

Aus I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Analyse der Expression des Enzyms Glyoxalase 1
in einem Kollektiv von Patientinnen und Patienten mit
cholangiozellulären Karzinomen der Universitätsmedizin Mainz

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Rebecca Victoria Centers
aus München

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

1. Gutachter: 

2. Gutachter: 

Tag der Promotion: 29. Juli 2026

Nachnutzungslizenz: CC-BY-4.0

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	X
1. Einleitung und Zielsetzung	1
2. Literaturdiskussion	2
2.1. Maligne biliäre Tumore	2
2.1.1. Anatomische Klassifikation	2
2.1.2. Epidemiologie	2
2.1.3. Risikofaktoren	4
2.1.4. Diagnostik	6
2.1.5. Stadieneinteilung	10
2.1.6. Karzinogenese	11
2.1.7. Therapie	12
2.1.8. Prognostische Faktoren	17
2.2. Glyoxalase 1	17
2.2.1. Das Glyoxalasesystem	17
2.2.2. Methylglyoxal und Glyoxalase 1 in malignen Tumoren.....	19
2.2.3. GLO1 und MDR	20
2.2.4. GLO1 Modulatoren	20
2.3. Zytokeratin 7	20
3. Kollektiv, Material und Methoden.....	22
3.1. Kollektiv und allgemeiner Verlauf.....	22
3.2. Materialien	22
3.3. Methoden	24
4. Auswertung	31
4.1. Klinische Daten und allgemeine Charakteristika des Kollektivs.....	31
4.2. Immunhistochemische Färbeargebnisse.....	36
4.2.1. CK7 Färbungen	37
4.2.2. GLO1-Färbungen.....	39

4.2.3. Korrelation der deskriptiven Analyse der GLO1-Färbungen mit den erhobenen klinischen Parametern.....	44
4.2.4. Überlebenszeitanalysen.....	51
5. Diskussion.....	61
5.1. Diskussionseinleitung	61
5.2. GLO1.....	61
5.2.1. Die Rolle der GLO in der Karzinogenese und der Therapie	61
5.2.2. Ergebnisse der deskriptiven Analyse zur GLO1	62
5.2.3. Ergebnisse der Überlebensanalysen	65
5.2.4. Ergebnisse der multiplen-Cox-Regression	68
5.3.Diskussion des Studiendesigns	70
6. Zusammenfassung und Ausblick.....	72
7. Literatur	74
8. Anhang.....	89
9. Danksagung	106

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
18F-FDG PET/CT	Fluorine-18 Fluordesoxyglucose PET/CT
3D	Dreidimensional
Abb.	Abbildung
AGE	Advanced Glycation Endproducts
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALT/GPT	Alanin-Aminotransferase/Glutamat-Pyruvat-Transaminase
AP	Alkalische Phosphatase
ARID1A	AT-rich interactive domain-containing protein 1A (AT= Adenin-Thymin-Basenpaare)
ASCOT	Multizentrische, randomisierte, unverblindete, kontrollierte Phase-3-Studie: „Adjuvant S-1 compared with observation in resected biliary tract cancer “
ASIR	Altersstandardisierte Inzidenzrate
ASMR	Altersstandardisierte Mortalitätsrate
AST/GOT	Aspartat-Aminotransferase/Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BBGC	S-p-bromobenzylglutathion
BILCAP	Multizentrische, randomisierte, unverblindete, kontrollierte Phase-3-Studie: „Capecitabine compared with observation in resected biliary tract cancer “
BRAF	Menschliches Gen, codiert für Serin/Threonin-Protein-Kinase B-Raf
BSC	Best-Supportive Care
CA19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CAM	Chorion-Allantoin-Membran
CCA	cholangiozelluläres Karzinom
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CK	Zytokeratin
COX2	Cyclooxygenase 2
CT	Computertomographie
DAB	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DWI-Sequenz	Diffusionsgewichtete Sequenz
dCCA	Karzinome der distalen extrahepatischen Gallengänge
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Enzyme Commission numbers (Klassifikationssystem für Enzyme)
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ENSCCA	European Network for the Study of Cholangiocarcinoma
EP	Ethylpyruvat
ER	Östrogenrezeptor
ERCP	Endoskopisch-Retrograde-Cholangio-Pankreatikographie
ESMO	European Society for Medical Oncology
et al.	et alii
FAS	Membranprotein der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptorfamilie
Fc-Region	Fragment crystallisable, konstante Region des Antikörpers
FGFR	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FOLFOX	5-Fluoruracil, Leucovorin, Oxaliplatin
G3P	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GBC	Karzinome der Gallenblase und des Ductus cysticus
GEMCIS	Gemcitabin und Cisplatin
GEMOX	Gemcitabin und Oxaliplatin
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
GLO1-3	Glyoxalase 1-3
GLOD1, GLO1	Glyoxalase 1 / Lactoylglutathion Lyase
HAI	Hepatische arterielle Infusion von Chemotherapeutika
Hb	Hämoglobin
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HER2/neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 / Neural
HGNC	HUGO (Human Genome Organization) Nomenclature Committee
HR	Hazard Ratio
HSP	Heat-Shock-Protein
ICD-10/ 11	International Statistical Classification of Disease and Related Health Problems, 10. Version / 11. Version
IDH1	Isocitrat-Dehydrogenase 1
IGF	Insulin-like Growth Factor
IHC	Immunhistochemie
IL6	Interleukin 6
IMBEI	Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik
INR	International Normalized Ratio
IRS	Immunreaktiver Score
JAK-STAT	Janus kinase and signal transducers and activators of transcription
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MDR	Multi Drug Resistance
MG	Methylglyoxal
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie

MCL1	Myeloid-Leukemia-Cell-Differentiation-Protein
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl der Merkmalsausprägungen
NO	Stickstoffmonoxid
NTRK	neurotrophe Tyrosinkinase
OR	Odds Ratio
OS	Overall Survival (Gesamtüberleben)
PD-L1	Programmed Death Ligand 1
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFS	Progressionsfreies Überleben
PGRN	Progranulin
PH	Proportionale Hazards
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
R0	Vollständige Tumoresektion
RAGE	AGE-Rezeptor
RFS	Rezidivfreie Überlebensrate
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rtu	Ready to Use (Gebrauchsfertig)
s.	siehe
S1	Tegafur in Kombination mit Gimeracil und Oteracil
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results Program
SIRT	Selektive interne Radiotherapie
SOCS3	Suppressor of Cytokine Signalling
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
STAT3	Signaltransduktionsweg, der das STAT3-Protein beinhaltet
Tab.	Tabelle
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TARE	Transarterielle Radioembolisation
TGF-alpha	Transforming Growth Factor Alpha
TGF-β	Transforming Growth Factor Beta
Tis	Tumor in situ
TNM	Primärtumor (T), Lymphknotenmetastasen (N) und Fernmetastasen (M)
TP53	Tumorsuppressorgen p53
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
vs.	versus
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
YAP	Yes-associated Protein

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einteilung der abführenden Gallenwege nach anatomischer Lokalisation in intrahepatisch-, extrahepatisch- und distal.	2
Abbildung 2: Weltweite Inzidenz des CCA: Weltweite Inzidenz (Fälle pro 100.000) des cholangiozellulären Karzinoms (CCA) im Zeitraum 1979 bis 2009.	4
Abbildung 3: Darstellung des Diagnosealgorithmus bei Verdacht auf ein Cholangiokarzinom der Leber.....	8
Abbildung 4: Einteilung der Wachstumsformen nach masseformend, periduktal-infiltrativ und intraduktal.....	10
Abbildung 5: Schematische Darstellung verschiedener pathomolekularer Einflussmechanismen auf das CCA.....	12
Abbildung 6: Sequenztherapie bei Cholangiokarzinomen laut Empfehlungen der S3-Leitlinie.	16
Abbildung 7: Das Glyoxalase System.....	18
Abbildung 8: Der Einfluss und die molekularen Mechanismen der AGE/RAGE Signalachse auf die Entstehung von Krebs.....	19
Abbildung 9: EnVision-Polymer-Konjugat-Methode.	25
Abbildung 10: CK7-Färbung der intrahepatischen Tumorpräparate	37
Abbildung 11: CK7-Färbung der extrahepatischen Tumorpräparate	38
Abbildung 12: GLO1-Färbung der intrahepatischen Tumorpräparate.....	39
Abbildung 13: GLO1-Färbung der extrahepatischen Tumorpräparate.....	40
Abbildung 14: Besonderheiten der GLO1-Färbung am Beispiel der intrahepatischen Tumorpräparate.....	41
Abbildung 15: Anzahl und Verteilung der GLO1-Expression im Gesamtkollektiv sowie den intrahepatischen und extrahepatischen Unterkollektiven.	44
Abbildung 16: Anzahl und Häufigkeitsverteilung der Lokalisation der GLO1-Färbung im Gesamtkollektiv sowie den intrahepatischen und extrahepatischen Unterkollektiven	44
Abbildung 17: Anzahl und Verteilung der Färbeergebnisse bezüglich des T-Stadiums bei eCCA.	45
Abbildung 18: Verteilung der positiven und negativen GLO1 Färbungen bei iCCA unter Betrachtung der Tumordifferenzierungsgrade.....	46
Abbildung 19: Verteilung der Färbeverhalten bei iCCA (links) und eCCA (rechts) in den Präparaten von männlichen und weiblichen Patienten und Patientinnen.....	47
Abbildung 20: Balkendiagramm für die Verteilung der GLO1-Expression im Bezug zum CA19-9 Status bei iCCA bei einem gewählten Curt-off-Wert von 37 U/ml.....	49
Abbildung 21: Kaplan-Meier-Kurve. Gesamtüberleben in Abhängigkeit der GLO1-Expression im Subkollektiv der intrahepatischen Tumore.....	52

Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurve zum Überleben im Gesamtkollektiv bei Betrachtung der GLO1-Expressionsstärke	53
Abbildung 23: Kaplan Meier-Kurve im Bezug zum GLO1 Expressionsstatus und Geschlecht bei iCCA.	54
Abbildung 24 : Kaplan Meier-Kurve im Bezug zur CA 19-9 Expression bei iCCA.....	55
Abbildung 25 : Kaplan Meier-Kurve bei gleichzeitiger Betrachtung des GLO1 und CA 19-9 Expressionsstatus bei iCCA.	56
Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve zum Kumulativen Überleben bei iCCA unter Betrachtung der verschiedenen Lokalisationen der Färbung.	57
Abbildung 27: Forest-Plot der multiplen Cox-Regression ausgewählter Parameter im Gesamtkollektiv.....	59

Abbildungsverzeichnis (Anhang)

Abbildung A 1: Schematische Darstellung der Einteilung von pCCA nach Bismuth-Corlette.	90
Abbildung A 2: Behandlungsalgorithmus für Maligne Biliäre Tumore der ESMO.	93
Abbildung A 3: Kaplan-Meier-Kurve zum Gesamtüberleben im Unterkollektiv der eCCA.	100
Abbildung A 4: Kaplan-Meier-Kurve zum Gesamtüberleben im Unterkollektiv der iCCA....	100
Abbildung A 5: Kaplan-Meier-Kurve zum Gesamtüberleben im Gesamtkollektiv	101
Abbildung A 6: Kaplan Meier-Kurve samt Falltabelle im Bezug zur GLO1 Expressionsstatus und Geschlecht bei iCCA.	101
Abbildung A 7: Kaplan Meier-Kurve im Bezug zur GLO1 Expressionsstärke bei iCCA.	102
Abbildung A 8: Kaplan Meier-Kurve im Bezug zur GLO1 Expressionsstärke IRS 0-3 vs. 4-12 bei iCCA.	102
Abbildung A 9: Kaplan Meier-Kurve im Bezug zur GLO1 Expressionsstärke IRS 0-3 vs. 4-12 bei eCCA.....	103
Abbildung A 10: Kaplan Meier-Kurve sowie Zusammenfassung der Fälle im Bezug zur kombinierten Betrachtung von GLO1 und CA 19-9 Expression bei iCCA.	103
Abbildung A 11: Kaplan-Meier-Kurve im Bezug zur Färbelokalisation im Gesamtkollektiv.	104
Abbildung A 12: Kaplan Meier-Kurve im Bezug zur GLO1-Lokalisation bei eCCA	104
Abbildung A 13: Kaplan Meier-Kurve im Bezug zum CK7 Expressionsstatus im Gesamtkollektiv.....	105
Abbildung A 14: Forest-Plot der multiplen Cox-Regression ausgewählter Parameter bei iCCA.	118

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Punktevergabe innerhalb des IRS-Scores.....	29
Tabelle 2: Überblick Gesamtkollektiv und Unterkollektive: Häufigkeitsverteilung Tumorlokalisation, Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose und Overall Survival.....	31
Tabelle 3: Risikofaktoren im Gesamtkollektiv.....	32
Tabelle 4: TNM-Klassifikation: Häufigkeitsverteilung des TNM-Status im Gesamtkollektiv und in den Unterkollektiven	33
Tabelle 5: Stadieneinteilung: Häufigkeitsverteilung des UICC-Stadiums und des Grades der Differenzierung im Gesamtkollektiv und in den Unterkollektiven, zusätzliche Einteilung der Extrahepatischen Karzinome nach Bismuth-Corlette.....	34
Tabelle 6: Serumparameter: Häufigkeitsverteilung der Parameter CA19-9, GOT, GPT, Bilirubin, Albumin und des errechneten De-Ritis-Quotienten im Gesamtkollektiv und den Unterkollektiven.....	36
Tabelle 7: Gerinnungsparameter: Häufigkeitsverteilung des Hämoglobinwertes, des INR-Wertes und des Quickwertes im Gesamtkollektiv sowie den Unterkollektiven.....	36
Tabelle 8: CK7 Färbung: Häufigkeitsverteilung der Färbeintensitäten der CK7 Färbung im Gesamtkollektiv und den Subkollektiven der intrahepatischen und extrahepatischen Tumore ..	39
Tabelle 9: GLO1 Färbung: Häufigkeitsverteilung des errechneten IRS-Scores, der daraus folgenden Expression und der Lokalisation der GLO1 Färbung im Gesamtkollektiv und den Subkollektiven der intrahepatischen und extrahepatischen Tumore.....	43
Tabelle 10: p-Werte des zweiseitigen exakten Tests nach Fisher für das Gesamtkollektiv, sowie die Unterkollektive der iCCA und eCCA.	50
Tabelle 11: Ergebnisse der uni- und multivariaten Cox-Regressionsanalyse im Gesamtkollektiv.	58
Tabelle 12: Ergebnisse der uni- und multivariaten Cox-Regressionsanalyse beim Unterkollektiv der iCCA.	60

Tabellenverzeichnis (Anhang)

Tabelle A 1 : Einteilung der Karzinome der intrahepatischen Gallengänge nach 8. Version der TNM-Klassifikation.	89
Tabelle A 2: klinische UICC-Stadieneinteilung für die Karzinome der intrahepatischen Gallengänge.....	89
Tabelle A 3: Einteilung der Karzinome der perihilären Gallengänge nach 8. Version der TNM-Klassifikation..	90
Tabelle A 4: klinische UICC-Stadieneinteilung für die Karzinome der perihilären Gallengänge.	90
Tabelle A 5: Stadieneinteilung der Tumore der perihilären Gallenwege nach Bismuth-Corlette.	91

Tabelle A 6: Einteilung der Karzinome der distalen extrahepatischen Gallengänge nach 8. Version der TNM-Klassifikation..	91
Tabelle A 7: klinische UICC-Stadieneinteilung für die Karzinome der distalen extrahepatischen Gallengänge.....	91
Tabelle A 8: Einteilung der Karzinome der Gallenblase und des Ductus cysticus nach 8. Version der TNM-Klassifikation.	92
Tabelle A 9: Klinische UICC-Stadieneinteilung für die Karzinome der Gallenblase und des Ductus cysticus.	92
Tabelle A 10: Kreuztabellen A-P: Kreuztabellen für die jeweils in der ersten Spalte eingetragenen Parameter im Gesamtkollektiv.	95
Tabelle A 11: Kreuztabellen A-P: Kreuztabellen für die jeweils in der ersten Spalte eingetragenen Parameter bei iCCA.....	97
Tabelle A 12: Kreuztabellen A-P: Kreuztabellen für die jeweils in der ersten Spalte eingetragenen Parameter bei eCCA.	99

1. Einleitung und Zielsetzung

Die Gruppe der biliären Karzinome beinhaltet als Überbegriff die Karzinome der intra- und extrahepatischen Gallenwege, auch Cholangiokarzinome genannt, und Malignome der Gallenblase (1). Diese stellen mit ca. 3% aller weltweiten gastrointestinalen Neoplasien eine seltene Tumorerkrankung dar, welche jedoch mit einer niedrigen 5-Jahres-Überlebensrate einhergeht (2–4). In Deutschland beträgt diese 18-22% mit einer medianen Überlebenszeit von 24 Monaten, was hauptsächlich auf die späte Erkennung durch ein spätes Auftreten von Symptomen und limitierte Behandlungsmöglichkeiten zurückzuführen ist (5, 6).

Den aktuell einzigen kurativen Ansatz bietet die komplette chirurgische Exzision, jedoch ist diese aufgrund des meist ausgedehnten Tumorbefalls bei Erstdiagnose je nach Literatur nur für weniger als ein Drittel bis die Hälfte aller Patienten und Patientinnen eine Option (7–9). In diesen Fällen ist die palliative Erstlinientherapie mit Gemcitabin und Cisplatin in Kombination mit den zielgerichteten Antikörpern Durvalumab (anti PD-L1 (= programmed cell death ligand 1) Antikörper) oder Pembrolizumab (anti PD-1 (=programmed cell death 1 protein Antikörper) zusätzlich zur Symptomkontrolle die Therapieoption für die Patienten und Patientinnen, welche jedoch mit einer deutlich reduzierten medianen Überlebenszeit von etwa 12,75 Monaten einhergeht (10).

Demzufolge gewinnt die Erforschung von neuen, zielgerichteten Therapien zunehmend an Bedeutung. Hierbei stellt das Enzym Glyoxalase 1 (GLO1) einen aktuell neuen Bestandteil der Karzinomforschung dar, welches am Abbau von Methylglyoxal beteiligt ist (11). Methylglyoxal entsteht vermehrt als toxisches Nebenprodukt der anaeroben Glykolyse, welche aufgrund des gesteigerten Energiebedarfs im Tumor vermehrt stattfindet. Eine Akkumulation von Methylglyoxal kann zu vermehrten Mutationen und schließlich zur Apoptose der Zelle führen (12, 13). GLO1 konnte bereits bei verschiedenen Karzinomen, wie etwa dem Magenkarzinom (14), dem Prostatakarzinom (15), dem Mammakarzinom (16) oder dem hepatozellulären Karzinom (17) mit einer erhöhten Expression nachgewiesen werden. Diese korrelierte zudem meist mit einer höheren Aggressivität des Tumors (15, 16). Darüber hinaus konnte in einigen Studien eine höhere Resistenz gegen Chemotherapeutika gezeigt werden, was Glyoxalase-Inhibitoren zu einem möglichen neuen Therapieansatz macht, um Tumoren mit erhöhter GLO1-Expression potentiell wieder empfindlicher gegenüber den verwendeten Chemotherapeutika zu machen (12, 17). Zum cholangiozellulären Karzinom liegen noch keine Studien bezüglich der GLO1 Expression sowie deren prognostischen oder prädiktiven Aussagekraft vor.

Das Hauptziel dieser Arbeit ist es, die Expression von GLO1 an Tumormaterial von Gallengangskarzinompatienten der Universitätsmedizin Mainz mittels immunhistochemischer Färbungen zu evaluieren. Hierzu erfolgten immunhistochemische Färbungen der Gewebspräparate und die Auswertung unter Anleitung und Hilfe der Abteilung für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz. Anschließend wurden die Ergebnisse mit klinisch-pathologischen Parametern und Prognosemarkern verglichen und mögliche Zusammenhänge untersucht. Diese sollen einen Einblick bezüglich einer möglichen prognostischen oder prädiktiven Aussagekraft von GLO1 und dessen möglicher Basis für eine zielgerichtete Therapieoption geben.

2. Literaturdiskussion

2.1. Maligne biliäre Tumore

2.1.1. Anatomische Klassifikation

Die Gruppe der malignen biliären Tumore wird im englischen Sprachraum auch häufig unter dem Begriff der cholangiozellulären Karzinome (Cholangiokarzinom, CCA) geführt (1). Die Einteilung der CCA erfolgt aktuell gemäß der 2017 erschienenen 8. Ausgabe der AJCC TNM-Stadieneinteilung basierend auf der anatomischen Tumorlokalisation (18). Grundsätzlich wird zwischen intrahepatischen (iCCA) und extrahepatischen (eCCA) Tumoren unterschieden. Diese werden weiter in spezifischere Lokalisationen unterteilt. Die iCCA reichen bis zu den Gallengängen 2. Ordnung, das Einmünden des Duktus cysticus dient als anatomischer Anhaltspunkt für die Unterscheidung von den eCCA. Die eCCA werden weiter unterteilt in perihiläre Karzinome (pCCA), Karzinome der distalen extrahepatischen Gallengänge (dCCA), sowie den Sonderfall der Karzinome der Ampulla vateri (siehe Abbildung 1). Eine gesonderte Tumorentität stellen die Karzinome der Gallenblase und des Duktus cysticus (GBC) dar (18). Die perihilären extrahepatischen Karzinome können gemäß der Klassifikation nach Bismuth-Corlette in vier weitere Gruppen je nach ihrer Lokalisation im Duktus hepaticus communis und der Hepatikusgabel unterteilt werden (siehe Anhang) (19).

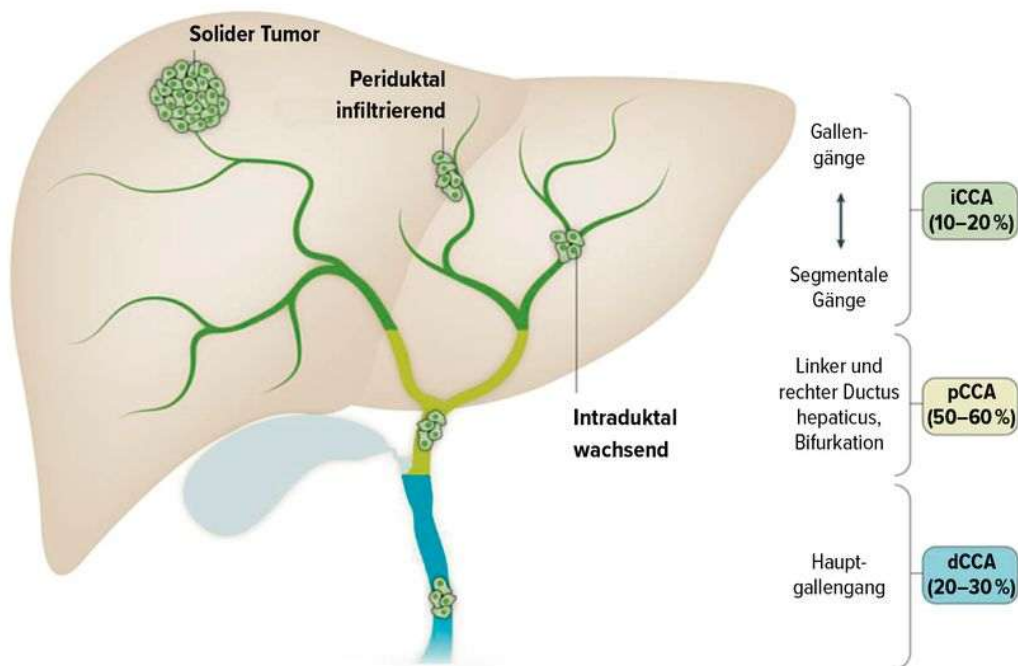


Abbildung 1: Einteilung der abführenden Gallenwege nach anatomischer Lokalisation in intrahepatisch-, extrahepatisch- und distal. Entnommen und Übersetzt aus: (1).

2.1.2. Epidemiologie

Das extrahepatische Cholangiokarzinom ist der häufigste Tumor der Gallenwege mit ca. 80% der Tumore, darüber hinaus stellen die intrahepatischen Cholangiokarzinome mit 15-25% aller Lebertumoren die zweithäufigste primäre Tumorentität der Leber nach dem hepatozellulären Karzinom (HCC) dar (7, 20, 21).

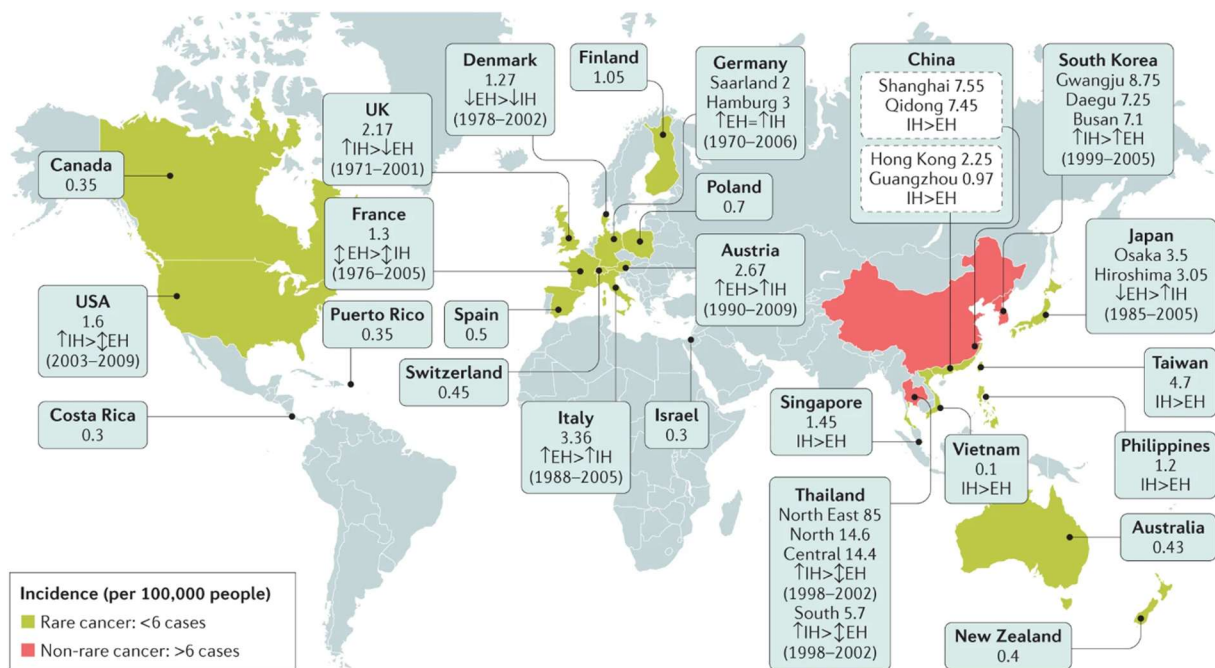
Die weltweite altersstandardisierte Inzidenzrate für maligne biliäre Tumore beträgt 3,1 pro 100.000. Diese variiert jedoch regional stark, mit sehr hohen Inzidenzen in bestimmten Gebieten, wie beispielsweise dem Nord-Osten Thailands (85 pro 100.000), und vergleichsweise niedrigen Inzidenzen in Ländern wie Australien mit 0,4 pro 100.000 Personen. Diese regionalen Unterschiede sind vor allem auf eine weltweit inhomogene Verteilung der jeweiligen Risikofaktoren zurückzuführen (siehe Abbildung 2) (2, 22). Deutschland wird zu den Niedriginzidenzgebieten gezählt, mit einer Inzidenz für alle cholangiozellulären Karzinome von 2,61 bzw. 3,93 pro 100.000 Personen im Jahr 2014, wobei mehr Männer als Frauen erkrankten (5, 23). Die Erfassung einer exakten Inzidenz für alle Entitäten der malignen biliären Tumore stellt sich jedoch als Herausforderung dar und ist in der Literatur oft uneinheitlich. Daten der ENSCCA-Registerstudie bei europäischen Patienten zeigten zwischen 2010 und 2019 eine Verteilung von 55,6% iCCA, 26,5% pCCA und 17,9% dCCA, wobei Karzinome der Ampulla vateri nicht berücksichtigt wurden (7). In vielen Fällen treten Missklassifikationen aufgrund unterschiedlicher Begriffsdefinitionen auf. So erfassen einige Studien iCCA zusammen mit dem HCC unter den primären Lebertumoren, während andere Studien diese gesondert betrachten. Auch werden perihiläre Klatskin-Tumore häufig fälschlicherweise den intrahepatischen Tumoren zugeordnet, da es beispielsweise im ICD-10 keine eigene Diagnose für pCCA gibt (23, 24). Solche Missklassifikationen erschweren den Vergleich von Studienergebnissen sowie die genaue Erfassung von Inzidenzen und Prävalenzen erheblich. In der neuen ICD-11 Version, welche von der WHO im Januar 2022 eingeführt wurde und in einigen Ländern bereits verwendet wird ((Stand 11/2025) verwendet Deutschland weiterhin ICD-10 (25)), gibt es einen separaten Diagnosecode für pCCA, was zukünftig mehr Klarheit bezüglich der genauen Tumorklassifikationen schaffen wird (26).

Im globalen Trend ist in vielen Ländern ein Anstieg der Inzidenzen und altersstandardisierten Mortalitätsraten (ASMR) der intrahepatischen Karzinome mit einem gleichzeitigem Rückgang der Inzidenz und ASMR der extrahepatischen Karzinome zu beobachten (4, 27).

Die Inzidenz für das CCA steigt stetig mit dem Alter und erreichte in Deutschland 2013/14 ihren Höhepunkt. Männer im Alter von über 75 Jahren verzeichneten eine Inzidenz von 20-30 pro 100.000, während Frauen im Alter von über 80 eine Inzidenz von etwa 15 pro 100.000 aufwiesen. Das mediane Erkrankungsalter in Deutschland liegt zwischen 69 Jahren (männliche Patienten mit iCCA) und 78 Jahren (weibliche Patientinnen mit Karzinomen der Gallenblase) und liegt somit über dem bundesweiten Durchschnitt von 70 Jahren für alle Krebserkrankungen des Erwachsenenalters (5, 20, 23).

Die Prognose für alle drei Formen des CCA ist ungünstig und ist vor allem von der Resektabilität und der lokalen Ausbreitung des Tumors abhängig. Je nach Studienlage ist bei lediglich 35%-50% der Patienten und Patientinnen zum Zeitpunkt der Diagnose eine Resektion mit kurativem Ansatz möglich (7, 8). Nach erfolgreicher vollständiger Resektion liegt die relative 5-Jahres Überlebensrate je nach Literatur bei ca. 20%-40% für sowohl eCCA als auch iCCA (6, 7, 28). Bei nicht-resektablen, fortgeschrittenen Tumoren liegt die 5-Jahres-Überlebensrate für

iCCA bei ca. 5% und für eCCA und Tumore der Gallenblase mit unter 5% noch geringer (3, 7).



Nature Reviews | Gastroenterology & Hepatology

Abbildung 2: Weltweite Inzidenz (Fälle pro 100.000) des cholangiozellulären Karzinoms (CCA) im Zeitraum 1979 bis 2009. IH= intrahepatische Lokalisation, EH= extrahepatische Lokalisation, nach ICD codierter Diagnose; ↑ansteigender Trend, ↓fallender Trend. Entnommen aus (29).

2.1.3. Risikofaktoren

In zahlreichen Studien konnten verschiedene Risikofaktoren für das cholangiozelluläre Karzinom identifiziert werden. Die meisten Risikofaktoren führen durch chronische Inflammation, Cholestase oder einer Veränderung der Zusammensetzung der Gallenflüssigkeit zu einer vermehrten Proliferation, genetischen Mutationen oder epigenetischen Modifikationen (30). Die meisten Fälle von CCA treten jedoch in den westlichen Nationen sporadisch auf (29, 31, 32).

Leberzirrhose und cholestatische- und inflammatorische Lebererkrankungen

Ein signifikanter Risikofaktor für die Entwicklung von iCCA ist die Leberzirrhose. Eine Metaanalyse von sieben Fall-Kontrollstudien durch Palmer et al. ergab eine gemeinsame Odds-Ratio (OR) von 22,9 für iCCA für alle Fibroseformen, unabhängig von ihrer Ätiologie (31). Es wird vermutet, dass dieses erhöhte Risiko auf eine bei der Leberzirrhose vorliegende Veränderung des Mikroenvironments zurückzuführen ist, welches mit einer chronischen Inflammation und zunehmender Fibrose einhergeht (33–35).

Ein weiterer Risikofaktor ist die primäre sklerosierende Cholangitis (PSC). Die Ätiologie der PSC ist noch nicht vollständig geklärt, es kommt jedoch im Krankheitsverlauf zur chronischen Cholestase mit zunehmender Destruktion der Gallengänge (36). PSC-Patienten haben ein Lebenszeitrisko von 5-10% ein CCA zu entwickeln, wobei ein Drittel der Betroffenen ihre Krebsdiagnose innerhalb der ersten zwölf Monate nach Diagnose der PSC erhalten. Zudem liegt

das mediane Alter bei Diagnose des CCA bei PSC-Patienten in der 5. Lebensdekade und ist somit deutlich jünger als das mediane Erkrankungsalter bei Patienten ohne PSC-Vorgeschichte (30, 37–39). Es wird vermutet, dass die Karzinogenese durch die cholestatisch bedingte Überexposition des Gallenepithels mit Gallensäuren verursacht wird (40).

Weitere Risikofaktoren für die Entwicklung von CCA sind unter anderem die fibropolyzystischen Lebererkrankungen wie die Caroli-Erkrankung und Choledochuszysten. Diese seltene Erkrankungen sind mit zystischen Läsionen in den Gallengängen und einer daraus resultierenden Leberfibrose verbunden (34, 41, 42).

Chronische Infektionen

Weitere Risikofaktoren für die Entwicklung von CCA sind chronische Infektionen mit Parasiten oder Viren. In bestimmten Regionen wie Thailand, Laos, Kambodscha und Vietnam spielen Leberegel wie *Clonorchis sinensis* und *Opisthorchis viverrini*, eine besondere Rolle, da sie dort endemisch vorkommen. Diese gelangen durch den Verzehr von rohem oder nicht komplett garen Süßwasserfischen in den menschlichen Körper. Es wird vermutet, dass der mechanische Schaden durch die Egel und die durch sie verursachte Inflammation zur Karzinogenese beitragen (43).

Des Weiteren konnte eine chronische Infektion mit Hepatitis B und C in Metaanalysen als Risikofaktor für CCA, insbesondere für iCCA, identifiziert werden (34, 42, 44). Der genaue Mechanismus ist auch hier noch ungeklärt, jedoch werden sowohl die chronische Inflammation als auch direkte Einwirkungen der Viren auf die Zellproliferation und Apoptose als mögliche Ursache diskutiert (45).

Metabolische Erkrankungen und Steinerkrankungen

In mehreren Metaanalysen zeigte sich Diabetes als weiterer Risikofaktor für CCA (34, 42, 46). Clements et al. konnten in ihrer Metaanalyse von 12 Fall-Kontroll-Studien beispielweise eine gemeinsame OR von 1,73 für iCCA und 1,5 für eCCA nachweisen (34). Der Pathomechanismus ist noch nicht vollständig geklärt, eine vermehrte Stimulation der Zellproliferation über IGF (Insulin-like Growth Factor) durch Hyperinsulinämie oder DNA-Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) durch hyperglykämische Zustände (47) werden hier diskutiert.

Übergewicht wurde ebenfalls als ein weiterer Risikofaktor identifiziert (34, 42). In der Metaanalyse von Clements et al. zeigte sich eine gepoolte OR von 1,14 für iCCA und 1,2 für eCCA (34). Es wird vermutet, dass ein vermehrtes Vorliegen von Fettzellen und die damit verbundene Produktion von Leptin zu einer chronischen Entzündung führen, da diese in Zellstudien eine wachstumsstimulierende Wirkung auf CCA Zellen aufwiesen (48).

Auch das Vorliegen einer Choledocholithiasis der extrahepatischen Gallengänge und einer Cholezystolithiasis der Gallenblase konnten als Risikofaktoren für sowohl iCCA als auch eCCA identifiziert werden (34, 42, 49). Eine Analyse der SEER-Datenbank von Petrick et al. konnte hier bei Choledocholithiasis eine OR von 6,94 für iCCA und 14,22 für eCCA errechnen. Eine Cholezystolithiasis wies in derselben Kohorte ein etwas niedrigeres Risiko mit einem OR von

3,93 für iCCA und 5,29 für eCCA auf (42). Als zur Karzinogenese beitragender Mechanismus wird die durch das Steinleiden verursachte Inflammation vermutet (50).

Toxinexposition und genetische Risikofaktoren

Mehrere Studien konnten Alkoholexposition als Risikofaktor für CCA identifizieren. In der Metaanalyse von Clements et al. zeigte sich beispielsweise eine gepoolte OR von 3,15 für iCCA und 1,75 für eCCA. (31, 34). (42). Tabak konnte als ein weiterer Risikofaktor identifiziert werden, wenn auch von geringem Einfluss (OR: 1,25 für iCCA , OR: 1,69 für eCCA) (34, 42, 51). Das Lynch-Syndrom ist eine genetische Erkrankung, welche sich durch einen Defekt im DNA-Reparaturmechanismus verursacht wird und mit einem damit erhöhten Risiko für eine Vielzahl an Tumoren, hierunter auch CCA, verbunden ist (52).

2.1.4. Diagnostik

Die klinische Präsentation von biliären Tumoren verläuft oft stumm und wird häufig erst in fortgeschrittenen Stadien symptomatisch. Dies stellt zusammen mit fehlenden Screeningmethoden eine Herausforderung bei der frühzeitigen Diagnose dar. Generell lässt sich sagen, dass auch bei den Symptomen Unterschiede zwischen iCCA und eCCA bestehen (53). iCCA präsentieren sich häufig mit unspezifischen Symptomen wie allgemeiner Abgeschlagenheit und einem Krankheitsgefühl sowie Kachexie (21%), abdominalen Schmerzen (49%) und Ikterus (32%). Im Gegensatz dazu präsentieren sich eCCA vor allem mit Ikterus (75%) und abdominalen Schmerzen (36%) aber auch mit Gewichtsverlust (10%) und Pruritus (7%) (53). Aufgrund der früheren und häufiger auftretenden Präsentation des obstruktiven Ikterus werden distale und perihiläre Tumore tendenziell früher als iCCA entdeckt (7, 29, 32). In etwa 20-25% der Fälle wird die Diagnose durch Zufallsbefunde gestellt, wobei es hier wiederum Unterschiede zwischen iCCA (32%) und eCCA (6%) gibt (53).

2.1.4.1. Bildgebende Diagnostik

Die Bildgebende Diagnostik ist ein wesentlicher Bestandteil der Diagnose von biliären Tumoren und umfasst verschiedene Verfahren wie Ultraschall, CT (mit oder ohne Kontrastmittel), MRCP und ERCP, PET sowie die pathologische Beurteilung von Tumorbiopsien. Meist werden mehrere bildgebende Verfahren im Diagnose- und Stagingprozess verwendet (7, 53).

Die oft als erste durchgeführte Bildgebung ist der Ultraschall (53). Dieser zeichnet sich vor allem durch eine einfache Verfügbarkeit aus, kann Aufschluss über mögliche Obstruktionen und deren Lokalisation geben und bietet oft die Grundlage für die Einleitung von weiteren bildgebenden Untersuchungen (54).

Einen wesentlichen Aspekt der Diagnostik des CCA stellt die Schnittbildgebung dar. Die multiphasische kontrastmittelgestützte CT ist nützlich, um zwischen HCC und iCCA zu unterscheiden. Im Gegensatz zum HCC fehlt beim iCCA das klassische radiologische Erscheinungsbild des HCC mit homogenem Anfluten in der arteriellen Phase und Auswaschen in der späten venösen Kontrastmittelphase. Häufige Befunde beim iCCA sind eine hypodense hepatische Läsion mit peripherem Enhancement und progressivem Kontrastmittelenhancement in den

späten Phasen oder durch alle Phasen hindurch (55, 56). Auch die MRT kann bei der Diagnose des iCCA behilflich sein. Häufig präsentieren sich iCCA in dieser als lobulierte Masse mit zentralen hypointensen Anteilen in T1-Wichtung und peripherer Hyperintensität in T2-Wichtung (56). Für eCCA können sowohl die dynamische CT als auch die dynamische MRT wertvolle Informationen bei der Diagnose liefern. In der CT präsentieren sich eCCA häufig als kurze Verengung des Gallengangs, als Kalibersprünge des Gallengangs durch eine noduläre oder polypenartige Masse oder als asymmetrische Verdickungen. Die MRT bietet vor allem in Kombination mit der MRCP (Magnetresonananz-Cholangiopankreatikographie) und der Möglichkeit der Erstellung eines 3D-Modells des Gallengangssystems oberhalb und unterhalb der Verengung eine gute Möglichkeit zur operativen Planung (56, 57). Die CT des Thorax, Abdomen und Pelvis ist zudem essentiell für das Tumorstaging vor Beginn der Therapie (58).

Die ERCP kann ebenfalls zur Einschätzung der biliären Obstruktion beitragen und bietet zudem die Möglichkeit zur Intervention mit Entlastung der Obstruktion durch Stenting und Probeentnahme für die histologische Klassifikation. Es ist jedoch erwähnenswert, dass die Sensitivität der Biopsie vor allem bei pCCA mit 50-72% je nach gewählter Methodik (eine Kombination mit FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) steigert die Sensitivität) moderat ist (59–61).

Die 18F-FDG PET/CT (Fluorine-18 Fluordesoxyglucose) kann selektiv bei Patienten mit potenziell kurativer Intention von Vorteil sein, um regionale Lymphknoten und Fernmetastasen zu entdecken und ein angemessenes Staging und eventuell daraus resultierenden Änderungen im Krankheitsmanagement zu ermöglichen (62).

Die S3-Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) (58) erarbeitete aus den aktuellen Forschungsdaten den unter Abbildung 3 gezeigten bildgebenden Diagnosealgorithmus für CCA. Demnach solle der Verdacht auf ein CCA mit einer Staging-CT weiter abgeklärt und mögliche kurative Ansätze mittels Operation abgewägt werden. Unabhängig davon, ob ein kurativer oder palliativer Behandlungsansatz indiziert sei, sei eine histologische Diagnosesicherung anzustreben. Bestünde eine kurative Behandlungsindikation, so sollten zuvor weitere bildgebende Maßnahmen wie eine kontrastmittelgestützte MRT erfolgen, um das weitere operative Vorgehen zu planen. Anschließend soll die histologische Diagnosesicherung erfolgen, gegebenenfalls intraoperativ. Bei palliativer Behandlungsindikation wird in der S3 Leitlinie nach der Staging-CT keine weitere Bildgebung empfohlen, es solle direkt eine histologische Diagnosesicherung und anschließende Therapie erfolgen. Die zuvor aufgezählten weiteren Diagnosetools könnten bei Unklarheit optional erwägt werden oder zur Beurteilung von Rezidiven dienen (siehe Abbildung 3) (58).

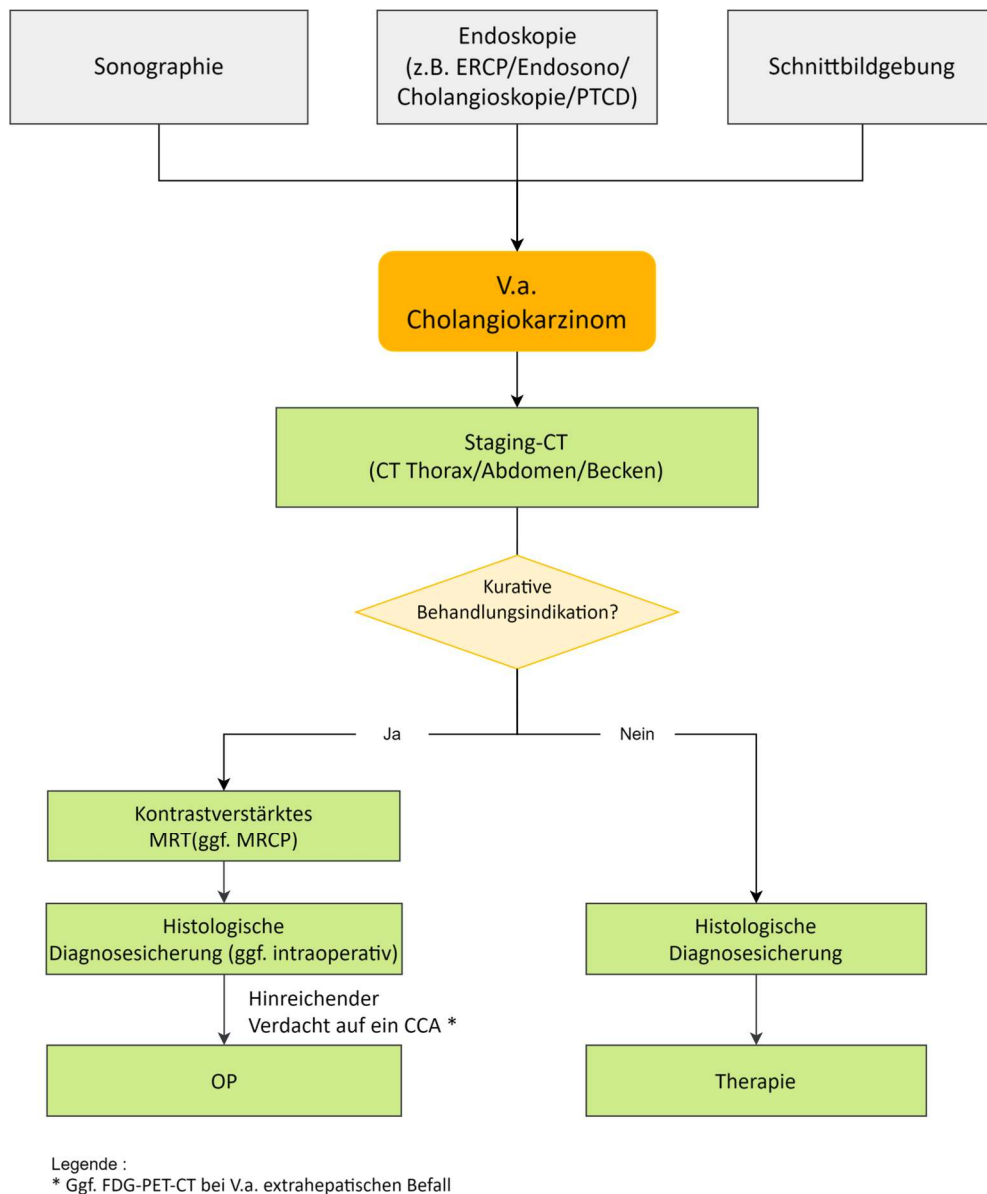


Abbildung 3: Darstellung des Diagnosealgorithmus bei Verdacht auf ein Cholangiokarzinom der Leber. Entnommen aus (58).

2.1.4.2. Laborchemische Diagnostik

Die bekannten laborchemischen Biomarker für das CCA sind nicht spezifisch, sie können jedoch von diagnostischer und prognostischer Bedeutung sein und stellen eine hilfreiche Ergänzung zur bildgebenden Diagnostik und histologischen Diagnosesicherung dar. Hier werden vor allem CA 19-9 (Carbohydrate-Antigen 19-9, ein Hapten der Lewis-a-Blutgruppenderminante) und CEA (Carcinoembryonales Antigen) diskutiert.

CA 19-9 ist der am häufigsten verwendete Biomarker, ist in einer Expression jedoch variabel und abhängig von verschiedenen Faktoren wie dem Geschlecht oder dem Lewis Genotyp, welcher bei etwa 8% der kaukasischen Bevölkerung homozygot mutiert ist und mit fehlender

CA 19-9 Expression einhergeht (63). In der Literatur wird häufig zwischen Personen mit und ohne PSC unterschieden, da Personen mit PSC häufig höhere CA19-9 Werte aufweisen. Es gibt keinen einheitlichen Wert für den Cut-off, häufig wird jedoch ein Cut-off-Wert von 34-40 U/ml verwendet, ab welchem der Biomarker als positiv gewertet wird (7, 64, 65). In verschiedenen Studien wurden höhere Cut-off-Werte für PSC-Erkrankte diskutiert. So sind bei dieser Personengruppe beispielsweise Cut-off-Werte von > 129 U/ml in der Literatur vorgeschlagen, um die diagnostische Präzision zu verbessern (66). Des Weiteren haben Studien gezeigt, dass Personen mit nicht-resektablen Tumoren im Vergleich zu Personen mit resektablen Tumoren signifikant höhere CA 19-9 Werte aufwiesen. Diese stiegen im Verlauf mit Fortschreiten des Krankheitsstadiums an, und korrelierten mit einer schlechteren Krankheitsprognose und niedrigerem Überleben (7, 67–69).

Als weiterer unspezifischer Marker kann CEA (Carcinoembryonales Antigen) als unterstützendes Warnzeichen für eine mögliche unterliegende Malignität herangezogen werden. In Studien konnte gezeigt werden, dass CCA mit einer CEA-Erhöhung einhergehen (7) und eine Kombination von CA 19-9 und CEA gegenüber der Bestimmung von nur einem beider Parameter die Genauigkeit einer Differenzierung von Personen mit CCA und gesunden Personen auf über 90% steigern kann (70).

Weitere Laborparameter die häufig im Rahmen der CCA-Diagnose untersucht werden sind Parameter, die auf eine potenzielle Leberschädigung oder biliäre Obstruktion hindeuten. Diese können bei iCCA und pCCA beispielsweise durch die Tumormassewirkung hervorgerufen werden und können häufig erhöht sein. Zu diesen Parametern gehören unter anderem AST/ GOT (Aspartat Transaminase/ Glutamat-Oxalacetat Transaminase), ALT/ GPT (Alanin Aminotransferase/ Glutamat-Pyruvat-Transaminase), Bilirubin, GGT (Gamma-Glutamyltransferase) und AP (alkalische Phosphatase) (7, 70).

2.1.4.3. Histopathologische Diagnostik

Die histopathologische Diagnostik nach Biopsieentnahme ist entscheidend für die endgültige Diagnose des iCCA und ist für alle Patienten und Patientinnen obligat, bei denen eine systemische Therapie durchgeführt wird (58).

