 32 keine Angabe der Tumorgröße. Die übrigen 158 Fälle wurden auf den Zusammenhang mit der Überlebenszeit untersucht. In Abbildung 18 ist die Verteilung der Tumorgrößen  $\leq$ 5 cm und  $>$ 5 cm auf die Überlebenszeit der jeweiligen Patienten visuell dargestellt. Tabelle 20 kann man die dazugehörigen Median- und Mittelwerte der Überlebenszeit entnehmen. Es zeigt sich in der Gruppe mit der Tumorgröße  $>$ 5 cm ein im Median um 8 Monate kürzeres Überleben als in der Gruppe mit der Tumorgröße  $\leq$ 5 cm.



	TumorgroÙe	
	≤5 cm	>5 cm
Anzahl	48	110
Mittelwert	39,21	30,98
Median	28	20

**Tabelle 20: Mittelwert und Median der Überlebenszeit in Monaten für TumorgroÙe ≤5 cm und >5 cm**

**Abbildung 18: Verteilung der beiden TumorgroÙen ≤5 cm und >5 cm auf die Überlebenszeit der 190 Patienten**

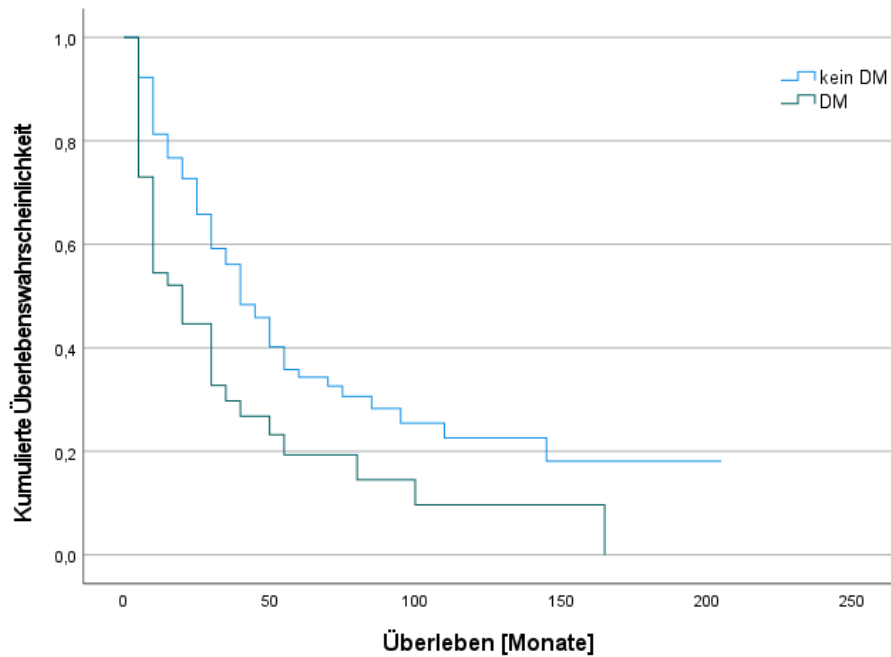
### 3.1.5.2 Diabetes mellitus und Überlebenszeit

Auch Diabetes mellitus Typ 2 als Begleiterkrankung scheint eine negative Auswirkung auf die Überlebenszeit der iCCA-Patienten zu haben. In unserer Stichprobe befanden sich unter den 190 Patienten 45 Personen, die zusätzlich an DM Typ 2 litten. Von diesen 45 Personen sind im beobachteten Zeitraum 35 verstorben. Im Gegensatz dazu sind von den übrigen 145 Personen ohne Diabetes mellitus lediglich 78 Todesfälle zu verzeichnen.

In Tabelle 21 sind die Mittel- und die Medianwerte der Überlebensanalyse der beiden Patientengruppen zusammengefasst, in Abbildung 19 kann man die dazugehörige Kaplan-Meier-Kurve sehen. Der durchgeführte Log-Rank Test ergab eine Signifikanz von <0,001. Insgesamt lässt sich sagen, dass die Patienten mit Diabetes im Median eine um 22 Monate kürzere Überlebenszeit hatten als die Patienten ohne Diabetes.

	Mittelwert			Median		
	Wert	Standardfehler	95% KI	Wert	Standardfehler	95% KI
<b>Kein DM</b>	70,641	8,396	54,185-87,098	39,000	4,821	29,551-48,449
<b>DM</b>	36,288	8,496	19,636-52,940	17,000	8,547	0,248-33,752
<b>Gesamt</b>	61,365	6,644	48,343-74,388	35,000	4,084	26,995-43,005

**Tabelle 21: Überlebensanalyse in Monaten der Patienten mit und ohne Diabetes mellitus Typ 2; DM: Diabetes mellitus**

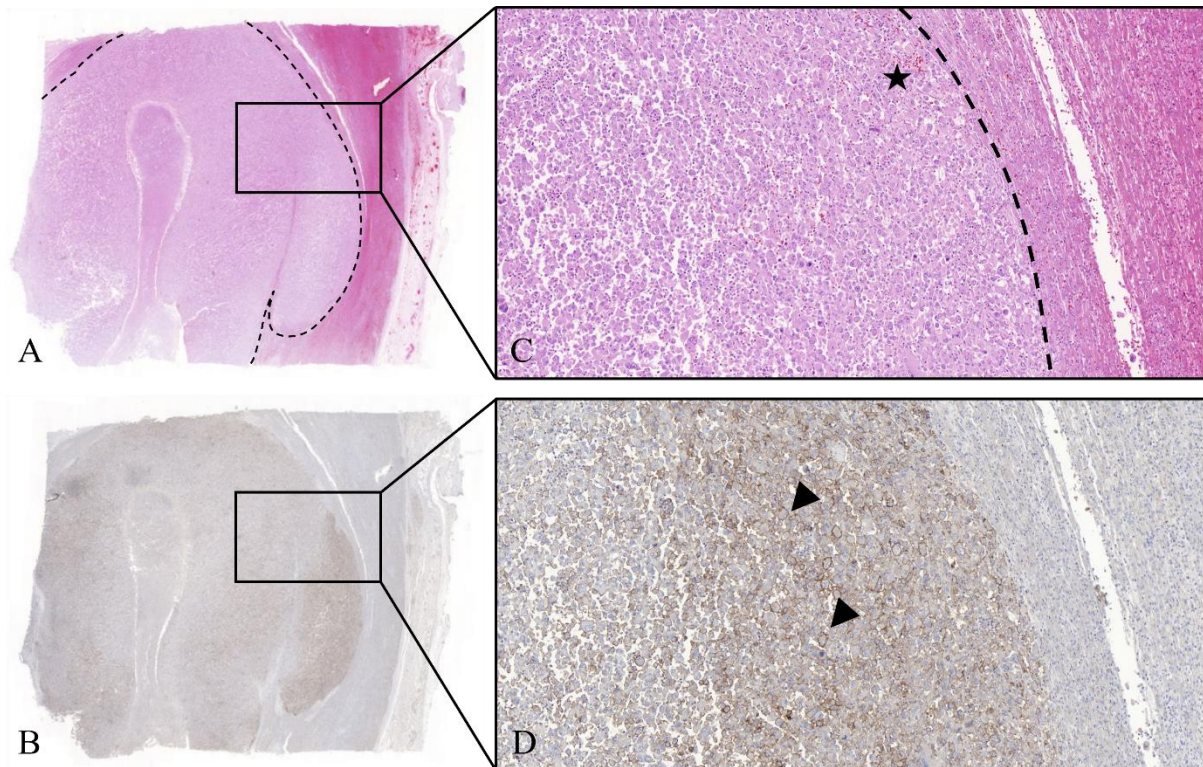


**Abbildung 19: Kaplan-Meier-Kurven für die beiden Patientengruppen mit und ohne Diabetes mellitus Typ 2; DM: Diabetes mellitus**

## 3.2 Auswertung der PD-L1 Färbung

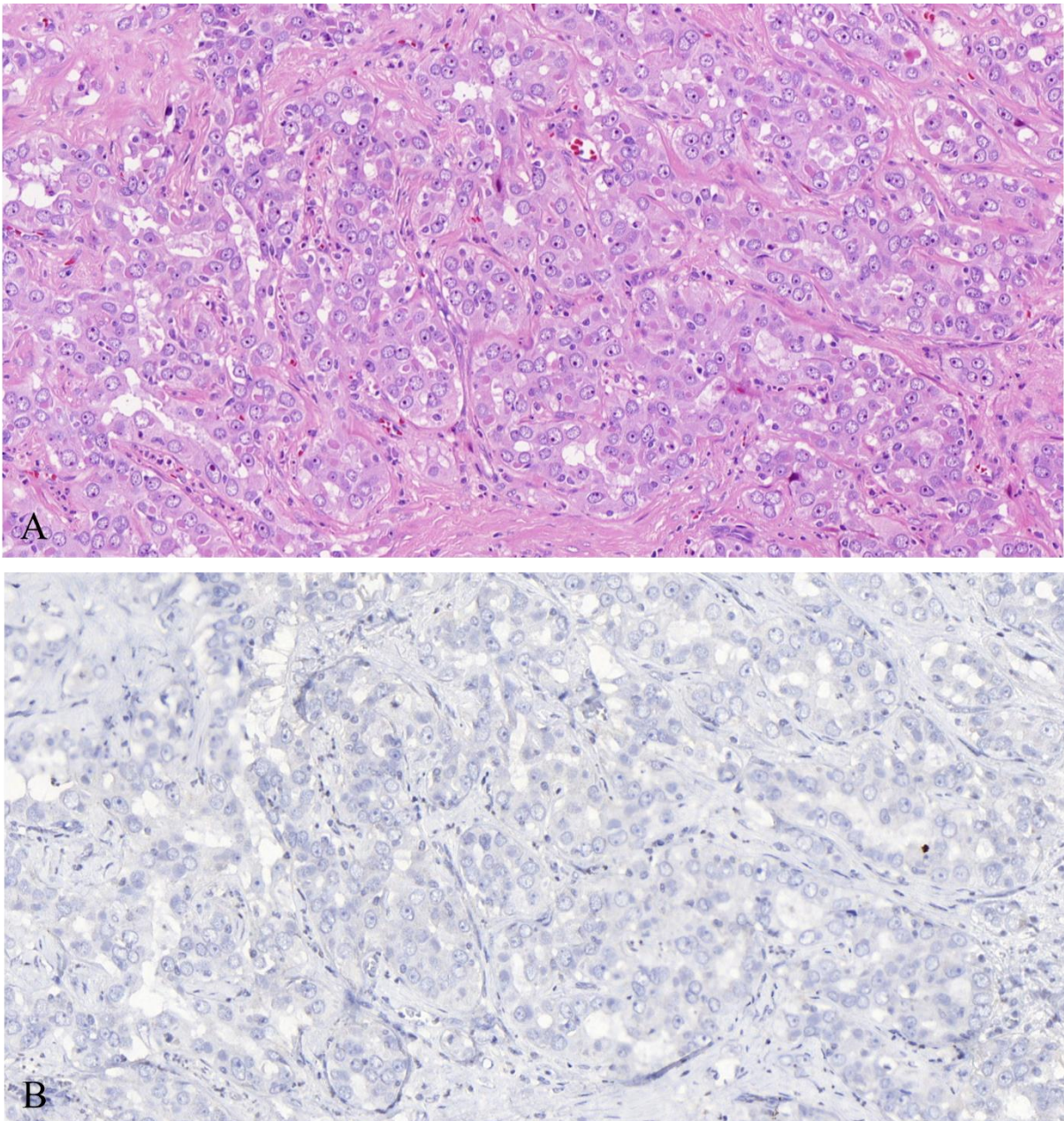
### 3.2.1 PD-L1 Expression auf den Tumorzellen

Die Auswertung der PD-L1 Expression erfolgte anhand des TC/IC-Scorings. Um den Tumor und die Immunzellen sowie das umgebende Lebergewebe gut beurteilen zu können, wurde zu jeder immunhistochemischen Färbung ein dazugehöriger HE-Schnitt angefertigt. In Abbildung 20 wird ein intrahepatisches cholangiozelluläres Karzinom in der HE-Färbung und der dazugehörigen PD-L1-Färbung exemplarisch aufgezeigt.

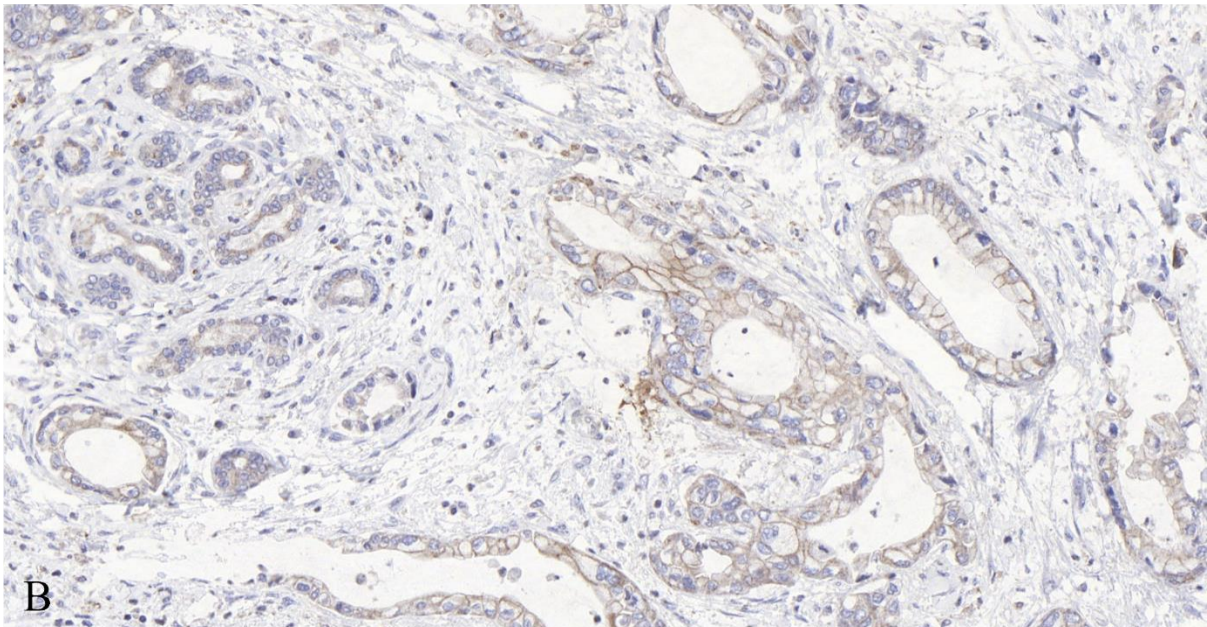
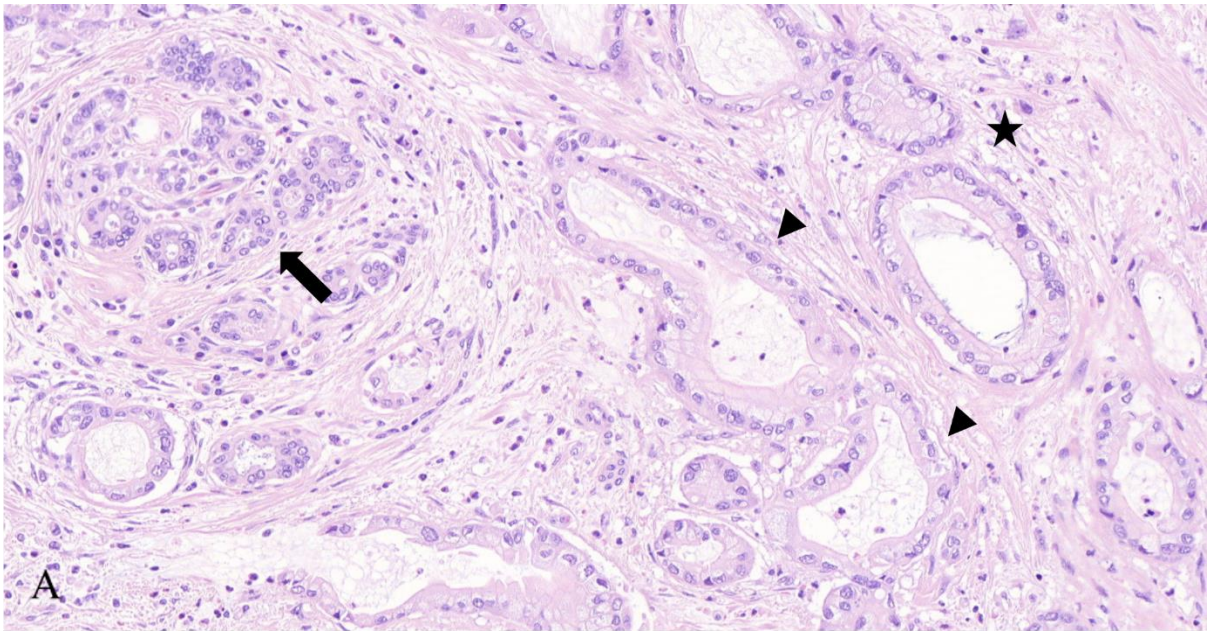


**Abbildung 20: HE- und die zugehörige PD-L1 Färbung eines intrahepatischen cholangiozellulären Karzinoms (iCCA).** In der HE-Färbung (A+C) sieht man einen scharf begrenzten Tumor (Tumorgewebe innerhalb der gestrichelten Linie und mit Stern markiert). In der dazugehörigen PD-L1 Färbung (B+D) kann man das umgebende Leber- und Bindegewebe anhand der fehlenden Farbreaktion erkennen. Die positiven Tumorzellen sind exemplarisch mit zwei Pfeilspitzen markiert. A und B: 50-fache Vergrößerung, C und D 100-fache Vergrößerung

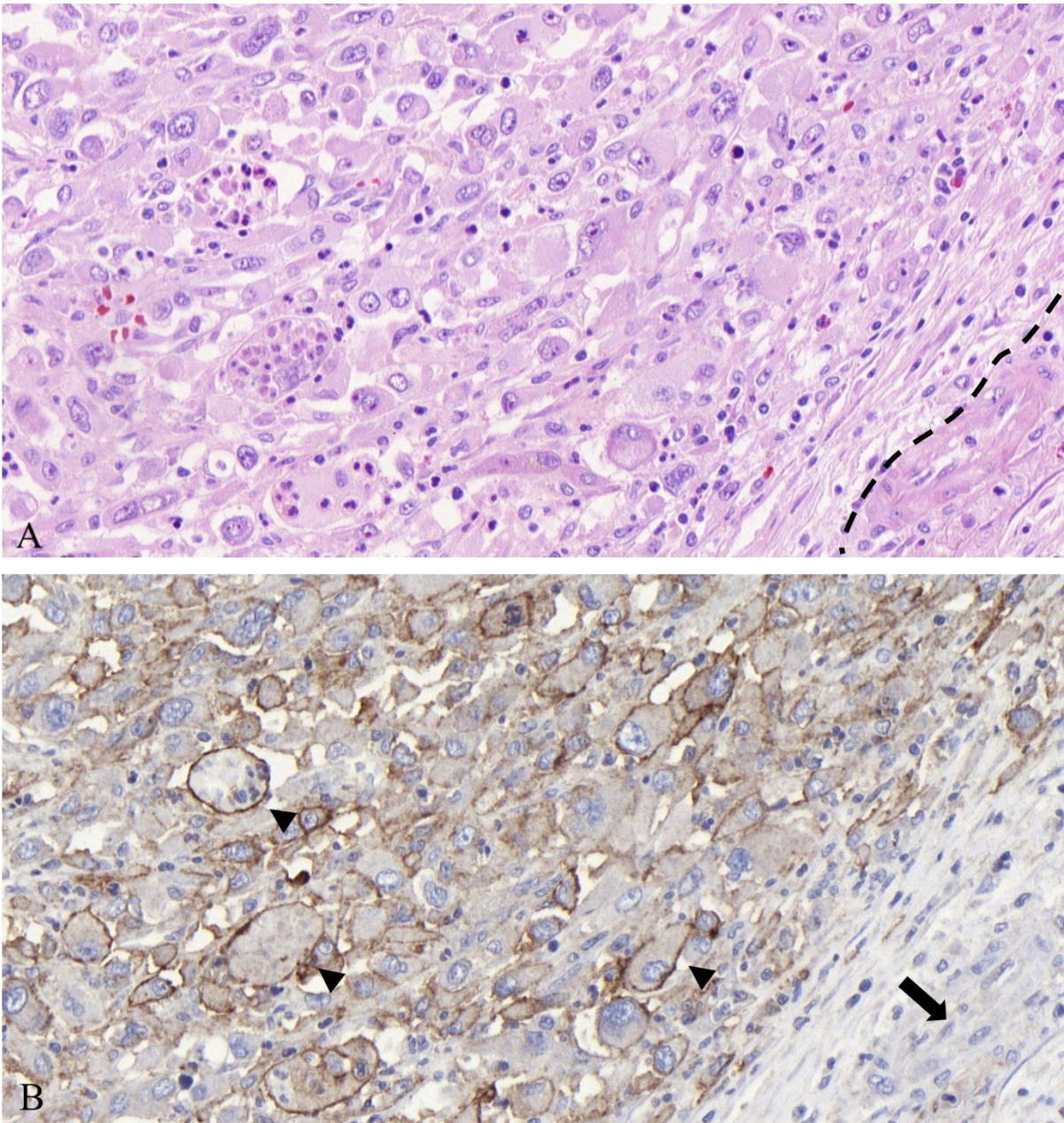
Bei der Auswertung von PD-L1 auf den Tumorzellen wurde in folgenden Schritten gezählt: 0%, <1%, 1 bis  $\leq$ 5%, 6 bis  $\leq$ 10%, 11 bis  $\leq$ 15%, 16 bis  $\leq$ 20%, 21 bis  $\leq$ 25%, 26 bis  $\leq$ 30% und >30%. In den folgenden Abbildungen werden die verschiedenen Ausprägungsgrade der PD-L1 Expression mit den dazugehörigen HE-Färbungen dargestellt und erläutert. Dabei wurde beispielhaft ein TC von 0% (Abbildung 21), 16 bis  $\leq$ 20% (Abbildung 22) und 25% (Abbildung 23) gewählt.