Bei eCCA gestaltet sich eine Biopsie aus mehreren Gründen jedoch schwierig. eCCA wachsen oft diffus und nicht massenartig, was eine perkutane Biopsie erschwert. Zudem kann es durch die Biopsie zu einer potentiellen Tumorstreuung kommen (71). Aus diesen Gründen wird bei pCCA und dCCA häufig eine ERCP-gesteuerte Biopsie durchgeführt (72). Alternativ kann eine Zytologie in Kombination mit einer sensitivitätssteigernden FISH (Fluoreszenz in Situ Hybridisierung) erwägt werden (73, 74).

Histologisch können beim CCA verschiedene Subtypen unterscheiden werden, oft gibt es Mischformen verschiedener Subtypen innerhalb der Tumore. pCCA und dCCA präsentieren sich am häufigsten als muzinöse Adenokarzinome die vor allem intraduktal oder periduktal-

infiltrativ wachsen (siehe Abbildung 4) (75). Bei iCCA werden häufig zwei histologische Haupttypen identifiziert, die jeweils Rückschlüsse auf ihren anatomischen Ursprung zulassen. Zu diesen gehören der gemischt nicht-muzin-produzierende und muzinöse Typ, der viele Ähnlichkeiten mit den kuboidalen Epithelzellen der kleinen hepatischen Gallengänge aufweist, sowie der muzinöse Subtyp, der Ähnlichkeiten mit dem Zylinderepithel der großen intrahepatischen Gallengänge aufweist. Diese Subtypen unterscheiden sich ebenfalls in der Art ihres Tumorstwachstums. Beispielsweise zeigen iCCA des Mischtyps oft ein massenformendes Wachstum, während der muzinöse Subtyp zwar auch masseformend auftreten kann, vor allem aber periduktal infiltrativ und intraduktal auftritt (76, 77).

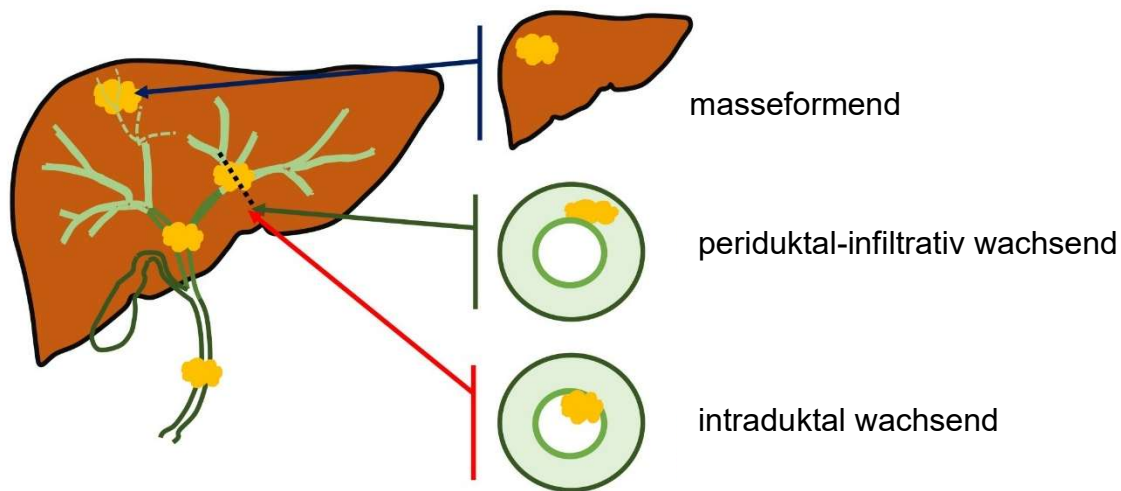


Abbildung 4: Einteilung der Wachstumsformen nach masseformend, periduktal-infiltrativ und intraduktal. Entnommen und modifiziert aus (1).

2.1.5. Stadieneinteilung

Die jeweilige Stadieneinteilungen nach TNM (8. Auflage, 2017) und UICC/AJCC (Union internationale contre le cancer/ American Joint Committee on Cancer) Klassifikation sind den Tabellen im Anhang zu entnehmen (Abbildung A 1 + Tabelle A 1-A9). Anhand dieser Einteilungen richten sich die nachfolgenden Therapien und Handlungsalgorithmen. Hier wird jeweils in die bereits oben beschriebenen Tumorentitäten unterteilt (iCCA, pCCA, dCCA, Karzinome der Ampulla vateri und Karzinome der Gallenblase und des Duktus cysticus). Die TNM-Klassifikation basiert auf der Größe und Ausbreitung des Primarius (T), Lymphknotenmetastasen (N) und dem Vorhandensein von Fernmetastasen (M) (18). Die UICC/AJCC Klassifikation teilt die Tumore anhand der TNM-Klassifikation in vier übergeordnete Stadien ein (78).

Die Einteilung von pCCA erfolgt zudem wie bereits erwähnt nach Bismuth-Corlette, welche sich an der Hepatikusgabel orientiert und für die chirurgische Therapie relevant ist (19). Da dies von keiner Relevanz für Patienten mit chirurgisch nicht-resektablen Tumoren ist, finden sich in der Literatur zunehmend neue klinische Stagingansätze, die ein nichtoperatives Staging mit prognostischer Relevanz zum Ziel haben (9, 79, 80). Ein Beispiel dafür ist das von Schweizer et al. vorgeschlagene Stagingssystem, welches die Personen, anhand der Laborwerte CRP,

INR und Bilirubin, sowie des Alters und des Metastasestatus, in drei Gruppen einteilt. Das Überleben korrelierte signifikant bei allen Karzinomtypen der Gallenwege (sowohl iCCA, eCCA als auch GBC), unabhängig von ihrer Resektabilität und könnte eine gute und einfach zu er rechnende Alternative zur Risikostratifizierung bei Diagnose sein (9).

Die genaue Stadieneinteilung nach TNM, UICC sowie Bismuth-Corlette kann den Tabellen im Anhang entnommen werden.

2.1.6. Karzinogenese

Bei eCCA sind die häufigsten genetischen Mutationen eine KRAS-Mutation (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) mit einer Häufigkeit von 36,7% und eine Loss-of-Function-Mutation von TP53 (Tumorsuppressorgen p53) mit einer Häufigkeit von 34,7% zu erwähnen. Im Gegensatz dazu spielen bei iCCA eher Mutationen in IDH1 (Isocitrat Dehydrogenase 1) mit einer Häufigkeit von 20% (nur 7% bei eCCA), ARID1A (AT-rich interactive domain-containing protein 1A) mit ebenfalls mit einer Häufigkeit von 20% und TP53 mit einer Häufigkeit von 17% eine Rolle, während KRAS-Mutationen nur in 10% vorkommen (81, 82).

Wie zuvor erwähnt, spielt bei vielen der Risikofaktoren eine chronische Inflammation als unterliegender Mechanismus der Pathogenese eine Rolle. In der Karzinogenese des CCA durch chronische Inflammation spielt das Zytokin Interleukin 6 (IL-6) eine zentrale Rolle. Etliche Studien konnten eine drastische Erhöhung von IL-6 in CCA-Zellen im Vergleich zu gesundem Gallengangsepithel nachweisen (83–85). In gesunden Zellen existiert ein negativer Rückkopplungsmechanismus über die Aktivierung des Januskinase-Signaltransduktionswegs (JAK-STAT) durch IL-6. Es wurde jedoch gezeigt, dass dieser Mechanismus in CCA durch Promotormethylierung unterbrochen ist (86). Dadurch kann IL-6 ungehindert den STAT3-Signalweg aktivieren, der durch Hochregulation der Transkription des „leukemia cell differentiation protein“ (MCL-1) zu einer erhöhten Resistenz gegen Apoptose und somit zu einem vermehrten Überleben der Tumorzellen führt (87).

Weitere IL-6 vermittelte Signalwege sind beispielsweise die Aktivierung des MAPK-Weges und die Promotormethylierung bestimmter Gene zur Zellzyklusdysregulation und Proliferation, wie beispielsweise für den Tyrosinkinase-Rezeptor EGFR (85, 88, 89). Ein weiterer Mechanismus über den IL-6 wirkt ist die Induktion der Expression von Progranulin (PGRN), das über den Signalweg der Serin/Threonin- Kinase „AKT“ zu einer erhöhten Zellproliferation führt (90). Es konnte auch gezeigt werden, dass KRAS Mutationen zu einer vermehrten IL-6 Expression führten (85). Darüber hinaus spielt das Enzym Cyclooxygenase 2 (COX2) und die damit verbundene Produktion von Prostaglandin E2 eine Rolle bei der Tumorentwicklung bei chronischer Inflammation (91).

Weitere entzündliche Einflüsse auf die Karzinogenese werden durch inflammatorische Zytokine vermittelt, welche die Expression der NO-Synthase (iNOS) induzieren. Das daraufhin syn-

thetisierte Stickstoffoxid (NO) wirkt zum einen DNA-schädigend und inhibiert DNA-Reparaturmechanismen, zum Anderen stimuliert es die COX2-Expression, welche über oben genannten Mechanismus wirkt (92, 93).

Weitere Mechanismen der Karzinogenese umfassen eine Aktivierung von Notch-Proteinen, die mit Hilfe von Akt zu einer Transformation gesunder Hepatozyten in Vorstufen von CCA-Zellen führen können, sowie eine Hemmung der Apoptose über den Hedgehog-Signalweg, oder eine vermehrte Zellproliferation über die Deaktivierung des Hippo-Signalwegs und hierdurch bedingte vermehrte Transkriptionsstimulation durch YAP (Yes-Associated-Protein) (94–96). Es wurden auch zahlreiche neuroendokrine Faktoren identifiziert, die einen Einfluss auf das Zellwachstum und die Apoptose haben, wie beispielsweise die Modulation durch Östrogene oder Leptin (48, 97). Eine gute Zusammenfassung und ein Überblick über die diversen Faktoren der Karzinogenese ist in Abbildung 5 zu finden.

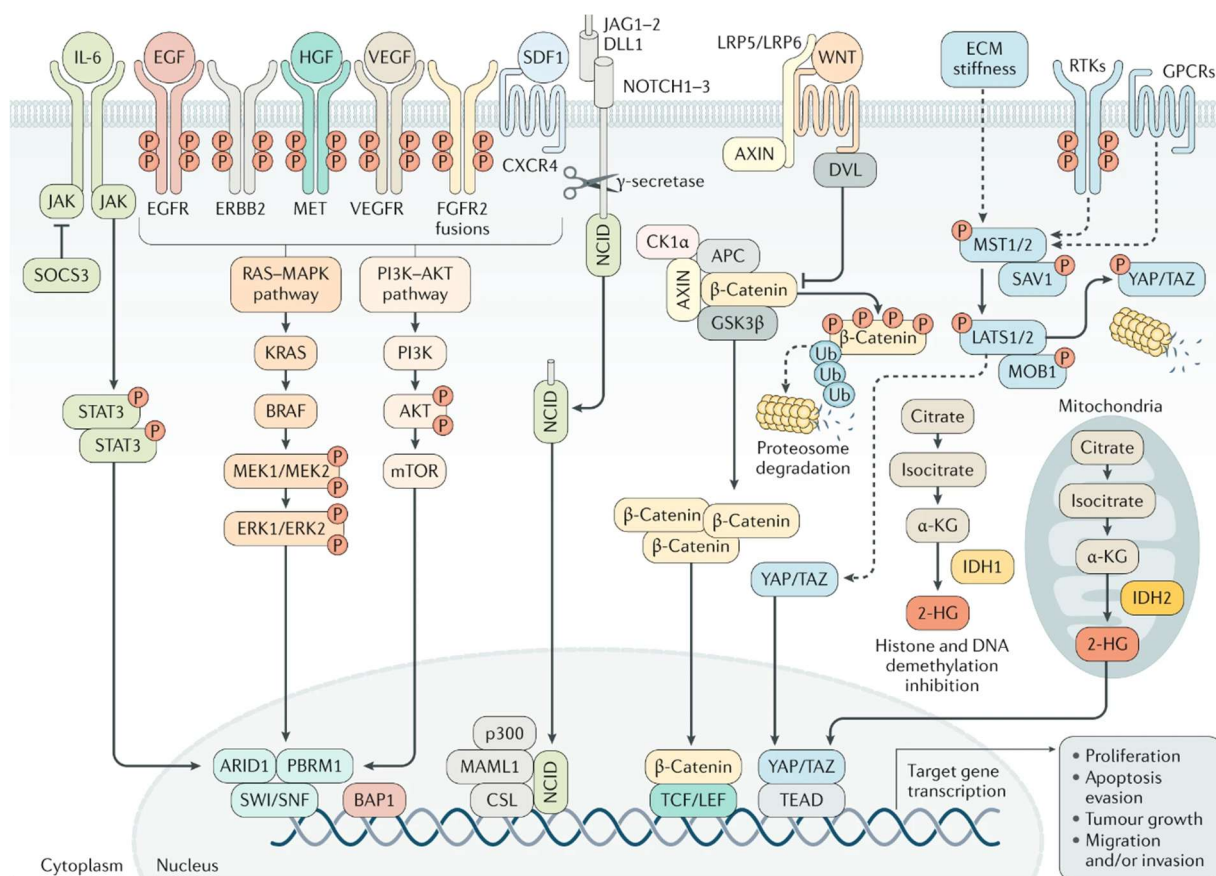


Abbildung 5: Schematische Darstellung verschiedener pathomolekularer Einflussmechanismen auf das CCA. Quelle: Entnommen aus (98).

2.1.7. Therapie

2.1.7.1. Chirurgische Therapie

Wie bereits erwähnt, ist die vollständige Resektion des Tumors die einzige kurative Therapieoption für CCA-Patienten. In den S3-Leitlinien und in der Leitlinie der European Society for Medical Oncology (ESMO) wird, unabhängig von der Lokalisation, eine vollständige Resektion des CCA empfohlen, sobald eine komplette Tumorresektion (R0) in der Diagnostik möglich

erscheint. Dies soll zuvor in einem interdisziplinären Tumorboard besprochen und entschieden werden (58, 72). Allerdings kommen aufgrund des oft stummen Krankheitsverlaufes und der damit verbundenen späten Diagnose je nach Literatur nur 25-50% der Erkrankten für eine kurative, operative Therapie in Frage (7–9). Die Überlebensraten nach erfolgreicher vollständiger Tumoresektion variieren ebenfalls stark in der Literatur und es werden mOS von 25-45 Monaten berichtet. Die rezidivfreie Überlebensrate (RFS) ist mit 12-36 Monaten ebenfalls gering und etwa 60-70% der R0-resezierten Personen erleiden ein Rezidiv (6, 7, 99)

Das Ausmaß der Resektion richtet sich nach Tumorlokalisation und Tumorausbreitung und sollte die Funktionalität des überbleibenden Leberrestes mit einbeziehen. Es kann von Vorteil sein vor der Resektion eine Portalvenenembolisation durchzuführen um die Restleistung des überbleibenden Lebersegmentes zu steigern (100).

Bei iCCA wird in der Regel eine Hemihepatektomie oder erweiterte Hepatektomie (Entfernung von ≥ 5 Segmenten) zusammen mit einer Lymphknotenresektion auf der Ebene des hepatoduodenalen Segmentes durchgeführt. Je nach Ausdehnung des Tumors kann es auch erforderlich sein, den extrahepatischen Duktus hepaticus mitzuentfernen (6, 101). Die Resektion von pCCA richtet sich nach dem Bismuth-Corlette Stadium, welches häufig erst bei chirurgischer Ansicht bestimmt werden kann. Hierbei erfolgt eine En-bloc Resektion des involvierten Leberparenchyms, einschließlich des befallenen Anteils des Duktus hepaticus. Ebenso werden der Lobus caudatus (I. Lebersegment), der in die Gallengangbifurkation drainiert, sowie die Lymphknoten entfernt (19, 102, 103). Vor der Resektion bei pCCA wird häufig ein biliäres Stenting durchgeführt, um die Restleberfunktionalität nach Resektion und somit das Ergebnis zu verbessern (7, 100). Die Behandlung von dCCA besteht in der Regel aus einer Resektion des Pankreaskopfes mit erweiterter Resektion des Gallengangs bis zum Leberhilus. Hierfür wird meist eine partielle Duodenopankreatektomie (Kausch-Whipple-OP) durchgeführt. Diese wird auch bei anderen Tumoren des Pankreaskopfes durchgeführt und umfasst die Resektion der Gallenblase, des Duktus choledochus, des Pankreaskopfes, des Duodenums, der drainierenden Lymphknoten und eine Magenteilresektion mit anschließender Rekonstruktion (28, 104).

Nach erfolgreicher Resektion wird eine anschließende adjuvante Chemotherapie mit Capecitabin, einem Antimetabolit, der in den Tumorzellen zu 5-Fluoruracil umgewandelt wird und als Pyrimidin-Antagonist zu einer Verringerung der DNA-Replikation führt, empfohlen. Subgruppen-Analysen der britischen BILCAP Studie haben gezeigt, dass die adjuvante Chemotherapie mit Capecitabin mit einem signifikant erhöhten medianen OS (53 Monate vs. 36 Monate ohne Capecitabin) und einem erhöhten PFS innerhalb der ersten 24 Monate verbunden ist (99, 105). Ähnliche Ergebnisse konnten in der japanischen ASCOT-Studie mit einem anderen Pyrimidin-Antagonisten erzielt werden (106).

2.1.7.2. Palliative Systemtherapie

Erstlinientherapie

Die ESMO-Empfehlung für Personen mit nicht resektablen oder metastasierten Erkrankungsstadien ist eine systemische Therapie mit dem Alkylans Cisplatin und dem Pyrimidin-Antagonisten Gemcitabin (GEMCIS) in Kombination mit den Antikörpern gegen PD-1 (Pembrolizumab) oder PD-L1 (Durvalumab) als Erstlinientherapie (107, 108). Die Phase-III-Studie „ABC-02“ und die Phase 2-Studie „BT22“ konnten beide bereits ein signifikant verlängertes Überleben bei Kombination von Gemcitabin und Cisplatin im Vergleich zur Monotherapie mit Gemcitabin (11,7 Monate vs. 8,1 Monate, ABC-02 Studie) und eine signifikant verbesserte Tumorkontrolle (definiert als komplettes oder partielles Ansprechen oder stabile Erkrankung) (81,4% vs. 71,8% bei Gemcitabin Monotherapie, ABC-02 Studie) zeigen (109, 110).

Basierend auf den Ergebnissen der Phase-3 -Studien „TOPAZ-1“ und „Keynote-966“ empfiehlt die S3 Leitlinie und die ESMO seit 2024 eine Kombination von GEMCIS mit dem PD-L1 Immuncheckpoint-Inhibitor Durvalumab oder die Kombination von GEMCIS mit dem anti-PD1-Antikörper Pembrolizumab als Erstlinientherapie bei nicht-operablen Tumoren. Die Zugabe von Durvalumab in „TOPAZ-1“ führte zu einem signifikant erhöhten medianen OS (12,8 Monate vs. 11,5 Monate) und PFS (7,2 Monate vs. 5,7 Monate). Eine höhere Ansprechrates sowie ein längeres PFS konnten ebenfalls als sekundäre Endpunkte gezeigt werden (111–113). Die Hinzunahme des anti-PD-1 Antikörpers Pembrolizumab zur Kombinationschemotherapie in „Keynote-966“ verbesserte das OS von 10,9 Monaten auf 12,7 Monate (108).

Die Entscheidung, ob eine palliative Chemotherapie oder Best-Supportive-Care (BSC) durchgeführt wird, richtet sich nach dem allgemeinen Zustand des Patienten (ECOG), der genauen Lokalisation und Ausbreitung des Tumors, sowie dem Zugang zur Tumorprofil-Diagnostik. In Europa erhielten in den untersuchten Studienzentren des ENSCCA-Registers 29% der Patienten eine aktive palliative Therapie, während 20,6% aufgrund des ihres schlechten Zustandes BSC erhielten (7). Für Patienten, bei denen beispielsweise aufgrund eingeschränkter Nierenfunktion kein nephrotoxisches Cisplatin in Frage kommt, konnte eine Kombination von Gemcitabin und Oxaliplatin (GEMOX) als alternative betrachtet werden (112, 114). Eine Monotherapie mit Gemcitabin kann laut ESMO-Empfehlung gegenüber der BSC bei Patienten mit einem EGO von 2 oder anderen zustandsverschlechternden Faktoren in Erwägung gezogen werden (72, 110).

Zweitlinientherapie

Für das CCA gewinnen zielgerichtete Therapien als Zweitlinientherapie immer mehr an Bedeutung. In der prospektiven Kohortenstudie „MOSCATO-01“ wurde festgestellt, dass Gallengangskarzinome dabei mit einer überdurchschnittlichen Anzahl an Mutationen im Vergleich zum restlichen Tumorkollektiv aufwiesen (115), was weitere Forschung auf diesem Gebiet besonders interessant macht. Nach bisheriger Datenlage können in bis zu 40%- 60% der CCA solche Mutationen zugrunde liegen (115, 116). Besonders interessant sind dabei Mutationen in IDH1 (bis zu 20% der iCCA (81)), FGFR (bis zu 16% der CCA (116)), HER2/neu (bis zu 10%

der CCA (117)) und BRAF (bis zu 5% der CCA (118)), So ist sowohl die Empfehlung in den S3-Leitlinien als auch die Empfehlung der ESMO eine zusätzliche molekulare Tumordiagnostik und eine zielgerichtete Therapie je nach molekularem Tumorprofil (58, 72).

Zu den Zielgerichteten Therapien gehört beispielsweise bei Vorliegen von IDH1 und IDH2 Mutationen die Hinzunahme von Ivosidenib, welche in der in der Phase III-„ClearIDHy“-Studie eine Verbesserung des PFS sowie OS nach Progress unter Erstlinientherapie zeigte (119). Bei Vorliegen einer FGFR-Mutation konnte in multiplen Phase-II-Studien konnten eine Therapie mit FGFR-Inhibitoren eine Verbesserung des OS erzielen, so Beispielsweise bei Pemigatinib in der „FIGHT-202“-Studie (120).

Aufgrund von in Genanalysen gefundener NTRK-Fusionsgene (neurotrope Tyrosinkinase-Fusionsgene) empfiehlt die Deutsche S3-Leitlinie bei tumorunabhängiger Zulassung beider Medikamente auch eine Therapie mit den Tyrosinkinaseinhibitoren Larotrectinib oder Entrectinib, sofern ein NTRK-Fusionsgen molekulargenetisch bestätigt ist (58, 121). Auch eine Therapie mit Pembrolizumab bei hoher Mikrosatelliteninstabilität sollte als Zweitlinientherapie erwogen werden, sofern dies noch nicht in der Erstlinientherapie erfolgt ist (108).

Weitere Therapiemöglichkeiten in der Zweitlinientherapie stellen je nach molekulargenetischer Diagnostik beispielsweise auch die zielgerichtete Therapie bei Vorliegen von HER2/neu-Mutationen dar, beispielsweise mit Pertuzumab-Trastuzumab (122) oder auch eine Therapie mit einer Kombination von BRAF-Inhibitoren und MEK-Inhibitoren wie Darafenib-Trametinib (118, 123) bei vorliegenden BRAF-Mutationen dar. Diese sollen jeweils in Studien oder off-Label erfolgen.

Sofern keine Mutation vorliegt, welche zielgesteuert therapiert werden kann, empfiehlt die S3-Leitlinie bei Versagen der Erstlinientherapie eine Therapie mit FOLFOX (5-Fluoruracil, Leucovorin, Oxaliplatin), welches auf der randomisierten Phase-III- „ABC-06-Studie“ zur Zweitlinientherapie basiert. Obwohl hier nur eine mäßige Verbesserung des medianen OS im Vergleich zur aktiven Symptomkontrolle nach Progress unter GEMCIS gezeigt wurde, konnte sich FOLFOX aufgrund klinisch signifikanter Verbesserungen bei den 6-Monats Überlebensraten von 50,6% gegenüber 35,55% und den 12-Monats Überlebensraten von 25,9% gegenüber 11,4% als etablierte Zweitlinientherapie durchsetzen (124). Eine Kombination von FOLFIRI (5-Fluoruracil, Leucovorin und Irinotecan) können laut S3-Leitlinie erwogen werden wenn eine Kontraindikation gegen Oxaliplatin vorliegt (125).

2.1.7.3. Lokoregionale Therapien bei lokal fortgeschrittenen Tumorstadien

In Fällen von regional fortgeschrittenen Tumoren, bei denen eine Resektion aufgrund der Lage oder der Ausbreitung des Tumors nicht möglich ist, werden verschiedene lokoregionale Alternativen interdisziplinär diskutiert. Alternativen wurden vor allem bei iCCA mit nur intrahepatischem Befall untersucht. Zu den aktuellen Therapieoptionen gehören die Strahlentherapie, intraarterielle Therapien wie transarterielle Chemoembolisation (TACE), transarterielle Radio-

embolisation (TARE, auch als SIRT bekannt (selektive interne Radiotherapie)) und die hepatische arterielle Infusion von Chemotherapeutika (HAI), sowie Ablationstechniken wie die Radiofrequenzablation oder Mikrowellenablation (126–128). Laut ESMO-Leitlinie kann eine Ablation bei Patienten mit Kontraindikationen zur chirurgischen Resektion und einem iCCA von <3cm in Erwägung gezogen werden. Eine gepoolte Analyse von Edeline et al., welche sich die Studienlage und Outcomes der verschiedenen Therapieoptionen angeschaut hat, zeigte eine gepoolte komplette Ansprechrate von 93,3% mit einem gepoolten medianen OS von 30,2 Monaten, was der chirurgischen Resektion ähnelt, jedoch mit einer anderen Patientenpopulation (126). Aufgrund der heterogenen Datenlage und des niedrigen Evidenzgrades wird jedoch nur eine schwache Empfehlung ausgestellt.

Eine externe Bestrahlung kann laut ESMO-Leitlinie bei Patienten mit Kontraindikationen zur chirurgischen Resektion in einem palliativen Setting bei Leberbegrenzter Tumorausbreitung in Erwägung gezogen werden, sofern eine Ablation nicht möglich ist (129). Eine HAI kann laut Leitlinie bei Patienten in Kombination mit systemischer Chemotherapie erwogen werden, um die Ansprechrate zu verbessern (72, 130). Sowohl die S3-Leitlinie als auch die ESMO-Leitlinien betonen die Notwendigkeit weiterer Studien, um eine bessere Einschätzung dieser Therapieoptionen zu erhalten. Eine aktuelle multizentrische Prospektive Phase-II-Studie „ABC-07“, welche sich mit der stereotaktischen Bestrahlung zusätzlich zur systemischen Chemotherapie auseinandersetzt, befindet sich aktuell in der Auswertung und könnte wichtige Daten für die Reevaluation der lokoregionalen Therapien liefern (EduCT:2014-003656-31). Erste Ergebnisse (Stand 11/2025) zeigten ein besseres OS als GEMCIS alleine (131).

Nachfolgendes Flussdiagramm stellt die systemischen Therapieoptionen und sich den daraus ergebenden empfohlenen Behandlungsalgorithmus der S3-Leitlinie übersichtlich dar (siehe Abbildung 6).

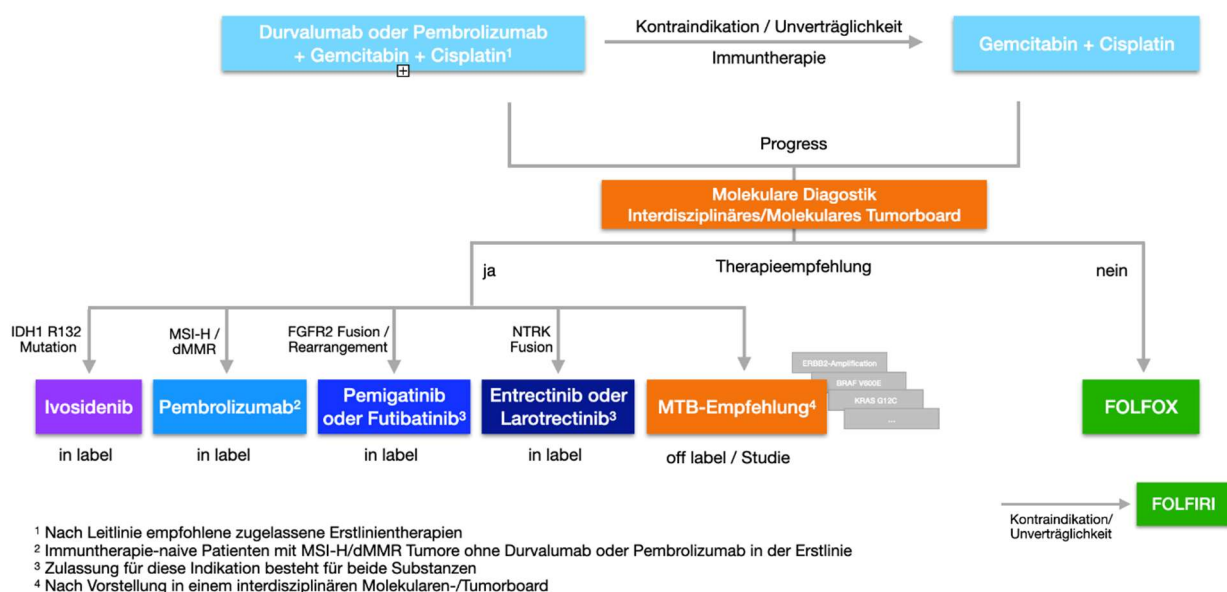


Abbildung 6: Sequenztherapie bei Cholangiokarzinomen laut Empfehlungen der S3-Leitlinie. Entnommen aus (58).

2.1.7.4. Best Supportive Care

Gemäß ESMO-Leitlinie wird ab einem ECOG-Performancestatus von ≥ 3 die Best Supportive Care (BSC, engl. für bestmögliche unterstützende Behandlung) empfohlen. Auch die bereits genannten Studien zu systemischen Chemotherapien schlossen meist nur Patienten mit ECOG 0-2 ein (72, 110, 124). In der Studie des ENSCCA-Registers von Izquierdo-Sanchez et al. erhielten 20,6% der Patienten in den Studienzentren ausschließlich BSC (7). Hierbei sollte laut ESMO-Leitlinie besonders auf obstruktive Komplikationen durch den Tumor geachtet und diese symptomatisch behandelt werden. Mögliche obstruktive Komplikationen können eine Obstruktion der Gallenwege, des Magenausgangs oder des Duktus pancreaticus beinhalten, die mittels eines Stentings oder einer biliären Drainage therapiert werden können (7, 72). Weitere therapeutische Maßnahmen können eine Enzyersatztherapie oder einen Duodenalstent beinhalten (72).

Die Lebenserwartung unter BSC ist gering, und beträgt je nach Literatur zwischen 2,5 und 4,5 Monaten (7, 132).

2.1.8. Prognostische Faktoren

Wie bereits erwähnt, konnte ein erhöhter CA-19-9 Titer in mehreren Studien als unabhängiger Prädiktor für eine schlechtere Prognose identifiziert werden (7, 64, 68, 133).

Auch der Lymphknotenstatus nach kurativer Resektion konnte als prognostischer Faktor herausgearbeitet werden. In der Analyse von Uchiyama et al. wurde beispielsweise eine Hazard Ratio von 2,1 bei iCCA für Patienten mit positivem Lymphknotenstatus errechnet, was zudem zu einer signifikanten Reduktion der 5-Jahres Überlebensrate von 46,4% auf 7% führte (133). Der ECOG-Performancestatus wurde ebenfalls als unabhängige prognostische Variable identifiziert. Eine große Differenz in der Überlebenszeit wurde beispielsweise in der Analyse des ENSCCA-Registers gezeigt, mit Überlebenszeiten von 25,3 Monaten bei ECOG 0 und lediglich 3 Monaten bei ECOG 3/4 (7). Prognostische Scores, welche beispielsweise prognostische Laborparameter beinhalten, wurden bereits unter 2.1.5. diskutiert (9, 80).

Weitere prognoseverschlechternden Faktoren sind beispielsweise ein unvollständiger Resektionsstatus (28, 134), sowie eine perineurale, lymphangiozytäre- oder Gefäßinvasion des Tumors (135). In der Analyse der ENSCCA stellten Einzelmetastasen mit 80% der Metastasen den häufigsten Metastasierungsmodus dar. Die häufigsten Metastaseorte für CCA insgesamt waren das Peritoneum (20,7% der Einzelmetastasen), distale Lymphknoten (16,5%), die Leber (pCCA 34,9%, dCCA 27,8%) und die Lunge (14,1%) (7).

2.2. Glyoxalase 1

2.2.1. Das Glyoxalasesystem

Die Glyoxalase 1 (GLO1), auch bekannt als Lactoylglutathion Lyase oder GLOD1 gemäß der HGNC-Gendatenbank (HGNC:4323; HUGO Gene Nomenclature Committee), ist ein Enzym, das auf Chromosom 6 (Genlokus 6p21.2) lokalisiert ist (136). Es gehört zur Familie der Glyo-

xalasen, zu der bisher 6 Enzyme gezählt werden. Diese Enzyme sind in diversen metabolischen Prozessen beteiligt, insbesondere am Abbau von reaktiven Dikarbonylen, wie Methylglyoxal, und kommen in der Natur ubiquitär vor (137). Die Entdeckung und Charakterisierung des Glyoxalase-Systems rund um GLO1 geht zurück auf die Arbeit von Dakin und Dudley im Jahr 1913, die 1951-1953 von Racker vervollständigt wurde (138, 139). Es besteht aus den zwei Enzymen Glyoxalase 1 (GLO1, EC 4.4.1.5) und Glyoxalase 2 (GLO2, EC 3.1.2.6), die Methylglyoxal (MG) unter Verwendung von reduziertem Glutathion zu D-Laktat umwandeln (139). Die nicht-enzymatische Reaktion (Abbildung 7) zwischen MG und reduziertem Glutathion führt zur Bildung eines Hemithioacetals, das anschließend durch die Glyoxalase 1 zu S-D-Lactoylglutathion umgewandelt wird. Im darauffolgenden Reaktionsschritt wird S-D-Lactoylglutathion durch GLO2 zu D-Lactat hydrolysiert, wodurch das reduzierte Glutathion wiederhergestellt wird. D-Laktat kann dann durch die D-Laktat-Dehydrogenase weiter zu Pyruvat oxidiert werden (140).

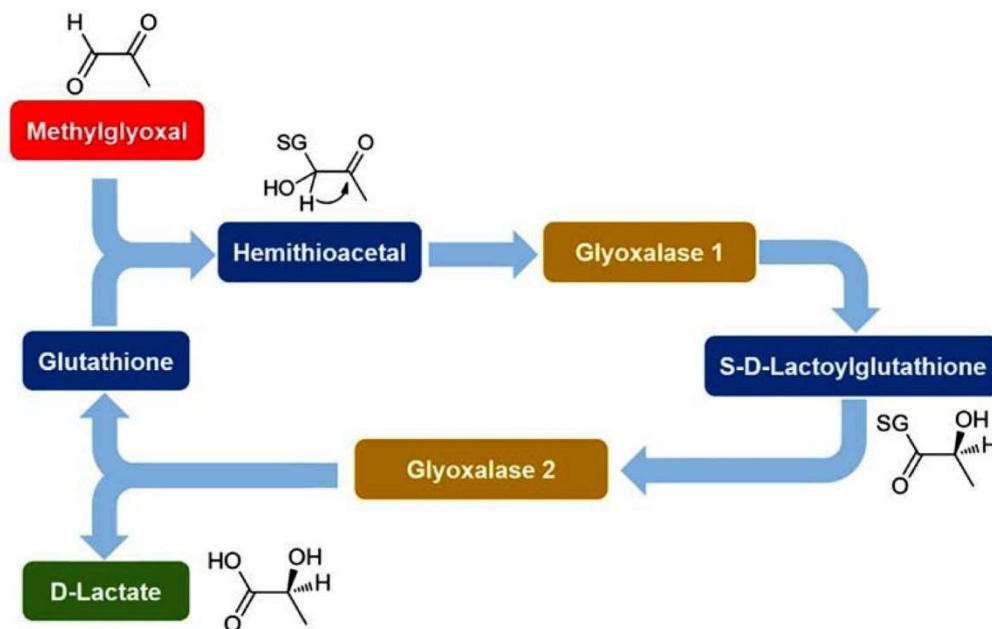


Abbildung 7: Das Glyoxalase System. Entnommen aus (141).

In Säugetieren entsteht der größte Teil von MG als Nebenprodukt der Glykolyse durch nicht-enzymatische Degradation von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (G3P). MG kann allerdings auch an anderen Stellen des Stoffwechsels, wie im Threonin-Katabolismus oder im Abbau von Aceton entstehen (142, 143). Die Umwandlung der Triosephosphate zu MG innerhalb der Glykolyse geschieht in etwa 0,1-1%, je nach glykämischen Zustand (in Normoglykämie vs. Hyperglykämie). GLO1 baut unter physiologischen Bedingungen über 99% des MG ab. Ohne jenen Abbau würde es zu einer MG-Anreicherung bis hin zu zelltoxischen Werten kommen (144–146). MG ist ein hochreaktives α -Oxoaldehyd, das zur Glykierung von Nukleotiden, Proteinen und basischen Phospholipiden führt und mit diesen „Advanced Glycation Endproducts“ (AGEs) formt (147). Die geformten AGEs können entweder direkt über Proteinfehlfaltung und einer Erhöhung der DNA-Mutationsraten wirken oder über spezifische AGE-Rezeptoren (RAGE) Signalkaskaden induzieren (146, 148, 149). Dies kann

beispielsweise zu vermehrtem oxidativen Stress, vermehrter Expression und Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen oder verstärkter Angiogenese und Zellproliferation führen (150). MG und seinen AGEs werden in diversen Krankheiten wie Diabetes, kardiovaskulären- und neurodegenerativen Erkrankungen mit der Pathogenese in Verbindung gebracht (siehe Abbildung 8) (151).

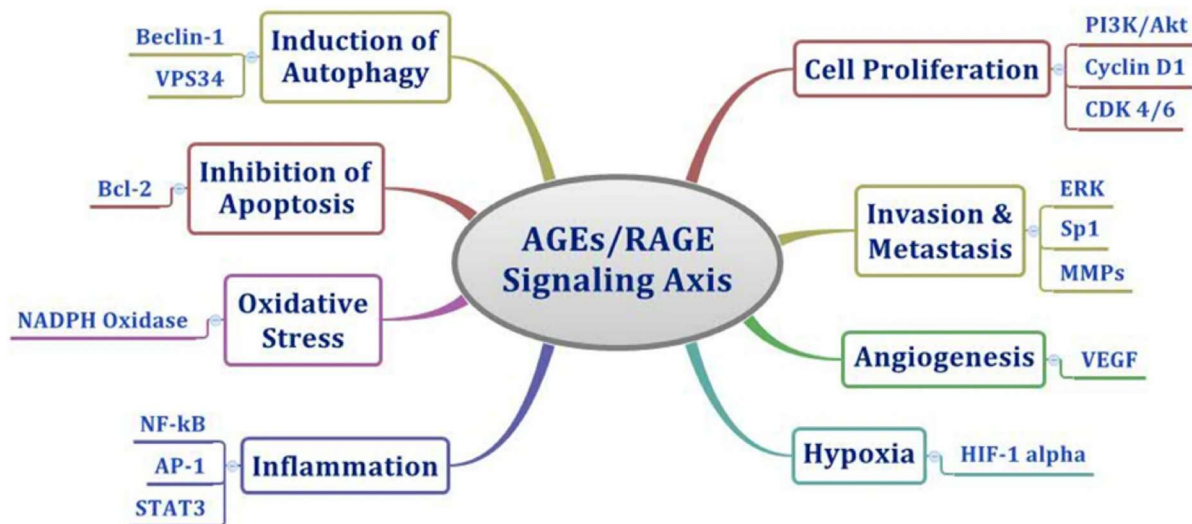


Abbildung 8: Der Einfluss und die molekularen Mechanismen der AGE/RAGE Signalachse auf die Entstehung von Krebs. Entnommen aus (150).

2.2.2. Methylglyoxal und Glyoxalase 1 in malignen Tumoren

Die Rolle von MG bei der Entstehung von Krebs ist zweigleisig. Zum einen konnte gezeigt werden, dass erhöhte MG-Konzentrationen in Tumoren mit einer Verringerung der DNA-Replikation und einem Zellzyklusarrest einhergehen, was mit einer vermehrten Apoptose verbunden ist (145, 152, 153). Auch wurde am HCC gezeigt, dass eine erhöhte MG-Konzentration die Invasion, Migration und Adhäsion von HCC-Zellen störte (154). Zum anderen konnte an den Beispielen von Brustkrebs, dem kolorektalen Karzinom und dem anaplastischen Schilddrüsenkarzinom gezeigt werden, dass MG-induzierter Zellstress pro-metastatisch und wachstumsfördernd wirken kann (155–157). Dies geschieht beispielsweise durch Aktivierung migratorischer Signalwege oder Hochregulation der Expression von YAP (Yes-Associated Protein), einem Transkriptionsaktivator, der wachstumsfördernde Gene reguliert (158, 159).

Um den gesteigerten Energiebedarf der schnell wachsenden Tumorzellen zu decken, erfolgt eine Umstellung des Zellstoffwechsels im Tumor auf anaerobe Glykolyse, auch bekannt als Warburg-Effekt. Dabei wird Glucose unabhängig vom Sauerstoffangebot vermehrt zu Laktat umgewandelt. Dies führt zu einem erhöhten Bedarf an Glucose in den Tumorzellen und einer vermehrten Bildung von MG, wodurch das Glyoxalasesystem im Tumorstoffwechsel an Bedeutung zunimmt (160). Studien am Magenkarzinom konnten zeigen, dass eine hohe GLO1-Expression mit aggressiveren Phänotypen, wie beispielsweise einer Magenwandinvasion oder Lymphknotenmetastasen, und einer damit verbundenen schlechteren Prognose einherging

(14). Ähnliche Ergebnisse konnten beim Prostatakarzinom gezeigt werden. Während gesundes Prostataepithel keine GLO1-Expression zeigte, ging eine GLO1-Expression mit höheren Tumorstadien, einem höheren Gleason Score und einem positivem Lymphknotenstatus einher. Zudem wurde gezeigt, dass GLO1-Positivität als unabhängiger Marker für eine schlechte Prognose bei den untersuchten Prostatakarzinomen fungierte (15). Eine erhöhte GLO1-Expression wurde auch bei anderen Tumoren, wie Brustkrebs (16), Gliomen (161), und hepatozellulären Karzinomen (162) mit fortgeschrittenem Tumorstadium beobachtet. Es gibt jedoch auch Forschungsergebnisse, die auf eine protektive Rolle von GLO1 hinweisen. In zwei *in-vivo*-Studien führte eine Depletion von GLO1 bei kolorektalen Karzinomen und Brustkrebs zu einem erhöhten Tumorwachstum (155, 156). In einer Analyse von Zender et al. mit dem Ziel Tumorsuppressorgene durch RNA-Interferenz-Screening bei HCC zu identifizieren, konnte GLO1 als ein Tumorsuppressor identifiziert werden (163).

2.2.3. GLO1 und MDR

GLO1 wird auch eine Rolle bei der Entwicklung von Multiplen Drug Resistance (MDR), also einer Resistenz der Tumorzellen gegen verschiedene Arzneistoffe, unter Chemotherapie zugeschrieben (164). Zum Beispiel wurde beobachtet, dass Mitomycin C und Doxorubicin die Überexpression von GLO1 induzieren, was die Tumorzellen vor der Toxizität dieser Therapeutika schützt (165). In humanen Leukämiezellen wurde ebenfalls eine Überexpression von GLO1 in Chemotherapieresistenten Zelllinien gezeigt. Eine Inhibition der GLO1 durch BBGC unter Etoposidtherapie führte wieder zu einem vermehrten Anstieg der zuvor inhibierten Apoptose in diesen Zellen (166). Der genaue Mechanismus der MDR durch GLO1 ist jedoch noch nicht vollständig verstanden, es wird vermutet, dass eine geringere MG-Anreicherung unter oxidativem Stress durch die Chemotherapeutika eine Rolle spielt (166).

2.2.4. GLO1 Modulatoren

In der Literatur lassen sich zahlreiche Modulatoren von GLO1 finden. Dazu gehören Inhibitoren wie BBGC (S-p-bromobenzylglutathion cyclopentyl diester), Ethylpyruvat (EP) und Curcumin (17, 167, 168). Es wurde beobachtet, dass die Hemmung von GLO1 in humanen Leukämiezellen (HL60-Zellen) zu einer Anreicherung von MG mit Induktion von Apoptose führt (167). In Zelllinien des HCC wurde unter BBGC eine Reduktion der Proliferation und unter EP eine Reduktion der Migration beobachtet (17).

Zu den Induktoren der GLO1 gehören beispielsweise trans-Resveratrol und Hesperetin. In einer randomisierten kontrollierten Studie mit übergewichtigen und adipösen Patienten konnten Xue et al. die erhöhte Aktivität von GLO1, reduzierte Plasma-MG-Spiegel und eine verringerte Bildung von AGEs bei Behandlung mit einer Kombination aus beiden Stoffen beobachten. Dies führte zu einer verbesserten glykämischen Kontrolle und vaskulären Funktion. (169)

2.3. Zytokeratin 7

Zytokeratine (CK) gehören zur Gruppe der Intermediärfilamente und bilden einen Teil des Zytoskeletts. Dabei wird zwischen sauren (CK 1-8) und basischen (CK 9-23) Zytokeratinen un-

terschieden, die in unterschiedlichen Geweben individuell zusammengesetzt sind. Immunhistochemische Anfärbung mit Antikörpern ermöglicht die Sichtbarmachung von Zytokeratinen und die Erstellung von Expressionsprofilen in verschiedenen Geweben (170–172).

Zytokeratin 7 (CK7) wird von verschiedenen Geweben exprimiert, darunter findet sich auch eine hohe CK7-Expression bei Epithelzellen der Gallengänge. Betrachtet man CCA, zeigen über 95% der Tumore eine positive Expression von CK7, unabhängig von der Lokalisation des Gallengangs und des Karzinoms, weshalb CK7 als ein guter Biomarker für CCA gilt (173, 174). CK7 wird vor allem verwendet, um CCA von HCC und Metastasen kolorektaler Karzinome abzugrenzen (175). Es konnte zwar durch Rullier et al. keine Korrelation zwischen der Anfärbbarkeit von CK7 und Tumordifferenzierungsgrad gefunden werden (176), jedoch beschrieben Liu et al. eine potenzielle Prognostische Bedeutung eines CK7/CK19-Indexes bei iCCA nach Operation. Eine höhere Expression von CK7 und CK19 gingen dabei mit einer schlechteren postoperativen Prognose einher (176, 177).

3. Kollektiv, Material und Methoden

3.1. Kollektiv und allgemeiner Verlauf

Diese Arbeit umfasst ausschließlich Personen, die im Zeitraum von 1999 bis 2015 an der Universitätsmedizin Mainz aufgrund eines Gallenblasenkarzinoms oder cholangiozellulären Karzinoms als Erstbehandlung eine Operation erhielten (229/245), da nur diese genug Tumormaterial für eine immunhistochemische Färbung zur Verfügung stellten. Personen, die in diesem Zeitraum lediglich biopsiert wurden und eine systemische oder andere nicht-operative Therapie erhielten (16/245), wurden von der immunhistochemischen Untersuchung ausgeschlossen. Zudem erfolgte im Vorfeld bereits ein Ausschluss von Personen, die eine lückenhafte Nachbehandlungshistorie und Dokumentation aufwiesen, bei denen eine ausreichende Erhebung der klinischen Daten hierdurch nicht möglich war.

Die Tumorproben wurden alle aus dem Archiv des Instituts für Pathologie an der Universitätsmedizin Mainz zur Verfügung gestellt, geschnitten und mit spezifischen Antikörpern immunhistochemisch für Glyoxalase 1 und Zytokeratin 7 gefärbt. Anschließend erfolgte eine mikroskopische Auswertung der Präparate. Das Kollektiv umfasst n=245 Patienten, bei n=229 Patienten lag ausreichend Resttumormaterial vor, um eine mikroskopische Auswertung zu ermöglichen. Bei den restlichen 16 Proben konnte keine Auswertung erfolgen, sie wurden dennoch in die Auswertung der klinischen Daten einbezogen. Die Erhebung der klinisch-pathologischen Parameter erfolgte mithilfe des Personendaten-Organisationssystems „SAP“ (siehe Datenerfassung 3.3.2) Es erfolgte zum Zeitpunkt 09/2021 eine Parameteraktualisierung der vorhandenen Datenbank sowie eine Neuaufnahme der beschriebenen Blutwerte (siehe Datenerfassung 3.3.2).

3.2. Materialien

Nachfolgend sind alle in dieser Arbeit benutzen Materialien und Geräte mit Herstellerangabe und Produktnummer aufgelistet.