**Abbildung 21: HE- und die zugehörige PD-L1 Färbung eines intrahepatischen cholangiozellulären Karzinoms mit TC von 0%;** A: HE-Färbung eines mäßig differenzierten iCCA mit kleindrüsigem Wachstum ohne wesentliche Entzündungszellen. B: In der korrespondierenden PD-L1 Färbung zeigt sich eine negative Färbereaktion, weder die Tumorzellen noch die spärlich nachweisbaren Immunzellen reagieren mit dem Antikörper, entsprechend einem Score von 0. 200-fache Vergrößerung



**Abbildung 22: HE- und die zugehörige PD-L1 Färbung eines intrahepatischen cholangiozellulären Karzinoms mit TC von 16 bis  $\leq 20\%$ ; A: HE-Färbung eines iCCA (Pfeilspitzen) eingebettet in desmoplastisches Stroma (Stern). In der linken oberen Ecke ist zum Vergleich eine zirkuläre Formation von unauffälligen Gallengängen zu sehen (Pfeil). B: Zugehörige PD-L1 Färbung, auch in diesem Präparat weisen die Tumorzellen eine membranäre Färbung auf, die gesunden Gallengänge dagegen blieben erwartungsgemäß negativ. Der Anteil der PD-L1 positiven Tumorzellen liegt hier zwischen 16 und  $<20\%$  bezogen auf den Gesamtschnitt. 200-fache Vergrößerung**



**Abbildung 23: HE- und die zugehörige PD-L1 Färbung eines intrahepatischen cholangiozellulären Karzinoms mit TC von 25%; A: HE-Färbung eines schlecht differenzierten iCCA mit deutlicher Pleomorphie mit angrenzendem Lebergewebe (rechts der gestrichelten Linie). B: In der zugehörigen PD-L1 Färbung ist bei einigen Tumorzellen eine deutliche zirkuläre membranständige Färbereaktion erkennbar (Pfeilspitzen). Das angrenzende gesunde Gewebe (Pfeil) zeigt dabei keine Reaktion. 400-fache Vergrößerung**

Wie man in Tabelle 22 und Abbildung 24 deutlich sehen kann, bewegte sich die Mehrheit aller Fälle im Bereich 0% und <1%. Die wenigsten Proben (insgesamt 11) wiesen einen TC  $\geq 1\%$  auf.

TC	Anzahl	Prozent
0%	136	71,6
<1%	43	22,6
1 bis $\leq 5\%$	5	2,6
6 bis $\leq 10\%$	1	0,5
11 bis $\leq 15\%$	0	0,0
16 bis $\leq 20\%$	2	1,1
21 bis $\leq 25\%$	2	1,1
26 bis $\leq 30\%$	1	0,5
>30%	0	0,0
<b>Gesamt</b>	<b>190</b>	<b>100,0</b>

PD-L1 Expression auf Tumorzellen

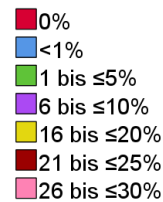


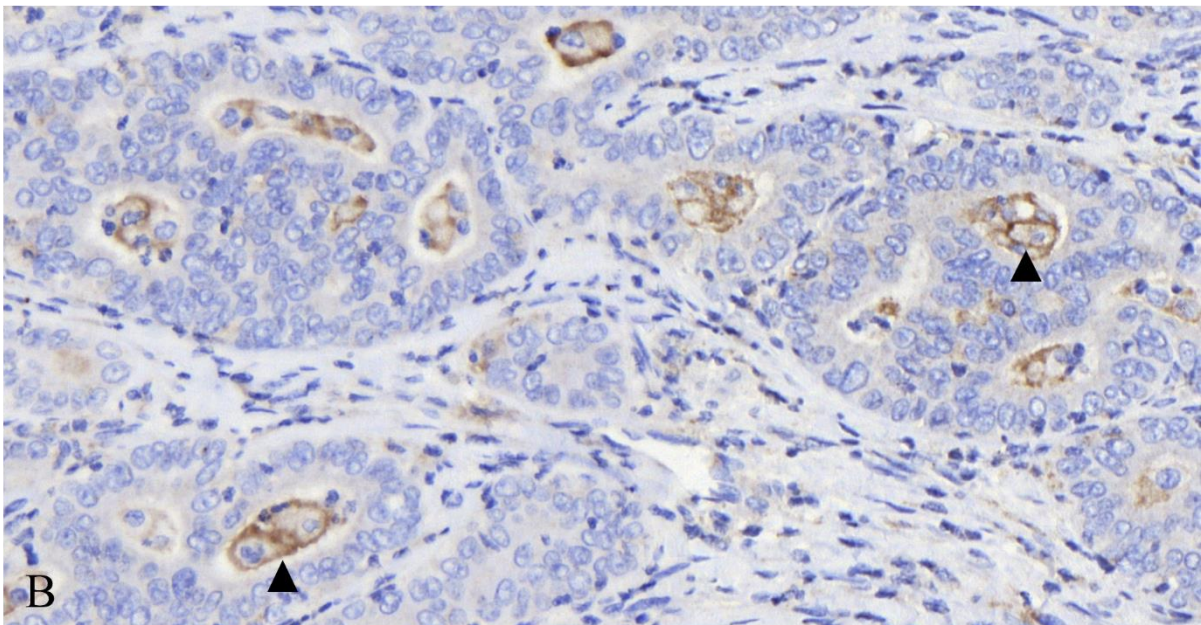
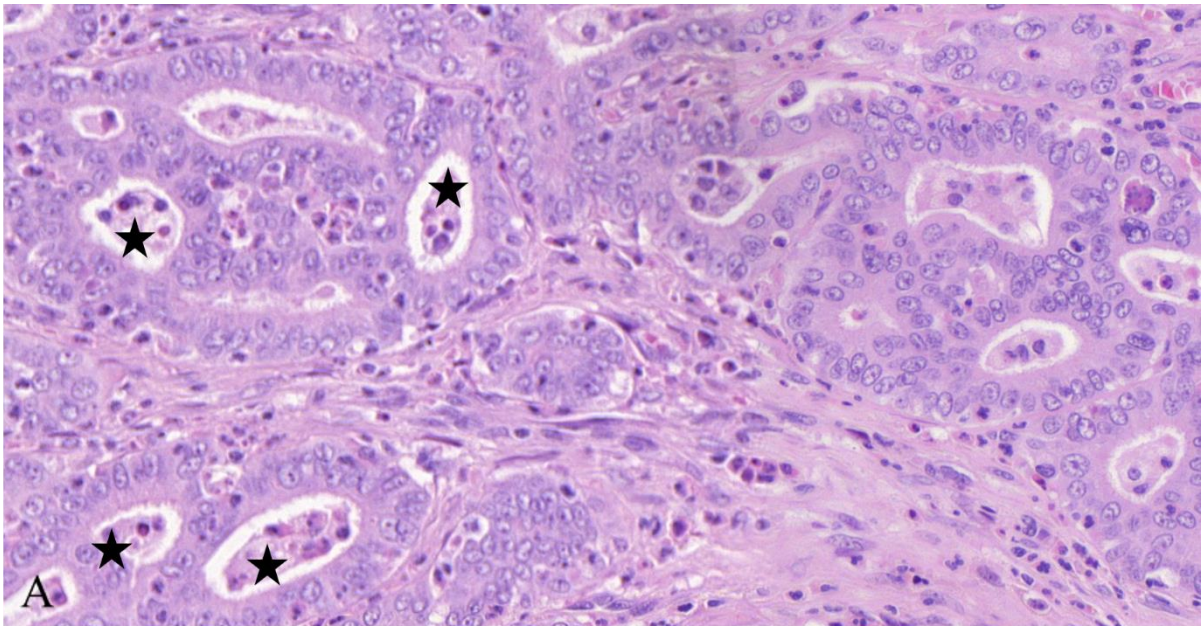
Abbildung 24: PD-L1 Expression auf den Tumorzellen

Tabelle 22: PD-L1 Expression auf den Tumorzellen

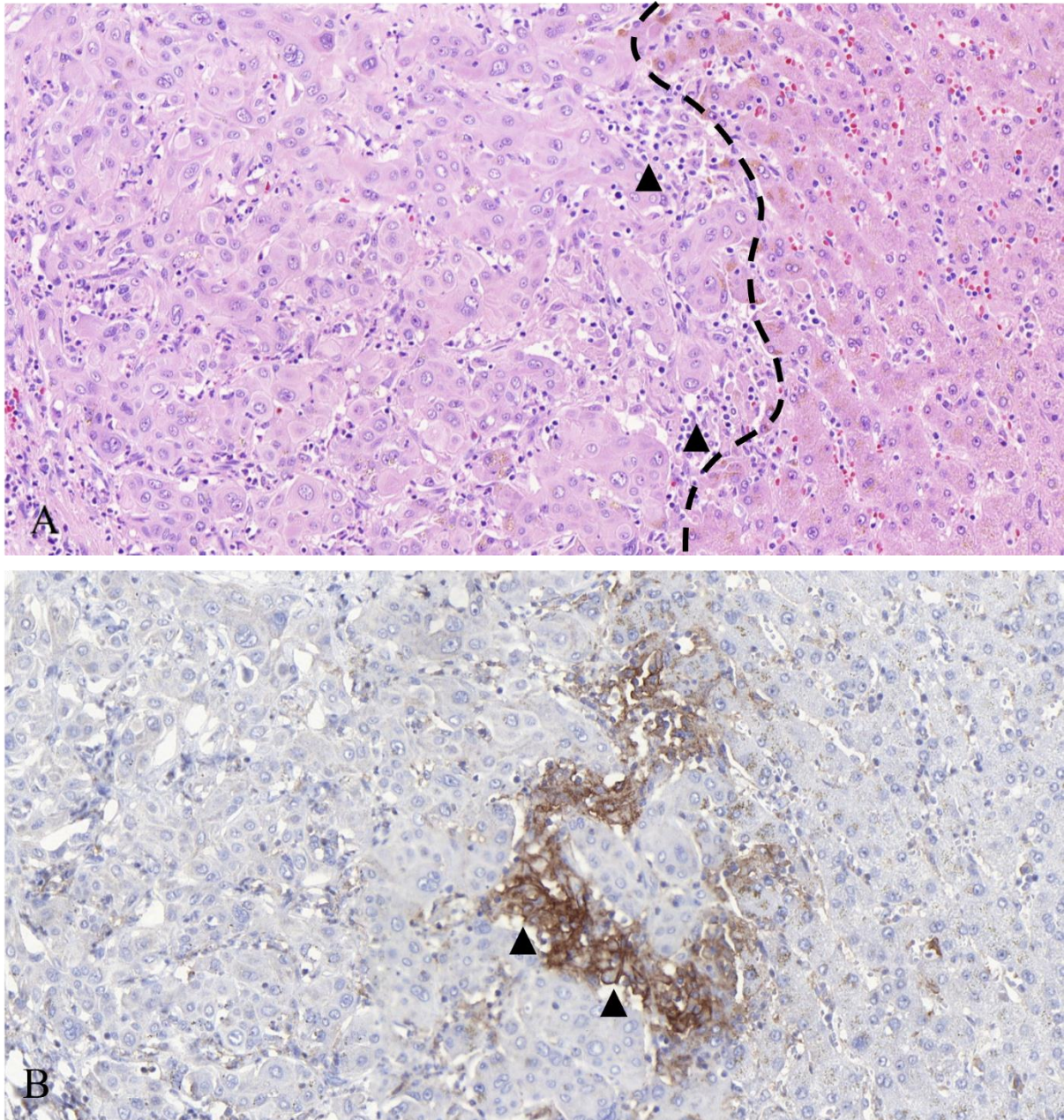
### 3.2.2 PD-L1 Expression auf den tumorspezifischen Immunzellen

Bei der Auswertung des Ausprägungsgrades von PD-L1 auf den tumorspezifischen Immunzellen wurde in denselben Schritten wie für den TC gezählt: 0%, <1%, 1 bis  $\leq 5\%$ , 6 bis  $\leq 10\%$ , 11 bis  $\leq 15\%$ , 16 bis  $\leq 20\%$ , 21 bis  $\leq 25\%$ , 26 bis  $\leq 30\%$  und >30%.

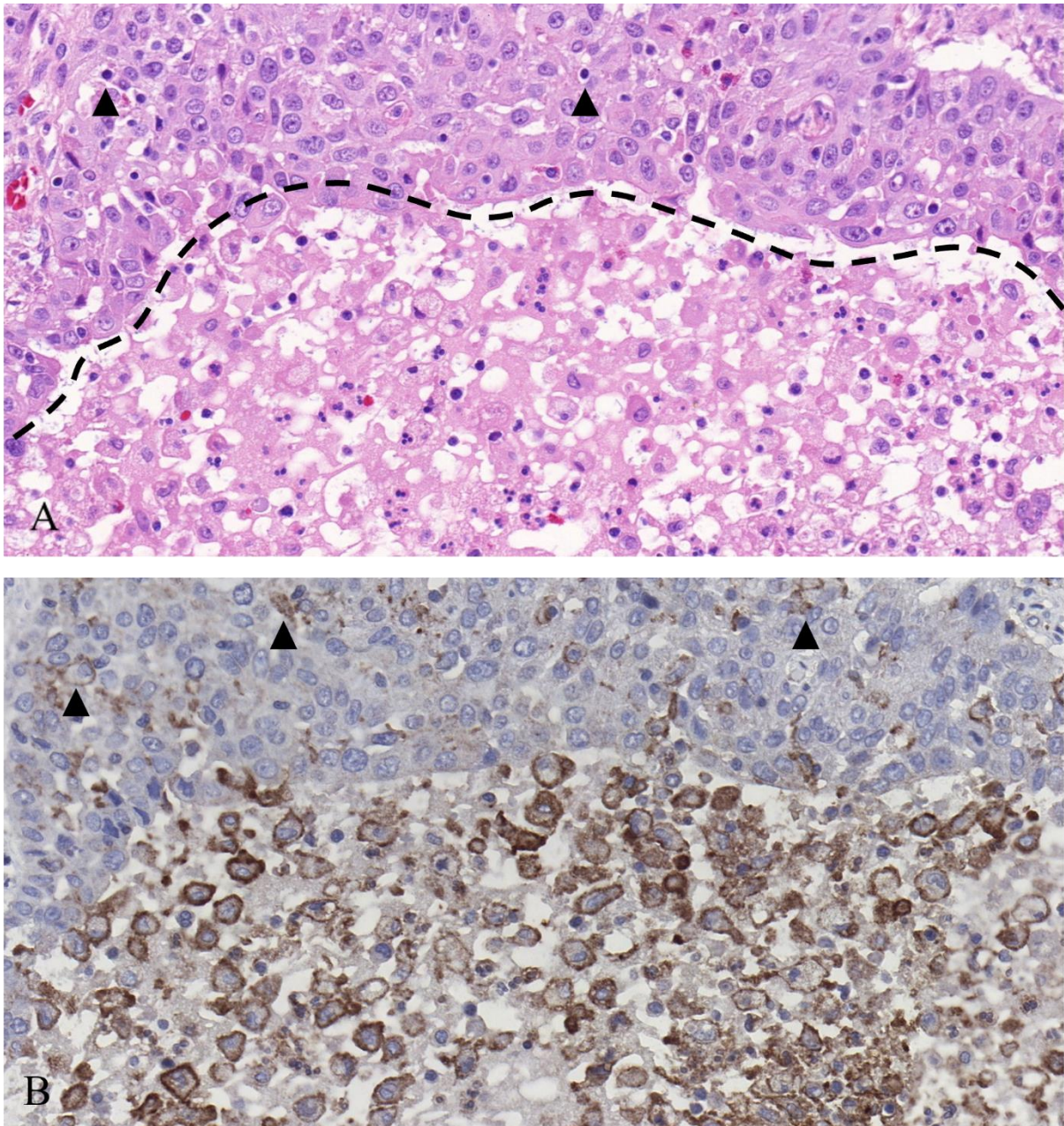
In Abbildung 25, Abbildung 26 und Abbildung 27 kann man die HE-Färbungen und die zugehörigen PD-L1 Färbungen von ausgewählten Proben betrachten. Dabei ist die unterschiedliche Anordnung der tumorspezifischen Immunzellen in Bezug auf das Tumorgewebe sowie die unterschiedliche PD-L1 Expression interessant.



**Abbildung 25: HE und die zugehörige PD-L1 Färbung eines intrahepatischen cholangiozellulären Karzinoms mit IC von 1 bis  $\leq$  5%;** A: HE-Färbung eines gut differenzierten intrahepatischen cholangiozellulären Karzinoms. Innerhalb der Lumina der Tumordrüsen finden sich diverse Immunzellen (Stern). B: In der zugehörigen PD-L1 Färbung zeigen die tumorspezifischen Immunzellen hier eine relativ kräftige membranständige Färbung (Pfeilspitze), die Tumorzellen dagegen bleiben in diesem Fall negativ. 400-fache Vergrößerung



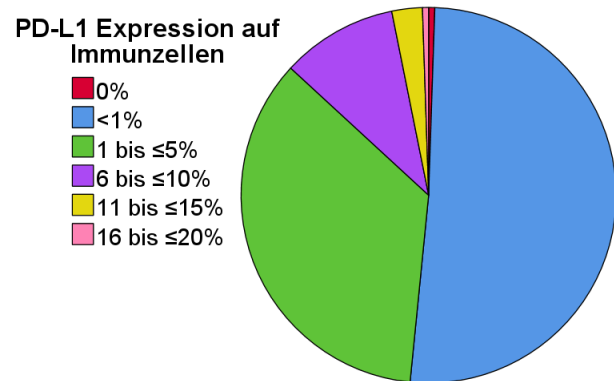
**Abbildung 26: HE und die zugehörige PD-L1 Färbung eines iCCA mit IC von 6 bis  $\leq 10\%$ ; A: HE-Färbung eines solide wachsenden intrahepatischen cholangiozellulären Karzinoms mit angrenzendem Lebergewebe in der rechten Bildhälfte (rechts der gestrichelten Linie). Immer wieder sieht man Ansammlungen von Immunzellen (Pfeilspitze). B: In der entsprechenden PD-L1 Färbung weist eine Immunzellgruppe eine starke Färbung auf (Pfeilspitze). Die Tumorzellen sind dabei negativ. 200-fache Vergrößerung**



**Abbildung 27: HE und die zugehörige PD-L1 Färbung eines iCCA mit IC von 11 bis  $\leq$  15%;** A: HE-Färbung eines schlecht differenzierten intrahepatischen cholangiozellulären Karzinoms mit deutlicher Pleomorphie der Tumorzellen (Tumor oberhalb der gestrichelten Linie). Die Immunzellen befinden sich in einer größeren Ansammlung vor dem Tumorgewebe (unterhalb der gestrichelten Linie) und vereinzelt zwischen den einzelnen Tumorzellen (Pfeilspitze). B: In der PD-L1 Färbung zeigen die tumorspezifischen Immunzellen eine starke positive Reaktion, während die Tumorzellen erneut keine Reaktion aufweisen. 400-fache Vergrößerung

Im Gegensatz zu dem TC gab es lediglich einen Fall mit einer PD-L1 Expression von 0%, die Mehrheit bewegte sich in dem Bereich <1% und 1 bis ≤ 5%. Eine höhere Expression als 20% wurde unter den insgesamt 190 Fällen nicht beobachtet. Abbildung 28 und Tabelle 23 geben eine Übersicht über die Ergebnisse.