Verwendete Primärantikörper:

Glyoxalase I Antibody (Clone: JU44-11), Novus Biologicals (NBP2-75514), rabbit monoclonal in der Verdünnung 1/500. (Typ IgG)

Cytokeratin 7 Antibody (Clone: OV-TL 12/30), Dako Denmark A/S (Agilent Technologies) (IS619), mouse monoclonal ready to use. (Typ IgG)

Verwendetes Antikörpersystem mit Sekundärantikörper

Dako Denmark A/S (Agilent Technologies), Glostrup Dänemark:

EnVision FLEX™ + Mouse (LINKER) (K8022)

EnVision FLEX™ /HRP visualization reagent (DM822)

Weitere Reagenzien und Chemikalien:

Dako Denmark A/S (Agilent Technologies), Glostrup Dänemark:

EnVision FLEX™ Wash Buffer (K8007)

EnVision FLEX™ Peroxidase-Blocking Reagent (DM821)

EnVision™ Target Retrieval Solution Low pH (6)	(K8005)
EnVision™ Target Retrieval Solution High pH (9)	(K8004)
EnVision™ FLEX Antibody Diluent	(K8006)
EnVision FLEX™ DAB + Chromogen	(DM827)
EnVision™ FLEX Hematoxylin	(K8018)
<u>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe:</u>	
Xylol (Isomerengemisch), reinst	(1.08685)
Ethanol	(K928.1)
<u>B. Braun SE, Melsungen:</u>	
Desionisiertes Wasser, Braun Ecotainer®	(5102A101)
<u>Sigma-Aldrich® (Merck KGaA):</u>	
Entellan® (butyl 2-methylprop-2-enoate; methyl 2-methylprop-2-enoate)	(1.07960)
<u>Stadtwerke Mainz:</u>	
Leitungswasser	

Arbeitsgeräte und Software:

Glasutensilien:

- Deckgläser 24x50 mm, Gerhard Menzel GmbH
- Objektträger, SuperFrost® Plus, Gerhard Menzel GmbH
- Glasküvetten, VWR International GmbH
- Färbereinsätze, VWR International GmbH
- Messzylinder (10ml, 50ml), VWR International GmbH

Elektrogeräte und Mikroskope:

- Brutschrank, Memmert
- Dampfgerät, Braun 3216
- Färbearomat, DAKO Cytomation Autostainer Plus
- Kühlschrank, Liebherr KBes 4260
- Laborwaage, Sartorius LC 4200
- Lichtmikroskope, Olympus CX21
- Mikrotom, Zeiss Rotationsmikroskop Hyrax M55

Sonstige Laborausstattung:

- Dako Pen For Immunostaining, Agilent Technologies (S200230-2)

Software:

- Microsoft 365® Excel
- Microsoft 365® Word
- SAP® Patientendatenmanagement
- IBM SPSS® Statistics 27.0 für Windows

3.3. Methoden

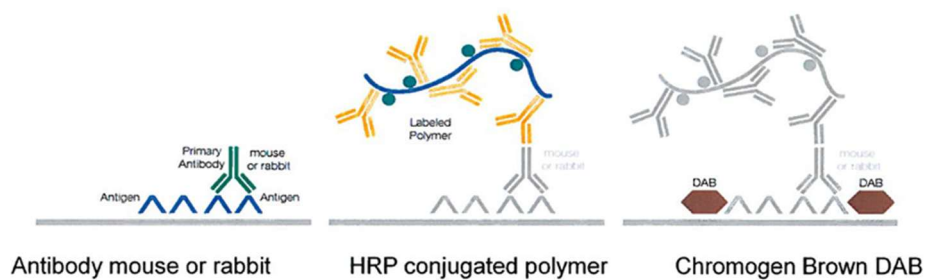
3.3.1. Immunhistochemische Färbungen

3.3.1.1. Prinzipien der immunhistochemischen Färbung

Das Prinzip der Immunhistochemie (IHC) beruht auf einer Sichtbarmachung von Antigenen und Proteinen mithilfe von Antikörpern. Ein bedeutender Anwendungspunkt der IHC in der klinischen Histologie ist bei der Erkennung und Klassifikation von Tumoren. Diese können beispielsweise mit spezifischen immunhistochemischen Markern sichtbar gemacht werden und somit Rückschluss auf den Tumorursprung und die Tumorentität ermöglichen. Weiterhin können Tumore auch auf ihre spezifischen Charakteristika, wie beispielsweise die Expression bestimmter Antigene oder Enzyme untersucht werden, die in der Prognose von Bedeutung sind oder als therapeutische Zielstruktur dienen (178). Hierdurch wird eine präzise und individuell auf den Tumor des Erkrankten zugeschnittene Therapie ermöglicht. Die Grundlage der IHC basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, bei welcher ein Antigen eine bestimmte Antigenstruktur erkennt (Epitop) und spezifisch unter einem Schlüssel-Schloss-Prinzip an diese bindet. Idealerweise sollte ein in der Diagnostik verwendeter Antikörper nicht an ähnliche Epitope oder auf gleiche Epitope auf verschiedenen Antigenen binden, also keine Kreuzreaktivität aufweisen. Bei Antikörpern wird zwischen mono- und polyklonalen Antikörpern unterschieden (179). Polyklonale Antikörper entstehen beispielsweise dadurch, dass ein Immunsystem ein körperfremdes Antigen erkennt und mehrere Plasmazellen verschiedene Antikörper gegen verschiedene Epitope dieses Antigens herstellen. Bei monoklonalen Antikörpern stammen diese von lediglich einer Plasmazelle oder einem unsterblichen Plasmazellklon und sind gegen ein spezifisches Epitop gerichtet (180). Plasmazellklone werden für die industrielle Herstellung von Antikörpern verwendet, für diese Arbeit wurde der Klon JU44-11 für die Antikörper gegen GLO1 und OV-TL 12/30 für die Antikörper gegen CK7 verwendet. In der Färbemethodik wird zwischen direkter und indirekter Immunmarkierung unterschieden. In der direkten Methode wird der Antikörper (= Primärantikörper) an einen fluoreszierenden Farbstoff oder ein farbstoffumsetzendes Enzym gekoppelt (= konjugiert). Dieser bindet dann spezifisch an sein Epitop und markiert die Zielstruktur direkt. Da hier keine weiteren Sekundärantikörper beteiligt sind findet die Signalverstärkung gering aus und die Sensitivität ist deutlich geringer als bei der indirekten Methode. Bei dieser bindet zuerst ein unkonjugierter Primärantikörper an die Zielstruktur. Dieser wird daraufhin klassischerweise mit einem zweiten Antikörper (=Sekundärantikörper), der mit einem Farbstoff, Enzym, Goldpartikel oder ein Polymer zur Visualisierung konjugiert ist, markiert. Dieser richtet sich gezielt gegen die Fc-Region (konstante Region) des Primärantikörpers, die je nach Organismus, der den Primärantikörper hergestellt hat, unterschiedlich ist. Wurde dieser beispielsweise durch Plasmazellen eines Hasen (engl. rabbit) hergestellt, gibt es spezifische anti-rabbit-Antikörper. Es gibt mittlerweile viele Formen der indirekten Methode. Beispielsweise kann in einem dritten Schritt ein weiterer enzymkonjugierter Antikörper (=Tertiärantikörper) an den Sekundärantikörper binden und somit eine weitere Signalverstärkung erlangt werden. In dieser Arbeit wurde die EnVision-Polymer-Konjugat-Methode der Firma Dako (jetzt Agilent) verwendet (siehe Abbildung 9). Hierbei sind

an den Sekundärantikörper Dextran-Polymere gebunden, an welche Enzymmoleküle und weitere speziesspezifische Sekundärantikörper gebunden sind. Optional können statt der direkten Sekundärantikörperbindung sogenannte Linker verwendet werden, die statt des Sekundärantikörpers an den Primärantikörper binden. An diese Linke können dann mehrere sekundärantikörpergebundene Dextran-Polymere binden und somit eine weitere Signalverstärkung ermöglicht werden. Die hier eingesetzten Linker für die EnVision FLEX™-Polymer-Konjugate sind ein Rabbit-Antikörper-Polymer ohne Linker bei GLO1 und einen Mouse-Linker und Antikörper-Polymer bei CK7 (181, 182).

FLEX protocol



FLEX+ protocol

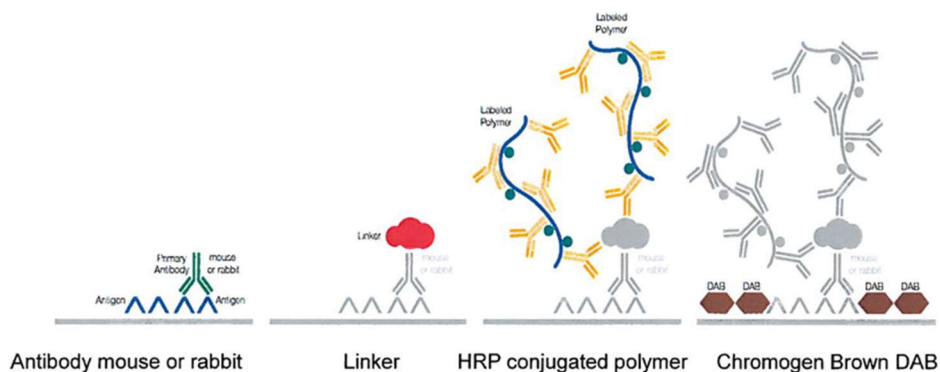


Abbildung 9: EnVision-Polymer-Konjugat-Methode. Entnommen aus (183).

Der Erstantikörper (gegen Antigen/Epitop) ist nach optionaler Bindung des Polymers und essenzieller Bindung des Sekundärantikörpers inklusive gekoppeltem Enzym weiterhin nicht direkt sichtbar. Es muss ein Substrat hinzugefügt werden, welches durch enzymatische Umsetzung sichtbar wird. Das am häufigsten verwendete Enzym ist die Meerrettich-Peroxidase (engl. horseradish peroxidase= HRP), die auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Ein hinzugegebener Farbstoff (= Chromogen) wird von der HRP oxidiert und führt zum Farbumschlag. Der hier verwendete Farbstoff ist 3-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) und verwandelt sich nach Oxidierung in einen unlöslichen, dunkelbraunen Niederschlag. Somit werden die Orte sichtbar gemacht, an denen eine ursprüngliche Primärantikörperbindung stattgefunden hatte (184).

Im nachfolgenden ist der immunhistochemische Färbeprozess mit seinen einzelnen Schritten ausführlich dargestellt.

3.3.1.2. Färbeprozess

1. Vorbereitung der Tumorpräparate

Da die verwendeten Tumorpräparate zur Konservierung in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet gelagert wurden, muss das Tumormaterial zur Verwendung für die immunhistochemische Färbung vorbereitet und entparaffiniert werden. Dafür wurden von den jeweils zu verwendenden Tumorblöcken zuerst 3µm dicke Schnitte angefertigt, auf einen Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37°C getrocknet. Anschließend erfolgt die Entparaffinisierung mittels Xylol und die Rehydrierung der Präparate in einer absteigenden Alkoholreihe in destilliertes Wasser durch Tauchbäder nachfolgendem Schema:

1. 3x in Xylol, jeweils 3 min
2. Ethanol 100%, 3 min
3. Ethanol 96%, 3 min
4. Ethanol 80%, 3 min
5. Ethanol 70%, 3 min
6. Ethanol 50%, 3 min
7. Destilliertes Wasser, 3 min

Danach erfolgt die Demaskierung mittels Dampfgeräts und einer Pufferlösung bei 96°C. Für die GLO1 Färbung erfolgte diese für 35 Minuten mit einem Citratpuffer mit einem pH von 6 (EnVision™ Target Retrieval Solution Low pH) in einer 1:50 Verdünnung und für die CK7 Färbung erfolgte die Demaskierung für 20 Minuten mit einem TRIS-EDTA-Puffer mit einem pH von 9 (EnVision™ Target Retrieval Solution High pH) in einer 1:50 Verdünnung. Nach 3-maligem Waschen in Waschpuffer (EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x), 1:20 verdünnt in A. dest) für je 5 Minuten wurde der Färbevorgang gestartet.

2. Färbevorgang

Für den Vorgang wurde der „Dako Cytomation Autostainer Plus“ verwendet, um einheitliche Bedingungen zu gewährleisten und Fehlerquellen dank Automatisierung zu minimieren und den Durchsatz zu steigern. Pro Färbedurchgang wurden immer Prostatapräparate als Positivkontrollen mitgeführt. Als Negativkontrolle wurde das gleiche Präparat ohne Zugabe des Erstantikörpers verwendet und am Ende des Durchgangs evaluiert.

1. Schritt: Blockierung der endogenen Peroxidase

Als erster Schritt erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidase durch Wasserstoffperoxid in Phosphatpuffer mittels „EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent“ (15mmol/L NaN₃) für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT). Anschließend erfolgten 3 Waschschrte mit dem „EnVision™ FLEX Wash Buffer“.

2. Schritt: Bindung des Primärantikörpers

Nun wurden die jeweiligen Primärantikörperlösungen aufgetragen und bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Für GLO1 erfolgte dies in einer Verdünnung von 1:500 in EnVision™ FLEX Antibody Diluent und für CK7 ohne vorherige Verdünnung als ready to use (rtu). Anschließend erfolgten 3 Waschschrte mit dem Waschpuffer.

3. Schritt: Bindung des Linkers + Sekundärantikörper-Polymers + Chromogen

Im Falle von CK7 erfolgte die Inkubation des EnVision™ FLEX+ Mouse Linkers, um die Signalverstärkung zu erhöhen für 15 Minuten bei RT, gefolgt von 3 Waschschrten (Für GLO1 ist eine Verstärkung per Linker nicht nötig). Im nachfolgenden Arbeitsschritt erfolgte die Applizierung und Inkubation der Sekundärantikörper-Polymer-Lösungen für 20 Minuten bei RT (EnVision FLEX™ /HRP visualization reagent). Anschließend erfolgten erneut 3 Waschschrte.

4. Schritt: Anfärbung mittels DAB-Chromogen

Durch 5-minütige Inkubation des DAB-Chromogens (EnVision FLEX™ DAB+ Chromogen) und 3-maligem Auswaschen wurde die Antikörperbindung sichtbar gemacht. Dieser Vorgang wurde pro Färbung insgesamt zweimal durchgeführt.

5. Schritt: Gegenfärbung mit Hämatoxylin

Zur besseren Erkennbarkeit und zur Gewebekontrastierung erfolgt im Anschluss eine Gegenfärbung mittels Hämatoxylin nach Mayer. Diese wird für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 10 Minuten mit Leitungswasser gebläut und ermöglicht eine Färbung aller Zellkerne in blau.

6. Schritt: Entwässerung und eindecken mit Entellan™

Die Präparate wurden abschließend mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (gleicher Vorgang wie bei Rehydrierung mit absteigender Alkoholreihe, aber Beginn mit Destilliertem Wasser und Schritte aufsteigend hin zum Xylol), mit dem Eindeckmittel Entellan™ permanent eingedeckt und mit einem Deckglas versehen.

3.3.2. Datenerhebung

3.3.2.1. Klinische Daten

Die klinischen Patientendaten wurden aus einer bestehenden Datenbank der Arbeitsgruppe von Prof. [REDACTED] entnommen, aktualisiert und teils erweitert. Dies erfolgte mithilfe des klinikintern verwendeten Personendatenmanagement-Programms SAP. Anschließend wurden die pseudonymisierten Daten zunächst in eine Excel-Tabelle konvertiert und aus dieser dann in eine SPSS-Datei erstellt. Diese wurde mit freundlicher Unterstützung des Instituts für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) der Universitätsmedizin Mainz ausgewertet und mit den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbungen korreliert.

Als Patientenparameter wurden Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose und das errechnete OS sowie die Risikofaktoren Alkohol-, Nikotinabusus sowie Diabetes Mellitus erhoben. An Tumorparametern wurden die Tumorlokalisation (iCCA, pCCA, dCCA, GB) sowie die TNM-Klassifikation, die Klassifikation nach UICC und Bismuth-Corlette, sowie der Tumordifferenzierungsgrad erhoben. Über die Jahre haben sich leichte Änderungen an der Wertung der verschiedenen Stadien bezüglich der UICC-Klassifikation ergeben, weshalb die vorliegenden TNM-Stadien zur besseren Vergleichbarkeit nach der 8. UICC-Auflage aktualisiert und ausgewertet wurden.

An Laborparametern wurden CA 19-9, GOT, GPT, der De-Ritis-Quotient, Bilirubin, Albumin, der Hämoglobinwert sowie der INR und Quick-Wert erhoben und verwendet (65).

In der Datenbank wurden ebenso die weiteren Therapieverläufe (z.B. Chemotherapie) erhoben, jedoch aufgrund der weitestgehenden Unvollständigkeit durch a.e. fehlende Digitalisierung und der Nachsorge außerhalb der Universitätsmedizin für diese Arbeit nicht verwendet.

3.3.2.2. Immunhistochemische Färbung

Nach der IHC erfolgte die lichtmikroskopische Präparateauswertung. Diese wurde mit freundlicher Unterstützung durch das Institut für allgemeine Pathologie der Universitätsmedizin Mainz unter Begleitung und Anleitung durch [REDACTED] und [REDACTED]. Die Auswertung wurde an einem Lichtmikroskop der Firma Olympus unter 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung durchgeführt. Die Einteilung der GLO1-Färbung erfolgte nach dem immunreaktiven Score (IRS-Score) nach Remmele und Stegner, der sonst als Bewertungsskala für Progesteron- und Östrogenrezeptoren von Tumorzellen der Brust dient und für diese Arbeit für GLO1 adaptiert wurde (185). In diesem Score wird jeweils eine Punktzahl für die Prozentzahl positiver Zellkerne und für die Intensität der Färbereaktion vergeben und beide Punktzahlen im Anschluss multipliziert. Die Einteilung und Auswertung von CK7 erfolgte lediglich nach Intensität der Färbereaktion.

Punktzahl	Positiv gefärbte Zellen in %	Intensität der Färbereaktion
0	0	Keine Anfärbung
1	< 10	Schwache Färbereaktion
2	11-50	Mäßige Färbereaktion
3	51-80	Starke Färbereaktion
4	> 80	-

Auswertung des IRS-Scores, abgewandelt für GLO1	
0-1	GLO1-negativ
2-3	GLO1-positiv, schwache Expression
4-8	GLO1-positiv,mäßige Expression
9-12	GLO1-positiv, starke Expression

Tabelle 1: Punktevergabe innerhalb des IRS-Scores. Spalte 1 zeigt die jeweils zu vergebende Punktzahl für die Ergebnisse in Spalten 2 (positiv gefärbte Zellen in Prozent) und Spalte 3 (Intensität der Färbereaktion). Zur Errechnung des IRS-Scores für GLO1 werden die jeweiligen Punktzahlen für Spalte 2 und 3 multipliziert und anhand der Grenzwerte im unteren Teil der Tabelle eingeteilt. Waren z.B. 40% der Tumorzellen in einem Präparat schwach gefärbt so ergibt sich rechnerisch eine Punktzahl von $2 \times 1 = 2$. Somit wird das Präparat als GLO1-positiv gewertet mit einer schwachen Expression.

3.3.2.3. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte wie bereits erwähnt mit dem Programm SPSS (Statistical Package for Social Sciences) der Firma IBM unter Verwendung der 27.0 Version für Windows und unter beratender Begleitung durch [REDACTED] vom Institut für medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Es erfolgte zunächst die Deskription der Daten des Patientenkollektivs, danach erfolgte die retrospektive explorative Auswertung verschiedener Korrelationen mittels exaktem Test nach Fisher für 2 kategoriale unverbundene Variablen. Im Anschluss erfolgte die explorative Durchführung von Lebenszeitanalysen mittels Kaplan-Meier Kurven, Log-Rank-Tests und Breslow-Tests. Der Breslow-Test ist ein statistischer Test zur Analyse von Überlebenskurven, welcher Ereignisse zu Beginn des Beobachtungsintervalls stärker gewichtet, um Aussagen über Unterschiede in der Anfangsphase eines Untersuchten Zeitraums hervorzuheben (186, 187).

In dieser Arbeit wurde der Breslow-Test herangezogen, wenn in den Kaplan Maier-Überlebenskurven grafisch deutliche Unterschiede bei den Überlebensraten in den Anfangsphasen zu sehen waren. Da es sich beim CCA um eine aggressive Tumorart mit geringem OS nach kurativer Resektion handelt (s. Abschnitt 2.1.7.), welches sich auch in den mOS-Zeiten in diesem Kollektiv widerspiegelt, waren Unterschiede im Beginn des Beobachtungszeitraumes von besonderem Interesse.

Als statistisches Signifikanzniveau der explorativen Analyse wurde ein p-Wert von 0,05 gewählt. Aufgrund des gewählten Studiendesigns (retrospektive Analyse) ist die Analyse des Datensatzes rein explorativer Natur und erlaubt keine Aussagen über tatsächliche Signifikanzen. Zur Vereinfachung des Leseflusses wird in folgendem Text von „statistisch signifikant“ gesprochen, wenn sich Auffälligkeiten innerhalb des gewählten p-Wertes zeigen ließen.

Zur Ermittlung des Einflusses bestimmter Daten auf das Überleben erfolgte zudem eine Auswertung mittels Cox-Regressionsmodell. Hierzu wurden die getesteten Variablen zunächst auf eine Annahme von einer über die Zeit konstanten Einflussnahme (engl. proportional Hazard) hin getestet und dann sowohl univariat sowie multivariat getestet. Eine grafische Darstellung erfolgte mittels Forest-Plots, welche mit dem Datenverarbeitungsprogramm Microsoft-Excel erstellt wurden.

4. Auswertung

4.1. Klinische Daten und allgemeine Charakteristika des Kollektivs

Es wurden insgesamt von 245 Patienten und Patientinnen klinische Daten erhoben. Diese konnten bei einigen wenigen Personen aufgrund fehlender Digitalisierung, fehlendem Zugang zu älteren archivierten Akten, und der teilweise fehlenden Dokumentierung bezüglich der spezifischen Fragestellung der Dissertation nicht vollständig erhoben werden.

Die 245 Tumore wurden für die weitere Betrachtung in Gruppen nach ihrer Lokalisation aufgeteilt. Daraus ergaben sich drei Gruppen mit n=163 intrahepatischer Lokalisation, n=77 extrahepatischer Lokalisation und n=5 Lokalisation in der Gallenblase. 53,1% (n=130) der Tumoren stammten von männlichen Patienten und 46,9 % (n=115) von weiblichen Patientinnen. Bei den intrahepatischen Karzinomen war der Anteil der männlichen Patienten mit 45,4 % (n=74) geringer als im Gesamtkollektiv. Das Overall Survival (OS, engl. Gesamtüberleben) betrug in diesem Kollektiv im Schnitt 27,9 Monate (Median = 20,4 Monate). Dabei wurde das beste OS (29,3 Monate) bei intrahepatischen Karzinomen beobachtet. Extrahepatische Karzinome hatten ein mittleres OS von 25,3 Monaten. Das mediane Erkrankungsalter bei Erstdiagnose betrug in diesem Kollektiv 65 Jahre (min. 31- max. 84) (Siehe Tabelle 2).

	Gesamtkollektiv		intrahepatisch		extrahepatisch		Gallenblase	
	Anzahl in n=	Häufig- keit in %	Anzahl in n=	Häufig- keit in %	Anzahl in n=	Häufig- keit in %	Anzahl in n=	Häufig- keit in %
Gesamtzahl	245	100						
Lokalisation								
intrahepatisch			163	100				
extrahepatisch	insgesamt				77	100		
	davon: distal				4	5,2		
	davon: perihilär				73	94,8		
Gallenblase							5	100
Geschlecht								
männlich	130	53,1	74	45,4	54	70,1	2	40
weiblich	115	46,9	89	54,6	23	29,9	3	60
Alter bei Erstdiagnose	MW	63,6	MW	63,6	MW	63,3	MW	68
	SD	11,1	SD	11,6	SD	10,2	SD	8,9
	Min	32	Min	32	Min	39	Min	59
	Max	84	Max	84	Max	84	Max	81
	Median	65	Median	65	Median	64	Median	67
Overall- Survival (in Monaten)	MW	34,4	MW	40	MW	26,4	MW	20,9
	SD	2,8	SD	4,3	SD	2,6	SD	7
	Min	0	Min	0	Min	0	Min	1,3
	Max	189,2	Max	189,2	Max	84,3	Max	42,7
	Median	23,5	Median	23,5	Median	22,6	Median	22,8

Tabelle 2: Überblick Gesamtkollektiv und Unterkollektive: Häufigkeitsverteilung Tumorlokalisation, Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose und Overall Survival.

In Bezug auf die gängigsten Risikofaktoren gaben 12 Personen (4,9%) einen Alkoholabusus und 26 Personen (10,6%) einen Nikotinabusus an. Bei 33 (13,5%) Personen war in der Akte ein Diabetes Mellitus vermerkt (siehe Tabelle 3).

Risikofaktoren		Anzahl =n	Prozent
Alkoholabusus	ja	12	4,9
	fehlend	233	95,1
Nikotinabusus	ja	26	10,6
	fehlend	219	89,4
Diabetes	ja	33	13,5
	nein	211	86,1
	fehlend	1	0,4

Tabelle 3: Risikofaktoren im Gesamtkollektiv.

Anhand der in Tabelle 4 dargestellten Häufigkeitsverteilungen der TNM-Stadien ist zu erkennen, dass insgesamt eher niedrigere T-Stadien vorliegen (Tis, T1 und T2-Stadien aufsummiert n=167, 68,7%). Die Gruppe der aufsummierten T3 und T4 Stadien beträgt lediglich n=76 (31,3%) der untersuchten Präparate. Dieselbe Tendenz zeigt sich ebenfalls bei den Häufigkeiten des Lymphknotenbefalls (N0 mit n=144, 59,3%) und des Status der Fernmetastasierung (M0 mit n=197, 85,7%). Der bereits in der TNM-Klassifizierung gesehene Trend zu niedrigen Stadien spiegelt sich ebenfalls in der UICC-Klassifizierung wider. Im Gesamtkollektiv sind bei Diagnose in diesem Kollektiv 43,3% in Stadium 1-2 und 49,4% in Stadium 3-4, bei 7,3% fehlt eine Angabe des UICC-Stadiums. Von den nach UICC-Stadium ausgewerteten Patienten sind bei iCCA 50,7% und bei eCCA 40,5% der Tumore in einem Stadium $\leq$ IIb (siehe Tabelle 5). Bei jeweils der Hälfte der Personen im Gesamtkollektiv lag eine mittelgradige Tumordifferenzierung vor. Dies spiegelt sich auch in den beiden Untergruppen der intrahepatischen und extrahepatischen Karzinome wider. Bei 25,3% der Karzinome im Gesamtkollektiv, bei 26,3% der intrahepatischen Tumore und 22,4% der extrahepatischen Tumore lag eine schlechte Tumordifferenzierung vor (siehe Tabelle 5). In der Einteilung der extrahepatischen Tumore nach Bismuth-Corlette befiel der Tumor in 36 Fällen (55,4%) die Hepatikushauptäste sowie beide Hauptäste (Typ IV).

Bezüglich der laborchemischen Grenzwerte wurden die Referenzwerte des Institutes für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universitätsmedizin Mainz gewählt. Für CA 19-9 ergibt sich hierdurch in dieser Arbeit 37 U/ml als Cut-off-Wert (65). In 60,1% (n=86) der Fälle im Gesamtkollektiv liegt ein erhöhter Wert des Tumormarkers CA19-9 vor. Eine ähnliche Verteilung mit erhöhten CA 19-9 Werten bei mehr als der Hälfte des Kollektivs lässt sich ebenso in den Unterkollektiven beobachten (iCCA: n=44, 51%; eCCA: n=40, 74%). Der errechnete De-Ritis-Quotient, welcher sich durch Division von GOT durch GPT ergibt, ist im Gesamtkollektiv etwa gleichmäßig verteilt (51,7% ≥ 1), bei der Betrachtung der Unterkollektive fällt jedoch auf, dass sich die intrahepatischen Tumore wie zu erwarten (63,8%, n=88 ≥ 1) zu den extrahepatischen (25,4%, n=16 ≥ 1) gegensätzlich verhalten. 40,7% (n=48) der intrahepatischen Kar-

zinome gingen mit einer Erniedrigung des Albuminwerts einher (vs. 58,1%, n=36 extrahepatische Tumore). Eine erwartete gegensätzliche Verteilung ist bei den Bilirubinwerten zu beobachten. Hierbei gehen die extrahepatischen Tumore eher mit Gallenabflussstörungen einher und somit tendenziell mit höheren Bilirubinwerten (71,4% erhöht extrahepatisch vs. 21,7% intrahepatisch) (siehe Tabelle 6).

Die INR (91,2%) und Quick- Werte (94,6%) lagen im Gesamtkollektiv hauptsächlich im Normbereich. Gleichmaßen verhielt es sich in den Unterkollektiven (siehe Tabelle 7). 26% (n=53) des Gesamtkollektives wiesen eine Anämie auf, wobei in der Gruppe der intrahepatischen Karzinome 18,2% (n=25) und in der Gruppe der extrahepatischen Karzinome 42,9% (n=27) eine Anämie aufwiesen.

TNM-Klassifikation		Gesamtkollektiv		intrahepatisch		extrahepatisch		Gallenblase	
		Anzahl in n=	Häufig- keit in %	Anzahl in n=	Häufig- keit in %	Anzahl in n=	Häufig- keit in %	Anzahl in n=	Häufig- keit in %
T-Stadium									
Fehlend		2	0,82	1	0,6	1	1,3	0	0
Gültig T		243	99,1	162	100	76	98,7	5	100
<u>- davon:</u>		Gültige %		Gültige %		Gültige %		Gültige %	
	Tis	1	0,4	-	-	1	1,3	-	-
	T1	58	23,9	52	32,1	6	7,9	-	-
	T2	12	4,9	4	2,5	6	7,9	2	40
	T2a	30	12,3	19	11,7	11	14,5	-	-
	T2b	66	27,2	38	23,5	28	36,8	-	-
	T3	66	27,2	47	29	18	23,7	1	20
	T4	10	4,1	2	1,2	6	7,9	2	40
N-Stadium									
Fehlend		19	7,8	16	9,8	3	3,9	0	0
Gültig N		243	92,2	147	90,2	74	96,1	5	100
<u>- davon:</u>		Gültige %		Gültige %		Gültige %		Gültige %	
	N0	144	63,7	97	66	44	59,5	3	60
	N1	78	34,5	50	34	26	35,1	2	40
	N2	4	1,8	0	-	4	5,4	0	-
M-Stadium									
Fehlend		27	11	11	6,7	15	19,5	1	20
Gültig M		230	89	152	93,3	62	80,5	4	80
<u>- davon:</u>		Gültige %		Gültige %		Gültige %		Gültige %	
	M0	197	90,4	138	90,8	56	90,3	3	75
	M1	21	9,6	14	9,2	6	9,7	1	25

Tabelle 4: TNM-Klassifikation: Häufigkeitsverteilung des TNM-Status im Gesamtkollektiv und in den Unterkollektiven.

Stadieneinteilung	Gesamtkollektiv		intrahepatisch		extrahepatisch		Gallenblase	
	Anzahl in n=	Häufig- keit in %	Anzahl in n=	Häufig- keit in %	Anzahl in n=	Häufig- keit in %	Anzahl in n=	Häufig- keit in %
UICC-Stadium								
Fehlend	18	7,3	15	9,2	3	3,9	0	0
Gültig	227	92,6	148	90,8	74	96,2	5	100
<u>davon:</u>		Gültige %		Gültige %		Gültige %		Gültige %
Tis	1	0,4	-	-	1	1,4	-	-
I	39	17,2	35	23,6	4	5,4	-	-
II	63	27,8	40	27	22	29,7	1	20
IIa	2	0,9	-	-	2	2,7	0	0
IIb	1	0,4	-	-	1	1,4	0	0
III	1	0,4	1	0,7	-	-	-	-
IIIa	31	13,7	21	14,2	10	13,5	-	-
IIIb	39	17,2	37	25	1	1,4	1	20
IIIc	23	10,1	-	-	23	31,1	-	-
IV	14	6,2	14	9,5	-	-	-	-
IVa	6	2,6	-	-	4	5,4	2	40
IVb	7	3,1	-	-	6	8,1	1	20
<u>insgesamt:</u>		Gültige %		Gültige %		Gültige %		Gültige %
Stadien Tis-IIb	106	46,7	75	50,7	30	40,5	1	20
Stadien IIIa-IVb	121	53,3	73	49,3	44	59,5	4	80
Einteilung nach Bismuth-Corlette								
Fehlend					12	15,6		
Gültig					65	84,5		
<u>davon:</u>						Gültige %		
Typ I					2	3,1		
Typ II					3	4,6		
Typ IIIa					16	24,6		
Typ IIIb					8	12,3		
Typ IV					36	55,4		
Grad der Differenzierung								
Fehlend	12	4,9	11	6,7	1	1,3	0	0
Gültig	233	95,1	152	93,3	76	98,7	5	100
<u>davon:</u>		Gültige %		Gültige %		Gültige %		Gültige %
Gut	54	23,2	34	22,4	19	25	1	20
Mittel	120	51,5	78	51,3	40	52,6	2	40
Niedrig	59	25,3	40	26,3	17	22,4	2	40

Tabelle 5: Stadieneinteilung: Häufigkeitsverteilung des UICC-Stadiums und des Grades der Differenzierung im Gesamtkollektiv und in den Unterkollektiven, zusätzliche Einteilung der Extrahepatischen Karzinome nach Bismuth-Corlette.

Laborparameter: Serum	Gesamtkollektiv		intrahepatisch		extrahepatisch		Gallenblase	
	Anzahl in n=	Häufig- keit in %	Anzahl in n=	Häufig- keit in %	Anzahl in n=	Häufig- keit in %	Anzahl in n=	Häufig- keit in %
CA 19-9								
Fehlend	102	41,6	77	47,2	23	70,1	2	40
Gesamt	143	58,4	86	52,8	54	29,9	3	60
- davon:	Gültige %		Gültige %		Gültige %		Gültige %	
< 37 U/ml	57	39,9	42	48,8	14	25,9	1	33,3
≥ 37 U/ml	86	60,1	44	51,2	40	74,1	2	66,7
GOT								
Fehlend	40	16,3	25	15,3	14	18,2	1	20
Gesamt	205	83,7	138	84,7	63	81,8	4	80
- davon:	Gültige %		Gültige %		Gültige %		Gültige %	
Normwertig (♂ 5-35 U/L, ♀ 5-31 U/L)	68	33,2	61	44,2	5	7,9	2	50
erhöht (♂ > 35 U/L, ♀ > 31 U/L)	136	66,3	77	55,8	57	90,5	2	50
erniedrigt (<5 U/L)	1	0,5	0	-	1	1,6	0	-
GPT								
Fehlend	40	16,3	25	15,3	14	18,2	1	20
Gesamt	205	83,7	138	84,7	63	81,8	4	80
- davon:	Gültige %		Gültige %		Gültige %		Gültige %	
normwertig (♂ < 50 U/L, ♀ < 35 U/L)	103	50,2	91	65,9	10	15,9	2	50
erhöht (♂ ≥ 50 U/L, ♀ ≥ 35 U/L)	102	49,8	47	34,1	53	84,1	2	50
De-Ritis-Quotient								
Fehlend	40	16,3	25	15,3	14	18,2	1	20
Gesamt	205	83,7	138	84,7	63	81,8	4	80
- davon:	Gültige %		Gültige %		Gültige %		Gültige %	
<1	99	48,3	50	36,2	47	74,6	2	50
≥1	106	51,7	88	63,8	16	25,4	2	50
Bilirubin								
Fehlend	40	16,3	25	15,3	14	18,2	1	20
Gesamt	205	83,7	138	84,7	63	81,8	4	80
- davon:	Gültige %		Gültige %		Gültige %		Gültige %	
<1,2 mg/dl	129	62,9	108	78,3	18	28,6	3	75
≥ 1,2 mg/dl	76	37,1	30	21,7	45	71,4	1	25
Albumin								
Fehlend	61	24,9	45	27,6	15	19,5	1	20
Gesamt	184	75,1	118	72,4	62	80,5	4	80
- davon:	Gültige %		Gültige %		Gültige %		Gültige %	
normwertig 15-60 Jahre (35-50 g/L), ≥ 61 Jahre (32-46 g/L)	97	52,7	69	58,5	26	41,9	2	50
erniedrigt 15-60 Jahre (<35 g/L), ≥ 61 Jahre (<32 g/L)	86	46,7	48	40,7	36	58,1	2	50
erhöht 15-60 Jahre (> 50 g/L), ≥ 61 Jahre (>46 g/L)	1	0,4	1	0,8	0	0	0	0

Tabelle 6: Serumparameter: Häufigkeitsverteilung der Parameter CA19-9, GOT, GPT, Bilirubin, Albumin und des errechneten De-Ritis-Quotienten im Gesamtkollektiv und den Unterkollektiven.

Laborparameter: Gerinnung	Gesamtkollektiv		intrahepatisch		extrahepatisch		Gallenblase	
	Anzahl in n=	Häufig- keit in %	Anzahl in n=	Häufig- keit in %	Anzahl in n=	Häufig- keit in %	Anzahl in n=	Häufig- keit in %
Hb								
Fehlend	41	16,7	26	16	14	18,2	1	20
Gesamt	204	83,3	137	84	63	81,8	4	80
- <u>davon:</u>	Gültige %		Gültige %		Gültige %		Gültige %	
Anämie (♂ <13 g/dl, ♀ <12 g/dl)	53	26	25	18,2	27	42,9	1	25
Keine Anämie (♂ ≥13 g/dl, ♀ ≥12 g/dl)	151	74	112	81,8	36	57,1	3	75
INR								
Fehlend	40	16,3	25	15,3	14	18,2	1	20
Gesamt	205	83,7	138	84,7	63	81,8	4	80
- <u>davon:</u>	Gültige %		Gültige %		Gültige %		Gültige %	
normwertig (0,85-1,15)	187	91,2	128	92,8	56	88,9	3	50
erhöht (>1,15)	16	7,8	9	6,5	6	9,5	1	50
erniedrigt (<0,85)	2	1	1	0,7	1	1,6	0	0
Quick								
Fehlend	40	16,3	25	15,3	14	18,2	1	20
Gesamt	205	83,7	138	84,7	63	81,8	4	80
- <u>davon:</u>	Gültige %		Gültige %		Gültige %		Gültige %	
normwertig (70-130%)	194	94,6	133	96,4	58	92,1	3	60
erniedrigt (<70%)	11	5,4	5	3,6	5	7,9	1	40

Tabelle 7: Gerinnungsparameter: Häufigkeitsverteilung des Hämoglobinwertes, des INR-Wertes und des Quickwertes im Gesamtkollektiv sowie den Unterkollektiven.

4.2. Immunhistochemische Färbeergebnisse

Die Auswertung der IHC-Färbungen erfolgte nach der im Kapitel 3.3.2. beschriebenen Methode.

Insgesamt wurden von 245 Personen im Kollektiv 229 Präparate vollständig auf ihre Färbung hin ausgewertet. Bei 16 Präparaten (jeweils 8 extrahepatisch und intrahepatisch) konnte kein oder ungenügend Tumormaterial für eine Auswertung nachgewiesen werden, diese wurden im Folgenden ausgeschlossen.

Die Präparate wurden dabei jeweils auf CK7 und GLO1 hin angefärbt.

4.2.1. CK7 Färbungen

4.2.1.1 Intrahepatische CK7 Färbungen

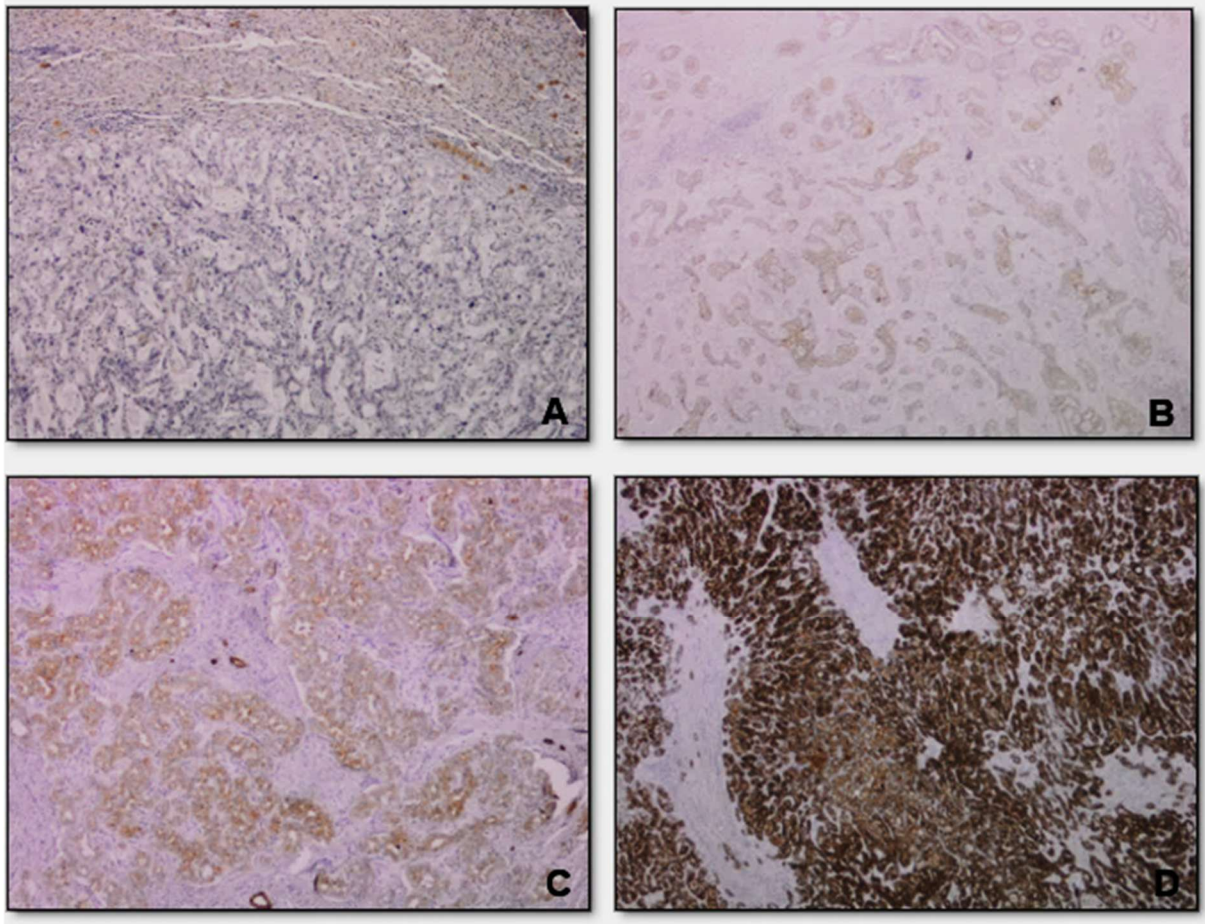


Abbildung 10: CK7-Färbung der intrahepatischen Tumorpräparate.

Abb. 10 A keine CK7 Färbung der Tumorzellen, schwache Hintergrundfärbung der Leber, 20fache Vergrößerung.

Abb. 10 B schwache CK7 Färbung der Tumorzellen, 20fache Vergrößerung.

Abb. 10 C mäßige CK7 Färbung der Tumorzellen, 40fache Vergrößerung.

Abb. 10 D starke CK7 Färbung der Tumorzellen, 20fache Vergrößerung.

4.2.1.2 extrahepatische CK7 Färbungen

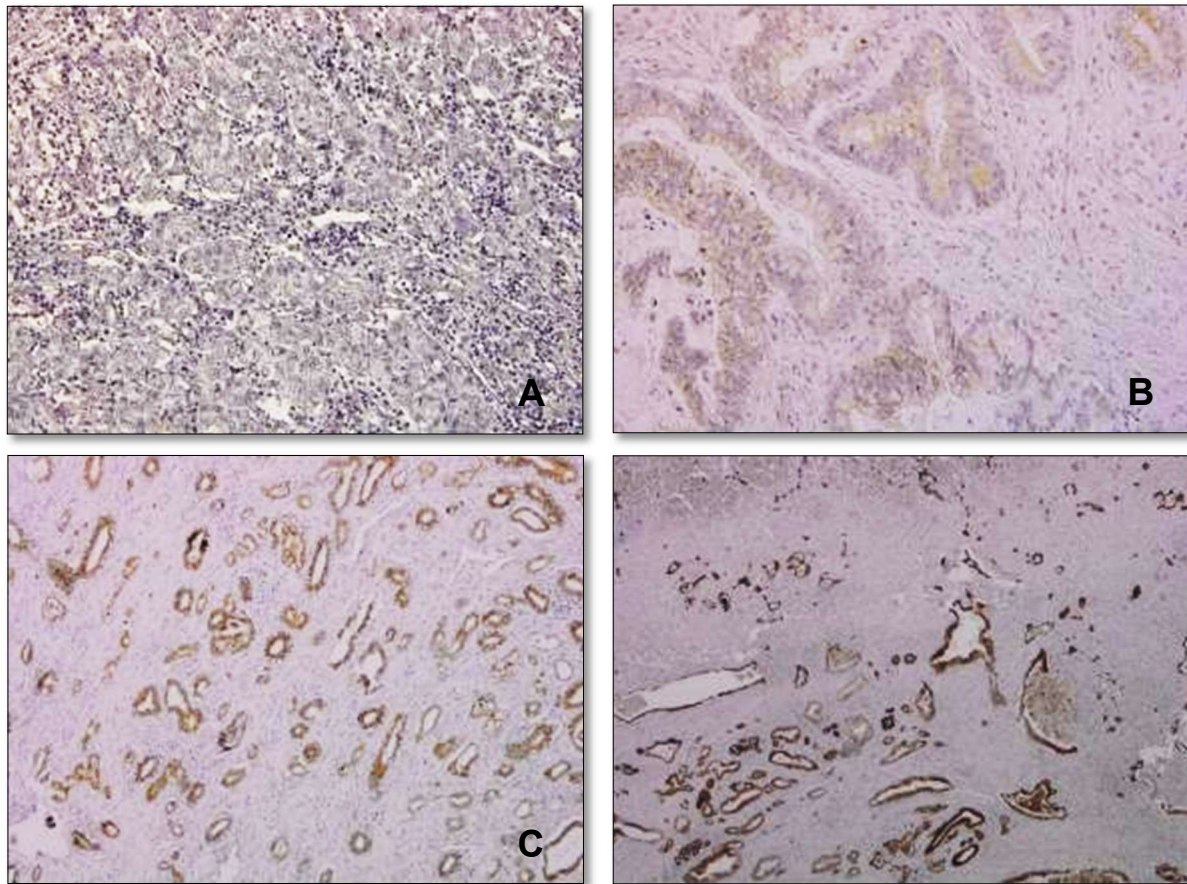


Abbildung 11: CK7-Färbung der extrahepatischen Tumorpräparate.

Abb. 11 A keine CK7 Färbung der Tumorzellen, 100fache Vergrößerung.

Abb. 11 B schwache CK7 Färbung der Tumorzellen, 100fache Vergrößerung.

Abb. 11 C mäßige CK7 Färbung der Tumorzellen, 40fache Vergrößerung.

Abb. 11 D starke CK7 Färbung der Tumorzellen, 20fache Vergrößerung.

4.2.1.3. Ergebnisse der CK7 Färbung

Abbildung 10 zeigt exemplarisch die immunhistochemische CK7-Färbung in ihren unterschiedlichen Färbeintensitäten (ungefärbt, schwach, mäßig, stark) anhand der intrahepatischen Tumore. Abbildung 11 zeigt die unterschiedlichen CK7-Färbeintensitäten anhand der extrahepatischen Tumore. Dabei ergab sich unter Tabelle 8 veranschaulichte Verteilung. Im Gesamtkollektiv ist zu sehen, dass die Gruppe der moderat und stark gefärbten Präparate 69% (n=79) ausmacht, eine fehlende (negative) Färbung lag bei 16,2% der Präparate (n=37) vor. Auch in den beiden Untergruppen waren die Färbeintensitäten ähnlich verteilt moderat und stark gefärbten Gruppe intrahepatisch 68% (n=106) und extrahepatisch 69,6% (n=48), und ungefärbt waren intrahepatisch 17,2% (n=27) und extrahepatisch 13% (n=9).

Insgesamt stelle sich die CK 7-Färbung stets homogen verteilt dar, sowohl im Gesunden als auch im tumorösen Gewebe. Gesunde Gallengangszellen stellten sich durchgehend homogen stark gefärbt dar.

CK7 Färbung	Gesamtkollektiv		intrahepatisch		extrahepatisch	
	Anzahl in n=	Häufig- keit in %	Anzahl in n=	Häufig- keit in %	Anzahl in n=	Häufig- keit in %
Fehlend	16	6,5	8	4,9	8	10,4
Gültig	229	93,5	155	95,1	69	89,6
- davon:	Gültige %		Gültige %		Gültige %	
negativ	37	16,2	27	17,4	9	13
schwach	34	14,8	22	14,2	12	17,4
moderat	72	31,4	46	29,7	26	37,7
stark	86	37,6	60	38,7	22	31,9

Tabelle 8: CK7 Färbung: Häufigkeitsverteilung der Färbeintensitäten der CK7 Färbung im Gesamtkollektiv und den Subkollektiven der intrahepatischen und extrahepatischen Tumore.

4.2.2 GLO1-Färbungen

4.2.2.1. intrahepatische GLO1-Färbungen

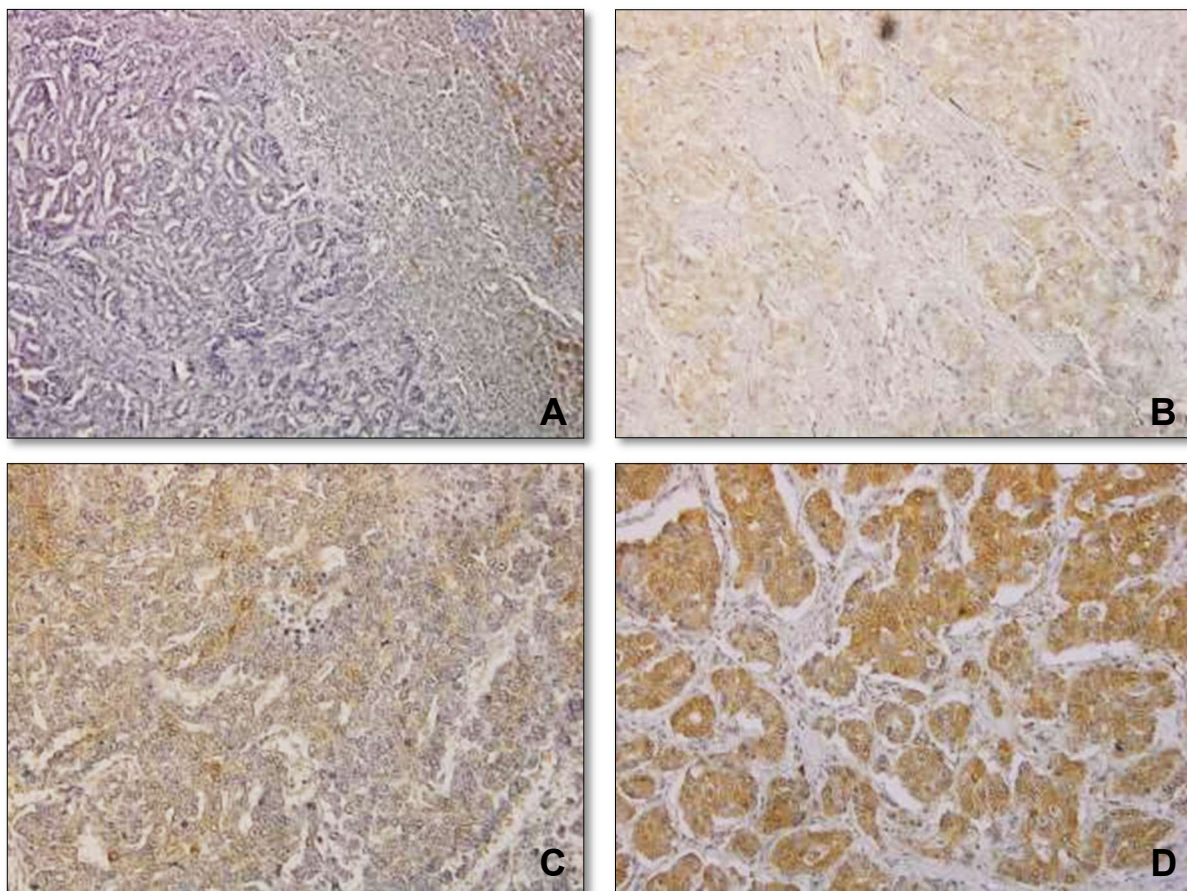


Abbildung 12: GLO1-Färbung der intrahepatischen Tumorpräparate.

Abb. 12 A keine GLO1 Färbung der Tumorzellen, 40fache Vergrößerung.

Abb. 12 B schwache GLO1 Färbung der Tumorzellen, 100fache Vergrößerung.

Abb. 12 C mäßige GLO1 Färbung der Tumorzellen, 100fache Vergrößerung.

Abb. 12 D starke GLO1 Färbung der Tumorzellen, 100fache Vergrößerung.

Abbildung 12 zeigt exemplarisch die immunhistochemische GLO1-Färbung in ihren unterschiedlich ausgeprägten Färbintensitäten (ungefärbt, schwach, mäßig, stark) anhand der intrahepatischen Tumorpräparate.

Insgesamt fiel im Vergleich zur CK7-Färbung eine hohe Inhomogenität der GLO1-Färbung innerhalb der Tumorpräparate auf. So gab es Exemplare, welche größtenteils homogen gefärbt waren, jedoch auch einen Großteil an Exemplaren welche sowohl gefärbte Anteile unterschiedlicher Intensitäten als auch ungefärbte Bereiche aufwiesen.

4.2.2.2. extrahepatische GLO1-Färbungen

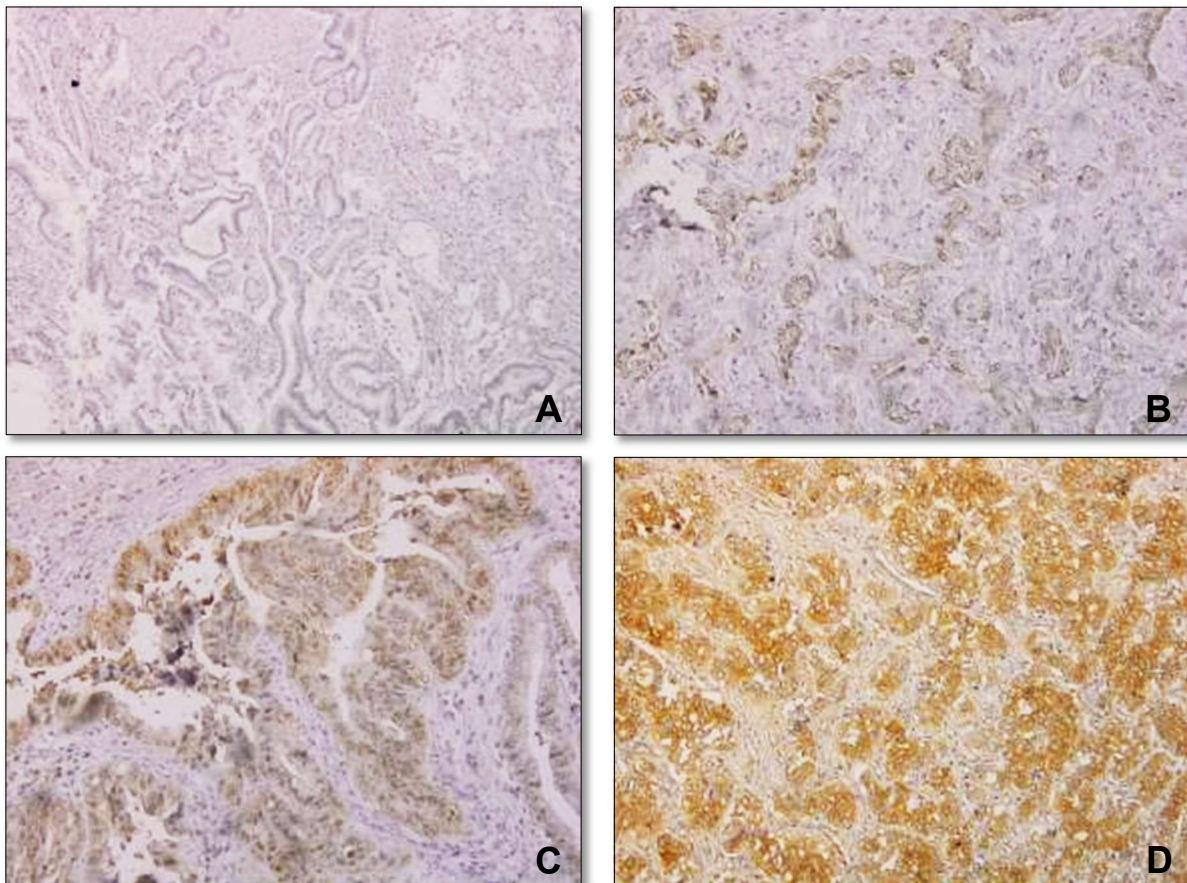


Abbildung 13: GLO1-Färbung der extrahepatischen Tumorpräparate.

Abb. 13 A keine GLO1 Färbung der Tumorzellen, 40fache Vergrößerung.

Abb. 13 B schwache GLO1 Färbung der Tumorzellen, 100fache Vergrößerung.

Abb. 13 C mäßige GLO1 Färbung der Tumorzellen, 100fache Vergrößerung.

Abb. 13 D starke GLO1 Färbung der Tumorzellen, 100fache Vergrößerung.

Abbildung 13 zeigt exemplarisch die unterschiedlichen GLO1-Intensitätsabstufungen anhand der extrahepatischen Tumore.

4.2.2.3. Besonderheiten am Beispiel der intrahepatischen GLO1-Färbungen

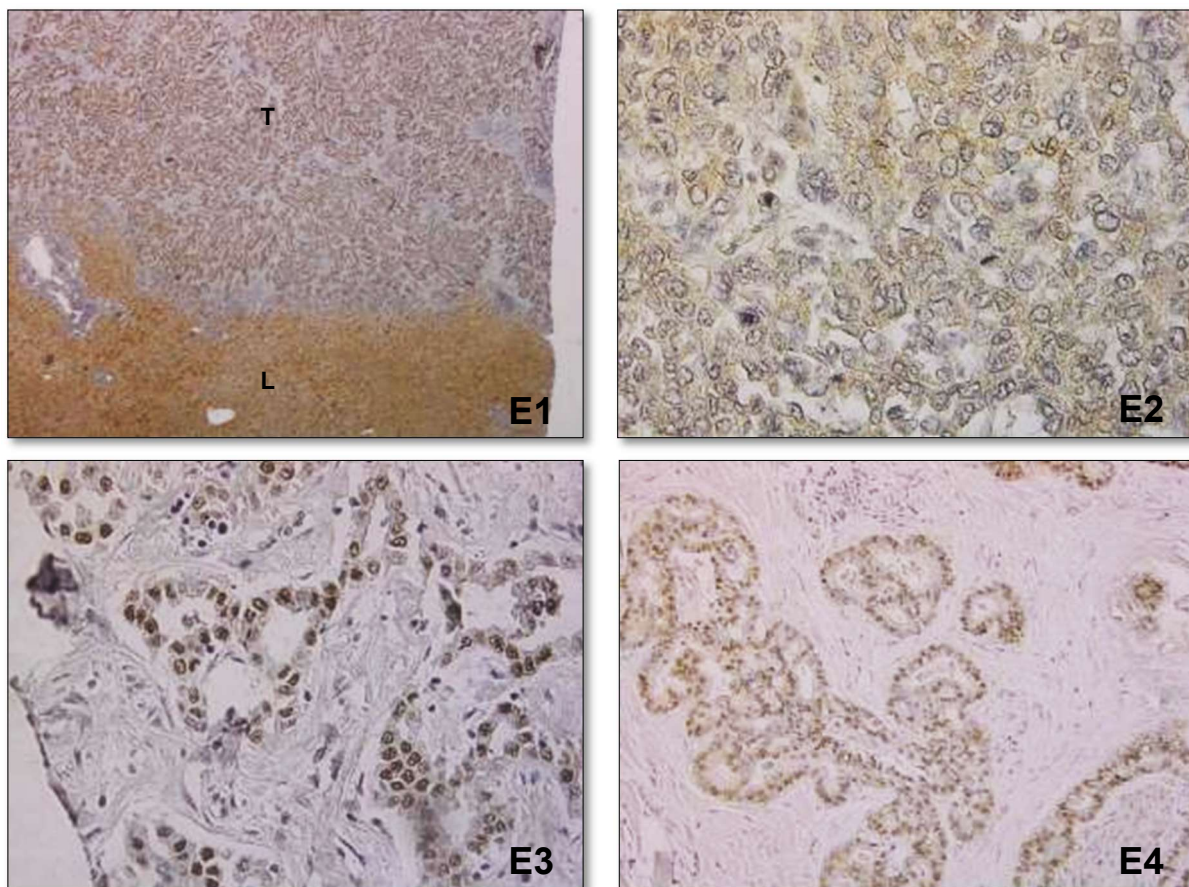


Abbildung 14: Besonderheiten der GLO1-Färbung am Beispiel der intrahepatischen Tumorphäparate.

Abb. 14 E1: exemplarisches Beispiel der Anfärbung der Leber (L) unter starker GLO1 Färbung der Tumorzellen (T), 20fache Vergrößerung.

Abb. 14 E2: exemplarisches Beispiel der Plasmafärbung unter mäßiger GLO1 Färbung der Tumorzellen, 200fache Vergrößerung.

Abb. 14 E3: exemplarisches Beispiel der Kernfärbung, 200fache Vergrößerung.

Abb. 14 E4: exemplarisches Beispiel der Kernfärbung, 100fache Vergrößerung.

In Abbildung 14 sind am Beispiel der intrahepatischen Präparate einige Besonderheiten der GLO1-Anfärbung gezeigt, welche sich in diesem Kollektiv präsentierten. Bei allen Präparaten, bei denen ein Teil der Leber (L) zu sehen war, war diese durchwegs homogen mit als stark einzustufender Intensität angefärbt (Abb. 14 E1). Des Weiteren zeigte sich, dass in einigen Präparaten eine reine Plasmafärbung auftrat, während andere Präparate wiederum eine reine Kernfärbung aufwiesen (Abb. 14 E3). Aufgrund der hohen Inhomogenität der Färbungen traten ebenso Fälle auf, in denen es Bereiche mit einer reinen Kernfärbung, andere Bereiche mit einer reinen Plasmafärbung und Bereiche mit sowohl angefärbten Kernen als auch angefärbtem Plasma gab.

4.2.2.4. Ergebnisse der GLO1-Färbung

Der IRS-Score wurde anhand der Färbeintensität und dem prozentualen Anteil der gefärbten Tumorzellen im Präparat wie unter 3.3.2. beschrieben berechnet. Insgesamt war eine breitere Verteilung des Scores bei iCCA zu sehen, bei denen 13,5% (n= 21) einen Score von 9-12 erreichten. Bei eCCA erreichte kein Präparat einen Score von 9 oder höher. Im Gesamtkollektiv wiesen 31,4% (n=72) keine oder als nicht-relevant zu betrachtende Färbung auf (IRS 0-1). Eine schwache Färbung war bei 28,8% (n=66) und eine mäßige Färbung war bei 30,6% (n=70) Präparaten zu finden. Somit wurden unter Betrachtung des IRS-Scores bei einem Grenzwert von ≥ 2 im Gesamtkollektiv 68,6% der Präparate als GLO1-positiv (n=157) bewertet. Innerhalb der iCCA wiesen 66,5% (n=103) und innerhalb der eCCA 72,5% (n=50) eine positive Färbung auf. Insgesamt zeigt sich eine breitere Verteilung der Ergebnisse im intrahepatischen Unterkollektiv (0-12) als im extrahepatischen Unterkollektiv (0-8).

Bei Betrachtung der Lokalisation der GLO1-Färbung wiesen im Gesamtkollektiv 41% (n=93) der Präparate eine reine Plasmafärbung auf. Dagegen wiesen 14% (n=33) eine reine Kernfärbung und 25% (n=58) eine Färbung von sowohl Plasma als auch Kernen auf. Eine ähnliche Verteilung ist ebenso im Unterkollektiv der intrahepatischen Tumore zu finden (43%, n=66 Plasmafärbung, 11%, n=17 Kernfärbung, 23%, n=36 Kombination aus Beiden). Bei den extrahepatischen Karzinomen stellten die rein kerngefärbten Präparate einen prozentual größeren Anteil mit 22% (n=15) dar. Ebenso verhielt es sich mit der Kombination aus Kern und Plasma (30%, n=21). Die reine Plasmafärbung fiel hier im Vergleich zu den intrahepatischen Karzinomen mit lediglich 35% (n=24) geringer aus (siehe Tabelle 9). In Abbildung 15 und Abbildung 16 sind die jeweiligen Verteilungen im Gesamtkollektiv und den Unterkollektiven bezüglich der GLO1-Expression und der Lokalisation der Färbung grafisch dargestellt.

GLO1- IRS-Score	Gesamtkollektiv		Intrahepatisch		Extrahepatisch	
	Anzahl in n=	Häufigkeit in %	Anzahl in n=	Häufig- keit in %	Anzahl in n=	Häufig- keit in %
Fehlend	16	6,5	8	4,9	8	10,4
Gültig	229	93,5	155	95,1	69	89,6
- davon:	Gültige %		Gültige %		Gültige %	
0	45	19,7	36	23,2	9	13
1	27	11,8	16	10,3	10	14,5
2	38	16,6	22	14,2	15	21,7
3	28	12,2	15	9,7	12	17,4
4	30	13,1	16	10,3	14	20,3
6	29	12,7	22	14,2	5	7,2
8	11	4,8	7	4,5	4	5,8
9	8	3,5	8	5,2	0	-
12	13	5,7	13	8,4	0	-
GLO1- Expression						
Fehlend	16	6,5	8	4,9	8	10,4
Gültig	229	93,5	155	95,1	69	89,6
- davon:	Gültige %		Gültige %		Gültige %	
negativ (0-1)	72	31,4	52	33,5	19	27,5
schwach (2-3)	66	28,8	37	23,9	27	39,1
mäßig (4-8)	70	30,6	45	29,0	23	33,3
stark (9-12)	21	9,2	21	13,5	0	-
insgesamt:	Gültige %		Gültige %		Gültige %	
negativ (0-1)	72	31,4	52	33,5	19	27,5
positiv (≥2)	157	68,6	103	66,5	50	72,5
GLO1- Lokalisation						
Fehlend	16	6,5	8	4,9	8	10,4
Gültig	229	93,5	155	95,1	69	89,6
- davon:	Gültige %		Gültige %		Gültige %	
Plasma	93	40,6	66	42,6	24	34,8
Kern	33	13,5	17	11,0	15	21,7
Beides	58	25,3	36	23,2	21	30,4
keine Färbung	45	19,7	36	23,2	9	13

Tabelle 9: GLO1 Färbung: Häufigkeitsverteilung des errechneten IRS-Scores, der daraus folgenden Expression und der Lokalisation der GLO1 Färbung im Gesamtkollektiv und den Subkollektiven der intrahepatischen und extrahepatischen Tumore.

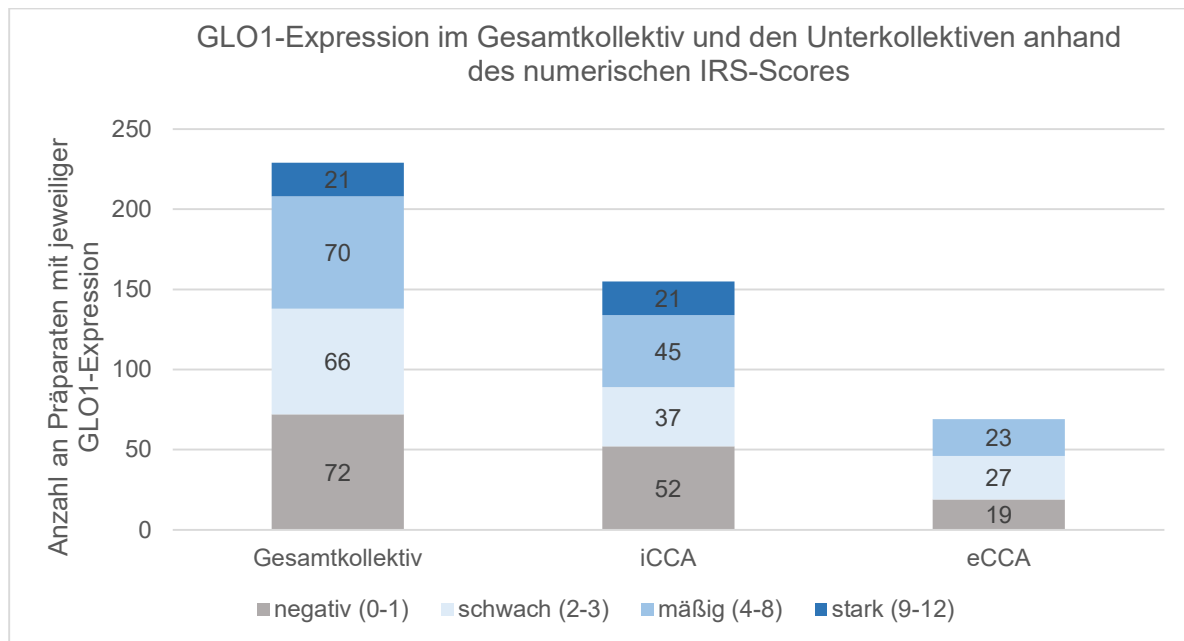


Abbildung 15: Anzahl und Verteilung der GLO1-Expression im Gesamtkollektiv sowie den intrahepatischen und extrahepatischen Unterkollektiven.

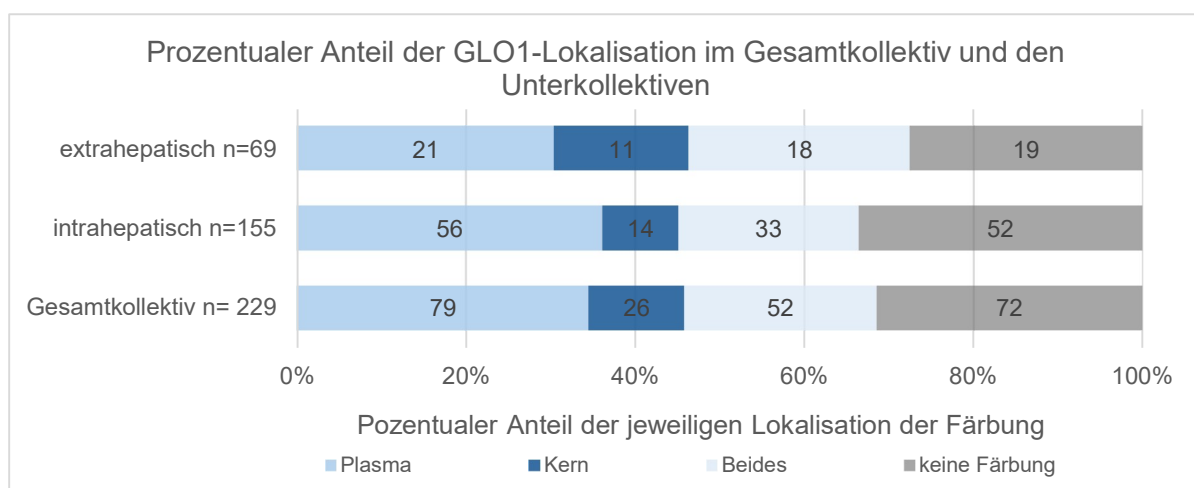


Abbildung 16: Anzahl und Häufigkeitsverteilung der Lokalisation der GLO1-Färbung im Gesamtkollektiv sowie den intrahepatischen und extrahepatischen Unterkollektiven.

4.2.3. Korrelation der deskriptiven Analyse der GLO1-Färbungen mit den erhobenen klinischen Parametern

Im Anschluss an die deskriptive Analyse erfolgte eine Korrelation der erhobenen Patientenparameter mit den Eigenschaften der GLO1-Färbung. Hierbei wurde zuerst das gesamte Kollektiv betrachtet und im Anschluss auf die zwei Hauptgruppen der iCCA und eCCA aufgeteilt. Da die Karzinome der Gallenblase mit lediglich 5 Präparaten vertreten waren, wurden hier keine separaten statistischen Analysen durchgeführt. Für die Statistischen Analysen wurden die in „schwach“, „mäßig“ und „stark“ eingeteilten GLO1 Färbungen zunächst in eine Gruppe zusammengefasst (als „positiv“ beschrieben) und gegen die Gruppe der negativ gefärbten Präparate auf die jeweiligen Charakteristika hin verglichen. Bezüglich der Tumorcharakteristika waren

der TNM-Status sowie das daraus resultierende UICC-Stadium von Interesse. Des Weiteren von Interesse waren die im Vorfeld erhobenen Blutparameter. Mögliche Zusammenhänge der Tumorcharakteristika und laborchemischen Parameter mit der GLO1-Expression wurden mittels exaktem Test nach Fisher untersucht. Dafür wurden die Tumore zunächst in jeweils 2 Gruppen in kleine (Tis-T2b) und große (T3-T4) Tumore unterteilt. Im Gesamtkollektiv wurden 32% der untersuchten Karzinome als „groß“ klassifiziert. Eine GLO1-Expression ließ sich bei sowohl großen als auch kleinen Tumoren beobachten. Im Gesamtkollektiv und bei iCCA ist bei p-Werten von 0,365 und 0,713 keine Korrelation anzunehmen. Bei Betrachtung der eCCA fiel auf, dass große Tumore eher mit einer GLO1-Positivität einhergingen (21/23 positiv) als kleine Tumore (29/46 positiv), ein statistischer Zusammenhang ist in diesem Kollektiv bei einem $p = 0,021$ wahrscheinlich (Siehe Abbildung 17).

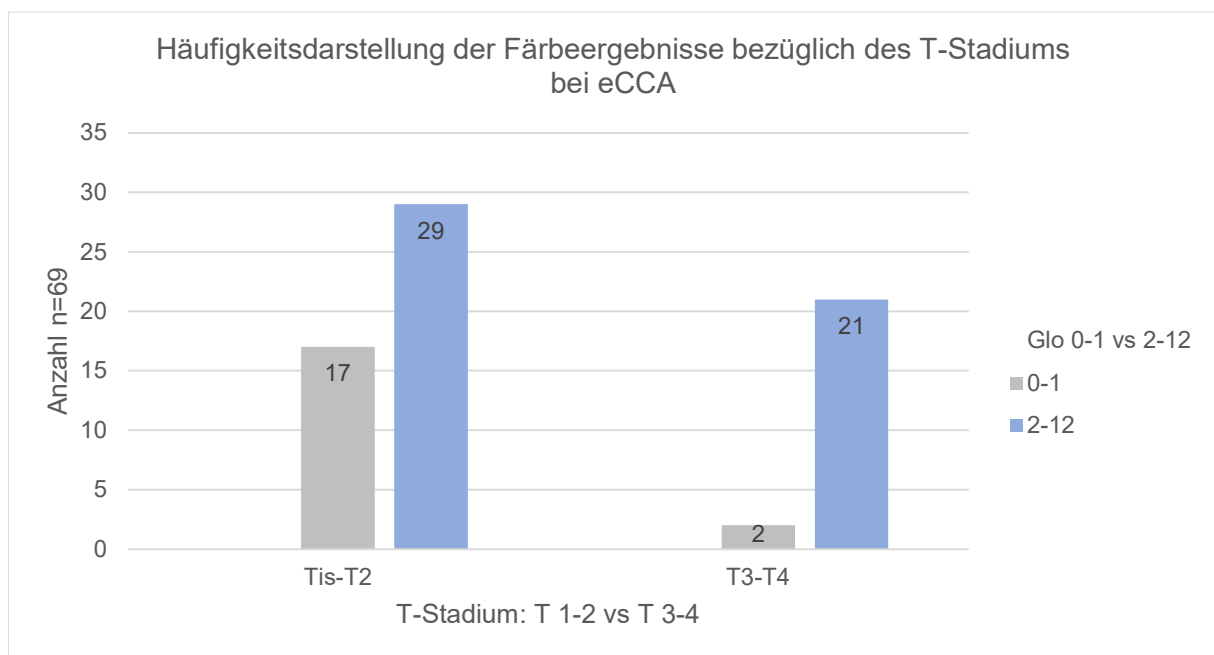


Abbildung 17: Anzahl und Verteilung der Färbeergebnisse bezüglich des T-Stadiums bei eCCA, $p=0,021$.

Im Gesamtkollektiv konnte ein Lymphknotenbefall bei 35% der ausgewerteten Tumore nachgewiesen werden. Im Gesamtkollektiv sowie den Unterkollektiven konnte eine GLO1-Detektion bei sowohl positivem (N1, N2) als auch negativem (N0) Befall nachgewiesen werden, jedoch ohne statistisch relevante Differenzen. Ähnliches zeigte sich auch hinsichtlich des Metastasierungsstatus, wobei nur bei unter 10% der ausgewerteten Patienten eine Fernmetastasierung (M1) festgestellt werden konnte.

Für die Betrachtung des UICC-Stadiums wurden die Tumore ebenfalls in zwei Gruppen in niedrige UICC-Stadien (UICC-Stadien: Tis, I, II) und höhere UICC-Stadien (UICC-Stadien: III, IV) aufgeteilt. Bei Betrachtung dieser Gruppen konnten sowohl positive als auch negative GLO1-Expressionen in beiden Ausprägungen festgestellt werden. Die Anfärbbarkeit war im Gesamtkollektiv mit jeweils 68% GLO1-Positivität bei sowohl niedrigem als auch hohem UICC-Status in etwa gleichmäßig verteilt. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei den jeweiligen

Analysen der Unterkollektive. Die kompletten Ergebnisse können Tabelle 10 entnommen werden.

Bei Betrachtung des Differenzierungsgrades der Tumorzellen konnte sowohl eine positive als auch eine negative GLO1 Expression bei fast allen Differenzierungsgraden beobachtet werden. Lediglich bei den n=6 gut differenzierten Tumorpräparaten konnte nur eine positive Anfärbbarkeit beobachtet werden. Mit n=113 stellte die Gruppe der mittelgradig differenzierten Präparate die größte Gruppe dar. Bei Betrachtung der iCCA ist eine Tendenz zu beobachten, dass je niedriger der Grad der Differenzierung ausfällt, desto weniger prozentuale Anteile machten die positiven Färbungen aus. Nichtsdestotrotz stellten die positiven Färbungen auch hier in allen Gruppen über 50% der Präparate dar (Abbildung 18).

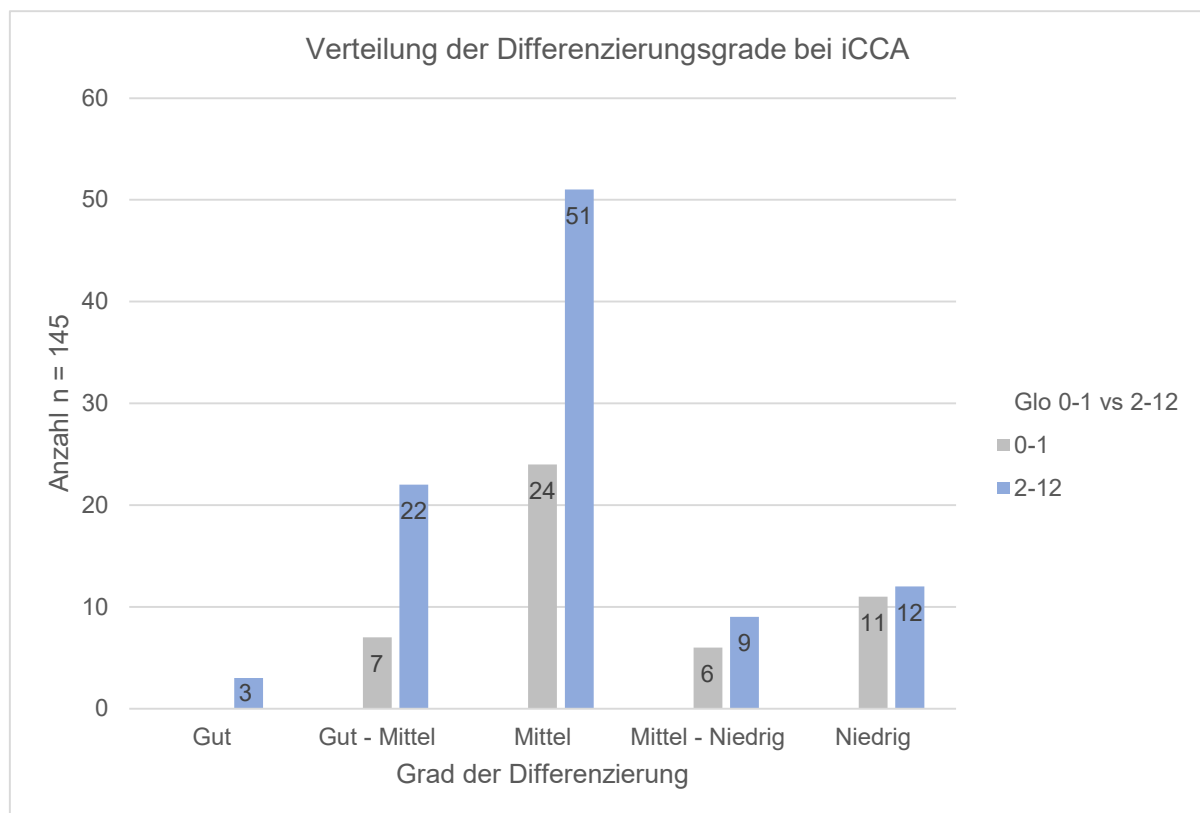


Abbildung 18: Verteilung der positiven und negativen GLO1 Färbungen bei iCCA unter Betrachtung der Tumordifferenzierungsgrade.

Bezüglich der Individualcharakteristika wurde das Kollektiv auf Unterschiede der GLO1-Färbung auf Geschlecht und Vorhandensein von Risikofaktoren hin untersucht. Im Gesamtkollektiv ergab sich kein geschlechterspezifischer Unterschied in der GLO1-Färbung ($p=0,088$). Betrachtete man jedoch die Unterkollektive gesondert, fiel auf, dass in diesem Kollektiv bei iCCA Frauen eher eine positive Färbung aufwiesen als Männer ($p=0,016$). Bei eCCA war die Anfärbbarkeit bei beiden Geschlechtern ähnlich ($p=1$). Betrachtete man bei beiden Geschlechtern und Kollektiven jedoch nur die positiven Präparate, war zu sehen, dass im intrahepatischen Kollektiv bei einem positiven GLO1-Nachweis bei Männern, diese auch eher mit einer stärkeren Färbung (IRS 4-12) eingingen ($p=0,012$). Demnach wiesen 79,5% der gefärbten

männlichen Präparate (n=31) eine starke GLO1-Färbung auf. Bei Frauen ergab sich intrahepatisch eine ausgeglichene Verteilung. Hier wiesen nur 54,7% (n=35) der positiven Präparate eine starke Färbung intrahepatisch auf. Interessanterweise fiel im Vergleich hierzu bei den eCCA auf, dass Frauen eher eine Tendenz zu stärkeren Färbungen (73,3%, n=11) als Männer (34,3%, n=12) aufwiesen ($p=0,015$) (siehe Abbildung 19).

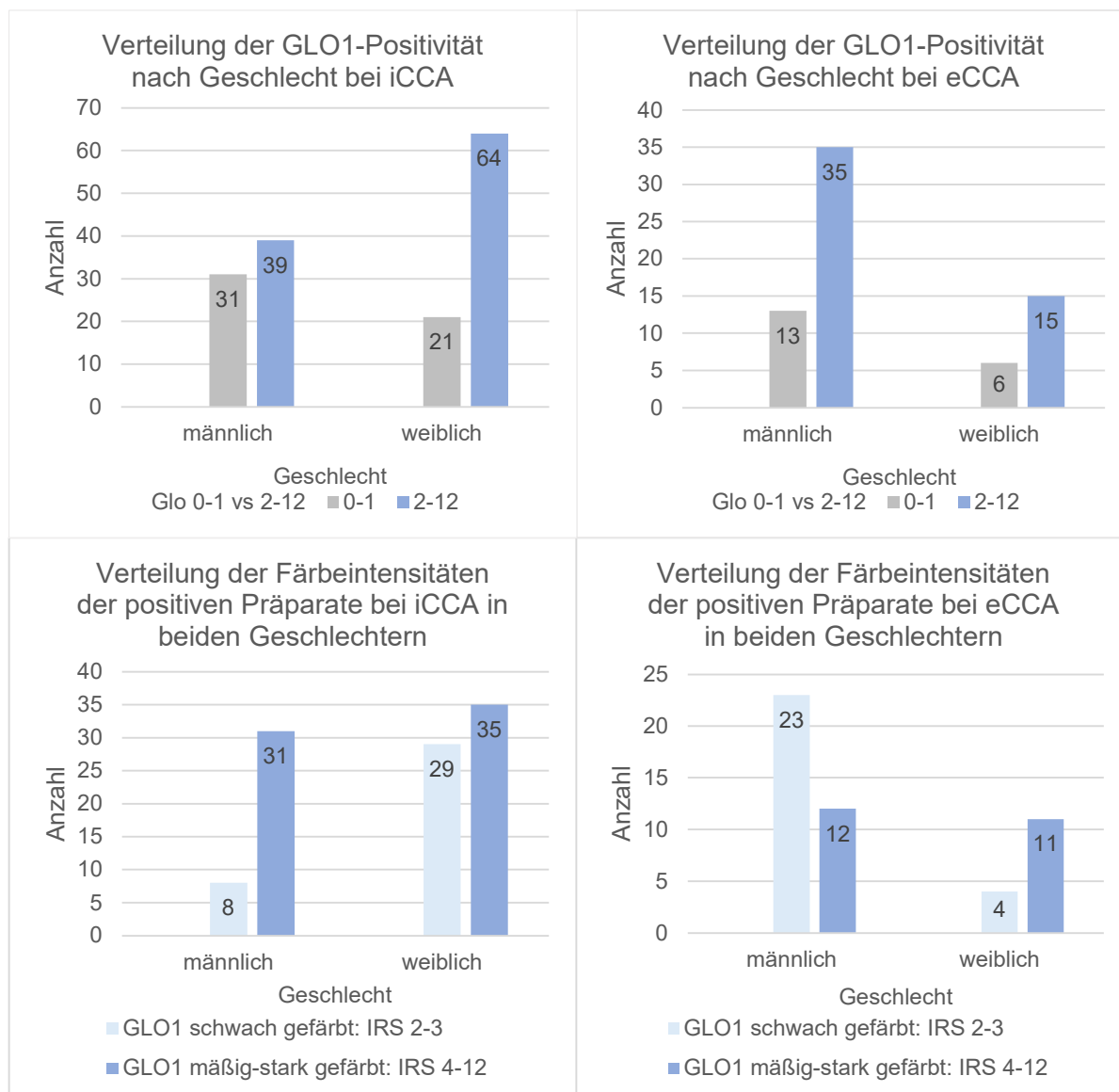


Abbildung 19: Verteilung der Färbeverhalten bei iCCA (links) und eCCA (rechts) in den Präparaten von männlichen und weiblichen Patienten und Patientinnen. Obere Reihe: im Bezug zur GLO1-Positivität. Untere Reihe: Färbeintensität der positiven Präparate, ohne Betrachtung der negativen Färbungen.

Bezüglich des Alters bei Erstdiagnose wurden drei Gruppen anhand der jeweiligen Terzile aufgeteilt, um mögliche Unterschiede bei eher jüngeren oder eher älteren Patienten im Vergleich zum mittleren Drittel zu sehen. In allen drei Gruppen zeigten sich sowohl positive als auch negative Färbeergebnisse, welche zudem ähnlich gleich verteilt waren ($p=0,741$).

Um das Kollektiv auf die Risikofaktoren hin zu beurteilen, wurden ebenfalls zwei Analysegruppen gebildet. Bei einer Gruppe lagen keine Risikofaktoren vor ($n=174$), in der anderen lag mindestens ein Risikofaktor vor ($n=54$). Es konnten jedoch bei dieser Aufteilung weder im Gesamtkollektiv ($p=0,867$), noch in den Unterkollektiven Unterschiede aufgezeigt werden. Zu beachten ist jedoch die kleine Gruppengröße der Personen mit vorhandenen Risikofaktoren.

Das Färbeverhalten der CK7 Färbung wurde ebenso auf mögliche Zusammenhänge mit der GLO1-Färbung hin untersucht. Hierbei war von Interesse, ob ein Fehlen der CK7-Expression mögliche Zusammenhänge mit der GLO1-Expression aufweist.

Hierfür wurden die Präparate in zwei Gruppen bezüglich ihrer CK7-Expression aufgeteilt (positiv ($n=134$) vs. negativ ($n=23$)) und auf Unterschiede im GLO1-Expressionsverhalten (positiv vs. negativ) hin untersucht. Die Expression war jedoch im Gesamtkollektiv und den Unterkollektiven in beiden Gruppen ähnlich verteilt ($p=0,822$ im Gesamtkollektiv, $p=1$ in den Unterkollektiven). Zu beachten ist auch hier wiederum die kleine Gruppengröße der Präparate mit fehlender CK7 Expression.

Bezüglich der Laborparameter wurde das Kollektiv auf Unterschiede in der GLO1-Expression hinsichtlich eines Zusammenhangs mit dem Tumormarker CA 19-9, der Serumparame-ter Bilirubin, Albumin, sowie GOT, GPT, und dem daraus errechneten De-Ritis-Quotienten untersucht. Auch die Gerinnungsparameter INR, Quick und der Hämoglobinwert wurden hinsichtlich eines möglichen Zusammenhangs mit der GLO1-Expression beurteilt. Die Ergebnisse sind Tabelle 10 zu entnehmen.

Für die Beurteilung des CA 19-9 Wertes wurde ein Cut-off Wert von 37 U/ml gewählt. Bei einem Wert ≥ 37 U/ml wurde der Tumormarker als positiv gewertet, ein Wert unterhalb des Cut-offs wurde als negativ interpretiert. Im Gesamtkollektiv ($p=0,357$) und in der Untergruppe der eCCA ($p=0,275$) konnte keine Tendenz zu Unterschieden in den beiden Gruppen gesehen werden. Bei iCCA waren von 39 Personen mit negativem CA 19-9 Wert 71,8% ($n=28$) GLO1-positiv, während von den 42 CA 19-9 positiven Personen nur 47,6% ($n=20$) eine GLO1-Positivität im Präparat aufwiesen (Abbildung 20). Ein inverser Zusammenhang zwischen GLO1-Expression und Vorhandensein von CA 19-9 bei iCCA ist bei einem p-Wert von 0,041 wahrscheinlich.

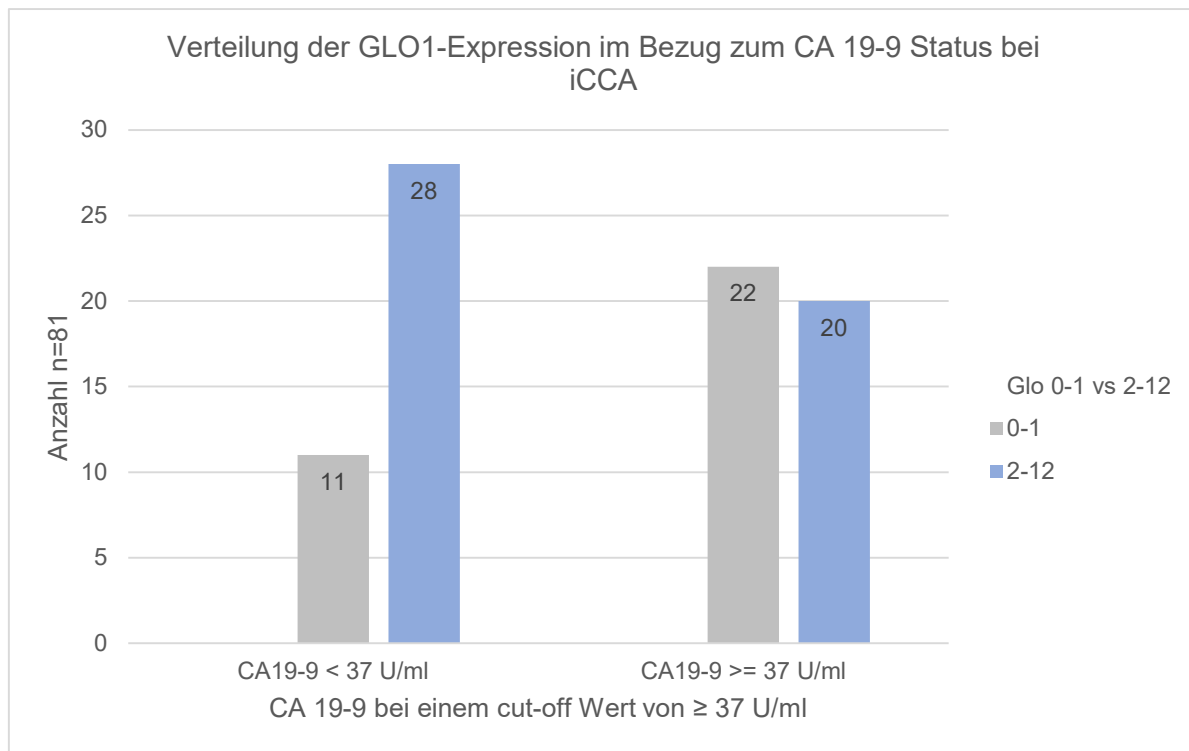


Abbildung 20: Balkendiagramm für die Verteilung der GLO1-Expression im Bezug zum CA19-9 Status bei iCCA bei einem gewählten Cut-off-Wert von 37 U/ml, $p = 0,041$.

Für die restlichen Blutparameter wurde das Kollektiv anhand diesen ebenso in jeweils zwei Gruppen unterteilt. Eine Gruppe bildete sich jeweils aus den Personen mit Normwerten für den jeweils untersuchten Parameter, die jeweils andere Gruppe enthielt die Personen mit pathologisch erhöhten (GPT, GOT, De-Ritis Quotient, Bilirubin, INR) oder pathologisch erniedrigten (Albumin, Hb, Quick) Parametern. Diese wurden im Gesamtkollektiv und in den Unterkollektiven mittels exaktem Test nach Fisher auf Unterschiede in der GLO1-Expression untersucht. Die beiden Personen, bei denen GOT und Albumin erhöht waren, wurden aufgrund der zu erwarteten fehlenden Krankheitsrelevanz für die Analyse jeweils den respektiven Gruppen der Normalparameter zugeordnet. Da die Anzahl an Personen mit pathologischen Parametern bezüglich INR und Quick < 10 war, wurden hiermit keine weiteren kreuztabellarischen Analysen vorgenommen. Es zeigten sich weder im Gesamtkollektiv noch in den Unterkollektiven Tendenzen bezüglich möglicher Unterschiede im Expressionsverhalten der GLO1 im Bezug zu den genannten Parametern. Alle p-Werte für alle Kollektive sind der Tabelle 10 zu entnehmen.

Korrelation mit GLO1-Färbung	Gesamtkollektiv	intrahepatisch	extrahepatisch
	p-Werte im zweiseitigen exakten Test nach Fisher		
Geschlecht Frauen vs. Männer	p= 0,088	p= 0,016 (Frauen eher GLO1-positiv)	p= 1
- darunter nur positive: schwach (IRS 2-3) vs. Stark (IRS 4-12)	p= 1	p = 0,012 (wenn GLO1-positiv, dann Männer eher stark als Frauen)	p= 0,015 (Frauen eher GLO1-stark)
Risikofaktoren (RF) mind. 1 RF vs. keiner	p = 0,867	p= 0,705	p= 0,715
CK7-Expression positiv vs. negativ	p = 0,822	p= 1	p= 1
Tumorgröße- T Tis-T2 vs. T3-T4	p= 0,365	p= 0,713	p= 0,021 (T3/T4 eher GLO1-positiv)
Lymphknotenstatus- N N0 vs. N1-N2	p= 0,285	p= 0,095	p= 1
Fernmetastasierung- M M0 vs. M1	p= 0,438	p=0,386	p= 1
UICC- Stadium UICC-Stadien 1-2 vs. 3-4	p= 1	p= 0,859	p= 0,583
CCA- Lokalisation iCCA vs. eCCA vs. GB	p= 0,623	-	-
Alter gedrittelt	p= 0,741	p= 0,553	p= 0,890
CA 19-9-Status <37 U/ml vs. ≥ 37 U/ml	p= 0,357	p= 0,041 (GLO1-negative eher CA 19-9-positiv)	p= 0,275
Bilirubin erhöht vs. normwertig	p= 0,430	p= 0,255	p= 0,753
Albumin erniedrigt vs. normwertig	p= 0,527	p= 0,440	p= 0,562
GOT erhöht vs. normwertig	p= 0,875	p= 1	p= 1
GPT erhöht vs. normwertig	p= 0,453	p= 0,247	p= 0,413
De-Ritis-Quotient <1 vs. ≥1	p= 0,112	p= 0,459	p= 0,734
Bismuth-Klassifikation I-IIIb vs. IV	-	-	p= 0,080

Tabelle 10: p-Werte des zweiseitigen exakten Tests nach Fisher für das Gesamtkollektiv, sowie die Unterkollektive der iCCA und eCCA. In der linken Spalte ist der jeweils untersuchte Parameter angegeben, der mittels des Tests in Bezug auf die GLO1-Expression untersucht wurde, in den anderen Spalten befinden sich die jeweiligen p-Werte des Tests.

4.2.4. Überlebenszeitanalysen

Die Analysen der Überlebenszeiten wurden mittels Kaplan-Meier-Kurve visualisiert und mit anschließendem Log-Rank-Test eingeordnet. Hierbei werden auf der X-Achse das Überleben in Monaten und auf der Y-Achse die kumulativen Überlebenszeiten dargestellt. Verglichen wurde dabei in separaten Analysen zunächst das Gesamtüberleben in Bezug auf verschiedene Aspekte des GLO1-Expressionsstatus im Gesamtkollektiv sowie den Unterkollektiven und im Folgenden auch zu dem prädiktiven Wert der Laborparameter.

4.2.4.1. GLO1-Expression

Im Gesamtkollektiv zeigte sich ein medianes OS von 23,5 Monaten (95% KI: 18,81 - 28,24). Bei Personen, die keine GLO1-Expression aufwiesen, zeigte sich ein OS von 18,33 Monaten (95% KI: 12,97 - 23,69). Im Vergleich hierzu betrug das mediane OS bei Personen mit positiver GLO1-Expression 26,09 Monate (95% KI: 18,93 – 33,24). Eine statistisch relevante Differenz ist unter Betrachtung des Kurvenverlaufes und des Ergebnisses des Log-Rank-Tests ($p=0,226$) unwahrscheinlich. Betrachtet man eCCA gesondert, betrugen die medianen OS 21,55 Monate bei GLO1-negativen Personen (95% KI: 16,83- 26,27) und 24,9 Monate bei positiver GLO1- Expression (95% KI: 4,32 – 45,48) bei einem Gesamt-OS der eCCA von 22,64 (95% KI: 14,32- 30,95). Eine statistische Signifikanz ist bei einem p-Wert von 0,316 unwahrscheinlich. Bei iCCA betrug das OS in diesem Kollektiv 17,28 Monate (95% KI: 13,53 – 21,04) bei fehlender GLO1-Expression und 27,11 Monate bei positiver GLO1-Expression (95% KI: 18,30 - 35,92) bei einem Gesamt-OS der iCCA von 23,66 (95% KI: 17,67- 29,58). Der p-Wert für das OS bei iCCA betrug 0,246. Grafisch fiel auf, dass das kumulative OS bis zu 4 Jahren bei iCCA bei Patienten mit positiver GLO1-Expression höher war als bei Patienten ohne GLO1-Expression.

Betrachtet man das OS der iCCA mittels Breslow-Test, welcher Ereignisse am Beginn des Beobachtungszeitraums mehr gewichtet (186, 187), ergibt sich ein p-Wert von 0,027. So sind zum Beispiel in diesem Kollektiv 3 Jahren nach Diagnose noch ca. 42% der Personen mit positiver GLO1 Färbung am Leben, wohingegen nur ca. 29% der Personen ohne GLO1-Expression im Tumor am Leben sind (Abbildung 21+ Abbildung A3-A5 aus dem Anhang).