IC	Anzahl	Prozent
0%	1	0,5
<1%	97	51,1
1 bis ≤5%	67	35,3
6 bis ≤10%	19	10,0
11 bis ≤15%	5	2,6
16 bis ≤20%	1	0,5
>20%	0	0,0
<b>Gesamt</b>	<b>190</b>	<b>100,0</b>



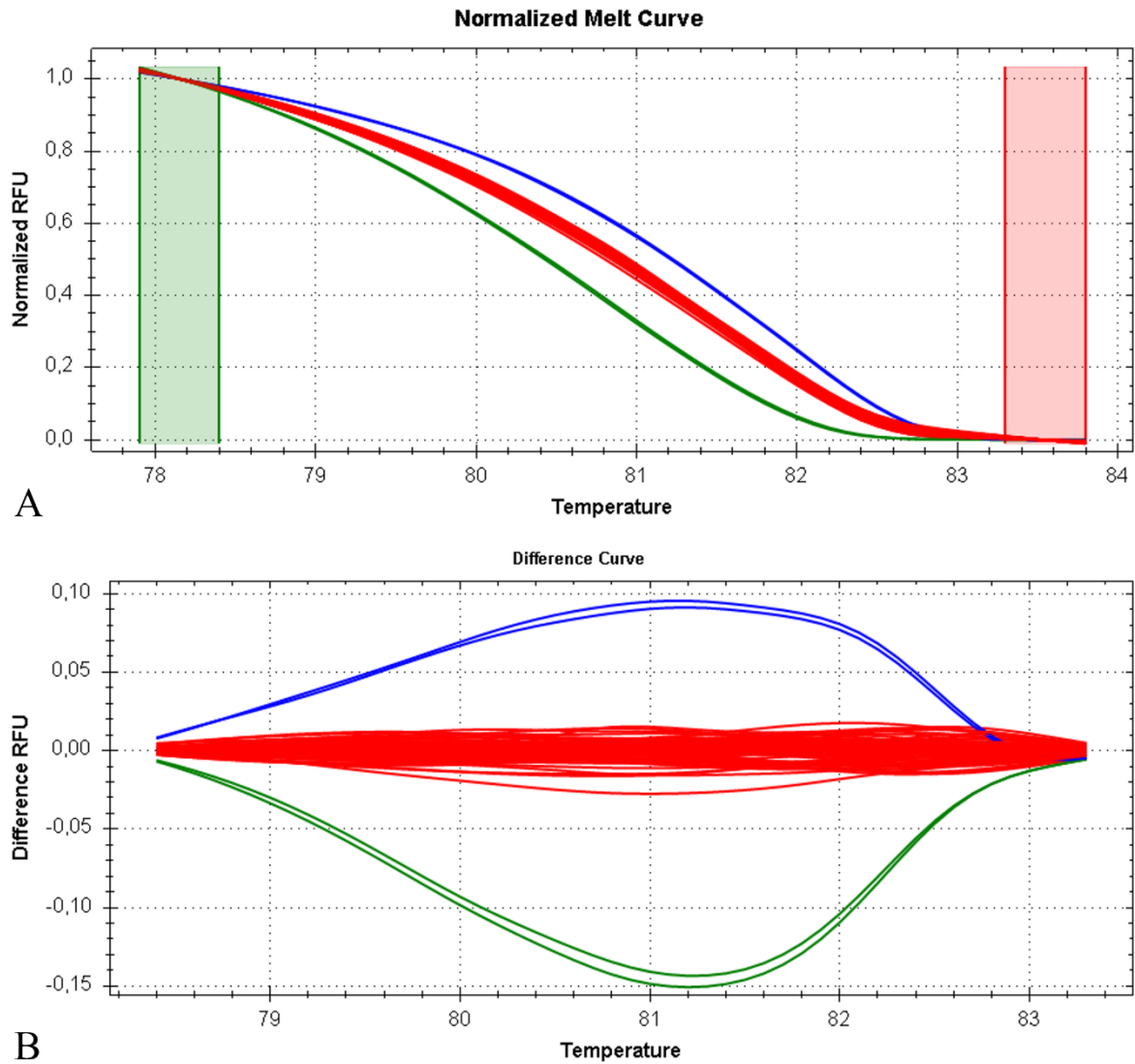
**Tabelle 23: PD-L1 Expression auf den tumorspezifischen Immunzellen**

**Abbildung 28: PD-L1 Expression auf den tumorspezifischen Immunzellen**

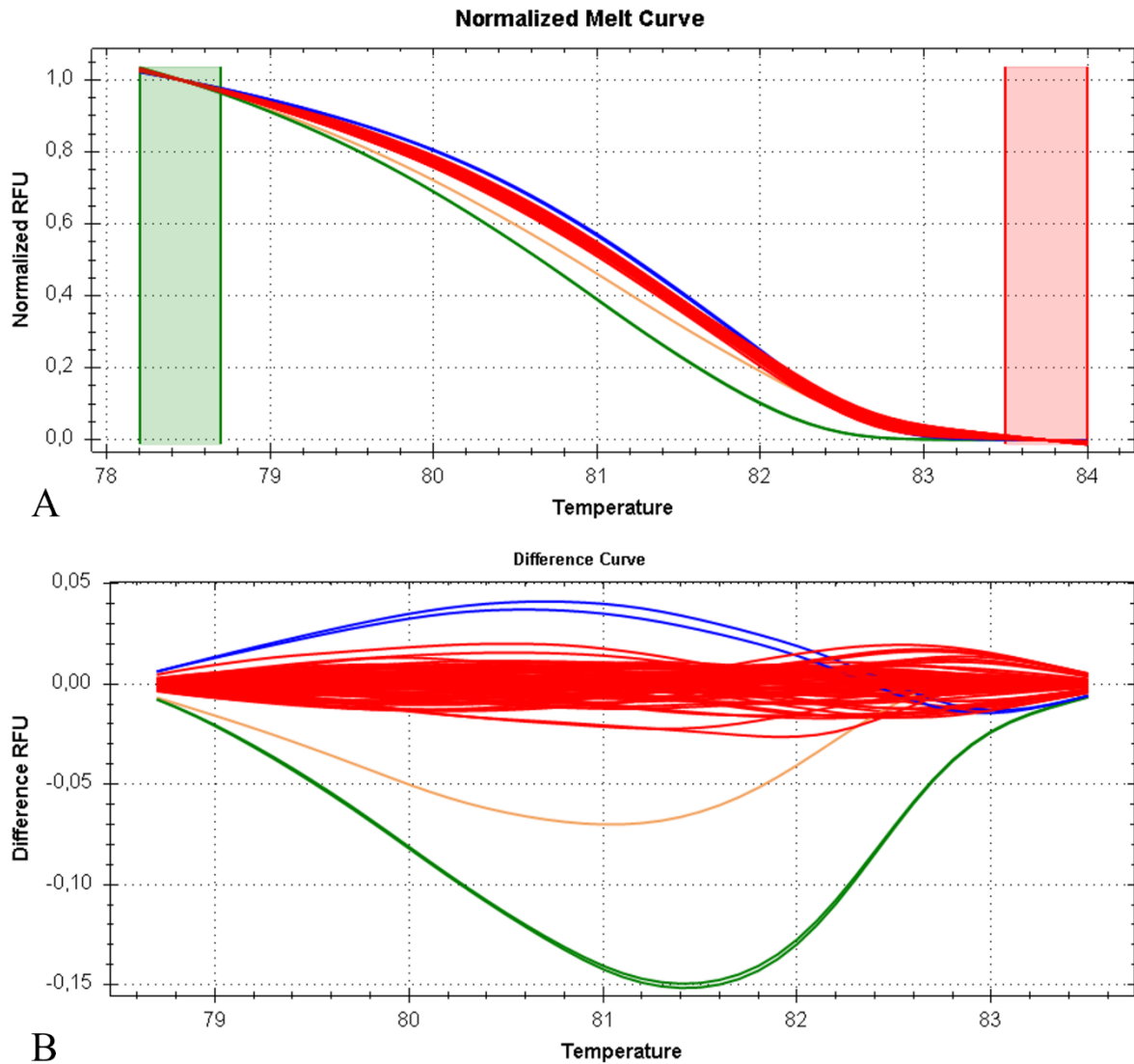
### 3.3 Auswertung der Mutationsanalyse

Die 190 Proben wurden auf die häufigsten Mutationen unter den gastroenterologischen Tumoren mithilfe von HRM und der Sequenzierung untersucht. Darunter fallen *KRAS* 12-13, *KRAS* 59-61, *KRAS* 117, *KRAS* 146, *NRAS* 12-13, *NRAS* 59-61 und *BRAF*. Mithilfe der HRM-Schmelzkurvenanalyse wurden die Proben auf das Vorhandensein einer Mutation in den zu untersuchenden Genen getestet. Pro Genabberation wurden mehrere Durchläufe durchgeführt. Pro Durchlauf wurden zwischen 60 und 80 Patientenproben analysiert. Im Anschluss wurden die eindeutig als positiv gekennzeichneten Fälle und einige der negativen Fälle sequenziert, um die genaue Genaberration festzustellen und das Ergebnis der HRM-Methode zu bestätigen. Weiterhin wurden jene Fälle sequenziert, in denen die Schmelzkurven keinen eindeutigen Verlauf zeigten.

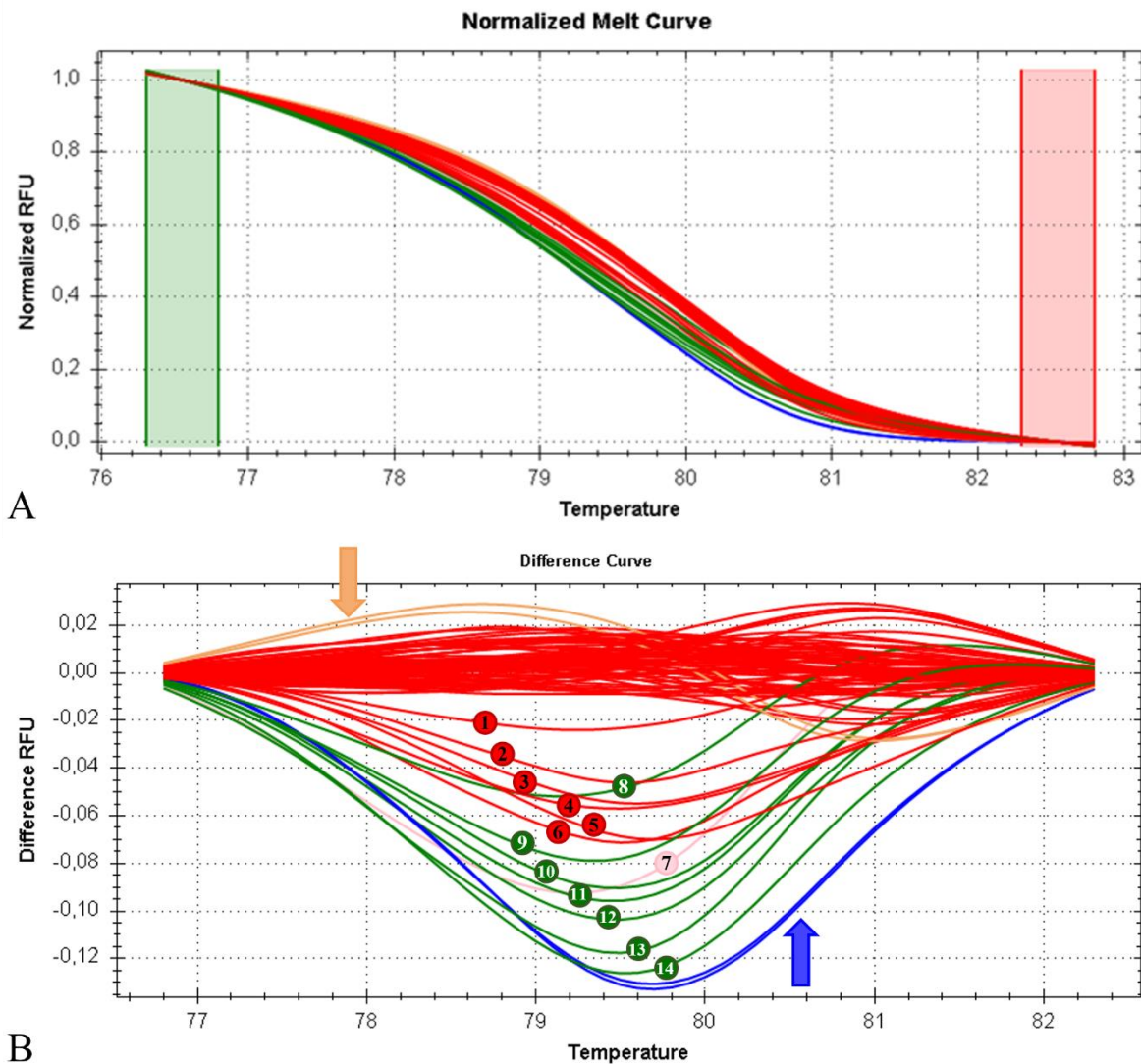
In den folgenden Abbildungen werden Beispiele für eindeutige Ergebnisse (Abbildung 29 und Abbildung 30) sowie weniger eindeutige Ergebnisse (Abbildung 31) aufgeführt.



**Abbildung 29: Darstellung der Schmelzkurven eines Durchlaufs für die Analyse der Proben auf die Mutation *NRAS* 12-13; A: Normalisierte Schmelzkurve, B: Differenzkurve. Positivkontrollen sind sowohl in A als auch in B dunkelgrün dargestellt, Negativkontrollen blau. In diesem Durchlauf war keine der Patientenproben auffällig, sodass keine weitere Analyse mittels Gensequenzierung erfolgte.**



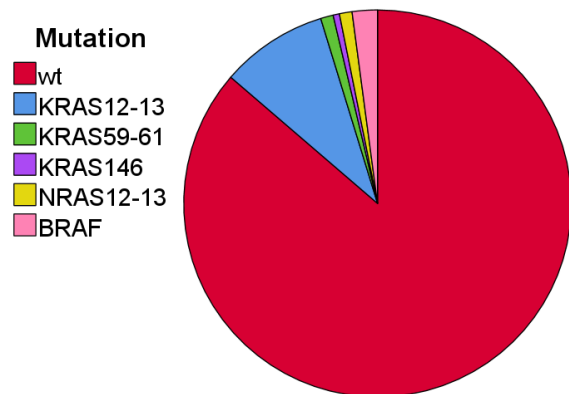
**Abbildung 30: Darstellung der Schmelzkurven eines Durchlaufs für die Analyse der Proben auf die Mutation *NRAS* 12-13; A: Normalisierte Schmelzkurve, B: Differenzkurve. Auch hier sind die Positivkontrollen dunkelgrün und die Negativkontrollen blau dargestellt. Eine Probe, die mit der Farbe orange hervorgehoben wurde und einen ähnlicheren Kurvenverlauf zu den Positivkontrollen aufweist, fällt auf. Diese Probe wies in der Sequenzierung die Mutation c.38G>T auf.**



**Abbildung 31: Darstellung der Schmelzkurven eines Durchlaufs für die Analyse der Proben auf die Mutation *KRAS* 12-13; A: Normalisierte Schmelzkurve, B: Differenzkurve. Die blauen Kurven entsprechen der Positivkontrolle, die zwei orangefarbener Pfeil) der Negativkontrolle (blauer und orangefarbener Pfeil). Die Mehrheit der Fälle zeigt ein negatives Ergebnis und gruppiert sich im oberen Teil der Grafik in Form von roten Kurven. Die Kurven, die sich zwischen den Positivkontrollen und den negativen Fällen befinden, konnten nicht sicher zugeordnet werden und wurden daher sequenziert. Unter den grünen Kurven (Nummern 8-14) befinden sich mit Ausnahme von einem Fall (Nummer 9) mutierte Fälle. Unter den rot markierten Fällen, die durch einen abweichenden Kurvenverlauf aufgefallen sind, sind alle Proben positiv (Nummern 1-6). Auch die rosa Kurve (Nummer 7) entspricht nach Durchführung der Sequenzierung einer Mutation.**

Die zur Darstellung ausgewählten Durchläufe sollen zeigen, dass die Entscheidung zur Sequenzierung bestimmter Proben jedes Mal einzeln und individuell getroffen wurde. Nach der Auswertung der HRM-Analyse und der Sequenzierung aller 190 Fälle waren insgesamt 26 Fälle mit Mutationen zu verzeichnen. Die *KRAS*-Mutation war mit 20 Fällen am häufigsten vertreten (17 *KRAS* 12-13-Mutationen, 2 *KRAS* 59-61-Mutationen, 1 *KRAS* 146-Mutation), die zweithäufigste Mutation fand sich im *BRAF*-Gen in 4 Fällen. *NRAS*-Mutationen fanden sich in 2 Fällen (*NRAS* 12-13) Die Übersicht über die verschiedenen Mutationen ist in Tabelle 24 und Abbildung 32 dargestellt.

	Anzahl	Prozent
<b>wt</b>	164	86,3
<b><i>KRAS</i> 12-13</b>	17	8,9
<b><i>KRAS</i> 59-61</b>	2	1,1
<b><i>KRAS</i> 117</b>	0	0,0
<b><i>KRAS</i> 146</b>	1	0,5
<b><i>NRAS</i> 12-13</b>	2	1,1
<b><i>NRAS</i> 59-61</b>	0	0,0
<b><i>BRAF</i></b>	4	2,1
<b>Gesamt</b>	190	100,0



**Abbildung 32: Verteilung der verschiedenen Mutationen auf die untersuchten Proben**

**Tabelle 24: Verteilung der verschiedenen Mutationen auf die untersuchten Proben**

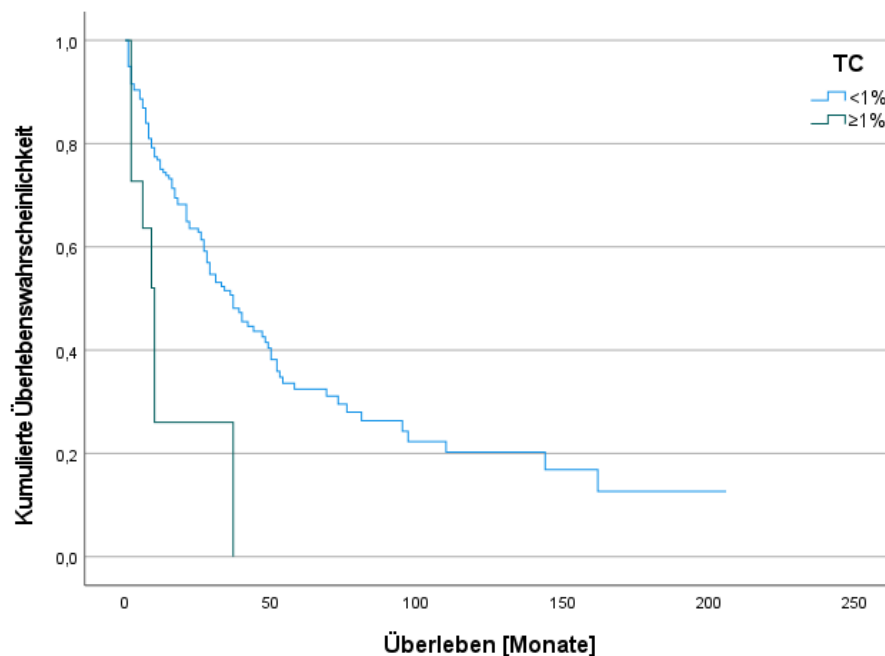
### 3.4 Überlebenszeitanalysen

#### 3.4.1 PD-L1 Expression auf Tumorzellen

Für die Überlebenszeitanalyse wurde die PD-L1 Expression auf den Tumorzellen in folgende Hauptgruppen unterteilt: TC <1% und TC ≥1%. Der Grund hierfür ist der bereits an dieser festgesetzten Grenze beobachtete Unterschied in den Überlebenszeiten der Patienten. Dieser sogenannte Cut-off-Wert erschien auch hinsichtlich der immunhistochemischen Expression des PD-L1 Rezeptors und der Anzahl der positiven Fälle unter den iCCA-Tumoren als sinnvoll. Tabelle 25 gibt eine Übersicht über die Mittel- sowie Medianwerte der errechneten Überlebenszeit, Abbildung 33 visualisiert die Überlebenszeit in Form von Kaplan-Meier-Kurven.