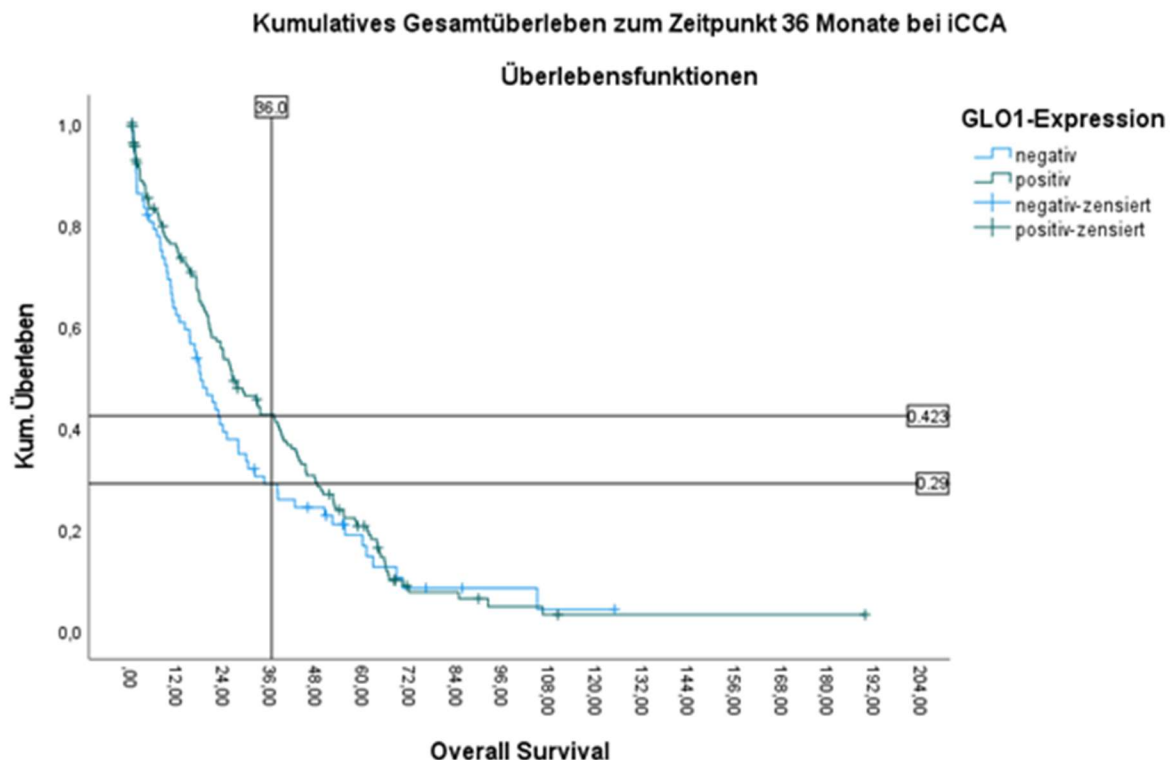


Abbildung 21: Kaplan-Meier-Kurve. Gesamtüberleben in Abhängigkeit der GLO1-Expression im Subkollektiv der intrahepatischen Tumore, Log-Rank-Test: $p=0,246$, Breslow-Test: $p=0,027$. X-Achse: Overall Survival in Monaten, Y-Achse: Kumulatives Überleben des Kollektivs in Monaten. Markierte Punkte: OS zum Zeitpunkt 36 Monate.

Nach Revision der Herangehensweisen in der Literatur wurde die Analyse der Expressionsstärke für den besseren Vergleich mit der Literatur ausgeweitet. Die Stark gefärbten Präparate ($\text{IRS} \geq 4$) wurden gegen die Gruppe der schwach- und ungefärbten Präparate getestet ($\text{IRS} \leq 3$). Hieraus ergaben sich für das Gesamtkollektiv ein medianes OS von 19,68 Monaten bei einem $\text{IRS} \leq 3$ (95% KI: 15,29– 24,07) und von 28,55 Monaten bei einem $\text{IRS} \geq 4$ (95% KI: 20,71 – 36,39). Optisch betrachtet kommt es zu keiner Kurvenüberschneidung, der p-Wert beim Log-Rank Test ist mit 0,052 sehr nah am gesetzten Signifikanzwert von 0,05. Auch hier fällt wieder eine Kurvendifferenz vor allem zu Anfang auf, betrachtet man den Breslow-Test so ergibt sich ein p-Wert von 0,02. Die Gruppe der stark gefärbten Präparate zeigt ein besseres Überleben als die Gruppe der wenig bis ungefärbten Präparate (siehe Abbildung 22). Betrachtet man die Unterkollektive einzeln so liegen die Kurven für die eCCA praktisch aufeinander, es gibt in diesem Kollektiv demnach keine Unterschiede im Überleben bezüglich der Expressionsstärke. Die Kurve der iCCA ähnelt der des Gesamtkollektivs. Das mediane OS der iCCA betrug 18,33 Monate bei einem $\text{IRS} \leq 3$ (95% KI: 13,57- 23,09) und 29,08 Monate bei einem $\text{IRS} \geq 4$ (95% KI: 16,46- 41,70). Auch hier zeigte sich wie auch im Gesamtkollektiv ein besseres Überleben der Gruppe der stark gefärbten Präparate, vor allem in der Anfangsphase (Log-Rank-Test: $p=0,069$, Breslow-Test: $p=0,011$) (Siehe Abbildung A 8- A 9 im Anhang).

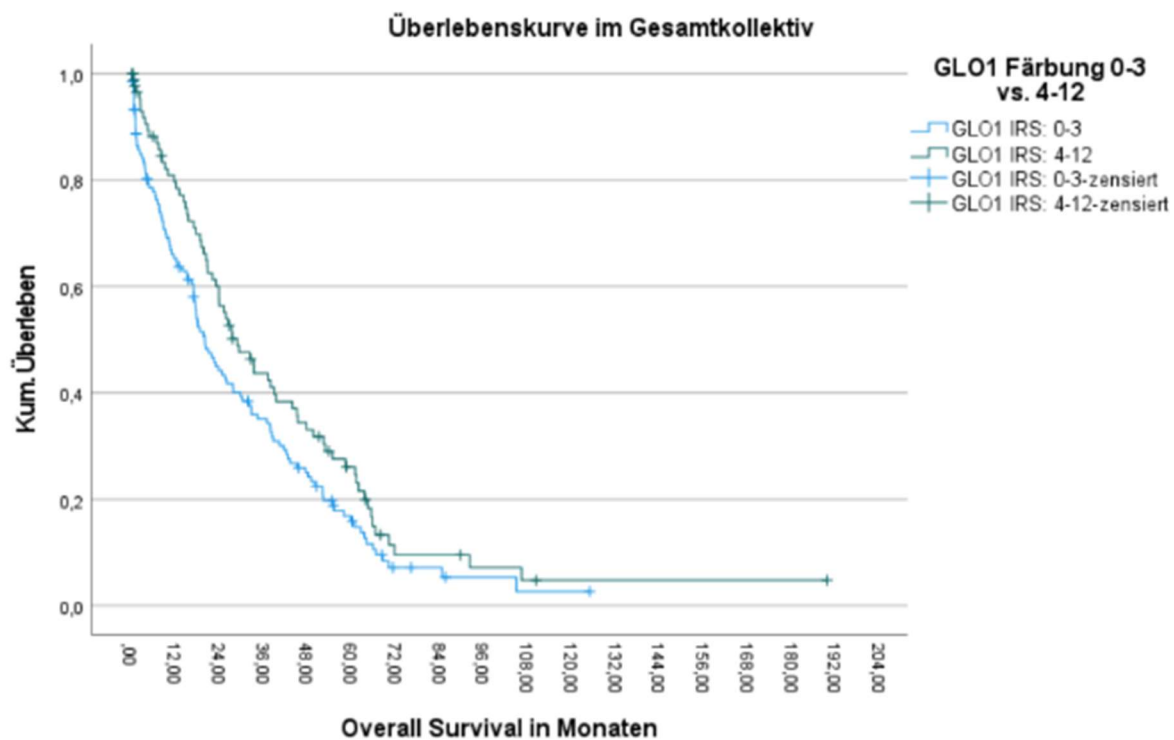


Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurve zum Überleben im Gesamtkollektiv bei Betrachtung der GLO1-Expressionsstärke IRS 0-3 vs. 4-12. Log-Rank-Test: $p = 0,052$, Breslow-Test: $p = 0,02$.

Des Weiteren wurde eine Unterteilung der Gruppen nach Geschlecht und Expressionsstatus unternommen, um weiter zu differenzieren, ob die unter 4.2.3. beschriebenen Unterschiede im Färbeverhalten einen Einfluss auf das Gesamtüberleben haben. Zuerst wurde untersucht, ob es generell einen Unterschied im OS zwischen Frauen und Männern in den beiden Unterkollektiven gibt. Mit einem medianen OS von 23,52 Monaten bei Frauen und 23,62 Monaten bei Männern ist das OS bei iCCA vergleichbar. Mit 22,83 Monaten bei Frauen und 22,63 Monaten bei Männern war auch bei eCCA das OS ähnlich. Danach erfolgte eine Aufteilung der Kollektive nach Geschlecht und Expressionsstatus. Was in der Analyse der Überlebenskurven bei iCCA optisch auffällt, ist, dass die Gruppe der männlichen Patienten vor allem in der Anfangsphase deutliche Unterschiede im Überleben zeigt. Betrachtet man diese Gruppe separat so lässt sich im Breslow-Test ein p-Wert von 0,01 errechnen bei einem späten Überschneiden der Kurven bei einem Zeitpunkt von 63 Monaten (Log-Rank p-Wert 0,113) (Abbildung 23). Bei eCCA gab es bei einem p-Werten von 0,506 bei eCCA keine statistisch relevanten Unterschiede im OS zwischen den jeweiligen Gruppen (siehe Abbildung A 6 aus dem Anhang).

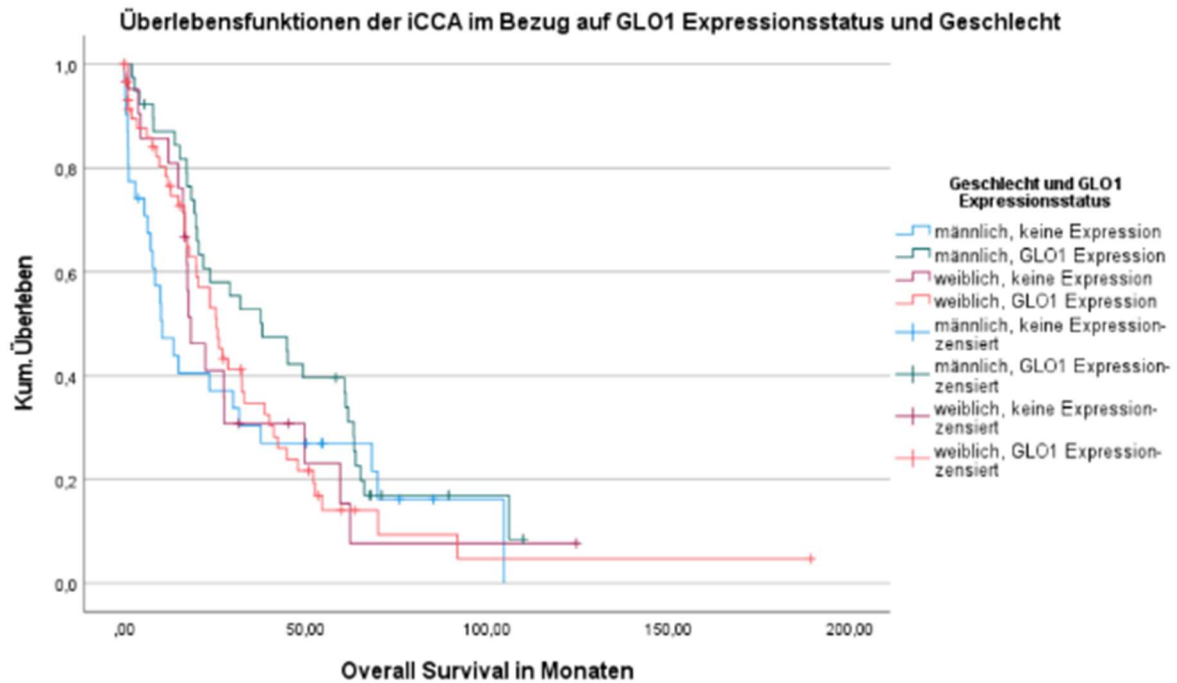


Abbildung 23: Kaplan Meier-Kurve im Bezug zum GLO1 Expressionsstatus und Geschlecht bei iCCA. Medianes OS männlicher GLO1-negativer Personen: 10,83 (95% KI: 3,56 – 17,21), medianes OS männlicher GLO1-positiver Personen: 37,98 (95% KI: 14,3 – 61,67). Medianes OS weiblicher GLO1-negativer Personen: 18,33 (95% KI: 11,45 – 25,22), medianes OS weiblicher GLO1-positiver Personen: 25,5 (95% KI: 18,89 – 32,1). Log-Rank-Test: $p = 0,307$.

Da in den Voruntersuchungen auffiel, dass CA 19-9 bei iCCA mit einer negativen GLO1-Expression korrelierte wurde zunächst eine Überlebenszeitanalyse mit CA 19-9 durchgeführt um das OS in Abhängigkeit vom CA 19-9 Expressionsstatus zu Untersuchen. Hier zeigte sich bei iCCA ein deutlicher Unterschied der Gruppe mit einer positiven CA 19-9 Expression. Das mOS betrug bei als negativ Gewerteter CA 19-9 Expression 33,08 Monate im Gegensatz zum medianen OS von 15,23 Monaten bei positiver Expression. Bei einem p-Wert von 0,07 im Log-Rank Test ist ein negativer Einfluss auf das OS bei positiver CA 19-9 Expression wahrscheinlich (siehe Abbildung 24).

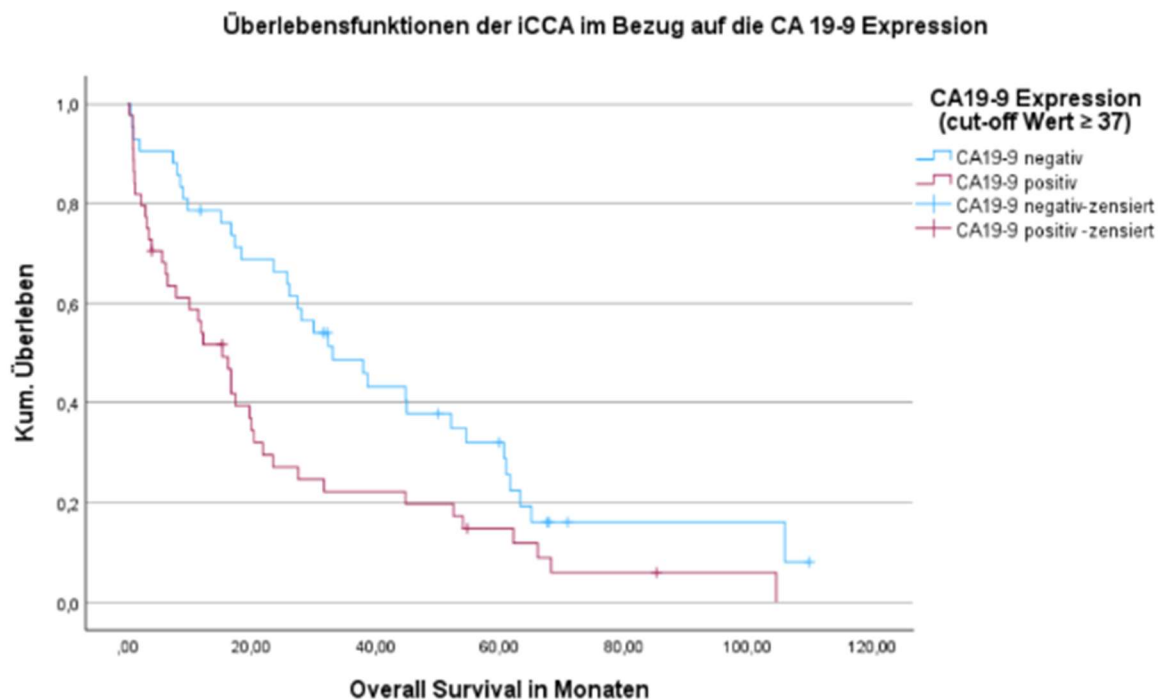


Abbildung 24: Kaplan Meier-Kurve im Bezug zur CA 19-9 Expression bei iCCA. Medianes OS gesamt: 21,78 Monate (95% KI: 13,31 – 30,26), medianes OS CA 19-9-positiver Personen: 15,28 Monate (95% KI: 9,87 – 20,68). Medianes OS CA19-9-negativer Personen: 33,08 Monate (95% KI: 20,69 – 45,48). Log-Rank-Test: $p = 0,007$.

Als nächstes wurden Gruppen mit den Expressionsmodalitäten bezüglich CA 19-9 und GLO1 gebildet und kombiniert (GLO1 positiv/negativ sowie CA 19-9 positiv/negativ) und sodann mittels Kaplan-Meier-Kurven untersucht.

Lag eine negative CA 19-9 Expression vor so zeigte sich bei gleichzeitiger positiver GLO1-Expression ein längeres medianes OS (45,01 Monate) im Vergleich zu den anderen Gruppen. Die Gruppe mit einer negativen CA 19-9 Expression in Kombination mit einer negativen GLO1-Expression zeigte keine wesentlichen Unterschiede im medianen OS (17,28 Monate) im Vergleich mit den beiden Gruppen mit positiver CA 19-9 Expression (16,57 Monate bei gleichzeitiger GLO1-Positivität; 9,96 Monate bei GLO1-Negativität). Bei einem p-Wert von 0,005 im Log-Rank-Test ist ein statistisch signifikanter Zusammenhang wahrscheinlich (siehe Abbildung 25).

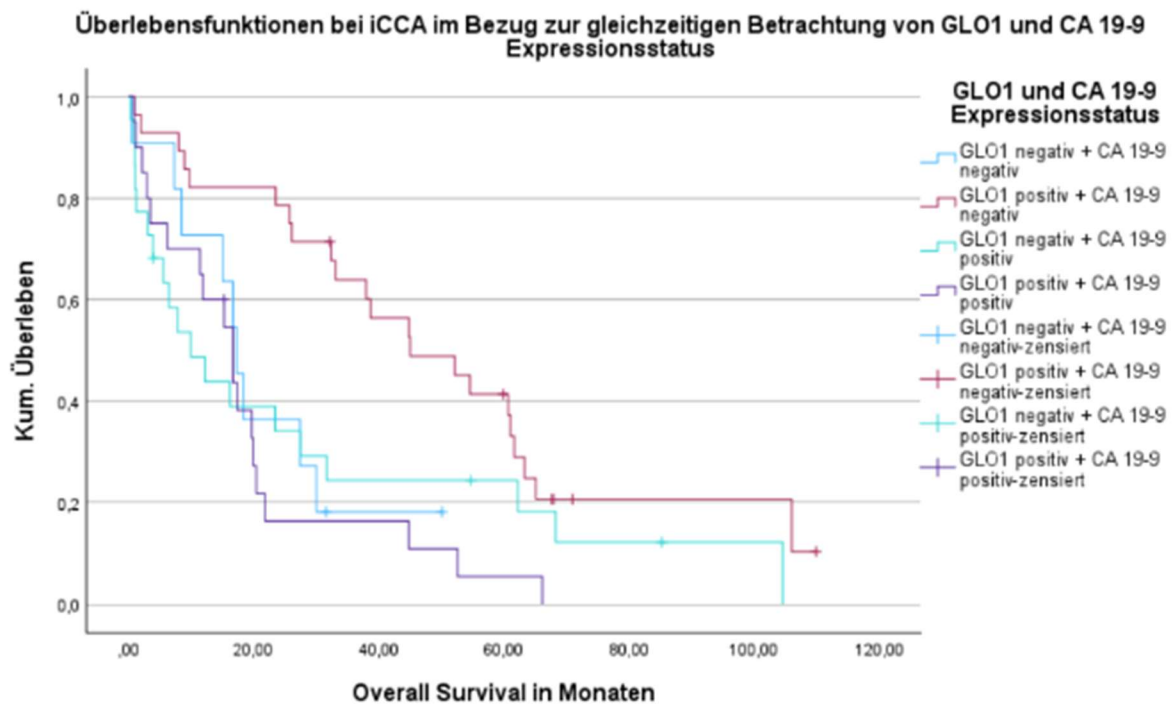


Abbildung 25: Kaplan Meier-Kurve bei gleichzeitiger Betrachtung des GLO1 und CA 19-9 Expressionsstatus bei iCCA. Medianes OS = mOS. mOS gesamt: 20,4 Monate (95% KI: 4,12 – 38,48). mOS CA 19-9 negativ + GLO1 negativ: 17,28 Monate (95% KI: 13,7 – 20,86). mOS CA 19-9 negativ + GLO1 positiv: 45,01 Monate (95% KI: 25,12 – 64,91). mOS CA 19-9 positiv + GLO1 negativ: 9,96 Monate (95% KI: 1,57 – 18,34). mOS CA 19-9 positiv + GLO1 positiv: 16,66 Monate (95% KI: 10,19 – 23,12). Log-Rank-Test: $p = 0,005$.

Des Weiteren wurde eine Analyse nach Kaplan-Meier-Methode bezüglich der Lokalisation der GLO1-Färbung durchgeführt. Beim Bewerten der Präparate fiel auf, dass sich bei einigen Präparaten die GLO1-Färbung lediglich auf die Region des Nukleus beschränkte. Diese wurden gesondert als Gruppe zusammengefasst und im Vergleich zur rein plasmatischen Lokalisation oder einer gemischten Lokalisation aus Kernfärbung und Plasmafärbung beurteilt. Es ist jedoch zu beachten, dass es sich im Gesamtkollektiv um lediglich 25 Präparate handelt, die dann gesondert in den Unterkollektiven nur 14 bei iCCA und 11 bei eCCA betragen. Eine Bewertung dieses Aspektes hat demnach nur eine stark limitierte Aussagekraft.

Im Gesamtkollektiv betrug das mediane OS bei reiner Kernfärbung 39,16 Monate (95% KI: 0 – 79,45) und bei gemischten oder rein Plasmatischen Färbung 25,37 Monate (95% KI: 17,93 – 32,60). Ein statistisch signifikanter Zusammenhang ist bei einem p-Wert von 0,12 im Log-Rank-Test nicht gegeben (siehe Abbildung A 11 im Anhang).

Betrachtet man die Unterkollektive gesondert fällt ein grafisch noch etwas stärker ausgeprägter Unterschied zwischen den beiden Kurvenverläufen bei iCCA auf. Hier betrug das mediane OS für die Kernfärbung 52,14 Monate (95% KI: 0 – 109,48) und 25,5 Monate bei plasmatischer oder kombinierter Färbung (95% KI: 15,89 – 35,1). Allerdings ist hier die Streuung noch breiter, da noch weniger Ereignisse zur Verfügung stehen. Auch hier ist bei einem p-Wert von 0,058

im Log-Rank-Test zwar eine leichte Tendenz zu erahnen, diese ist mit hoher Wahrscheinlichkeit jedoch ebenso nicht aussagekräftig (siehe Abbildung 26). Bei eCCA waren keine Unterschiede in den Überlebenskurven zu erkennen (siehe Abbildung A 12 aus dem Anhang).

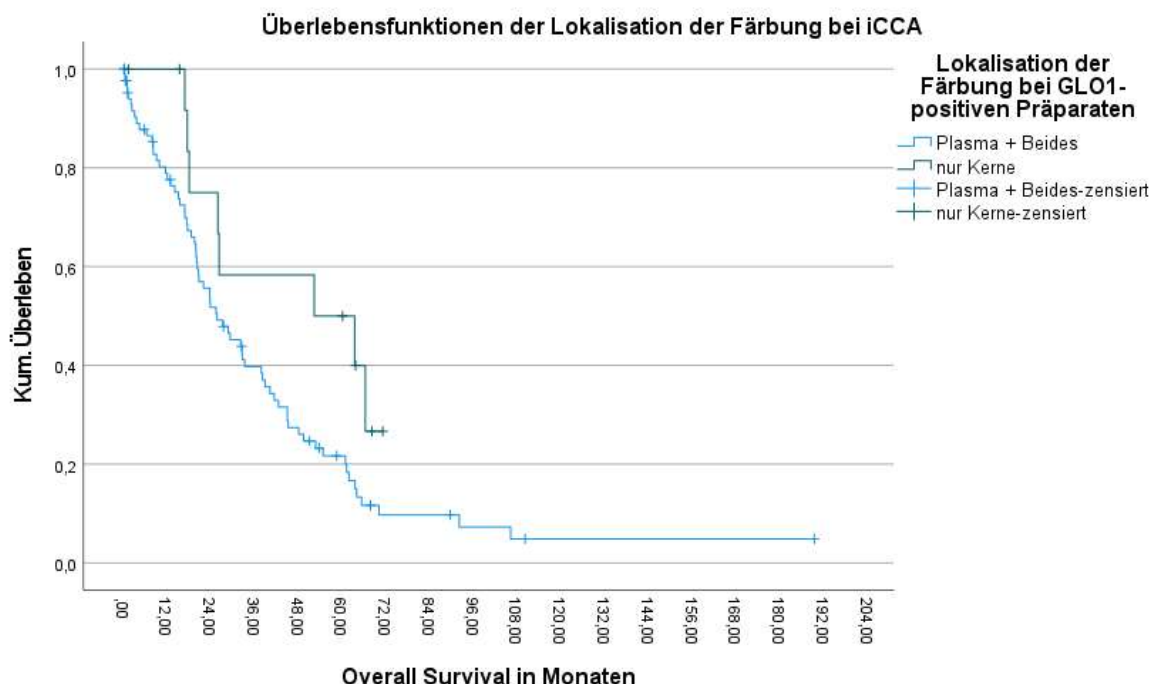


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve zum Kumulativen Überleben bei iCCA unter Betrachtung der verschiedenen Lokalisationen der Färbung. Log-Rank-Test: $p = 0,058$; Breslow-Test: $p = 0,058$.

4.2.4.2. Analyse der Laborchemischen Parameter

Mithilfe der Multiplen-Cox-Regression wurde der gleichzeitige Einfluss ausgewählter Laborparameter, sowie das Alter bei Erstdiagnose und das Geschlecht untersucht. Betrachtet wurde dabei das Gesamtüberleben im Gesamtkollektiv, sowie in den Unterkollektiven. Zuerst wurde dafür mittels Kaplan-Meier-Methode untersucht, ob die Proportionale-Hazards-Annahme (PH-Annahme) für die zu untersuchenden Parameter gegeben ist (188). Bei den im Gesamtkollektiv geprüften Parametern konnten keine proportionalen Hazards für GPT, INR und Quick und das Geschlecht angenommen werden. Bezüglich der GLO1 konnte in keinem der Kollektive PH angenommen werden.

Tabelle 11 zeigt die jeweiligen Parameter mit den jeweiligen Signifikanzniveaus mit den dazugehörigen Konfidenzintervallen und Hazard-Ratios (HR) im Gesamtkollektiv. Es wurde jeweils eine univariate Analyse und anschließend eine multivariate Analyse bei den genannten Parametern durchgeführt. In der univariaten Analyse zeigte sich, dass Personen mit einem CA19-9 ≥ 37 U/ml in diesem Kollektiv ein 1,64-fach erhöhtes Risiko hatten zu versterben ($p = 0,008$). Des Weiteren schienen ein erhöhtes Bilirubin (HR: 1,367; $p = 0,045$), eine GOT-Erhöhung (HR: 1,624; $p = 0,004$), ein De-Ritis-Quotient von ≥ 1 (HR: 1,474; $p = 0,013$) und eine Anämie (HR: 1,434; $p = 0,037$) zum Zeitpunkt der Erstdiagnose das Überleben in der univariaten Analyse negativ zu beeinflussen.

Betrachtet man den Einfluss der ausgewählten Parameter zeitgleich mithilfe der multivariaten Cox-Regressionsanalyse, so zeigt sich, dass eine Erhöhung von CA19-9 als unabhängiger Risikofaktor zu Versterben galt. Hierfür wurde in diesem Kollektiv eine Hazard-Ratio von 1,57 ($p=0,031$) errechnet. Ebenso verhielt sich der De-Ritis-Quotient in diesem Kollektiv als unabhängiger Risikofaktor (HR: 1,519; $p=0,025$). Eine bildliche Veranschaulichung der Ergebnisse der multiplen Cox-Regression im Gesamtkollektiv erfolgte anhand des Forest-Plots, welcher in Abbildung 27 zu sehen ist.

	univariate Analyse					multivariate Analyse				
Gesamtkollektiv	n	B	p-Wert	HR	95% KI	n	B	p-Wert	HR	95% KI
Alter bei Erstdiagnose	MW: 63,57J	-0,003	0,684	0,997	0,984 - 1,011	MW: 63,4 J	0,004	0,689	1,004	0,986 - 1,021
CA 19-9 erhöht	86/146 60,14%	0,493	0,008	1,637	1,139 - 2,352	85/138 61,59%	0,451	0,031	1,57	1,043 - 2,362
Bilirubin erhöht	76/205 37,07%	0,312	0,045	1,367	1,007 - 1,855	62/138 44,93%	-0,16	0,458	0,852	0,558 - 1,301
GOT erhöht	136/205 66,34%	0,491	0,004	1,634	1,171 - 2,280	101/138 73,19%	0,251	0,317	1,285	0,786 - 2,102
De-Ritis-Quotient ≥ 1	106/205 51,71%	0,388	0,013	1,474	1,087 - 2,000	64/138 46,37%	0,418	0,025	1,519	1,053 - 2,192
Albumin erniedrigt	86/184 46,74%	0,310	0,56	1,364	0,992 - 1,874	56/138 40,58%	0,027	0,896	1,027	0,688 - 1,533
Anämie bei ED	53/204 25,98%	0,360	0,037	1,434	1,021 - 2,012	35/138 25,36%	0,387	0,101	1,472	0,928 - 2,335

Tabelle 11: Ergebnisse der uni- und multivariaten Cox-Regressionsanalyse im Gesamtkollektiv. n= Anzahl der Personen, bei denen der jeweilige Parameter erhöht oder erniedrigt ist, B= Regressionskoeffizient, HR= Hazard Ratio, 95% KI: 95% Konfidenzintervall.

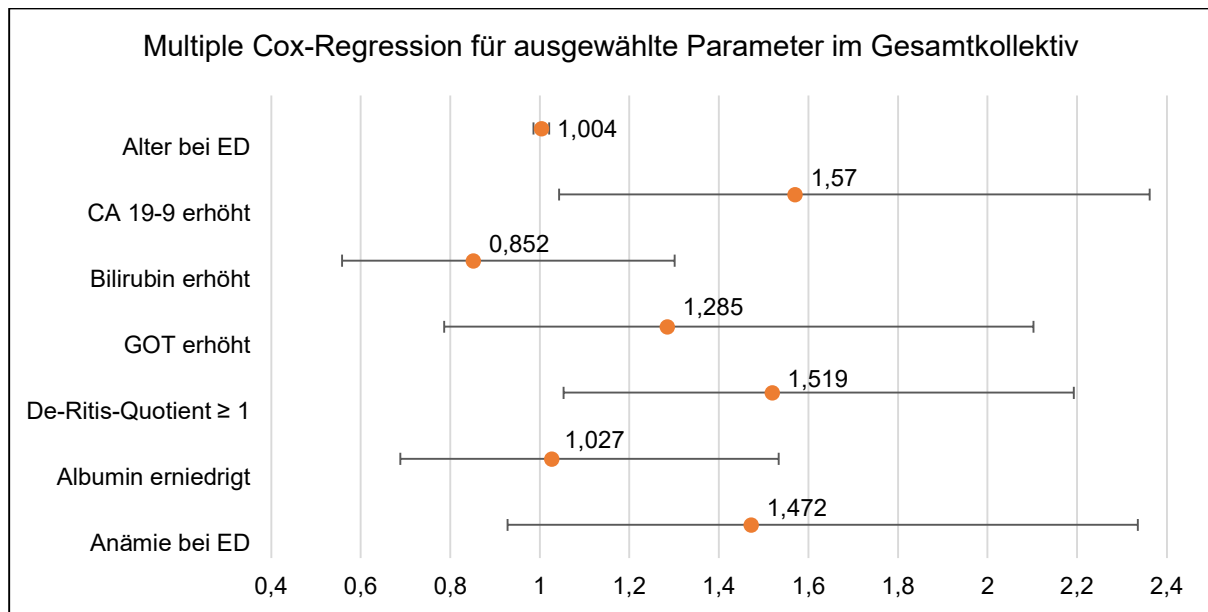


Abbildung 27: Forest-Plot der multiplen Cox-Regression ausgewählter Parameter im Gesamtkollektiv. x-Achse: Hazard Ratio, y-Achse: jeweils untersuchter Parameter, Whiskers: 95% Konfidenzintervalle.

Im Anschluss wurden die Parameter einzeln in den Unterkollektiven auf die PH-Annahme mittels Kaplan-Meier Methode überprüft. Aufgrund der kleinen Größe des Unterkollektivs ließ sich so bei eCCA bei keinem der Parameter proportionale Hazards annehmen. Bei iCCA konnten bei CA19-9, GOT, De-Ritis-Quotient und Albumin proportionale Hazards angenommen werden. Tabelle 12 zeigt die univariate- sowie die multivariate Analyse der zuvor beschriebenen Parameter. In der multivariaten Analyse zeigte sich, dass eine CA19-9 Erhöhung in diesem Kollektiv als unabhängiger Risikofaktor mit einer fast zweifachen Erhöhung des Risikos zu versterben verbunden war (HR:1,958; $p=0,009$). Auch hier zeigte sich der De-Ritis-Quotient ähnlich wie im Gesamtkollektiv als unabhängiger Risikofaktor (HR: 2,184; $p=0,005$). Die Ergebnisse der univariaten Analyse, sowie der Forest-Plot sind der Tabelle 12, sowie der Abbildung A 14 im Anhang zu entnehmen.

	univariate Analyse					multivariate Analyse				
iCCA	n	B	p-Wert	HR	95% KI	n	B	p-Wert	HR	95% KI
Alter bei Erstdiagnose	MW = 63,571	- 0,13	0,14	0,987	0,971 - 1,004	MW= 63,024	-0,004	0,685	0,996	0,975 - 1,017
CA 19-9 erhöht	44/86 51,12%	0,641	0,007	1,898	1,187 - 3,035	43/82 52,42%	0,672	0,009	1,958	1,178 - 3,252
GOT erhöht	77/138 55,8%	0,611	0,002	1,842	1,248 - 2,719	49/82 59,76%	0,350	0,193	1,419	0,838 - 2,401
De-Ritis-Quotient ≥ 1	88/138 63,77%	0,652	0,002	1,92	1,266 - 2,912	50/82 60,98%	0,781	0,005	2,184	1,272 - 3,751
Albumin erniedrigt	48/118 40,67%	0,297	0,162	1,346	0,887 - 2,042	26/82 31,71%	0,178	0,505	1,194	0,709 - 2,013

Tabelle 12: Ergebnisse der uni- und multivariaten Cox-Regressionsanalyse beim Unterkollektiv der iCCA. n= Anzahl der Personen, bei denen der jeweilige Parameter erhöht/erniedrigt ist, B= Regressionskoeffizient, HR= Hazard Ratio, 95% KI: 95% Konfidenzintervall.

5. Diskussion

5.1. Diskussionseinleitung

In der Tumordiagnostik gewinnen Biomarker zunehmend an Bedeutung. Sie können von diagnostischer und prognostischer Relevanz sein, da sie mit bestimmten Tumoreigenschaften verbunden sein können. Cholangiokarzinome gehören zwar zu den seltenen Tumoren, jedoch gehen sie weiterhin mit einer schlechten Prognose einher (7, 189). Bis vor kurzem gab es nur wenige Biomarker für diese Tumorentität mit limitierter diagnostischer und prognostischer Relevanz (190). Durch die nun auch in den Leitlinien wiedergespiegelte diagnostische Relevanz von bestimmten Tumormarkern und Tumorproteinen (Z.B. FGFR, IDH, HER2/neu), bei deren Vorhandensein nun auch in der Zweitlinientherapie eine zielgerichtete Therapie erwägt werden sollte, ist weitere Forschung in diesem Bereich prognostischer und prädiktiver Marker wichtig, auch in Bezug auf sich hierdurch potenziell eröffnende Ausweitung der Therapiemöglichkeiten (45, 72, 119, 120, 122, 191). Ziel dieser Arbeit war es, die Expression von GLO1 beim CCA und seiner möglichen prognostischen Aussagekraft zu untersuchen. Hierzu wurde die Expression der GLO1 in einem Kollektiv von Mainzer Patienten mit CCA immunhistochemisch untersucht und mit klinisch-pathologischen Parametern verglichen.

5.2. GLO1

5.2.1. Die Rolle der GLO in der Karzinogenese und der Therapie

Wie bereits in 2.2.2. angesprochen ist die Rolle der GLO1 bei der Tumorentstehung noch Bestandteil aktueller Forschung. Es gibt Hinweise darauf, dass eine Hochregulation der GLO1 beispielsweise bei Karzinomen des Magens (14) oder der Prostata (15) mit einer schlechteren Prognose und erhöhten Invasivität einhergingen. Auch bei weiteren Tumoren wie Brustkrebs und dem HCC wurde bereits ein vermehrtes Vorhandensein von GLO1 mit höheren Tumorstadien assoziiert (16, 162). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine reduzierte Akkumulation von Methylglyoxal in der Zelle sein, welches durch die Hochregulation der Glykolyse im Rahmen des Warburg-Effekts vermehrt anfällt. Die verminderte Akkumulation verringert den Einfluss von oxidativem Stress auf die Zellprozesse (145, 152, 160). Andere Publikationsergebnisse konnten zeigen, dass GLO1 auch einen protektiven Effekt aufwies (155–158). So war beispielsweise in einer Publikation zu Brustkrebs eine erhöhte Expression von Tumorstadiumsgenen unter Depletion von GLO1 *in vitro* zu beobachten (155) und Chiavarina et al. beobachteten ein vermehrtes Tumorstadiumswachstum von kolorektalen Karzinomzellen unter GLO1 Depletion im *in vivo* CAM-Modell (chorionallantoic membrane model) (156). Mögliche Erklärungsansätze hierfür könnten eine beobachtete vermehrte Expression von wachstumsfördernden Faktoren wie YAP (Yes-Associated protein), TGF- β oder über verschiedene HSP (Heat shock Proteine) sein (157, 158, 192). Bei iCCA konnte in zwei *in vitro* und *in vivo* Studien gezeigt werden, dass YAP und dessen Signalkaskade eine Rolle als Onkogen beim CCA besitzen (96, 193).

5.2.2. Ergebnisse der deskriptiven Analyse zur GLO1

Die Expression von GLO1 in CCA wurde bisher noch nicht untersucht. In dieser Arbeit zeigte sich im Gesamtkollektiv kein Zusammenhang zwischen den untersuchten Parametern und der Expression von GLO1. Betrachtete man die Unterkollektive einzeln, so fiel auf, dass bei iCCA Frauen häufiger GLO1 gefärbt waren als Männer. Wenn allerdings eine GLO1-Färbung vorhanden war, wiesen Männer eine intensivere Färbung auf. Bei eCCA traten zwar keine Unterschiede in der allgemeinen Anfärbbarkeit auf, jedoch wiesen Frauen eher eine starke Färbung auf als Männer, sobald das Präparat als positiv eingestuft war. Geschlechterspezifische Unterschiede in der Expression von GLO1 wurden bei gesunden Leberzellen beschrieben, wo Frauen in einer Analyse eine geringere Expression von GLO1 aufwiesen (194). In einer Studie zur Aktivität der GLO1 in Karotiskaufen zeigten Frauen ein höheres Verhältnis von GLO1-Aktivität zu Protein in den Plaques auf als Männer, die hingegen eine stärkere Reduktion der GLO1-Aktivität aufwiesen (195). Um dieses Ergebnis genauer beurteilen zu können, könnten weitere Untersuchungen wie spektrometrische Analysen des Umsatzes der GLO1 aus Tumorpräparaten hilfreich sein, da so etwaige Unterschiede im GLO1-Aktivität-zu-Protein-Verhältnis gesehen werden könnten.

Betrachtet man jedoch das Überleben der Gruppen und separiert nach GLO1 Expressionsstatus und Expressionsstärke und unterteilt diese nach Geschlecht, so sieht man einen Unterschied im Überleben bei iCCA. GLO1-positive männliche Patienten weisen in diesem Kollektiv, vor allem in der Anfangsphase, eine Tendenz zu einem besseren Überleben auf. In den restlichen beiden Kollektiven zeigt sich kein Einfluss auf das Überleben. Hierbei ist jedoch darauf hinzuweisen, dass die Aussagekraft durch die kleinen Gruppengrößen bei eCCA teilweise stark limitiert wird. So wiesen beispielsweise nur 6 weibliche Patientinnen und 13 männliche Patienten bei eCCA keine GLO1-Färbung im Tumorpräparat auf. Mit einer größeren Gruppengröße ließen sich hier eventuell bessere Aussagen treffen. In der Literatur ließen sich bezüglich des Überlebens bei Frauen und Männern keine Untersuchungen bezüglich der GLO1-Expression finden.

Unter Betrachtung der Risikofaktoren ließen sich keine Auffälligkeiten bezüglich der GLO1-Färbung feststellen. In der Literatur ist beispielsweise eine erhöhte GLO1-Aktivität in Personen mit Diabetes mellitus beschrieben (196). Zu Alkohol und Tabakmissbrauch ließen sich in der Literatur keine Studien finden. In diesem Kollektiv ist jedoch auf die schlechte Erfassung der Risikofaktoren in den Aktenbefunden hinzuweisen. Lediglich bei 4,9% der Patienten wurde Rauchen als Risikofaktor in den Arztbriefen angegeben. In der Epidemiologischen Suchtsurvey des Bundesministeriums für Gesundheit 2021 gaben 8,8% der befragten Personen zwischen 18 und 64 einen problematischen Nikotinkonsum an, 13,7% der Befragten gaben an in den letzten 30 Tagen täglich geraucht zu haben (197). Hiernach ist zu vermuten, dass die tatsächliche Anzahl an Rauchern statistisch gesehen höher zu erwarten wäre, zumal auch wie bereits unter 2.1.3. beschrieben Tabakrauch in einigen Studien als Risikofaktor für CCA etabliert werden konnte (42, 198). Auch bei Diabetes sind höhere Zahlen zu erwarten. In diesem Kollektiv waren die meisten Patienten zwischen 60 und 70 Jahren alt bei Erstdiagnose. Bei

13,5% der Personen im Kollektiv wurde ein Diabetes mellitus in den Akten beschrieben. Die Hälfte der Personen in diesem Kollektiv ist zwischen 58 und 71 Jahren alt. In einer Studie anhand des RKI zur Diabetesprävalenz aller gesetzlich versicherten Personen in Deutschland 2021 ergab eine Prävalenz von Diabetes mellitus von 15,4% bei Frauen und 21,9% bei Männern im Alter von 60-65 Jahren und 19,3% und 26,6% im Alter von 65-69 Jahren respektive (199). Unter Umständen wurden viele Personen mit nicht insulinpflichtigem Diabetes mellitus in dieser Studie aufgrund mangelnder Dokumentation nicht miterfasst.

Bezüglich der TNM und UICC-Stadien des Tumors zeigten sich sowohl im Gesamtkollektiv als auch bei iCCA keine Zusammenhänge in der untersuchten Kohorte. Lediglich bei eCCA zeigte sich ein denkbarer Zusammenhang der GLO1-Färbung mit der Tumorgroße. Während kleine Tumore ($\leq T2$) bei eCCA zu 63% GLO1-positiv waren, besaßen über 90% der großen Tumore ($\geq T3$) eine GLO1-Expression. Lediglich zwei der großen Tumore der eCCA waren GLO1-negativ. Dies steht im Einklang mit der Literatur, in der bereits bei anderen Krebsarten wie Brustkrebs, Prostatakarzinomen und Magenkarzinomen ein positiver Zusammenhang von vermehrter GLO1 Anfärbbarkeit mit größeren Tumoren beschrieben wurde (14–16). Bezüglich der Tumorcharakteristiken ist die Literatur jedoch uneinheitlich, beispielsweise wurden in der Studie zum Magenkarzinom und in Studien zu Brustkrebs und Prostatakarzinomen positive Zusammenhänge von GLO1-Expression mit Lymphknotenbefall beschrieben (14, 15, 200). Darüber hinaus wurde bei Magenkarzinomen in selbiger Studie ebenfalls ein Zusammenhang mit dem UICC-Tumorstadium hergestellt (14). In Zellstudien zeigte eine GLO1-Depletion von Magenkarzinomzellen und HCC-Zellen eine geringere Migration und Invasivität dieser. Zudem wurden weniger wachstumsassoziierte Gene durch die GLO1-depletierten Zellen exprimiert (14, 17). Es gibt auch gegensätzliche Studienergebnisse. Beispielsweise zeigte Nokin et al. in einer *in vivo* Tiermodell-Studie zu Brustkrebs, dass Karzinomzellen unter GLO1-Knockdown eine höhere Wachstums- und Metastasierungsrate aufwiesen. Dies wurde mit einer inversen Korrelation von GLO1 und YAP erklärt (158). In wiederum anderen Studien zu Brustkrebs und Platenepithelkarzinomen des Oropharynx konnten keine Korrelationen der GLO1-Expression mit den jeweiligen TNM- und UICC-Stadien gefunden werden (200–202).

Mit der Lokalisation des Tumors in der Aufteilung nach iCCA und eCCA sowie der Tumorausbreitung der eCCA entlang der Hepatikusgabel (anhand der Bismuth-Klassifikation) gab es keine Zusammenhänge bezüglich der GLO1-Expression. So exprimieren beide Tumorentitäten das Enzym in gleichem Maße und GLO1 konnte somit in diesem Studienkollektiv nicht zur Unterscheidung zwischen iCCA und eCCA beitragen. In der Literaturrecherche ließen sich keine Untersuchungen bezüglich der GLO1-Expression und spezifischen Klassifikationen für CCA finden, weshalb sich dieses Ergebnis nicht mit der vorhandenen Literatur vergleichen lässt und diese Zusammenhänge potenziell erstmalig untersucht werden.

Als weiterer relativ CCA-spezifischer Marker wurde der Bezug der GLO1-Expression zur CK7-Expression untersucht. Es ergab sich ebenfalls kein Zusammenhang in diesem Kollektiv. Beiläufig auffällig war hier jedoch, dass 16,2% der Präparate keine CK7-Färbung aufwiesen. Eine

fehlende CK7-Färbung korrelierte in diesem Patientenkollektiv nicht mit Veränderungen im OS. In der Literatur wird teilweise eine CK7-Expression von Gallengangszellen und CCA-Zellen von über 95% beschrieben, weshalb CK7 oft als hilfreiches Mittel zur Identifizierung des Tumors als CCA benutzt wird (173, 174). Denkbar wäre, dass die negativ, d.h. nicht gefärbten, Karzinome fokale CK7-negative Anteile besaßen, welche zufällig für diese Färbereihe angeschnitten wurden. Fokale Unterschiede im CK7-Expressionsverhalten wurden bereits früher beschrieben (203).

Bezüglich des Alters zeigte sich in allen analysierten Gruppen in diesem Kollektiv kein Zusammenhang mit der GLO1-Expression. Dies ist bezüglich der Karzinome vereinbar mit der Literatur, wo sich unter anderem in Studien zu Brustkrebs Oropharynxkarzinomen und Magenkarzinomen kein Zusammenhang von Alter und veränderter GLO1-Expression aufzeigen ließ (14, 200, 202). Jedoch zeigten einige Tierstudien (204) und Untersuchungen am menschlichen Gewebe eine Abnahme der GLO1-Expression im Alter. So ist eine Abnahme der GLO1 Aktivität in menschlichen Nervenzellen und Astroglia des Gehirns in der Gruppe der Personen ab 67 Jahren (205) sowie mit zunehmenden Alter in der menschlichen Linse (206) beschrieben.

Betrachtet man die Ergebnisse dieses Kollektivs in Bezug auf die untersuchten Laborparameter, so lässt sich nur im Unterkollektiv der iCCA ein Unterschied in der Expression eines Parameters feststellen. So war ein positiver CA19-9-Status eher mit einem negativen GLO1-Färbeargebnis assoziiert als ein CA19-9-negativer Status. Zieht man in Betracht, dass CA19-9 vor allem in den Frühstadien eine geringere Sensitivität und Spezifität besitzt (siehe 2.1.4.) (207), könnte es interessant sein GLO1 anhand des Ergebnisses dieses Kollektivs als zusätzlichen potentiellen Biomarker in Kombination mit CA19-9 zu evaluieren. Es wäre denkbar hierdurch die Sensitivität und Spezifität in der Frühdiagnostik zu verbessern. Hierzu wären weitere Studien hilfreich, vor allem in Bezug zur Differenzierung zwischen CCA, Präkanzerose und gesundem Gewebe. Beispielsweise beobachteten Kim et al. am Zervixkarzinom eine zunehmende GLO1-Expression mit steigendem Grad an Dysplasie bis hin zum invasiven Karzinom (208). Kombinationen zur Steigerung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität wurden bereits mit CA19-9 und CEA untersucht und konnten die Genauigkeit der Diagnose auf über 90% steigern (siehe 2.1.4.) (70).

Als weiterer diagnostischer Marker für andere solide Tumore wurde der De-Ritis-Quotient in der Literatur diskutiert (209). Für den De-Ritis-Quotienten wurde in diesem Kollektiv jedoch kein Zusammenhang mit einer GLO1-Expression gefunden.

Bezüglich der Serumparameter gab es in diesem Kollektiv keine Korrelationen mit der GLO1-Färbung. Eine Erhöhung der GOT, GPT hätte beispielsweise ein Indiz auf eine Leberschädigung sein können und somit hätte eine Korrelation mit GLO1 potenziell einen Rückschluss auf mögliche sekundäre Tumorauswirkungen liefern können (210). Ein erniedrigtes Albumin kann ein Hinweis auf eine verminderte Syntheseleistung der Leber sein und erhöhte Bilirubinwerte könnten Aufschluss über eine cholestatische Komponente des CCA geben (211). Eine Verminderung des Albumins, sowie GOT und GPT und Bilirubin Erhöhungen sind in der Literatur

bereits mit CCA korreliert worden (7, 209), eine Korrelation der Parameter mit GLO1 gelang in dieser Arbeit nicht.

5.2.3. Ergebnisse der Überlebensanalysen

Die Untersuchung der Überlebenskurven bezüglich der GLO1 nach Kaplan-Meier ergab für das Gesamtkollektiv keine statistisch relevanten Unterschiede des OS zwischen den beiden Gruppen mit und ohne GLO1-Expression. Bei gesondertem Betrachten des OS innerhalb der Gruppe der iCCA betrug zwar das mediane OS (mOS) bei positiver GLO1-Expression 27,11 Monate (95% KI: 18,30 - 35,92) und 17,28 Monate bei fehlender GLO1-Expression (95% KI: 13,53 – 21,04), jedoch fiel grafisch eine Differenz der Kurven mit Betonung der ersten 4 Jahre auf. So waren nach 3 Jahren beispielsweise noch ca. 42% der Personen mit positiver GLO1-Färbung am Leben, wohingegen nur ca. 29% der Personen ohne GLO1-Expression im Tumor am Leben waren. Betrachtet man das Ergebnis des Breslow-Tests, welcher Ereignisse am Beginn des Beobachtungszeitraums mehr gewichtet (187), ergibt sich ein p-Wert von 0,027. Somit ist ein möglicher Zusammenhang der GLO1-Färbung mit dem Gesamtüberleben bei iCCA, vor allem bei Ereignissen in den ersten 4 Jahren nach Diagnose und Resektion, denkbar. Wenn man die Literatur betrachtet, findet man hier vor allem Ergebnisse, die im Kontrast zu den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen stehen. So wurde in Überlebenszeitanalysen zum Beispiel ein geringeres mOS bei stärkerer GLO1-Expression bei Tumoren der Brust, des Magens, des Pankreas und des Kolons (14, 200, 212, 213) und ein geringeres progressionsfreies Überleben (PFS) bei Tumoren des Oropharynx und der Brust gesehen (200, 202). Betrachtet man das mOS bei iCCA mit dem Log-Rank-Test, welcher alle Ereignisse über den gesamten Kurvenverlauf gleich gewichtet, so ergibt sich in diesem Kollektiv kein Überlebensvorteil durch GLO1-Expression. Wenn man jedoch bedenkt, dass je nach Datenlage die 5-Jahres-Überlebensrate der resektablen CCA zwischen 20-40% beträgt, so ist für einen Großteil der Patienten vor allem das Überleben in den ersten Monaten und Jahren nach Diagnose und Resektion von Interesse (7, 189). Dementsprechend könnte GLO1 laut den Ergebnissen in diesem Kollektiv für iCCA-Patienten ein hilfreiches ergänzendes Tool sein, um die Überlebensrate in der Anfangsphase besser einschätzen zu können. Einen möglichen Erklärungsansatz für dieses Ergebnis liefern Antognelli et al. in Zellstudien zu Schilddrüsenkarzinomen. In anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzellen führte eine GLO1-Depletion zur Akkumulation von MG und zu einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) dieser. Die EMT ist in Krebszellen wichtig für die Migration und Invasion und die anschließende Ausbildung von Metastasen (214). Antognelli et al. vermuten eine TGF- β 1 Einflussnahme auf die GLO1-Aktivität, bei der es TGF- β 1-vermittelt zu einer Hemmung der GLO1-Aktivität und einer Zunahme von MG in den Tumorzellen kommt, welche hierdurch aggressivere Phänotypen ausprägen. Umgekehrt führt die Depletion von TGF- β 1 und die Förderung der GLO1-Aktivität mit Resveratrol zu einer geringeren MG-Akkumulation und Umkehr der Tumorzellen zu weniger aggressiven Phänotypen (157). Interessanterweise wurde in dieser Arbeit jedoch nur eine Abnahme der Aktivität der GLO1 durch die untersuchten Einflussfaktoren gesehen und nicht eine Verringerung der Transkription und Expression der GLO1 in der Immunhistochemie. Ähnliche Zellstudien

zum Prostatakarzinom zeigten gegensätzliche Ergebnisse. In diesen Zellstudien von Antognelli et al. führte eine GLO1-Depletion zu einem weniger aggressiverem Tumorverhalten. Es wurde ebenso eine Verbindung zu TGF- β 1 hergestellt, jedoch lautete die Hypothese hier, dass eine GLO1-Überaktivität und dadurch eine Verringerung von MG zu einer Wachstumsförderung und EMT über TGF- β 1 und dessen Rezeptor führte (215). Die Wirkung von GLO1 und MG scheint demnach möglicherweise stark davon abzuhängen, welche Art von Tumor vorliegt (156–158, 215). Da es sich jedoch um Zellstudien handelt sind diese Ergebnisse nur schwer auf menschliche Präparate und Überlebensprognosen zu übertragen und stellen eine Hypothesengenerierung dar.

Betrachtet man die Kurven zum Gesamtüberleben bezüglich der GLO1-Expressionsstärke der Präparate ließ sich ein leichter Trend zu einem besseren Überleben von Patienten mit stark GLO1-exprimierenden Tumoren erahnen (19,91 Monate bei schwacher Färbung vs. 28,55 Monate bei starker Färbung). Dieser ist jedoch bei einem p-Wert von 0,091 im Log-Rank-Test mit hoher Wahrscheinlichkeit statistisch nicht signifikant. Im Vergleich zu den vorherigen Ergebnissen bei iCCA wäre ein größeres OS bei stärkerer GLO1-Expression konsistent mit dem Ergebnis des längeren OS bei allgemeiner GLO1-Positivität. Das Ergebnis steht jedoch wiederum im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen. So beschreiben Kreyt et al. am Oropharynxkarzinom ein niedrigeres OS und PFS bei stärkerer GLO1-Färbung im Vergleich zu einer nur schwachen Anfärbung (202). Für eine bessere Vergleichbarkeit mit der Literatur wurde die Analyse erweitert und die negativen Präparate in die Gruppe der niedrigen GLO1-Expression eingeschlossen, da dies in vergleichbaren Studien ebenfalls die Praktik war. Hierbei ergaben sich im Gesamtkollektiv und bei iCCA noch stärkere Tendenzen. So überschneiden sich die Kurven optisch nicht mehr und die p-Werte des Log-Rank-Tests rückten näher an das gewählte Signifikanzniveau (Gesamtkollektiv p-Wert 0,052, iCCA p-Wert 0,069), ein statistisch signifikantes Ergebnis in diesem Kollektiv ist bei Gleichgewichtung der Ereignisse über den gesamten Kurvenverlauf jedoch weiterhin nicht aufzeigbar. Allerdings fielen grafisch wieder größere Überlebensunterschiede, vor allem in den ersten fünf Jahren auf. Betrachtet man den Breslow-Test ergeben sich p-Werte von 0,02 für das Gesamtkollektiv und von 0,011 für iCCA. Demnach ist es möglich, dass in diesem Kollektiv eine starke GLO1-Anfärbung mit einem besseren OS in den ersten Jahren nach Diagnose korrelierte. Dies steht, wie bereits in den Vorergebnissen beschrieben, im Gegensatz zur Literatur, in der ein schlechteres OS bei starker Färbung jedoch in anderer Entität beschrieben wurde. So zeigte Peng et al. beispielsweise ein geringeres mOS bei Mammakarzinomen bei stärkerer GLO1 Färbung (200). Cheng et al. erzielten ähnliche Ergebnisse beim Magenkarzinom (14, 202).

Bei der Betrachtung von CA 19-9 als Überlebensparameter ließ sich auch in diesem Kollektiv die bereits in der Literatur mehrfach beschriebene prognostische Aussagekraft von CA 19-9 bestätigen (7, 133). So überlebten in diesem Kollektiv Patienten mit einer Expression von CA 19-9 unter dem Schwellenwert signifikant länger als Patienten mit einer Expression darüber. Im weiteren Test wurde eine Kombination von GLO1 und CA 19-9 evaluiert. Beispielsweise

haben Zhang et al. eine kombinierte Betrachtung von AFP (Alpha-1-Fetoprotein) mit CA 19-9 evaluiert mit dem Resultat eines besseren OS wenn beide Tumormarker negativ waren (216).

Eine kombinierte positive GLO1 Expression mit einer fehlenden CA 19-9 Expression bot in diesem Patientenkollektiv einen statistisch signifikanten Überlebensvorteil. Auch dies steht, wie bereits unter dem Punkt der längeren OS bei vermehrter GLO1 Expression beschrieben, im Gegensatz zum Großteil der aktuellen Literatur. Ein denkbarer Erklärungsansatz hierfür könnte sein, dass mit Fortschreiten der Tumorentdifferenzierung auch weniger GLO1 produziert wird, in diesem Kollektiv jedoch korrelierte die GLO1-Färbung nicht mit dem Tumordifferenzierungsgrad. Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz könnte die vermehrte Akkumulation von Methylglyoxal sein, welches bei geringerer GLO1-Expression vermehrt anfällt und weitere Signalkaskaden zum vermehrten Tumorwachstum aktiviert. In Zellstudien konnten Nokin et al. bereits ein durch MG-Akkumulation verursachtes YAP-induziertes aggressiveres Tumorwachstum zeigen, welches sich durch GLO1-silencing *in vivo* an Tierversuchsmodellen reproduzieren ließ (158). Da die IHC lediglich die Enzyme markiert und keine weitere Aussagekraft über den Aktivitätsgrad liefert wäre eine weitere Untersuchung Enzymaktivität, beispielsweise mit massenspektroskopischen Untersuchungen, gegebenenfalls aufschlussreich. In den Zellstudien von Antognelli et al. ging beispielsweise eine Förderung der GLO1-Aktivität mit geringer aggressiven Tumorphänotypen einher. Es wurde jedoch nur eine Abnahme der Aktivität der GLO1 durch die untersuchten Einflussfaktoren beobachtet und nicht eine Verringerung der Transkription und Expression der GLO1 in der Immunhistochemie. Möglicherweise liegen Veränderungen in der Enzymaktivität vor, welche eine veränderte Expressionsrate relativieren (157). An aus menschenentnommenen Tumorpräparaten konnte bisher noch keine positive Korrelation von GLO1 mit dem Überleben gezeigt werden.

Da in der initialen Bewertung der Präparate auffiel, dass sich die GLO1-Färbung bei einigen Präparaten lediglich auf die Region des Nukleus beschränkte, wurden diese ebenfalls separat untersucht. Es sind im Gesamtkollektiv sowie bei iCCA jeweils Tendenzen zu erahnen, dass eine Kernfärbung der Präparate mit etwas besseren Überlebenszeiten einhergeht als eine rein plasmatische- oder eine Mischfärbung. Die Ergebnisse sind jedoch statistisch zu hinterfragen (p-Wert Gesamtkollektiv= 0,12; p-Wert iCCA: 0,058). Es ist zu beachten, dass es sich insgesamt um lediglich 25 Präparate handelte, die dann gesondert in den Unterkollektiven nur 14 bei iCCA und 11 bei eCCA betrugen. Eine Bewertung dieses Aspektes hat demnach nur eine stark limitierte Aussagekraft. Vergleicht man dies mit der Literatur ist eine Färbung im Kern sowohl bei Beschreibung des Antikörpers (217), als auch in einigen Publikationen zur GLO1 beschrieben. So wurde eine nukleäre Färbung in Basalzellkarzinomen beschrieben, die sich zur rein zytoplasmatischen GLO1-Färbung der Plattenepithelkarzinome der Haut unterscheiden (218). Baunacke et al. beschreiben eine nukleäre Anfärbung der GLO1 bei Prostatakarzinomen. Interessanterweise beschrieben sie lediglich eine Anfärbung bei entnommenen Tumorpräparaten, eine Anfärbung in Zellkulturen wurde nicht gesehen, weshalb Baunacke et al. die Hypothese aufstellten, dass das Tumormikroenvironment Einfluss auf die GLO1-Lokalisation nehmen würde (219). Wang et al. beobachteten an Mauszelllinien von Fibrosarkomen

eine nukleäre Transposition der GLO1 im Zusammenhang mit aggressiverem Wachstum (220).

Bezüglich des Überlebens im Zusammenhang mit einer nukleären GLO1-Färbung wurde dies bisher nur beim Plattenepithelkarzinom des Oropharynx untersucht. Es zeigte sich ein kürzeres PFS und ein geringeres krankheitsspezifisches Überleben unter hoher und nukleärer GLO1-Färbung (202). Anteilsmäßig waren in dieser Studie jedoch ein deutlich größerer Anteil an Präparaten mit einer kerndominanten Färbung vorhanden als in diesem Kollektiv (31% vs. 13,5%). Da nur 25 Präparate in diesem Kollektiv eine reine Kernfärbung aufwiesen ließe sich eventuell mit einer größeren Kollektivgruppe eine bessere Aussagekraft treffen. Die Tendenz in diesem Kollektiv von Cholangiokarzinomen scheint, wie auch die vorherigen Ergebnisse, in die gegensätzliche Richtung zu weisen als die Ergebnisse, die bisher in der Literatur zu GLO1 bei anderen Entitäten beschrieben wurden. Die genaue Rolle von GLO1 im Nukleus ist bis dato ungeklärt. Mögliche Hypothesen könnten sein, dass GLO1 als Transkriptionsregulator mitwirkt oder durch MG-Detoxifikation im Nukleus zu einer verringerten Glykosylierung von nukleären Proteinen und DNA führt. Diese Hypothesen sind jedoch bislang wissenschaftlich nicht untersucht und bedürften weiterer Forschung.

Es scheint, als sei die GLO1-Expression und deren prädiktive Aussagekraft stark vom untersuchten Tumor abhängig. Womöglich spielt die GLO1 beim CCA eine andere Rolle als in den bisher untersuchten Karzinomen. Da sich in der Literatur keine Untersuchungen zur GLO1-Expression an gesunden Gallengangswegen finden ließen, ist die Rolle der GLO1 im Gesunden unbekannt. Es gibt Gewebe, wie beispielsweise die Leber (221), die von Natur aus eine starke GLO1 Expression im Gesunden besitzen, andere Gewebe, wie beispielsweise das Colon (213), besitzen grundlegend eine geringe GLO1-Expression. Es scheint auch individuelle Schwankungen in der Expression der GLO1 in den jeweils gesunden und tumorösen Geweben zu geben (222).

5.2.4. Ergebnisse der multiplen-Cox-Regression

Bezüglich der Laborparameter konnte in dieser Arbeit keine prognostische Wertigkeit von Albumin sowie dem Alter in der durchgeführten univariaten Analyse gefunden werden. Für CA 19-9, den De-Ritis-Quotienten, Bilirubin, GOT und eine Anämie konnten in der univariaten Analyse prädiktive Zusammenhänge mit dem Überleben gesehen werden. CA 19-9 und der De-Ritis-Quotient konnten darüber hinaus in diesem Kollektiv als unabhängige Risikofaktoren in der multivariaten Analyse identifiziert werden.

In der Literatur finden sich einige Studien zur prognostischen Aussagekraft von CA 19-9. So konnte in der Analyse des ENSCCA-Registers von Izquierdo-Sanchez et al. ein erhöhter CA19-9-Wert als ein unabhängiger prognostischer Marker mit einer HR von 1,52 in der multivariaten Analyse etabliert werden (7). Dies zeigt sich kongruent mit der in dieser Arbeit errechneten HR von 1,57. Weitere Arbeiten konnten CA 19-9 in multivariaten Analysen als unabhängigen Risikofaktor bestimmen (133, 223). Eine Arbeit von Losen et al. konnte wiederum weder in der univariaten noch in der multivariaten Analyse für CA 19-9 eine prognostische

Aussagekraft beim CCA finden (70). Ein möglicher Grund für uneinheitliche Ergebnisse bezüglich CA 19-9 könnte das Fehlen eines einheitlichen Cut-off-Wertes sein mit der Auswahl an unterschiedlichen Cut-off Werte je nach Studie (s. Laborchemische Diagnostik, Kapitel 2.1.4.).

Bezüglich des De-Ritis-Quotienten ließen sich in der Literaturrecherche keine Arbeiten finden, die dessen prognostische Aussagekraft beim CCA untersucht haben. Es finden sich jedoch in diversen Studien Zusammenhänge mit sowohl GOT als auch GPT, sodass ein potenzieller Zusammenhang mit dem De-Ritis-Quotienten denkbar wäre, da dieser aus beiden Parametern errechnet wird (GOT/GPT) (7, 70, 133, 190, 223). Zu erwähnen ist auch eine Metaanalyse von insgesamt 16 Studien zu unterschiedlichen Karzinomtypen von Wu et al., welche zeigte, dass ein erhöhter De-Ritis-Quotient vor Therapiebeginn unabhängig von den in den Studien untersuchten Karzinomen mit einem erniedrigten OS einherging (209). Zwar war keine CCA-Studie Bestandteil dieser Metaanalyse, jedoch ist dies kongruent mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit. Als möglichen Erklärungsansatz stellen die Autoren der Metaanalyse die Hypothese auf, dass der erhöhte Tumormetabolismus und der damit einhergehende Warburg-Effekt einerseits zu einer gesteigerten GOT-Produktion führen, da GOT zur anaeroben Glykolyse benötigt wird, andererseits kommt es durch den erhöhten Tumorstoffwechsel zu einem höheren Verbrauch an GPT, weshalb die GPT-Konzentration sinkt und den Quotienten weiter erhöht. Ein anderer denkbarer Mechanismus ist laut Studienautoren eine Leberschädigung durch anfallenden oxidativen Stress (160, 209, 224–226). Der genaue Mechanismus hinter der prognostischen Verschlechterung hierdurch ist noch nicht endgültig geklärt, es wäre aber denkbar, dass mit mehr Tumorzellen, welche einen aggressiven Stoffwechsel betreiben, eine höhere Wahrscheinlichkeit für einen De-Ritis-Quotienten >1 besteht, welches die Prognose verschlechtern könnte. In dieser Arbeit ging ein erhöhter De-Ritis-Quotient mit einer schlechteren Überlebensprognose einher, was kongruent mit den beschriebenen Studienergebnissen ist. Zwar wurde der De-Ritis-Quotient bisher nicht als prädiktiver Marker beim CCA beschrieben, vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse ist der in dieser Arbeit gesehene prädiktive Zusammenhang bei diesem Kollektiv nur bedingt als potenziell neuer Erkenntnisgewinn zu interpretieren.

Bezüglich der univariaten Analysen zeigt sich ein gemischtes Bild. Je nach Studie konnten in ihren univariaten Analysen eine prognostische Aussagekraft von ein oder mehreren der hier getesteten Laborwerten gezeigt werden. Andere Studien wiederum konnten bei ein oder mehreren der hier getesteten Laborwerte keine Zusammenhänge aufzeigen (7, 70, 133, 190, 223). So konnten beispielsweise in der Publikation von Izquierdo-Sanchez et al. in der univariaten Analyse GOT sowie Bilirubin nebst CA 19-9 als Risikofaktoren identifiziert werden, nicht jedoch in der multivariaten Analyse, was sich ebenfalls kongruent zu den Erkenntnissen dieser Arbeit zeigt. Gleichzeitig konnte für Albumin und ein Alter >65 Jahren eine positive Korrelation im Überleben in der univariaten Analyse aufgezeigt werden, was wiederum im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit steht (7). Loosen et al. konnten in ihrer univariaten Analyse einen prognostischen Zusammenhang des Überlebens mit dem Hb-Wert feststellen, allerdings

keinen Zusammenhang mit GOT, GPT oder Bilirubin. Kaibori et al. konnten Bilirubin und Albumin sogar in der multivariaten Analyse als unabhängige prognostische Marker bei iCCA identifizieren, was in diesem Kollektiv nicht gelang (223),

Eine Testung der laborchemischen Parameter in der multiplen-Cox-Regression zusammen mit GLO1 gelang in dieser Arbeit aufgrund einer fehlenden PH-Annahme nicht. Möglicherweise könnte hier eine Testung der Daten auf zeitabhängige Effekte von Kovariaten oder eine Testung auf nicht-lineare Zusammenhänge mehr Aufschluss liefern und könnte als Grundlage für zukünftige Forschungsansätze diesbezüglich dienen.

5.3. Diskussion des Studiendesigns

Bezüglich des Kollektivs gibt es einige Unterschiede zur in der Literatur beschriebenen Allgemeinbevölkerung. Wie bereits angesprochen, wird in einem Großteil der Erkrankten die Diagnose des CCA erst spät gestellt. Im Zeitraum 2019-2020 fehlt im deutschen Krebsregister des RKI bei über 60% der Personen mit CCA in Deutschland eine Angabe zum UICC-Stadium. Bei den verbleibenden Personen, bei denen eine Klassifikation vorlag, lag bei nur ca. 30% der Personen (29% der Frauen und 33% der Männer) ein CCA mit einem UICC-Stadium ≤ 2 vor (5). Da in diesem Kollektiv 46,7% der Personen ein Karzinom im UICC-Stadium ≤ 2 besaßen, ist diese Verteilung nicht repräsentativ für die in Deutschland erhobenen Daten aus der Allgemeinbevölkerung. Aus Daten des ENSCCA-Registers geht zudem hervor, dass ca. 50% der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose einen operablen Tumor besaßen (7). In diesem Kollektiv befinden sich überwiegend Personen, die primär einer Operation zugeführt wurden. Zudem waren die Erkrankten im Vergleich jünger als das mittlere Erkrankungsalter laut RKI-Daten (63,6 Jahre vs. 75-77 Jahre). Vergleicht man das mittlere Erkrankungsalter mit dem des ENSCCA-Registers (66 Jahre) liegen die Daten deutlich näher aneinander. Diese Unterschiede könnten unter anderem durch die Erfassung und Codierung der iCCA innerhalb der Karzinome der Leber durch das RKI zustande kommen (5, 7, 20). Auf die Probleme der häufigen Fehlklassifikation der iCCA und pCCA wurde bereits unter Abschnitt 2.1.2. eingegangen. Dies könnte ebenso Probleme bei der Vergleichbarkeit der Daten dieser Kohortenstudie mit Daten anderer Studien und Datenbanken verursachen.

Bezüglich der Färbung und der Auswertung dieser, könnte die starke Heterogenität der Expression der GLO1-Färbung eine mögliche Quelle für Ungenauigkeiten sein. Durch die Multiplikation der Fläche und Färbeintensität beim Errechnen des IRS-Scores und die anschließende Einteilung in Gruppen wurde zwar versucht etwaigen Inhomogenitäten weniger Gewicht zukommen zu lassen, jedoch könnte diese Heterogenität auch größere Abschnitte des Tumors betreffen und hier durch Betrachtung lediglich eines kleinen Teilabschnittes des Tumors nicht zur Geltung kommen. Auch fiel bei Betrachtung dieser Tumorpräparate auf, dass bei einigen Präparaten eine GLO1-Färbung in der Kerngegend bestand, während andere Präparate keine Kernfärbung besaßen. In der Literatur ist zwar eine Kernfärbung unter anderem durch den Hersteller der Antikörper beschrieben, es ist jedoch nicht geklärt welche Aufgabe die GLO1 im Nukleus besitzt (217).

Des Weiteren gibt die Expression von GLO1 keine Aussage über die tatsächliche Aktivität des Enzymes. Es könnten Unterschiede in der Enzymaktivität vorliegen, sodass beispielsweise eine geringere Enzymexpression durch eine erhöhte Enzymaktivität relativiert wird. So sind beispielsweise geschlechtsspezifische Unterschiede in der Enzymaktivität in der Literatur bei Leberzellen und in atherosklerotischen Plaques der Halsschlagader beschrieben (194, 195) oder eine erniedrigte Enzymaktivität bei gleichbleibender Enzymexpression (157). Weitere Untersuchungen mittels spektrometrischer Methoden könnten hier zusätzlichen Aufschluss liefern.

Die Datenerfassung stellt eine weitere Quelle für Ungenauigkeiten dar. Da die ersten Patientendaten aus diesem Kollektiv aus dem Jahr 1998 stammen und teils nicht digitalisiert oder nicht speziell für diese Arbeit erhoben wurden, fehlen bei einigen Patienten Angaben zu Faktoren wie Diabetes und Rauchen. Dies kann ebenfalls Einfluss auf die Aussagekraft und Repräsentativität der Daten haben.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Das Cholangiokarzinom ist eine seltene, aber schwerwiegende Krebserkrankung. Trotz besserer diagnostischer Möglichkeiten und Erforschung neuer Therapieansätze gelingt die Diagnose meist erst in hohen Tumorstadien und geht weiterhin mit einer hohen Mortalität einher. Die Untersuchung molekularer Biomarker, prognostischer Faktoren und möglicher neuer Therapieansätze ist daher von großer Bedeutung. Ziel dieser Arbeit war es, die Expression von GLO1 beim CCA zu untersuchen.

Zusammengefasst ergaben die in dieser Arbeit untersuchten Daten der explorativen Analyse, dass es im Gesamtkollektiv keine Korrelationen der GLO1 Färbung mit den erhobenen klinischen Parametern gab.

Im Unterkollektiv der iCCA zeigten die TNM und UICC-Stadien, das Alter, die CK7-Expression und die Risikofaktoren keine Korrelation mit GLO1. Das Färbeverhalten der GLO1 korrelierte jedoch bei iCCA mit dem Geschlecht. So besaßen Frauen häufiger eine positive GLO1-Expression, Männer wiesen jedoch eine stärkere Färbung auf, sobald sie eine positive Färbung besaßen. Bei iCCA wiesen männliche Patienten mit GLO1-Expression bessere Überlebensraten auf, vor allem in den ersten Jahren nach Diagnose (Breslow-Test).

Bei den Laborwerten gingen positive GLO1-Werte bei iCCA eher mit einer normwertigen CA 19-9-Expression einher als negative GLO1-Werte, welche sich eher als CA 19-9 positiv unter dem gewählten Cut-off Wert von 37 U/L darstellten. Es zeigte sich zudem, dass das Überleben bei Personen mit erhöhter CA 19-9-Expression signifikant kürzer war als bei jenen mit normaler CA 19-9-Expression. Interessanterweise ergab die kombinierte Betrachtung von CA 19-9 und GLO1, dass innerhalb der CA 19-9-negativen Gruppe eine GLO1-Expression mit einem signifikanten Überlebensvorteil assoziiert war. Hingegen unterschied sich das Überleben der CA 19-9-negativen Personen ohne GLO1-Expression nicht wesentlich von dem der beiden Gruppen mit erhöhter CA 19-9 Expression.

Die restlichen untersuchten Laborparameter wie Bilirubin, Albumin, GOT, GPT und der De-Ritis-Quotient wiesen bei iCCA keine Korrelationen mit der GLO1 Färbung auf.

Bei Betrachtung des Unterkollektives der eCCA gab es zwar keine Unterschiede in der Gesamtanfärbbarkeit zwischen Frauen und Männern, betrachtete man jedoch lediglich die positiven Färbungen so wiesen Frauen eher eine stärkere GLO1-Färbung als Männer auf, auch hier bot sich dadurch allerdings kein Überlebensvorteil. Von den untersuchten Tumorparametern ergab sich eine Korrelation mit der Tumorgröße. So gingen in diesem Kollektiv größere Tumore eher mit einer GLO1-positiven Färbung einher als GLO1-Negative. Mit den weiteren untersuchten Tumorparametern und den untersuchten Laborparametern ergab sich bei eCCA keine Korrelation.

Bei Betrachtung der Überlebenszeitanalysen fielen vor allem in den ersten Jahren nach Diagnose Unterschiede in den Überlebenszeiten auf. So hatten Personen im Unterkollektiv der

iCCA unter stärkerer Gewichtung der Anfangsphase (Breslow-Test) bessere Überlebensraten, wenn sie eine positive Färbung aufwiesen. Dieser Effekt verstärkte sich, wenn man einen höheren Cut-off Wert wählte und somit stark gefärbte Präparate im Vergleich zu schwächer gefärbten und ungefärbten Präparaten betrachtete. Im Gesamtkollektiv fiel eine ähnliche Tendenz zu besseren Überlebensraten in der Anfangsphase auf diese war jedoch statistisch nicht signifikant. Auch hier zeigte sich ein nochmal deutlicherer Unterschied, wenn man stark gefärbte Präparate im Vergleich zu schwach und ungefärbten Präparaten beurteilte. Im Unterkollektiv der eCCA ergaben sich keine Unterschiede in den Überlebenskurven. Betrachtet man die Lokalisation der Färbung gesondert, so lässt sich sowohl im Gesamtkollektiv als auch den iCCA ein grafischer Trend zu einem besseren Überleben bei reiner Kernfärbung im Vergleich zu einer plasmatischen- oder Mischfärbung erkennen, diese war jedoch statistisch nicht signifikant.

Da bei GLO1 keine proportionalen Hazards angenommen werden konnten, erfolgte die multivariate Analyse einiger der erhobenen Parameter ohne GLO1 als Kovariable. Im Gesamtkollektiv sowie bei iCCA zeigte sich ein erhöhter CA 19-9 Titer sowie ein erhöhter De-Ritis-Quotient in diesem Patientenkollektiv als unabhängige Risikofaktoren zu versterben.

Insgesamt stehen die Ergebnisse der Überlebenszeitanalysen zum größten Teil im Widerspruch zu den zuletzt publizierten Daten bei anderen Karzinomen, bei denen meist eine Korrelation von GLO1 mit aggressiveren Tumorwachstumsraten und geringeren OS sowie PFS auffiel.

Mögliche Erklärungsansätze könnten beispielsweise über eine Zunahme von Methylglyoxal und daraus resultierende Signalkaskaden über TGF- β 1 oder YAP sein. Somit wäre es denkbar, GLO1 möglicherweise als Marker für eine bessere Abschätzung des OS in der Anfangsphase nach Diagnosestellung einzusetzen. Weitere Untersuchungen sowie ein Blick auf mögliche PFS und Ansprechen auf systemische Therapiemethoden, welche in dieser Arbeit nicht erfasst wurden, könnten gegebenenfalls weiter Aufschluss liefern. Ein weiterer Ansatz wäre mittels Massenspektrometrie die GLO1-Enzymaktivität zu untersuchen, um potenzielle Verschiebungen in der Enzymaktivität von GLO1 zu untersuchen, da eine vermehrte Expression nicht unbedingt auch eine vermehrte oder gleichbleibende Enzymaktivität mit sich bringt. Möglicherweise führte eine Abnahme der GLO1-Aktivität zu dessen Mehrexpression. Auch eine Untersuchung gesunder Gallengangszellen im Hinblick auf die GLO1 Expression könnte weiteren Aufschluss über die Veränderungen im Vergleich zum Tumorgewebe liefern. Würden sich die Ergebnisse dieser Arbeit in nachfolgenden Arbeiten bestätigen so könnte man zudem auch Zellkulturversuche mit Hemmung oder Förderung der GLO1-Enzymaktivität in Erwägung ziehen, um potenziell neue Therapieansätze für CCA zu beleuchten. Bezüglich potenzieller prädiktiver Aussagen einer GLO1-Expression wären weiterführende statistische Analysen, die mögliche zeitabhängige oder nichtlineare Effekte der GLO1-Expression auf das Überleben untersuchen, ein sinnvoller Ansatz, um ein vollständigeres Bild zu erhalten.

7. Literatur

1. 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. doi: 10.1111/liv.14093.
2. Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, MacIntyre MF et al. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol* 2015; 1(4):505–27. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.0735.
3. McNamara MG, Lopes A, Wasan H, Malka D, Goldstein D, Shannon J et al. Landmark survival analysis and impact of anatomic site of origin in prospective clinical trials of biliary tract cancer. *J Hepatol* 2020; 73(5):1109–17. doi: 10.1016/j.jhep.2020.05.014.
4. Bertuccio P, Malvezzi M, Carioli G, Hashim D, Boffetta P, El-Serag HB et al. Global trends in mortality from intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 2019; 71(1):104–14. doi: 10.1016/j.jhep.2019.03.013.
5. Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland 2015/2016 2019. doi: 10.25646/5977.3.
6. Lang H, Baumgart J, Heinrich S, Huber T, Heuft L-K, Margies R et al. Liver Resection for Intrahepatic Cholangiocarcinoma-Single-Center Experience with 286 Patients Undergoing Surgical Exploration over a Thirteen Year Period. *J Clin Med* 2021; 10(16). doi: 10.3390/jcm10163559.
7. 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. doi: 10.1016/j.jhep.2021.12.010.
8. Hang H, Jeong S, Sha M, Kong D, Xi Z, Tong Y et al. Cholangiocarcinoma: anatomical location-dependent clinical, prognostic, and genetic disparities. *Ann Transl Med* 2019; 7(23):744. doi: 10.21037/atm.2019.12.37.
9. Schweitzer N, Fischer M, Kirstein MM, Berhane S, Kottas M, Sinn M et al. Risk estimation for biliary tract cancer: Development and validation of a prognostic score. *Liver Int* 2017; 37(12):1852–60. doi: 10.1111/liv.13517.
10. Thol F, Gairing SJ, Czauderna C, Thomaidis T, Gamstätter T, Huber Y et al. Outcomes in patients receiving palliative chemotherapy for advanced biliary tract cancer. *JHEP Rep* 2022; 4(3):100417. doi: 10.1016/j.jhepr.2021.100417.
11. He Y, Zhou C, Huang M, Tang C, Liu X, Yue Y et al. Glyoxalase system: A systematic review of its biological activity, related-diseases, screening methods and small molecule regulators. *Biomed Pharmacother* 2020; 131:110663. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110663.
12. Rabbani N, Xue M, Weickert MO, Thornalley PJ. Multiple roles of glyoxalase 1-mediated suppression of methylglyoxal glycation in cancer biology-Involvement in tumour suppression, tumour growth, multidrug resistance and target for chemotherapy. *Semin Cancer Biol* 2018; 49:83–93. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.05.006.
13. Hutschenreuther A, Bigl M, Hemdan NYA, Debebe T, Gaunitz F, Birkenmeier G. Modulation of GLO1 Expression Affects Malignant Properties of Cells. *Int J Mol Sci* 2016; 17(12). doi: 10.3390/ijms17122133.
14. Cheng W-L, Tsai M-M, Tsai C-Y, Huang Y-H, Chen C-Y, Chi H-C et al. Glyoxalase-I is a novel prognosis factor associated with gastric cancer progression. *PLoS One* 2012; 7(3):e34352. doi: 10.1371/journal.pone.0034352.
15. Burdelski C, Shihada R, Hinsch A, Angerer A, Göbel C, Friedrich E et al. High-Level Glyoxalase 1 (GLO1) expression is linked to poor prognosis in prostate cancer. *Prostate* 2017; 77(15):1528–38. doi: 10.1002/pros.23431.

16. Fonseca-Sánchez MA, Rodríguez Cuevas S, Mendoza-Hernández G, Bautista-Piña V, Arechaga Ocampo E, Hidalgo Miranda A et al. Breast cancer proteomics reveals a positive correlation between glyoxalase 1 expression and high tumor grade. *Int J Oncol* 2012; 41(2):670–80. doi: 10.3892/ijo.2012.1478.
17. Michel M, Hollenbach M, Pohl S, Ripoll C, Zipprich A. Inhibition of Glyoxalase-I Leads to Reduced Proliferation, Migration and Colony Formation, and Enhanced Susceptibility to Sorafenib in Hepatocellular Carcinoma. *Front Oncol* 2019; 9:785. doi: 10.3389/fonc.2019.00785.
18. Wittekind C. TNM-Klassifikation maligner Tumoren: Klassifikation Maligner Tumoren. Achte Auflage. Weinheim, Germany, [Geneva]: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; UICC global cancer control; 2017. Verfügbar unter: <https://livivo.idm.oclc.org/login?url=https://ebookcentral.proquest.com/lib/zbmed-ebooks/detail.action?docID=4770952>.
19. Bismuth H, Nakache R, Diamond T. Management strategies in resection for hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg* 1992; 215(1):31–8. doi: 10.1097/00000658-199201000-00005.
20. Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland für 2013/2014; 2017.
21. Rumgay H, Ferlay J, Martel C de, Georges D, Ibrahim AS, Zheng R et al. Global, regional and national burden of primary liver cancer by subtype. *Eur J Cancer* 2022; 161:108–18. doi: 10.1016/j.ejca.2021.11.023.
22. Kirstein MM, Vogel A. Epidemiology and Risk Factors of Cholangiocarcinoma. *Visc Med* 2016; 32(6):395–400. doi: 10.1159/000453013.
23. Walter D, Ferstl P, Waidmann O, Trojan J, Hartmann S, Schnitzbauer AA et al. Cholangiocarcinoma in Germany: Epidemiologic trends and impact of misclassification. *Liver Int* 2019; 39(2):316–23. doi: 10.1111/liv.13954.
24. Selvadurai S, Mann K, Mithra S, Bridgewater J, Malik H, Khan SA. Cholangiocarcinoma miscoding in hepatobiliary centres. *Eur J Surg Oncol* 2021; 47(3 Pt B):635–9. doi: 10.1016/j.ejso.2020.09.039.
25. ICD-11 - Aspekte der Einführung für Deutschland; 2024 [Stand: 19.08.2024]. Verfügbar unter: <https://www.bfarm.de/DE/Kodiersysteme/Klassifikationen/ICD/ICD-11/aspekte-einfuehrung.html?nn=724272>.
26. Cai S, Sivakumar S. The 11th revision of the International Statistical Classification of Disease and Related Health Problems and Cholangiocarcinoma. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2022; 11(2):276–9. doi: 10.21037/hbsn-22-69.
27. Javle M, Lee S, Azad NS, Borad MJ, Kate Kelley R, Sivaraman S et al. Temporal Changes in Cholangiocarcinoma Incidence and Mortality in the United States from 2001 to 2017. *Oncologist* 2022; 27(10):874–83. doi: 10.1093/oncolo/oyac150.
28. Zhou Y, Liu S, Wu L, Wan T. Survival after surgical resection of distal cholangiocarcinoma: A systematic review and meta-analysis of prognostic factors. *Asian J Surg* 2017; 40(2):129–38. doi: 10.1016/j.asjsur.2015.07.002.
29. 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 (ENS-CCA). *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016; 13(5):261–80. doi: 10.1038/nrgastro.2016.51.
30. Andersen JB. Molecular pathogenesis of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2015; 22(2):101–13. doi: 10.1002/jhbp.155.
31. 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. doi: 10.1016/j.jhep.2012.02.022.

32. Lee Y-T, Wang JJ, Luu M, Nouredin M, Nissen NN, Patel TC et al. Comparison of Clinical Features and Outcomes Between Intrahepatic Cholangiocarcinoma and Hepatocellular Carcinoma in the United States. *Hepatology* 2021; 74(5):2622–32. doi: 10.1002/hep.32007.
33. Dhar D, Baglieri J, Kisseleva T, Brenner DA. Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer. *Exp Biol Med (Maywood)* 2020; 245(2):96–108. doi: 10.1177/1535370219898141.
34. Clements O, Eliahoo J, Kim JU, Taylor-Robinson SD, Khan SA. Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 2020; 72(1):95–103. doi: 10.1016/j.jhep.2019.09.007.
35. Cadamuro M, Strazzabosco M. Inflammatory pathways and cholangiocarcinoma risk mechanisms and prevention. *Adv Cancer Res* 2022; 156:39–73. doi: 10.1016/bs.acr.2022.02.001.
36. Catanzaro E, Gringeri E, Burra P, Gambato M. Primary Sclerosing Cholangitis-Associated Cholangiocarcinoma: From Pathogenesis to Diagnostic and Surveillance Strategies. *Cancers (Basel)* 2023; 15(20). doi: 10.3390/cancers15204947.
37. Ehlken H, Zenouzi R, Schramm C. Risk of cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis: diagnosis and surveillance. *Curr Opin Gastroenterol* 2017; 33(2):78–84. doi: 10.1097/MOG.0000000000000335.
38. 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. doi: 10.1002/hep.26565.
39. Barner-Rasmussen N, Pukkala E, Hadkhale K, Färkkilä M. Risk factors, epidemiology and prognosis of cholangiocarcinoma in Finland. *United European Gastroenterol J* 2021; 9(10):1128–35. doi: 10.1002/ueg2.12154.
40. Werneburg NW, Yoon J-H, Higuchi H, Gores GJ. Bile acids activate EGF receptor via a TGF- α -dependent mechanism in human cholangiocyte cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285(1):G31-6. doi: 10.1152/ajpgi.00536.2002.
41. Lewis J. Pathology of Fibropolycystic Liver Diseases. *Clin Liver Dis (Hoboken)* 2021; 17(4):238–43. doi: 10.1002/cld.1044.
42. Petrick JL, Yang B, Altekruse SF, van Dyke AL, Koshiol J, Graubard BI et al. Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: A population-based study in SEER-Medicare. *PLoS One* 2017; 12(10):e0186643. doi: 10.1371/journal.pone.0186643.
43. Huang Y-L, Zhang K-Y, Sun Y-L, Qian M-B, Wang Z. The risk of hepatobiliary complications in Clonorchis and Opisthorchis infection: A systematic review and meta-analysis. *Acta Trop* 2024; 260:107457. doi: 10.1016/j.actatropica.2024.107457.
44. Li H, Hu B, Zhou Z-Q, Guan J, Zhang Z-Y, Zhou G-W. Hepatitis C virus infection and the risk of intrahepatic cholangiocarcinoma and extrahepatic cholangiocarcinoma: evidence from a systematic review and meta-analysis of 16 case-control studies. *World J Surg Oncol* 2015; 13:161. doi: 10.1186/s12957-015-0583-9.
45. Chen R-F, Li Z-H, Zou S-Q, Chen J-S. Effect of hepatitis C virus core protein on modulation of cellular proliferation and apoptosis in hilar cholangiocarcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4(1):71–4.
46. 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. *The American Journal of Gastroenterology* 2018; 113(10):1494–505. doi: 10.1038/s41395-018-0207-4.

47. Saengboonmee C, Seubwai W, Lert-Itthiporn W, Sanlung T, Wongkham S. Association of Diabetes Mellitus and Cholangiocarcinoma: Update of Evidence and the Effects of Antidiabetic Medication. *Can J Diabetes* 2021; 45(3):282–90. doi: 10.1016/j.jcjd.2020.09.008.
48. Fava G, Alpini G, Rychlicki C, Saccomanno S, DeMorrow S, Trozzi L et al. Leptin enhances cholangiocarcinoma cell growth. *Cancer Res* 2008; 68(16):6752–61. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6682.
49. Nordenstedt H, Mattsson F, El-Serag H, Lagergren J. Gallstones and cholecystectomy in relation to risk of intra- and extrahepatic cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* 2012; 106(5):1011–5. doi: 10.1038/bjc.2011.607.
50. Komori J, Marusawa H, Machimoto T, Endo Y, Kinoshita K, Kou T et al. Activation-induced cytidine deaminase links bile duct inflammation to human cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2008; 47(3):888–96. doi: 10.1002/hep.22125.
51. Huang Y, You L, Xie W, Ning L, Lang J. Smoking and risk of cholangiocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2017; 8(59):100570–81. doi: 10.18632/oncotarget.20141.
52. Bujanda L, Sánchez A, Moreira L, Prat R, Hernández-Mesa G, Rodríguez-Alcalde D et al. Pancreatic cancer and biliary tract tumors in individuals with lynch syndrome. *Dig Liver Dis* 2025. doi: 10.1016/j.dld.2025.09.025.
53. Alvaro D, Bragazzi MC, Benedetti A, Fabris L, Fava G, Invernizzi P et al. Cholangiocarcinoma in Italy: A national survey on clinical characteristics, diagnostic modalities and treatment. Results from the "Cholangiocarcinoma" committee of the Italian Association for the Study of Liver disease. *Dig Liver Dis* 2011; 43(1):60–5. doi: 10.1016/j.dld.2010.05.002.
54. Thinkhamrop K, Khuntikeo N, Chamadol N, Suwannatrai AT, Phimha S, Kelly M. Associations between ultrasound screening findings and cholangiocarcinoma diagnosis in an at-risk population. *Sci Rep* 2022; 12(1):13513. doi: 10.1038/s41598-022-17794-9.
55. Valls C, Gumà A, Puig I, Sanchez A, Andía E, Serrano T et al. Intrahepatic peripheral cholangiocarcinoma: CT evaluation. *Abdom Imaging* 2000; 25(5):490–6. doi: 10.1007/s002610000079.
56. Kidanemariam S, Gu J, Yoon JH, Challapalli JV, Fruh V, Sax AJ. Cholangiocarcinoma: Epidemiology and Imaging-Based Review. *R I Med J* (2013) 2024; 107(5):43–8.
57. Zhang H, Zhu J, Ke F, Weng M, Wu X, Li M et al. Radiological Imaging for Assessing the Respectability of Hilar Cholangiocarcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int* 2015; 2015:497942. doi: 10.1155/2015/497942.
58. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF)-Ständige Kommission Leitlinien. S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome, Version 5.2 – Juni 2025.
59. Navaneethan U, Hasan MK, Lourdusamy V, Njei B, Varadarajulu S, Hawes RH. Single-operator cholangioscopy and targeted biopsies in the diagnosis of indeterminate biliary strictures: a systematic review. *Gastrointestinal Endoscopy* 2015; 82(4):608-14.e2. doi: 10.1016/j.gie.2015.04.030.
60. Wen L-J, Chen J-H, Xu H-J, Yu Q, Liu K. Efficacy and Safety of Digital Single-Operator Cholangioscopy in the Diagnosis of Indeterminate Biliary Strictures by Targeted Biopsies: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Diagnostics (Basel)* 2020; 10(9). doi: 10.3390/diagnostics10090666.
61. Thomaidis T, Kallimanis G, May G, Zhou P, Sivanathan V, Mosko J et al. Advances in the endoscopic management of malignant biliary obstruction. *Ann Gastroenterol* 2020; 33(4):338–47. doi: 10.20524/aog.2020.0497.
62. Lee Y, Yoo IR, Boo SH, Kim H, Park HL, Hyun O J. The Role of F-18 FDG PET/CT in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Nucl Med Mol Imaging* 2017; 51(1):69–78. doi: 10.1007/s13139-016-0440-y.

63. Parra-Robert M, Santos VM, Canis SM, Pla XF, Fradera JMA, Porto RM. Relationship Between CA 19.9 and the Lewis Phenotype: Options to Improve Diagnostic Efficiency. *Anticancer Res* 2018; 38(10):5883–8. doi: 10.21873/anticancer.12931.
64. BERGQUIST JR, Ivanics T, STORLIE CB, GROESCHL RT, Tee MC, HABERMANN EB et al. Implications of CA19-9 elevation for survival, staging, and treatment sequencing in intrahepatic cholangiocarcinoma: A national cohort analysis. *J Surg Oncol* 2016; 114(4):475–82. doi: 10.1002/jso.24381.
65. Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin - Zentrallabor | Zentrallabor » Diagnostik » Analytinformationen » Analytinformationen-Vademecum; NaN [Stand: 12.01.2024]. Verfügbar unter: <https://www.unimedizin-mainz.de/index.php?id=43370&showmodal=1&uid=422>.
66. Charatcharoenwitthaya P, Enders FB, Halling KC, Lindor KD. Utility of serum tumor markers, imaging, and biliary cytology for detecting cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2008; 48(4):1106–17. doi: 10.1002/hep.22441.
67. Chaiteerakij R, Harmsen WS, Marrero CR, Aboelsoud MM, Ndzenge A, Kaiya J et al. A new clinically based staging system for perihilar cholangiocarcinoma. *The American Journal of Gastroenterology* 2014; 109(12):1881–90. doi: 10.1038/ajg.2014.327.
68. Coelho R, Silva M, Rodrigues-Pinto E, Cardoso H, Lopes S, Pereira P et al. CA 19-9 as a Marker of Survival and a Predictor of Metastization in Cholangiocarcinoma. *GE Port J Gastroenterol* 2017; 24(3):114–21. doi: 10.1159/000452691.
69. Hahn F, Müller L, Jungmann F, Mähringer-Kunz A, Tanyildizi Y, Düber C et al. Survival prediction for patients with non-resectable intrahepatic cholangiocarcinoma undergoing chemotherapy: a retrospective analysis comparing the tumor marker CA 19-9 with cross-sectional imaging. *J Cancer Res Clin Oncol* 2020; 146(7):1883–90. doi: 10.1007/s00432-020-03200-2.
70. Loosen SH, Roderburg C, Kauertz KL, Koch A, Vucur M, Schneider AT et al. CEA but not CA19-9 is an independent prognostic factor in patients undergoing resection of cholangiocarcinoma. *Sci Rep* 2017; 7(1):16975. doi: 10.1038/s41598-017-17175-7.
71. Gringeri E, Gambato M, Sapisochin G, Ivanics T, Lynch EN, Mescoli C et al. Cholangiocarcinoma as an Indication for Liver Transplantation in the Era of Transplant Oncology. *J Clin Med* 2020; 9(5). doi: 10.3390/jcm9051353.
72. Vogel A, Bridgewater J, Edeline J, Kelley RK, Klumpen HJ, Malka D et al. Biliary tract cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2023; 34(2):127–40. doi: 10.1016/j.annonc.2022.10.506.
73. Navaneethan U, Njei B, Venkatesh PGK, Vargo JJ, Parsi MA. Fluorescence in situ hybridization for diagnosis of cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis: a systematic review and meta-analysis. *Gastrointestinal Endoscopy* 2014; 79(6):943-950.e3. doi: 10.1016/j.gie.2013.11.001.
74. Fong ZV, Brownlee SA, Qadan M, Tanabe KK. The Clinical Management of Cholangiocarcinoma in the United States and Europe: A Comprehensive and Evidence-Based Comparison of Guidelines. *Ann Surg Oncol* 2021; 28(5):2660–74. doi: 10.1245/s10434-021-09671-y.
75. Krasinskas AM. Cholangiocarcinoma. *Surg Pathol Clin* 2018; 11(2):403–29. doi: 10.1016/j.path.2018.02.005.
76. 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. doi: 10.1002/hep.25595.
77. 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. doi: 10.1002/jhbp.154.

78. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2017; 67(2):93–9. doi: 10.3322/caac.21388.
79. DeOliveira ML, Schulick RD, Nimura Y, Rosen C, Gores G, Neuhaus P et al. New staging system and a registry for perihilar cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2011; 53(4):1363–71. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21480336/>.
80. Müller L, Mähringer-Kunz A, Jungmann F, Tanyildizi Y, Bartsch F, Czauderna C et al. Risk Stratification in Advanced Biliary Tract Cancer: Validation of the A.L.A.N. Score. *J Oncol* 2020; 2020:6180613. doi: 10.1155/2020/6180613.
81. Boerner T, Drill E, Pak LM, Nguyen B, Sigel CS, Doussot A et al. Genetic Determinants of Outcome in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2021; 74(3):1429–44. doi: 10.1002/hep.31829.
82. Montal R, Sia D, Montironi C, Leow WQ, Esteban-Fabrá R, Pinyol R et al. Molecular classification and therapeutic targets in extrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 2020; 73(2):315–27. doi: 10.1016/j.jhep.2020.03.008.
83. Sugawara H, Yasoshima M, Katayanagi K, Kono N, Watanabe Y, Harada K et al. Relationship between interleukin-6 and proliferation and differentiation in cholangiocarcinoma. *Histopathology* 1998; 33(2):145–53. doi: 10.1046/j.1365-2559.1998.00445.x.
84. Isomoto H, Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Guicciardi ME, Frank DA et al. Interleukin 6 upregulates myeloid cell leukemia-1 expression through a STAT3 pathway in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* 2005; 42(6):1329–38. doi: 10.1002/hep.20966.
85. Colyn L, Alvarez-Sola G, Latasa MU, Uriarte I, Herranz JM, Arechederra M et al. New molecular mechanisms in cholangiocarcinoma: signals triggering interleukin-6 production in tumor cells and KRAS co-opted epigenetic mediators driving metabolic reprogramming. *J Exp Clin Cancer Res* 2022; 41(1):183. doi: 10.1186/s13046-022-02386-2.
86. Isomoto H, Mott JL, Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Haan S et al. Sustained IL-6/STAT-3 signaling in cholangiocarcinoma cells due to SOCS-3 epigenetic silencing. *Gastroenterology* 2007; 132(1):384–96. doi: 10.1053/j.gastro.2006.10.037.
87. Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Kaufmann SH, Gores GJ. Interleukin-6 contributes to Mcl-1 up-regulation and TRAIL resistance via an Akt-signaling pathway in cholangiocarcinoma cells. *Gastroenterology* 2005; 128(7):2054–65. doi: 10.1053/j.gastro.2005.03.010.
88. Park J, Tadlock L, Gores GJ, Patel T. Inhibition of interleukin 6-mediated mitogen-activated protein kinase activation attenuates growth of a cholangiocarcinoma cell line. *Hepatology* 1999; 30(5):1128–33. doi: 10.1002/hep.510300522.
89. Wehbe H, Henson R, Meng F, Mize-Berge J, Patel T. Interleukin-6 contributes to growth in cholangiocarcinoma cells by aberrant promoter methylation and gene expression. *Cancer Res* 2006; 66(21):10517–24. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2130.
90. Frampton G, Invernizzi P, Bernuzzi F, Pae HY, Quinn M, Horvat D et al. Interleukin-6-driven progranulin expression increases cholangiocarcinoma growth by an Akt-dependent mechanism. *Gut* 2012; 61(2):268–77. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300643.
91. Nzeako UC, Guicciardi ME, Yoon J-H, Bronk SF, Gores GJ. COX-2 inhibits Fas-mediated apoptosis in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* 2002; 35(3):552–9. doi: 10.1053/jhep.2002.31774.
92. Ishimura N, Bronk SF, Gores GJ. Inducible nitric oxide synthase upregulates cyclooxygenase-2 in mouse cholangiocytes promoting cell growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287(1):G88–95. doi: 10.1152/ajpgi.00539.2003.

93. Jaiswal M, LaRusso NF, Shapiro RA, Billiar TR, Gores GJ. Nitric oxide-mediated inhibition of DNA repair potentiates oxidative DNA damage in cholangiocytes. *Gastroenterology* 2001; 120(1):190–9. doi: 10.1053/gast.2001.20875.
94. Sirica AE. Notching up on the cellular origins of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2013; 57(4):1668–71. doi: 10.1002/hep.26313.
95. Fingas CD, Bronk SF, Werneburg NW, Mott JL, Guicciardi ME, Cazanave SC et al. Myo-fibroblast-derived PDGF-BB promotes Hedgehog survival signaling in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* 2011; 54(6):2076–88. doi: 10.1002/hep.24588.
96. Pei T, Li Y, Wang J, Wang H, Liang Y, Shi H et al. YAP is a critical oncogene in human cholangiocarcinoma. *Oncotarget* 2015; 6(19):17206–20. doi: 10.18632/oncotarget.4043.
97. Alvaro D, Barbaro B, Franchitto A, Onori P, Glaser SS, Alpini G et al. Estrogens and insulin-like growth factor 1 modulate neoplastic cell growth in human cholangiocarcinoma. *Am J Pathol* 2006; 169(3):877–88. doi: 10.2353/ajpath.2006.050464.
98. 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. doi: 10.1038/s41575-020-0310-z.
99. Bridgewater J, Fletcher P, Palmer DH, Malik HZ, Prasad R, Mirza D et al. Long-Term Outcomes and Exploratory Analyses of the Randomized Phase III BILCAP Study. *J Clin Oncol* 2022; 40(18):2048–57. doi: 10.1200/JCO.21.02568.
100. Chaudhary RJ, Higuchi R, Nagino M, Unno M, Ohtsuka M, Endo I et al. Survey of pre-operative management protocol for perihilar cholangiocarcinoma at 10 Japanese high-volume centers with a combined experience of 2,778 cases. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2019; 26(11):490–502. doi: 10.1002/jhbp.668.
101. Zhang X-F, Bagante F, Chakedis J, Moris D, Beal EW, Weiss M et al. Perioperative and Long-Term Outcome for Intrahepatic Cholangiocarcinoma: Impact of Major Versus Minor Hepatectomy. *J Gastrointest Surg* 2017; 21(11):1841–50. doi: 10.1007/s11605-017-3499-6.
102. Ito F, Agni R, Rettammel RJ, Been MJ, Cho CS, Mahvi DM et al. Resection of hilar cholangiocarcinoma: concomitant liver resection decreases hepatic recurrence. *Ann Surg* 2008; 248(2):273–9. doi: 10.1097/SLA.0b013e31817f2bfd.
103. Cillo U, Fondevila C, Donadon M, Gringeri E, Mocchegiani F, Schlitt HJ et al. Surgery for cholangiocarcinoma. *Liver Int* 2019; 39 Suppl 1(Suppl Suppl 1):143–55. doi: 10.1111/liv.14089.
104. Pedrazzoli S, Beger HG, Obertop H, Andrén-Sandberg A, Fernández-Cruz L, Henne-Bruns D et al. A surgical and pathological based classification of resective treatment of pancreatic cancer. Summary of an international workshop on surgical procedures in pancreatic cancer. *Dig Surg* 1999; 16(4):337–45. doi: 10.1159/000018744.
105. 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. *Lancet Oncol* 2019; 20(5):663–73. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30915-X.
106. Nakachi K, Ikeda M, Konishi M, Nomura S, Katayama H, Kataoka T et al. Adjuvant S-1 compared with observation in resected biliary tract cancer (JCOG1202, ASCOT): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2023; 401(10372):195–203. doi: 10.1016/S0140-6736(22)02038-4.
107. 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 Evid* 2022; 1(8):EVIDoa2200015. doi: 10.1056/EVIDoa2200015.
108. 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. doi: 10.1016/S0140-6736(23)00727-4.
109. 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. doi: 10.1038/sj.bjc.6605779.
 110. Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthoney A, Maraveyas A et al. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N Engl J Med* 2010; 362(14):1273–81. doi: 10.1056/NEJMoa0908721.
 111. Oh D-Y, He AR, Qin S, Chen L-T, Okusaka T, Vogel A et al. A phase 3 randomized, double-blind, placebo-controlled study of durvalumab in combination with gemcitabine plus cisplatin (GemCis) in patients (pts) with advanced biliary tract cancer (BTC): TOPAZ-1. *JCO* 2022; 40(4_suppl):378. doi: 10.1200/JCO.2022.40.4_suppl.378.
 112. Feng L, Wang Y, Xu H, Yi F. Comparison of Different First-Line Systemic Therapies in Advanced Biliary Tract Cancer Based on Updated Random Controlled Trials: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Biomed Res Int* 2022; 2022:1720696. doi: 10.1155/2022/1720696.
 113. Mitzlaff K, Kirstein MM, Müller C, Venerito M, Olkus A, Dill MT et al. Efficacy, safety and differential outcomes of immune-chemotherapy with gemcitabine, cisplatin and durvalumab in patients with biliary tract cancers: A multicenter real world cohort. *United European Gastroenterol J* 2024; 12(9):1230–42. doi: 10.1002/ueg2.12656.
 114. 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. doi: 10.1038/sj.bjc.6604628.
 115. Massard C, Michiels S, Ferté C, Le Deley M-C, Lacroix L, Hollebecque A et al. High-Throughput Genomics and Clinical Outcome in Hard-to-Treat Advanced Cancers: Results of the MOSCATO 01 Trial. *Cancer Discov* 2017; 7(6):586–95. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-1396.
 116. Takada K, Kubo T, Kikuchi J, Yoshida M, Murota A, Arihara Y et al. Effect of comprehensive cancer genomic profiling on therapeutic strategies and clinical outcomes in patients with advanced biliary tract cancer: A prospective multicenter study. *Front Oncol* 2022; 12:988527. doi: 10.3389/fonc.2022.988527.
 117. Ohba A, Morizane C, Ueno M, Kobayashi S, Kawamoto Y, Komatsu Y et al. Multicenter phase II trial of trastuzumab deruxtecan for HER2-positive unresectable or recurrent biliary tract cancer: HERB trial. *Future Oncol* 2022; 18(19):2351–60. doi: 10.2217/fon-2022-0214.
 118. 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. *Lancet Oncol* 2020; 21(9):1234–43. doi: 10.1016/S1470-2045(20)30321-1.
 119. 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. doi: 10.1016/S1470-2045(20)30157-1.
 120. Vogel A, Sahai V, Hollebecque A, Vaccaro GM, Melisi D, Al Rajabi RM et al. An open-label study of pemigatinib in cholangiocarcinoma: final results from FIGHT-202*. *ESMO Open* 2024; 9(6). doi: 10.1016/j.esmoop.2024.103488.
 121. Ross JS, Wang K, Gay L, Al-Rohil R, Rand JV, Jones DM et al. New routes to targeted therapy of intrahepatic cholangiocarcinomas revealed by next-generation sequencing. *Oncologist* 2014; 19(3):235–42. doi: 10.1634/theoncologist.2013-0352.

122. Javle M, Borad MJ, Azad NS, Kurzrock R, Abou-Alfa GK, George B et al. Pertuzumab and trastuzumab for HER2-positive, metastatic biliary tract cancer (MyPathway): a multicentre, open-label, phase 2a, multiple basket study. *Lancet Oncol* 2021; 22(9):1290–300. doi: 10.1016/S1470-2045(21)00336-3.
123. Subbiah V, Kreitman RJ, Wainberg ZA, Gazzah A, Lassen U, Stein A et al. Dabrafenib plus trametinib in BRAFV600E-mutated rare cancers: the phase 2 ROAR trial. *Nat Med* 2023; 29(5):1103–12. doi: 10.1038/s41591-023-02321-8.
124. 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. doi: 10.1016/S1470-2045(21)00027-9.
125. Choi IS, Kim KH, Lee JH, Suh KJ, Kim J-W, Park JH et al. A randomised phase II study of oxaliplatin/5-FU (mFOLFOX) versus irinotecan/5-FU (mFOLFIRI) chemotherapy in locally advanced or metastatic biliary tract cancer refractory to first-line gemcitabine/cisplatin chemotherapy. *Eur J Cancer* 2021; 154:288–95. doi: 10.1016/j.ejca.2021.06.019.
126. Edeline J, Lamarca A, McNamara MG, Jacobs T, Hubner RA, Palmer D et al. Locoregional therapies in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma: A systematic review and pooled analysis. *Cancer Treat Rev* 2021; 99:102258. doi: 10.1016/j.ctrv.2021.102258.
127. Ray CE, Edwards A, Smith MT, Leong S, Kondo K, Gipson M et al. Metaanalysis of survival, complications, and imaging response following chemotherapy-based transarterial therapy in patients with unresectable intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Vasc Interv Radiol* 2013; 24(8):1218–26. doi: 10.1016/j.jvir.2013.03.019.
128. Gairing SJ, Thol F, Müller L, Hahn F, Thomaidis T, Czauderna C et al. The Addition of Transarterial Chemoembolization to Palliative Chemotherapy Extends Survival in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *J Clin Med* 2021; 10(12). doi: 10.3390/jcm10122732.
129. Hong TS, Wo JY, Yeap BY, Ben-Josef E, McDonnell EI, Blaszkowsky LS et al. Multi-Institutional Phase II Study of High-Dose Hypofractionated Proton Beam Therapy in Patients With Localized, Unresectable Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *JCO* 2016; 34(5):460–8. doi: 10.1200/JCO.2015.64.2710.
130. Cercek A, Boerner T, Tan BR, Chou JF, Gönen M, Boucher TM et al. Assessment of Hepatic Arterial Infusion of Floxuridine in Combination With Systemic Gemcitabine and Oxaliplatin in Patients With Unresectable Intrahepatic Cholangiocarcinoma: A Phase 2 Clinical Trial. *JAMA Oncol* 2020; 6(1):60–7. doi: 10.1001/jamaoncol.2019.3718.
131. Hawkins MA, Valle JW, Wasan HS, Harrison M, Morement H, Manoharan P et al. Addition of stereotactic body radiotherapy (SBRT) to systemic chemotherapy in locally advanced cholangiocarcinoma (CC) (ABC-07): Results from a randomized phase II trial. *Journal of Clinical Oncology* 2024; 42(16_suppl):4006. doi: 10.1200/JCO.2024.42.16_suppl.4006.
132. Dwary AD, Sharma A, Mohanti BK, Pal S, Garg P, Raina V et al. A randomized controlled trial (RCT) comparing best supportive care (BSC), 5-FU plus folinic acid (FUFA) and, gemcitabine plus oxaliplatin (Gem-Ox) in management of unresectable gallbladder cancer (GBC). *JCO* 2009; 27(15_suppl):4521. doi: 10.1200/jco.2009.27.15_suppl.4521.
133. Uchiyama K, Yamamoto M, Yamaue H, Ariizumi S, Aoki T, Kokudo N et al. Impact of nodal involvement on surgical outcomes of intrahepatic cholangiocarcinoma: a multicenter analysis by the Study Group for Hepatic Surgery of the Japanese Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2011; 18(3):443–52. doi: 10.1007/s00534-010-0349-2.
134. Li M-X, Bi X-Y, Li Z-Y, Huang Z, Han Y, Zhao J-J et al. Impaction of surgical margin status on the survival outcome after surgical resection of intrahepatic cholangiocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *J Surg Res* 2016; 203(1):163–73. doi: 10.1016/j.jss.2016.02.012.

135. Bartsch F, Heuft L-K, Baumgart J, Hoppe-Lotichius M, Margies R, Gerber TS et al. Influence of Lymphangio (L), Vascular (V), and Perineural (Pn) Invasion on Recurrence and Survival of Resected Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *J Clin Med* 2021; 10(11). doi: 10.3390/jcm10112426.
136. HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC). HGNC Database: European Molecular Biology Laboratory, European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) [Stand: 17.04.2023]. Verfügbar unter: www.genenames.org.
137. Farrera DO, Galligan JJ. The Human Glyoxalase Gene Family in Health and Disease. *Chem Res Toxicol* 2022; 35(10):1766–76. doi: 10.1021/acs.chemrestox.2c00182.
138. Dakin HD, Dudley HW. AN ENZYME CONCERNED WITH THE FORMATION OF HYDROXY ACIDS FROM KETONIC ALDEHYDES. *J Biol Chem* 1913; 14(2):155–7. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818886100>.
139. RACKER E. THE MECHANISM OF ACTION OF GLYOXALASE. *J Biol Chem* 1951; 190(2):685–96. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818560178>.
140. Thornalley PJ. The glyoxalase system in health and disease. *Mol Aspects Med* 1993; 14(4):287–371. doi: 10.1016/0098-2997(93)90002-u.
141. Yujiao He, Chunyan Zhou, Maolin Huang, Chunyan Tang, Xiao Liu, Yan Yue et al. Glyoxalase system: A systematic review of its biological activity, related-diseases, screening methods and small molecule regulators. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2020; 131:110663. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332220308568>.
142. Richard JP. Mechanism for the formation of methylglyoxal from triosephosphates. *Biochem Soc Trans* 1993; 21(2):549–53. doi: 10.1042/bst0210549.
143. Casazza JP, Felver ME, Veech RL. The metabolism of acetone in rat. *J Biol Chem* 1984; 259(1):231–6.
144. Thornalley PJ. Modification of the glyoxalase system in human red blood cells by glucose in vitro. *Biochem J* 1988; 254(3):751–5. doi: 10.1042/bj2540751.
145. Kang Y, Edwards LG, Thornalley PJ. Effect of methylglyoxal on human leukaemia 60 cell growth: modification of DNA G1 growth arrest and induction of apoptosis. *Leuk Res* 1996; 20(5):397–405. doi: 10.1016/0145-2126(95)00162-x.
146. Rabbani N, Thornalley PJ. Dicarbonyl proteome and genome damage in metabolic and vascular disease. *Biochem Soc Trans* 2014; 42(2):425–32. doi: 10.1042/BST20140018.
147. Rabbani N, Shaheen F, Anwar A, Masania J, Thornalley PJ. Assay of methylglyoxal-derived protein and nucleotide AGEs. *Biochem Soc Trans* 2014; 42(2):511–7. doi: 10.1042/BST20140019.
148. Murata-Kamiya N, Kamiya H, Kaji H, Kasai H. Methylglyoxal induces G:C to C:G and G:C to T:A transversions in the supF gene on a shuttle vector plasmid replicated in mammalian cells. *Mutat Res* 2000; 468(2):173–82. doi: 10.1016/s1383-5718(00)00044-9.
149. Xue J, Ray R, Singer D, Böhme D, Burz DS, Rai V et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) specifically recognizes methylglyoxal-derived AGEs. *Biochemistry* 2014; 53(20):3327–35. doi: 10.1021/bi500046t.
150. Waghela BN, Vaidya FU, Ranjan K, Chhipa AS, Tiwari BS, Pathak C. AGE-RAGE synergy influences programmed cell death signaling to promote cancer. *Mol Cell Biochem* 2021; 476(2):585–98. doi: 10.1007/s11010-020-03928-y.
151. Perrone A, Giovino A, Benny J, Martinelli F. Advanced Glycation End Products (AGEs): Biochemistry, Signaling, Analytical Methods, and Epigenetic Effects. *Oxid Med Cell Longev* 2020; 2020:3818196. doi: 10.1155/2020/3818196.

152. Milanese DM, Choudhury MS, Mallouh C, Tazaki H, Konno S. Methylglyoxal-induced apoptosis in human prostate carcinoma: potential modality for prostate cancer treatment. *Eur Urol* 2000; 37(6):728–34. doi: 10.1159/000020226.
153. Chan C-M, Huang D-Y, Huang Y-P, Hsu S-H, Kang L-Y, Shen C-M et al. Methylglyoxal induces cell death through endoplasmic reticulum stress-associated ROS production and mitochondrial dysfunction. *J Cell Mol Med* 2016; 20(9):1749–60. doi: 10.1111/jcmm.12893.
154. Loarca L, Sassi-Gaha S, Artlett CM. Two α -dicarbonyls downregulate migration, invasion, and adhesion of liver cancer cells in a p53-dependent manner. *Dig Liver Dis* 2013; 45(11):938–46. doi: 10.1016/j.dld.2013.05.005.
155. Nokin M-J, Bellier J, Durieux F, Peulen O, Rademaker G, Gabriel M et al. Methylglyoxal, a glycolysis metabolite, triggers metastasis through MEK/ERK/SMAD1 pathway activation in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2019; 21(1):11. doi: 10.1186/s13058-018-1095-7.
156. Chiavarina B, Nokin M-J, Bellier J, Durieux F, Bletard N, Sherer F et al. Methylglyoxal-Mediated Stress Correlates with High Metabolic Activity and Promotes Tumor Growth in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 2017; 18(1). doi: 10.3390/ijms18010213.
157. Antognelli C, Moretti S, Frosini R, Puxeddu E, Sidoni A, Talesa VN. Methylglyoxal Acts as a Tumor-Promoting Factor in Anaplastic Thyroid Cancer. *Cells* 2019; 8(6). doi: 10.3390/cells8060547.
158. Nokin M-J, Durieux F, Peixoto P, Chiavarina B, Peulen O, Blomme A et al. Methylglyoxal, a glycolysis side-product, induces Hsp90 glycation and YAP-mediated tumor growth and metastasis. *eLife* 2016; 5. doi: 10.7554/eLife.19375.
159. Park J, Kim JS, Nahm JH, Kim S-K, Lee D-H, Lim D-S. WWC1 and NF2 Prevent the Development of Intrahepatic Cholangiocarcinoma by Regulating YAP/TAZ Activity through LATS in Mice. *Mol Cells* 2020; 43(5):491–9. doi: 10.14348/molcells.2020.0093.
160. WARBURG O. The metabolism of tumours. Constable 1930. Verfügbar unter: <https://cir.nii.ac.jp/crid/1573950400488477824>.
161. Tian X, Wang Y, Ding X, Cheng W. High expression of GLO1 indicates unfavorable clinical outcomes in glioma patients. *J Neurosurg Sci* 2022; 66(3):228–33. doi: 10.23736/S0390-5616.19.04805-7.
162. Hu X, Yang X, He Q, Chen Q, Yu L. Glyoxalase 1 is up-regulated in hepatocellular carcinoma and is essential for HCC cell proliferation. *Biotechnol Lett* 2014; 36(2):257–63. doi: 10.1007/s10529-013-1372-6.
163. Zender L, Xue W, Zuber J, Semighini CP, Krasnitz A, Ma B et al. An oncogenomics-based in vivo RNAi screen identifies tumor suppressors in liver cancer. *Cell* 2008; 135(5):852–64. doi: 10.1016/j.cell.2008.09.061.
164. Alhujaily M, Abbas H, Xue M, La Fuente A de, Rabbani N, Thornalley PJ. Studies of Glyoxalase 1-Linked Multidrug Resistance Reveal Glycolysis-Derived Reactive Metabolite, Methylglyoxal, Is a Common Contributor in Cancer Chemotherapy Targeting the Spliceosome. *Front Oncol* 2021; 11:748698. doi: 10.3389/fonc.2021.748698.
165. Ranganathan S, Walsh ES, Tew KD. Glyoxalase I in detoxification: studies using a glyoxalase I transfectant cell line. *Biochem J* 1995; 309 (Pt 1)(Pt 1):127–31. doi: 10.1042/bj3090127.
166. Sakamoto H, Mashima T, Kizaki A, Dan S, Hashimoto Y, Naito M et al. Glyoxalase I is involved in resistance of human leukemia cells to antitumor agent-induced apoptosis. *Blood* 2000; 95(10):3214–8.
167. Thornalley PJ, Edwards LG, Kang Y, Wyatt C, Davies N, Ladan MJ et al. Antitumour activity of S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester in vitro and in vivo. Inhibition of

- glyoxalase I and induction of apoptosis. *Biochem Pharmacol* 1996; 51(10):1365–72. doi: 10.1016/0006-2952(96)00059-7.
168. Santel T, Pflug G, Hemdan NYA, Schäfer A, Hollenbach M, Buchold M et al. Curcumin inhibits glyoxalase 1: a possible link to its anti-inflammatory and anti-tumor activity. *PLoS One* 2008; 3(10):e3508. doi: 10.1371/journal.pone.0003508.
 169. Xue M, Weickert MO, Qureshi S, Kandala N-B, Anwar A, Waldron M et al. Improved Glycemic Control and Vascular Function in Overweight and Obese Subjects by Glyoxalase 1 Inducer Formulation. *Diabetes* 2016; 65(8):2282–94. doi: 10.2337/db16-0153.
 170. Ramaekers F, Huysmans A, Schaart G, Moesker O, Vooijs P. Tissue distribution of keratin 7 as monitored by a monoclonal antibody. *Exp Cell Res* 1987; 170(1):235–49. doi: 10.1016/0014-4827(87)90133-9.
 171. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; 31(1):11–24. doi: 10.1016/0092-8674(82)90400-7.
 172. Lazarides E. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 1980; 283(5744):249–56. doi: 10.1038/283249a0.
 173. Dum D, Menz A, Völkel C, Wispelaere N de, Hinsch A, Gorbokon N et al. Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in cancer: A tissue microarray study on 15,424 cancers. *Exp Mol Pathol* 2022; 126:104762. doi: 10.1016/j.yexmp.2022.104762.
 174. Cabibi D, Licata A, Barresi E, Craxi A, Aragona F. Expression of cytokeratin 7 and 20 in pathological conditions of the bile tract. *Pathol Res Pract* 2003; 199(2):65–70. doi: 10.1078/0344-0338-00356.
 175. Takahashi Y, Dungubat E, Kusano H, Ganbat D, Tomita Y, Odgerel S et al. Application of Immunohistochemistry in the Pathological Diagnosis of Liver Tumors. *Int J Mol Sci* 2021; 22(11). doi: 10.3390/ijms22115780.
 176. Rullier A, Le Bail B, Fawaz R, Blanc JF, Saric J, Bioulac-Sage P. Cytokeratin 7 and 20 expression in cholangiocarcinomas varies along the biliary tract but still differs from that in colorectal carcinoma metastasis. *Am J Surg Pathol* 2000; 24(6):870–6. doi: 10.1097/00000478-200006000-00014.
 177. Liu L-Z, Yang L-X, Zheng B-H, Dong P-P, Liu X-Y, Wang Z-C et al. CK7/CK19 index: A potential prognostic factor for postoperative intrahepatic cholangiocarcinoma patients. *J Surg Oncol* 2018; 117(7):1531–9. doi: 10.1002/jso.25027.
 178. Lang G. Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. 2., überarbeitete und aktualisierte Aufl. Wien: Springer; 2013. (SpringerLink Bücher).
 179. Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J* 2005; 46(3):258–68. doi: 10.1093/ilar.46.3.258.
 180. Nakane PK, Pierce GB. Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem* 1966; 14(12):929–31. doi: 10.1177/14.12.929.
 181. Hantschke M, Palmedo G. Immunhistologische Techniken. In: Cerroni L, Garbe C, Metze D, Kutzner H, Kerl H, Hrsg. *Histopathologie der Haut*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; Springer; 2019. S. 1–28 (Springer Reference Medizin).
 182. Taylor C RM. Immunohistochemical Staining Methods - Education Guidebook Sixth Edition; 6. September, 2021. Verfügbar unter: https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/08002_ihc_staining_methods.pdf.
 183. Dako Denmark A/S, An Agilent Technologies Company. EnVision™ FLEX+ system – Manual protocol: Dako Denmark A/S, An Agilent Technologies Company; 2011 [Stand:

07.08.2025]. Verfügbar unter: <https://kanidis.gr/wp-content/uploads/EnVision-FLEX-Systems-Manual-protocol.pdf>.

184. Verfahren der Immunlokalisation: Ein Überblick. Aufl. 2014. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden; 2014.
185. Remmele W, Stegner HE. Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. *Pathologe* 1987; 8(3):138–40.
186. BRESLOW N. A generalized Kruskal-Wallis test for comparing K samples subject to unequal patterns of censorship. *Biometrika* 1970; 57(3):579–94. doi: 10.1093/biomet/57.3.579.
187. Hazra A, Gogtay N. Biostatistics Series Module 9: Survival Analysis. *Indian J Dermatol* 2017; 62(3):251–7. doi: 10.4103/ijid.IJD_201_17.
188. Machin D, Cheung YB, Parmar MKB. *Survival Analysis: A practical approach*. 2nd ed. Chichester, England, Hoboken, NJ: Wiley; 2006. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/0470034572>.
189. 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. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 2007; 11(11):1488–96; discussion 1496–7. doi: 10.1007/s11605-007-0282-0.
190. Loosen SH, Vucur M, Trautwein C, Roderburg C, Luedde T. Circulating Biomarkers for Cholangiocarcinoma. *Dig Dis* 2018; 36(4):281–8. doi: 10.1159/000488342.
191. Distler MG, Palmer AA. Role of Glyoxalase 1 (Glo1) and methylglyoxal (MG) in behavior: recent advances and mechanistic insights. *Frontiers in Genetics* 2012; 3:250. doi: 10.3389/fgene.2012.00250.
192. van Heijst JWW, Niessen HWM, Musters RJ, van Hinsbergh VWM, Hoekman K, Schalkwijk CG. Argpyrimidine-modified Heat shock protein 27 in human non-small cell lung cancer: a possible mechanism for evasion of apoptosis. *Cancer Lett* 2006; 241(2):309–19. doi: 10.1016/j.canlet.2005.10.042.
193. Ilyas SI, Yamada D, Hirsova P, Bronk SF, Werneburg NW, Krishnan A et al. A Hippo and Fibroblast Growth Factor Receptor Autocrine Pathway in Cholangiocarcinoma. *J Biol Chem* 2016; 291(15):8031–47. doi: 10.1074/jbc.M115.698472.
194. Peter A, Schleicher E, Kliemank E, Szendroedi J, Königsrainer A, Häring H-U et al. Accumulation of Non-Pathological Liver Fat Is Associated with the Loss of Glyoxalase I Activity in Humans. *Metabolites* 2024; 14(4). doi: 10.3390/metabo14040209.
195. Peters AS, Hakimi M, Vittas S, Fleming TH, Nawroth PP, Böckler D et al. Gender difference in glyoxalase 1 activity of atherosclerotic carotid artery lesions. *J Vasc Surg* 2015; 62(2):471–6. doi: 10.1016/j.jvs.2014.02.058.
196. McLellan AC, Thornalley PJ, Benn J, Sonksen PH. Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clin Sci (Lond)* 1994; 87(1):21–9. doi: 10.1042/cs0870021.
197. Rauschert C, Möckl J, Seitz N-N, Wilms N, Olderbak S, Kraus L. The Use of Psychoactive Substances in Germany. *Dtsch Arztebl Int* 2022; 119(31-32):527–34. doi: 10.3238/arztebl.m2022.0244.
198. Ye X-H, Huai J-P, Ding J, Chen Y-P, Sun X-C. Smoking, alcohol consumption, and the risk of extrahepatic cholangiocarcinoma: A meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2013; 19(46):8780–8. doi: 10.3748/wjg.v19.i46.8780.
199. Schmidt C, Reitzle L, Dreß J, Rommel A, Ziese T, Heidemann C. Prävalenz und Inzidenz des dokumentierten Diabetes mellitus – Referenzauswertung für die Diabetes-Sur-

- veillance auf Basis von Daten aller gesetzlich Krankenversicherten. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 2020; 63(1):93–102. doi: 10.1007/s00103-019-03068-9.
200. Peng H-T, Chen J, Liu T-Y, Wu Y-Q, Lin X-H, Lai Y-H et al. Up-regulation of the tumor promoter Glyoxalase-1 indicates poor prognosis in breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2017; 10(11):10852–62.
 201. Scheifele C, Zhu Q, Ignatov A, Kalinski T, Nass N. Glyoxalase 1 expression analysis by immunohistochemistry in breast cancer. *Pathol Res Pract* 2020; 216(12):153257. doi: 10.1016/j.prp.2020.153257.
 202. Kreyacy N, Gotzian C, Fleming T, Flechtenmacher C, Grabe N, Plinkert P et al. Glyoxalase 1 expression is associated with an unfavorable prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2017; 17(1):382. doi: 10.1186/s12885-017-3367-5.
 203. Stroescu C, Herlea V, Dragnea A, Popescu I. The diagnostic value of cytokeratins and carcinoembryonic antigen immunostaining in differentiating hepatocellular carcinomas from intrahepatic cholangiocarcinomas. *J Gastrointest Liver Dis* 2006; 15(1):9–14.
 204. Fleming TH, Theilen T-M, Masania J, Wunderle M, Karimi J, Vittas S et al. Aging-dependent reduction in glyoxalase 1 delays wound healing. *Gerontology* 2013; 59(5):427–37. doi: 10.1159/000351628.
 205. Kuhla B, Boeck K, Lüth H-J, Schmidt A, Weigle B, Schmitz M et al. Age-dependent changes of glyoxalase I expression in human brain. *Neurobiol Aging* 2006; 27(6):815–22. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.04.006.
 206. Mailankot M, Padmanabha S, Pasupuleti N, Major D, Howell S, Nagaraj RH. Glyoxalase I activity and immunoreactivity in the aging human lens. *Biogerontology* 2009; 10(6):711–20. doi: 10.1007/s10522-009-9218-2.
 207. Patel AH, Harnois DM, Klee GG, LaRusso NF, Gores GJ. The utility of CA 19-9 in the diagnoses of cholangiocarcinoma in patients without primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(1):204–7. doi: 10.1111/j.1572-0241.2000.01685.x.
 208. Kim J-Y, Jung J-H, Jung S, Lee S, Lee HA, Ouh Y-T et al. Glyoxalase 1: Emerging biomarker and therapeutic target in cervical cancer progression. *PLoS One* 2024; 19(6):e0299345. doi: 10.1371/journal.pone.0299345.
 209. Wu J, Chen L, Wang Y, Tan W, Huang Z. Prognostic value of aspartate transaminase to alanine transaminase (De Ritis) ratio in solid tumors: a pooled analysis of 9,400 patients. *Onco Targets Ther* 2019; 12:5201–13. doi: 10.2147/OTT.S204403.
 210. Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ* 2005; 172(3):367–79. doi: 10.1503/cmaj.1040752.
 211. Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. II. Recommendations for use of laboratory tests in screening, diagnosis, and monitoring. *Clin Chem* 2000; 46(12):2050–68. doi: 10.1093/clinchem/46.12.2050.
 212. Crake R, Gasmi I, Dehaye J, Lardinois F, Peiffer R, Maloujahmoum N et al. Resistance to Gemcitabine in Pancreatic Cancer Is Connected to Methylglyoxal Stress and Heat Shock Response. *Cells* 2023; 12(10). doi: 10.3390/cells12101414.
 213. Sakellariou S, Fragkou P, Levidou G, Gargalionis AN, Piperi C, Dalagiorgou G et al. Clinical significance of AGE-RAGE axis in colorectal cancer: associations with glyoxalase-I, adiponectin receptor expression and prognosis. *BMC Cancer* 2016; 16:174. doi: 10.1186/s12885-016-2213-5.
 214. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 1995; 154(1):8–20. doi: 10.1159/000147748.

215. Antognelli C, Cecchetti R, Riuzzi F, Peirce MJ, Talesa VN. Glyoxalase 1 sustains the metastatic phenotype of prostate cancer cells via EMT control. *J Cell Mol Med* 2018; 22(5):2865–83. doi: 10.1111/jcmm.13581.
216. Zhang X, Zhou Y, Wu Z, Peng W, Li C, Yan L et al. Double-Negative α -Fetoprotein and Carbohydrate Antigen 19-9 Predict a Good Prognosis in Intrahepatic Cholangiocarcinoma: A Propensity Score Matching Analysis. *Clin Transl Gastroenterol* 2021; 12(11):e00425. doi: 10.14309/ctg.0000000000000425.
217. Nakadate Y, Mizuguchi C, Azuma M, Tachibana T. Generation of a rat monoclonal antibody specific for glyoxalase I. *Hybridoma (Larchmt)* 2009; 28(6):447–50. doi: 10.1089/hyb.2009.0048.
218. Zou X-Y, Ding D, Zhan N, Liu X-M, Pan C, Xia Y-M. Glyoxalase I is differentially expressed in cutaneous neoplasms and contributes to the progression of squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 2015; 135(2):589–98. doi: 10.1038/jid.2014.377.
219. Baunacke M, Horn L-C, Trettner S, Engel KMY, Hemdan NYA, Wiechmann V et al. Exploring glyoxalase 1 expression in prostate cancer tissues: targeting the enzyme by ethyl pyruvate defangs some malignancy-associated properties. *Prostate* 2014; 74(1):48–60. doi: 10.1002/pros.22728.
220. Wang Y, Kuramitsu Y, Tokuda K, Okada F, Baron B, Akada J et al. Proteomic analysis indicates that overexpression and nuclear translocation of lactoylglutathione lyase (GLO1) is associated with tumor progression in murine fibrosarcoma. *ELECTROPHORESIS* 2014; 35(15):2195–202. doi: 10.1002/elps.201300497.
221. Hollenbach M, Thonig A, Pohl S, Ripoll C, Michel M, Zipprich A. Expression of glyoxalase-I is reduced in cirrhotic livers: A possible mechanism in the development of cirrhosis. *PLoS One* 2017; 12(2):e0171260. doi: 10.1371/journal.pone.0171260.
222. Di Ilio C, Angelucci S, Pennelli A, Zezza A, Tenaglia R, Sacchetta P. Glyoxalase activities in tumor and non-tumor human urogenital tissues. *Cancer Lett* 1995; 96(2):189–93. doi: 10.1016/0304-3835(95)03928-p.
223. Kaibori M, Yoshii K, Kosaka H, Ota M, Komeda K, Ueno M et al. Preoperative Serum Markers and Risk Classification in Intrahepatic Cholangiocarcinoma: A Multicenter Retrospective Study. *Cancers (Basel)* 2022; 14(21). doi: 10.3390/cancers14215459.
224. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324(5930):1029–33. doi: 10.1126/science.1160809.
225. McGill MR. The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. *EXCLI J* 2016; 15:817–28. doi: 10.17179/excli2016-800.
226. Mukhopadhyay P, Eid N, Abdelmegeed MA, Sen A. Interplay of Oxidative Stress, Inflammation, and Autophagy: Their Role in Tissue Injury of the Heart, Liver, and Kidney. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 2018:2090813. doi: 10.1155/2018/2090813.

8. Anhang

8.1. TNM- und UICC-Klassifikationen:

8.1.1. Intrahepatische CCA:

TNM-Klassifikation der Karzinome der intrahepatischen Gallengänge (iCCA)		
T - Primärtumor	Tis	Carcinoma in situ (intraduktaler Tumor)
	T1a	Solitärer Tumor ≤ 5 cm in größter Ausdehnung ohne Gefäßinvasion
	T1b	Solitärer Tumor > 5 cm in größter Ausdehnung ohne Gefäßinvasion
	T2	Solitärer Tumor mit intrahepatischer Gefäßinvasion oder multiple Tumoren mit oder ohne Gefäßinvasion
	T3	Tumor(en) mit Perforation des viszerale Peritoneums
	T4	Tumor mit direkter Invasion extrahepatischer Strukturen
N- Regionale Lymphknoten	NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
	N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
	N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
M - Fernmetastasen	M0	Keine Fernmetastasen
	M1	Fernmetastasen

Tabelle A 1 : Einteilung der Karzinome der intrahepatischen Gallengänge nach 8. Version der TNM-Klassifikation, entnommen und grafisch abgewandelt aus: (18).

Stadieneinteilung nach UICC für Karzinome der intrahepatischen Gallengänge (iCCA)			
Stadium	T	N	M
I	T1	N0	M0
Ia	T1a	N0	M0
Ib	T1b	N0	M0
II	T2	N0	M0
IIIa	T3	N0	M0
IIIb	T4	N0	M0
	jedes T	N1	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle A 2: klinische UICC-Stadieneinteilung für die Karzinome der intrahepatischen Gallengänge. Entnommen und grafisch abgewandelt aus: (18).

8.1.2. Extrahepatische CCA (perihilär):

TNM-Klassifikation der Karzinome der perihilären Gallengänge (pCCA)		
T - Primärtumor	Tis	Carcinoma in situ
	T1	Tumor auf Gallengang beschränkt mit Ausdehnung bis in die muskuläre Wandschicht oder fibröse Schicht.
	T2a	Tumor infiltriert jenseits des Gallengangs in das benachbarte Weichgewebe
	T2b	Tumor infiltriert das benachbarte Leberparenchym
	T3	Tumor infiltriert unilaterale Äste der V. portae oder A. hepatica

	T4	Tumor infiltriert den Hauptast der V. portae oder bilaterale Äste; oder die A. hepatica communis oder Äste 2. Ordnung bilateral; oder unilaterale Äste 2. Ordnung des Gallengangs mit Infiltration von kontralateralen Ästen der V. portae oder A. hepatica
N- Regionale Lymphknoten	N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
	N1	Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten
	N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
M - Fernmetastasen	M0	Keine Fernmetastasen
	M1	Fernmetastasen

Tabelle A 3: Einteilung der Karzinome der perihilären Gallengänge nach 8. Version der TNM-Klassifikation, entnommen und grafisch abgewandelt aus: (18).

Stadieneinteilung nach UICC für Karzinome der perihilären Gallengänge (pCCA)			
Stadium	T	N	M
I	T1a	N0	M0
II	T2a, T2b	N0	M0
IIIa	T3	N0	M0
IIIb	T4	N0	M0
IIIc	Jedes T	N1	M0
Iva	Jedes T	N2	M0
IVb	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle A 4: klinische UICC-Stadieneinteilung für die Karzinome der perihilären Gallengänge. Entnommen und grafisch abgewandelt aus: (18).

8.1.3. Bismuth-Corlette Klassifikation für pCCA:

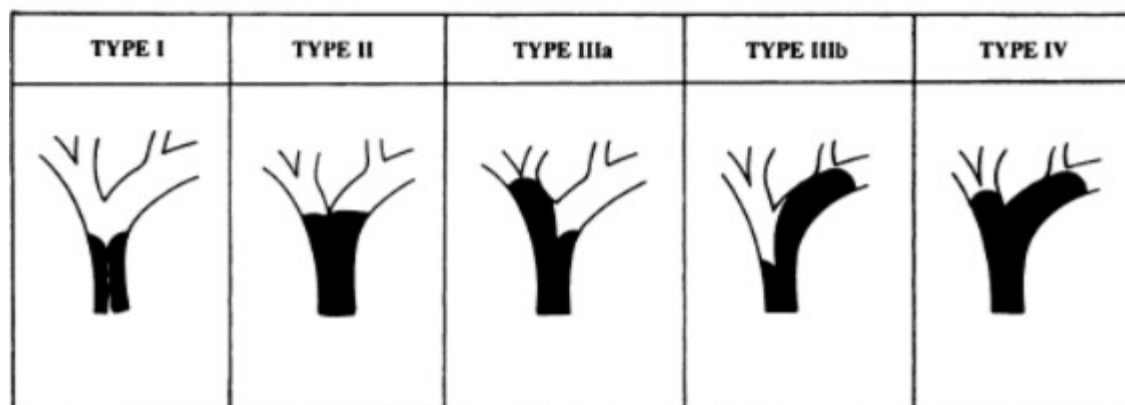


Abbildung A 1: Schematische Darstellung der Einteilung von pCCA nach Bismuth-Corlette. Entnommen aus (19).

Bismuth-Corlette Klassifikation der Karzinome der perihilären Gallengänge	
Typ I	Tumorbefall des Ductus hepaticus communis distal der Hepatikusgabel
Typ II	Tumorbefall der Hepatikusgabel
Typ IIIa	Tumorbefall der Hepatikusgabel mit Infiltration des rechten Hauptastes
Typ IIIb	Tumorbefall der Hepatikusgabel mit Infiltration des linken Hauptastes
Typ IV	Tumorbefall der Hepatikusgabel mit bilateralem Befall der Hauptäste

Tabelle A 5: Stadieneinteilung der Tumore der perihilären Gallenwege nach Bismuth-Corlette. Entnommen und grafisch abgewandelt aus: (19).

8.1.4. Extrahepatische CCA (distal):

TNM-Klassifikation der Karzinome der distalen extrahepatischen Gallengänge (dCCA)		
T - Primärtumor	Tis	Carcinoma in situ
	T1	Tumor infiltriert die Wand des Gallengangs ≤ 5 mm
	T2	Tumor infiltriert die Wand des Gallengangs 6-12 mm
	T3	Tumor infiltriert die Wand des Gallengangs >12 mm
	T4	Tumor infiltriert Truncus coeliacus, A. mesenterica sup. und/oder A. hepatica communis
N- Regionale Lymphknoten	N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
	N1	Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten
	N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
M - Fernmeta- stasen	M0	Keine Fernmetastasen
	M1	Fernmetastasen

Tabelle A 6: Einteilung der Karzinome der distalen extrahepatischen Gallengänge nach 8. Version der TNM-Klassifikation, entnommen und grafisch abgewandelt aus: (18).

Stadieneinteilung nach UICC für Karzinome der distalen extrahepatischen Gallengänge			
Stadium	T	N	M
Ia	T1	N0	M0
Ila	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Ilb	T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
IIla	T1, T2, T3	N2	M0
IIlb	T4	Jedes N	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle A 7: Klinische UICC-Stadieneinteilung für die Karzinome der distalen extrahepatischen Gallengänge. Entnommen und grafisch abgewandelt aus: (18).

8.1.5. Karzinome der Gallenblase und des Ductus cysticus:

TNM-Klassifikation der Karzinome Gallenblase und Ductus cysticus		
T - Primärtumor	Tis	Carcinoma in situ
	T1a	Tumor infiltriert Schleimhaut
	T1b	Tumor infiltriert muskuläre Wandschicht
	T2a	Tumor infiltriert perimuskuläres Bindegewebe auf der peritonealen Seite, aber keine Ausbreitung jenseits der Serosa
	T2b	Tumor infiltriert perimuskuläres Bindegewebe auf der Leberseite, aber keine Ausbreitung in die Leber
	T3	Tumor perforiert Serosa (viszerales Peritoneum) und/oder infiltriert direkt die Leber und/oder ein(e) Nachbarorgan/-struktur, z.B. Magen, Duodenum, Kolon, Pankreas, Netz, extrahepatische Gallengänge
	T4	Tumor infiltriert Stamm der V. portae oder A. hepatica oder infiltriert 2 oder mehr Nachbarorgane/-strukturen.
N- Regionale Lymphknoten	N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
	N1	Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten
	N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
M - Fernmetastasen	M0	Keine Fernmetastasen
	M1	Fernmetastasen

Tabelle A 8: Einteilung der Karzinome der Gallenblase und des Ductus cysticus nach 8. Version der TNM-Klassifikation, entnommen und grafisch abgewandelt aus: (18).

Stadieneinteilung nach UICC für Karzinome der Gallenblase und des Ductus cysticus			
Stadium	T	N	M
Ia	T1a	N0	M0
Ib	T1b	N0	M0
IIa	T2a	N0	M0
IIb	T2b	N0	M0
IIIa	T3	N0	M0
IIIb	T1, T2, T3	N1	M0
IVa	T4	N0, N1	M0
IVb	Jedes T	N2	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle A 9: Klinische UICC-Stadieneinteilung für die Karzinome der Gallenblase und des Ductus cysticus. Entnommen und grafisch abgewandelt aus: (18).

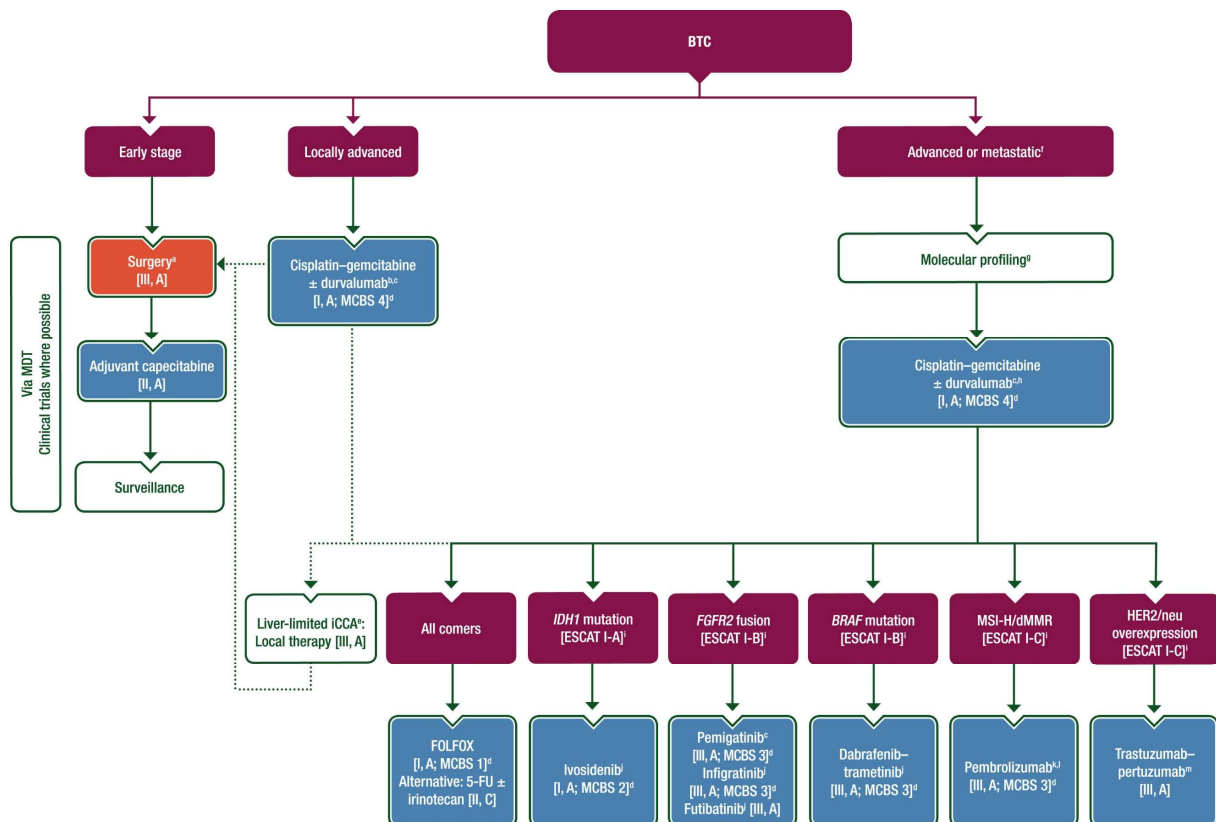


Abbildung A 2: Behandlungsalgorithmus für Maligne Biliäre Tumore der ESMO. violett: generelle Kategorien; orange: chirurgische Therapie; blau: systemische Therapie; weiß: andere Aspekte des Patientenmanagements. 5-FU: 5-Fluoruracil; BTC: biliary tract cancer; MSI-H: hohe Mikrosatteliteninstabilität; c: EMA und FDA zugelassen. Entnommen aus: (72).