	Anzahl (Prozent)	Mittelwert			Median		
		Wert	Standard- fehler	95% KI	Wert	Standard- fehler	95% KI
TC <1%	179 (94,2)	63,638	6,891	50,133- 77,144	36,000	4,723	26,743- 45,257
TC ≥1%	11 (5,8)	13,508	4,987	3,733- 23,282	9,000	1,654	5,757- 12,243
<b>Gesamt</b>	190 (100,0)	61,365	6,644	48,343- 74,388	35,000	4,084	26,995- 43,005

**Tabelle 25: Überlebensanalyse der Patienten mit TC <1% und TC ≥1%.** Die Tabelle gibt eine Übersicht über den Mittelwert sowie den Median der Überlebenszeit in Monaten bezogen auf die beiden Patientengruppen an. Interessant ist dabei der Unterschied zwischen dem medianen Überleben der Gruppe TC <1%, welches 36 Monate beträgt, und der Gruppe TC ≥1%, welches lediglich 9 Monate beträgt.



**Abbildung 33: Kaplan-Meier-Kurven für die Überlebenszeit der beiden Patientengruppen TC <1% (blaue Kurve) und TC ≥1% (grüne Kurve) in Monaten.** Der Kurvenverlauf unterstreicht den deutlichen Unterschied in der tatsächlichen Überlebenszeit der beiden Gruppen: Die grüne Kurve zeigt einen steilen Abfall, während die blaue Kurve sowohl flacher verläuft als auch höhere Werte auf der Zeitachse erreicht. Die Signifikanz des durchgeführten Log-Rank Tests beträgt 0,002.

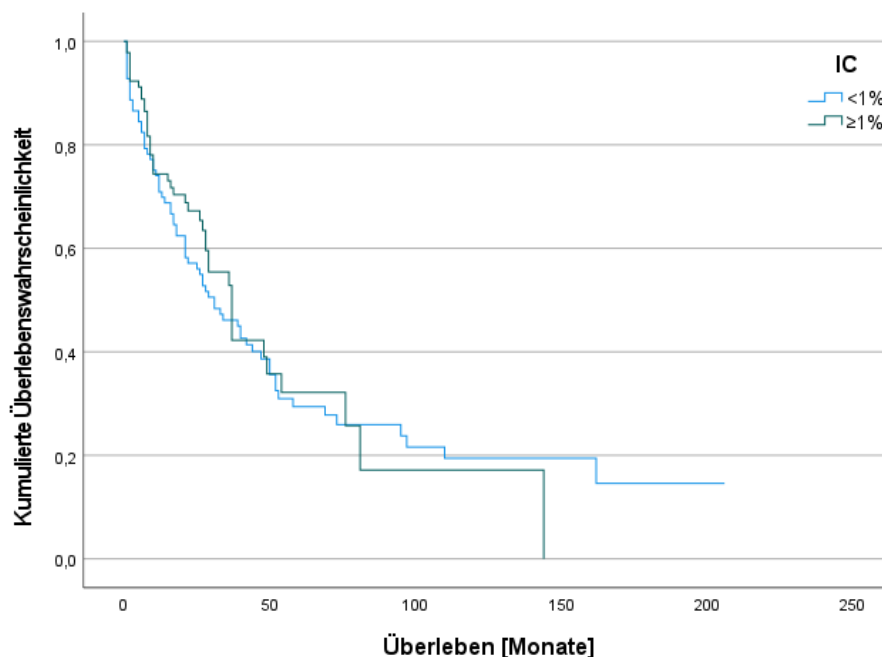
Die in Tabelle 25 dargestellten Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit lassen erkennen, dass das mediane Überleben in der Gruppe TC ≥1% um 27 Monate kürzer ist als das der Gruppe TC <1%. Dieses Ergebnis wird in Abbildung 33 zusätzlich durch die Kaplan-Meier-Kurven veranschaulicht. Der Wert des dabei durchgeführten Log-Rank Tests beträgt 0,002 und zeigt somit eine hohe Signifikanz der Ergebnisse an.

### 3.4.2 PD-L1 Expression auf tumorspezifischen Immunzellen

Auch für die Überlebenszeitanalyse in Bezug auf die PD-L1 Expression auf den Immunzellen wurden die Patienten in zwei Gruppen unterteilt: IC <1% und IC ≥1%. Tabelle 26 und Abbildung 34 stellen die Ergebnisse im Folgenden grafisch dar.

	Anzahl (Prozent)	Mittelwert			Median		
		Wert	Standard- fehler	95% KI	Wert	Standard- fehler	95% KI
IC <1%	98 (51,6)	61,407	8,220	45,297- 77,518	30,000	5,878	18,480- 41,520
IC ≥1%	92 (48,4)	51,928	8,177	35,901- 67,955	36,000	4,195	27,778- 44,222
<b>Gesamt</b>	190 (100,0)	61,365	6,644	48,343- 74,388	35,000	4,084	26,995- 43,005

**Tabelle 26: Überlebensanalyse der Patienten mit IC <1% und IC ≥1%.** Die Tabelle gibt eine Übersicht über den Mittelwert sowie den Median der Überlebenszeit in Monaten bezogen auf die beiden Patientengruppen an. Hier erkennt man nicht nur keinen wesentlichen Unterschied zwischen den beiden Gruppen, sondern auch eine starke Überlappung bei den Werten der 95% Konfidenzintervalle.



**Abbildung 34: Kaplan-Meier-Kurven für die Überlebenszeit der beiden Patientengruppen IC <1% (blaue Kurve) und IC ≥1% (grüne Kurve) in Monaten.** Beide Kurven zeigen einen beinahe gleichen Verlauf, zudem erkennt man keinen Unterschied in den erreichten Überlebenszeiten auf der Zeitachse. Der Log-Rank Test zeigt einen Wert von 0,635 und somit keine Signifikanz auf.

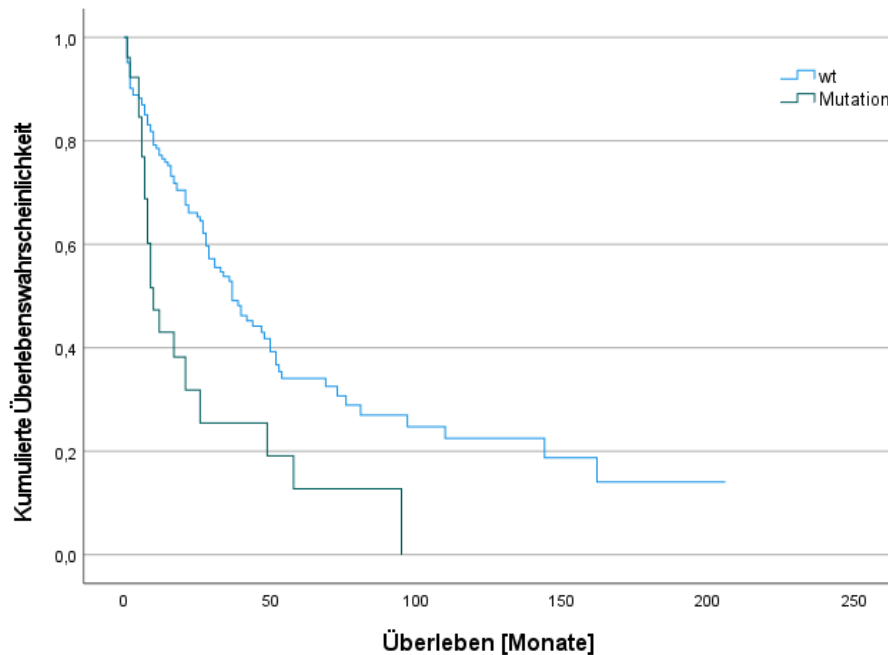
Die in Tabelle 26 errechneten Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit der beiden Patientengruppen zeigen mit 30 Monaten für die Gruppe IC <1% im Vergleich zu 36 Monaten für die Gruppe IC ≥1% keine wesentlichen Unterschiede. Auch die in Abbildung 34 dargestellten Kaplan-Meier-Kurven lassen einen ähnlichen Kurvenverlauf erkennen. Mit dem Wert des Log-Rank Tests von 0,635 ergibt sich kein signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit der Patienten in Bezug auf die PD-L1 Expression auf den tumorspezifischen Immunzellen.

### 3.4.3 Mutationsstatus

Für die Überlebenszeitanalyse im Zusammenhang mit dem Mutationsstatus wurde das Patientenkollektiv in folgende Gruppen aufgeteilt: das Vorhandensein von einer *KRAS*-, *NRAS*- oder *BRAF*-Mutation und einer Wildtyp-Gruppe. Hierbei wurden alle Mutationen als eine Variable betrachtet. Tabelle 27 und Abbildung 35 stellen die Ergebnisse der errechneten Überlebenszeiten übersichtlich dar.

	Anzahl (Prozent)	Mittelwert			Median		
		Wert	Standard- fehler	95% KI	Wert	Standard- fehler	95% KI
<b>wt</b>	164 (86,3)	66,985	7,462	52,358- 81,611	36,000	5,020	26,161- 45,839
<b>Mutation</b>	26 (13,7)	25,792	6,983	12,104- 39,479	9,000	2,346	4,401- 13,599
<b>Gesamt</b>	190 (100,0)	61,365	6,644	48,343- 74,388	35,000	4,084	26,995- 43,005

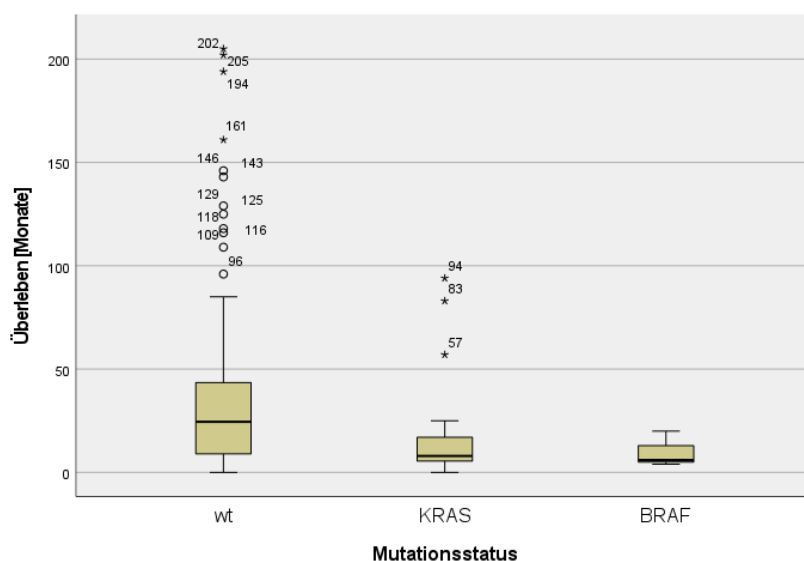
**Tabelle 27: Überlebensanalyse der Patienten mit Wildtyp (wt) und Patienten mit einer Mutation.** Die Tabelle gibt eine Übersicht über den Mittelwert sowie den Median der Überlebenszeit in Monaten bezogen auf die beiden Patientengruppen an. Dabei lässt sich auch hier ein deutlicher Unterschied erkennen: Die mediane Überlebenszeit in der Patientengruppe ohne Mutation beträgt 36 Monate, während die der Patienten mit einer Mutation lediglich 9 Monate beträgt.



**Abbildung 35: Kaplan-Meier-Kurven für die beiden Patientengruppen Wildtyp (blaue Kurve) und Vorhandensein einer Mutation (grüne Kurve).** Erkennbar ist der steilere Verlauf der grünen Kurve sowie der frühere Abbruch dieser auf der Zeitachse. Der Wert des durchgeführten Log-Rank Tests beträgt in diesem Fall 0,001.

Patienten mit einem Wildtyp-Status in den Genen *KRAS*, *NRAS* und *BRAF* leben im Median 27 Monate länger als Patienten mit einer Mutation in diesen Genen. Die in Abbildung 35 dargestellten zugehörigen Kaplan-Meier-Kurven lassen einen Unterschied im Verlauf beider Kurven erkennen. Der durchgeführte Log-Rank Test zeigt mit einem Wert von 0,001 eine hohe Signifikanz der errechneten Unterschiede an.

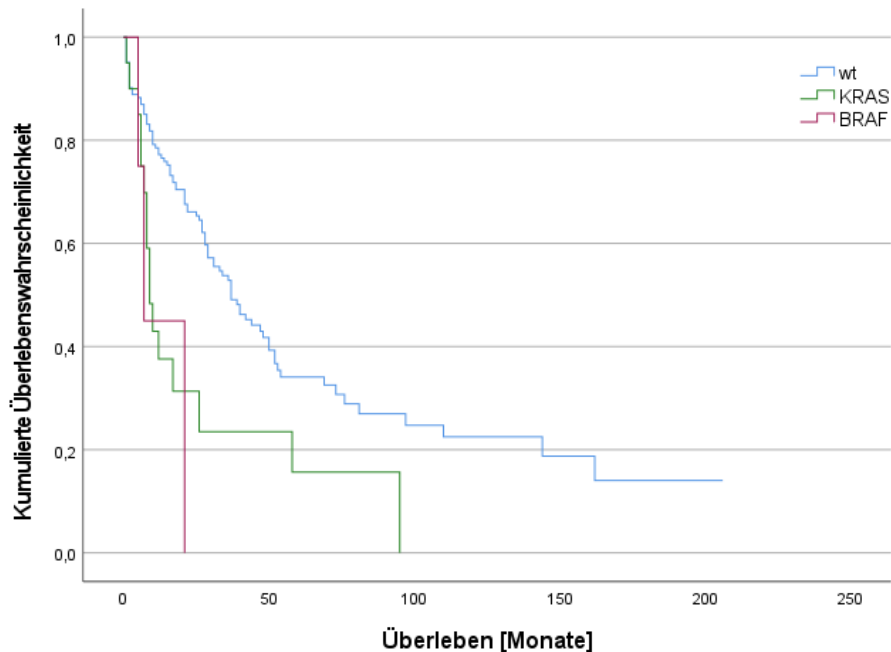
Nun sollen die unterschiedlichen Genmutationen getrennt voneinander betrachtet werden. Dabei soll die Mutationsgruppe in *KRAS*- und *BRAF*- Mutationen unterteilt werden und im Vergleich zu den Wildtyp-Fällen betrachtet werden. Die zwei Fälle mit einer Mutation *NRAS* 12-13 wurden in folgenden Auswertungen aufgrund der zu geringen Zahl nicht berücksichtigt. Abbildung 36 zeigt eine Verteilung der Überlebenszeit der verschiedenen Gruppen in einem Box-Plot. Tabelle 28 gibt einen Überblick über die errechneten Mittel- und Medianwerte, Abbildung 37 präsentiert die zugehörigen Kaplan-Meier-Kurven.



**Abbildung 36: Grafische Darstellung der Verteilung der beiden Mutationen *KRAS* und *BRAF* sowie des Wildtyps (wt) auf das Überleben der iCCA-Patienten mittels Box-Plot.** Zu erkennen ist die größere Bandbreite der Überlebenszeit der wt-Gruppe im Vergleich zu den beiden Mutationen. Auch der Median (Linie innerhalb der drei Boxen) der einzelnen Gruppen unterscheidet sich voneinander. Während der Median der wt-Box am höchsten liegt, scheint es auch einen Unterschied zwischen der medianen Überlebenszeit der beiden Mutationen zu geben.

	Anzahl (Prozent)	Mittelwert			Median		
		Wert	Standard- fehler	95% KI	Wert	Standard- fehler	95% KI
<b>wt</b>	164 (86,3)	66,985	7,462	52,358- 81,611	36,000	5,020	26,161- 45,839
<b><i>KRAS</i></b>	20 (10,5)	25,949	8,267	9,746- 42,153	8,000	1,415	5,227- 10,773
<b><i>BRAF</i></b>	4 (2,1)	12,500	4,613	3,468- 21,542	6,000	5,333	0,000- 16,453
<b>Gesamt</b>	188 (98,9)	61,596	6,704	48,456- 74,736	33,000	4,329	24,514- 41,486

**Tabelle 28: Überlebensanalyse der Patienten mit Wildtyp und Patienten mit der Mutation *KRAS* oder *BRAF*.** Die Tabelle gibt eine Übersicht über den Mittelwert sowie den Median der Überlebenszeit in Monaten bezogen auf die Patientengruppen Wildtyp (wt), *KRAS*- und *BRAF*-Mutation. Es zeigt sich der bereits bekannte Unterschied zwischen dem Vorhandensein einer Mutation in den Genen *KRAS* und *BRAF* mit 36 Monaten Überlebenszeit für wt. Neu ist die Erkenntnis, dass sich die mediane Überlebenszeit unter den beiden Mutationen um zwei Monate unterscheidet.



**Abbildung 37: Kaplan-Meier-Kurve für iCCA mit einem Wildtyp-Status (blaue Kurve) sowie für iCCA mit Mutationen *KRAS* (grüne Kurve) und *BRAF* (rote Kurve).** Während die blaue Kurve einen flachen Verlauf zeigt und auf der Zeitachse höhere Werte erreicht, brechen sowohl die grüne als auch die rote Kurve ihren Verlauf relativ früh ab. Der Wert des durchgeführten Log-Rank Tests beträgt hier  $<0,001$ .

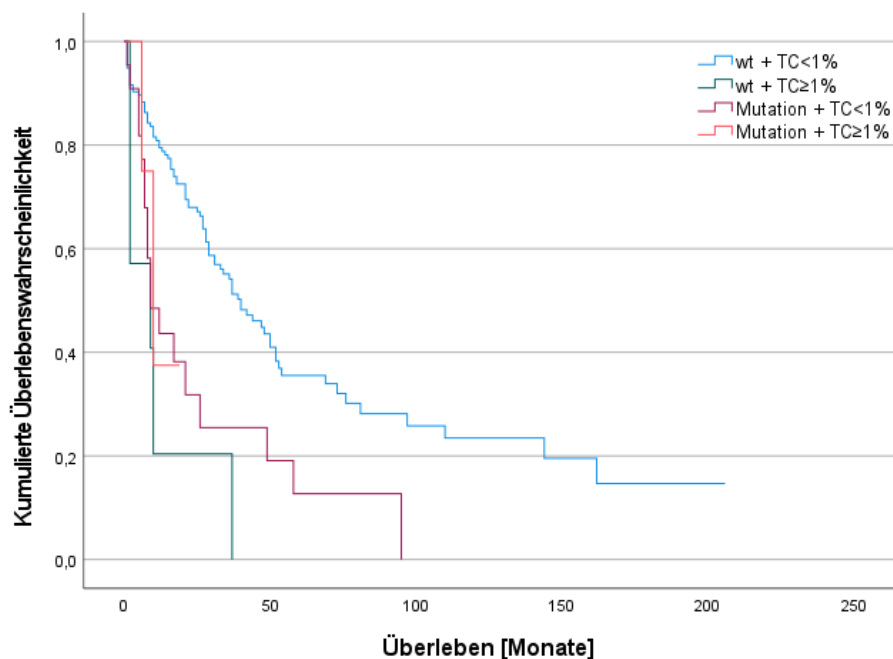
Insgesamt ist deutlich zu erkennen, dass sowohl die *KRAS*-Mutationen als auch die *BRAF*-Mutation die Prognose der iCCA-Patienten erheblich verschlechtern. Die mediane Überlebenszeit für Patienten mit *KRAS*-mutiertem iCCA beträgt 8 Monate, die mit *BRAF*-mutiertem iCCA 6 Monate. Zum Vergleich beträgt das mediane Überleben der Patienten mit einem Wildtyp-Status 3 Jahre. Der durchgeführte Log-Rank Test zeigt mit dem Wert von  $<0,001$  eine sehr hohe Signifikanz an.

#### 3.4.4 *PD-L1 Expression auf Tumorzellen und Mutationsstatus*

Sowohl die PD-L1 Expression auf den Tumorzellen als auch das Vorhandensein einer Mutation zeigt ein geringeres Überleben der Patienten. Aus diesem Grund wurde eine zusätzliche Überlebensanalyse für beide Variablen zusammen durchgeführt und die Ergebnisse in Tabelle 29 und Abbildung 38 miteinander verglichen.

	Anzahl (Prozent)	Mittelwert			Median		
		Wert	Standard- fehler	95% KI	Wert	Standard- fehler	95% KI
wt + TC <1%	157 (82,6)	69,361	7,711	54,248- 84,475	39,000	5,487	28,246- 49,754
wt + TC ≥1%	7 (3,7)	11,214	6,112	0,000- 23,194	8,000	9,165	0,000- 25,964
Mutation + TC <1%	22 (11,6)	25,660	7,278	11,396- 39,925	8,000	2,975	2,169- 13,831
Mutation + TC ≥1%	4 (2,1)	11,375	3,014	5,468- 17,282	9,000	3,055	3,012- 14,988
<b>Gesamt</b>	190 (100,0)	61,365	6,644	48,343- 74,388	35,000	4,084	26,995- 43,005

**Tabelle 29: Überlebensanalyse der Patienten aufgeteilt in Mutationsstatus und PD-L1 Expression auf den Tumorzellen.** Die Tabelle gibt eine Übersicht über den Mittelwert sowie den Median der Überlebenszeit in Monaten bezogen auf die kombinierten Variablen Mutationsstatus und PD-L1 Expression auf den Tumorzellen. Bereits eine PD-L1 Expression von TC ≥1% oder eine Mutation scheint mit einem Überlebensnachteil verbunden. Wenn beide Faktoren kombiniert auftreten (Mutation + TC ≥1%), verkürzt sich die Überlebenszeit nicht zusätzlich.



**Abbildung 38: Kaplan-Meier-Kurven für die vier Patientengruppen aufgeteilt in Mutationsstatus und PD-L1 Expression auf den Tumorzellen.** Die blaue Kurve stellt mit ihrem flachen Verlauf die längsten Überlebenszeiten in Monaten der Patientengruppe ohne Mutation sowie einem TC <1% PD-L1 Expression dar. Die übrigen drei Gruppen mit Vorhandensein von entweder einer Mutation und/oder einem TC ≥1% PD-L1 Expression verlaufen steil und brechen rasch ab. Der Wert des durchgeführten Log-Rank Tests beträgt hier <0,001.

Zusammenfassend zeigt sich ein im Median um 30 bis 31 Monate kürzeres Überleben beim Auftreten von einer Mutation und/oder einer PD-L1 Expression auf Tumorzellen von  $\geq 1\%$ . Das gleichzeitige Auftreten von beiden Faktoren scheint keine zusätzliche Verkürzung der Überlebenszeit zu bewirken. Der durchgeführte Log-Rank Test zeigt einen Wert von  $< 0,001$  und somit eine sehr hohe Signifikanz.

### 3.5 Korrelation zwischen PD-L1 Expression und anderen Variablen

Mittels des Korrelationskoeffizienten Cramer's V wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der PD-L1 Expression auf den Tumorzellen sowie den tumorspezifischen Immunzellen und anderen Variablen untersucht. Eine signifikante Korrelation wurde dabei zwischen der PD-L1 Expression und dem Mutationsstatus, sowie dem Differenzierungsgrad der Tumorzellen gefunden. So existiert eine schwache Korrelation (Cramer's V = 0,164) mit einer Signifikanz von  $p = 0,024$  zwischen einem TC  $< 1\%$  und  $\geq 1\%$  und dem Vorhandensein einer der untersuchten Mutationen. Zusätzlich besteht eine schwache Korrelation (Cramer's V = 0,185) mit einer Signifikanz von  $p = 0,046$  zwischen einem TC  $< 1\%$  und  $\geq 1\%$  und den verschiedenen Malignitätsgraden G1, G2 und G3.

## 4 Diskussion

### 4.1 Bewertung der DNA-Qualität und der Schmelzkurven

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 190 Fälle von intrahepatischen cholangiozellulären Karzinomen aus dem Institut für Pathologie an der Universität Regensburg untersucht. Das Alter der Proben betrug zum Zeitpunkt der Untersuchungen 0 bis 22 Jahre. Es ist naheliegend, dass die Qualität des Gewebes trotz einer sachgemäßen Präparation und Lagerung mit steigendem Alter abnimmt. In Zusammenschau der gemessenen DNA-Qualität ließ sich jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Alter der Proben und der DNA-Qualität feststellen. Setzt man beide Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  und  $A_{260}/A_{230}$  für eine gute Qualität voraus, so wiesen insgesamt 81 Proben (42,6%) eine gute und 109 Proben (57,4%) eine schlechtere Qualität auf. Letztere ließe sich durch folgende mögliche Ursachen erklären: Fixierungsartefakte durch Formaldehyd, fehlende Pufferung des Formalins bei bereits älteren Fällen, längere Fixierungszeiten, unzureichende Entparaffinierung während der Vorbereitung des Gewebes oder Verunreinigung der Proben während der Extraktion.

Auch die HRM-Methode, die als zeit- und materialsparende Methode zur ersten Detektion möglicher Mutationen gewählt wurde, ist kritisch zu hinterfragen. In einigen Fällen ergaben die Schmelzkurven kein eindeutiges Ergebnis (siehe 3.3). Hier können verschiedene Ursachen eine Rolle spielen. Zum einen ist die Konzentration und Qualität der DNA-Probe entscheidend. Auch die Art der Mutation und die Länge des amplifizierten DNA-Abschnitts sind bei dieser Methode nicht unerheblich. Nicht zuletzt kann auch während des Vorbereitungsvorgangs eine gelegentliche Verunreinigung der Proben nicht ausgeschlossen werden. Die Sequenzierung aller in der HRM-Untersuchung eindeutig positiven Fälle sowie auch der in der HRM-Analyse nicht sicher zu klassifizierenden Proben konnte hier weiteren Aufschluss geben. Die Sequenzierung der durch Farbe oder Kurvenverlauf in der HRM-Analyse auffälligen Fälle bestätigte in den meisten Fällen eine Mutation. Zudem wurden einige von den eindeutig negativen Fällen stichprobenartig ausgesucht und ebenfalls sequenziert. Unter diesen Proben befand sich wie erwartet keine Mutation. Die Auswahl der Proben, die einen nicht ganz eindeutigen Kurvenverlauf zeigten, erfolgte großzügig. Hier befanden sich sowohl mutierte Fälle als auch Wildtypen, sodass sich retrograd der Schmelzkurvenverlauf als entscheidendes Differenzierungsmerkmal erwies. Sofern alle möglichen Fehlerquellen beachtet werden, kann das High Resolution Melting aber insgesamt als eine zuverlässige Methode zum Nachweis von genetischen Aberrationen in großen Stichproben gesehen werden.

## 4.2 PD-L1 Expression in iCCA

Die PD-L1-Expression intrahepatischer cholangiozellulärer Karzinomen wurde in den vergangenen Jahren in mehreren Studien untersucht. Einige dieser Studien sind in Tabelle 30 zusammengefasst. Die Expression von PD-L1 auf den Tumorzellen reicht dabei von 9 bis 72%, auf den tumorassoziierten Immunzellen von 17 bis 63%. In dieser Arbeit wurde in 11 von 190 Fällen ein Wert von  $\geq 1\%$  im TC und in 92 von 190 Fällen ein Wert von  $\geq 1\%$  im IC erreicht.

Damit hat diese Arbeit von allen unten aufgezählten Studien den niedrigsten Anteil von 6% an PD-L1 positiven Proben in Bezug auf den TC. Beachtet man den deutlich höheren Cut-off-Wert bei der Bewertung der Ergebnisse in anderen Studien, erscheint dieses Resultat umso niedriger. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten zum einen daran liegen, dass die Einschätzung des Scores von der subjektiven Wahrnehmung des Betrachters abhängt. Um diesem Betrachter-Bias entgegenzuwirken, wurde jeder der 190 Fälle von mindestens zwei unabhängigen Auswertern analysiert (Alexandra Muggli, Dr. Katja Evert und Dr. Kirsten Utpatel) und ausgewertet. Fälle mit Abweichung wurden dann erneut gemeinsam mikroskopiert und zusammen bewertet.

Zum anderen könnten die unterschiedlichen Ergebnisse dadurch erklärt werden, dass nicht in allen Arbeiten derselbe PD-L1 Klon bei der IHC-Färbung verwendet wurde. In der Studie *Kriegsmann et al.* wurden drei Klone im Vergleich angeschaut, dabei zeigten sich Unterschiede im Färbeverhalten zwischen den Klonen 28-8 bzw. SP263 und dem Klon SP142 (117). Es ist bereits bekannt, dass die verschiedenen Antikörper eine unterschiedliche Intensität in den verschiedenen Zellen aufweisen. So wurde der Klon SP142 für die Detektion von Immunzellen etabliert, während z. B. der Klon SP263 eher für die Detektion von Tumorzellen entwickelt wurde (118). Der im Rahmen dieser Studie gewählte Antikörperklon 28-8 hat in Studien Färbeergebnisse gezeigt, die mit anderen Klonen vergleichbar sind (119). Auch wurden mit diesem Klon im Institut für Pathologie der Universität Regensburg bereits zahlreiche Ringversuche mit PD-L1 erfolgreich absolviert. Nicht zuletzt kann auch das Patientenkollektiv einen Einfluss auf unterschiedliche Ergebnisse ausgeübt haben.

In Bezug auf den IC dagegen zeigt diese Arbeit ähnliche Ergebnisse wie die anderen Studien. Hier ist allerdings zu bedenken, dass die Ergebnisse nur bedingt miteinander vergleichbar sind, da zum Beispiel in der Studie *Fortugne et al.* die PD-L1 positiven Immunzellen nicht mithilfe des IC ausgewertet, sondern die Immunzell-Cluster bei einer 400-fachen Vergrößerung ausgezählt wurden (89).

Keine der Studien hat eine signifikante Reduktion der Überlebenszeit im Zusammenhang mit der PD-L1 Expression auf den Immunzellen nachweisen können. Bei den Überlebensanalysen in Bezug auf die PD-L1 Expression auf den Tumorzellen wurde stets der Cut-off-Wert von  $\geq 5\%$  gewählt. Die Studie *Kriegsmann et al.* wählte zwar bei der Auswertung den Wert  $\geq 1\%$  für PD-L1 positive und  $< 1\%$  für PD-L1 negative Tumoren aus, konnte für diesen Grenzwert aber keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Überlebens der Patienten zeigen. Bei dem Cut-off-Wert von  $\geq 5\%$  konnten die Autoren einen Überlebensnachteil für Patienten mit der entsprechenden PD-L1 Expression auf den Tumorzellen des iCCA nachweisen (117).

Somit ist diese Arbeit die erste, die beweist, dass bereits ein Cut-off-Wert von  $\geq 1\%$  im TC mit einem signifikant höheren Risiko für den Patienten assoziiert ist (siehe 3.4.1). Was die PD-L1 Expression auf den Immunzellen betrifft, so zeigt auch diese Arbeit keinen Unterschied in den Überlebenskurven von positiven im Vergleich zu den negativen Patientenproben (siehe 3.4.2). Tabelle 30 gibt eine Übersicht über ähnliche Studien, ihre Stammdaten sowie die relevanten Ergebnisse im Vergleich zur eigenen Arbeit.

Studie	<i>Kriegsmann et al., 2019</i> (117)	<i>Jing et al., 2019</i> (120)	<i>Fontugne et al., 2017</i> (89)	<i>Zhu et al., 2018</i> (121)	<i>Gani et al., 2016</i> (88)	<i>Eigene Arbeit</i>
Land	D	CHN	F	CHN	USA	D
Anzahl	72 iCCA	153 iCCA	58 iCCA	192 iCCA	54 iCCA	190 iCCA
PD-L1 Klon	28-8 SP142 SP263	E1L3N	E1L3N	SP142	5H1	28-8
TC	8/72 (11%)	43/153 (28%)	5/58 (9%)	34/192 (18%)	39/54 (72%)	11/190 (6%)
IC	22/72 (31%)	26/153 (17%)	31/58 (53%)	-	34/54 (63%)	92/190 (48%)
Cut-off-Wert	≥1%	TC: ≥5% IC: ≥1%	TC: ≥5% IC: Cluster	≥5%	≥5%	≥1%
Ergebnis	≥1% im TC: OS ↔ (p=0,606) >5% im TC: OS↓ (p=0,024)  ≥1% im IC: OS ↔ (p=0,89) >5% im IC: OS ↔ (p=0,69)	≥5% im TC: OS ↔ (p=0,859)  ≥1% im IC: OS ↔ (p=0,489)	-	≥5% im TC: OS↓ (p=0,012)	≥5% im TC: OS↓ (p=0,008)  ≥5% im IC: OS ↔ (p>0,05)	≥1% im TC: OS↓ (p=0,002)  ≥1% im IC: OS ↔ (p=0,635)

**Tabelle 30: Übersicht über Studien, die die PD-L1-Expression im CCA untersucht haben und ihre Ergebnisse, inklusive eigener Arbeit;** CHN: China; D: Deutschland; F: Frankreich; USA: United States of America; OS: Overall Survival

### 4.3 Rolle der Begleiterkrankungen

Begleiterkrankungen tragen zu einer Verschlechterung des Allgemeinzustands eines Krebspatienten bei. Gleichzeitig können sie die Entstehung bestimmter Krebsarten erst begünstigen und entsprechen somit Risikofaktoren. Die in dieser Arbeit untersuchten Begleiterkrankungen zählen zu den häufigsten in der westlichen Bevölkerung. In unserer Stichprobe von 190 Patienten war die arterielle Hypertonie mit 55,79%, Adipositas mit 28,42% und Diabetes mellitus Typ 2 mit 23,68% vertreten. Alle drei Begleiterkrankungen werden immer wieder als Risikofaktoren für die Entstehung des iCCA benannt und untersucht (122–124). Zum Einfluss der Begleiterkrankungen auf das Outcome der iCCA-Patienten gibt es aber bisher wenig Daten.

Die Studie *Surapaneni et al.* aus dem Jahr 2019 untersuchte die Auswirkung von Adipositas auf das Gesamtüberleben von 152 Patienten mit iCCA. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied im Outcome zwischen den adipösen, übergewichtigen und normalgewichtigen Patienten nachgewiesen werden (125). So betrug die Überlebensrate für normalgewichtige iCCA-Patienten nach 3 Jahren nach der Diagnosestellung 31%, die der übergewichtigen Patienten 25% und die der adipösen Patienten 27% ( $p=0,8766$ ). Auch die vorliegende Arbeit ergab keinen Hinweis auf eine durch Adipositas verursachte Risikoerhöhung, an einem iCCA zu versterben (siehe 3.1.5).

Anders sieht es bei Diabetes mellitus Typ 2 als Begleiterkrankung aus. In der durchgeführten Cox-Regression ergab die Berechnung des Hazard Ratios (HR) ein um 136% höheres Risiko für den Eintritt des Todes bei Vorliegen eines DM Typ 2 (siehe 3.1.5). Auch die Kaplan-Meier-Kurven bestätigten dieses Ergebnis. So betrug die mediane Überlebenszeit für Patienten ohne DM 39 Monate, während sie für Patienten mit dieser Erkrankung lediglich 17 Monate betrug (siehe 3.1.5.2). Einschränkend muss hier jedoch erwähnt werden, dass aus den erfassten Daten nicht hervorgeht, ob die Patienten an der Folge der Tumorerkrankung verstorben sind, oder ob hier andere Todesursachen vorlagen, die z. B. auf den Diabetes mellitus zurückzuführen sind. Eine im Jahr 2017 von *Waseem et al.* durchgeführte Studie stützt dieses Ergebnis allerdings nicht. Überlebensanalysen, die retrospektiv an 242 Fällen von cholangiozellulären Karzinomen, darunter 90 iCCAs, durchgeführt wurden, ergaben keinen signifikanten Einfluss von DM Typ 2 sowie anderen Begleiterkrankungen wie Leberzirrhose, Alkohol- und Nikotinabusus oder PSC auf das Gesamtüberleben der iCCA-Patienten (126). Es können viele Gründe für die Diskrepanz der Ergebnisse beider Arbeiten verantwortlich sein. Zum einen spielt die Dauer der

Erkrankung eine wichtige Rolle. Zum anderen ist die Compliance des Patienten bei der Therapie von DM Typ 2 nicht unerheblich für den Therapieerfolg und somit das Outcome. Der genaue Mechanismus hinter dem Einfluss von Diabetes auf den Krankheitsverlauf der iCCA-Patienten sollte Gegenstand weiterführender Forschung sein. Auch sind hier weitere Analysen bezüglich weiterer möglicher Einflussgrößen notwendig, die in weiteren Studien mitanalysiert werden sollten.

Einen besonderen Stellenwert nehmen strukturelle Lebererkrankungen sowohl bei der Entstehung von Krebs als auch im Krankheitsverlauf ein. In dieser Arbeit ließ sich bei der Auswertung des Fibrosestatus eine eher kleine Anzahl an Patienten mit höhergradiger Fibrose oder gar Leberzirrhose feststellen. Insgesamt zeigten lediglich 5,3% (n = 10) der untersuchten Fälle einen Fibrosegrad von 5 oder 6. Die Studie *Zhang et al.* aus dem Jahr 2020, die die Auswirkung des Fibrosegrades auf das Outcome von Patienten mit iCCA untersuchte, zählte unter den insgesamt 729 Fällen 63,9% (n = 465) mit geringerer Fibroseausprägung und 36,1% (n = 264) mit Fibrosegrad 5 oder 6 (127). Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte einerseits die insgesamt deutlich kleinere Fallzahl und somit geringere Repräsentanz sein. Auch erscheint nicht abwegig, dass Patienten mit fortgeschrittener Fibrose bzw. bekannter Zirrhose (insbesondere alkoholtoxischer Genese) seltener regelmäßige, halbjährlich empfohlene Ultraschall-Untersuchungen des Leberparenchyms zur Krebsvorsorge wahrnehmen und demnach die Diagnose eines möglichen iCCA in einem nicht mehr resezierbaren Stadium erhalten haben könnten. Da die in dieser Arbeit untersuchten Proben ausschließlich reseziertes Gewebe darstellen, könnte dies ebenfalls die Ergebnisse beeinflusst haben und die Abweichungen zu den anderen Studien erklären.

#### 4.4 Mutationsstatus

Von den insgesamt 190 untersuchten intrahepatischen cholangiozellulären Karzinomen waren 26 (13,7%) Tumoren mutiert. Davon gehörten 20 Fälle (10,5%) der Gruppe der *KRAS*-Mutationen an, *NRAS*-Mutationen waren mit 2 Fällen (1,1%) und *BRAF* mit 4 Fällen (2,1%) vertreten. Mehrere Studien untersuchten bereits die molekularen Aberrationen im iCCA und ihre Folgen für die Patienten (Tabelle 31). In den Studien finden sich *KRAS*-Mutationen in 8,6% bis 13,6% der Fälle, die in unserem Kollektiv nachgewiesene *KRAS*-Mutationsrate von 10,5% ist hier vergleichbar mit diesen Ergebnissen. *NRAS*- oder *BRAF*-Mutationen sind in unserem Kollektiv etwas seltener nachweisbar als innerhalb der aufgeführten Studien, wobei auch innerhalb der Studien die Ergebnisse etwas schwanken. Diese etwas abweichenden Ergebnisse

könnten sich zum Beispiel durch die Zusammensetzung des Kollektivs erklären, ggf. könnte sich durch eine Erhöhung der Fallzahlen eine Angleichung ergeben.

Beim Betrachten des Outcomes der Patienten im Hinblick auf den Mutationsstatus sind bei den verschiedenen Arbeiten unterschiedliche Ergebnisse zu verzeichnen. Die vier Studien, die die Überlebensanalyse für *KRAS*-mutierte iCCAs durchgeführt haben, kommen zu dem Ergebnis, dass diese Mutation das Gesamtüberleben signifikant verkürzt. So kann man der Arbeit von *Zhu et al.* aus dem Jahr 2014 entnehmen, dass das mediane Überleben der Patienten mit Wildtyp 31,35 Monate, während das der Patienten mit einer *KRAS*-Mutation im Median 20,33 Monate betrug (102). Auch die Publikation von *Zhou et al.* aus dem Jahr 2021 mit der größten Stichprobe von 1024 iCCAs untersuchte das Outcome der Patienten im Zusammenhang mit der *KRAS*-Mutation. Die Autoren fanden ein signifikant kürzeres Überleben der Patienten mit der besagten Mutation, stellten aber einen Unterschied unter den verschiedenen *KRAS*-Varianten fest. Während die G12 Varianten der *KRAS*-Mutation ein medianes Überleben von 11,3 Monaten aufwiesen, präsentierten die anderen Varianten ein Überleben von 29,1 Monaten, was in etwa dem medianen Überleben von Wildtyp-Tumoren (28,9 Monate) glich (128).

Wie im Kapitel 3.4.3 gezeigt, wurde in dieser Arbeit ein signifikant schlechteres Outcome für iCCA-Patienten mit einer *KRAS*-Mutation (medianes Überleben von 8 Monaten) im Vergleich zum Wildtyp (medianes Überleben von 3 Jahren) ( $p < 0,001$ ) nachgewiesen. Das insgesamt deutlich kürzere Überleben unterscheidet sich von den Ergebnissen der oben genannten Studien. Als Gründe hierfür liegen auch in diesem Fall die Zusammensetzung des Kollektivs sowie womöglich das zum Zeitpunkt der Diagnose fortgeschrittene Tumorstadium nahe.