8.2. Kreuztabellen

8.2.1. Kreuztabellen Gesamtkollektiv:

A	GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv
männlich	Anzahl	44	76
	%	36,7%	63,3%
weiblich	Anzahl	28	81
	%	25,7%	74,3%
Gesamt	Anzahl	72	157
	%	31,4%	68,6%

Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,088

B	GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv
Tis/T1/T2	Anzahl	52	103
	%	33,5%	66,5%
T2/T3	Anzahl	20	53
	%	27,4%	72,6%
Gesamt	Anzahl	72	156
	%	31,6%	68,4%

C	GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv
N0	Anzahl	40	96
	%	29,4%	70,6%
N1-2	Anzahl	28	48
	%	36,8%	63,2%
Gesamt	Anzahl	68	144
	%	32,1%	67,9%

Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,285

D	GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv
M0	Anzahl	61	124
	%	33,0%	67,0%
M1	Anzahl	4	15
	%	21,1%	78,9%
Gesamt	Anzahl	65	139
	%	31,9%	68,1%

Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,438

E	GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv
UICC: Tis, 1,2,2a,2b	Anzahl	32	68
	%	32,0%	68,0%
UICC: 3,3a,3b,3c 4,4a,4b	Anzahl	35	77
	%	31,3%	68,8%
Gesamt	Anzahl	67	145
	%	31,6%	68,4%

Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 1,000

F	GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv
eCCA	Anzahl	19	50
	%	27,5%	72,5%
iCCA	Anzahl	52	103
	%	33,5%	66,5%
GB	Anzahl	1	4
	%	20,0%	80,0%
Gesamt	Anzahl	72	157
	%	31,4%	68,6%

G	GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv
kein RF	Anzahl	56	118
	%	32,2%	67,8%
mind. 1RF	Anzahl	16	38
	%	29,6%	70,4%
Gesamt	Anzahl	72	156
	%	31,6%	68,4%

Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,867

H	GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv
CA19-9 < 37	Anzahl	16	35
	%	31,4%	68,6%
CA19-9 ≥ 37	Anzahl	33	49
	%	40,2%	59,8%
Gesamt	Anzahl	49	84
	%	36,8%	63,2%

Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,357

		GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv	
I	GPT Anzahl	32	67	99
	norm. %	32,3%	67,7%	100,0%
	GPT Anzahl	35	58	93
	erhöht %	37,6%	62,4%	100,0%
	Gesamt Anzahl	67	125	192
	%	34,9%	65,1%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,453				

		GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv	
J	GOT Anzahl	24	43	67
	norm. %	35,8%	64,2%	100,0%
	GOT Anzahl	43	82	125
	erhöht %	34,4%	65,6%	100,0%
	Gesamt Anzahl	67	125	192
	%	34,9%	65,1%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,875				

		GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv	
K	Bilirubin Anzahl	41	84	125
	<1,2 %	32,8%	67,2%	100,0%
	Bilirubin Anzahl	26	41	67
	>1,2 %	38,8%	61,2%	100,0%
	Gesamt Anzahl	67	125	192
	%	34,9%	65,1%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,430				

		GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv	
L	De-Ritis Anzahl	35	59	94
	<1 %	37,2%	62,8%	100,0%
	De-Ritis Anzahl	32	66	98
	>=1 %	32,7%	67,3%	100,0%
	Gesamt Anzahl	67	125	192
	%	34,9%	65,1%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,546				

		GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv	
M	Albumin Anzahl	32	49	81
	norm. %	39,5%	60,5%	100,0%
	Albumin Anzahl	31	60	91
	erniedr. %	34,1%	65,9%	100,0%
	Gesamt Anzahl	63	109	172
	%	36,6%	63,4%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,527				

		GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv	
N	Alter Anzahl	29	56	85
	1.Terzile %	34,1%	65,9%	100,0%
	Alter Anzahl	20	51	71
	2.Terzile %	28,2%	71,8%	100,0%
	Alter Anzahl	23	50	73
	3.Terzile %	31,5%	68,5%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,741				

		GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv	
O	CK7 Anzahl	14	23	37
	positiv %	37,8%	62,2%	100,0%
	CK7 Anzahl	58	134	192
	negativ %	30,2%	69,8%	100,0%
	Gesamt Anzahl	72	157	229
	%	31,4%	68,6%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,439				

		GLO1-Expression		Gesamt
		leicht	stark	
P	männlich Anzahl	32	44	76
	%	42,1%	57,9%	100,0%
	weiblich Anzahl	34	47	81
	%	42,0%	58,0%	100,0%
	Gesamt Anzahl	66	91	157
	%	42,0%	58,0%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 1				

Tabelle A 10: Kreuztabellen A-P: Kreuztabellen für die jeweils in der ersten Spalte eingetragenen Parameter im Gesamtkollektiv. Die jeweils letzte Zeile der Tabelle beinhaltet den jeweiligen p-Wert des zweiseitigen exakten Tests nach Fisher. A: Geschlecht, B: T-Stadium, C: N-Stadium, D: M-Stadium, E: UICC-Stadium, F: Tumorlokalisation, G: Risikofaktoren (RF), H: CA19-9 Expressionsstatus, I: GPT, J: GOT, K: Bilirubin, L: De-Ritis-Quotient, M: Albumin im Serum, N: Alter bei ED (in Terzilen), O: CK7 Expressionsstatus, A-O wurden auf ihren GLO1-Expressionsstatus hin getestet, P zeigt die Verteilung der GLO1-Expressionsstärke (leicht vs. mittel und stark) und beinhaltet lediglich die positiven GLO1 Präparate.

8.2.2. Kreuztabellen in den Unterkollektiven

8.2.2.1. iCCA:

A	GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv
männlich	Anzahl	31	39
	%	44,3%	55,7%
weiblich	Anzahl	21	64
	%	24,7%	75,3%
Gesamt	Anzahl	52	103
	%	33,5%	66,5%

Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,016

B	GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv
Tis/T1/T2	Anzahl	35	72
	%	32,7%	67,3%
T2/T3	Anzahl	17	30
	%	36,2%	63,8%
Gesamt	Anzahl	52	102
	%	33,8%	66,2%

Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,713

C	GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv
N0	Anzahl	27	65
	%	29,3%	70,7%
N1-2	Anzahl	21	27
	%	43,8%	56,3%
Gesamt	Anzahl	48	92
	%	34,3%	65,7%

Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,095

D	GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv
M0	Anzahl	45	85
	%	34,6%	65,4%
M1	Anzahl	3	11
	%	21,4%	78,6%
Gesamt	Anzahl	48	96
	%	33,3%	66,7%

Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,386

E	GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv
UICC: Tis, 1,2,2a,2b	Anzahl	23	47
	%	32,9%	67,1%
UICC: 3,3a,3b,3c 4,4a,4b	Anzahl	25	45
	%	35,7%	64,3%
Gesamt	Anzahl	48	92
	%	34,3%	65,7%

Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,859

F	GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv
Alter 1. Terzile	Anzahl	21	34
	%	38,2%	61,8%
Alter 2. Terzile	Anzahl	14	36
	%	28,0%	72,0%
Alter 3. Terzile	Anzahl	17	33
	%	34,0%	66,0%
Gesamt	Anzahl	52	103
	%	33,5%	66,5%

Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,553

G	GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv
kein RF	Anzahl	39	73
	%	34,8%	65,2%
mind. 1RF	Anzahl	13	29
	%	31,0%	69,0%
Gesamt	Anzahl	52	102
	%	33,8%	66,2%

Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,705

H	GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv
CA19-9 < 37	Anzahl	11	28
	%	28,2%	71,8%
CA19-9 ≥ 37	Anzahl	22	20
	%	52,4%	47,6%
Gesamt	Anzahl	33	48
	%	40,7%	59,3%

Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,041

		GLO1-Expression		Gesamt	
		negativ	positiv		
I	GPT	Anzahl	30	59	89
	norm.	%	33,7%	66,3%	100,0%
	GPT	Anzahl	19	23	42
	erhöht	%	45,2%	54,8%	100,0%
	Gesamt	Anzahl	49	82	131
		%	37,4%	62,6%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,247					

J	GLO1-Expression			Gesamt
		negativ	positiv	
GOT	Anzahl	22	38	60
norm.	%	36,7%	63,3%	100,0%
GOT	Anzahl	27	44	71
erhöht	%	38,0%	62,0%	100,0%
Gesamt	Anzahl	49	82	131
	%	37,4%	62,6%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 1				

K		GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv	
Bilirubin	Anzahl	37	69	106
<1,2	%	34,9%	65,1%	100,0%
Bilirubin	Anzahl	12	13	25
>1,2	%	48,0%	52,0%	100,0%
Gesamt	Anzahl	49	82	131
	%	37,4%	62,6%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,255				

L		GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv	
De-Ritis	Anzahl	20	28	48
<1	%	41,7%	58,3%	100,0%
De-Ritis	Anzahl	29	54	83
>=1	%	34,9%	65,1%	100,0%
Gesamt	Anzahl	49	82	131
	%	37,4%	62,6%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,459				

		GLO1-Expression		Gesamt
M		negativ	positiv	
Albumin	Anzahl	21	26	47
norm.	%	44,7%	55,3%	100,0%
Albumin	Anzahl	24	41	65
erniedr.	%	36,9%	63,1%	100,0%
Gesamt	Anzahl	45	67	112
	%	40,2%	59,8%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0.440				

N		GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv	
Anämie	Anzahl	12	11	23
	%	52,2%	47,8%	100,0%
Keine Anämie	Anzahl	36	71	107
	%	33,6%	66,4%	100,0%
Gesamt	Anzahl	48	82	130
	%	36,9%	63,1%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0.103				

O		GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv	
CK7	Anzahl	10	17	27
positiv	%	37,0%	63,0%	100,0%
CK7	Anzahl	42	86	128
negativ	%	32,8%	67,2%	100,0%
Gesamt	Anzahl	52	103	155
	%	33,5%	66,5%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,661				

P		GLO1-Expression		Gesamt
		leicht	stark	
männlich	Anzahl	8	31	39
	%	20,5%	79,5%	100,0%
weiblich	Anzahl	29	35	64
	%	45,3%	54,7%	100,0%
Gesamt	Anzahl	37	66	103
	%	35,9%	64,1%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,012				

Tabelle A 11: Kreuztabellen A-P: Kreuztabellen für die jeweils in der ersten Spalte eingetragenen Parameter bei iCCA. Die jeweils letzte Zeile der Tabelle beinhaltet den jeweiligen p-Wert des zweiseitigen exakten Tests nach Fisher. A: Geschlecht, B: T-Stadium, C: N-Stadium, D: M-Stadium, E: UICC-Stadium, F: Alter nach Terzilen aufgeteilt G: Risikofaktoren (RF), H: CA19-9 Expressionsstatus, I: GPT, J: GOT, K: Bilirubin, L: De-Ritis-Quotient, M: Albumin im Serum, N: Hb im Serum (Anämie/keine Anämie), O: CK7 Expressionsstatus, A-O wurden auf ihren GLO1-Expressionsstatus hin getestet, P zeigt die Verteilung der GLO1-Expressionsstärke (leicht vs. mittel und stark) und beinhaltet lediglich die positiven GLO1 Präparate.

8.2.2.2. eCCA:

		GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv	
A	männlich Anzahl	13	35	48
	%	27,1%	72,9%	100,0%
weiblich	Anzahl	6	15	21
	%	28,6%	71,4%	100,0%
Gesamt	Anzahl	19	50	69
	%	27,5%	72,5%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 1				

		GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv	
B	Tis/T1/Anzahl	17	29	46
	T2 %	37,0%	63,0%	100,0%
T2/T3	Anzahl	2	21	23
	%	8,7%	91,3%	100,0%
Gesamt	Anzahl	19	50	69
	%	27,5%	72,5%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,021				

		GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv	
C	N0 Anzahl	12	29	41
	%	29,3%	70,7%	100,0%
N1-2	Anzahl	7	19	26
	%	26,9%	73,1%	100,0%
Gesamt	Anzahl	19	48	67
	%	28,4%	71,6%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 1				

		GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv	
D	M0 Anzahl	15	37	52
	%	28,8%	71,2%	100,0%
M1	Anzahl	1	3	4
	%	25,0%	75,0%	100,0%
Gesamt	Anzahl	16	40	56
	%	28,6%	71,4%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 1				

		GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv	
E	UICC: Anzahl	9	20	29
	Tis, %	31,0%	69,0%	100,0%
1,2,2a,2b	Anzahl	9	29	38
	%	23,7%	76,3%	100,0%
3,3a,3b,3c	Anzahl	18	49	67
	%	26,9%	73,1%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,583				

		GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv	
F	Alter Anzahl	8	20	28
	1.Terzile %	28,6%	71,4%	100,0%
Alter	Anzahl	6	14	20
	2.Terzile %	30,0%	70,0%	100,0%
Alter	Anzahl	5	16	21
	3.Terzile %	23,8%	76,2%	100,0%
Gesamt	Anzahl	19	50	69
	%	27,5%	72,5%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,890				

		GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv	
G	kein RF Anzahl	17	41	58
	%	29,3%	70,7%	100,0%
mind.	Anzahl	2	9	11
	%	18,2%	81,8%	100,0%
1RF	Anzahl	19	50	69
	%	27,5%	72,5%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,715				

		GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv	
H	CA19-9 Anzahl	5	6	11
	< 37 %	45,5%	54,5%	100,0%
CA19-9	Anzahl	10	28	38
	>= 37 %	26,3%	73,7%	100,0%
Gesamt	Anzahl	15	34	49
	%	30,6%	69,4%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,275				

		GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv	
I	GPT Anzahl	1	7	8
	norm. %	12,5%	87,5%	100,0%
GPT erhöht	Anzahl	16	33	49
	%	32,7%	67,3%	100,0%
Gesamt	Anzahl	17	40	57
	%	29,8%	70,2%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,413				

		GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv	
J	GOT Anzahl	1	4	5
	norm. %	20,0%	80,0%	100,0%
GOT erhöht	Anzahl	16	36	52
	%	30,8%	69,2%	100,0%
Gesamt	Anzahl	17	40	57
	%	29,8%	70,2%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 1				

		GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv	
K	Bilirubin Anzahl	4	12	16
	<1,2 %	25,0%	75,0%	100,0%
Bilirubin >1,2	Anzahl	13	28	41
	%	31,7%	68,3%	100,0%
Gesamt	Anzahl	17	40	57
	%	29,8%	70,2%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,753				

		GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv	
L	De-Ritis Anzahl	14	30	44
	<1 %	31,8%	68,2%	100,0%
De-Ritis >=1	Anzahl	3	10	13
	%	23,1%	76,9%	100,0%
Gesamt	Anzahl	17	40	57
	%	29,8%	70,2%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,734				

		GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv	
M	Albumin Anzahl	11	21	32
	norm. %	34,4%	65,6%	100,0%
Albumin erniedr.	Anzahl	6	18	24
	%	25,0%	75,0%	100,0%
Gesamt	Anzahl	17	39	56
	%	30,4%	69,6%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,562				

		GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv	
N	Bismuth Anzahl	4	21	25
	I-IIIb %	16,0%	84,0%	100,0%
Bismuth IV	Anzahl	13	20	33
	%	39,4%	60,6%	100,0%
Gesamt	Anzahl	17	41	58
	%	29,3%	70,7%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,080				

		GLO1-Expression		Gesamt
		negativ	positiv	
O	CK7 Anzahl	3	6	9
	positiv %	33,3%	66,7%	100,0%
CK7 negativ	Anzahl	16	44	60
	%	26,7%	73,3%	100,0%
Gesamt	Anzahl	19	50	69
	%	27,5%	72,5%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,699				

		GLO1-Expression		Gesamt
		leicht	stark	
P	männlich Anzahl	23	12	35
	%	65,7%	34,3%	100,0%
weiblich	Anzahl	4	11	15
	%	26,7%	73,3%	100,0%
Gesamt	Anzahl	27	23	50
	%	54,0%	46,0%	100,0%
Exakter Test nach Fisher (zweiseitig): 0,015				

Ta-

belle A 12:Kreuztabellen A-P: Kreuztabellen für die jeweils in der ersten Spalte eingetragenen Parameter bei eCCA. Die jeweils letzte Zeile der Tabelle beinhaltet den jeweiligen p-Wert des zweiseitigen exakten Tests nach Fisher. A: Geschlecht, B: T-Stadium, C: N-Stadium, D: M-Stadium, E: UICC-Stadium, F: Alter nach Terzilen aufgeteilt G: Risikofaktoren (RF), H: CA19-9 Expressionsstatus, I: GPT, J: GOT, K: Bilirubin, L: De-Ritis-Quotient, M: Albumin im Serum, N: Bismuth Stadium des Tumors, O: CK7 Expressionsstatus, A-O wurden auf ihren GLO1-Expressionsstatus hin getestet, P zeigt die Verteilung der GLO1-Expressionsstärke (leicht vs. mittel und stark) und beinhaltet lediglich die positiven GLO1 Präparate.

8.3. Überlebenszeitanalysen:

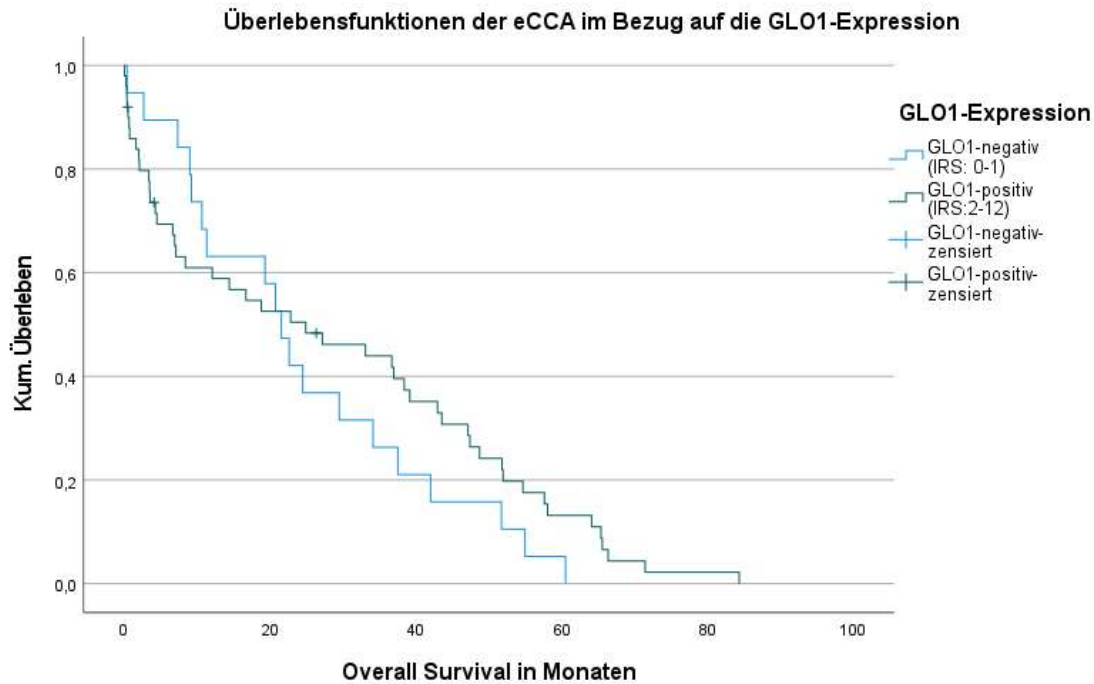


Abbildung A 3: Kaplan-Meier-Kurve zum Gesamtüberleben im Unterkollektiv der eCCA. Gezeigt ist das OS in Monaten (x-Achse) und die kumulative Überlebensrate (y-Achse) unter negativer (blau) und positiver (grün) GLO1-Expression. Log-Rank-Test: $p = 0,316$.

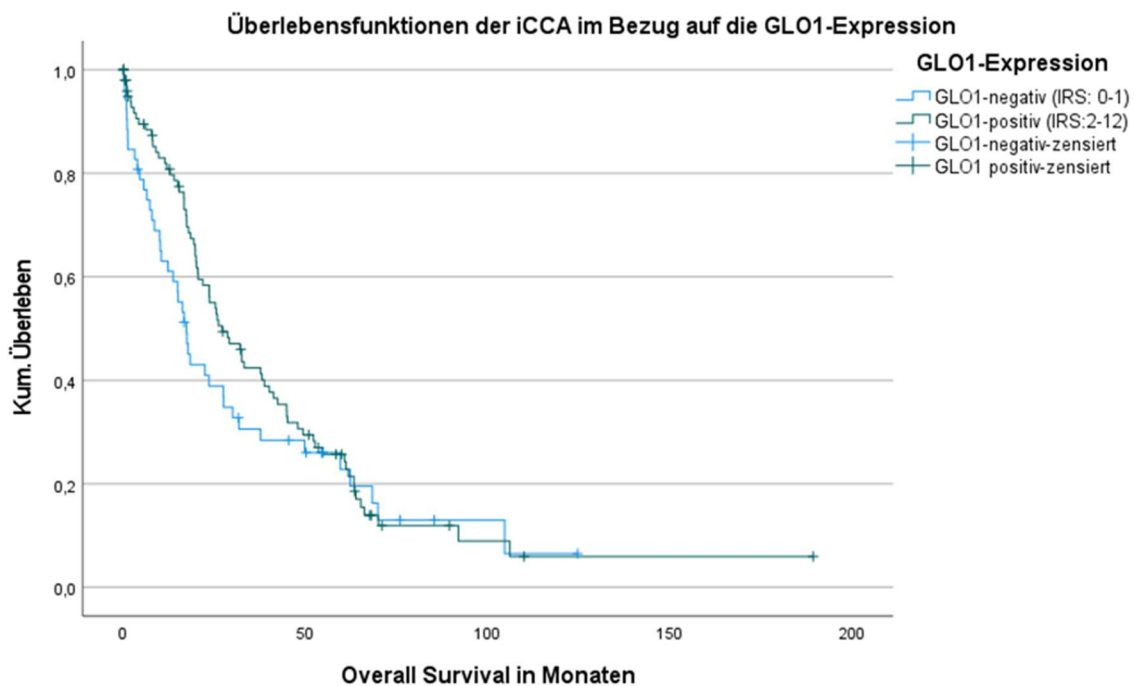


Abbildung A 4: Kaplan-Meier-Kurve zum Gesamtüberleben im Unterkollektiv der iCCA. Gezeigt ist das OS in Monaten (x-Achse) und die kumulative Überlebensrate (y-Achse) unter negativer (blau) und positiver (grün) GLO1-Expression. Log-Rank-Test: $p = 0,246$.

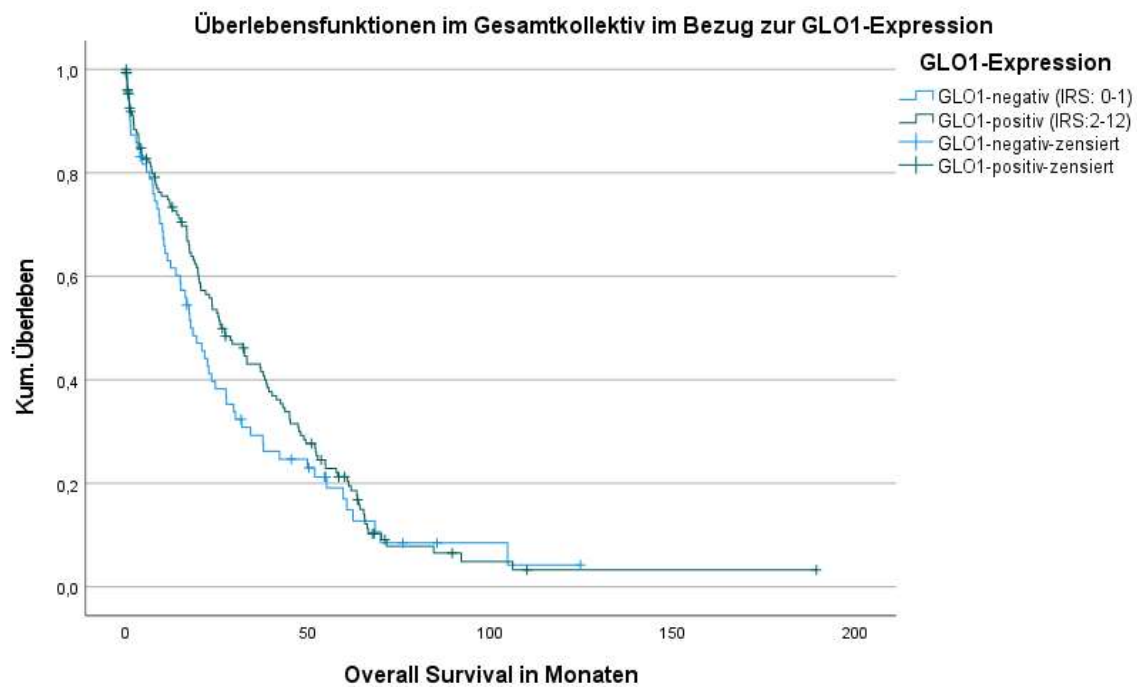


Abbildung A 5: Kaplan-Meier-Kurve zum Gesamtüberleben im Gesamtkollektiv. Gezeigt ist das OS in Monaten (x-Achse) und die kumulative Überlebensrate (y-Achse) unter negativer (blau) und positiver (grün) GLO1-Expression. Log-Rank-Test: $p = 0,266$.

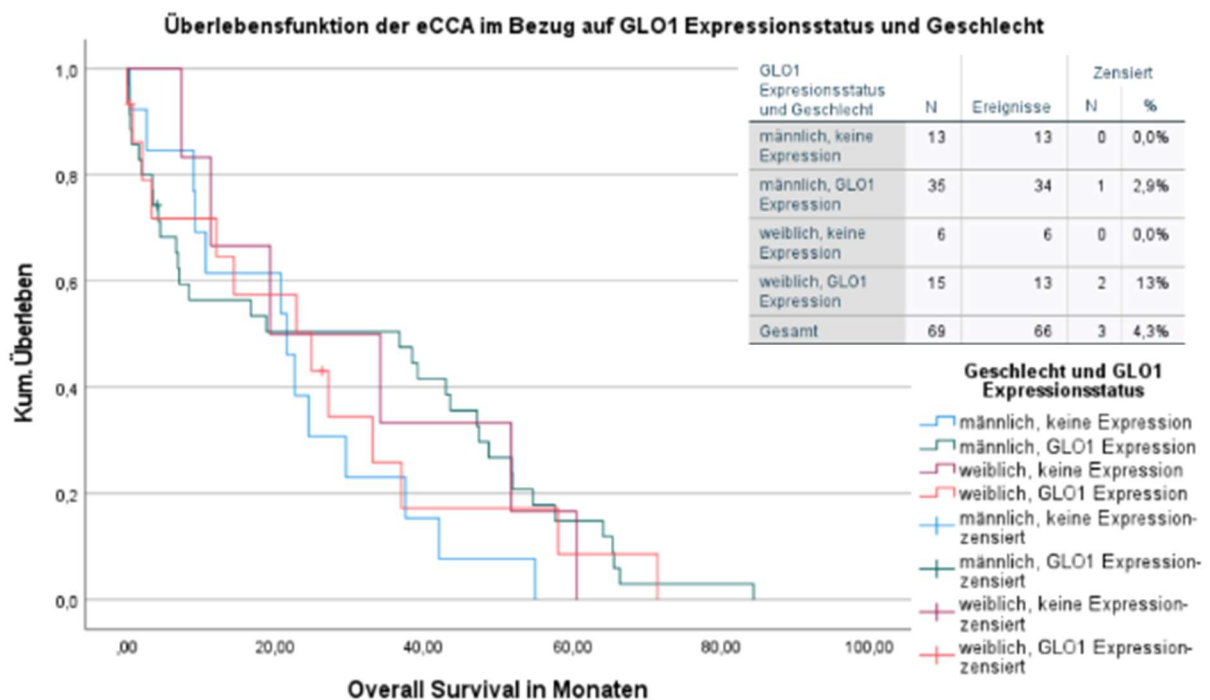


Abbildung A 6: Kaplan Meier-Kurve samt Falltabelle im Bezug zur GLO1 Expressionsstatus und Geschlecht bei eCCA. Medianes OS männlicher GLO1-negativer Personen: 21,552 (95% KI: 7,509 – 35,596), medianes OS männlicher GLO1-positiver Personen: 36,698 (95% KI: 0,000 – 79,022). Medianes OS weiblicher GLO1-negativer Personen: 19,318 (95% KI: 0,000 – 46,685), medianes OS weiblicher GLO1-positiver Personen: 24,903 (95% KI: 5,959 – 43,848). Log-Rank-Test: $p = 0,586$.

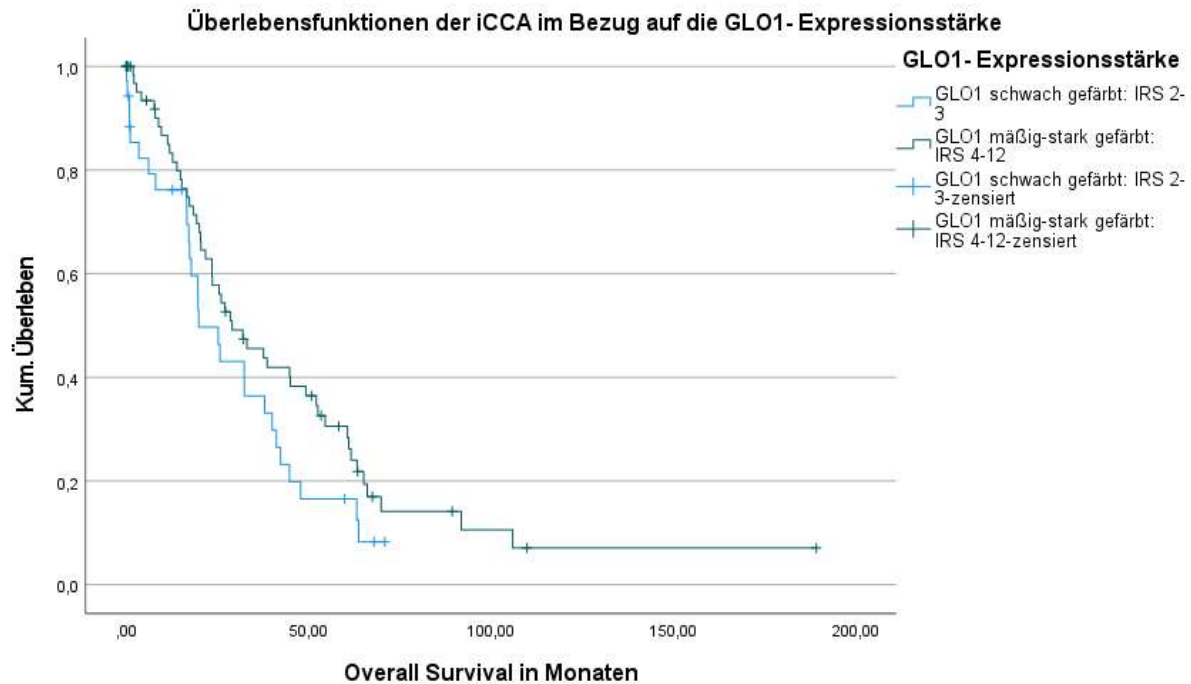


Abbildung A 7: Kaplan Meier-Kurve im Bezug zur GLO1 Expressionsstärke bei iCCA. Medianes OS der schwach gefärbten Präparate: 19,910 (95% KI: 11,897 – 27,922), Medianes OS der stark gefärbten Präparate: 29,076 (95% KI: 16,456 – 41,695). Log-Rank-Test: $p=0,109$.

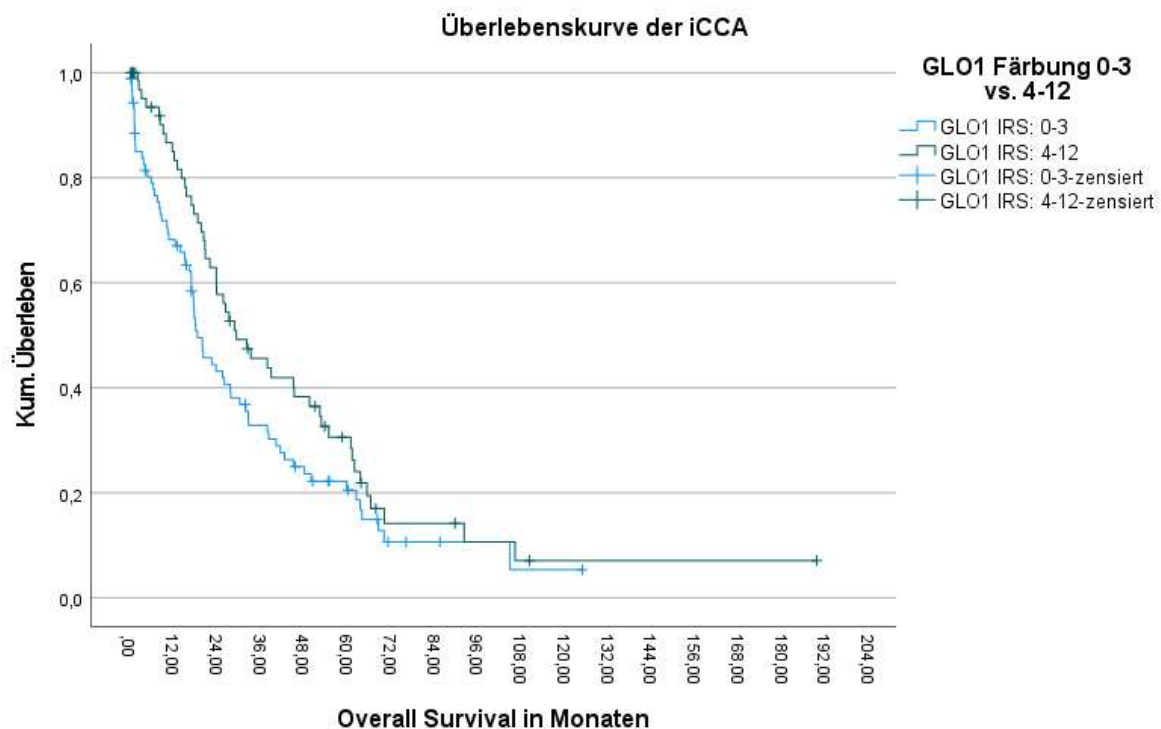


Abbildung A 8: Kaplan Meier-Kurve im Bezug zur GLO1 Expressionsstärke IRS 0-3 vs. 4-12 bei iCCA. Medianes OS 18,33 Monate bei einem IRS ≤ 3 (95% KI: 13,571- 23,094) und 29,08 Monate bei IRS ≥ 4 (95% KI: 16,456- 41,695). Log-Rank-Test: $p=0,069$, Breslow-Test: $p=0,011$.

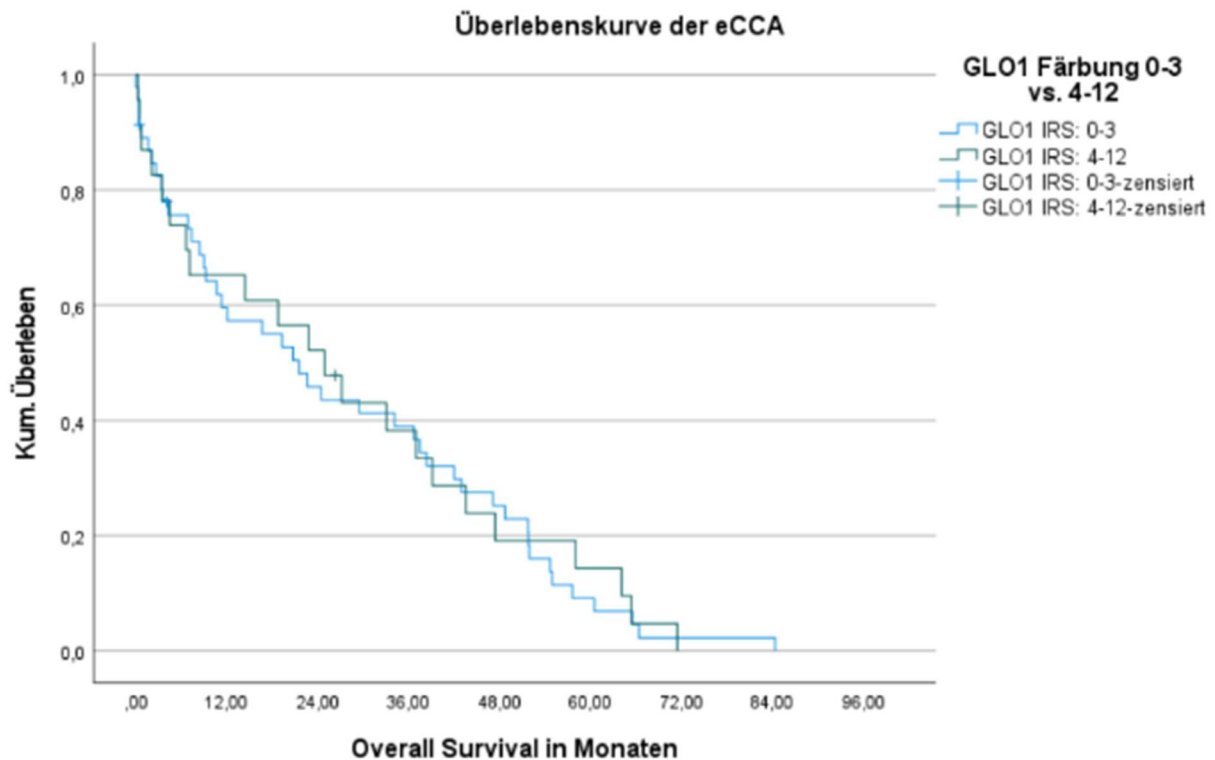


Abbildung A 9: Kaplan Meier-Kurve im Bezug zur GLO1 Expressionsstärke IRS 0-3 vs. 4-12 bei eCCA. Medianes OS 21,55 Monate bei einem IRS ≤ 3 (95% KI: 11,528-31,577) und 24,9 Monate bei IRS ≥ 4 (95% KI: 12,214 -37,593). Log-Rank-Test: $p=0,861$.

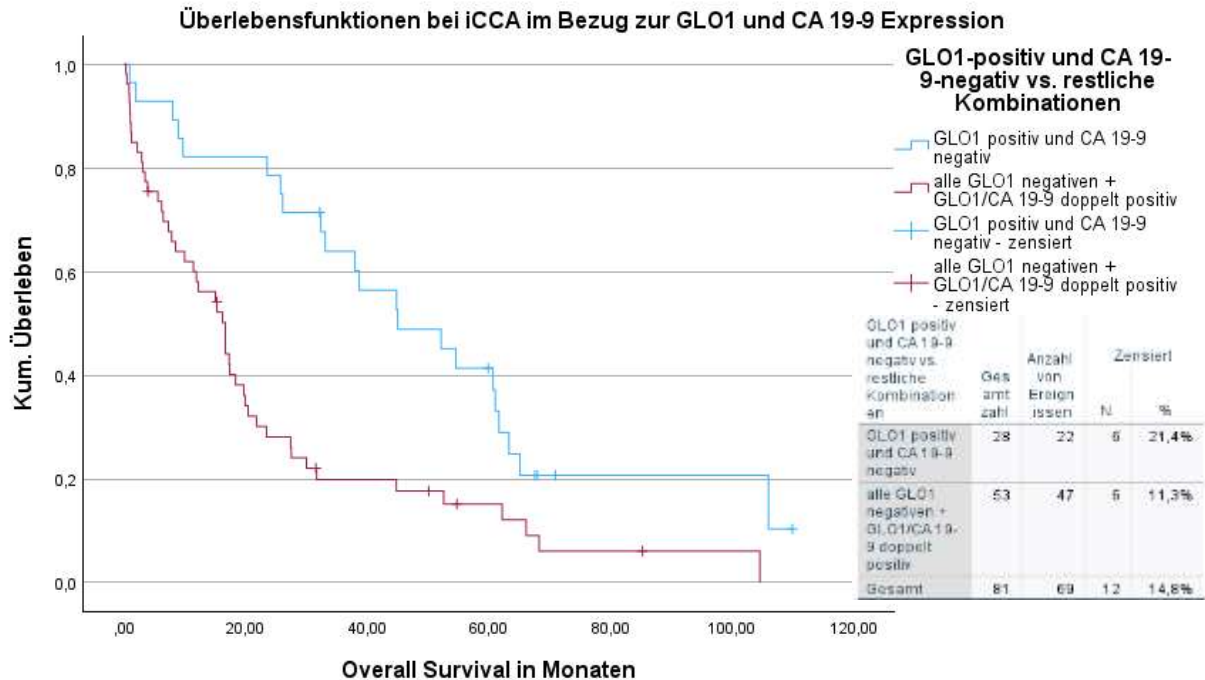


Abbildung A 10: Kaplan Meier-Kurve sowie Zusammenfassung der Fälle im Bezug zur kombinierten Betrachtung von GLO1 und CA 19-9 Expression bei iCCA. Medianes OS gesamt: 20,4 Monate (95% KI: 12,3 – 28,5), medianes OS CA 19-9-negativer

und GLO1-positiver Personen: 45 Monate (95% KI: 25,1 – 64,9). Medianes OS restlicher Personen (GLO1/CA19-9 negativ, GLO1 negativ/ CA19-9 positiv, GLO1/CA19-9 positiv): 16,7 Monate (95% KI: 11,6 – 21,7). Log-Rank-Test: $p = <0,001$.

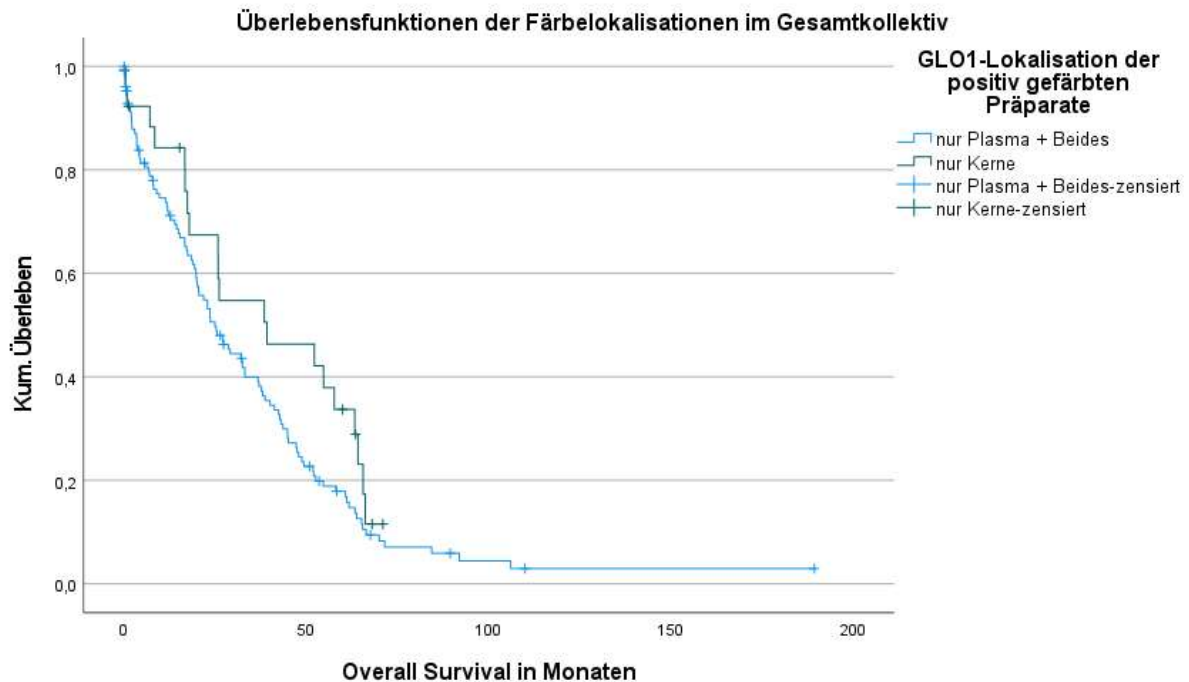


Abbildung A 11: Kaplan-Meier-Kurve im Bezug zur Färbelocalisation im Gesamtkollektiv. Log-Rank-Test: $p = 0,126$, Breslow-Test: $p = 0,109$.

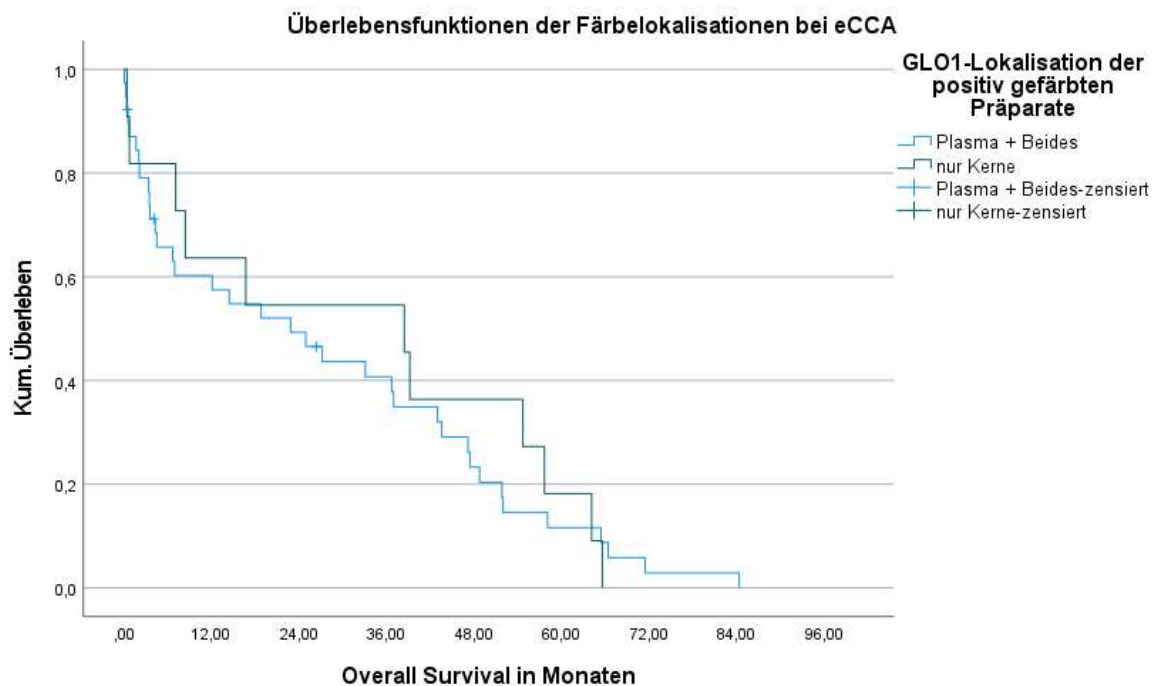


Abbildung A 12: Kaplan Meier-Kurve im Bezug zur GLO1-Lokalisation bei eCCA. Medianes OS der Kernfärbung: 38,407 (95% KI: 5,227 – 71,586), Medianes OS der restlichen Färbelocalisationen: 24,903 (95% KI: 5,344 – 40,323). Log-Rank-Test: $p = 0,743$.



Abbildung A 13: Kaplan Meier-Kurve im Bezug zum CK7 Expressionsstatus im Gesamtkollektiv. Medianes OS: 23,4 Monate (95% KI: 19,2 – 27,9), medianes OS der CK7 negativen: 29 Monate (95% KI: 17,2 – 40,9), medianes OS der CK7-positiven: 22,6 Monate (95% KI: 18,4 – 26,8), Log-Rank-Test: $p = 0,35$.

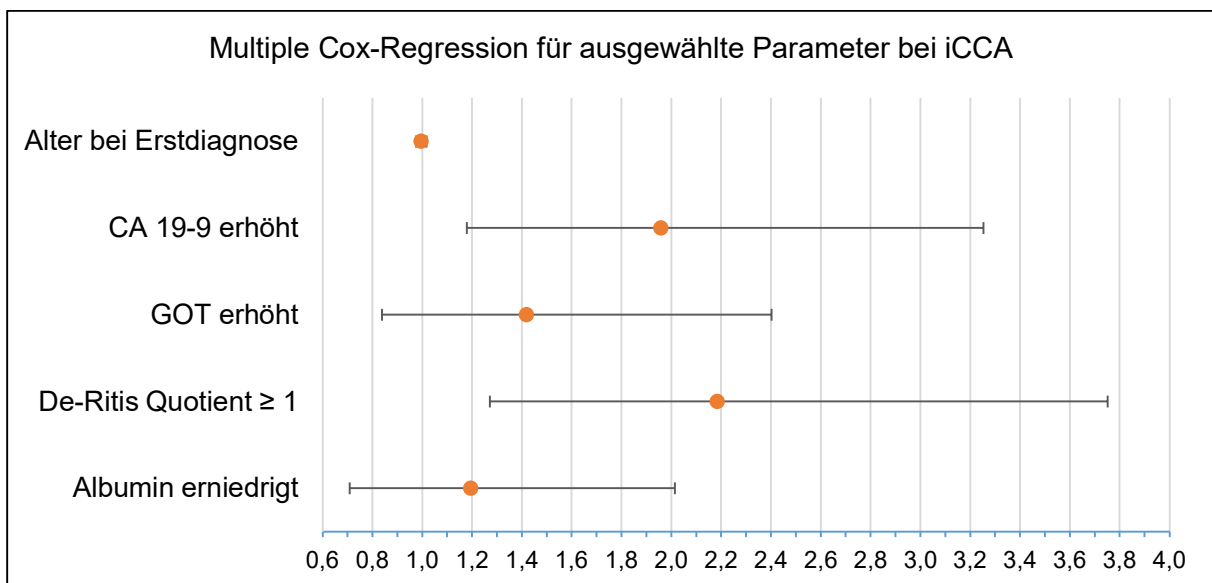


Abbildung A 14: Forest-Plot der multiplen Cox-Regression ausgewählter Parameter bei iCCA. x-Achse: Hazard Ratio, y-Achse: jeweils untersuchter Parameter, Whiskers: 95% Konfidenzintervalle.

9. Danksagung

Sehr herzlich danke ich [REDACTED] für die Aufnahme in die Arbeitsgemeinschaft und die Möglichkeit, über dieses Thema zu promovieren sowie für die hervorragende Zusammenarbeit.

[REDACTED] möchte ich herzlich für die Überlassung des Themas, die jederzeitige Ansprechbarkeit sowie die fachliche Betreuung danken.

Mein aufrichtiger Dank gebührt auch [REDACTED] für die zweite Begutachtung meiner Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin [REDACTED] für die ausgezeichnete und geduldige Betreuung über alle Phasen dieses Projektes hindurch. Ihre Unterstützung und ihr stetiges Engagement hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Auch möchte ich sehr herzlich [REDACTED] für die hilfsbereite Betreuung der immunhistochemischen Färbungen sowie der histopathologischen Befundsuche im Archiv.

Zudem möchte ich [REDACTED] und [REDACTED] aus dem Institut für Pathologie für die wertvolle Beratung und Zusammenarbeit im Rahmen der Auswertung der histologischen Präparate danken.

[REDACTED] aus dem Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) gilt mein Dank für die hervorragende und geduldige Beratung und Unterstützung im Rahmen der statistischen Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit.

Ein großer Dank geht an meine Mutter, die mich zum Studium der Humanmedizin motiviert hat und mir dieses ermöglicht hat.

Von Herzen danke ich meinem Ehemann und meinen Freundinnen, die mir stets Rat, Tat und mit einem offenen Ohr zur Seite standen. Danke für eure bedingungslose Unterstützung und euer Zuspruch hat mir immer wieder neuen Rückhalt und Energie gegeben, ohne euch wäre dieser Weg nicht möglich gewesen.