Die einzige Arbeit, die sich ausschließlich mit der *BRAF*-Mutation im iCCA beschäftigt hat, war die Publikation von *Goepfert et al.* im Jahr 2014. Hier wurde kein Unterschied zwischen mutierten Fällen und dem Wildtyp im Hinblick auf das Gesamtüberleben nachgewiesen (104). Auch die Arbeit *Zhu et al.* konnte in den Überlebensanalysen keinen signifikanten Überlebensnachteil durch die *BRAF* Mutationen aufzeigen (102).

Anders verhält es sich im Regensburger Kollektiv. Auch für die *BRAF*-Mutation wurde ein signifikant schlechteres Outcome (medianes Überleben von 6 Monaten) im Vergleich zum Wildtyp (medianes Überleben von 3 Jahren) ( $p < 0,001$ ) aufgezeigt. Der Unterschied in den Ergebnissen lässt sich vor allem mit der eher kleinen Stichprobengröße erklären. Um das Ergebnis dieser Arbeit, besonders im Hinblick auf die *BRAF*-Mutation, zu verifizieren, benötigt es weiterer prospektiver Untersuchungen im größeren Umfang.

Studie	<i>Zhou et al., 2021</i> (128)	<i>Sia et al., 2018</i> (100)	<i>Zhu et al., 2014</i> (102)	<i>Jang et al., 2014</i> (101)	<i>Goeppert et al., 2014</i> (104)	<i>Eigene Arbeit</i>
Land	CHN	ESP, USA, BEL	USA, ROU, BEL, CHN	KOR	D	D
Anzahl	1024 iCCA	149 iCCA	162 iCCA	81 iCCA	159 iCCA	190 iCCA
<b>KRAS</b>	12,4% (127)	-	8,6% (14)	13,6% (11)	-	10,5% (20)
<b>NRAS</b>	-	-	3,1% (5)	8,6% (7)	-	1,1% (2)
<b>BRAF</b>	-	-	4,9% (8)	3,7% (3)	3% (5)	2,1% (4)
<b>Ergebnis</b>	wt: 28,9 M  <i>KRAS</i> : OS↓ (p<0.001)  <i>KRAS</i> Variante G12: 11,3 M  <i>KRAS</i> andere Varianten: 29,1 M (p=0,009)	Aufteilung in inflammatorischen Typ (38%; OS 47,2 M) und proliferativen Typ (62%; OS 24,3 M). Letzterer unter anderem durch RAS-Aktivierung gekennzeichnet: OS↓ (p=0,048)	wt: 31,4 M  <i>KRAS</i> : 20,33 M (p=0,07) <i>BRAF</i> : 25,46 M (p=0,92) <i>NRAS</i> : 28,62 M (p=0,98) <i>KRAS</i> oder <i>BRAF</i> : 20,3 M (p=0,17)	<i>KRAS</i> : OS↓ (p=0,0075)	<i>BRAF</i> : OS ↔ (p=0,38)	wt: 36 M  <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> oder <i>BRAF</i> -Mutation: OS↓ (p=0.001)  <i>KRAS</i> : OS↓ auf 8 M (p<0.001)  <i>BRAF</i> : OS↓ auf 6 M (p<0.001)

**Tabelle 31: Übersicht über Studien, die *KRAS*-, *NRAS*- und *BRAF*-Mutationsstatus in CCA untersucht haben, und ihre Ergebnisse; BEL: Belgien; CHN: China; D: Deutschland; ESP: Spanien; KOR: Südkorea; ROU: Rumänien; USA: United States of America; M: Monate; OS: Overall Survival**

#### 4.5 Hemmung von PD-1/PD-L1 in CCA

Sowohl bei hämatologischen als auch bei soliden Tumoren wurde bereits ein Zusammenhang zwischen der PD-L1 Expression und dem Ansprechen auf die Immuncheckpoint Therapie festgestellt.

Wie bereits in Kapitel 1.2.4 erwähnt, finden Immuncheckpoint-Inhibitoren breite Anwendung in der Therapie von diversen Tumorentitäten, sowohl abhängig von der PD-L1 Expression als auch unabhängig davon. In der 1st Line Therapie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms beispielsweise sind Atezolizumab, Cemiplimab, Durvalumab, Nivolumab und Pembrolizumab als Monotherapie oder in Kombination mit Chemotherapeutika zugelassen. Auch finden Nivolumab in Kombination mit platinbasierter Chemotherapie in der neoadjuvanten und Atezolizumab in der adjuvanten Therapie als Monotherapie nach vollständiger Resektion und platinbasierter Chemotherapie bei erwachsenen Patienten mit hohem Risiko für ein Rezidiv Anwendung.

Bei der Zulassung der Immuncheckpoint-Inhibitor-Therapie für biliäre Tumoren im Allgemeinen werden anhand der neuesten Studien zwei Inhibitoren im Rahmen einer Systemtherapie in Kombination mit Gemcitabin und Cisplatin von der deutschen Leitlinie als Erstlinientherapie empfohlen (24). Wie bereits in Kapitel 1.1.4 erwähnt, erfolgte die Zulassung von Durvalumab (IMFINZI®) in Kombination mit Gemcitabin und Cisplatin zur Behandlung von nicht resezierbaren oder metastasierten biliären Tumoren unabhängig vom PD-L1 Status auf Grundlage der Ergebnisse der Phase-III-Studie TOPAZ-1. In dieser Studie wurden insgesamt 685 Patienten nach dem Zufallsprinzip einer Therapie mit Durvalumab (n=341) oder Placebo (n=344) in Kombination mit der oben genannten Chemotherapie zugeteilt. Das Gesamtüberleben für 24 Monate betrug dabei für die Durvalumab Gruppe 24,9 %, während für die Placebo Gruppe lediglich 10,4 % Wahrscheinlichkeit erreicht wurde. Dabei ergab die Studie keinen Vorteil im Ansprechen auf die Therapie mit Durvalumab zwischen den Tumoren mit einem  $TC \geq 1\%$  und  $TC < 1\%$  (50). Auf Grundlage der Ergebnisse einer weiteren Phase-III-Studie KEYNOTE-966 erfolgte auch die Zulassung für Pembrolizumab (KEYTRUDA®) in selbiger Kombination zur systemischen Therapie. In dieser Studie wurden insgesamt 1069 Patienten mit fortgeschrittenem biliären Karzinom randomisiert in zwei Gruppen unterteilt (Pembrolizumab Gruppe n=533, Placebo Gruppe n=536). Nach 24 Monaten betrug die geschätzte Überlebensrate der Patienten in der Pembrolizumab Gruppe ca. 25%, während die der Placebo Gruppe ca. 18% erreichte. Auch im medianen Gesamtüberleben unterschieden sich

die beiden Gruppen mit 12,7 Monaten in der Pembrolizumab Gruppe und 10,9 Monaten in der Placebo Gruppe deutlich (51).

Zum cholangiozellulären Karzinom existieren einige weitere Studien, die die Wirksamkeit der PD-1/PD-L1 Hemmung untersuchen. In der KEYNOTE-028 Phase Ib Studie wurde Pembrolizumab als Monotherapie an 23 ausgewählten Patienten mit biliary tract cancer (BTC; iCCA, eCCA, Gallenblasen- und Papillenkarcinom eingeschlossen) mit positiver PD-L1 Expression untersucht. 3 von ihnen (13%) zeigten ein partielles Ansprechen, das progressionsfreie Überleben betrug 1,8 Monate und die mediane Überlebenszeit 6,2 Monate. Eine größere Phase II Studie zu Pembrolizumab (KEYNOTE-158) mit 104 Patienten zeigte eine objektive Ansprechrates von 5,8% (6 Patienten), ein Gesamtüberleben von 7,4 Monaten und ein progressionsfreies Überleben von 2 Monaten. In dieser Studie waren sowohl Patienten mit positiver als auch mit negativer PD-L1 Expression inkludiert und es zeigte sich auch hier keine Korrelation zwischen dem Ansprechen auf die Therapie und dem PD-L1 Status (129).

Eine Phase II Studie aus dem Jahr 2020 untersuchte die Wirkung von Nivolumab, einem PD-1 Inhibitor, an 54 Patienten mit fortgeschrittenem BTC. Hier erreichten 22% partielles Ansprechen auf die Therapie, 38% verweilten im Stadium der stabilen Erkrankung. Die mediane Überlebenszeit betrug 14,2 Monate und ein progressionsfreies Überleben von 4 Monaten. Interessanterweise wiesen die 18 PD-L1 positiven ( $TC \geq 1\%$ ) Patienten ein längeres medianes progressionsfreies Überleben auf (HR: 0,23, 95% KI: 0.10-0.51;  $p < 0.001$ ) (130).

Um die Ansprechrates der Immuncheckpoint Therapie zu erhöhen, kann man sie mit anderen Therapeutika wie Chemotherapie, lokaler Therapie oder anderen Immuncheckpoint Inhibitoren kombinieren. *Koido et al.* konnten zeigen, dass eine vorherige Stimulation intrahepatischer cholangiozellulärer Karzinomzellen mit Chemotherapeutika wie Gemcitabin oder 5-Fluorouracil die Expression von Immuncheckpoint Rezeptoren hochregulieren kann (131).

Eine Studie aus China untersuchte 30 Patienten, die am metastasierten BTC litten und Nivolumab als Monotherapie oder in Kombination mit Gemcitabin, Oxaliplatin oder Nab-Paclitaxel erhielten. Die partielle Ansprechrates betrug 16,7%, das progressionsfreie Überleben während der Monotherapie war kürzer als das während der Kombinationstherapie (2,1 vs. 4,3 Monate). Ob der Tumor PD-L1 positiv oder negativ war, änderte nichts am progressionsfreien Überleben (3,6 vs. 3,0 Monate,  $p > 0,05$ ). Bei einem Patienten konnte eine komplette Regression erreicht werden (132).

In einer japanischen Phase I Studie wurde Nivolumab allein oder zusammen mit Cisplatin plus Gemcitabin in zwei verschiedenen Kohorten mit jeweils 30 BTC-Patienten getestet. Die Monotherapie-Kohorte hatte folgende Ergebnisse zu verzeichnen: Ansprechrate von 3,3% (1/30), mediane Überlebenszeit von 5,2 Monaten und progressionsfreies Überleben von 1,4 Monaten. Im Vergleich dazu präsentierte sich die Kohorte mit der Kombinationstherapie folgendermaßen: Ansprechrate von 36,7% (11/30), mediane Überlebenszeit von 15,4 Monaten und progressionsfreies Überleben von 4,2 Monaten. Abgesehen von den deutlich besseren Ergebnissen in der Gruppe mit der Kombinationstherapie, wiesen die Patienten mit PD-L1 positiven Tumorzellen ein längeres Gesamtüberleben als die mit PD-L1 negativem Tumor (11,6 vs. 5,2 Monate) auf (133).

Eine weitere Phase I Studie untersuchte die Kombination von Durvalumab, einem PD-L1 Hemmer, mit Tremelimumab. Dieser ist ebenfalls ein Immuncheckpoint Inhibitor, welcher an das Oberflächenprotein CTLA-4 bindet und damit die Herunterregulierung der T-Zell Aktivität hemmt. Von den 42 BTC-Patienten, die Durvalumab als Monotherapie erhalten haben, haben 2 Patienten (4,8%) ein partielles Ansprechen gezeigt. Das mediane Gesamtüberleben betrug in dieser Gruppe 8,1 Monate und das progressionsfreie Überleben 1,5 Monate. In der Gruppe mit beiden Immuncheckpoint Inhibitoren dagegen war die Ansprechrate höher. Von den 65 BTC Patienten reagierten 7 auf die Therapie (10,8%), das mediane Überleben zählte 10,1 Monate und das progressionsfreie Überleben 1,6 Monate (134).

Ramucirumab, ein Inhibitor des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors VEGFR-2, wurde in der Kombination mit Pembrolizumab an 26 Patienten mit fortgeschrittenem BTC untersucht. Dabei betrug die mediane Überlebenszeit lediglich 6,4 Monate und die progressionsfreie Zeit 1,6 Monate. Zwischen den PD-L1 positiven und PD-L1 negativen Tumoren unterschied sich zwar nicht die Zeit bis zum erneuten Fortschreiten der Erkrankung (1,5 vs. 1,6 Monate), dafür aber das Gesamtüberleben (11,3 vs. 6,1 Monate) (135).

In einer Phase II Studie wurde die Kombination von PD-1 Inhibitoren (Pembrolizumab oder Nivolumab) und dem Multikinase-Inhibitor Lenvatinib getestet. Von den 14 Patienten mit intrahepatischem cholangiozellulärem Karzinom haben 3 (21%) ein partielles Ansprechen gezeigt. 7 Tumoren wurden mithilfe des Next Generation Sequencing auf 450 Tumormutationen untersucht, 4 von ihnen wiesen eine hohe Tumormutationslast mit >12 Mutationen/Megabasenpaar auf. Diese hohe Mutationslast war stark mit einem besseren Ansprechen auf die durchgeführte Therapie assoziiert (136).

Aktuell werden viele Studien durchgeführt, in welchen weitere Kombinationen getestet werden. Die Studie NCT02821754 untersucht beispielsweise die Kombination von der Immuncheckpoint Therapie mit Durvalumab und Tremelimumab mit lokaler Therapie (TACE, RFA oder Kryotherapie) in HCC und BTC (137). Die Phase II Studie NCT03250273 testete die Kombination aus Nivolumab und Entinostat an Patienten mit fortgeschrittenem Cholangio- oder Pankreaskarzinom. Entinostat ist eine experimentelle Substanz, die zu den epigenetisch modulierenden Medikamenten gehört. Als Histon-Deacetylase Inhibitor ist Entinostat in der Lage, die Expression Zellzyklus regulierender Gene und die Tumorsensitivität für zytostatische Therapie zu beeinflussen (138). Rucaparib gehört zu der Substanzklasse der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) Inhibitoren und wird bereits in der Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms eingesetzt. Durch die Hemmung des PARP Enzyms ist der Tumor nicht mehr in der Lage dazu, seine DNA-Einzelstrangbrüche zu reparieren, aus Einzelstrangbrüchen werden Doppelstrangbrüche, es folgt die Apoptose der Tumorzelle (139). Da bis zu 25% der BTC Patienten direkte molekulare Veränderungen in DNA-Reparaturgenen aufweisen, ist auch dieser Therapieansatz von großem Interesse (140). So wurde in einer Phase II Studie (NCT03639935) eine Kombination aus Rucaparib und Nivolumab als Erhaltungstherapie nach einer Erstlinien Chemotherapie an 31 Patienten mit fortgeschrittenem BTC getestet (141).

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass in allen oben erwähnten Studien kein Unterschied zwischen den einzelnen Tumorentitäten der biliären Karzinome gemacht wurde. Das ist auch der Grund, wieso die Ergebnisse sich nicht oder nur eingeschränkt auf die in dieser Arbeit untersuchten Patientengruppe übertragen lassen. Auch zeigten sich inkongruente Ergebnisse bezüglich des Therapieansprechens zwischen den Tumoren mit einem PD-L1 TC $\geq$ 1% und TC<1%. Diese Tatsache beweist, dass es weitere Studien mit dem Schwerpunkt auf die Ansprechrate auf die Immuncheckpoint-Therapie im Zusammenhang mit der PD-L1 Expression braucht. Mit weiteren Studien sowie der Ausdehnung der Datenlage könnten in Zukunft weitere Wirkstoffe aus der Gruppe der Immuncheckpoint-Inhibitoren eine Anwendung in Kombination mit bereits etablierten Verfahren wie Chemotherapie finden.

#### 4.6 Hemmung des Ras-Raf-MEK-ERK Signalweges in iCCA

Mutationen von *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* und anderen Komponenten des Ras-Raf-MEK-ERK Signalweges sind bei verschiedenen Krebsarten, darunter Magen-Darm-, Lungen- und Hautkrebs, bekannt und bilden mitunter den Ausgangspunkt für die derzeit eingesetzten

zielgerichteten Therapien. *KRAS* beispielsweise ist in etwa 25% aller Krebsarten verändert. Seit langer Zeit versuchen Forscher Substanzen zu entwickeln, die auf die einzelnen Strukturen dieses Signalweges abzielen, bislang mit geringem Erfolg. Grund hierfür ist die durch die Mutation verursachte stärkere Bindung des Proteins zum Energieträgermolekül Guanosintriphosphat (GTP) und der darauffolgenden Aktivierung des nachgeschalteten Signalweges, der an den Vorgängen wie Zellproliferation, Entwicklung, Differenzierung und Apoptose beteiligt ist und so die Krebsbildung fördert. Die festere Bindung verursacht eine glattere Oberfläche des Proteins und macht es potenziellen Agenzien schwer, direkt anzugreifen (142).

Bei der Behandlung verschiedener Krebsarten wie des Kolorektalen Karzinoms (CRC) oder des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms sind verschiedene Substanzen in Testung. AMG 510 (Sotorasib) und MRTX849 (Adagrasib) sind direkt wirkende Substanzen und inhibieren *KRAS* G12C irreversibel, indem sie das Protein in einem inaktiven Zustand fixieren. Zu den indirekten Wegen gehört beispielsweise die Hemmung des prenylbindenden Proteins (PDE $\delta$ ), welches eine wichtige Rolle bei der Interaktion von *KRAS* mit der zellulären Plasmamembran spielt. *KRAS*-mutierte kolorektale Karzinome haben sich als empfindlich gegenüber einem neueren G-Quadruplex (G4) Liganden namens EMICORON gezeigt, welcher eine Herunterregulierung der mRNA- und Proteinexpression von *KRAS* verursacht. Ein anderer Ansatz konzentriert sich auf die Mikro-RNA (miRNA) und ihre Rolle bei der Proliferation, Migration oder Apoptose der Zelle. Abhängig von der Gewebsart kann die miRNA sowohl als Tumorsuppressor als auch als Onkogen agieren. Experimentelle Studien an CRC-Zelllinien haben gezeigt, dass eine Herunterregulierung von miR-143 mit einer Hochregulierung des *KRAS*-Proteins verbunden war. Behandelte man die Zelllinien mit miR-143, stellte man eine Unterdrückung der *KRAS*-Translation fest (142, 143).

Trotz vieler Ansätze zur gezielten Behandlung von *KRAS*-mutierten Tumoren existieren keine Daten über eine solche Behandlung in der Therapie der cholangiozellulären Karzinome. Da - wie unter anderem in dieser Arbeit gezeigt - *RAS* Mutationen auch im cholangiozellulären Karzinom zu den häufigsten Mutationen zählen und in mehreren Studien eine Assoziation mit schlechterem Patientenoutcome gezeigt wurde, bedarf es in Zukunft intensiver Forschung auf diesem Gebiet der personalisierten Tumorthherapie.

Vemurafenib (PLX4032) und Dabrafenib (GSK2118436) sind zwei selektive und reversible *BRAF*-Inhibitoren und stellen ein positives Beispiel für die erfolgreiche Entwicklung der

Präzisionsmedizin dar. Beide haben sich in der Behandlung des *BRAF*-mutierten malignen Melanoms etabliert (144, 145). Zu dem Einsatz der *BRAF*-Inhibitoren im CCA gibt es allerdings wenig Daten.

Eine Phase II Studie (NCT01524978), die die Wirkung von Vemurafenib in anderen Tumorentitäten - darunter 8 CCA-Patienten – untersuchte, veröffentlichte im Jahr 2015 ihre Ergebnisse. Einer von 8 Patienten zeigte ein partielles Ansprechen (12%) und in 4 weiteren Patienten war die Krankheit stabil (50%) (146).

*Loaiza-Bonilla et al.* berichten über einen Fall einer 47-jährigen Patientin mit einem nicht resektablen, chemotherapie- und strahlentherapieresistenten, *BRAF* V600E mutierten und schlecht differenzierten iCCA. Nach einer Therapie mit einer Kombination aus Dabrafenib und Trametinib (einem MEK1/2-Inhibitor) verzeichneten die Behandler nach weniger als einem Monat eine Größenabnahme der Leberläsionen und einen Rückgang der Metastasen (147). In der folgenden ROAR (Rare Oncology Agnostic Research) Phase II Studie wurden 43 Patienten mit *BRAF* V600E mutiertem Cholangio- oder Gallenblasenkarzinom zwei Mal täglich mit 150 mg Dabrafenib und einmal täglich mit 2 mg Trametinib behandelt. Das Resultat war ein Ansprechen auf die Therapie von 20 Patienten (47%). In Hinblick auf diese hohe Ansprechrate empfehlen die Autoren deshalb, ein routinemäßiges Screening aller Patienten mit Cholangio- und Gallenblasenkarzinom auf eine *BRAF* V600E Mutation durchzuführen (148).

Ein weiterer *BRAF*-Inhibitor PLX8394 wurde in zwei weiteren klinischen Studien der Phase I/II getestet (NCT02428712, NCT02012231). Gegenstand der Untersuchung waren fortgeschrittene solide Tumoren, einschließlich CCA. Während eine der Studien abgebrochen wurde, liegen für die andere noch keine Ergebnisse vor (149). Die Multi-Kinase-Inhibitoren Regorafenib (BAY 73-4506) und Sorafenib (BAY 43-9006) sind ebenfalls vielversprechende Substanzen im Kampf gegen *BRAF*-mutierte CCAs und werden aktuell in mehreren Studien näher untersucht.

Obwohl bereits viele Ansätze der gezielten Therapie des cholangiozellulären Karzinoms existieren, sind ihre Ergebnisse dennoch nur bedingt auf das intrahepatische cholangiozelluläre Karzinom übertragbar. Sowohl die Entstehungsmechanismen und die Morphologie als auch das Ansprechen auf verschiedene Therapien und das Outcome der Patienten unterscheiden sich zwischen den einzelnen Subtypen. Unter dem Oberbegriff BTC sind sowohl die drei Subtypen des cholangiozellulären Karzinoms als auch das Gallenblasenkarzinom und das Karzinom der Papilla Vateri zusammengefasst. Da das cholangiozelluläre Karzinom selten ist, ist die

Rekrutierung von Patienten schwierig. Dies spiegelt sich in den kleinen Kohorten und der damit verbundenen geringen Aussagekraft der Studien wider. Für die Entwicklung gezielter Therapeutika müssen aus diesen Gründen zukünftig multizentrische, größer angelegte Studien durchgeführt werden, die zwischen den einzelnen Subtypen des cholangiozellulären Karzinoms unterscheiden. Die hier erhobenen Daten unterstreichen jedoch noch einmal die Wichtigkeit dieser Studien und es sollte versucht werden, möglichst viele der Patienten mit iCCA in Studien einzuschließen und somit die Therapieoptionen für diesen zwar seltenen, aber doch in der Inzidenz zunehmenden Tumor weiter zu untersuchen und zu optimieren. Hierzu können Patienten auch in ein molekulares Tumorboard eingeschlossen werden.

#### 4.7 Ausblick in die Zukunft

Im Zeitalter der Präzisionsmedizin ist es mittlerweile möglich, viele Krebsarten gezielt und abhängig von den spezifischen Veränderungen zu therapieren. Auch in der Therapie des cholangiozellulären Karzinoms existieren verschiedene Ansätze, die neue Substanzen wie Immuncheckpoint-Inhibitoren, Tyrosinkinase-Inhibitoren oder Kombinationen mit bereits bekannten Therapeutika untersuchen. Es erscheint nicht abwegig, dass durch die Ergebnisse der neuesten Forschungen ein Paradigmenwechsel in der Behandlung des cholangiozellulären Karzinoms stattfinden könnte. Patienten könnten zukünftig eine für sie und ihr genomisches Tumorprofil maßgeschneiderte Therapie erhalten, wodurch sich das Outcome und die Lebensqualität verbessern könnte. Leider gibt es bis heute nur wenige Daten zur Auswirkung zielgerichteter Therapeutika auf das intrahepatische CCA. Dies liegt nicht zuletzt an den sehr heterogenen Eigenschaften des Tumors.

Es wurde bereits eine Korrelation zwischen der Expression von PD-L1 und dem Ansprechen auf Immuntherapie in anderen soliden Tumoren festgestellt (150, 151). Zum cholangiozellulären Karzinom dagegen gibt es bisweilen wenige eindeutige Ergebnisse. Während einige Studien keinen Zusammenhang zwischen den beiden Faktoren feststellten (129, 132), fanden andere heraus, dass die PD-L1 positiven Tumoren durch einen deutlichen Therapieerfolg mit Verlängerung des Gesamtüberlebens gekennzeichnet waren (130, 133, 135). Allen Studien war gemein, dass kein einheitlicher Score bei der Auswertung der Immunhistochemie benutzt und die Expression auf den Tumor- und den Immunzellen teilweise nicht getrennt voneinander in Hinblick auf das Therapieansprechen betrachtet wurde. An die zukünftige Forschung stellt sich also nicht nur die Frage, ob die Immuncheckpoint-Inhibitor-

Therapie in der Behandlung des intrahepatischen CCA gute Ergebnisse erzielt, sondern auch, ob die Expression des programmed death Liganden 1 auf den Tumorzellen und/oder tumorspezifischen Immunzellen als prädiktiver Biomarker genutzt werden kann.

Mit dieser Arbeit wurde bewiesen, dass die PD-L1 Expression im iCCA bereits ab 1% der positiven Tumorzellen mit einer signifikant schlechteren Prognose für die Patienten einhergeht. Auch die Mutationen im Ras-Raf-MEK-ERK Signalweg und Diabetes mellitus Typ 2 als Begleiterkrankung reduzieren die Lebenserwartung. Hier müsste man in Zukunft die Dauer von DM Typ 2 vor der Krebsentstehung sowie die Qualität der antihyperglykämischen Therapie und die Compliance der Patienten berücksichtigen. Interessant wäre zudem, die genauen Mechanismen zu untersuchen, die bei der Verschlechterung des Outcomes eine Rolle spielen. Zur Beantwortung dieser Fragestellungen sind jedoch große prospektive Studien notwendig.

## 5 Zusammenfassung

Das intrahepatische cholangiozelluläre Karzinom ist eine seltene Tumorentität mit einer hohen Mortalität und einer schlechten Prognose, deren Inzidenz von Jahr zu Jahr zunimmt. Die jüngsten Fortschritte in der Medizin haben die Behandlung weg von reiner chirurgischer Resektion bzw. zytotoxischer Therapie in Richtung multimodaler Therapieansätze geführt, darunter zu Kombinationstherapien mit neuen Substanzen wie Immuncheckpoint-Inhibitoren. Zahlreiche Studien haben bereits den Zusammenhang zwischen cholangiozellulären Karzinomen und der PD-L1 Expression untersucht, ohne jedoch kongruente Ergebnisse zu liefern. Ziel dieser Arbeit war also unter anderem, eben diesen Zusammenhang mitsamt weiterer Faktoren wie etwa genetischer Abberationen und Komorbiditäten zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass iCCA-Patienten mit einer PD-L1 Expression auf den Tumorzellen von bereits  $\geq 1\%$  eine signifikant schlechtere Überlebenszeit zeigten als Patienten mit einer Expression von  $< 1\%$ . Die unterschiedliche Expression auf den tumorassoziierten Immunzellen zeigte keinen Zusammenhang mit einem schlechteren Outcome.

Auch spielt das Vorhandensein einer *KRAS*-, *NRAS*- oder *BRAF*-Mutation eine Rolle im Krankheitsverlauf. Mittels der High Resolution Melting Methode konnte eine schnelle und effiziente Mutationsanalyse für die insgesamt 190 Fälle erfolgen. In den Überlebensanalysen konnte aufgezeigt werden, dass sowohl das alleinige Vorliegen einer der oben genannten Mutation als auch die Kombination mit  $TC \geq 1\%$  die Lebenserwartung signifikant reduziert. Diabetes mellitus als Begleiterkrankung zeigte ferner ebenfalls einen Einfluss auf die Überlebenszeit.

Diese Erkenntnisse bieten die Möglichkeit, die Charakteristika dieser Tumorentität besser zu verstehen und somit gezieltere Therapiemöglichkeiten für betroffene Menschen im Sinne einer personalisierten Therapie zu gestalten. Inwieweit die Ergebnisse sich auf die Therapie mit PD-1/PD-L1-Inhibitoren übertragen lassen, ist eine Frage, die sich an die zukünftige Forschung stellt.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Banales JM, Cardinale V, Macias RIR, Andersen JB, Braconi C, Carpino G et al. Cholangiocarcinoma: State-of-the-art knowledge and challenges. *Liver Int* 2019; 39(Suppl 1):5–6.
2. Khan SA, Tavolari S, Brandi G. Cholangiocarcinoma: Epidemiology and risk factors. *Liver Int* 2019; 39(Suppl 1):19–31.
3. Bridgewater J, Galle PR, Khan SA, Llovet JM, Park J-W, Patel T et al. Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 2014; 60(6):1268–89.
4. Banales JM, Marin JJG, Lamarca A, Rodrigues PM, Khan SA, Roberts LR et al. Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2020; 17(9):557–88.
5. Cardinale V, Semeraro R, Torrice A, Gatto M, Napoli C, Bragazzi MC et al. Intra-hepatic and extra-hepatic cholangiocarcinoma: New insight into epidemiology and risk factors. *World J Gastrointest Oncol* 2010; 2(11):407–16.
6. Torbenson M, Zen Y, Yeh MM. Tumors of the liver. Washington, DC: American Registry of Pathology Armed Forces Inst. of Pathology; 2018. (AFIP atlas of tumor pathologyvSeries 4, 27).
7. Banales JM, Cardinale V, Carpino G, Marzioni M, Andersen JB, Invernizzi P et al. Expert consensus document: Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENSCCA). *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016; 13(5):261–80.
8. Sripa B, Kaewkes S, Sithithaworn P, Mairiang E, Laha T, Smout M et al. Liver Fluke Induces Cholangiocarcinoma. *PLoS Med* 2007; 4(7).
9. Dodson RM, Weiss MJ, Cosgrove D, Herman JM, Kamel I, Anders R et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: management options and emerging therapies. *J Am Coll Surg* 2013; 217(4):736-750.
10. Bergquist A, Ekbohm A, Olsson R, Kornfeldt D, Löf L, Danielsson A et al. Hepatic and extrahepatic malignancies in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 2002; 36(3):321–7.

11. Chapman RW. Risk factors for biliary tract carcinogenesis. *Annals of Oncology* 1999; 10 Suppl 4:308–11.
12. Boonstra K, Weersma RK, van Erpecum KJ, Rauws EA, Spanier BWM, Poen AC et al. Population-based epidemiology, malignancy risk, and outcome of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2013; 58(6):2045–55.
13. Zhou Y, Zhao Y, Li B, Huang J, Wu L, Xu D et al. Hepatitis viruses infection and risk of intrahepatic cholangiocarcinoma: evidence from a meta-analysis. *BMC Cancer* 2012; 12:289.
14. 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* 2012; 57(1):69–76.
15. Mavros MN, Economopoulos KP, Alexiou VG, Pawlik TM. Treatment and Prognosis for Patients With Intrahepatic Cholangiocarcinoma: Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Surg* 2014; 149(6):565–74.
16. Forner A, Vidili G, Rengo M, Bujanda L, Ponz-Sarvisé M, Lamarca A. Clinical presentation, diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. *Liver Int* 2019; 39(Suppl 1):98–107.
17. Cardinale V, Bragazzi MC, Carpino G, Di Matteo S, Overi D, Nevi L et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: review and update. *Hepatoma Research* 2018; 4(6):20.
18. Vidili G, Sio I de, D'Onofrio M, Mirk P, Bertolotto M, Schiavone C. SIUMB guidelines and recommendations for the correct use of ultrasound in the management of patients with focal liver disease. *J Ultrasound* 2019; 22(1):41–51.
19. Vilana R, Forner A, Bianchi L, García-Criado A, Rimola J, Lope CR de et al. Intrahepatic peripheral cholangiocarcinoma in cirrhosis patients may display a vascular pattern similar to hepatocellular carcinoma on contrast-enhanced ultrasound. *Hepatology* 2010; 51(6):2020–9.
20. Wildner D, Pfeifer L, Goertz RS, Bernatik T, Sturm J, Neurath MF et al. Dynamic Contrast-Enhanced Ultrasound (DCE-US) for the Characterization of Hepatocellular Carcinoma and Cholangiocellular Carcinoma. *Ultraschall in Med* 2014; 35(06):522–7.
21. Rimola J, Forner A, Reig M, Vilana R, Lope CR de, Ayuso C et al. Cholangiocarcinoma in cirrhosis: absence of contrast washout in delayed phases by magnetic resonance imaging avoids misdiagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009; 50(3):791–8.

22. Henedige TP, Neo WT, Venkatesh SK. Imaging of malignancies of the biliary tract- an update. *Cancer Imaging* 2014; 14:14.
23. Lamarca A, Barriuso J, Chander A, McNamara MG, Hubner RA, ÓReilly D et al. 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (18FDG-PET) for patients with biliary tract cancer: Systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 2019; 71(1):115–29.
24. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF. S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome, Langversion 5.0 2024; (AWMF-Registernummer: 032-053OL). Available from: URL: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/hcc-und-biliaere-karzinome/>.
25. Macias RIR, Banales JM, Sangro B, Muntané J, Avila MA, Lozano E et al. The search for novel diagnostic and prognostic biomarkers in cholangiocarcinoma. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2018; 1864(4 Pt B):1468–77.
26. Rizvi S, Gores GJ. Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 2013; 145(6):1215–29.
27. Macias RIR, Kornek M, Rodrigues PM, Paiva NA, Castro RE, Urban S et al. Diagnostic and prognostic biomarkers in cholangiocarcinoma. *Liver Int* 2019; 39(Suppl 1):108–22.
28. Kendall T, Verheij J, Gaudio E, Evert M, Guido M, Goeppert B et al. Anatomical, histomorphological and molecular classification of cholangiocarcinoma. *Liver Int* 2019; 39(Suppl 1):7–18.
29. Blechacz B, Komuta M, Roskams T, Gores GJ. Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 8(9):512–22.
30. 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* 2010; 2(12):419–27.
31. Schirmacher P, Dienes HP, Jochum W, Trauner M, Lackner C, Denk H. Leber und intrahepatische Gallenwege: Neoplastische Erkrankungen [Maligne epitheliale Tumoren]. In: Höfler G, Kreipe H, Moch H, editors. *Lehrbuch Pathologie: Mit StudentConsult-Zugang*. 5. Auflage. München: Urban & Fischer in Elsevier; 2012. p. 659–61.
32. 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* 2015; 22(2):94–100.

33. 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* 2012; 4(5):94–102.
34. Komuta M, Govaere O, Vandecaveye V, Akiba J, van Steenberg W, Verslype C et al. Histological diversity in cholangiocellular carcinoma reflects the different cholangiocyte phenotypes. *Hepatology* 2012; 55(6):1876–88.
35. Wittekind C, editor. *TNM - Klassifikation maligner Tumoren*. Achte Auflage. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2017.
36. Bosman FT. WHO classification of tumours of the digestive system: [reflects the views of a working group that convened for an editorial and consensus conference at the International Agency for Research on Cancer (IARC) Lyon December 10 - 12 2009 ; third volume of the 4th edition of the WHO series on histological and genetic typing of human tumours]. 4. ed., 1. print run. Lyon: Internat. Agency for Research on Cancer; 2010. (World Health Organization classification of tumours).
37. Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD. Cholangiocarcinoma. *The Lancet* 2005; 366(9493):1303–14.
38. Nathan H, Pawlik TM, Wolfgang CL, Choti MA, Cameron JL, Schulick RD. Trends in survival after surgery for cholangiocarcinoma: a 30-year population-based SEER database analysis. *J Gastrointest Surg* 2007; 11(11):1488-97.
39. Khan SA, Davidson BR, Goldin RD, Heaton N, Karani J, Pereira SP et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update. *Gut* 2012; 61(12):1657–69.
40. Endo I, Gonen M, Yopp AC, Dalal KM, Zhou Q, Klimstra D et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: rising frequency, improved survival, and determinants of outcome after resection. *Ann Surg* 2008; 248(1):84–96.
41. Choi S-B, Kim K-S, Choi J-Y, Park S-W, Choi J-S, Lee W-J et al. The prognosis and survival outcome of intrahepatic cholangiocarcinoma following surgical resection: association of lymph node metastasis and lymph node dissection with survival. *Ann Surg Oncol* 2009; 16(11):3048–56.
42. Wang Y, Li J, Xia Y, Gong R, Wang K, Yan Z et al. Prognostic nomogram for intrahepatic cholangiocarcinoma after partial hepatectomy. *J Clin Oncol* 2013; 31(9):1188–95.

43. Li Y, Li H, Lv P, Liu G, Li X, Tian B et al. Prognostic value of cirrhosis for intrahepatic cholangiocarcinoma after surgical treatment. *J Gastrointest Surg* 2011; 15(4):608–13.
44. Sapisochín G, Fernández de Sevilla E, Echeverri J, Charco R. Liver transplantation for cholangiocarcinoma: Current status and new insights. *World J Hepatol* 2015; 7(22):2396–403.
45. Cillo U, Fondevila C, Donadon M, Gringeri E, Mocchegiani F, Schlitt HJ et al. Surgery for cholangiocarcinoma. *Liver Int* 2019; 39(Suppl 1):143–55.
46. Marin JJG, Lozano E, Briz O, Al-Abdulla R, Serrano MA, Macias RIR. Molecular Bases of Chemoresistance in Cholangiocarcinoma. *Curr Drug Targets* 2017; 18(8):889–900.
47. Glimelius B, Hoffman K, Sjöden PO, Jacobsson G, Sellström H, Enander LK et al. Chemotherapy improves survival and quality of life in advanced pancreatic and biliary cancer. *Ann Oncol* 1996; 7(6):593–600.
48. Primrose JN, Fox RP, Palmer DH, Malik HZ, Prasad R, Mirza D et al. Capecitabine compared with observation in resected biliary tract cancer (BILCAP): a randomised, controlled, multicentre, phase 3 study. *The Lancet Oncology* 2019; 20(5):663–73.
49. Shroff RT, Kennedy EB, Bachini M, Bekaii-Saab T, Crane C, Edeline J et al. Adjuvant Therapy for Resected Biliary Tract Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline. *JCO* 2019; 37(12):1015–27.
50. Oh D-Y, Ruth He A, Qin S, Chen L-T, Okusaka T, Vogel A et al. Durvalumab plus Gemcitabine and Cisplatin in Advanced Biliary Tract Cancer. *NEJM Evidence* 2022; 1(8).
51. Kelley RK, Ueno M, Yoo C, Finn RS, Furuse J, Ren Z et al. Pembrolizumab in combination with gemcitabine and cisplatin compared with gemcitabine and cisplatin alone for patients with advanced biliary tract cancer (KEYNOTE-966): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2023; 401(10391):1853–65.
52. Valle Juan, Wasan Harpreet, Palmer Daniel H., Cunningham David, Anthony Alan, Maraveyas Anthony et al. Cisplatin plus Gemcitabine versus Gemcitabine for Biliary Tract Cancer. *N Engl J Med* 2010; 362(14):1273–81.
53. Okusaka T, Nakachi K, Fukutomi A, Mizuno N, Ohkawa S, Funakoshi A et al. Gemcitabine alone or in combination with cisplatin in patients with biliary tract cancer: a comparative multicentre study in Japan. *Br J Cancer* 2010; 103(4):469–74.

54. Valle JW, Furuse J, Jitlal M, Beare S, Mizuno N, Wasan H et al. Cisplatin and gemcitabine for advanced biliary tract cancer: a meta-analysis of two randomised trials. *Ann Oncol* 2014; 25(2):391–8.
55. André T, Reyes-Vidal JM, Fartoux L, Ross P, Leslie M, Rosmorduc O et al. Gemcitabine and oxaliplatin in advanced biliary tract carcinoma: a phase II study. *Br J Cancer* 2008; 99(6):862–7.
56. Jang J-S, Lim HY, Hwang IG, Song HS, Yoo N, Yoon S et al. Gemcitabine and oxaliplatin in patients with unresectable biliary cancer including gall bladder cancer: a Korean Cancer Study Group phase II trial. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 65(4):641–7.
57. Lamarca A, Palmer DH, Wasan HS, Ross PJ, Ma YT, Arora A et al. Second-line FOLFOX chemotherapy versus active symptom control for advanced biliary tract cancer (ABC-06): a phase 3, open-label, randomised, controlled trial. *Lancet Oncol* 2021; 22(5):690–701.
58. Kuhlmann JB, Blum HE. Locoregional therapy for cholangiocarcinoma. *Curr Opin Gastroenterol* 2013; 29(3):324–8.
59. Park S-Y, Kim JH, Yoon H-J, Lee I-S, Yoon H-K, Kim K-P. Transarterial chemoembolization versus supportive therapy in the palliative treatment of unresectable intrahepatic cholangiocarcinoma. *Clin Radiol* 2011; 66(4):322–8.
60. Konstantinidis IT, Groot Koerkamp B, Do RKG, Gönen M, Fong Y, Allen PJ et al. Unresectable intrahepatic cholangiocarcinoma: Systemic plus hepatic arterial infusion chemotherapy is associated with longer survival in comparison with systemic chemotherapy alone. *Cancer* 2016; 122(5):758–65.
61. Abou-Alfa GK, Macarulla T, Javle MM, Kelley RK, Lubner SJ, Adeva J et al. Ivosidenib in IDH1-mutant, chemotherapy-refractory cholangiocarcinoma (ClarIDHy): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol* 2020; 21(6):796–807.
62. Goyal L, Meric-Bernstam F, Hollebecque A, Valle JW, Morizane C, Karasic TB et al. Futibatinib for FGFR2-Rearranged Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *N Engl J Med* 2023; 388(3):228–39.
63. Abou-Alfa GK, Sahai V, Hollebecque A, Vaccaro G, Melisi D, Al-Rajabi R et al. Pemigatinib for previously treated, locally advanced or metastatic cholangiocarcinoma: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2020; 21(5):671–84.

64. Nakamura H, Arai Y, Totoki Y, Shiota T, Elzawahry A, Kato M et al. Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nat Genet* 2015; 47(9):1003–10.
65. Ye Y, Zhou L, Xie X, Jiang G, Xie H, Zheng S. Interaction of B7-H1 on intrahepatic cholangiocarcinoma cells with PD-1 on tumor-infiltrating T cells as a mechanism of immune evasion. *J Surg Oncol* 2009; 100(6):500–4.
66. Liang SC, Latchman YE, Buhmann JE, Tomczak MF, Horwitz BH, Freeman GJ et al. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur J Immunol* 2003; 33(10):2706–16.
67. Kythreotou A, Siddique A, Mauri FA, Bower M, Pinato DJ. PD-L1. *J Clin Pathol* 2018; 71(3):189–94.
68. Boussiotis VA. Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *N Engl J Med* 2016; 375(18):1767–78.
69. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008; 26:677–704.
70. Yokosuka T, Takamatsu M, Kobayashi-Imanishi W, Hashimoto-Tane A, Azuma M, Saito T. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J Exp Med* 2012; 209(6):1201–17.
71. Sheppard K-A, Fitz LJ, Lee JM, Benander C, George JA, Wooters J et al. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKC $\theta$ . *FEBS Lett* 2004; 574(1-3):37–41.
72. Patsoukis N, Li L, Sari D, Petkova V, Boussiotis VA. PD-1 increases PTEN phosphatase activity while decreasing PTEN protein stability by inhibiting casein kinase 2. *Mol Cell Biol* 2013; 33(16):3091–8.
73. Xing Y, Hogquist KA. T-cell tolerance: central and peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4(6).
74. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999; 11(2):141–51.
75. Nishimura H, Honjo T. PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. *Trends Immunol* 2001; 22(5):265–8.

76. Ansari MJI, Salama AD, Chitnis T, Smith RN, Yagita H, Akiba H et al. The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* 2003; 198(1):63–9.
77. Prokunina L, Castillejo-López C, Oberg F, Gunnarsson I, Berg L, Magnusson V et al. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet* 2002; 32(4):666–9.
78. Kroner A, Mehling M, Hemmer B, Rieckmann P, Toyka KV, Mäurer M et al. A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2005; 58(1):50–7.
79. Prokunina L, Padyukov L, Bennet A, Faire U de, Wiman B, Prince J et al. Association of the PD-1.3A allele of the PDCD1 gene in patients with rheumatoid arthritis negative for rheumatoid factor and the shared epitope. *Arthritis Rheum* 2004; 50(6):1770–3.
80. Hayashi M, Kouki T, Takasu N, Sunagawa S, Komiya I. Association of an A/C single nucleotide polymorphism in programmed cell death-ligand 1 gene with Graves' disease in Japanese patients. *Eur J Endocrinol* 2008; 158(6):817–22.
81. Das S, Suarez G, Beswick EJ, Sierra JC, Graham DY, Reyes VE. Expression of B7-H1 on gastric epithelial cells: its potential role in regulating T cells during *Helicobacter pylori* infection. *Journal of immunology* 2006; 176(5):3000–9.
82. Iwai Y, Terawaki S, Ikegawa M, Okazaki T, Honjo T. PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *J Exp Med* 2003; 198(1):39–50.
83. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 2006; 12(10):1198–202.
84. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 2006; 443(7109):350–4.
85. Ehrlich Paul. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. In: Beiträge zur experimentellen Pathologie und Chemotherapie; 1909. p. 117–64.
86. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 1970; 13:1–27.

87. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 2002; 3(11):999–1005.
88. Gani F, Nagarajan N, Kim Y, Zhu Q, Luan L, Bhajjee F et al. Program Death 1 Immune Checkpoint and Tumor Microenvironment: Implications for Patients With Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2016; 23(8):2610–7.
89. Fontugne J, Augustin J, Pujals A, Rousseau B, Luciani A, Azoulay D et al. PD-L1 expression in perihilar and intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncotarget* 2017; 8(15).
90. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, Hwu W-J, Topalian SL, Hwu P et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012; 366(26):2455–65.
91. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; 366(26):2443–54.
92. Heinzerling L, Toni EN de, Schett G, Hunderfean G, Zimmer L. Checkpoint Inhibitors. *Dtsch Arztebl Int* 2019; 116(8):119–26.
93. Infothek Onkologie - Arzneimittel zur Behandlung von Krebs - eine Übersicht; 2025 [cited 2025 Jan 23]. Available from: URL: [https://www.bfarm.de/DE/Das-BfArM/EU-und-Internationales/Onkologie-in-der-EU/Infothek-Onkologie/\\_docs/2024-11-Uebersicht-AM.html](https://www.bfarm.de/DE/Das-BfArM/EU-und-Internationales/Onkologie-in-der-EU/Infothek-Onkologie/_docs/2024-11-Uebersicht-AM.html).
94. Cicala CM, Musacchio L, Scambia G, Lorusso D. Dostarlimab: From preclinical investigation to drug approval and future directions. *Hum Vaccin Immunother*; 19(1).
95. Yang Y, Pan J, Wang H, Zhao Y, Qu S, Chen N et al. Tislelizumab plus chemotherapy as first-line treatment for recurrent or metastatic nasopharyngeal cancer: A multicenter phase 3 trial (RATIONALE-309). *Cancer Cell* 2023; 41(6):1061-1072.e4.
96. Rajasekaran N, Wang X, Ravindranathan S, Chin DJ, Tseng S-Y, Klakamp SL et al. Toripalimab, a therapeutic monoclonal anti-PD-1 antibody with high binding affinity to PD-1 and enhanced potency to activate human T cells. *Cancer Immunol Immunother* 2024; 73(3):60.
97. Kang C. Retifanlimab: First Approval. *Drugs* 2023; 83(8):731–7.
98. Antoni R. Tumor Immunotherapy Directed at PD-1. *N Engl J Med* 2012; 366(26):2517–9.

99. Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O et al. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 1999; 18(3):813–22.
100. Sia D, Hoshida Y, Villanueva A, Roayaie S, Ferrer J, Tabak B et al. Integrative molecular analysis of intrahepatic cholangiocarcinoma reveals 2 classes that have different outcomes. *Gastroenterology* 2013; 144(4):829–40.
101. Jang S, Chun S-M, Hong S-M, Sung CO, Park H, Kang HJ et al. High throughput molecular profiling reveals differential mutation patterns in intrahepatic cholangiocarcinomas arising in chronic advanced liver diseases. *Mod Pathol* 2014; 27(5):731–9.
102. Zhu AX, Borger DR, Kim Y, Cosgrove D, Ejaz A, Alexandrescu S et al. Genomic profiling of intrahepatic cholangiocarcinoma: refining prognosis and identifying therapeutic targets. *Ann Surg Oncol* 2014; 21(12):3827–34.
103. Liao J-Y, Tsai J-H, Yuan R-H, Chang C-N, Lee H-J, Jeng Y-M. Morphological subclassification of intrahepatic cholangiocarcinoma: etiological, clinicopathological, and molecular features. *Mod Pathol* 2014; 27(8):1163–73.
104. Goepfert B, Frauenschuh L, Renner M, Roessler S, Stenzinger A, Klauschen F et al. BRAF V600E-specific immunohistochemistry reveals low mutation rates in biliary tract cancer and restriction to intrahepatic cholangiocarcinoma. *Mod Pathol* 2014; 27(7):1028–34.
105. Stock S. Epidemiologie und Klinik des cholangiozellulären Karzinoms - eine retrospektive Studie [Dissertation]. Regensburg: Universität; 2024.
106. Brunt EM. Grading and Staging the Histopathological Lesions of Chronic Hepatitis: The Knodell Histology Activity Index and Beyond. *Hepatology* 2000; 31(1):241–6.
107. Moch H, Zimmermann DR, Probst-Hensch N. Pathologie: Aufgaben und Methoden: Methoden in der Pathologie. In: Höfler G, Kreipe H, Moch H, editors. *Lehrbuch Pathologie: Mit StudentConsult-Zugang*. 5. Auflage. München: Urban & Fischer in Elsevier; 2012. p. 3–17.
108. Jöhrens K, Büttner R, Dietel M, Sheel A. PD-L1 IHC beim Bronchialkarzinom. Qualitätssicherungs-Initiative Pathologie QuIP GmbH; 2017.
109. Armbrrecht M. Detektion von Kontaminationen in DNA und Protein-Proben durch photometrische Messungen: Application Note No. 279. Eppendorf; 2013.

110. Farrar JS, Wittwer CT. High Resolution Melting Curve Analysis for Molecular Diagnostics: Chapter 6. In: Patrinos GP, Ansorge W, Danielson PB, editors. *Molecular diagnostics*. 3rd edition. London, United Kingdom: Academic Press; 2017. p. 79–102.
111. Słomka M, Sobalska-Kwapis M, Wachulec M, Bartosz G, Strapagiel D. High Resolution Melting (HRM) for High-Throughput Genotyping-Limitations and Caveats in Practical Case Studies. *International Journal of Molecular Sciences* 2017; 18(11).
112. Netzger R. Zellzyklus und molekulare Genetik: Gentechnik und Nachweis bzw. Analyse von Nukleinsäuren. In: Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R, editors. *Biochemie*. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012. p. 482–91 (Duale Reihe).
113. Harrington CT, Lin EI, Olson MT, Eshleman JR. Fundamentals of pyrosequencing. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137(9):1296–303.
114. Ronaghi M. Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. *Genome Res*. 2001; 11(1):3–11.
115. Tausendpfund M. *Quantitative Datenanalyse: Eine Einführung mit SPSS*. Wiesbaden: Springer VS; 2019. (Springer eBooks Social Science and Law).
116. Briceño J, Padillo J, Rufián S, Solórzano G, Pera C. Assignment of steatotic livers by the Mayo model for end-stage liver disease. *Transpl Int* 2005; 18(5):577–83.
117. Kriegsmann M, Roessler S, Kriegsmann K, Renner M, Longuespée R, Albrecht T et al. Programmed cell death ligand 1 (PD-L1, CD274) in cholangiocarcinoma - correlation with clinicopathological data and comparison of antibodies. *BMC Cancer* 2019; 19(1):72.
118. Noske A, Wagner D-C, Schwamborn K, Foersch S, Steiger K, Kiechle M et al. Interassay and interobserver comparability study of four programmed death-ligand 1 (PD-L1) immunohistochemistry assays in triple-negative breast cancer. *Breast* 2021; 60:238–44.
119. Tsao MS, Kerr KM, Kockx M, Beasley M-B, Borczuk AC, Botling J et al. PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results of Blueprint Phase 2 Project. *J Thorac Oncol* 2018; 13(9):1302–11.
120. Jing C-Y, Fu Y-P, Yi Y, Zhang M-X, Zheng S-S, Huang J-L et al. HHLA2 in intrahepatic cholangiocarcinoma: an immune checkpoint with prognostic significance and wider expression compared with PD-L1. *J Immunother Cancer* 2019; 7(1):77.

121. Zhu Y, Wang X-Y, Zhang Y, Xu D, Dong J, Zhang Z et al. Programmed death ligand 1 expression in human intrahepatic cholangiocarcinoma and its association with prognosis and CD8+ T-cell immune responses. *Cancer Manag Res* 2018; 10:4113–23.
122. Petrick JL, Thistle JE, Zeleniuch-Jacquotte A, Zhang X, Wactawski-Wende J, van Dyke AL et al. Body Mass Index, Diabetes and Intrahepatic Cholangiocarcinoma Risk: The Liver Cancer Pooling Project and Meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2018; 113(10):1494–505.
123. Xiong J, Xu W, Huang H, Bian J, Lin J, Long J et al. Hypertension and risk of cholangiocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Transl. Cancer Res* 2018; 7(3):543–51.
124. Izquierdo-Sanchez L, Lamarca A, La Casta A, Buettner S, Utpatel K, Klumpen H-J et al. Cholangiocarcinoma landscape in Europe: Diagnostic, prognostic and therapeutic insights from the ENSCCA Registry. *J Hepatol* 2022; 76(5):1109–21.
125. Surapaneni PK, Li Z, Vemireddy LP, Kasi PM, Starr JS, Ritter A et al. Impact of obesity upon the survival of cholangiocarcinoma patients. *JCO* 2019; 37(4\_suppl):288.
126. Waseem D, Tushar P. Intrahepatic, perihilar and distal cholangiocarcinoma: Management and outcomes. *Ann Hepatol* 2017; 16(1):133–9.
127. Zhang JX, Li P, Chen Z, Lin H, Cai Z, Liao W et al. Impact of liver fibrosis score on prognosis after common therapies for intrahepatic cholangiocarcinoma: a propensity score matching analysis. *BMC Cancer* 2020; 20(1):556.
128. Zhou S-L, Xin H-Y, Sun R-Q, Zhou Z-J, Hu Z-Q, Luo C-B et al. Association of KRAS Variant Subtypes With Survival and Recurrence in Patients With Surgically Treated Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *JAMA Surg* 2021; 157(1):1–7.
129. Piha-Paul SA, Oh D-Y, Ueno M, Malka D, Chung HC, Nagrial A et al. Efficacy and safety of pembrolizumab for the treatment of advanced biliary cancer: Results from the KEYNOTE-158 and KEYNOTE-028 studies. *Int J Cancer* 2020; 147(8):2190–8.
130. Kim RD, Chung V, Alese OB, El-Rayes BF, Li D, Al-Toubah TE et al. A Phase 2 Multi-institutional Study of Nivolumab for Patients With Advanced Refractory Biliary Tract Cancer. *JAMA Oncol* 2020; 6(6):888–94.
131. Koido S, Kan S, Yoshida K, Yoshizaki S, Takakura K, Namiki Y et al. Immunogenic modulation of cholangiocarcinoma cells by chemoimmunotherapy. *Anticancer Res* 2014; 34(11):6353–61.

132. Gou M, Zhang Y, Si H, Dai G. Efficacy and safety of nivolumab for metastatic biliary tract cancer. *Onco Targets Ther* 2019; 12:861–7.
133. Ueno M, Ikeda M, Morizane C, Kobayashi S, Ohno I, Kondo S et al. Nivolumab alone or in combination with cisplatin plus gemcitabine in Japanese patients with unresectable or recurrent biliary tract cancer: a non-randomised, multicentre, open-label, phase 1 study. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* 2019; 4(8):611–21.
134. Ioka T, Ueno M, Oh D-Y, Fujiwara Y, Chen J-S, Doki Y et al. Evaluation of safety and tolerability of durvalumab (D) with or without tremelimumab (T) in patients (pts) with biliary tract cancer (BTC). *JCO* 2019; 37(4\_suppl):387.
135. Arkenau H-T, Martin-Liberal J, Calvo E, Penel N, Krebs MG, Herbst RS et al. Ramucirumab Plus Pembrolizumab in Patients with Previously Treated Advanced or Metastatic Biliary Tract Cancer: Nonrandomized, Open-Label, Phase I Trial (JVDF). *The Oncologist* 2018; 23(12):1407-e136.
136. Lin J, Shi W, Zhao S, Hu J, Hou Z, Yao M et al. Lenvatinib plus checkpoint inhibitors in patients (pts) with advanced intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC): Preliminary data and correlation with next-generation sequencing. *JCO* 2018; 36(4\_suppl):500.
137. Jakubowski CD, Azad NS. Immune checkpoint inhibitor therapy in biliary tract cancer (cholangiocarcinoma). *Chin Clin Oncol* 2020; 9(1):2.
138. Baretta M, Durham JN, Walker R, Mitcheltree A-L, Christmas B, Cope L et al. Entinostat in combination with nivolumab for patients with advanced cholangiocarcinoma and pancreatic adenocarcinoma. *JCO* 2018; 36(15\_suppl):TPS4151-TPS4151.
139. Dockery LE, Gunderson CC, Moore KN. Rucaparib: the past, present, and future of a newly approved PARP inhibitor for ovarian cancer. *Onco Targets Ther* 2017; 10:3029–37.
140. Abdel-Wahab R, Ali SM, Borad MJ, Shroff RT, Kwong L, Vauthey J-N et al. Variations in DNA repair genomic alterations and tumor mutation burden in biliary tract cancer (BTC) subtypes. *JCO* 2018; 36(4\_suppl):263.
141. Sahai V, Griffith KA, Goff LW, Crysler OV, Enzler T, Zalupski M. Phase 2 multicenter trial of rucaparib and nivolumab as maintenance therapy following first-line platinum-based chemotherapy in patients with advanced biliary tract cancer (BTC): BilT-02. *JCO* 2023; 41(16\_suppl):4113.

142. Mustachio LM, Chelariu-Raicu A, Szekvolgyi L, Roszik J. Targeting KRAS in Cancer: Promising Therapeutic Strategies. *Cancers (Basel)* 2021; 13(6).
143. Rahman S, Garrel S, Gerber M, Maitra R, Goel S. Therapeutic Targets of KRAS in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* 2021; 13(24).
144. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011; 364(26):2507–16.
145. Menzies AM, Long GV, Murali R. Dabrafenib and its potential for the treatment of metastatic melanoma. *Drug Des Devel Ther* 2012; 6:391–405.
146. Hyman DM, Puzanov I, Subbiah V, Faris JE, Chau I, Blay J-Y et al. Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers with BRAF V600 Mutations. *N Engl J Med* 2015; 373(8):726–36.
147. Loaiza-Bonilla A, Clayton E, Furth E, O'Hara M, Morrissette J. Dramatic response to dabrafenib and trametinib combination in a BRAF V600E-mutated cholangiocarcinoma: implementation of a molecular tumour board and next-generation sequencing for personalized medicine. *Ecancermedicalsecience* 2014; 8:479.
148. Subbiah V, Lassen U, Élez E, Italiano A, Curigliano G, Javle M et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with BRAFV600E-mutated biliary tract cancer (ROAR): a phase 2, open-label, single-arm, multicentre basket trial. *The Lancet Oncology* 2020; 21(9):1234–43.
149. Yang W, Sun Y. Promising Molecular Targets for the Targeted Therapy of Biliary Tract Cancers: An Overview. *Onco Targets Ther* 2021; 14:1341–66.
150. Taube JM, Klein A, Brahmer JR, Xu H, Pan X, Kim JH et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res* 2014; 20(19):5064–74.
151. Herbst RS, Soria J-C, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014; 515(7528):563–7.

## 7 Anhang

### 7.1 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen herzlich danken, die mich auf meinem Weg zur Promotion begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Frau PD Dr. med. Katja Evert, sowie meiner Betreuerin, Frau PD Dr. med. Kirsten Utpatel, für ihre verlässliche und engagierte fachliche Begleitung. Ihre zielgerichtete und stets konstruktive Beratung hat mir wertvolle Impulse gegeben und mir bei der Bearbeitung meines Themas sowohl inhaltlich als auch persönlich Sicherheit und Vertrauen vermittelt.

Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. med. Evert für die Bereitstellung des Themas sowie eines Forschungsplatzes. Dank auch an Prof. Dr. med. Calvisi für seine Unterstützung und Expertise. Ebenso an das gesamte Team der Pathologie an der Uniklinik Regensburg. Die Umsetzung dieser Arbeit wäre ohne die fachliche Kompetenz, die Unterstützung und die hilfreichen Ratschläge aller Beteiligten nicht möglich gewesen.

Von Herzen danken möchte ich auch meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Mann. Ihnen verdanke ich nicht nur meine akademische Ausbildung, sondern auch ihre bedingungslose Unterstützung in allen Lebenslagen.

## 7.2 Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift