

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

Evaluation des Argpyrimidin- und Sirtuin 6-Nachweises im cholangiozellulären
Karzinom in einem Patientenkollektiv der Universitätsmedizin Mainz

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

Vorgelegt von

Dorothee Larissa Wolfhard
Aus Essen

Mainz, 2025

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

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Markus Möhler

2. Gutachter: PD Dr. med. Marcus Hollenbach

Tag der Promotion: 10. Juni 2026

Nachnutzungslizenz*: CC BY-4.0

* Die Angabe über die Nachnutzungslizenz ist ausschließlich in der elektronischen Version anzugeben. In der Druckversion muss die Angabe vollständig entfallen (einschließlich der Überschrift „Nachnutzungslizenz“)

Meinem Vater.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	XI
1 Einleitung / Ziel der Dissertation.....	1
2 Literaturdiskussion	4
2.1 Cholangiozelluläre Karzinome	4
2.2 Epidemiologie	5
2.3 Risikofaktoren	9
2.4 Genomanalysen und Karzinogenese.....	10
2.5 Makroskopie und Histologie.....	12
2.5.1 Intrahepatisches CCC	12
2.5.2 Extrahepatische CCC	13
2.5.3 Gallenblasenkarzinome	14
2.6 Metastasierung	14
2.7 Screening.....	15
2.8 Diagnostik	15
2.8.1 Apparative Diagnostik.....	15
2.8.2 Diagnostik durch den Pathologen.....	16
2.9 Klassifikation	16
2.9.1 Tumorigradung	16
2.9.2 TNM-Klassifikation	16
2.9.3 UICC	17
2.10 Tumormarker.....	17
2.11 ECOC-Schema	18
2.12 Therapie	19
2.12.1 Lokal begrenztes CCC	19
2.12.2 Metastasiertes CCC	20
2.12.3 Personalisierte Medizin	21
2.12.4 Rezidivtherapie	21
2.13 Nachsorge	21
2.14 Immunhistochemische Marker	23
2.14.1 Argpyrimidin	23
2.14.2 Sirtuin 6	27
3 Material und Methoden.....	33
3.1 Datenerhebung	33
3.2 Liste der verwendeten Materialien	33
3.3 Methode – Immunhistochemie.....	33
3.4 Materialverarbeitung	34
3.4.1 Vorbereitung	34
3.4.2 Demaskierung	35

3.4.3	Blockierung der endogenen Peroxidase.....	35
3.4.4	Primärantikörper	35
3.4.5	Sekundärantikörper	35
3.4.6	Gegenfärbung.....	36
3.4.7	Entwässern und Eindecken in Entellan®.....	36
3.4.8	Vorbereitung der Färbeprotokolle.....	36
3.4.9	Färbeprotokoll im Überblick.....	37
3.5	Histopathologische Auswertung	38
3.6	Immunhistochemische Färbeergebnisse	39
3.6.1	Immunreaktiver Score für Argpyrimidin	39
3.6.2	Immunreaktiver Score für Sirtuin 6	40
3.7	Statistische Analysen.....	41
3.7.1	Allgemeines	41
3.7.2	Kreuztabellen.....	42
3.7.3	Überlebensanalysen nach Kaplan-Meier.....	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Deskription	43
4.1.1	Grundlegende Patientencharakteristika	45
4.1.2	Allgemeine Risikofaktoren und Komorbiditäten.....	46
4.1.3	Tumorcharakteristika	46
4.1.4	Laborparameter	49
4.1.5	Therapiealgorithmus.....	50
4.1.6	Gesamtüberleben (Overall Survival)	51
4.2	Färbungen	53
4.2.1	Argpyrimidin.....	53
4.2.2	Sirtuin 6	59
4.3	Korrelationen	66
4.3.1	Argpyrimidin.....	66
4.3.2	Sirtuin 6	75
4.3.3	Koexpression von Argpyrimidin und Sirtuin 6.....	92
5	Diskussion	93
5.1	Einführung	93
5.2	Argpyrimidin.....	94
5.3	Sirtuin 6.....	99
5.4	Kritik.....	105
6	Zusammenfassung	107
7	Literaturverzeichnis	109
8	Anhang	119
8.1	Zum Kapitel 2.9.2 TNM-Klassifikation.....	119
8.2	Zum Kapitel 2.9.3 UICC-Stadium	120
8.3	Zum Kapitel 3.2 Lister der verwendeten Materialien	121

8.4	Zum Kapitel 3.4.8 Vergleichsfärbungen Mamma/Ösophagus und Magen/Ösophagus	123
8.5	Zum Kapitel 4.1 – Deskription.....	124
8.6	Zum Kapitel 4.1.3 Tumorcharakteristika	125
8.7	Zum Kapitel 4.1.4 Laborparameter	125
8.8	Zum Kapitel 4.1.6 Gesamtüberleben (Overall Survival)	128
8.9	Zum Kapitel 4.2.1.1 Argpyrimidin im Tumor	128
8.10	Zum Kapitel 4.3.1.1 Argpyrimidin – Patientenspezifische Eigenschaften	129
8.11	Zum Kapitel 4.3.1.2 Argpyrimidin – Tumorspezifische Eigenschaften	130
8.12	Zum Kapitel 4.3.1.3 Argpyrimidin – Laborparameter	131
8.13	Zum Kapitel 4.3.1.5 Argpyrimidin – Überleben	132
8.14	Zum Kapitel 4.3.2.2 Sirtuin 6 – Tumorspezifische Parameter	133
8.15	Zum Kapitel 4.3.2.3 Sirtuin 6 – Laborparameter	133
8.16	Zum Kapitel 4.3.2.5 Sirtuin 6 – Sirtuin 6 in der Leber	134
8.17	Zum Kapitel 4.3.2.6 Sirtuin 6 – Überleben	135
8.18	Zum Kapitel 5.2 – Argpyrimidin	137
8.19	Zum Kapitel 5.3 – Sirtuin 6	137
9	Danksagung	138

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
ADP	Adenosindiphosphat
AP-1	Transkriptionsfaktor
BiIIN	biliäre intraepitheliale Neoplasie
BILCAP	Biliary Intrahepatic Liver Cancer Adjuvant Prognostic" Studie
BTC	Biliary Tract Cancer
df	degrees of freedom, zu deutsch: Freiheitsgrade
ECOC	Eastern Cooperative Oncology Group, beschreibt den physischen Zustand von Krebspatienten und dient der Quantifizierung des allgemeinen Wohlbefindens sowie der Einschränkungen bei Aktivitäten des alltäglichen Lebens
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EPHA2	Ephrin type-A receptor 2-Gen
ERBB3	Gen, das für das Protein des Receptor tyrosine-protein kinase erbB-3 kodiert
ERCP	endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikografie
ERK	extracellular-signal regulated kinases
Era	Östrogenrezeptor alpha
ESMO	European Society for Medical Oncology
Et al.	et alii
Etc.	et cetera
EUS	endoskopischee Ultraschall
exkl.	exklusive
FGFR2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
FOLFOX	Chemotherapieregime aus Folinsäure (Leucovorin), Fluorouracil (5-FU) und Oxaliplatin
G1	Tumorgewebe ähnlich dem Ursprungsgewebe
G2	Mäßig differenzierter tumor
G3	Entdifferenzierter Tumor
GBT	Gallenblasentumor
GLO I und II	Glyoxalase I und II
GLUT1	Glucosetransporter 1
GNAS	Komplex-Lokus auf Chromosom 20, das die Alpha-Untereinheit des stimulierenden G-Proteins (G α) kodiert,
Gy	Gray, Dosiseneinheit in der Strahlentherapie
H ₀	Nullhypothese
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H3	Histon 3
H3K18Ac	epigenetische Modifikation des Histonproteins H3, bei der eine Acetylgruppe an die Lysin-18-Position angehängt wird
H3K56Ac	epigenetische Modifikation des Histonproteins H3, bei der eine Acetylgruppe an die Lysin-56-Position angehängt wird

H3K9Ac	epigenetische Modifikation des Histonproteins H3, bei der eine Acetylgruppe an die Lysin-9-Position angehängt wird
HBV	Hepatitis-B-Virus
HBx	Protein X
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HDL	High Density Lipoprotein (Lipoprotein hoher Dichte)
Her2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HIF1 α	Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierter Faktor 1 α
HK2	Hexokinase 2
HR	Hazard Ratio
HR	Hazard Ratio
HRP	horseradisch peroxidase, Meerrettichperoxidase
HSP27	Hitzeschock-Protein 27, heat shock protein 27
iCCC/ICC	Intrahepatisches cholangiozelluläres Karzinom
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, zu deutsch: internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme
ICD-O	International Classification of Diseases for Oncology
IDH1/2	Isocitratdehydrogenase (-Gen) 1/2
IHC	Immunhistochemisch
IL	Interleukin
IMBEI	Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik
Inkl.	inklusive
IPN	intraduktale papilläre Neoplasie
IRS	Immunreaktiver Score
k	Kilo, Tausend
KI/CI	Konfidenzintervall/Confidence Intervall
KO	Knock-out
KRAS	Kirsten rat sarcoma virus (Erstisolation in einem onkogenen Virus)
L	Invasion in Lymphgefäße anhand der TNM-Klassifikation
l	Liter
LDL	Low Density Lipoprotein (Lipoprotein niedriger Dichte)
M	Fernmetastasienstatus anhand der TNM-Klassifikation
m/m	Vorsilbe „Milli-“, Tausendstel Teil einer Basiseinheit (10^{-3})/Meter
MAGE, AGE	Argpyrimidin
Max.	maximal
MCT4	Monocarboxylate transporter 4
MG	Methylglyoxal

MLL2, auch bekannt als KMT2D	Gen, Histone-lysine N-methyltransferase 2D (KMT2D)
MLL3, auch bekannt als KMT2C	Gen, Lysine N-methyltransferase 2C (KMT2C)
mm	Millimeter
MMS	Methylmethansulfonat
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
MRT	Magnetresonanztomographie
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MYC	aviäres Myelozytomatose-Virus-Onkogen-Homolog
N	Lymphknotenstatus anhand der TNM-Klassifikation
n	Fallzahl
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
o. n. A.	Ohne nähere Angabe
OR	Odds Ratio
OS	Overall Survival
p	Kurz für p-Wert ("p-value"), misst die Wahrscheinlichkeit, dass das beobachtete Ergebnis (oder ein extremeres) auftritt, vorausgesetzt die Nullhypothese ist wahr
P16	Protein 16, entspricht dem Cyclin dependent kinase inhibitor 2A
P21	Protein 21, entspricht dem cyclin-dependent kinase inhibitor 1
PARP1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBS	Phosphate-Buffered-Saline
pCCC	Perihiläres cholangiozelluläres Karzinom
Pdk1	3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1
PDP	partielle Duodenopankreatektomie
PIK3CA	PIK3CA-Gen kodiert die katalytische Untereinheit eines Enzyms namens Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)
Pn	perineurale Invasion anhand der TNM-Klassifikation
PP	Percent Points
PRKACA/B	Gen, das für das Protein Protein kinase A /B catalytic subunit (PKA Cα) kodiert
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
PTC	perkutane transhepatische Cholangiographie
PTEN	Gen, Phosphatase and Tensin homolog
R0/R1/R2	Resektionsrand nach Exzision, R0 = vollständige chirurgische Entfernung eines Tumors, bei der sowohl makroskopisch (sichtbar) als auch mikroskopisch (unter dem Mikroskop) keine Tumorzellen am Randschnittgewebe des entnommenen Präparats nachweisbar sind. R1 = vollständige Entfernung

	des Tumors durch den Chirurgen, aber mit mikroskopisch sichtbaren Krebszellen an den Schnittträgern des entfernten Gewebes. R2 = operative Entfernung eines Tumors, bei der makroskopisch sichtbare Tumorteile im Körper verbleiben
RAGE	Receptor for AGE, Rezeptor für AGEs
RKI	Robert-Koch-Institut
ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
SAP	Systemanalyse Programmentwicklung, Kliniksystem für ERP-Software (Enterprise Resource Planning)
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results
SIRT6	Sirtuin 6
SMAD4	Gen (Mothers against decapentaplegic homolog 4), welches für ein Protein kodiert, das eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion des Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β)-Signalwegs spielt
SPSS	Name der Software für die statistische Datenanalyse der Firma IBM
SSB	single-strand break, Einzelstrangbrüche
T	Tumorgroße anhand der TNM-Klassifikation
TACE	transarterielle Chemoembolisation
TACP	transarteriellen Chemoperfusion
Tbl.	Tabelle
TERT promotor	Dann-Abschnitt, der die Expression des Gens für die Telomerase-Reverse-Transkriptase (TERT) reguliert
Tis	Carcinoma in situ
TNF α	Tumornekrosefaktor-alpha
TP53	tumor protein p53, cellular tumor antigen p53
U	Unit
UHRF1	Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 1
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
Univ.-Prof.	Universitätsprofessor
USA	United States of America
USP 10	Ubiquitin-specific protease 10
UV	ultraviolettes Licht
uvm	Und viele mehr
V	Invasion in Venen anhand der TNM-Klassifikation
Vgl.	vergleiche
Vs.	versus
WES	whole-exome sequencing
WGS	whole-genome sequencing
WRN	Werner-Gen
WT	Wildtyp
z. B.	Zum Beispiel

μ	Vorsilbe „Mikro-“, Millionstel Teil einer Basis-einheit (10^{-6})
---	---

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten nach Geschlecht, ICD-10 C23 -C24, Deutschland 1999-2018/2019. Während die Inzidenz der eCCC und der Gallenblasenkarzinome bei Männern weitestgehend konstant blieb (2,8 zu 2,9/100.000/a), kam es im Zeitraum von 1999 bis 2018/19 zu einem dezenten Inzidenzrückgang bei Frauen (2,2 zu 1,9/100.000/a).....	7
Abbildung 2: Subtypspezifische und sich überschneidende Veränderungen abhängig von der Tumorlokalisation. Man erkennt sowohl somatische (unter anderem TP53, KRAS) als auch Keimbahnmutationen (unter anderem BRCA1, BRCA2).	11
Abbildung 3: Differenzierungsgrad von Gallengangskarzinomen: a histologisches Bild eines gut differenzierten tubulären Adenokarzinoms mit deutlicher desmoplastischen Stromareaktion. b Karzinom mit mäßiger Differenzierung, erkennbar an den tubulären, kribriformen und mikropapillären Anteilen. c schlecht differenziertes Cholangiokarzinom mit deutlichen Atypien und Polymorphismen.	13
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Klassifikation der Klatskin-Tumoren in Anlehnung an Bismuth und Corlette. Typ I: Tumor betrifft den Ductus hepaticus communis distal der Hepatikusgabel; Typ II: Tumor befällt zusätzlich die Hepatikusgabel; Typ IIIa: Tumor befällt die Hepatikusgabel sowie den rechten Hauptast, Typ IIIb: Tumor befällt die Hepatikusgabel sowie den linken Hauptast; Typ IV: Tumor befällt die Hepatikusgabel und beide Hauptäste	14
Abbildung 5: Entstehung von Argpyrimidin aus Arginin und Methylglyoxal über eine Maillard-Reaktion und Abbau über das Glyoxalase-System. Methylglyoxal entsteht vorwiegend, nachdem von Glycerinaldehyd-3-phosphat (DAP) oder Dihydroxyacetonphosphat (DHAP), beides Stoffwechselzwischenprodukte der Glykolyse, nichtenzymatisch die Phosphatgruppe abgespalten wurde. Weitere Quellen für die Generierung von Methylglyoxal sind der Katabolismus von Threonin und Aceton. Methylglyoxal weist zytotoxische Eigenschaften auf und kann durch die körpereigenen Enzyme Glyoxalase I und II zum unschädlichen Lactat abgebaut werden. Überschüssiges Methylglyoxal kann jedoch weiterhin nichtenzymatisch an Arginin gebunden werden mit dem Ergebnis, dass Argpyrimidin entsteht. Eigene, vereinfachte Darstellung.....	23
Abbildung 6: Intrazelluläre Signalkaskade von AGEs. Durch Bindung von AGEs an ihren Rezeptor kommt es über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zur Induktion von NF-κB, welches wiederum die Expression proinflammatorischer Faktoren wie IL-1, -6, -8 und Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) fördert. Eigene, vereinfachte Darstellung	25
Abbildung 7: Im Vergleich zum Normalgewebe zeigen Tumoren (im Speziellen Adenokarzinom des Kolons) bereits in frühen Stadien eine verminderte Expression an SIRT6.	30
Abbildung 8: Vergleich von Pankreas- und Kolon-Normalgewebe mit jeweiligen Adenokarzinomen. Es wird deutlich, dass in der immunhistochemischen Färbung weniger SIRT6 im Tumorgewebe nachzuweisen ist. Rechts davon Kaplan-Meier-Kurven für das krankheitsfreie Überleben bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen (links) und Patienten mit hohem C-reaktivem Protein (CRP) (rechts): Vergleich SIRT6 geringe versus ausgeprägte Expression.	31
Abbildung 9: direkter (links) und indirekter (rechts) immunhistochemischer Nachweis	34
Abbildung 10: schematische Darstellung der immunhistochemischen Färbung nach dem DAKO Flex + Protokoll.....	36
Abbildung 11: Immunreaktiver Score (14) nach Remmele und Stegner in der Originalversion	39
Abbildung 12: Das gestapelte Säulendiagramm veranschaulicht die Verteilung der Tumorlokalisation im Hinblick auf das Geschlecht. eCCC: 70,13% Männer, 29,8% Frauen. iCCC: 45,4% Männer, 54,6% Frauen. Gallenblasenkarzinome: 40% Männer, 60% Frauen. Im Umkehrschluss bedeutet dies eine Verteilung der Tumorlokalisation bei Männern: 41,5% (n=54) eCCCs, 56,9% (n=74) iCCCs und 1,5% (n=2) Gallenblasenkarzinome und bei Frauen: 20% (n=23) eCCCs, 77,4% (n=89) iCCCs und 2,6% (n=3) Gallenblasenkarzinome. Der geschlechtsspezifische Unterschied im Hinblick auf die Tumorlokalisation wurde durch einen p-Wert von < 0,001 (nach Pearson-Chi-Quadrat) unterstrichen.	46

Abbildung 13: Vereinfachte Darstellung der Therapieverläufe im Fließdiagramm. Der Großteil der Patienten (93,1%, n=228) wurde initial operiert, im Verlauf kamen den meisten Patienten jedoch verschiedenen Therapiemodalitäten zu.	50
Abbildung 14: Overall Survival und graphische Darstellung einer Kaplan-Meier-Kurve für iCCC, eCCC und GBT. Das mediane Gesamtüberleben für Patienten mit eCCC betrug 22,6 Monate (95% KI 16,9-28,4 Monate), für Patienten mit iCCC 23,5 Monate (95% KI 18,1-28,9 Monate) und für Patienten mit GBT 22,8 Monate (95% KI 0-46,7 Monate). Log Rank (Mantel Cox) $p = 0,036$	51
Abbildung 15: Vergleich der Tumorlokalisation (eCCC und iCCC) und des Tumormarkers CA 19-9 anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms. Es zeigte sich das längste Überleben bei Patienten mit iCCC und normwertigem CA 19-9-Wert (Mittelwert 43,3 Monate (95% KI 32,5-54,1 Monate), Median: 33,1 Monate (95% KI 20,7-45,5 Monate)) und das kürzeste Überleben bei Patienten mit intrahepatischen Karzinomen und erhöhten CA 19-9-Werten (Mittelwert: 34 Monate (95% KI 15,3-32,7 Monate), Median: 15,3 Monate (95% KI 9,9-20,7 Monate)). Bei Patienten mit eCCC schien der CA 19-9-Wert keinen großen Einfluss auf die Dauer des Gesamtüberlebens zu haben. p -Wert (Log Rank (Mantel Cox)) 0,037.	52
Abbildung 16: fehlende Färbung (0) auf Argpyrimidin, links 40-fache Vergrößerung, rechts 100-fache Vergrößerung.	53
Abbildung 17: schwache Färbung (1) auf Argpyrimidin, links 40-fache Vergrößerung, rechts 100-fache Vergrößerung.	53
Abbildung 18: moderate Färbung (2) auf Argpyrimidin, links 40-fache Vergrößerung, rechts 100-fache Vergrößerung. Zu erkennen ist eine Färbung ausschließlich im Zytosol.	54
Abbildung 19: starke Färbung (140) auf Argpyrimidin, links 40-fache Vergrößerung, rechts 100-fache Vergrößerung.	54
Abbildung 20: Verteilung der Percent Points (PP) des immunreaktiven Scores (IRS für Argpyrimidin).	55
Abbildung 21: Kreisdiagramme zur Verteilung der Percent Points für Argpyrimidin im Gesamtkollektiv (links) und in Abhängigkeit der Lokalisation des Tumors (rechts). 19,65% des Gesamtkollektivs wiesen kein Argpyrimidin im Tumor auf, knapp dreiviertel aller Präparate verteilten sich auf 1 bis 4 Percent Points. Der Median der Percent Points sowohl für iCCC als auch für eCCC lag bei 2. Bei Karzinomen der Gallenblase lag der Median bei 4. Der Interquartilsabstand (IQA) für eCCC bei 3 (1-4), für iCCC lag bei 4 (0-4), für eCCC bei 3 (1-4) und für Gallenblasenkarzinome bei 2 (2-4).	56
Abbildung 22: Nachweis von Argpyrimidin in der Leber. Man erkennt den Nachweis im Zytosol der Hepatozyten. 40-fache Vergrößerung.	57
Abbildung 23: fehlende Färbung (0) auf Sirtuin 6, links 40-fache Vergrößerung, rechts 100-fache Vergrößerung.	59
Abbildung 24: schwache Färbung (1) auf Sirtuin 6, links 40-fache Vergrößerung, rechts 100-fache Vergrößerung. Zu erkennen ist eine Färbung von sowohl Zytosol als auch Nukleus.	59
Abbildung 25: moderate Färbung (2) auf Sirtuin 6, links 40-fache Vergrößerung, rechts 100-fache Vergrößerung.	60
Abbildung 26: starke Färbung (140) auf Sirtuin 6, links 40-fache Vergrößerung, rechts 100-fache Vergrößerung.	60
Abbildung 27: Vergleich Kernfärbung (oben) versus Zytosolfärbung (unten) für Sirtuin 6 im Tumorgewebe, 100-fache Vergrößerung. Auf dem oberen Bild erkennt man eine deutliche Färbung nahezu aller Zellkerne, wohingegen die Färbung auf Sirtuin6 im unteren Bild im Zytosol zu finden ist.	61
Abbildung 28: Säulendiagramm: Verteilung der Percent Points des IRS für Sirtuin 6 im Tumorgewebe.	62
Abbildung 29: Kreisdiagramme zur Verteilung der Percent Points für Sirtuin 6 im Gesamtkollektiv (links) und in Abhängigkeit der Lokalisation des Tumors (rechts). Im Gesamtkollektiv zeigten nur wenige Präparate (0,87%) keine Färbung auf Sirtuin 6 im Tumormaterial. Der Median der Percent Points sowohl für eCCC als auch für iCCC lag bei 4. Bei Karzinomen der Gallenblase lag der Median bei 6. Der Interquartilsabstand (IQA) für eCCC bei 4 (2-6), für iCCC lag bei 6 (2-8) und für Gallenblasenkarzinome bei 5 (3-8).	63
Abbildung 30: Percent Points des IRS für Sirtuin 6 in der Leber.	64

Abbildung 31: Vergleich des Gesamtüberlebens bei extrahepatischen CCCs und graphische Darstellung anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms: Patienten mit Argyrimidin-positiven Tumoren zeigten ein signifikant (Log Rank (Mantel Cox) $p = 0,023$) verlängertes Gesamtüberleben von 32,2 Monaten im Mittel und 29,5 Monaten im Median (95% KI 17,3-41,8 Monate) (versus 17,9 Monate bei Argyrimidin-negativen Tumoren, 9,0 Monaten im Median (95% KI 0-19,2))..... 71

Abbildung 32: Vergleich des Gesamtüberlebens von allen Männern im Gesamtkollektiv in Hinblick auf das Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Argyrimidinnachweis. Hierbei war zu erkennen, dass Männer mit Argyrimidinnachweis länger überlebten (Gesamtüberleben im Median 24,5 Monate (95% KI 6,6-42,4 Monate) als jene ohne Argyrimidinnachweis (im Median 15,01 Monate (95% KI 0-30,3 Monate)), Log Rank (Mantel Cox) $p = 0,031$. Verbildlicht anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms. 72

Abbildung 33: Vergleich des Gesamtüberlebens von allen Patienten, die jünger als 65 Jahre waren, in Hinblick auf das Gesamtüberleben in Abhängigkeit des Argyrimidinnachweises, Hierbei ist zu erkennen, dass ein jüngeres Patientenalter unter 65 Jahre bei gleichzeitigem Nachweis von Argyrimidin im Tumor mit einem längeren Überleben einherging (Median: 39,2 Monate (95% KI 19,2-59,1 Monate)) als bei Patienten in der gleichen Alterskategorie ohne Argyrimidinnachweis (Median: 23,4 Monate (95% KI 8,2-38,7 Monate)). Log Rank (Mantel Cox) $p = 0,032$. Bildliche Darstellung anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms. 73

Abbildung 34: Vergleich des Gesamtüberlebens in Monaten, verbildlicht anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms. Es zeigte sich, dass Patienten mit normwertigem De-Ritis-Quotienten (Normwert: 0,6-0,8) und Nachweis von Argyrimidin im Tumor am längsten überlebten (mittleres Überleben 47,9 Monate (95% KI 33,7-62,1 Monate), medianes Überleben 44,8 Monate (95% KI 8,3-81,3 Monate). Bei Patienten mit einem De-Ritis-Quotienten außerhalb der Norm schien der Argyrimidin-Status jedoch keinen Unterschied im Hinblick auf das Überleben zu haben. Der p-Wert (Log Rank (Mantel Cox)) lag bei 0,074. 74

Abbildung 35: gestapeltes Säulendiagramm zum vorwiegenden Nachweisort von SIRT6 (Nukleus versus Zytosol) bei intra- und extrahepatischen Tumoren. Dieser zeigte sich signifikant unterschiedlich: SIRT6 war bei extrahepatischen Tumoren vorwiegend im Zytosol, bei intrahepatischen Tumoren vorwiegend im Nukleus nachweisbar (p (Chi-Quadrat) $< 0,001$). 77

Abbildung 36: Gesamtüberleben für SIRT6 bei Patienten mit extrahepatischem CCC, dargestellt anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms. Patienten mit SIRT6-positiven Tumoren überlebten im Median 34,1 Monate (95% KI 19,4-48,9) und Patienten mit SIRT6-negativen Tumoren im Median 9,2 Monate (95% KI 4,3-14,2) (Log Rank (Mantel Cox) $p = 0,01$). 81

Abbildung 37: Vergleich aller weiblichen Patienten in Hinblick auf den SIRT6-Nachweis im Tumor und GOT. Es zeigte sich, dass weibliche Patienten ohne SIRT6-Nachweis und erhöhtem GOT am kürzesten überlebten (mittleres Überleben 12,8 Monate (95% KI 7,5-18,1 Monate), medianes Überleben 9,7 Monate (95% KI 2-17,4 Monate). Mit einem p-Wert von $< 0,001$ hob sich diese Subgruppe der Vergleichsgruppen ab. Patientinnen mit SIRT6-positiven Tumoren unterschieden sich hinsichtlich des Überlebens nicht trotz unterschiedlich erhöhter GOT-Werte (Log Rank (Mantel Cox) $p=0,272$). Graphische Darstellung anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms. 82

Abbildung 38: Vergleich der weiblichen Patienten mit erhöhter GOT in Hinblick auf die SIRT6-Positivität. Es zeigte sich, dass Patientinnen mit SIRT6-Nachweis im Tumor länger überlebten (im Mittel 28,6 Monate (95% KI 20,9-36,4 Monate), im Median 20,4 Monate (95% KI 10,9-29,9 Monate)) als jene ohne SIRT6-Nachweis im Tumor (im Mittel 12,8 Monate (95% KI 7,5-18,1 Monate), im Median 9,7 Monate (95% KI 2-17,4 Monate)). Der p-Wert lag bei 0,004 (Log Rank (Mantel Cox)). Graphische Darstellung anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms. 83

Abbildung 39: Vergleich aller weiblichen Patienten in Hinblick auf den SIRT6-Nachweis im Tumor und GPT. Es zeigte sich, dass weibliche Patienten ohne SIRT6-Nachweis und erhöhter GPT am kürzesten überlebten (mittleres Überleben 13,5 Monate (95% KI 7,4-19,6 Monate), medianes Überleben 7,4 Monate (95% KI 0-17,5 Monate). Mit einem p-Wert von 0,007 (Log Rank (Mantel Cox)) hob sich diese Subgruppe der Vergleichsgruppen ab. Patientinnen mit SIRT6-positiven Tumoren unterschieden sich hinsichtlich des Überlebens nicht trotz

unterschiedlich erhöhter GPT-Werte. Graphische Darstellung anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms.....	84
Abbildung 40: Vergleich der weiblichen Patienten mit erhöhter GPT in Hinblick auf die SIRT6-Positivität. Es zeigte sich, dass Patientinnen mit SIRT6-Nachweis im Tumor länger überlebten (im Mittel 32,6 Monate (95% KI 24,6-40,7 Monate), im Median 32,4 Monate (95% KI 11,5-53,2 Monate)) als jene ohne SIRT6-Nachweis im Tumor (im Mittel 13,5 Monate (95% KI 7,4-19,6 Monate), im Median 7,4 Monate (95% KI 0-17,5 Monate)). Der p-Wert (Log Rank (Mantel Cox)) lag bei 0,001. Graphische Darstellung anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms.	85
Abbildung 41: Vergleich des Gesamtüberlebens aller Patienten im Hinblick auf den Nachweis von SIRT6 im Tumor und Bilirubin. Patienten mit erhöhtem Bilirubin und fehlendem SIRT6-Nachweis lebten am kürzesten (im Mittel 18,4 Monate (95% KI 13-23,8 Monate), im Median 17,4 Monate (95% KI 6,8-28,1 Monate), Log Rank (Mantel Cox) $p = 0,015$). Graphische Darstellung anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms.	86
Abbildung 42: Selektion aller Patienten mit Bilirubinerhöhung. Hierbei war ersichtlich, dass Patienten mit SIRT6-Nachweis länger überlebten (im Mittel 31,6 Monate (95% KI 23,5-39,7 Monate, im Median 24,9 Monate (95% KI 5,7-44,1 Monate)). Ohne SIRT6-Nachweis im Tumor lag die mittlere Überlebenszeit bei 18,4 Monaten (95% KI 13-23,8 Monate), die mediane Überlebenszeit bei 14,4 Monaten (95% KI 6,8-28,1 Monate). Der p-Wert (Log Rank (Mantel Cox)) lag dabei bei 0,01. Graphische Darstellung anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms.	87
Abbildung 43: Selektion aller weiblichen Patienten mit Bilirubinerhöhung in Abhängigkeit vom Nachweis von SIRT6 im Tumor. Es zeigt sich ein Überlebensvorteil der Frauen mit SIRT6-Nachweis (medianes Überleben 25,7 Monate (95% KI 9,8-41,7 Monate) versus 11,3 Monate (95% KI 0-23,3 Monate)), $p = 0,002$ (Log Rank (Mantel Cox)).	88
Abbildung 44: Vergleich aller Patienten im Hinblick auf den Nachweis von SIRT6 im Tumor und dem CA 19-9-Spiegel anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms. Patienten ohne SIRT6-Nachweis im Tumor und erhöhtem CA 19-9 wiesen die kürzeste Überlebenszeit auf (Mittelwert: 17,8 Monate (95% KI 8,6-27 Monate), Median: 7,4 Monate (95% KI 0,8-13,9 Monate). Der p-Wert (Log Rank (Mantel Cox)) lag bei $<0,001$. Graphische Darstellung anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms.	89
Abbildung 45: Selektion aller Patienten mit erhöhtem Tumormarker CA 19-9 in Abhängigkeit zum Nachweis von SIRT6 im Tumor. Ohne SIRT6-Nachweis im Tumor war eine mittlere Überlebenszeit von 17,8 Monaten (95% KI 8,6-27 Monate) und eine mediane Überlebenszeit von 7,4 Monaten (95% KI 0,8-13,9 Monate) zu verzeichnen. Bei Patienten mit SIRT6-positiven Tumoren lag die mittlere Überlebenszeit bei 30,1 Monaten (95% KI 23,1-37,1 Monate) und die mediane Überlebenszeit bei 20,4 Monaten (95% KI 11,9-28,9 Monate). Der p-Werte (Log Rank (Mantel Cox)) wurde mit 0,021 ausgegeben. Graphische Darstellung anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms.	90
Abbildung 46: Selektion aller weiblichen Patienten mit erhöhtem CA 19-9-Spiegel. Es ist zu erkennen, dass der Nachweis von SIRT6 im Tumor eine protektive Rolle zu spielen scheint: medianes Überleben 19,3 Monate (95% KI 13,8-24,8 Monate) versus 3,9 Monate (95% KI 0-8,5 Monate beim Fehlen von SIRT6, p (Log Rank (Mantel Cox)) $< 0,001$ (Chi-Quadrat 13,562).	91
Abbildung 47: Nachweis von Argpyrimidin in der Mamma, links eher schwacher Nachweis und rechts eher starker Nachweis.	123
Abbildung 48: Argpyrimidinnachweis in der Mamma, links mit primär zytosolischem, rechts mit zusätzlich nukleärem Nachweis.	123
Abbildung 49: Nachweis von Argpyrimidin im Ösophagus, links kein Nachweis und rechts eher leicht bis mäßige Nachweisintensität.	124
Abbildung 50: Nachweis von Sirtuin 6 im Magen, links dezenter Nachweis, rechts mittlere Nachweisintensität.	124
Abbildung 51: Überlebensfunktionen nach Kaplan-Meier für alle Patienten mit intra- und extrahepatischen Gallengangskarzinomen in Abhängigkeit von der Tumorgroße (T2 und kleiner versus T3 und größer), dem Lymphknotenstatus (N0 versus N+) und dem UICC-Stadium (kleiner gleich 2 versus drei und höher). Bei allen Vergleichen ergab sich eine statistische Signifikanz ($p = 0,013$, $< 0,001$ und $< 0,001$).	128

Abbildung 52: Viergruppenvergleich von Argpyrimidinnachweis und Lokalisation des Primarius. Argpyrimidinnegative extrahepatische Tumoren scheinen das kürzeste Überleben aufzuweisen.	132
Abbildung 53: Viergruppenvergleich über das Überleben von Frauen und Männern mit bzw. ohne Argpyrimidinnachweis im Tumor, dargestellt anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms. Zu erkennen ist ein signifikanter Unterschied im Überleben im Vergleich zwischen Männern mit und ohne Argpyrimidinnachweis, wohingegen der Argpyrimidinstatus bei Frauen keinen statistisch bedeutsamen Unterschied im Überleben erbrachte.	132
Abbildung 54: Selektion aller Männer mit Bilirubinerhöhung. Es zeigt sich, dass - im Gegensatz zu den weiblichen Patienten - kein Überlebensvorteil durch den Nachweis von SIRT6 im Tumor bietet. Mediane Überlebenszeit ohne SIRT6-Nachweis 20,8 Monate (95% KI 2,4-39,2 Monate) versus 17,2 Monate (95% KI 0-41,5 Monate) mit SIRT6-Nachweis, p (Log Rank) (Mantel Cox) 0,144 (Chi-Quadrat 2,136 (df 1)).	135
Abbildung 55: Vergleich der Überlebenszeit anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms hinsichtlich dem überwiegenden Nachweisort von SIRT6 im Tumor. Bei Tumoren mit überwiegendem nuklärem Nachweis zeigte sich eine mittlere Überlebenszeit von 36,2 Monaten (95% KI 29,8-42,5 Monate), im Median betrug sie 29,5 Monate (95% KI 21,4-37,6 Monate). Dahingegen war die mittlere Überlebenszeit bei vorwiegend zytosolischem Nachweis 35 Monate (95% KI 27,1-42,8 Monate), im Median 22,6 Monate (95% KI 17,3-28 Monate). p (Lok Rank) = 0,447. Die Gruppe der Präparate mit 50:50-Verteilung hob sich deutlich von den beiden anderen Gruppen ab, wurde jedoch aufgrund der kleinen Fallzahl von n = 15 und der Ungenauigkeit einer menschlichen Bewertung aus dem Vergleich herausgenommen.	136

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ICD-10 Code: C22.- Bösartige Neubildung der Leber und der intrahepatischen Gallengänge.....	4
Tabelle 2: ICD-10 Code: C24.- Bösartige Neubildung sonstiger nicht näher bezeichneter Teile der Gallenwege.....	5
Tabelle 3: Inzidenz je 100.000 Einwohner: Gallengangskarzinome im Jahr 1999 versus 2018	7
Tabelle 4: Klassifikation der Klatskin-Tumoren anhand der Klassifikation nach Bismuth und Corlette	14
Tabelle 37: TNM-Klassifikation der intrahepatischen Gallengangskarzinome.....	16
Tabelle 5: UICC-Stadien des Karzinoms intrahepatischen Gallengänge	17
Tabelle 6: ECOG Performance Score, der den physischen Zustand von Krebspatienten beschreibt.	18
Tabelle 7: Modifizierter Immunreaktiver Score für Argpyrimidin	40
Tabelle 8: Modifizierter Immunreaktiver Score für Sirtuin 6	40
Tabelle 9: Grundlegende Patientencharakteristika und Laborwerte bei Erstdiagnose. eCCC = extrahepatische cholangiozelluläre Karzinome, iCCC = intrahepatische cholangiozelluläre Karzinome, GBT = cholangiozelluläre Karzinome der Gallenblase, IQA= Interquartilsabstand, n= Anzahl, ALT (GPT) = Alanin-Aminotransferase (Glutamat-Pyruvat-Transaminase), AST (GOT) = Aspartat-Aminotransferase (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase), INR= International Normalized Ratio, CA 19-9 = Carbohydrate-Antigen 19-9, Tumormarker für cholangiozelluläre Karzinome. ^a p-Wert (Pearson-Chi-Quadrat), ^b p-Wert (Kruskal-Wallis). Paarweise Vergleiche im Anhang (vgl. Tabelle 44).	43
Tabelle 10: Tumorcharakteristika bei Erstdiagnose anhand der TNM- und UICC-Klassifikation (Union internationale contre le cancer). Tis = Carcinoma in situ. T = Tumorgröße, N+ = Lymphknotenmetastasen, M+ = Auftreten von Fernmetastasen. ^a p-Wert (Pearson-Chi-Quadrat), ^b p-Wert (Kruskal-Wallis), ^c p-Wert (exakter Test nach Fisher).	44
Tabelle 11: Zusammenfassung des Gesamtüberlebens nach Kaplan-Meier in Monaten.	44
Tabelle 12: Verteilung der Klatskin-Tumoren des Patientenkollektivs anhand der Klassifikation nach Bismuth und Corlette. Das Kollektiv schloss 77 (30% des Gesamtkollektivs) Patienten mit Klatskin-Tumoren ein, von denen der Großteil (46,8%) Stadium IV, beide Hepatikushauptäste betreffend, zuzuordnen war.	45
Tabelle 13: TNM-Klassifikation des Gesamtkollektivs und aufgeteilt nach Tumorlokalisation. 68,2% der Patienten zeigten einen Tumor bis T2, 33,5% der Patienten wurden als N+ und 8,6% als M+ klassifiziert. NX bzw. MX = unbekannter Lymphknoten- bzw. Fernmetastasenstatus.	47
Tabelle 14: UICC-Klassifikation des Gesamtkollektivs und aufgeteilt nach Tumorlokalisation. Die Verteilung im Gesamtkollektiv war in etwa ausgeglichen: 46,7% der Patienten befanden sich bei Erstdiagnose im Stadium UICC 0 bis 2, 53,3% im UICC-Stadium 3 bis 4.	48
Tabelle 15: Tumorgrading des Gesamtkollektivs sowie aufgeteilt nach Lokalisation des Primarius. Zusammengefasst in Gruppen (gut: gut, gut-mittel und mittel versus schlecht: mittel-niedrig und niedrig) zeigte sich, dass 71,02% der Patienten einen tendenziell gut differenzierten Tumor wiesen.....	48
Tabelle 16: Verteilung der Argpyrimidin-negativen und -positiven Präparate anhand der Verteilung der Percent Points beim IRS für Argpyrimidin, Der Cut Off wurde bei einem (1) Percent Point gesetzt. Die Bewertung eine Bewertung von 91 (39,7%) negativen und 138 (60,3%) positiven Präparaten. Bei Patienten mit eCCC überwog der Anteil an Argpyrimidin-positiven (69,1%) Präparaten, wohingegen die Verteilung bei iCCC nahezu ausgeglichen war. Alle Patienten mit Gallenblasentumoren wiesen Argpyrimidin im Tumor auf.	55
Tabelle 17: quantitativer Nachweis von Argpyrimidin in der den Tumor umgebenden Leber. In über zwei Drittel aller Fälle konnte Argpyrimidin quantitativ in der den Tumor umgebenden Leber nachgewiesen werden. Werden Präparate ohne Leberanschnitt exkludiert, so ist die umgebende Leber in 96% aller eCCC Argpyrimidin-positiv und bei 85% aller iCCC.	58
Tabelle 18: Intensität der Argpyrimidinfärbung der den Tumor umgebenden Leber im Gesamtkollektiv und aufgeteilt nach Lokalisation des Primarius. Insgesamt konnten 187	

Präparate (davon 51 eCCC, 131 iCCC und 5 GBT) auf den Nachweis von Argpyrimidin in der den Tumor umgebenden Leber untersucht werden. Im Gesamtkollektiv ergab sich bei 161 Patienten der Nachweis von Argpyrimidin in der Leber. Bei den extrahepatischen Karzinomen wiesen 96% Argpyrimidin in der Leber auf, bei den intrahepatischen Karzinomen waren es 84,6% und bei dem kleinen Kollektiv von Patienten mit Gallenblasenkarzinom waren es alle Patienten (100%). In der Gruppe der Gallenblasentumoren waren Argpyrimidin in allen Fällen mäßig stark (=2) gefärbt. Bei der kleinen Fallzahl wurden die Gallenblasentumoren im paarweisen Vergleich ausgeschlossen. Im Vergleich von extra- und intrahepatischen Tumoren wurde der Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit einem p-Wert (Chi-Quadrat) von 0,014 statistisch unterstrichen. 58

Tabelle 19: Verteilung der negativen und positiven Präparate anhand der Verteilung der Percent Points beim IRS für Sirtuin 6. Der Cut Off wurde bei 3 Percent Points gesetzt. Dadurch ergab die Bewertung 101 (44,1%) negative und 128 (55,9%) positive Tumoren im Gesamtkollektiv. Bei allen drei Lokalisationen überwog der Anteil positiv bewerteter Präparate. 62

Tabelle 20: Vorwiegende Lokalisation von Sirtuin 6 innerhalb der Zelle: Kern versus Zytosol. SIRT6 war sowohl im Zellkern als auch im Zytosol nachzuweisen. In der kleinen Gruppe der Gallenblasentumoren waren drei (60%) Präparate überwiegend im Zytosol, ein Präparat (20%) überwiegend im Kern und ein Präparat (29%) ausgeglichen gefärbt. Im paarweisen Vergleich wurde die Gruppe der Gallenblasentumoren aufgrund der kleinen Fallzahl ausgeschlossen. Der Vergleich von extra- und intrahepatischen Tumoren ergab einen statistisch signifikanten Unterschied (p-Wert (Chi-Quadrat) < 0,001) zwischen den beiden Lokalisationen. Es zeigte sich ein Übergewicht (55,8%) an iCCC, die überwiegend Kernfärbung zeigten, wohingegen etwa zwei Drittel (67,6%) der eCCC SIRT6 überwiegend im Zytosol aufwiesen. 63

Tabelle 21: Verteilung der negativen und positiven Leberpräparate anhand der Verteilung der Percent Points beim IRS für Sirtuin 6, Cut Off bei drei (140) Percents Points. Es ergab sich eine Verteilung von 98 (51,9%) negativen und 91 (48,1%) positiven Leberpräparaten. Bei allen Tumorlokalisationen war die Verteilung von positiven und negativen Leberpräparaten in etwa ausgeglichen. 65

Tabelle 22: Kreuztabelle Argpyrimidin-Nachweis in Abhängigkeit zum Alter. Oben: im Gesamtkollektiv, unten: gesondert für extrahepatische CCCs. Vorwiegend Patienten ≥ 65 Jahre mit extrahepatischen Tumoren zeigten Argpyrimidin vermehrt im Tumorgewebe (81,8%). Der Unterschied wurde mit einem p-Wert (Chi-Quadrat) von 0,037 unterstrichen. 66

Tabelle 23: Kreuztabelle Argpyrimidin-Nachweis in Abhängigkeit zur Tumorlokalisation. Der prozentuale Anteil Argpyrimidin-positiver Tumoren ist beim eCCC (69,1%) höher als beim iCCC (55,1%). Der p-Wert (Chi-Quadrat) lag bei 0,055. 67

Tabelle 24: Kreuztabelle Argpyrimidin-Expression in Abhängigkeit zur Tumorgroße. Kleinere Tumoren (Tis-T2) scheinen eher Argpyrimidin-positiv zu sein als größere Tumoren (T3-T4) (p (Chi-Quadrat) = 0,014). 67

Tabelle 25: Kreuztabelle Argpyrimidin-Nachweis und der Tumorgroße bei Patienten mit eCCC. Hier zeigte sich der Zusammenhang zwischen Argpyrimidin-Positivität und Tumorgroße ≤ T2 noch deutlicher (p (Chi-Quadrat) < 0,001). 68

Tabelle 26: Zusammenhang zwischen dem Argpyrimidin-Nachweis und dem UICC-Stadium bei Patienten mit eCCC: bei Tumoren im früheren Krankheitsstadium (UICC 0-2) konnte in 82,1% der Fälle Argpyrimidin im Tumor nachgewiesen werden. Bei Patienten mit UICC-Stadium 3 oder 4 waren es nur noch 57,9% (p (Chi-Quadrat) = 0,06) 68

Tabelle 27: Zusammenhang zwischen dem Argpyrimidin-Nachweis in der Leber und der Lokalisation des Primarius. Sowohl bei intrahepatischen als auch bei extrahepatischen Präparaten konnte im Großteil der Fälle eine Leberfärbung nachgewiesen werden. Es fiel jedoch auf, dass nahezu in jedem extrahepatischen Präparat (96,1%), jedoch nur in etwa vier Fünftel aller intrahepatischen Präparate (81,7%), Argpyrimidin-positive Leber zu finden war. Der Unterschied zeigte sich mit einem p-Wert (Chi-Quadrat) von 0,016. 69

Tabelle 28: Zusammenfassende Tabelle zu den Überlebenszeiten in verschiedenen Subgruppenanalysen bezogen auf den Argpyrimidin-Nachweis im Tumor 70

Tabelle 29: Kreuztabelle SIRT6-Nachweis und Alter. Patienten unter 65 Jahren zeigten eine ausgeglichene Verteilung zwischen SIRT6-positiven und -negativen Tumoren, wohingegen

ältere Patienten mit 61,7% etwas mehr SIRT6-positive Tumoren aufwiesen (p (Chi-Quadrat) = 0,084).....	75
Tabelle 30: Kreuztabelle SIRT6-Nachweis und Nikotinabusus. Trotz der eher geringen Fallzahl an Rauchern im Patientenkollektiv zeigte sich bei den Patienten mit Nikotinkonsum ein Übergewicht an SIRT6-positiven Tumoren (p (Chi-Quadrat) = 0,026).	75
Tabelle 31: Kreuztabelle SIRT6-Nachweis und Alter für iCCCs. Ältere Patienten (≥ 65 Jahre) mit intrahepatischen Tumoren schienen häufiger SIRT6-positive Tumoren zu zeigen als jüngere Patienten mit iCCC: 63,3% versus 46,8% (p (Chi-Quadrat) = 0,053).....	76
Tabelle 32: Kreuztabelle Sirtuin6-Nachweis im Tumor und Serumalbumin. Bei Patienten mit normwertigem Serumalbumin zeigte sich ein Übergewicht (70,4%) von Fällen, bei denen der Tumor SIRT6-positiv war, bei Patienten mit erniedrigtem Serumalbumin war die Verteilung an SIRT6-positiven und SIRT6-negativen Tumoren in etwa ausgeglichen. p (Chi-Quadrat) = 0,013.	77
Tabelle 33: Kreuztabelle Lokalisation (Kern versus Zytosol) des überwiegenden SIRT6-Nachweises und Tumorcharakteristika. Bei extrahepatischen Karzinomen fand man SIRT6 vorwiegend im Zytosol, bei intrahepatischen CCC eher im Nukleus (p-Wert (Chi-Quadrat) < 0,001). Die Lokalisation des SIRT6-Nachweises zeigte sich in einem Zusammenhang zur Tumorgröße (p (Chi-Quadrat) = 0,013), dem Nachweis von Lymphknotenmetastasen (p (Chi-Quadrat) = 0,039) und dem konsekutiv höheren UICC-Stadium (p (Chi-Quadrat) < 0,001).	78
Tabelle 34: Kreuztabelle SIRT6-Nachweis im Tumor und in der Leber. Für intrahepatische Tumoren lässt sich ein Zusammenhang zwischen dem SIRT6-Nachweis von Tumor- und umgebendem Lebergewebe feststellen: zeigt sich der Tumor positiv auf SIRT6, so ist in 69% der Fälle auch die Leber positiv. Andersherum waren 77,4% der SIRT6-negativen Tumoren auch ohne Nachweis des immunhistochemischen Markers in der Leber (p (Chi-Quadrat) < 0,001).....	79
Tabelle 35: Zusammenfassende Tabelle zu den medianen Überlebenszeiten in verschiedenen Subgruppenanalysen bezogen auf den SIRT6-Nachweis im Tumor.....	80
Tabelle 36: Kreuztabelle über den Zusammenhang zwischen Argpyrimidin- und SIRT6-Koexpression. Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Argpyrimidin und SIRT6 im Tumor (p (Chi-Quadrat, exakter Test nach Fischer) = 0,279)....	92
Tabelle 38: TNM-Klassifikation der extrahepatischen Gallengangskarzinome.....	119
Tabelle 39: TNM-Klassifikation der Gallenblasenkarzinome	119
Tabelle 40: UICC-Stadien für perihiläre Gallenganskarzinome	120
Tabelle 41: UICC-Stadien für distale extrahepatische Gallengangskarzinome	120
Tabelle 42: UICC-Stadien für Gallenblasenkarzinome	121
Tabelle 43: Liste der verwendeten Materialien	121
Tabelle 44: Paarweise Vergleiche der stetigen Variablen aus Tabelle 9 und Tabelle 10....	124
Tabelle 45: Kreuztabelle über den Zusammenhang zwischen Tumorgröße und Differenzierungsgrad. Es zeigte sich, dass kleinere Tumoren (kleiner T3) häufiger ein besseres histopathologisches Grading aufwiesen als große Tumoren.p-Wert (Chi-Quadrat) = 0,048.	125
Tabelle 46: Zusammenschau der erhobenen Laborparameter im Gesamtkollektiv und aufgeteilt nach Tumorlokalisation. Für GOT, GPT und CA 19-9 sind ebenfalls die Mediane mit Interquartilabstand (IQA) aufgeführt.	125
Tabelle 47: Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich von Männern und Frauen hinsichtlich der Verteilung der Percent Points des IRS für Argpyrimidin. Mit einer asypmtomatischen Signifikanz von 0,431 zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern.....	128
Tabelle 48: Kreuztabellen zur Korrelation zwischen Argpyrimidinnachweis im Tumor und Geschlecht, Alkohol- und Nikotinabusus sowie Nachweis eines Diabetes mellitus Typ 2. Bei keinem der patientenspezifischen Parameter zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang (p = 0,499, 1, 0,828 und 0,695)	129
Tabelle 49: Kreuztabellen zur Korrelation zwischen Argpyrimidinnachweis im Tumor und Lymphknoten- sowie Fernmetastasenstatus, UICC-Stadium und Tumorgrading. Bei keinem der tumorspezifischen Parameter zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang (p = 0,31, 0,225, 0,213 und 0,748).....	130

Tabelle 50: Kreuztabellen Argpyrimidinnachweis im Tumor und Laborparameter. Hierbei ergab sich für keinen der erhobenen Laborparameter ein statistisch signifikanter Zusammenhang.	131
Tabelle 51: Kreuztabelle für den Sirtuin 6 Nachweis im Tumor und tumorspezifischer Charakteristika. Hier ließ sich keine statistisch signifikante Korrelation erheben.	133
Tabelle 52: Kreuztabellen Sirtuin 6-Nachweis im Tumor und erhobene Laborparameter. ..	133
Tabelle 53: Kreuztabelle zwischen SIRT6-Nachweis in der den Tumor umgebenden Leber und der Tumorgroße. Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Tumorgroße und dem Nachweis von SIRT6 in der den Tumor umgebenden Leber (p-Wert (Chi-Quadrat) = 0,641).	134
Tabelle 54: Kreuztabelle zwischen SIRT6-Nachweis in der den Tumor umgebenden Leber und dem Alter. Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Nachweis von SIRT6 in der den Tumor umgebenden Leber (p-Wert (Chi-Quadrat) = 1).	134
Tabelle 55: Kreuztabelle zwischen SIRT6-Nachweis in der den Tumor umgebenden Leber und dem Fernmetastasenstatus. Es zeigte sich nur eine Tendenz eines Zusammenhangs zwischen Fernmetastasenstatus und dem Nachweis von SIRT6 in der den Tumor umgebenden Leber (p-Wert (Chi-Quadrat) = 0,103)	135
Tabelle 56: Kreuztabelle über den Zusammenhang zwischen Tumorgroße und Differenzierungsgrad. Es zeigte sich, dass kleinere Tumoren (kleiner T3) häufiger ein besseres histopathologisches Grading aufwiesen als große Tumoren.p-wert (Chi-Quadrat) = 0,048.	137
Tabelle 57: Kreuztabelle zwischen SIRT6-Nachweis in der den Tumor umgebenden Leber und dem Alter. Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Nachweis von SIRT6 in der den Tumor umgebenden Leber (p-Wert (Chi-Quadrat) = 1).	137

1 Einleitung / Ziel der Dissertation

Das cholangiozelluläre Karzinom (CCC) stellt nach dem hepatozellulären Karzinom (HCC) die zweithäufigste Form primärer maligner Lebertumoren dar. Abhängig von der anatomischen Lokalisation wird das CCC in intrahepatische, extrahepatische – mit weiterer Unterteilung in perihiläre und distale – sowie Gallenwegstumoren klassifiziert. Mit einer Inzidenz von etwa 2–3 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr handelt es sich in Deutschland um eine seltene Tumorerkrankung. Weltweit variiert die Inzidenz jedoch erheblich und zeigt in bestimmten Regionen deutlich höhere Erkrankungsraten.

Ein Großteil der Patientinnen und Patienten wird in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium diagnostiziert, wodurch eine kurative Primärtherapie in vielen Fällen nicht mehr möglich ist. Diese späte Diagnosestellung trägt maßgeblich zur ungünstigen Prognose bei: die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei unter 20 %. Die therapeutischen Ansätze beim lokal begrenzten CCC richten sich nach der Tumorlokalisation und dem Krankheitsstadium und umfassen in der Regel eine chirurgische Resektion und/oder eine systemische Chemotherapie.

Im Kontext der personalisierten Medizin wurden insbesondere die Signalwege des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) sowie des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) intensiv untersucht. Trotz vielversprechender präklinischer Daten zeigten sich in klinischen Studien bislang jedoch keine überzeugenden therapeutischen Erfolge.

Advanced Glycosylation Endproducts (AGE) sind Reaktionsprodukte, die infolge andauernder Zuckerexposition nicht-enzymatisch glykosyliert (= glykiert) werden und nicht nur mit dem natürlichen Alterungsprozess, sondern auch mit der Entstehung und dem Voranschreiten von kardiovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen sowie Krebs in Verbindung gebracht werden. Bei vielen Krebsarten ist die Glykolyse zur Energiegewinnung verstärkt aktiv (anaerobe Glykolyse, Warburg Effekt), bei der als zytotoxisches Stoffwechselnebenprodukt Methylglyoxal anfällt. Argpyrimidin ist ein AGE, welches aus Methylglyoxal und Arginin synthetisiert wird. Im zentralen Nervensystem wurde gezeigt, dass Argpyrimidin spezifische Signalwege moduliert, die zur Entwicklung altersassoziierter Erkrankungen wie der Alzheimer-Krankheit beitragen. Die Akkumulation von Argpyrimidin führt zur Induktion proinflammatorischer Zytokine und einer Zunahme des oxidativen Stresses. In der Folge kommt es zu Schädigungen an Desoxyribonukleinsäure (DNA), Proteinen und anderen zellulären Makromolekülen (1), was eine mögliche Verbindung zwischen AGEs und Tumorentstehung nahelegt. In verschiedenen Tumorentitäten wurden AGEs als potenziell tumorfördernde Faktoren identifiziert. So konnte beispielsweise das AGE S100P im Zusammenhang mit cholangiozellulären Karzinomen (CCC) beschrieben werden (2). Für Argpyrimidin existieren bislang jedoch keine belastbaren Daten zur Rolle in der Karzinogenese des CCC, zum Progressionsverhalten oder zur prognostischen Relevanz.

Sirtuine bilden eine Familie von sieben Isoformen der Klasse-III-Histon-Deacetylasen, die NAD⁺-abhängig (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) wirken und eine Schlüsselrolle in zellulären Prozessen wie Alterung, Zellzyklusregulation und DNA-Reparatur spielen. Insbesondere Sirtuin 6 (SIRT6) wird als potenzieller Tumorsuppressor betrachtet. Es hemmt unter anderem den Warburg-Effekt und trägt zur genomischen Stabilität bei. Als nukleäres Enzym ist SIRT6 eng an das Chromatin gebunden und deacetyliert unter anderem Histon H3 (3). Die funktionelle Rolle von SIRT6 variiert jedoch je nach Gewebe und Tumorentität. Während ein Verlust von SIRT6 in der Leber mit der Entstehung chronischer Lebererkrankungen sowie hepatozellulärer Karzinome assoziiert ist (4), wird eine Überexpression in anderen Tumorarten – beispielsweise im Mamma- oder Pankreaskarzinom – mit einer ungünstigen Prognose in Verbindung gebracht. In diesen Entitäten scheint SIRT6 die Tumorprogression über Förderung von Inflammation, Angiogenese und Zellmigration zu unterstützen (5).

Vor diesem Hintergrund ist es von besonderem Interesse, die Expression und funktionelle Bedeutung von SIRT6 im Kontext des cholangiozellulären Karzinoms systematisch zu untersuchen – sowohl im Hinblick auf intrahepatische im Vergleich zu extrahepatischen Tumoren als auch auf mögliche prognostische Relevanz. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass SIRT6 in bestimmten Tumorarten, wie dem Mammakarzinom, mit einer verminderten Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika assoziiert ist (6), was auch im Kontext des CCC von therapeutischer Bedeutung sein könnte.

Ziel dieser Dissertationsarbeit war die Evaluation der prognostischen und prädiktiven Relevanz der Biomarker Argpyrimidin und Sirtuin 6 im Gallengangskarzinom. In die retrospektive Analyse wurden insgesamt 245 Patientinnen und Patienten eingeschlossen, bei denen im Zeitraum von 1998 bis 2015 ein CCC neu diagnostiziert worden war. Die klinischen Daten (Alter, Risikofaktoren, Laborparameter), tumorbezogene Informationen (Stadium, Lokalisation) sowie therapeutische Maßnahmen (chirurgische Resektion, Chemotherapie, lokalablativ Verfahren) wurden aus dem SAP-Kliniksystem extrahiert, validiert und in einer strukturierten Datenbank erfasst.

Im Rahmen der Primärdiagnostik archivierte Tumorgewebeproben wurden in Kooperation mit dem Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz immunhistochemisch (IHC) auf Argpyrimidin und Sirtuin 6 untersucht. Beide Marker sind mit dem pathologischen Glukosestoffwechsel assoziiert und zeigten in anderen Tumorentitäten bereits eine veränderte Expression.

Die Bewertung der IHC-Färbungen erfolgte anhand der für Mammakarzinome etablierten Immunreaktiven Score (IRS)-Methodik nach Remmele und Stegner. Dabei wurde der IRS als Produkt aus Färbeintensität und dem Anteil positiv gefärbter Tumorzellen berechnet. Auf Basis

der IRS-Werte wurden Cut-off-Werte definiert, um eine Dichotomisierung in "positiv" vs. "negativ" gefärbte Tumoren zu ermöglichen. Bei Sirtuin 6 wurde zusätzlich die subzelluläre Lokalisation (nukleär vs. zytosolisch) dokumentiert sowie die Expression im nicht-neoplastischen Lebergewebe erfasst.

Die Färbeergebnisse wurden im Anschluss mit klinisch-pathologischen Parametern korreliert, um potenzielle prognostische Zusammenhänge zu identifizieren.

Hypothese

Die Nullhypothese (H_0) lautete, dass der Nachweis von Argpyrimidin oder Sirtuin 6 im Tumorgewebe keinen Einfluss auf das Überleben sowie auf patienten- oder tumorspezifische Merkmale hat. Ziel der Arbeit war es, diese Hypothese zu widerlegen.

Nebenhypothesen umfassten:

- die Bedeutung der subzellulären Lokalisation von Sirtuin 6 (Kern vs. Zytosol) für die Prognose, insbesondere beim intrahepatischen CCC,
- sowie einen möglichen Zusammenhang zwischen der Sirtuin-6-Expression im umgebenden Lebergewebe und dem Tumorverhalten.

2 Literaturdiskussion

2.1 Cholangiozelluläre Karzinome

Das cholangiozelluläre Karzinom (im Folgenden CCC) ist der zweithäufigste primäre Lebertumor nach dem hepatozellulären Karzinom (HCC). Es handelt sich um epitheliale Neoplasien der intrahepatischen und ableitenden Gallenwege sowie des Gallenblasenepithels. Sie werden anhand ihrer anatomischen Lage in intrahepatische (iCCC), extrahepatische (eCCC) und Gallenblasenkarzinome (GBT, inklusive Ductus cysticus) unterteilt, wobei die eCCCs weiterführend in perihiläre (pCCC, Synonym: Klatskin-Tumor) und distale (dCCC) Karzinome differenziert werden können (7). Bisher konnte gezeigt werden, dass diese Subtypen sich nicht nur anhand ihrer Lokalisation unterscheiden, sondern auch Abweichungen bei ihren klinisch-pathologischen Merkmalen, Risikofaktoren und Mutationsprofilen aufweisen (8), (9). Anhand der 10. Version der internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (englisch: International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, ICD-10) werden intrahepatische Gallengangskarzinome den primären Leberneoplasien zugeordnet (C22.1), wohingegen die extrahepatischen Karzinome eine eigene Entität, verschlüsselt mit ICD 10 C24.0, darstellen (vgl. Tabelle 1, Tabelle 2). Gallenblasenkarzinome sind in der ICD-10 mit der Ziffer C23 kodiert. Die überarbeitete Version des ICD (ICD-11, 2022) existiert bereits, wird aus lizenzrechtlichen Gründen in Deutschland jedoch noch nicht verwendet und findet daher auch in dieser Arbeit keine Anwendung (Stand August 2025).

Tabelle 1: ICD-10 Code: C22.- Bösartige Neubildung der Leber und der intrahepatischen Gallengänge

C22.- Bösartige Neubildung der Leber und der intrahepatischen Gallengänge

Exkl.: Gallenwege o. n. A. (C24.9)

Sekundäre bösartige Neubildung der Leber (C78.7)

C22.0	Leberzellkarzinom Inkl.: Carcinoma hepatocellulare
C22.1	Intrahepatisches Gallenganskarzinom Inkl. Cholangiokarzinom
C22.2	Hepatoblastom
C22.3	Angiosarkom der Leber Inkl.: Kupffer-Zell-Sarkom
C22.4	Sonstiger Sarkome der Leber
C22.7	Sonstige nicht näher bezeichnete Karzinome der Leber
C22.9	Leber, nicht näher bezeichnet

Modifiziert nach: (10)

Tabelle 2: ICD-10 Code: C24.- Bösartige Neubildung sonstiger nicht näher bezeichneter Teile der Gallenwege

C24.- Bösartige Neubildung sonstiger und nicht näher bezeichneter Teile der Gallenwege**Exkl.: intrahepatischer Gallengang (C22.1)****C24.0** Extrahepatischer Gallengang

Inkl.: Ductus choledochus

Ductus cysticus

Ductus hepaticus

Ductus hepaticus communis

Gallengang o.n.A.

C24.1 Ampulla hepatopancreatica [Ampulla Vateri]**C24.8** Gallenwege, mehrere Teilbereiche überlappend

Inkl.: Bösartige Neubildung der Gallenwege, deren Ursprungsort nicht unter den Kategorien C22.0-C24.1 klassifiziert werden kann

Bösartige Neubildung mit Beteiligung sowohl der intra- als auch der extrahepatischen Gallengänge

C24.9 Gallenwege, nicht näher bezeichnet

Modifiziert nach: (11)

In Anbetracht der ICD-10 Verschlüsselung fiel bis 2003 auf, dass perihiläre Tumoren nicht eindeutig zugeordnet werden können. So wurde sowohl die Kodierung C22.1 als auch C24.0 für diese Tumorlokalisation verwendet, was in der Vergangenheit zu fehlerhaften epidemiologischen Trends führte, auf die im Weiteren noch eingegangen wird.

2.2 Epidemiologie

2018 wurden in Deutschland etwa 5080 Gallengangskarzinome außerhalb der Leber (ICD C23 und C24) diagnostiziert, von denen etwa 27% (etwa 1370) in der Gallenblase lagen. Intrahepatische CCC waren im gleichen Jahr etwa 2470 zu verzeichnen (26% der etwa 9500 primären Lebertumoren). Daraus ergibt sich folgende Verteilung der Gallenganskarzinome von intrahepatisch: 32,7%, extrahepatisch: 49,1%, Gallenblase: 18,2% (12). Autopsiestudien suggerieren jedoch, dass Gallenblasenkarzinome mit 80 bis 95% den weitaus größten Anteil der Karzinome des Gallesystems einnehmen (13).

Mit einer Inzidenz von 2-3 Neuerkrankungen/100.000 Einwohner/Jahr handelt es sich in Deutschland um eine seltene Erkrankung. Global ist eine ungleiche Inzidenz auffällig: der Nordosten von Thailand ist die Region mit der höchsten Inzidenz weltweit, insgesamt erkranken hier 85 Menschen pro 100.000 Einwohner pro Jahr an einem cholangiozellulären Karzinom (14). Dabei scheint die unterschiedliche Risikoexposition, im Speziellen der Befall der

Gallenwege durch Leberegel (z. B. *Opisthorchis viverrini* und *Clonorchis sinensis*), maßgeblich an der erhöhten Inzidenz beteiligt zu sein (15).

Im Allgemeinen wird das CCC häufig erst in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien diagnostiziert, sodass nur 20-30% der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung kurativ behandelt werden können (16). Dies ist ein Erklärungsansatz dafür, wieso das CCC eine schlechte Fünfjahresüberlebensrate (5-JÜR) aufweist. Diese wird vom Zentrum für Krebsregisterdaten vom Robert-Koch-Institut (RKI) mit unter 20% angegeben (extrahepatische CCC: 14% für Frauen und 17% für Männer, primäre Lebertumoren: 12% für Frauen und 15% für Männer) (17).

Wie auch beim hepatozellulären Karzinom (HCC) sind Männer in Deutschland vom CCC etwas häufiger betroffen als Frauen (in 2018: 2700 vs. 2380 Neuerkrankungen absolut, standardisierte Neuerkrankungsrate Männer: 3,5 pro 100.000 Einwohner pro Jahr, Frauen: 3 pro 100.000 Einwohner pro Jahr (17), (18) bei einer Verteilung von 50,7% Frauen und 49,3% Männer im Jahr 2018, (19)). Eine Ausnahme bildet das Gallenblasenkarzinom, welches bei Frauen häufiger auftritt als bei Männern (20). Die amerikanische Krebsdatenbank SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) berichtet über ein ähnliches Geschlechterverhältnis (21). Sowohl bei Männern als auch bei Frauen überwiegt der Anteil an Karzinomen des Galleepithels außerhalb der Leber (iCCC bei Männern: 17%, iCCC bei Frauen: 36%) (12).

Bei weiblichen Individuen ist ein leichter Inzidenzrückgang für eCCC und Gallenblasen-Karzinomen (von 2,2 auf 1,9/100.000/a und von 3,1 auf 1,1/100.000/a im Zeitraum von 1999 bis 2018) zu verzeichnen, wohingegen die standardisierte Neuerkrankungsrate für Männer mit eCCC in den Jahren 1999 bis 2018 und in der Prognose für 2022 weitestgehend konstant bleibt (18), vgl. Abbildung 1.

je 100.000 (alter Europastandard)

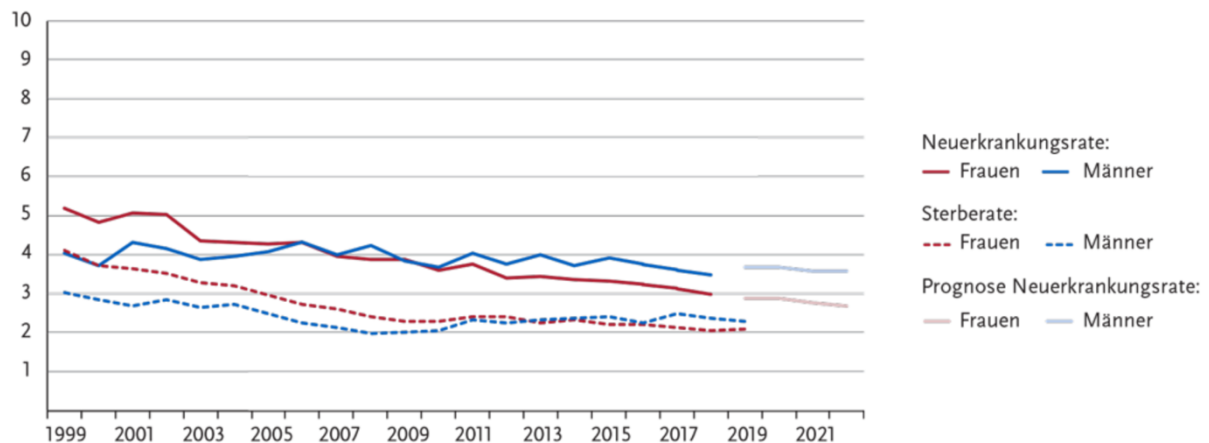


Abbildung 1: Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten nach Geschlecht, ICD-10 C23 -C24, Deutschland 1999-2018/2019. Während die Inzidenz der eCCC und der Gallenblasenkarzinome bei Männern weitestgehend konstant blieb (2,8 zu 2,9/100.000/a), kam es im Zeitraum von 1999 bis 2018/19 zu einem deutlichen Inzidenzrückgang bei Frauen (2,2 zu 1,9/100.000/a).

Aus: (17)

Da die intrahepatischen Gallengangskarzinome durch das Zentrum für Krebsregisterdaten unter den Inzidenzen für Leberkarzinomen aufgeführt werden, ist die Bewegung für iCCC der Inzidenzen für den oben genannten Zeitraum nicht eindeutig auszumachen. Dennoch wird eine steigende Tendenz deutlich, die Walter et al für den Zeitraum von 2003 bis 2014 bestätigen: Männer: etwa 1,05 auf etwa 1,85/100.000 pro Jahr und Frauen: etwa 0,75 auf etwa 1,25/100.000 pro Jahr (8), vgl. Tabelle 3.

Tabelle 3: Inzidenz je 100.000 Einwohner: Gallengangskarzinome im Jahr 1999 versus 2018

Diagnose	Geschlecht	Bevölkerungsstandard 1999	Bevölkerungs- standard 2018
Leber (C22)	Weiblich	3,1	3,5
	Männlich	7,8	10,3
Gallenblase (C23)	Weiblich	3,1	1,1
	Männlich	1,3	0,6
Extrahepatische Gallenwege (C24)	Weiblich	2,2	1,9
	Männlich	2,8	2,9

Modifiziert aus: (20)

Für die Inzidenzzunahme der intrahepatischen Gallengangskarzinome werden mehrere Ursachen diskutiert. Zum einen ist die Diagnosestellung präziser geworden. Tumoren, die früher zunächst als Krebserkrankung mit unbekanntem Primärtumor (Cancer of Unknown Primary (CUP)) diagnostiziert wurden, können heute eindeutiger dem Ursprungsgewebe zugewiesen werden. Immunhistochemische Marker werden immer spezifischer, sodass ein (intrahepatisches) Gallenganskarzinom, obwohl es viele Marker (z. B. Cytokeratin 7 und 19) mit anderen Tumoren teilt, seltener mit einer Metastase verwechselt wird (22). Des Weiteren haben sich die Diagnosestandards allgemein verbessert, sodass Tumoren möglicherweise früher erkannt werden können. Überdies konnte in den USA neben dem vermehrten Auftreten von iCCC auch eine gehäufte Prävalenz von primär sklerosierender Cholangitis (PSC), einem Risikofaktor für das CCC, festgestellt werden (23).

Gegen die Theorie, dass sich der Inzidenzanstieg nur durch gebesserte Diagnosemöglichkeiten und dem Inzidenzanstieg von PSC-Patienten mit jungem Erkrankungsalter (mittleres Erkrankungsalter von 40 Jahren, (24)) erklären lässt, spricht, dass sich die Tumorgöße im Mittel nicht verkleinert hat (was für eine frühere Diagnosestellung sprechen könnte) und sich das mittlere Erkrankungsalter für iCCC nicht nach vorne verlegt hat (was für mehr iCCC aufgrund von PSC sprechen könnte) (25).

Für einen echten Inzidenzanstieg spricht, dass der Anstieg von intrahepatischen Gallengangskarzinomen über alle ethnischen Gruppen und Regionen der USA gleich war und so nicht auf einen spezifischen Risikofaktor geschlossen werden kann. Partel et al. fordern dafür jedoch risikofaktorenspezifische Untersuchungen ein (22).

So kann man zusammenfassen, dass sich sowohl die Erklärungsansätze der verbesserten Früherkennung und Diagnosestellung als auch der PSC nicht halten können. Umso mehr spricht es dafür, dass es sich bei dem Inzidenzanstieg für intrahepatische Gallengangskarzinome um ein wahres Phänomen handelt. Insgesamt hat sich die Lebergesundheit aufgrund steigender Risikofaktoren (chronische Hepatitis B oder C, Diabetes mellitus Typ II, Übergewicht und Alkoholkonsum) so sehr verschlechtert, dass auch hier der Anstieg an Neuerkrankungen, vor allem des intrahepatischen CCC, zu erklären ist. Zudem ergibt sich durch den demographischen Wandel eine im Schnitt immer ältere Gesellschaft, in der insgesamt auch mehr Krebserkrankungen auftreten (26).

Abschließend sei noch angemerkt, dass das ICD-O 2 (International Classification of Diseases for Oncology) (von 1992 bis 2000) Klatskin-Tumoren den intrahepatischen CCC zugeordnet hat (27). Dies führte zu einer Überschätzung der Inzidenz von intrahepatischen um 13% und einer Unterschätzung von extrahepatischen Gallengangskarzinomen um 15% in den USA

(28). Von ähnlichen Verzerrungen ist in Deutschland auszugehen. In der nachfolgenden Ausgabe des ICD-O (ICD-O 3 ab 2000) wurden perihiläre Tumoren (= Klatskin-Tumoren) den extrahepatischen Tumoren zugeordnet (29). Dennoch zeigte sich auch nach Bereinigung dieser Fehlzusammenordnung immer noch ein Inzidenzanstieg der intrahepatischen Gallengangskarzinome. Die Auswirkung dieser Fehlklassifikation in Deutschland wurden von Walter et al. untersucht und zeigte einen Rückgang der Fehlklassifizierung des pCCC als iCCC (8).

2.3 Risikofaktoren

Obwohl die meisten Gallengangskarzinome sporadisch entstehen (30), konnten spezifische Risikofaktoren herausgearbeitet werden. Beim cholangiozellulären Karzinom gelten allgemeine Risikofaktoren wie Adipositas, Diabetes mellitus sowie Alkoholabusus (31). Maßgebliche Risikofaktoren, die die Leber und Gallenwege betreffen, sind beispielsweise Cholelithiasis, chronisch-bakterielle Cholangitiden und Hepatitis-B und -C-Infektionen. Ihnen allen ist gemein, dass sie mit einer (chronischen) Entzündung und einem vermehrten Zellumsatz einhergehen. Choledochuszysten scheinen das höchste Risiko für sowohl intra- als auch extrahepatische Tumoren aufzuweisen (Relatives Risiko 26,7 bzw. 34,9, (32)). Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, am ehestens wegen ihrer Komorbidität mit der primär sklerosierenden Cholangitis (PSC), sind ebenfalls als Risikofaktor zu nennen. Bergquist et al. sprechen in diesem Zusammenhang in ihrer schwedischen PSC-Kohorte über ein Lebenszeitrisko, ein Gallengangskarzinom zu entwickeln, von bis zu 13% (33). Ähnliche Ergebnisse erzielten Claessen et al. in einem niederländischen Kollektiv mit 9% (34). Dies erklärt, wieso PSC-Patienten empfohlen wird, ein- bis zweimal jährlich mittels Bildgebung (Sonographie im Wechsel mit Magnetresonanztomographie (MRT) inkl. Magnetresonanzz-Cholangiopankreatikographie (MRCP)) und Bestimmung des Tumormarkers CA 19-9 an einem Screening auf CCC teilzunehmen. Diese Notwendigkeit ergibt sich auch, wenn Gallenblasenpolypen vorliegen (35).

Die Risikofaktoren für intra- und extrahepatische CCC überschneiden sich weitestgehend, wobei das Vorliegen des metabolischen Syndroms (abdominelle Fettleibigkeit, arterieller Bluthochdruck, Fettstoffwechselstörungen (LDL ↑, HDL ↓), Insulinresistenz/Glucosetoleranzstörung) signifikant mit dem Auftreten eines iCCC in Verbindung zu bringen ist (36), (37).

In Südostasien liegt die Inzidenz der intrahepatischen Gallengangskarzinome um ein Vielfaches höher als in Deutschland (14, 26), wohingegen die Inzidenz des extrahepatischen CCC weltweit nahezu gleich ist. Dieses vermehrte Auftreten von iCCC kann auf die Infektion mit Leberegelern wie *Opisthorchis viverrini* oder *Clonorchis sinensis*, aber auch auf die erhöhte Inzidenz von Hepatolithiasis und Gallengangszysten (38), zurückgeführt werden. Die Parasiten steigen

vom Duodenum über die Ampulla duodeni Vateri in Richtung intrahepatischer Gallenwege hinauf, wo es dann zu einer chronischen Entzündungsreaktion kommt. Dies erklärt, wieso die Egel vor allem als Risikofaktor für intrahepatische Karzinome gelten.

Risikofaktoren, die speziell für das Karzinom in der Gallenblase gelten, scheinen weibliches Geschlecht, Cholelithiasis, Porzellangallenblase, Gallenblasenpolypen (vor allem > 10 mm) sowie chronische bakterielle Infektionen mit *Salmonella typhi* oder *Helicobacter bilis* zu sein (39), (40).

Zuletzt sei noch erwähnt, dass sich bei gut einem Zehntel der Patienten mit dem seltenen Caroli-Syndrom ein CCC entwickelt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass neben allgemeinen Risikofaktoren insbesondere chronische Entzündungszustände der Gallenwege als bedeutender Risikofaktor für die Entwicklung von biliären Karzinomen zu nennen sind.

2.4 Genomanalysen und Karzinogenese

Aufgrund der Heterogenität von Gallengangstumoren scheint es nahezu unumgänglich, die Gene hinsichtlich Karzinomentstehung, Klassifizierung und letztendlich auch Therapie zu analysieren. Wardell et al. haben in einer Sequenzierung (whole-exome sequencing (WES), whole-genome sequencing (WGS) und targeted sequencing) von 412 japanischen und italienischen Patienten mit Tumoren der Gallenwege 32 Gene herausgestellt, die signifikant häufig mutiert waren. Dabei handelt es sich sowohl um somatische (unter anderem TP53, KRAS) als auch Keimbahnmutationen (unter anderem BRCA1, BRCA2) (41).

Schon 2014 wiesen Nakamura et al. nach, dass 40 % der BTC (biliary tract cancer)-Patienten in ihrer Kohorte Mutationen aufwiesen, die potenzielle therapeutische Targets darstellen (42). Dabei ist festzuhalten, dass sich die genetischen Variationen je nach Tumorlokalisation unterschieden. Die untenstehende Abbildung 2 fasst die Lokalisations-spezifischen, aber auch die überlappenden, Genmutationen zusammen.

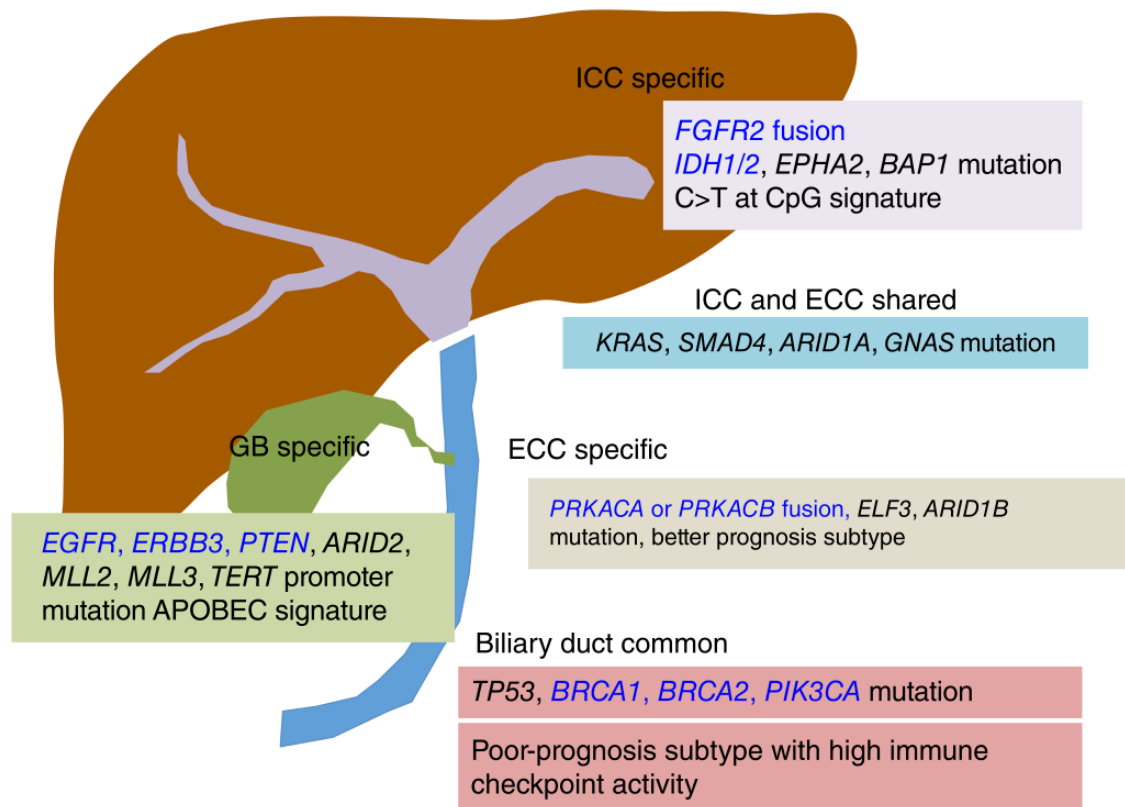


Abbildung 2: Subtypspezifische und sich überschneidende Veränderungen abhängig von der Tumorlokalisation. Man erkennt sowohl somatische (unter anderem *TP53*, *KRAS*) als auch Keimbahnmutationen (unter anderem *BRCA1*, *BRCA2*).

Aus: (42)

Die Karzinogenese wird im Wesentlichen gefördert durch „Zytokine, Zelltod in Verbindung mit Zunahme der Zellproliferation sowie Veränderungen der Leber in Form von Fibrose“, wobei jedoch nicht jeder Patient mit (intrahepatischem) CCC eine zugrundeliegende Zirrhose aufweist (43).

Nachdem die Rolle der Hepatitis B- und C-Viren in ihrer Funktion als Onkoviren lange Zeit kontrovers diskutiert wurde, stellen Zhou et al. in einer Metaanalyse 2012 fest, dass Patienten mit Virus-bedingter Zirrhose nicht nur Dysplasien der Gallengansepithelien aufweisen, sondern auch intrahepatische Gallengangskarzinome entwickeln (44). Weiterführende Studien legen nahe, dass das Risiko je nach Ethnie unterschiedlich erhöht ist. Wang et al. zeigen, dass die kaukasische Bevölkerung bei Hepatitis-C-Virus (HCV)-Infektion ein gesteigertes Risiko im Vergleich zur asiatischen Bevölkerung aufweist (Odds Ratio (OR) = 3.93 vs. 1.51, $p = 0.014$), wohingegen das Risiko bei HBV (Hepatitis-B-Virus)-Infektion nahezu gleich erhöht ist (45). Entscheidende Rolle für die Karzinogene scheinen Virusproteine, beispielsweise das Protein X (HBx) und das HCV-Kernprotein, zu spielen. Sie modulieren unter anderem die Transkription, den Proteinabbau und die Reaktion auf zytotoxischen Stress (46), (47).

2.5 Makroskopie und Histologie

2.5.1 Intrahepatisches CCC

Intrahepatische Gallengangkarzinome betreffen alle distal des rechten und linken Ductus hepaticus gelegenen Gallengänge, von den segmentalen Gallengängen bis zu den kleinsten Verzweigungen in die Leberperipherie. Anhand ihrer Wachstumsform können drei Typen unterschieden werden: mass-forming, periduktal-infiltrierend und prädominant-intraduktal. Ersterer ist mit über 50% die häufigste Form und wächst solide. Im Anschnitt zeigt sich eine grau-weiße Schnittfläche und ist so vom HCC mit seinem eher grünlichen Anschnitt zu unterscheiden. Der periduktal-infiltrierende Typ breitet sich entlang der Gallengänge aus, sodass diese fibrosiert erscheinen. Finden sich dilatierte Gallengänge, in die polypoide oder papilläre Tumormassen einwachsen, spricht man vom intraduktalen Typ, welcher die seltenste Form ausmacht. Je größer der Gallengang ist, desto eher findet sich ein intraduktales Wachstum, wobei Kombinationen dieser Subtypen möglich sind. Histopathologisch kann das intrahepatische CCC weiterführend in zwei Typen unterschieden werden: Karzinome vom „small duct“- und vom „large duct“-Type. Die Karzinome vom „large duct type“ erinnern an extrahepatische cholangiozelluläre Läsionen, wohingegen sich Karzinome vom „small duct type“ in ätiopathologischen und radiologischen Charakteristika mit dem HCC überschneiden (48).

Histologisch handelt es sich in den meisten Fällen um Adenokarzinome glandulärer oder tubulärer Differenzierung. Neben den Adenokarzinomen finden sich deutlich seltener adenosquamöse und Plattenepithelkarzinome, Siegelringzell- oder muzinös differenzierte CCC sowie sarkomatoide Läsionen.

Die kubischen Epithelzellen weisen karzinombedingte Veränderungen wie Atypien, Mitosen und Kernnukleolen auf. Typisch sind Gallengangsproliferate in der Tumorperipherie, die durch Galleabflussstörungen entstehen, sowie eine ausgeprägte desmoplastische Bindegewebsreaktion, welche den gesamten Tumor durchziehen kann. Des Weiteren kann man als Zeichen der Malignität häufig eine Perineuralscheideninfiltration und eine Infiltration entlang der Lebersinusoide ausmachen. Die Portalfelder der Leber können vom Tumor ausgespart sein. Finden sich atypische Cholangiozyten innerhalb der dem Tumor benachbarten Portalfelder, spricht man von biliären intraepithelialen Neoplasie (BillIN). Diese gilt neben der intraduktalen papillären Neoplasie (IPN) als Karzinomvorläufer.

Bemerkenswert ist eine hohe Variabilität des Differenzierungsgrads (gut, mäßig, schlecht differenziert) in verschiedenen Arealen eines einzigen Tumors (49), (50), (51).

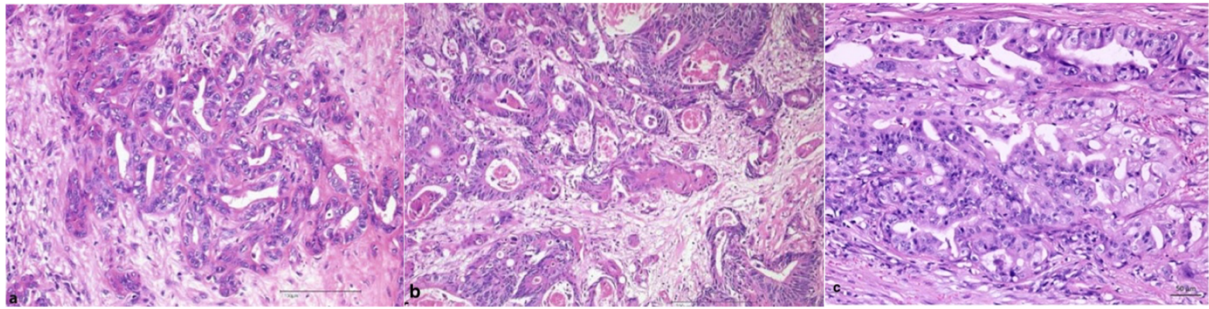


Abbildung 3: Differenzierungsgrad von Gallengangskarzinomen: **a** histologisches Bild eines gut differenzierten tubulären Adenokarzinoms mit deutlicher desmoplastischen Stromareaktion. **b** Karzinom mit mäßiger Differenzierung, erkennbar an den tubulären, kribriformen und mikropapillären Anteilen. **c** schlecht differenziertes Cholangiokarzinom mit deutlichen Atypien und Polymorphien.

Aus: (49)

Selten sind gemischte Tumoren aus hepatozellulären und cholangiozellulären Karzinomen zu finden. Dies deutet darauf hin, dass eine Untergruppe des iCCC einer hepatischen Progenitorzelle entstammt. Diesen Typ nennt man dann cholangiozellulär und er entsteht in den kleinen Hering-Kanälchen, in denen die Progenitorzellen zu finden sind (52).

2.5.2 Extrahepatisches CCC

Extrahepatische Gallenganskarzinome nehmen ihren Ausgang vom rechten und linken Ductus hepaticus bis zur Papilla duodeni major (Vateri). Befindet sich das Karzinom am Zusammenfluss des rechten und linken Ductus hepaticus, spricht man vom perihilären oder Klatskin-Tumor, welche nach der Bismuth-Corlette-Klassifikation unterteilt werden können (s. u.). Histopathologisch können sie nicht von intrahepatischen Gallengangstumoren unterschieden werden (siehe Kapitel 2.2 Epidemiologie). Nach dem Zufluss des Ductus cysticus (also ab dem Ductus choledochus) werden die Läsionen den distalen Karzinomen zugeordnet.

2.5.2.1 Bismuth-Corlette-Klassifikation

Die vier Kategorien der Bismuth-Corlette-Klassifikation dienen der Lokalisationszuordnung perihilärer Tumoren. Daraus folgt eine Abschätzung der Operabilität hilärer Gallengangskarzinome. Der untenstehenden Abbildung 4 und der Tabelle 4 sind die Charakteristika zu entnehmen.

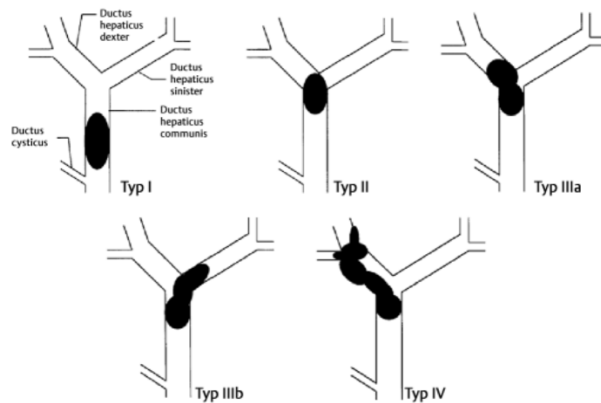


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Klassifikation der Klatskin-Tumoren in Anlehnung an Bismuth und Corlette. Typ I: Tumor betrifft den Ductus hepaticus communis distal der Hepatikusgabel; Typ II: Tumor befällt zusätzlich die Hepatikusgabel; Typ IIIa: Tumor befällt die Hepatikusgabel sowie den rechten Hauptast, Typ IIIb: Tumor befällt die Hepatikusgabel sowie den linken Hauptast; Typ IV: Tumor befällt die Hepatikusgabel und beide Hauptäste

Aus: (53)

Tabelle 4: Klassifikation der Klatskin-Tumoren anhand der Klassifikation nach Bismuth und Corlette

Stadium	Erklärung
I	Tumor betrifft den Ductus hepaticus communis distal der Hepatikusgabel
II	Tumor befällt zusätzlich die Hepatikusgabel
III	IIIa: Tumor befällt die Hepatikusgabel sowie den rechten Hauptast IIIb: Tumor befällt die Hepatikusgabel sowie den linken Hauptast
IV	Tumor befällt die Hepatikusgabel und beide Hauptäste

Modifiziert nach: (7) und (54)

2.5.3 Gallenblasenkarzinome

Auch bei Gallenblasenkarzinomen handelt es sich meist um biliär differenzierte Adenokarzinome. Adenosquämöse Mischformen, intestinal-differenzierte, muzinöse, klarzellige sowie hepatoide Karzinome sind möglich, jedoch selten. Unter diese Kategorie fallen nicht nur Karzinome der Gallenblase selbst, sondern auch jene des Ductus cysticus.

2.6 Metastasierung

Eine Metastasierung erfolgt früh und in aller Regel hämatogen in Leber und Peritoneum, alternativ per continuitatem. Bei Erstdiagnose weisen Patienten in bis zu 30% der Fälle bereits Metastasen auf (55).

2.7 Screening

Ein Screening auf biliäre Karzinome bietet sich aufgrund der Seltenheit der Erkrankung nicht für die Gesamtpopulation im Rahmen einer Sekundärprävention an. Patienten mit erhöhtem Risiko durch eine primär sklerosierende Cholangitis sollten ab einem Alter von 20 Jahren alle sechs bis zwölf Monate eine Vorsorge mit Ultraschall, Computertomographie (CT) oder MRT und eine Bestimmung des Serum-CA 19-9 erhalten. Eine ERCP ist nur dann angezeigt, wenn Patienten symptomatisch werden oder die Cholestase beziehungsweise die Strikturen progredient sind (56). Gallenblasenpolypen größer zehn Millimeter haben ein erhöhtes Risiko einer malignen Entartung, weshalb auch hier eine Ultraschallkontrolle angezeigt ist. Gleiches gilt für Patienten mit Gallenblasensludge und -steinen. Park et al. fordern eine „sorgfältige Untersuchung oder eine Cholezystektomie“ dieser Patienten und postulieren, dass auch Polypen unter einer Größe von zehn Millimeter ein Malignitätsrisiko aufweisen. Daher empfehlen sie, Patienten möglichst lang zu überwachen, „damit keine neoplastischen Polypen übersehen werden [...] und Gallenblasenkarzinome im Frühstadium [erkannt und behandelt werden können]“ (39).

2.8 Diagnostik

2.8.1 Apparative Diagnostik

Mittel der ersten Wahl zur Diagnostik von cholangiozellulären Karzinom ist die Schnittbildgebung mittels Computer- und/oder Magnetresonanztomographie (CT/MRT). Gerade die MRT bietet mit der Magnetresonananz-Cholangiopankreatikographie (MRCP) die Möglichkeit, die Gallenwege nicht-invasiv darzustellen. Die CT-Untersuchung dient dann vielmehr dem Staging. Trotz zum Teil charakteristischer radiologischer Merkmale der Tumoren ist eine Biopsie des Tumors zur Diagnosesicherung und vor Einleitung einer Systemtherapie anzustreben. Diese kann durch eine endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikografie (ERCP), alternativ, bei unmöglichem endoskopischen Zugang, durch eine perkutane transhepatische Cholangiographie (PTC) erfolgen. Bei Patienten ohne Fernmetastasen ist die Indikation zur chirurgischen Exploration mit Resektion jedoch großzügig zu stellen. Eine weitere Option der Materialgewinnung stellt endoskopische Ultraschall-geführte Feinnadelpunktion dar. Der endoskopische Ultraschall (EUS) wird ebenfalls für das Staging zur Untersuchung des Lymphknotenstatus genutzt.

Das Staging wird komplettiert durch die Bestimmung der Tumormarker CA (Kohlenhydratantigen) 19-9 und CEA (carcinoembryonales Antigen) sowie eine CT-Untersuchung des Thorax und Abdomen.

2.8.2 Diagnostik durch den Pathologen

Gerade die Schwierigkeit, intrahepatische Läsionen vom hepatozellulären Karzinom (HCC) und extrahepatische Prozesse von Strikturen (durch beispielweise PSC oder anderen entzündlichen Prozessen) abzugrenzen, zeigt die Notwendigkeit der Diagnosestellung durch den Pathologen. Dennoch scheint die Sensitivität der histologischen und zytologischen Tumorsicherung von distalen CCC bei Biopsie mit maximal 70% relativ gering und favorisiert hier wiederum eine postoperative Aufarbeitung des Resektionspräparates nach chirurgischer Entfernung (57).

2.9 Klassifikation

2.9.1 Tumorgrading

Durch den Pathologen erfolgt eine Klassifikation des Tumors nach Grad der Differenzierung. Das Union Internationale Contre le Cancer (UICC) unterscheidet hierbei drei Grade, die von gut differenzierten, dem Ursprungsgewebe ähnlichen, Tumoren (G1), über mäßig (G2) bis schlecht (G3) differenzierten Geweben reichen. In einer erweiterten Variante wird in fünf Kategorien unterteilt (gut, gut-mittel, mittel, mittel-schlecht, schlecht).

2.9.2 TNM-Klassifikation

Durch die oben beschriebenen diagnostischen Verfahren kann im Rahmen des Stagings ein TNM-Stadium festgelegt werden. Dabei fließen Tumorgröße (T), der Lymphknoten- (N) und Fernmetastasenstatus (M) in die Bewertung ein. Der Pathologe kann das TNM-Schema um folgende Punkte erweitern: Invasion in Lymphgefäße (L0/1), Invasion in Venen (V0/1/2), perineurale Invasion (Pn0/1), Resektionsrand (R0/1/2) (58) sowie immunhistochemische Untersuchungsmethoden.

Jede Tumorlokalisation hat ein spezifisches Schema, dem Anhang zu entnehmen sind (vgl. Tabelle 5, Tabelle 38, Tabelle 39). Exemplarisch ist die TNM-Klassifikation des intrahepatischen Gallengangskarzinom aufgeführt.

Intrahepatische Gallenwege

Tabelle 5: TNM-Klassifikation der intrahepatischen Gallengangskarzinome

TNM

Tx	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ (intraduktales Tumor)
T1a	Solitärer Tumor ≤ 5 cm in der größten Ausdehnung ohne Gefäßinvasion
T1b	Solitärer Tumor > 5 cm in der größten 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
Nx	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Lymphknoten tumorfrei
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
Mx	Fernmetastasen nicht beurteilbar
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden

Modifiziert nach: (59)

2.9.3 UICC

Das UICC bedient sich der TNM-Klassifikation und teilt so das Stadium der Krebserkrankung ein. Exemplarisch sind die UICC-Stadien des intrahepatischen Gallengangskarzinom aufgeführt (vgl. Tabelle 6), alle weiteren sind dem Anhang zu entnehmen (vgl. Tabelle 40, Tabelle 41, Tabelle 42).

Tabelle 6: UICC-Stadien des Karzinoms intrahepatischen Gallengänge

UICC-Stadien – intrahepatische Gallengänge

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium IA	T1a	N0	M0
Stadium IB	T1b	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium IIIA	T3	N0	M0
Stadium IIIB	T4	N0	M0
	Jedes T	N1	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Aus: (59), (60)

2.10 Tumormarker

Bei Karzinomen der Gallenwege hat sich zur Therapie- und Verlaufskontrolle das Kohlenhydrat-Antigen CA 19-9 neben dem carcinoembryonalen Antigen (5) (61) als Tumormarker etabliert. Aufgrund fehlender Verlässlichkeit im Hinblick auf Sensitivität und Spezifität und der Überschneidung zu anderen Tumorentitäten eignen sie sich jedoch nicht zu diagnostischen Zwe-

cken (62), (63). Beim CA 19-9 handelt sich hierbei um ein Glykoprotein, welches mittels Immunassays nachgewiesen werden kann. Der Cut-Off-Wert liegt bei 37 kU/l (64). Hohe Serum-CA 19-9 und CEA-Spiegel im Blut gehen mit prognostisch ungünstigen Faktoren wie einer Tumorgroße über fünf Centimetern (cm), einem hohen UICC-Stadium, schlechter Prognose und/oder Lymphknotenmetastasen einher. (65), (66). Des Weiteren scheint die Höhe des CA 19-9-Spiegels (> 100 kU/l) mit der Inoperabilität des Tumors zu korrelieren (67). Interessanterweise besteht ein Zusammenhang zwischen der Expression von CA 19-9 und dem Vorhandensein der Lewis-Blutgruppe: bis zu 10% der Bevölkerung in Mitteleuropa sind Lewis-negativ und können somit kein CA 19-9 exprimieren (68).

2.11 ECOC-Schema

Das Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG-) Schema beschreibt den physischen Zustand von Krebspatienten. Da das ECOC-Schema zum Teil therapieentscheidend ist, sei es an dieser Stelle kurz erwähnt.

Tabelle 7: ECOG Performance Score, der den physischen Zustand von Krebspatienten beschreibt.

Grad	Erklärung
0	Normale uneingeschränkte Aktivität wie vor der Erkrankung
1	Einschränkung bei körperlicher Anstrengung, aber gehfähig; leichte körperliche Arbeit bzw. Arbeit im Sitzen (z. B. leichte Hausarbeit oder Büroarbeit) möglich
2	Gehfähig, Selbstversorgung möglich, aber nicht arbeitsfähig; kann mehr als 50% der Wachzeit aufstehen
3	Nur begrenzte Selbstversorgung möglich; 50% oder mehr der Wachzeit an Bett oder Stuhl gebunden
4	Völlig pflegebedürftig, keinerlei Selbstversorgung möglich; völlig an Bett oder Stuhl gebunden
5	Tod

Modifiziert nach: (69)

2.12 Therapie

Die Therapie des cholangiozellulären Karzinoms unterscheidet sich hinsichtlich des Tumorstadiums und der Lokalisation des Primärtumors. Im Folgenden werden die Therapieoptionen anhand der ESMO (European Society for Medical Oncology) -Guidelines aufgeführt.

2.12.1 Lokal begrenztes CCC

Die Therapie des lokal begrenzten CCC variiert abhängig von der Lokalisation und dem Stadium des Tumors.

Intrahepatische Cholangiozellkarzinome können ausschließlich mittels einer R0-Resektion kurativ behandelt werden. Aufgrund der Neigung zur Lymphknotenmetastasierung ist standardmäßig eine Lymphadenektomie der Lymphknoten des Ligamentums hepatoduodenale durchzuführen. Eine adjuvante Chemotherapie kann abhängig der Größe des Tumors, vaskulärer und Perineuralscheideninfiltration oder dem Vorhandensein von Satellitenmetastasen abgewägt werden. Ergebnisse der BILCAP-Studie (Capecitabine compared with observation in resected biliary tract cancer) zeigen, dass eine adjuvante Chemotherapie mit Capecitabin das Overall Survival (OS) bei Patienten mit kurativ intendierter Resektion bei allen Lokalisationen des CCC signifikant verbessert (OS 49,6 Monate im Capecitabin-Arm versus 36,1 Monate in der Kontrollgruppe, Hazard Ratio (HR) für Tod 0,84) (70). 2022 wurden die Ergebnisse der STAMP-Studie veröffentlicht, welche die Standardtherapie Capecitabin mit einer Kombinationstherapie aus Gemcitabin und Cisplatin (Standardtherapie bei inoperablem/metastasiertem CCC) verglich. Allerdings konnte kein Vorteil bezüglich des OS bei Kombinationstherapie festgestellt werden, sodass die Standardtherapie beibehalten werden soll (71).

Nicht-resektable Tumoren oder Patienten mit ausgedehnter Leberzirrhose können mithilfe von lokalen Verfahren behandelt werden. Darunter fallen die Mikrowellen- und die Radiofrequenzablation, Radiotherapie und transarterielle Verfahren (zum Beispiel die transarterielle Chemoembolisation (TACE) und die transarteriellen Chemoperfusion (TACP)) (72), (73).

Bei perihilären Tumoren ist eine kurative Operation nur selten möglich. Es empfiehlt sich eine Hemihepatektomie mit Pfortaderembolisation, wobei zusätzlich das Lebersegment I (Lobus caudatus) und Lymphknoten entfernt werden. Die Pfortaderembolisation induziert eine Hypertrophie der nicht-resezierten Leberhälfte. Bei Passagestörungen in den Gallengängen ist auch vor Therapie eine Drainage-/Stenteinlage zur Symptomkontrolle ratsam.

Das distale CCC wird mittels Entfernung des Pankreaskopfes, in der Regel im Rahmen einer partiellen Duodenopancreatektomie (PDP, Entfernung des Pankreaskopfes, des Duodenums, der Gallenblase inklusive des Ductus choledochus sowie des Magenantrums und der regionären Lymphknoten) mit erweiterter Gallengangsresektion bis zum Hilum, behandelt.

Die Lebertransplantation kann als potenziell kurative Behandlungsoption angesehen werden, ist aufgrund der fehlenden Organverfügbarkeit auf der einen Seite und der hohen und frühen Rezidivneigung sowie der schlechten Prognose im Allgemeinen auf der anderen Seite nur selten eine Alternative im klinischen Alltag und daher nur im Rahmen von Studien durchzuführen (43), (74). Die Lebertransplantation beinhaltet dabei immer eine neoadjuvante Chemotherapie.

Gallenblasentumoren können im lokalisierten Stadium reseziert werden. Bei vor allem inzidentellen Gallenblasenkarzinomen, die auf die Schleimhaut beschränkt (maximal Stadium T1a) sind, besteht durch die einfache Cholezystektomie eine kurative Behandlungsmethode mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von bis zu 100% (75), (76).

Sofern der Tumor jedoch das Stadium T1a überschreitet, ist eine Segment-IVb/V-Leberresektion und Lymphadenektomie durchzuführen. Bei lokal fortgeschrittenen Gallenblasenfundus-Tumoren wird neben der Leberteilresektion eine Entfernung des Colon transversum durchgeführt. Liegt der Tumor am Gallenblaseninfundibulum, ist zudem eine Entfernung des Bulbus duodeni und des Pankreaskopfes nötig. Aufgrund des zahlreichen Auftretens von Lokal- und Fernrezidiven nach der Operation ist vor allem bei Lymphknoten-positiven Erkrankungen oder bei R1-Resektion eine adjuvante Chemo- oder Radiochemotherapie empfohlen (45 Gray (Gy) in Fraktionen von 1,8 oder 2 Gy in Kombination mit 5-Fluorouracil (5-FU) oder Capecitabin) (77), (76).

2.12.2 Metastasiertes CCC

Im metastasierten Stadium steht seit der ABC-02 Studie (2010) aus dem Vereinigten Königreich die Kombination aus Gemcitabin und Cisplatin als Standard-Chemotherapie zur Verfügung (78). Alle Patienten unabhängig von Tumorstadium (lokal fortgeschritten versus metastasiert), Alter (unter versus über 65 Jahre) oder Ort des Primärtumors (iCCC versus eCCC versus GBT) haben von dieser Therapie hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens (8 Monate im Vergleich zu 5 Monaten bei Gemcitabin allein) und des Gesamtüberlebens (11,7 Monate im Vergleich zu 8,1 Monaten bei Gemcitabin allein) profitiert. Anpassungen hinsichtlich Nierenfunktion (Wechsel auf Gemcitabin mit Oxaliplatin) und ECOG-Status größer/gleich 2 (hier Monotherapie mit Gemcitabin erwägen) können erfolgen. Eine standardisierte Zweitlinientherapie existiert nicht, es wird jedoch oft auf eine Therapie auf Fluoropyrimidin-Basis (entweder als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Zytostatika) zurückgegriffen. Die ABC-06 Studie (2021) prüfte bis 2018 den Nutzen von FOLFOX (Folinsäure, Fluorouracil und Oxaliplatin) als Zweitlinientherapie und konnte zeigen, dass sich das mediane Gesamtüberleben (englisch: Overall survival (OS)) von 5,3 auf 6,2 Monate anheben lies und die Overall Survival-Raten nach sechs und zwölf Monaten signifikant höher waren als eine aktive Symptomkontrolle allein (79).

2.12.3 Personalisierte Medizin

Hinsichtlich personalisierter Medizin sind die Signalwege des epithelialen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) und des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) bisher am besten untersucht. Studien, die die Wirkung von Immuntherapie in Kombination mit konventioneller Chemotherapie untersuchten, zeigten bisher keinen Nutzen von Cetuximab (IgG1-Antikörper gegen EGFR), Sorafenib (Multi-Kinase-Inhibitor), Erlotinib (selektiver Inhibitor der Tyrosinkinase-Domäne des EGF-Rezeptors) oder Panitumumab (IgG2k-Antikörper gegen EGFR) (80), (81), (82). Weitere Therapieoptionen stellen im fortgeschrittenen Stadium Durvalumab/Pembrolizumab, Ivosidenib, Trastuzumab, Pemigatinib/Futibatinib dar. Chen et al. stellen fest, dass die Ansprechrate auf Immuntherapie abhängig vom Mutationsstatus, insbesondere von KRAS und TP53, zu sein scheint (83). Die Erkenntnis legt nahe, dass Immuntherapie im Hinblick auf den Mutationsstatus weiter erforscht werden muss, um Patienten die bestmögliche Therapie zukommen zu lassen.

2.12.4 Rezidivtherapie

Kommt es zu einem isolierten Rezidiv eines iCCCs, so wird eine R0-Resektion angestrebt. Durch das Auftreten von multifokalen Rezidiven oder der Notwendigkeit von wiederholten Resektionen, kann es im Verlauf zu einer Abnahme der Leberfunktion kommen, was weitere Resektionen unmöglich macht. Eine Alternative stellen thermische Ablationsverfahren in Form von Mikrowellen- oder Radiofrequenzablation dar (83), (84).

Aufgrund der schlechten Zugänglichkeit von Rezidiven eines perihilären CCC ist eine kurative Reoperation oft nicht möglich.

Die 2021 veröffentlichte ABC-06-Studie schlägt als systemische Zweitlinien-therapie die Kombination aus FOLFOX (Kombination aus Folinsäure, Fluorouracil und Oxaliplatin) und aktiver Symptomkontrolle vor, wenn es zum Progress oder zum Rezidiv nach Erstlinien-therapie mit Gemcitabin und Cisplatin gekommen ist (79).

2.13 Nachsorge

Kurativ behandelte Patienten werden an ein Follow-Up angeschlossen, welches im ersten Jahr alle drei Monate, im zweiten bis vierten Jahr alle sechs Monate und ab dem fünften Jahr einmal jährlich stattfindet. Dabei wird der Patient klinisch untersucht, Laborparameter (inklusive Tumormarker CA 19-9) bestimmt und ein CT des Thorax und des Abdomens angefertigt. Bei Patienten in palliativer Versorgung soll vor allem auf Komplikationen, speziell obstruktive

Veränderungen (Gallenwege, Magenausgang, Pankreasgang), geachtet werden. Die palliativ-medizinische Therapie richtet sich hierbei besonders auf Symptomkontrolle und Begleitung des Patienten (85).

2.14 Immunhistochemische Marker

2.14.1 Argpyrimidin

Argpyrimidin ist ein advanced glycation endproduct (AGE, zu Deutsch fortgeschrittenes Verzuckerungsendprodukt) aus Arginin und Methylglyoxal. Es entsteht durch die Maillard-Reaktion, zurückgehend auf den französischen Wissenschaftler Louis-Camille Maillard (1878-1936). Dabei handelt es sich um eine nicht-enzymatische Reaktion, bei der aus reduzierenden Zuckern in Verbindung mit Aminosäuren, Proteinen, Peptiden oder Aminen sogenannte N-Glykoside entstehen (86).

2.14.1.1 Advanced glycation endproducts (AGEs) und Argpyrimidin-Entstehung

AGEs entstehen also aus Proteinen oder Lipiden, die durch (längerfristigen) Kontakt mit Zuckern glykiert werden. Sie gelten als Biomarker für das Altern und verschiedene Erkrankungen, unter anderem Diabetes mellitus und Morbus Alzheimer (87), (88). Diverse Zellen (unter anderem Makrophagen, Monozyten, Mikroglia, Endothelzellen) können AGEs über einen spezifischen Rezeptor (Receptor for AGE, RAGE) aufnehmen und so über die Produktion von Zytokinen zu Inflammation führen.

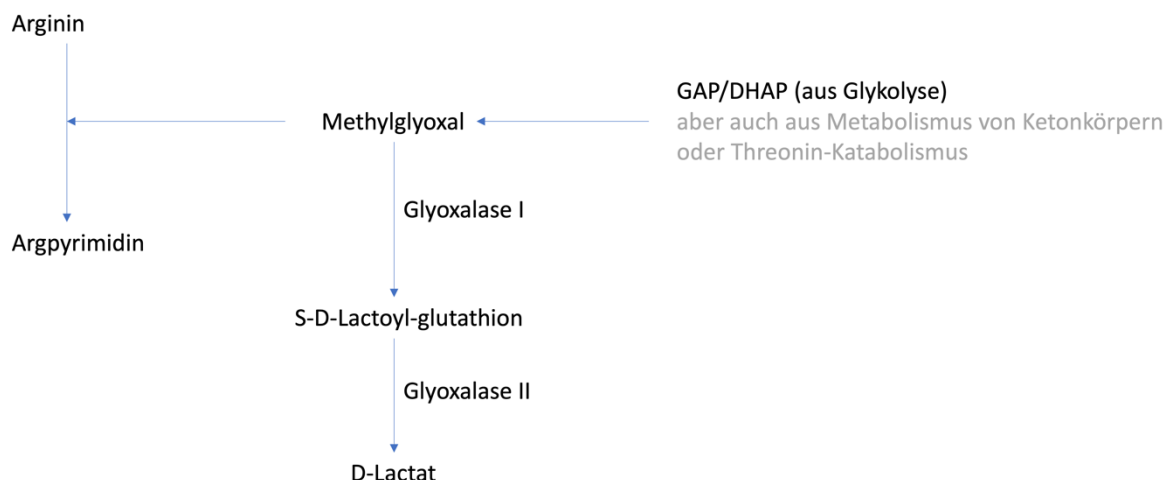


Abbildung 5: Entstehung von Argpyrimidin aus Arginin und Methylglyoxal über eine Maillard-Reaktion und Abbau über das Glyoxalase-System. Methylglyoxal entsteht vorwiegend, nachdem von Glycerinaldehyd-3-phosphat (DAP) oder Dihydroxyacetonphosphat (DHAP), beides Stoffwechselzwischenprodukte der Glykolyse, nichtenzymatisch die Phosphatgruppe abgespalten wurde. Weitere Quellen für die Generierung von Methylglyoxal sind der Katabolismus von Threonin und Aceton. Methylglyoxal weist zytotoxische Eigenschaften auf und kann durch die körpereigenen Enzyme Glyoxalase I und II zum unschädlichen Lactat abgebaut werden. Überschüssiges Methylglyoxal kann jedoch weiterhin nichtenzymatisch an Arginin gebunden werden mit dem Ergebnis, dass Argpyrimidin entsteht. Eigene, vereinfachte Darstellung

Zur schnellen Energiebereitstellung ist in Tumorzellen die Glykolyse oft hochreguliert. Diese Änderung im Metabolismus wird als Warburg-Effekt bezeichnet. Gesunde Zellen zeigen diese Art der Energiegewinnung nur unter sauerstoffarmen Bedingungen, Krebszellen praktizieren

dies jedoch auch in Anwesenheit ausreichenden Sauerstoffs (89). Die bei der Glykolyse entstehenden Triosen Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) können durch Abspaltung der Phosphatgruppe in Methylglyoxal umgewandelt werden. Durch die gesteigerte Glykolyse in Tumorzellen liegt es nahe, dass deutlich mehr Methylglyoxal entstehen kann (90). Dieses Stoffwechselprodukt ist zytotoxisch und wird durch die Enzyme Glyoxalase I und II (GLO-I und -II) über das Zwischenprodukt S-D-Lactoyl-glutathion zum unschädlichen D-Lactat abgebaut. Kann das Methylglyoxal weniger effizient abgebaut werden, beispielsweise bei Übersättigung der abbauenden Enzyme, kommt es im Kontakt mit Arginin(-resten) zur nicht-enzymatischen Glykierung und es entsteht über das Zwischenprodukt 3-Hydroxypentan-2,4-dion letztendlich Argpyrimidin.

Methylglyoxal wird eine „hormetische Wirkung [zugeschrieben], die durch eine Stimulierung des Tumorwachstums in niedriger Dosierung und eine Hemmung des Tumorwachstums in hoher Dosierung definiert ist“ (91). Die abbauenden Enzymen Glyoxalase (92), insbesondere GLO-I, wurden auch im Kontext des Voranschreitens von Tumoren untersucht: die experimentelle Hemmung von GLO-I im HCC rief eine signifikante Verringerung der Proliferation, der Migration und der Koloniebildung hervor (1). Dies kann letztlich wieder im Zusammenhang mit dem konsekutiv erhöhten Methylglyoxal Spiegel im Zusammenhang stehen.

Erstmalig Erwähnung findet Argpyrimidin 1997, als Shipanova et al. Arginin mit Methylglyoxal inkubierten. Sie stellten fest, dass ein Stoffwechselprodukt (= Argpyrimidin) entsteht, welches sich verschiedene Zucker sowie Ascorbinsäure zur Synthese zu Nutze machen kann. Für die Bildung eines Moleküls Argpyrimidin werden dabei jeweils zwei Moleküle Methylglyoxal benötigt (92). Argpyrimidin ist ein AGE, welches typischerweise im Zytosol einer Zelle zu finden ist. Nakadate et al. fanden Argpyrimidin jedoch auch im Kern von kortikalen Neuronen von Mäusen und gehen davon aus, dass Argpyrimidin während der Embryonalzeit „zur neuronalen Differenzierung und/oder zur Aufrechterhaltung des differenzierten Zustands beitragen“ kann (93).

Das Enzym Fructosamin-3-Kinase kann intrazellulär die durch die Glykierung angelagerte Glukose an Aminen (durch Reaktion der Carbonylgruppe der Glukose mit der Aminogruppe der Proteine entsteht ein Fruktosamin) wieder aufheben (94). Spezifische Enzyme für die Entfernung von Methylglyoxal an Argininresten wurden bisher nicht identifiziert.

2.14.1.2 Intrazelluläre Signalwege durch Argpyrimidin

Westwood et al. zeigten schon früh, dass insbesondere Makrophagen und Monozyten spezielle Rezeptoren besitzen, auf denen durch Methylglyoxal veränderte (Arginin-)Addukte binden können (95). Intrazellulär kommt es über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) durch eine NAD(P)H-Oxidase zur Induktion von NF- κ B (nuclear factor

'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells), welches wiederum die Expression proinflammatorischer Faktoren wie IL-1, -6, -8 und Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) fördert (96) (Abbildung 6).

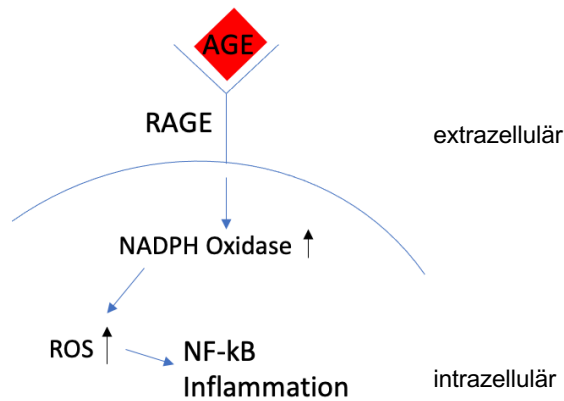


Abbildung 6: Intrazelluläre Signalkaskade von AGEs. Durch Bindung von AGEs an ihren Rezeptor kommt es über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zur Induktion von NF- κ B, welches wiederum die Expression proinflammatorischer Faktoren wie IL-1, -6, -8 und Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) fördert. Eigene, vereinfachte Darstellung

Interessant erscheint die pathophysiologische Bedeutung von AGEs, im Speziellen von Argpyrimidin, bei chronischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus. Es konnte immunhistochemisch festgestellt werden, dass Media und Intima der Gefäßwände (von Niere und Aorta) von Diabetikern angereichert sind mit Argpyrimidin, wohingegen dieses Stoffwechselprodukt bei Nichtdiabetikern fehlte (97). Auch weitere diabetische Komplikationen wie Retinopathie und Neuropathie scheinen im Zusammenhang mit dem Methylglyoxal-Spiegel und seinen Addukten im Blut und im Gewebe zu stehen (98). Die Menge des Methylglyoxals, aus dem Argpyrimidin entsteht, scheint dabei abhängig von der Höhe des Glucosespiegel im Blut zu sein (96, 99, 100). Bei Patienten mit Leberzirrhose korrelierte der Methylglyoxal-Spiegel signifikant mit dem Schweregrad der Erkrankung sowie krankheitsassoziierten Komplikationen wie Aszites (101).

Unter anderem wurde Argpyrimidin auch in Amyloidablagerung von Patienten mit familiärer Amyloid-Polyneuropathie gefunden und unterstützt damit die These, dass AGEs eine Rolle bei der Entwicklung von Amyloiderkrankungen spielt (102).

Auch im physiologischen Zustand reagiert Methylglyoxal mit Proteinen. Hervorzuheben ist hier vor allem das Hitzeschock-Protein 27 (heat shock protein 27, Hsp27). Dabei wird HSP27 selektiv an Stelle Arginin 188 (Arg-188) durch Methylglyoxal unter Entstehung von Argpyrimidin modifiziert. Diese Modifikation hemmt die Cytochrom-c-vermittelte Apoptose. Leukämiezellen zeigten in einer von Sakamoto et al. durchgeführten Studie durch diese Modifikation einen Resistenz gegenüber der Chemotherapie-induzierten Apoptose. Hemmt man

dahingegen jedoch die Argpyrimidin-Modifikation des HSP27, reagieren die Zellen sensibler auf Chemotherapeutika, in diesem Fall Etoposid und Camptothecin (100).

2.14.1.3 Argpyrimidin und Krebs

Van Heijst et al. untersuchten das Auftreten von Argpyrimidin in verschiedenen Krebsentitäten und stellten fest, dass es zu einem deutlich divergenten Auftreten kam. So zeigten das Plattenepithelkarzinom des Larynx und das Adenokarzinom der Mamma einen deutlichen Nachweis, wohingegen der Nachweis in kolorektalen Karzinomen und Leiomyosarkomen eher negativ bis schwach positiv ausfiel. Chiavarina et al. hingegen konnten nachweisen, dass es zu erniedrigten GLO-I und -II-Spiegeln in kolorektalen Karzinomen (colorectal carcinoma, CRC) höherer Stadien und erhöhten Methylglyoxal-Spiegeln, angezeigt durch akkumulierte Argpyrimidin-Addukte, kam (103). Der von Van Heijst et al. erhobene Befund bezüglich des kolorektalen Karzinoms unterscheidet sich von den Ergebnissen, die Chiavarina et al. beobachteten, und können möglicherweise auf die kleine Fallzahl (n=5) in van Heijsts Studie zurückgeführt werden.

Insgesamt lässt sich jedoch feststellen, dass Argpyrimidin bisher nur wenig Aufmerksamkeit in der Krebsforschung erhalten hat (104).

2.14.2 Sirtuin 6

Sirtuine sind eine Enzymgruppe aus Klasse III Histon-Deacetylasen, die von 1 bis 7 durchnummeriert werden. Dabei hat jedes Sirtuin seine individuelle Funktion und unterscheidet sich auch hinsichtlich der Wirkung in verschiedenen Geweben und bösartigen Tumoren.

Sirtuin 6 (SIRT6) wird besonders stark in den Zellen des Thymus, der Skelettmuskeln und des Gehirns exprimiert (105). SIRT6 findet sich eng verbunden mit dem telomeren Chromatin im Zellkern, wo es die Genexpression reguliert und auf Inflammation, den Glucosemetabolismus sowie die Genomstabilität Einfluss nimmt (106) (107) (3). Es ist ein Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺)-abhängiges Enzym mit Mono-ADP-Ribosyltransferase-Aktivität (ADP = Adenosindiphosphat), welches spezifisch an Lysin-acetylierte Histone (u. a. H3K9Ac, H3K18Ac sowie H3K56Ac, jeweils benannt nach dem acetylierten Lysinrest) bindet und diese deacetyliert. Dieser Prozess geschieht vor allem in der S-Phase des Zellzyklus. Eine (Hyper-)Acetylierung scheint im Gegensatz dazu im Zusammenhang mit einer Telomerdysfunktion und konsekutiv mit der Zellalterung zu stehen. Michishita et al. nehmen daher an, dass SIRT6 einer vorzeitigen Seneszenz durch Verhinderung der Telomerdysfunktion vorbeugt (106, 108, 109). Mostoslavsky et al. konnten ebenfalls feststellen, dass SIRT6-Knockout (KO) Mäuse eine deutliche genomische Instabilität aufweisen, welche sich in Form von „chromosomaler Translokationen, fragmentierter Chromosomen, abgelöster Zentromere und Lücken“ zeigt (105). Phänotypisch wiesen die SIRT6-KO-Mäuse bereits jung alterstypische Degenerationen (beispielsweise Osteopenie, Lordokyphose) auf. SIRT6 steht im Zusammenhang mit dem seltenen, autosomal-rezessiv vererbten Werner-Syndrom. Dabei handelt es sich um eine Erkrankung, bei der die Erkrankten ab der Pubertät oder spätestens ab der frühen Adoleszenz vorzeitig altern. Ursächlich ist dabei eine Mutation im Werner-Gen (WRN), welches für eine RecQ-Typ- Helikase kodiert. Dieses Protein verbessert physiologisch durch Bindung am Telomer dessen Stabilität (110). Michishita et al. erkannten eine Verbindung zwischen dem Werner-Protein und SIRT6 und postulierten, dass die beiden Proteine gemeinsam „die Entstehung struktureller Anomalien an den Telomeren verhindern“. Dabei scheint SIRT6 die Verbindung des WRN-Proteins am Telomer zu stabilisieren und so die Telomerreplikation zu gewährleisten. Bei Patienten mit dem Werner-Syndrom ist die Bindung von WRN-Protein und SIRT6 gestört und sie werden klinisch mit einer Progerie apparent (106).

Die erhöhte Anfälligkeit für DNA-Schäden bei SIRT6-defizienten Zellen scheint sowohl auf einer defekten Basenexzisionsreparatur (base excision repair (BER)) als auch Reparatur von Einzel- und Doppelstrangbrüchen (single-strand break (SSB), double-strand break (DSB)) zu beruhen. Die DNA-Reparatur wird durch SIRT6 gefördert, indem SIRT6 mit dem Reparatorenzym PARP1 (Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1) bindet. Dies gilt vor allem für die DNA-Reparatur unter oxidativem Stress (105, 111, 112).

Mäuse, bei denen SIRT6 gehemmt wird, fehlt die Fähigkeit, DNA-Schäden nach Infrarot-Einwirkung zu beheben. Mostoslavsky et al. stellten bei SIRT6-KO-Mäusen fest, dass diese ebenfalls empfindlicher auf Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Methylmethansulfonat (MMS), welche beide Einzelstrangbrüchen in der DNA hervorrufen können, reagierten. Es kam jedoch zu keiner Überempfindlichkeit gegenüber ultraviolettem Licht (UV-Licht) kam, wenn SIRT6 fehlte (105). Auch kürzlich veröffentlichte Ergebnisse bestätigen diese vielfältige Rolle von SIRT6 bei Seneszenz und Alterserkrankungen (113).

Wichtiger Faktor zur Induktion mitotischer Fehler und zellulärer Seneszenz scheint außerdem eine Überexpression perizentromerer Satelliten-DNA zu spielen. Die Transkription dieser repetitiven Sequenzen im Genom kann durch SIRT6-vermitteltes Chromatin-Silencing aufgehalten werden (109).

Der Abbau von SIRT6 erfolgt proteosomal, kann aber durch die Ubiquitin-specific protease 10 (USP 10) vermindert werden (114).

2.14.2.1 SIRT6 und Stoffwechsel

Es ist bekannt, dass Tumoren ihren Stoffwechsel auch unter aeroben Bedingungen bevorzugt über eine verstärkte Glykolyse betreiben (= Warburg Effekt). Zellen, denen experimentell die Fähigkeit zur Expression von SIRT6 genommen wurde, praktizieren diese Form der Energiebereitstellung ebenfalls verstärkt und verringern die Abläufe der Atmungskette (115), (116). Dazu muss man verstehen, dass der Transkriptionsfaktor HIF1 α (Hypoxie-induzierter Faktor 1 α) neben der direkten Inhibition der Atmungskette die Expression wichtiger Glykolyseenzyme induziert (117). Bei diesen Glykolyseenzymen handelt es sich u. a. um GLUT1 (Glukosetransporter 1) und Pdk1 (3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1), die bewirken, dass Glukose in die Zelle aufgenommen (z. B. durch GLUT1) und verstoffwechselt werden kann (115, 118). SIRT6 gilt als Repressor für HIF1 α und bei seinem Fehlen kann HIF1 α verstärkt wirken. Um dies nachzuweisen, setzt man sowohl SIRT6-Wildtyp (WT)-Zellen als auch SIRT6-defiziente Zellen einem Glukosemangel aus. SIRT6-exprimierende Zellen finden andere Wege der Energiebereitstellung, wohingegen SIRT6-defiziente Zellen zu einem großen Teil starben.

Kit et al. fanden zudem heraus, dass SIRT6 ebenfalls eine Rolle im Fettmetabolismus spielt. Patienten mit einer Steatosis hepatis (Fettlebererkrankung) zeigten eine verminderte SIRT6-Expression im Lebergewebe im Vergleich zu gesunden Leberproben. Ein Knockout von SIRT6 führte im Mausmodell zur Entwicklung einer Fettleber bei gesteigerter Triglyceridsynthese und Glykolyse (119). Im Fettgewebe spielt SIRT6 eine wichtige Rolle im Metabolismus, der Lipolyse und verbessert die Insulinwirkung. Dahingegen führt ein SIRT6-Mangel zu Gewichts- und Fettzunahme, Inflammation und Insulinresistenz (120).

2.14.2.2 SIRT6 und Inflammation

SIRT6 wird verdächtig, Inflammation durch gesteigerte Expression verschiedener Zytokine, unter anderem TNF (Tumornekrosefaktor) α und Interleukin (IL) 8, durch Immunzellen hervorzurufen (121, 122). Die TNF α -Sekretion geschieht durch eine sogenannte Demyristoylierung, also der Deacetylierung langkettiger Fettsäuren, am TNF α durch SIRT6 (121, 123). Bauer et al. stellten heraus, dass SIRT6 in Adenokarzinomzellen des Pankreas zu einer gesteigerten Inflammation über TNF α sowie diverser Interleukine führt. Neben der lokalen Inflammation führen diese Zytokine zu einer verstärkten Angiogenese und zum Zellwachstum. Dennoch war SIRT6 vermindert in diesen Krebszellen zu finden. Die Forschenden spekulieren, ob SIRT6 zu bestimmten Zeitpunkten der Karzinogenese überexprimiert sein und „möglicherweise mit fortgeschrittenen oder hochaggressiven Krebsformen assoziiert sein könnte“ (61).

Auf der anderen Seite scheint SIRT6 die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B zu bremsen und so dessen Regulation auf Gene für Apoptose, Seneszenz und Inflammation sowie Angiogenese, Invasion und epithelialer-mesenchymaler Transition zu unterdrücken (124, 125).

SIRT6 hat die Fähigkeit, die IL-4-Produktion zu steigern und so die Entstehung antiinflammatorischer M2-Makrophagen zu fördern (126). Des Weiteren kann SIRT6 die Aktivierung von HIF1 α hemmen, sodass dieser seine Funktion als Modulator des Immunsystems (u. a. T-Zell-Differenzierung, Phagozytenaktivierung) nicht wahrnehmen kann.

2.14.2.3 SIRT6 und Karzinogenese

SIRT6 scheint präventiv auf die Karzinogenese und in frühen Tumorstadien als Tumorsuppressor zu fungieren. Min et al. zeigten, dass SIRT6 in der Anfangsphase der Tumorigenese über die Unterdrückung von Survivin, einem anti-apoptotischen Enzym, die Krebsentstehung beeinträchtigt (127). Durch die Unterdrückung von Survivin kommt es konsekutiv also verstärkt zum Zelltod (123). Dies wird unterstützt durch Experimente, bei denen eine induzierte Überexpression von SIRT6 in Lebertumoren im Anfangsstadium zu einer Wachstumsbeeinträchtigung führt. Entscheidend scheint in Tumoren die Regulation von SIRT6 durch c-Fos zu sein. Dabei handelt es sich um einen Teil des protoonkogenen Transkriptionsfaktors AP-1 (127). In frühen Tumorstadien wird SIRT6 durch c-Fos gehemmt (123). Ähnliche Resultate erhielten Sebastián et al. im Mausmodell, in dem gezeigt werden konnte, dass SIRT6 die Tumorentstehung und das Tumorvoranschreiten von kolorektalen Karzinomen (CRC) in vivo durch die Unterdrückung der aeroben Glykolyse und ribosomalen Genexpression hemmt. Dahingegen scheint die Regulation von SIRT6 in späten Stadien ausgehebelt zu sein und es ist kein schützender Effekt mehr zu erwarten. Ebenso konnte gezeigt werden, dass (vor allem in frühen Stadien) die SIRT-Expression in CRC und Adenokarzinomen des Pankreas gehemmt ist und

die Konsequenz des Fehlens (beziehungsweise des Herunterregulierung) die Rolle als Tumorsuppressor unterstützt (118) (vgl. Abbildung 7 und Abbildung 8). Auch bei muskelinvasivem Harnblasenkarzinom stellten Wu et al. fest, dass die SIRT6-Expression nachließ, wenn der Tumor vom Stadium T2 zum Stadium T4 voranschritt (128). Wang et al. wiesen ebenfalls im Harnblasenkarzinom ein schlechteres Gesamtüberleben bei Verlust von SIRT6 auf und konnten einen Zusammenhang zwischen SIRT6-Mangel und verstärkter Glykolyse durch UHRF1 (Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 1) und konsekutiver Aktivierung von MCT4/HK2 (Monocarboxylate transporter 4/Hexokinase 2) feststellen (129).

Neben dem veränderten Glucosestoffwechsel scheint außerdem die Regulierung ribosomaler Proteine entscheidend bei der Karzinogenese und dem Tumorwachstum zu sein. Die Expression ribosomaler Proteine wird durch den Transkriptionsfaktor MYC (aviäres Myelozytomatose-Virus-Onkogen-Homolog) gesteuert. Dabei nennen Sebastià et al. sowie Lerrer et al. die Funktion von SIRT6 als Regulator des Transkriptionsfaktors MYC. MYC wird durch SIRT6 unterdrückt, konsekutiv kommt es bei SIRT6-Defizienz zur verstärkten Expression ribosomaler Proteine und so zum verstärkten Tumorwachstum (118, 130).

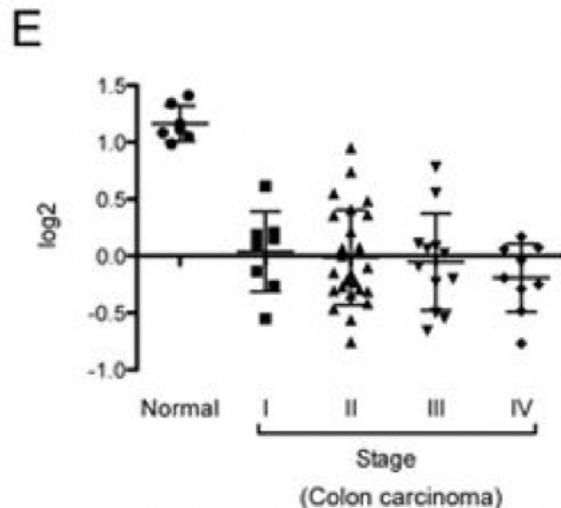


Abbildung 7: Im Vergleich zum Normalgewebe zeigen Tumoren (im Speziellen Adenokarzinom des Kolons) bereits in frühen Stadien eine verminderte Expression an SIRT6.

Aus: (118)

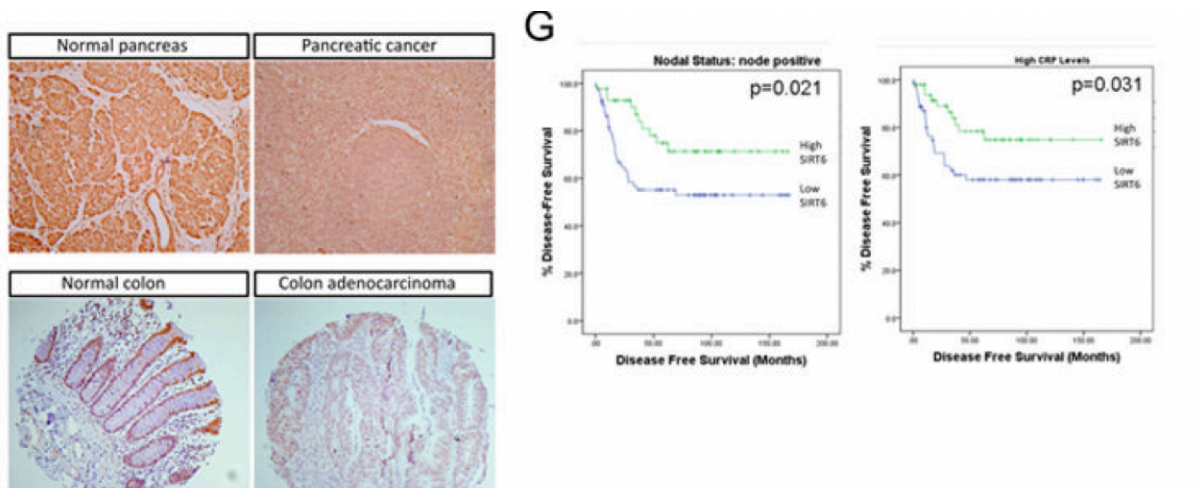


Abbildung 8: Vergleich von Pankreas- und Kolon-Normalgewebe mit jeweiligen Adenokarzinomen. Es wird deutlich, dass in der immunhistochemischen Färbung weniger SIRT6 im Tumorgewebe nachzuweisen ist. Rechts davon Kaplan-Meier-Kurven für das krankheitsfreie Überleben bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen (links) und Patienten mit hohem C-reaktivem Protein (CRP) (rechts): Vergleich SIRT6 geringe versus ausgeprägte Expression.

Aus: (118)

Weiterführende Experimente des Teams um Sebastián untersuchten die Expression von SIRT6 in 253 CRC-Proben. Dabei konnte festgehalten werden, dass das krankheitsfreie Überleben bei Patienten mit höherer Krankheitsaktivität (repräsentiert durch Lymphknotenmetastasen und hohen CRP-Werten) assoziiert ist mit niedriger SIRT6-Expression (vgl. Abbildung 8). Zudem sprechen die Autoren von einer 2,3-fach höheren Rezidivwahrscheinlichkeit und einer verkürzten Zeit bis zum Rezidiv (118).

Sebastián et al. gehen so weit, dass sie einem SIRT6-Mangel eine „entscheidende Rolle in der Tumorentstehung und im Tumorwachstum“ zusprechen und benennen SIRT6 als „Tumorsuppressor, [der] die aerobe Glykolyse unterdrückt“. Dies scheint dabei unabhängig von Onkogenen mit ERK- und AKT-Signalwegen zu sein, sondern sich auf Tumorwachstum aufgrund verstärkter Glukoseverwertung zu beziehen (118). Neuere Studien an kolorektalen Karzinomen zeigten eine negative Korrelation zwischen SIRT6 und Apoptose (im Speziellen der Anoikis). Insbesondere Karzinome im fortgeschrittenen Stadium gingen mit einer Hochregulation von SIRT6 einher und beeinflussten, gegensätzlich zu den älteren Ergebnissen von Sebastián, den MYC-AKT-Signalweg (131).

Neben den Erkenntnissen von SIRT6 als Tumorsuppressor gibt es Studien, die zeigen, dass SIRT6 auch onkogene/tumorfördernde Eigenschaften aufweist. So stellten Ming et al. heraus, dass SIRT6 in der Epidermis, genauer in den Keratinozyten, als Tumorpromotor fungiert und erhöhte SIRT-Spiegel bei UV-B-Strahlung zu Plattenepithelkarzinomen führen können (132). Ähnliche Ergebnisse erhielten Ran et al. und Fen et al. in ihren Studien zum hepatozellulären

Karzinom (HCC). Sie konnten einen Zusammenhang zwischen der verstärkten SIRT6-Expression mit dem Tumorgrading, der Tumorgroße und der Gefäßinvasion sowie dem verkürzten Überleben herstellen. Feng et al. ziehen nun doch Verbindungen zum ERK-Signalweg, bei dem die verstärkte Expression von SIRT6 zelluläre Seneszenz über Herunterregulierung von p16 und p21 (beides Cyclin-abhängige Kinaseinhibitoren) unterdrückt (133), (134).

Insgesamt scheint SIRT6 kontext- und gewebeabhängig zu agieren und es erfordert weitere Forschung, um die Rolle von SIRT6 in verschiedenen Tumoren zu verstehen. Durch einen SIRT6-Mangel kommt es zu mitotischen Funktionsstörungen, welche die Zelle zur Seneszenz zwingt. Diese Seneszenz kann jedoch auch als tumorsuppressive Reaktion in Krebszellen verstanden werden, die „die Ausbreitung potenziell onkogener genomischer Veränderungen“ verhindern soll (109).

3 Material und Methoden

3.1 Datenerhebung

Es erfolgte eine retrospektive Untersuchung von 245 Tumorproben von Patienten mit Gallengangskarzinomen, die an der Universitätsmedizin Mainz behandelt wurden und ihre Erstdiagnose zwischen 1998 und 2015 bekamen. Jede Probengewinnung war dabei aus onkologischer Sicht indiziert und gefährdete die Therapie nicht. Die histopathologische Aufarbeitung der Proben erfolgte durch das Institut für Allgemeine Pathologie der Universitätsmedizin Mainz. Die Patientendaten wie beispielsweise Alter, Geschlecht, Risikofaktoren, Tumorstadium, Laborparameter, Therapieablauf, Histologie sowie Daten zum Follow-Up stammten aus den individuellen Patientenakten des SAP-Kliniksystems.

3.2 Liste der verwendeten Materialien

Eine Liste der verwendeten Materialien ist dem Anhang zu entnehmen (Tabelle 43).

3.3 Methode – Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung ist ein diagnostisches Instrument, welches zur Detektion und Darstellung spezifischer Gewebe eingesetzt wird. Eine Antikörper-Antigen-Reaktion dient der Erkennung spezifischer molekularer Zielstrukturen des Antigens (Epitope), um diese für den Untersucher mithilfe eines Detektionssystems sichtbar zu machen. So ergibt sich nicht nur eine quantitative Bewertung der Zielstruktur, sondern es lassen sich auch Rückschlüsse auf die Lokalisation des Antigens innerhalb der Zelle treffen (135).

Das Verfahren läuft in zwei Schritten ab: ein Primärantikörper bindet an das für ihn spezifische Antigen auf oder innerhalb einer Zelle. Der zweite Schritt entscheidet, ob es sich um ein direktes oder indirektes Nachweisverfahren handelt.

Für das *direkte Verfahren* ist bereits der Primärantikörper mit einem „Markermolekül (fluoreszierender Farbstoff, Enzym, kolloidales Gold) [verknüpft, welches] als Ausgangspunkt oder Katalysator der Farbreaktion dient“ (136). Diese Reaktion findet statt, wenn dem Markermolekül sein spezifisches Substrat präsentiert wird. Bei dem Markerenzym handelt es sich bei einer immunhistochemischen Färbung in den meisten Fällen um Meerrettichperoxidase (horseradisch peroxidase, HRP), welche unter Zugabe des Chromogens Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) zu einem bräunlichen Färbeargebnis führt. Der direkte Nachweis bietet Vorteile durch seine schnelle Durchführbarkeit und geringe Anfälligkeit auf unspezifische Nebenreaktionen. Nachteilig ist jedoch, dass bei geringem Vorhandensein des gesuchten Epitops die Signalstärke schwächer ausfällt und es somit schwieriger darzustellen ist.

Dem gegenüber steht das *indirekte Nachweisverfahren*, welches eine zwischengeschaltete zweite Reaktion zwischen einem nativen Primärantikörper und einem weiteren Sekundärantikörper beinhaltet. Dieser Sekundärantikörper trägt den Marker, der dann in einem weiteren Schritt die Reaktion eingeht, welche die Färbereaktion erzielt. Dadurch, dass auf einem Primärantikörper bei Verwendung eines Linkers mehrere Sekundärantikörper binden können, kommt es zur Signalverstärkung und besseren Detektion des gefragten Antigens (siehe Abbildung 9), umgekehrt sind Kreuzreaktionen mit endogenen Antikörpern und Nebenreaktionen mögliche Fehlerquellen. Sind die Antikörper mit fluoreszierendem Farbstoff markiert, spricht man von Immunfluoreszenz.

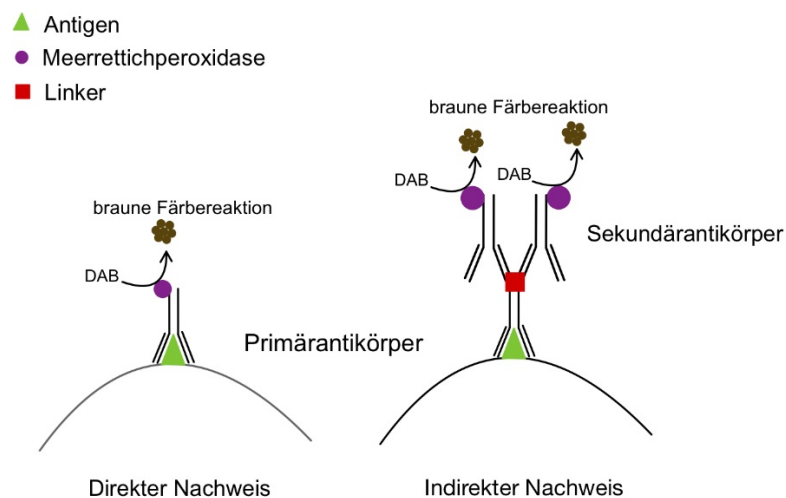


Abbildung 9: direkter (links) und indirekter (rechts) immunhistochemischer Nachweis

Eigene Abbildung, modifiziert nach: (137)

3.4 Materialverarbeitung

Nach der Materialgewinnung durch Biopsieentnahme oder Operation, Aufbereitung und Untersuchung des Tumors im Rahmen der Diagnosesicherung werden die Proben durch Formaldehyd in Paraffin haltbar gemacht. Die in Paraffin eingebetteten und Formaldehyd-behandelten Schnitte müssen dann jedoch durch ein mehrschrittiges Verfahren auf die immunhistochemische Färbung vorbereitet werden. Dieses Verfahren wird im Folgenden beschrieben.

3.4.1 Vorbereitung

Mit Hilfe eines Mikrotoms werden 3 µm dicke Schnitte vom Paraffinblock angefertigt, auf einen Objektträger aufgezogen und getrocknet. Vor der Färbung werden die Schnitte über Nacht auf 37°C erwärmt werden und am Folgetag 3 x 3 Minuten in aufeinander folgenden Xylolbädern entparaffiniert und mittels absteigender Alkoholreihe (3 Minuten 100% Ethanol, 3 Minuten 96% Ethanol, 3 Minuten 80% Ethanol, 3 Minuten 70%, 3 Minuten 50% Ethanol) und dreiminütigem

Aqua destillata (Aqua dest.) - Bad rehydriert. Durch die Rehydrierung wird in späteren Schritten eine bessere Bindung zwischen Epitop und dem in wässriger Lösung befindlichen Antikörper ermöglicht. Die rehydrierten Schnitte werden für die folgenden Färbeschritte mit dem Dako Real™ Cytomation Pen, welcher eine hydrophobe Barriere um die Gewebeprobe schafft, umrandet.

3.4.2 Demaskierung

Um das gewünschte Epitop auf den Geweben besser darzulegen, werden die Schnitte im Citratpuffer (EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, pH-Wert 6) für 35 Minuten im Dampfgarer demaskiert. Dadurch lockert sich die Struktur so auf, dass die Epitope, in diesem Fall Sirtuin 6 und Argpyrimidin (79), besser vom Antikörper erkannt werden können. Die Schnitte werden 7 Minuten mit Leitungswasser abgekühlt und dann 5 Minuten mit dem EnVision™ Wash Buffer (Phosphate-Buffered-Saline (PBS)) in einer 1:20 Verdünnung gewaschen. Nach abgeschlossener Demaskierung werden die Präparate in den Dako™ Autostainer transferiert.

3.4.3 Blockierung der endogenen Peroxidase

Da in anschließenden Schritten Merrettich-Peroxidase (englisch: Horseradish-Peroxidase, HRP) - konjugierte Antikörper Anwendung finden, kann es durch die endogene Peroxidase der Cholangio- und Hepatozyten im Gewebe zu störenden Hintergrundfärbungen kommen. Diese können vermieden werden, indem die zelleigene Enzymaktivität mithilfe von 3%-igem Wasserstoffperoxid in Methanol ausgeschaltet wird. Dazu werden den Präparaten EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent für 5 Minuten zugesetzt und anschließend gewaschen.

3.4.4 Primärantikörper

Weiterhin im Autostainer werden zu den Präparaten nun die Primärantikörper hinzugefügt. Dabei handelt es sich bei Argpyrimidin um einen monoklonalen Maus-Antikörper in der Verdünnung 1:1000. Der SIRT-6-Antikörper ist ein polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen mit 1:300 Verdünnung (siehe Materialliste). Beide Primärantikörper wurden jeweils über Nacht inkubiert und binden an das entsprechende Epitop im Sinne einer Antigen-Antikörper-Bindung. Am Folgetag erfolgt nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer eine 15-minütige Inkubation mit einem Linker (EnVision™ FLEX + Rabbit für SIRT/ + Mouse für MAGE), dieser fördert eine verstärkte Bindung des Sekundärantikörpers.

3.4.5 Sekundärantikörper

Im Folgeschritt wird nun nach erneutem Waschen der Sekundärantikörper ergänzt. Dabei handelt es sich um den EnVision™ FLEX /HRP visualization reagent, der sich gegen den Linker richtet und daran bindet. Der Sekundärantikörper wird für beide Färbungen jeweils 20 Minuten inkubiert. An den Sekundärantikörper ist das Enzym Peroxidase über einen Enzym-Biotin-

Komplex konjugiert, welches nach Zugabe des Chromogenes (EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen, 2 x 5 Minuten) für die Braunfärbung verantwortlich ist.

FLEX+ protocol

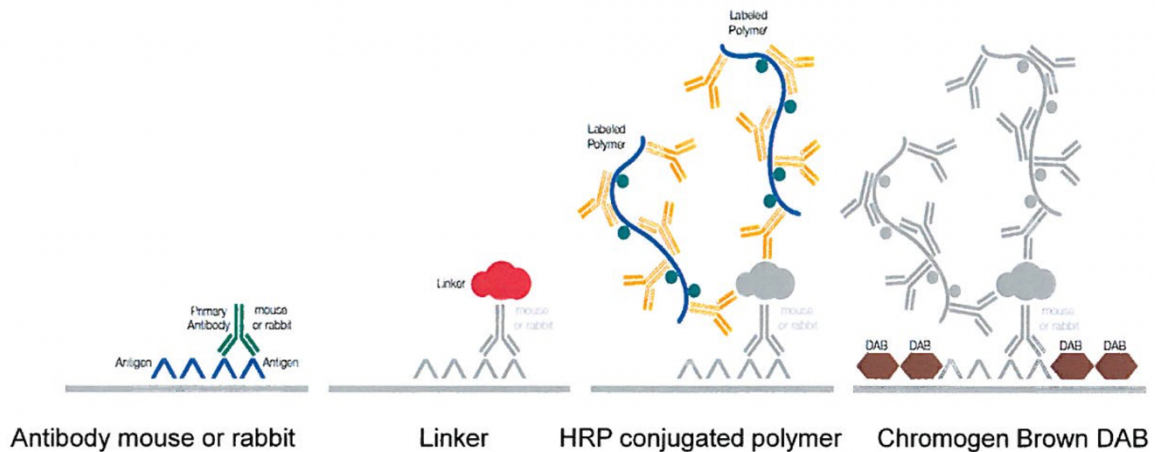


Abbildung 10: schematische Darstellung der immunhistochemischen Färbung nach dem DAKO Flex + Protokoll

Aus: (138)

3.4.6 Gegenfärbung

Eine Gegenfärbung mit 10%-igem Hämalan (EnVision™ FLEX Hematoxylin) für drei Minuten und anschließendem Bläuen in Leitungswasser für zehn Minuten färbt die Zellkerne blau.

Zur Qualitätskontrolle werden bei jedem Färbevorgang jeweils eine Positiv- (Argpyrimidin: Mamma und Ösophagus und Sirtuin 6: Magen und Ösophagus) und eine Negativkontrolle (ohne Primärantikörper) gefärbt.

3.4.7 Entwässern und Eindecken in Entellan®

In umgekehrter Reihenfolge zum Vorbereitungsprozess, werden die Präparate nun in Aqua dest., einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 96%, 100% Ethanol) und dreifachen Xylol-Bad für jeweils drei Minuten dehydriert. Die Schnitte werden anschließend mit Entellan® eingedeckt.

3.4.8 Vorbereitung der Färbeprotokolle

Vergleichsfärbungen Mamma/Ösophagus und Magen/Ösophagus

Zur Testung der immunhistochemischen Färbungen mit dem Argpyrimidin- und dem Sirtuin 6 -Antikörper wurden Vergleichsfärbungen mit Mamma und Ösophagus (Argpyrimidin) bzw. mit Magen und Ösophagus (Sirtuin 6) durchgeführt. Für Argpyrimidin war in der nicht-tumorösen Mamma von einer schwachen Färbung auszugehen (139), wohingegen für den Ösophagus keine Vorkenntnisse bestanden. Für die Mamma zeigte sich bei den Vergleichsfärbungen ein

heterogenes Färbeergebnisse mit zum Teil schwachen und zum Teil starken Färbungen. Ebenso war interessant, dass sich in der Färbung der Mamma vorwiegend zytoplasmische, zum Teil aber auch nukleäre Färbung auf Argprimidin fand (vgl. Abbildung 47, Abbildung 48, Abbildung 49 im Anhang).

Für Sirtuin 6 gab es im Vorfeld keine verlässlichen Daten zum Nachweis im gesunden Magen- und Ösophagusgewebe. Hier zeigte sich in den Vergleichspräparaten eine eher schwache Färbung (vgl. Abbildung 50 im Anhang).

Negativkontrollen erfolgten durch das Auslassen des Primärantikörpers, um unspezifische Anfärbungen sowie Hintergrundfärbungen zu erkennen bzw. auszuschließen.

3.4.9 Färbeprotokoll im Überblick

1. Vorbereitung/Entparaffinierung

Erhitzen auf 37°C	über Nacht
Xylol	3 Minuten
Xylol	3 Minuten
Xylol	3 Minuten
Ethanol 100%	3 Minuten
Ethanol 96%	3 Minuten
Ethanol 80%	3 Minuten
Ethanol 70%	3 Minuten
Ethanol 50%	3 Minuten
Aqua dest.	3 Minuten

Umrandung mit Dako Real™ Cytomation Pen

2. Demaskierung

Dampfgerar	
EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution pH6	35 Minuten
Waschen in EnVision™ Wash Buffer, 3x	5 Minuten

3. Blockierung der endogenen Peroxidase

Präparat EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent	5 Minuten
Waschen in EnVision™ Wash Buffer, 3x	5 Minuten

4. Primärantikörper

MAGE Primärantikörper (1:1000), mouse	über Nacht
Oder SIRT-6 Primärantikörper (1:300), rabbit	über Nacht
Waschen in EnVision™ Wash Buffer, 3x	5 Minuten
EnVision™ FLEX + Rabbit (79)	15 Minuten
Oder EnVision™ FLEX + Mouse (SIRT-6)	15 Minuten
Waschen in EnVision™ Wash Buffer, 3x	5 Minuten

5. Sekundärantikörper

EnVision™ FLEX /HRP visualization reagent	20 Minuten
Waschen in EnVision™ Wash Buffer, 3x	5 Minuten
EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen	2 x 5 Minuten
Waschen in EnVision™ Wash Buffer	5 Minuten

6. Gegenfärbung

EnVision™ FLEX Hematoxylin, 10%ig	3 Minuten
Bläuen in Leitungswasser	10 Minuten

7. Entwässern und Eindecken

Aqua dest.	3 Minuten
Ethanol 50%	3 Minuten
Ethanol 70%	3 Minuten
Ethanol 80%	3 Minuten
Ethanol 96%	3 Minuten
Ethanol 100%	3 Minuten
Xylol	3 Minuten
Xylol	3 Minuten
Xylol	3 Minuten
Eindecken mit Entellan®	

3.5 Histopathologische Auswertung

Die Bewertung der immunhistochemischen Färbungen der cholangiozellulären Karzinome wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Allgemeine Pathologie der Universitätsmedizin in Mainz durchgeführt. Dabei erfolgte die Bewertung primär durch die Doktorandin selbst sowie durch Herrn Dr. med. Dirk Ridder. Als weitere Ansprechpartnerin stand Frau Univ.-Prof. Dr. med. Beate Straub zur Verfügung. Alle Präparate wurden zweifach bewertet, bei abweichendem zweiten Bewertungsergebnis konnte durch gemeinsame Jurierung ein Konsens gefunden werden. Als Lichtmikroskop diente das Modell BX51 von der Firma Olympus (maximale Vergrößerung 400) mit der entsprechenden Kamera (Modell U-TV1X-2, U-CMAD3, Color View II).

Um das Karzinom vom Normalgewebe zu unterscheiden, wurden allgemeingültige Kriterien maligner Gewebeveränderungen betrachtet: Zellpolymorphien mit Atypien der Zellkerne sowie Mitosen, eine zum Teil ausgeprägte desmoplastische Stromareaktion, Gallengangsproliferate in der Tumorperipherie, Infiltration des Lebergewebes (insbesondere Sinusoide) und Perineuralscheiden sowie Differenzierungsverluste des Gallengangepithels. Häufig ist zudem die Kern-Plasma-Relation zugunsten der Zellkerne verschoben.

Für die Bewertung der immunhistochemisch angefärbten Schnitte wurden folgende Eigenschaften bewertet:

1. Färbeintensität (negativ (0), schwach (1), moderat (2), stark (140)) der Tumorzellen
2. Prozentualer Anteil der gefärbten Fläche des Tumors (0-100%)
3. Zytosol- und/oder Zellkernfärbung
4. Bei SIRT6: Anteil und Intensität (negativ (0), schwach (1), moderat (2), stark (140)) der in der Leber gefärbten Zellen
5. Weitere Auffälligkeiten (zum Beispiel andere gefärbte Zellen)

3.6 Immunhistochemische Färbeergebnisse

Um die Expression der immunhistochemischen Marker zu quantifizieren, wurde sich dem Immunreaktiven Score (14) nach Remmele und Stegner bedient (siehe Abbildung 11). Dieser Score wurde 1987 entwickelt, um den Hormonrezeptorstatus von Progesteron- und Östrogenrezeptoren bei Mammakarzinomen zu bewerten. Dazu wird entnommenes Gewebe immunhistochemisch angefärbt und wie folgt bewertet: die Färbeintensität (0: negativ, 1: schwach, 2: mittel, 3: stark) wird mit dem Prozentsatz der angefärbten Tumorzellen (0: negativ, 1: <10%, 2: 10-50%, 3: 51-80%, 4: >80%) multipliziert, sodass sich Werte von 0 bis 12 (Percent Points (PP)) ergeben (141).

Färbeintensität	Anteil positiver Tumorzellen	max. Wert
0 = keine Färbereaktion	0 = keine positiven Zellen	3 x 4 = 12
1 = schwache Färbereaktion	1 = < 10% positive Zellen	
2 = mäßige Färbereaktion	2 = 10 - 50% positive Zellen	
3 = starke Färbereaktion	3 = 51 - 80% positive Zellen	
	4 = > 80% positive Zellen	

Abbildung 11: Immunreaktiver Score (14) nach Remmele und Stegner in der Originalversion

Aus: (142)

Der immunreaktive Score nach Remmele und Stegner bewertet Mammakarzinome mit einem Score von 0 als negativ, von 1 bis 3 als schwach positiv, zwischen 4 und einschließlich 6 als mäßig positiv und ab 8 als stark positiv (143).

3.6.1 Immunreaktiver Score für Argpyrimidin (79)

Für Argpyrimidin fiel auf, dass das Färbeergebnis eher schwach ausfiel. Im Vorhinein gab es keinen Hinweis für die zu erwartende Färbeintensität, da Argpyrimidin zum einen bisher wenig

untersucht wurde und das Färbeergebnis je nach Ursprungsort des Tumors sehr unterschiedlich ausfiel. Für Argpyrimidin wurde der Immunreaktive Score (14) abgewandelt, sodass sich folgende Einteilung ergab:

Tabelle 8: Modifizierter Immunreaktiver Score für Argpyrimidin

Intensität	Anteil der gefärbten Tumorzellen
0: negativ	0: 0%
1: schwach positiv	1: < 5%
2: mäßig positiv	2: 5 – 45%
3: stark positiv	3: 46 – 70%
	4: > 70%

3.6.2 Immunreaktiver Score für Sirtuin 6

Sirtuin 6 wurde bisher zwar in mehr Studien untersucht als Argpyrimidin, dennoch gab es im Vorfeld keine Abschätzung, wie der Färbenachweis im CCC ausfallen würde. Für SIRT6 wurde der Immunreaktive Score (14) abgewandelt, sodass sich folgende Einteilung sowohl für den Tumor als auch für die Leberbewertung ergab:

Tabelle 9: Modifizierter Immunreaktiver Score für Sirtuin 6

Intensität	Anteil der gefärbten Tumorzellen
0: negativ	0: 0 bis 2,49%
1: schwach positiv	1: 2,5 – 25%
2: mäßig positiv	2: 26 - 50%
3: stark positiv	3: 51 - 75%
	4: > 75%

In der SIRT6-Färbung fiel auf, dass sich sowohl das Zytosol als auch der Nukleus positiv auf SIRT6 zeigten. Dabei herrschte jedoch eine deutliche Inhomogenität innerhalb der Kohorte und die Tumoren zeigten sich zum Teil mit Zytosol- oder Kernfärbung oder wiesen in beiden Zellkompartimenten SIRT6 auf. Daher floss unter dem Punkt „Fläche“ der höhere Prozentwert in den IRS, unabhängig davon, ob es der der Zytosol- oder der Kernfärbung war.

3.7 Statistische Analysen

3.7.1 Allgemeines

In den Jahren 1998 bis 2015 konnte an der Universitätsmedizin Mainz von 245 Patienten, bei denen ein cholangiozelluläres Karzinom diagnostiziert wurde, histopathologisches Material gewonnen werden, welches für diese Dissertationsarbeit genutzt werden konnte. Die Tumoren wurden anhand des ICD-10 (iCCA (C22.1), eCCA (C24), Gallenblasentumoren (C23)) kategorisiert und das Krankheitsstadium abhängig von Tumorgröße sowie Lymphknoten- und Fernmetastasenstatus (TNM-Stadium) einem UICC-Stadium (0 bis 4) zugeteilt. Die Zuteilung erfolgte nachdem jeweils gültigen UICC-Nomenklatur. Die Ergebnisse der mikroskopischen Bewertung und der immunhistochemischen Färbung sowie klinisch-pathologische Merkmale der Patienten (u. a. Laborparameter, Risikofaktoren, Therapie) wurden in einer Microsoft® Exceltabelle zusammengetragen und anschließend in das Statistikprogramm SPSS® überführt. Die statistische Analyse erfolgte mit der Statistiksoftware IBM® SPSS® Statistics (Versionen 23, 25 und 27) der Firma IBM® (Armonk, NY, USA). Zusätzlich erfolgte eine statistische Beratung und Prüfung durch das Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) der Johannes-Gutenberg-Universität, im Speziellen von Herrn Brahim Aboulmaouahib.

Zunächst erfolgte eine deskriptive Analyse des Gesamtkollektivs, deren Ergebnisse tabellarisch, graphisch oder in Textform präsentiert wurden. Kategoriale Daten wurden anhand ihrer Verteilung in Anzahl (n) und Häufigkeit in Prozent (%) angegeben. Stetige Variablen wurden durch Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen, Minimum sowie Maximum und Quartile charakterisiert. Die Testung auf Normalverteilung erfolgte durch einen Shapiro-Wilk-Test. Für normalverteilte Daten wurden paramterische Tests (u. a. t-Test/ANOVA/Pearson-Korrelation), für nicht-normalverteilte Daten nicht-paramterische Test (u. a. Mann-Witney U Test/Kruskal-Wallis-Test) angewendet.

Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt, sodass bei p-Werten $< 0,05$ die H_0 -Hypothese verworfen werden konnte.

Die H_0 -Hypothese beschäftigte sich mit der Frage, ob es Unterschiede hinsichtlich des Überlebens und weiterer patienten- und tumorspezifischer Charakteristika beim Nachweis von Argpyrimidin oder Sirtuin 6 gab. Die H_0 -Hypothese lautete zusammenfassend: Der Nachweis von Argpyrimidin beziehungsweise Sirtuin 6 in cholangiozellulären Karzinomen führt zu keinem Unterschied im Überleben oder im Hinblick auf patienten- oder tumorspezifische Merkmale im Vergleich zu Patienten mit cholangiozellulären Karzinomen ohne Nachweis von Argpyrimidin oder Sirtuin 6 im Tumor. Diese galt es zu widerlegen. Nebenhypothesen beschäftigten sich mit der Frage nach der Bedeutung der subzellulären Lokalisation von Sirtuin 6 (Kern vs. Zytosol)

für die Prognose, insbesondere beim intrahepatischen CCC, und einem möglichen Zusammenhang zwischen der Sirtuin-6-Expression im umgebenden Lebergewebe und dem Tumorverhalten.

3.7.2 Kreuztabellen

Zusammenhänge zwischen der Argpyrimidin- und Sirtuin-6-Positivität und patienten- bzw. tumorspezifischen Charakteristika wurden anhand von Kreuztabellen dargestellt. Dazu wurden Variablen z. T. dichotomisiert (z. B. CA 19-9-Serumspiegel < 37 kU/l (Norm) versus ≥ 37 kU/l (über dem Normbereich)). Eine mögliche Abhängigkeit der Variablen der Vierfeldertafel wurde mit Hilfe des exakten Tests nach Fisher getestet. Auch hier lag das Fehlerniveau für Fehler erster Art (α -Fehler) bei 5%.

3.7.3 Überlebensanalysen nach Kaplan-Meier

Kaplan-Meier-Analysen erlauben eine Schätzung über den Einfluss des Argpyrimidin- und Sirtuin-6-Expression auf das Gesamtüberleben, welches sich aus dem Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zum Todestag bzw. Lost of follow up definiert. Patienten, zu denen keine Angaben über das Überleben vorlagen oder die 2015 nach Ende der Datenerhebung noch lebten, wurden zum Ende der letzten Datenerhebung zensiert (Lost of follow up). Bei der Analyse werden stets zwei bis vier Überlebenskurven miteinander verglichen. Zum Vergleich des Überlebens zweier Gruppen wurde der Log Rank-Test zur Signifikanzprüfung genutzt. Ein p-Wert unter 0,05 erlaubte es uns, von der Nullhypothese abzuweichen und einen signifikanten Unterschied der beiden Gruppen anzunehmen.

Prognostische Faktoren wurden mit Hazard Ratio (HR), 95% Konfidenzintervall (KI) und p-Werten in Beziehung gesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Deskription

Das aktualisierte und dokumentierte Patientenkollektiv der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität umfasste 245 Patienten, bei denen in den Jahren 1998 bis 2015 ein cholangiozelluläres Karzinom diagnostiziert wurde. Tabelle 10 und Tabelle 11 fassen alle grundlegenden Patienten- und Tumorcharakteristika zusammen, Tabelle 12 zeigt das Überleben.

Tabelle 10: Grundlegende Patientencharakteristika und Laborwerte bei Erstdiagnose. eCCC = extrahepatische cholangiozelluläre Karzinome, iCCC = intrahepatische cholangiozelluläre Karzinome, GBT = cholangiozelluläre Karzinome der Gallenblase, IQA = Interquartilsabstand, n = Anzahl, ALT (GPT) = Alanin-Aminotransferase (Glutamat-Pyruvat-Transaminase), AST (GOT) = Aspartat-Aminotransferase (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase), INR = International Normalized Ratio, CA 19-9 = Carbohydrate-Antigen 19-9, Tumormarker für cholangiozelluläre Karzinome. ^a p-Wert (Pearson-Chi-Quadrat), ^b p-Wert (Kruskal-Wallis), ^c p-Wert (exakter Test nach Fisher). Paarweise Vergleiche im Anhang (vgl. Tabelle 44).

Grundlegende Patientencharakteristika	eCCC (31,4%, n = 77)	iCCC (66,5%, n = 163)	GBT (2,1%, n = 5)	p-Wert ^{a,b,c}	Gesamt (100%, n = 245)
Alter in Jahren, Median (IQA) (n=245)	64 (57,5-71)	65 (56-72)	67 (60-76,5)	0,638 ^b	65 (58-71)
Geschlecht, n (%) (n=245)				< 0,001 ^a	
Männlich	54 (70,1)	74 (45,4)	2 (40)		130 (53,1)
Weiblich	23 (29,9)	89 (54,6)	3 (60)		115 (46,9)
Komorbiditäten und Risikofaktoren n (%)					
Diabetes mellitus (n=244)	6 (7,8)	26 (16)	1 (20)	0,191 ^a	33 (13,5)
Alkohol (n=244)	2 (2,6)	10 (6,2)	0 (0)	0,493 ^a	12 (4,9)
Nikotin (n=244)	7 (9,1)	19 (11,7)	0 (0)	0,634 ^a	26 (10,6)
Laborwerte bei Erstdiagnose					
Laborparameter, Median (IQA)					
ALT (GPT) in mg/dl (n=205)	96 (58-232)	32 (21-50,25)	31,5 (27,25-71)	<0,001 ^b	40 (24-90)
AST (GOT) in mg/dl (n=205)	76 (49-125)	35 (28-54,25)	28,5 (21,25-43,25)	<0,001 ^b	44 (30,5-74,5)
Albumin in g/l (n=184)	31 (23,75-36,25)	35 (25,75-40)	28,5 (21,25-43,25)	0,211 ^b	33 (25-39)
Bilirubin in mg/dl (n=205)	4,06 (1,09-9,01)	0,65 (0,42-1,01)	0,74 (0,51-5,5)	<0,001 ^b	0,82 (0,5-1,92)
INR (n=205)	1 (0,9-1)	1 (1-1,1)	1,05 (1-1,4)	0,14 ^b	1 (1-1,1)
Tumormarker CA 19-9, Median (IQA) (n=143)	140,05 (35,13-749,85)	40,5 (15-182,1)	1180 (602,55-18143,7)	0,006 ^b	67 (21,4-368,9)

Tabelle 11: Tumorcharakteristika bei Erstdiagnose anhand der TNM- und UICC-Klassifikation (Union internationale contre le cancer). Tis = Carcinoma in situ. T = Tumorgröße, N+ = Lymphknotenmetastasen, M+ = Auftreten von Fernmetastasen. ^a p-Wert (Pearson-Chi-Quadrat), ^b p-Wert (Kruskal-Wallis), ^c p-Wert (exakter Test nach Fisher).

Tumorcharakteristika bei Erstdiagnose	eCCC	iCCC	GBT	p-Wert ^{a,b,c}	Gesamt
UICC-Stadium (n=227) (%)					
≤ 2	30 (40,5)	75 (50,7)	1 (20)	0,186 ^a ,	106 (46,7)
3-4	44 (59,5)	73 (44,8)	4 (80)	0,194 ^c	121 (53,3)
Differenzierung (n=233) (%)				0,429 ^a , 0,407 ^c	
Gut	3 (3,9)	3 (2)	0 (0)		6 (2,6)
Gut-mittel	16 (21,1)	31 (20,4)	1 (20)		48 (20,6)
Mittel	40 (52,6)	78 (51,3)	2 (40)		120 (51,5)
Mittel-niedrig	11 (14,5)	16 (10,5)	2 (40)		29 (12,4)
Niedrig	6 (7,9)	24 (15,8)	0 (0)		30 (12,9)
Tumorgröße (T-Status) (n=243) (%)				0,021 ^a , <0,001 ^c	
Tis	1 (1,3)	0 (0)	0 (0)		1 (0,4)
T1	6 (7,9)	52 (32,1)	0 (0)		58 (23,9)
T2	45 (59,2)	61 (37,7)	2 (40)		108 (44,4)
T3	18 (23,7)	47 (29)	1 (20)		66 (27,2)
T4	6 (7,9)	2 (1,2)	2 (40)		10 (4,1)
Lymphknoteninvasion (N+) (n=226) (%)	30 (40,5)	50 (34)	2 (40)	0,652 ^a , 0,623 ^c	82 (36,3)
Fernmetastasen (M+) (n=218) (%)	6 (9,7)	14 (9,2)	1 (25)	0,632 ^a , 0,47 ^c	21 (9,6)

Tabelle 12: Zusammenfassung des Gesamtüberlebens nach Kaplan-Meier in Monaten.

Überleben	eCCC	iCCC	GBT	p-Wert (Log Rank)	Gesamt
Medianes Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier in Monaten (95%-Konfidenzintervall) (n=245)	22,64 (16,9-28,37)	23,52 (18,13-28,92)	22,83 (0,0-46,68)	0,036 (Chi-Quadrat 6,664, df 2)	23,52 (19,15-27,9)

4.1.1 Grundlegende Patientencharakteristika

Das Gesamtkollektiv von 245 Patienten setzte sich aus 130 Männern (53,1%) und 115 Frauen (46,9%) mit cholangiozellulärem Karzinom zusammen. Insgesamt verteilte sich die Gruppe auf 163 (66,5%) intrahepatische, 77 (31,4%) extrahepatische (mit 73 (30%) Klatskin-Tumoren) und 5 (2,1%) Gallenblasenkarzinome. Die Klatskin-Tumoren teilten sich nach der Bismuth-Corlette-Klassifikation wie folgt ein (vgl. Tabelle 13):

Tabelle 13: Verteilung der Klatskin-Tumoren des Patientenkollektivs anhand der Klassifikation nach Bismuth und Corlette. Das Kollektiv schloss 77 (30% des Gesamtkollektivs) Patienten mit Klatskin-Tumoren ein, von denen der Großteil (46,8%) Stadium IV, beide Hepatikushauptäste betreffend, zuzuordnen war.

Bismuth-Corlette-Klassifikation

Stadium	n (%)
I	2 (2,6)
II	3 (3,9)
III	24 (31,2)
IV	36 (46,7)
un- be- kannt	12 (15,6)
ge- samt	77 (100)

Das Durchschnittsalter in der Gesamtkohorte lag bei 63,57 Jahren (Standardabweichung $\pm$ 11,1 Jahre), der Median bei 65 Jahren (IQA 58-71 Jahre). Dabei war der jüngste Patient zum Zeitpunkt der Erstdiagnose 32 Jahre alt, der älteste 84 Jahre. Die Altersverteilung unterschied sich zwischen den Geschlechtern kaum (im Median bei ♂: 64 Jahre (IQA 58-70 Jahre) und ♀: 66 Jahre (IQA 55-72 Jahre)). Ebenso lag das Alter bei eCCC und iCCC nah beieinander (eCCC: Median: 65 Jahre (IQA 57,5-71 Jahre), Minimum: 39 Jahre, Maximum 84 Jahre; iCCC: Median 65 Jahre (IQA 56-72 Jahre), Minimum: 32 Jahre, Maximum 84 Jahre). Patienten mit Gallenblasenkarzinomen waren in der Kohorte etwas älter (Median: 67 Jahre (IQA 60-76,5 Jahre), Minimum 59 Jahre, Maximum 81 Jahre). Die männlichen Patienten des Kollektivs wiesen zu 56,9% (n=74) intrahepatische, zu 41,5% (n=54) und zu 1,5% (n=2) Gallenblasenkarzinome auf, bei Frauen lag das intrahepatische Karzinom in 77,4% (n=89) der Fälle vor, extrahepatische Karzinome traten in 20% (n=23) und Gallenblasenkarzinome in 2,6% (n=3) der Fälle auf. Dieser Unterschied der Lokalisation zwischen beiden Geschlechtern konnte mit einem p-Wert von $< 0,001$ (nach Pearson-Chi-Quadrat) unterstrichen werden. Abbildung 12 zeigt die Geschlechtsverteilung je nach Tumorlokalisierung graphisch und macht hier deutlich,

dass der Anteil an Männern mit extrahepatischen Karzinomen und der Anteil an Frauen mit intrahepatischen Karzinomen in diesem Kollektiv überwog.

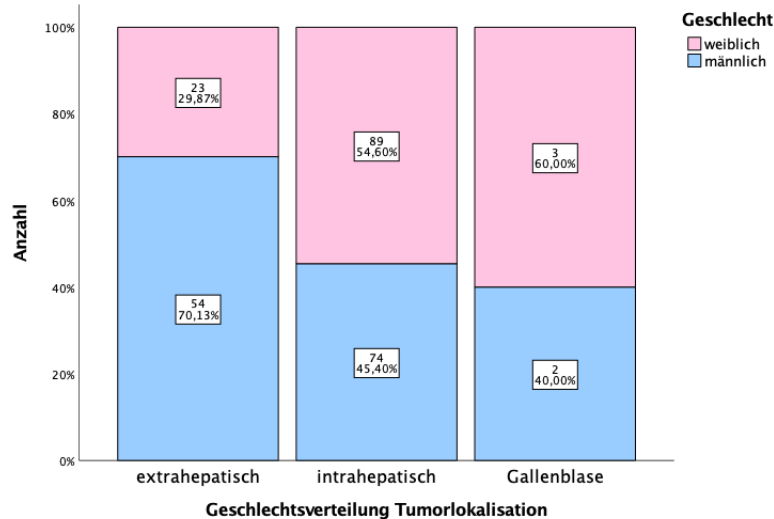


Abbildung 12: Das gestapelte Säulendiagramm veranschaulicht die Verteilung der Tumorlokalisation im Hinblick auf das Geschlecht. eCCC: 70,13% Männer, 29,8% Frauen. iCCC: 45,4% Männer, 54,6% Frauen. Gallenblasenkarzinome: 40% Männer, 60% Frauen. Im Umkehrschluss bedeutet dies eine Verteilung der Tumorlokalisation bei Männern: 41,5% (n=54) eCCCs, 56,9% (n=74) iCCCs und 1,5% (n=2) Gallenblasenkarzinome und bei Frauen: 20% (n=23) eCCCs, 77,4% (n=89) iCCCs und 2,6% (n=3) Gallenblasenkarzinome. Der geschlechtsspezifische Unterschied im Hinblick auf die Tumorlokalisation wurde durch einen p-Wert von < 0,001 (nach Pearson-Chi-Quadrat) unterstrichen.

4.1.2 Allgemeine Risikofaktoren und Komorbiditäten

Als mögliche Risikofaktoren werden im Folgenden die Nikotin- sowie Raucheranamnese und das Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ 2 aufgeführt. 10,6% des Kollektivs gaben eine Raucheranamnese an und 4,9% äußerten einen regelmäßigen Alkoholkonsum. Von den Patienten mit eCCC rauchten 9,1%, beim intrahepatischen CCC waren es 11,7%. Eine Alkoholanamnese konnte bei 2,7% der Patienten mit extrahepatischen CCC und bei 6,1% der Patienten mit iCCC dokumentiert werden. Bei 13,5% (n=33) von 245 Patienten des Kollektivs bestand zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eine Komorbidität durch einen Diabetes mellitus Typ 2.

4.1.3 Tumorcharakteristika

Für 218 Patienten (89%) lag eine vollständige TNM-Klassifizierung und für 227 Patienten (92,7%) ein UICC-Stadium nach der zum Diagnosezeitpunkt aktuellen UICC-Einteilung vor. Das Tumorgading konnte bei 233 Patienten (95,1%) ermittelt werden. Während bei etwa zwei Drittel der Patienten (167 Patienten, 68,2%) ein eher kleiner Tumor (Tis bis T2) nach der TNM-Klassifikation vorlag, wiesen 76 Patienten (31%) einen Tumor größer T2 auf. Bei zwei Patienten

ten (0,8%) war kein T-Stadium dokumentiert. Der Nachweis von Lymphknotenmetastasen erfolgte bei 82 Patienten (33,5%), bei 21 Patienten (8,6%) konnten Fernmetastasen bei Erstdiagnose nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 14).

Tabelle 14: TNM-Klassifikation des Gesamtkollektivs und aufgeteilt nach Tumorlokalisation. 68,2% der Patienten zeigten einen Tumor bis T2, 33,5% der Patienten wurden als N+ und 8,6% als M+ klassifiziert. NX bzw. MX = unbekannter Lymphknoten- bzw. Fernmetastasenstatus.

Tumor-charakteristika	Gesamtkollektiv n (%)	Extrahepatisch n (%)	Intrahepatisch n (%)	Gallenblase n (%)
Gesamtzahl	245 (100,00)	77 (31,4)	163 (66,5)	5 (2)
T-Status				
Tis	1 (0,4)	1 (1,3)	0 (0)	0 (0)
T1	58 (23,7)	6 (7,8)	52 (31,9)	0 (0)
T2	108 (44)	45 (58,5)	61 (37,5)	2 (40)
T3	66 (26,9)	18 (23,4)	47 (28,8)	1 (20)
T4	10 (4,1)	6 (7,8)	2 (1,2)	2 (40)
TX	2 (0,8)	1 (1,3)	1 (0,6)	0 (0)
N-Status				
N0	144 (58,8)	44 (57,1)	97 (59,5)	3 (60)
N1	78 (31,8)	26 (33,8)	50 (30,7)	2 (40)
N2	4 (1,6)	4 (5,2)	0 (0)	0 (0)
NX	19 (7,7)	3 (3,9)	16 (9,8)	0 (0)
M-Status				
M0	197 (80,4)	56 (72,7)	138 (84,7)	3 (60)
M1	21 (8,6)	6 (7,8)	14 (8,6)	1 (20)
MX	27 (11)	15 (19,5)	11 (6,7)	1 (20)

Die Ergebnisse der TNM-Klassifikation spiegeln sich zusammenfassend in der jeweils aktuellen UICC-Klassifikation wider (Tabelle 15). Nach UICC waren 39 Patienten (17,2%) in Stadium 1; 66 Patienten (29,1%) in Stadium 2; 94 Patienten (41,4%) in Stadium 3 und 27 Patienten in Stadium 4 (11,9%). Ein Patient (0,4%) hatte ein Carcinoma in situ (20) und war damit im Stadium 0.

Anhand des UICC-Schemas konnte in frühe (Stadium 0 bis 2) und fortgeschrittene (Stadium 3 bis 4) Krankheitsstadien eingeteilt werden. Dabei hielt sich die Verteilung in etwa die Waage: 106 Patienten (46,7%) ließen sich der frühen, 121 Patienten (53,3%) der fortgeschrittenen Kategorie zuordnen.

Tabelle 15: UICC-Klassifikation des Gesamtkollektivs und aufgeteilt nach Tumorlokalisation. Die Verteilung im Gesamtkollektiv war in etwa ausgeglichen: 46,7% der Patienten befanden sich bei Erstdiagnose im Stadium UICC 0 bis 2, 53,3% im UICC-Stadium 3 bis 4.

Tumor-charakteristika	Gesamtkollektiv n (%)	Extrahepatisch n (%)	Intrahepatisch n (%)	Gallenblase n (%)
Gesamtzahl	245 (100,00)	77 (31,4)	163 (66,5)	5 (2)
UICC-Stadium				
0	1 (0,4)	1 (1,3)	0 (0)	0 (0)
1	39 (15,9)	4 (5,2)	35 (21,5)	0 (0)
2	66 (26,9)	25 (32,5)	40 (24,5)	1 (20)
3	94 (38,4)	34 (44,2)	59 (36,2)	1 (20)
4	27 (11)	10 (13)	14 (8,6)	3 (60)
unbekannt	18 (7,3)	3 (3,9)	15 (9,2)	0 (0)

Bei knapp der Hälfte der Patienten (120 Patienten, 49%) ergab das Grading einen mäßig differenzierten („mittel“) Tumor. Es wurden Gruppen gebildet, die die eher gut differenzierten Tumoren (gut: gut, gut-mittel und mittel) von den eher schlecht differenzierten Tumoren (schlecht: mittel-niedrig und niedrig) unterschieden. Dadurch ergab sich, dass 71,02% der Patienten einen tendenziell gut differenzierten Tumor aufwiesen (Tabelle 16).

Tabelle 16: Tumorgading des Gesamtkollektivs sowie aufgeteilt nach Lokalisation des Primarius. Zusammengefasst in Gruppen (gut: gut, gut-mittel und mittel versus schlecht: mittel-niedrig und niedrig) zeigte sich, dass 71,02% der Patienten einen tendenziell gut differenzierten Tumor wiesen.

Tumor-charakteristika	Gesamtkollektiv n (%)	Extrahepatisch n (%)	Intrahepatisch n (%)	Gallenblase n (%)
Gesamtzahl	245 (100)	77 (31,4)	163 (66,5)	5 (2)
Grading				
Gut	6 (2,4)	3 (3,9)	3 (1,8)	0 (0)
Gut-mittel	48 (19,6)	16 (20,8)	31 (19)	1 (20)
Mittel	120 (49)	40 (51,9)	78 (47,9)	2 (40)
Mittel-niedrig	29 (11,8)	11 (14,3)	16 (9,8)	2 (40)
Niedrig	30 (12,2)	6 (7,8)	24 (14,7)	0 (0)
unbekannt	12 (4,9)	1 (1,3)	11 (6,7)	0 (0)

Letztlich zeigten kleinere Tumoren (Tis bis T2) häufiger ein besseres histopathologisches Grading als größere Tumoren (vgl. Tabelle 45 im Anhang).

4.1.4 Laborparameter

Mittels retrospektiver Recherche aus der SAP-Datenbank ließen sich leberspezifische Marker aus dem Serum, sowie weitere Laborparameter aus Citrat- und EDTA-Blut nachverfolgen. Eine Tabelle mit der Verteilung der Laborwerte ist dem Anhang zu entnehmen (siehe Tabelle 46).

Patienten mit extrahepatischen Gallengangskarzinomen zeigten zum Diagnosezeitpunkt im Vergleich zu den anderen Lokalisationen deutlich erhöhte GPT-, GOT- und Bilirubin-Spiegel. Dieser Unterschied war statistisch deutlich nachweisbar mit einem p-Wert (Kruskal-Wallis) von jeweils $<0,001$.

Bei 143 Patienten (58,4%) lagen Werte des Tumormarkers CA 19-9 vor Therapiebeginn vor. So bestätigt sich für extrahepatische und Gallenblasenkarzinome, dass die Mehrheit (73,7%) der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung erhöhte CA 19-9-Spiegel (> 37 kU/l) aufwies. Bei Patienten mit intrahepatischem Gallengangskarzinom war die Verteilung von normwertigen zu erhöhten CA 19-9-Spiegel eher ausgeglichen (normwertiges CA 19-9: 48,8%; erhöhtes CA 19-9: 51,2%).

Die Mittelwerte für den CA 19-9-Spiegel bei Erstdiagnose lagen bei Patienten mit eCCC bei 1.630,9 IU/ml, mit iCCC von 3.642,3 IU/ml und mit GBT von 12.104,2 IU/ml. Ein Kruskal-Wallis-Test zeigte mit einem p-Wert von 0,006 einen statistisch signifikanten Unterschied, der sich im paarweisen Vergleich zwischen eCCC und iCCC bestätigte (p-Wert = 0,01), vgl. Tabelle 44.

4.1.5 Therapiealgorithmus

In den meisten Fällen erhielten die Patienten im Laufe der Zeit mehrere Therapiemodalitäten. 228 Patienten (93,1%) wurden initial operiert, 17 Patienten (6,9%) wurden nach Diagnosestellung mit Chemotherapie oder lokalen Verfahren (zum Beispiel Embolisation oder selektive interne Radiotherapie (SIRT)) behandelt. Ein Fließdiagramm über die Therapieverfahren kann der Abbildung 13 entnommen werden.

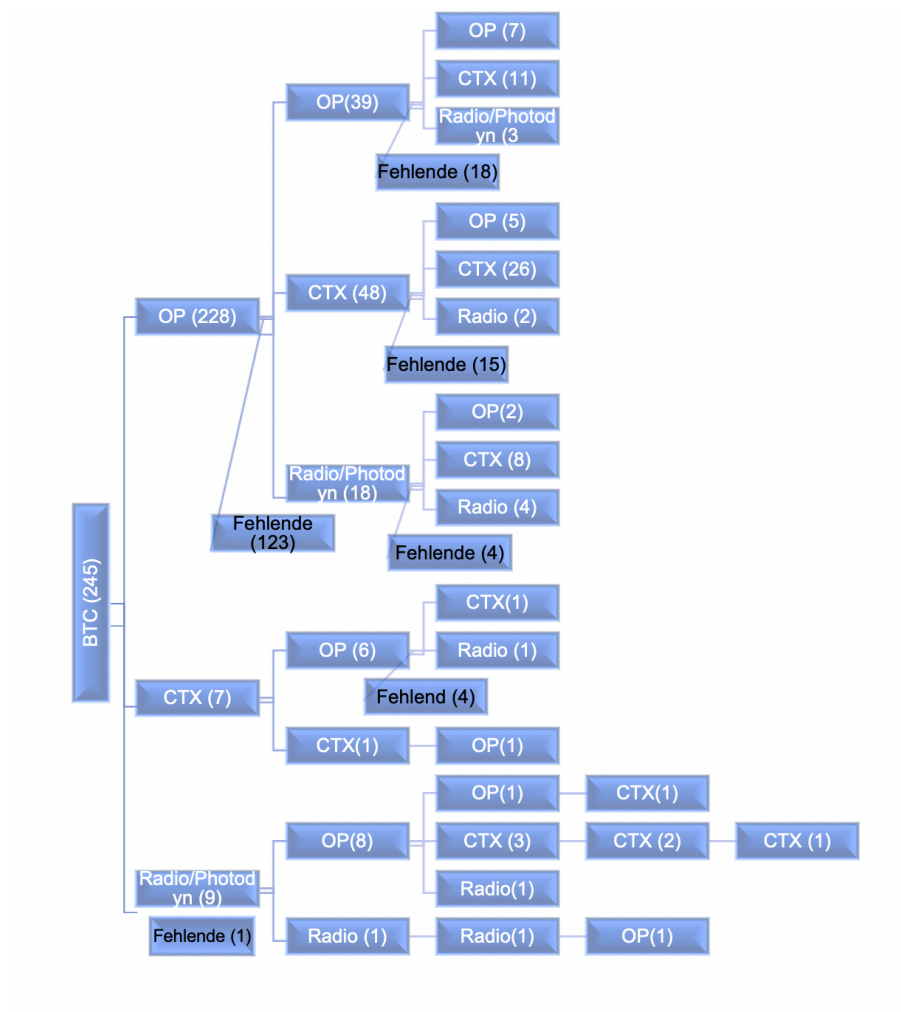


Abbildung 13: Vereinfachte Darstellung der Therapieverläufe im Fließdiagramm. Der Großteil der Patienten (93,1%, n=228) wurde initial operiert, im Verlauf kamen den meisten Patienten jedoch verschiedenen Therapiemodalitäten zu.

4.1.6 Gesamtüberleben (Overall Survival)

Bei allen Patienten lag ein Datum vor, welches entweder den Kontaktabbruch markierte oder dem Todesdatum entsprach. Daraus errechneten sich die Überlebenszeiträume. Ein Patient überlebte im beschriebenen Beobachtungszeitraum mit 189,24 Monaten (15,35 Jahre) am längsten, im Median lag die Überlebenszeit bei 23,5 Monaten (95%-Konfidenzintervall 19,2-27,9 Monate).

Das mittlere Überleben (bzw. die mediane Überlebenszeit) von Patienten mit intrahepatischen Karzinomen war mit 23,5 Monaten (95% KI 18,1-28,9 Monate) etwas länger als die mediane Überlebenszeit bei Patienten mit extrahepatischen Karzinomen mit 22,6 Monate (95% KI 16,9-28,4 Monate). Die geringe Anzahl der Gallenblasenkarzinompatienten überlebten im Median 22,8 Monate (95% KI 0-46,7 Monate) (vgl. Abbildung 14).

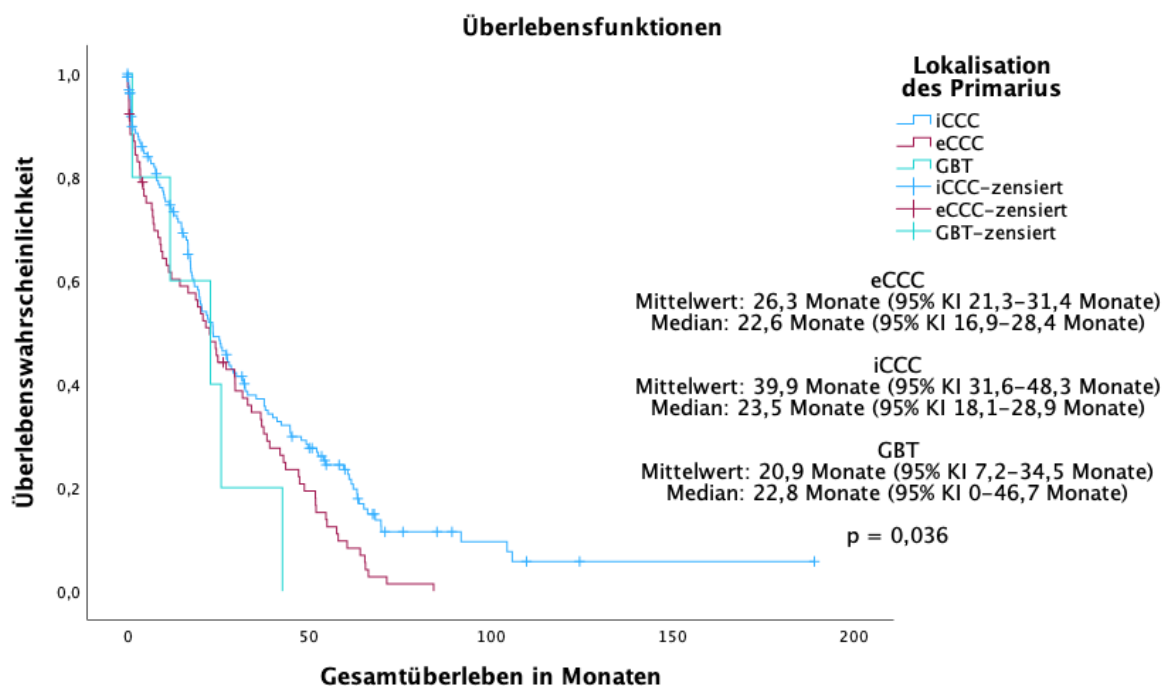


Abbildung 14: Overall Survival und graphische Darstellung einer Kaplan-Meier-Kurve für iCCC, eCCC und GBT. Das mediane Gesamtüberleben für Patienten mit eCCC betrug 22,6 Monate (95% KI 16,9-28,4 Monate), für Patienten mit iCCC 23,5 Monate (95% KI 18,1-28,9 Monate) und für Patienten mit GBT 22,8 Monate (95% KI 0-46,7 Monate). Log Rank (Mantel Cox) $p = 0,036$.

Im Gesamtkollektiv überlebten Patienten mit kleinen Tumoren (< T3) länger als jene mit größeren Tumoren (T3-T4) (Log Rank (Mantel Cox) $p = 0,008$; $0,013$ unter Ausschluss von GBT), gleiches galt für Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (Log Rank (Mantel Cox) $p < 0,001$; $< 0,001$ unter Ausschluss von GBT). Daraus folgend war die Überlebenszeit von Patienten mit niedrigerem UICC-Stadium (UICC 0-2) länger als von Patienten im fortgeschrittenen Tumorstadium (Log Rank (Mantel Cox) $p < 0,001$; $< 0,001$ unter Ausschluss von GBT). Entsprechende Kaplan-Meier-Diagramme sind im Anhang zu finden (vgl. Abbildung 51)

In Abhängigkeit von der Lokalisation des Primarius und dem Nachweis erhöhter CA 19-9-Werte zeigte sich das längste Überleben bei Patienten mit iCCC und normwertigem CA 19-9-Wert (Mittelwert 43,3 Monate (95% KI 32,5-54,1 Monate), Median: 33,1 Monate (95% KI 20,7-45,5 Monate)) und das kürzeste Überleben bei Patienten mit intrahepatischen Karzinomen und erhöhten CA 19-9-Werten (Mittelwert: 34 Monate (95% KI 15,3-32,7 Monate), Median: 15,3 Monate (95% KI 9,9-20,7 Monate)). Im Viergruppenvergleich von Tumormarker und Tumorlokalisation lag der p-Wert bei 0,037 (Log Rank (Mantel Cox)) (vgl. Abbildung 15).

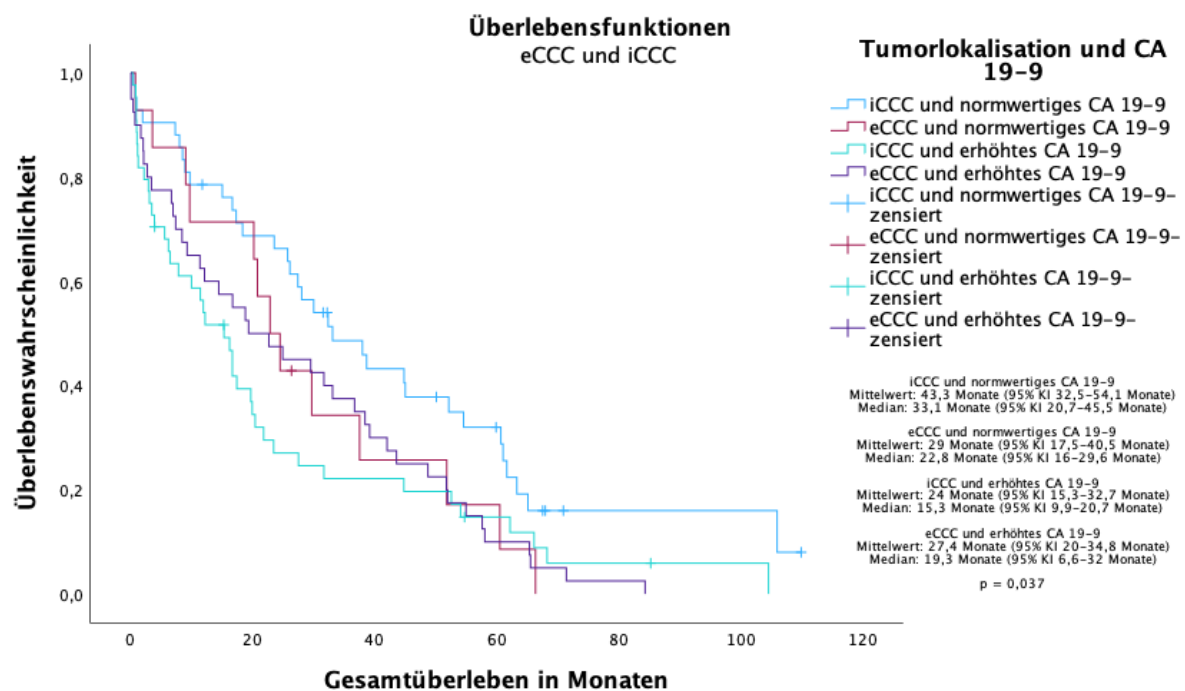


Abbildung 15: Vergleich der Tumorlokalisation (eCCC und iCCC) und des Tumormarkers CA 19-9 anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms. Es zeigte sich das längste Überleben bei Patienten mit iCCC und normwertigem CA 19-9-Wert (Mittelwert 43,3 Monate (95% KI 32,5-54,1 Monate), Median: 33,1 Monate (95% KI 20,7-45,5 Monate)) und das kürzeste Überleben bei Patienten mit intrahepatischen Karzinomen und erhöhten CA 19-9-Werten (Mittelwert: 34 Monate (95% KI 15,3-32,7 Monate), Median: 15,3 Monate (95% KI 9,9-20,7 Monate)). Bei Patienten mit eCCC schien der CA 19-9-Wert keinen großen Einfluss auf die Dauer des Gesamtüberlebens zu haben. p-Wert (Log Rank (Mantel Cox)) 0,037.

4.2 Färbungen

Im folgenden Kapitel wird die histologische Auswertung der Färbeergebnisse behandelt. Für das zuvor beschriebene Patientenkollektiv wurden immunhistochemische Färbungen auf Argpyrimidin und Sirtuin 6 angefertigt. Dabei wiesen 229 Patientenproben ausreichend bewertbare Tumorzellen auf. 16 Präparate (6,5%) wurden der Auswertung entzogen, da sich zu wenig oder keine Tumorzellen auf dem Schnitt befanden oder sich das Präparat aus anderen Gründen nicht zur Auswertung eignete. Der Ausschluss der 16 Präparate führte zu keiner wesentlichen Änderung der Zusammensetzung des Kollektiv, sodass dieses zur Auswertung weiterhin repräsentativ blieb.

4.2.1 Argpyrimidin

4.2.1.1 Argpyrimidin im Tumor

Die untenstehenden Abbildungen (Abbildung 16, Abbildung 17, Abbildung 18, Abbildung 19) zeigen exemplarisch die Färbeintensität für Argpyrimidin in aufsteigender Intensität:

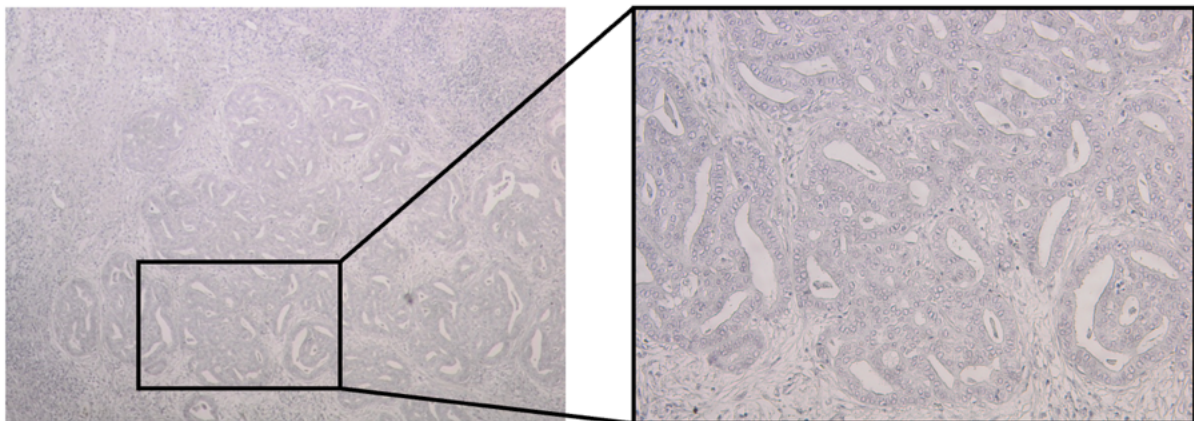


Abbildung 16: fehlende Färbung (0) auf Argpyrimidin, links 40-fache Vergrößerung, rechts 100-fache Vergrößerung

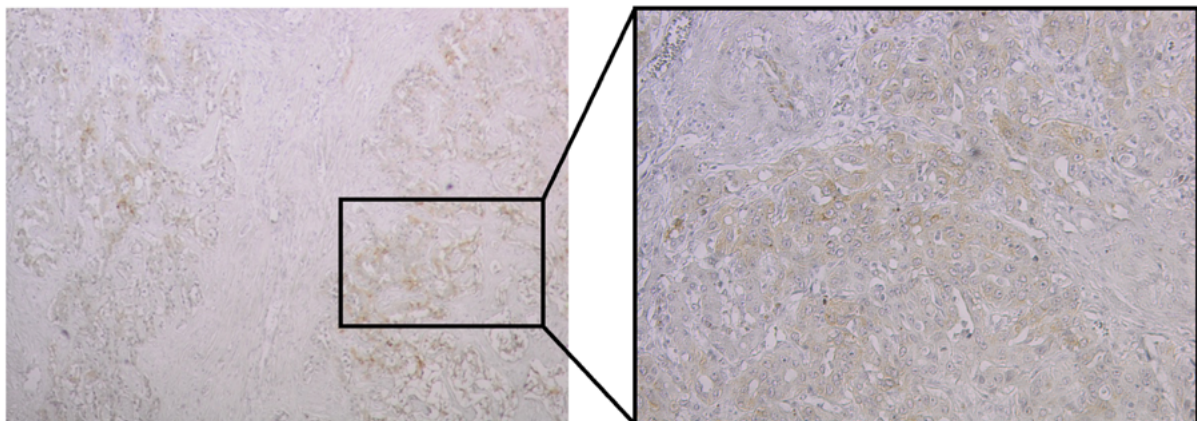


Abbildung 17: schwache Färbung (1) auf Argpyrimidin, links 40-fache Vergrößerung, rechts 100-fache Vergrößerung

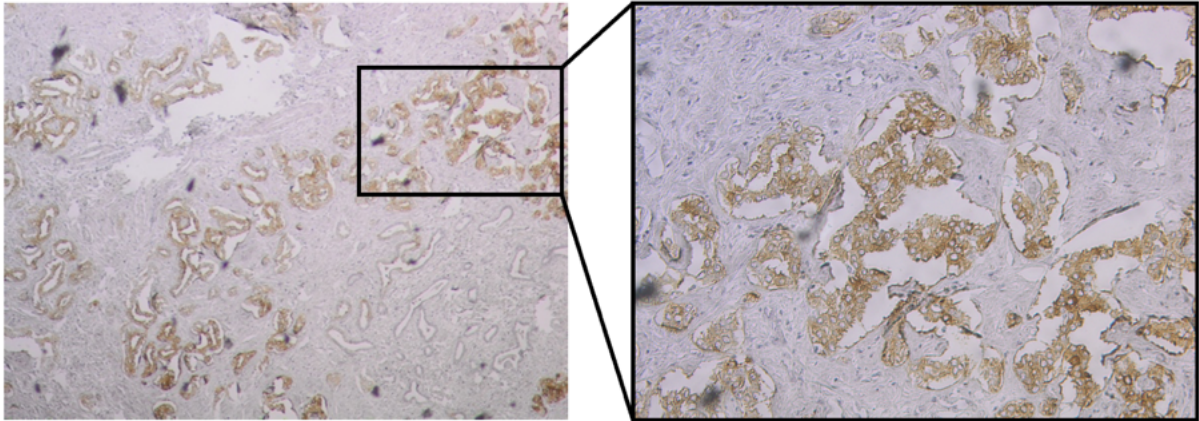


Abbildung 18: moderate Färbung (2) auf Argpyrimidin, links 40-fache Vergrößerung, rechts 100-fache Vergrößerung. Zu erkennen ist eine Färbung ausschließlich im Zytosol.

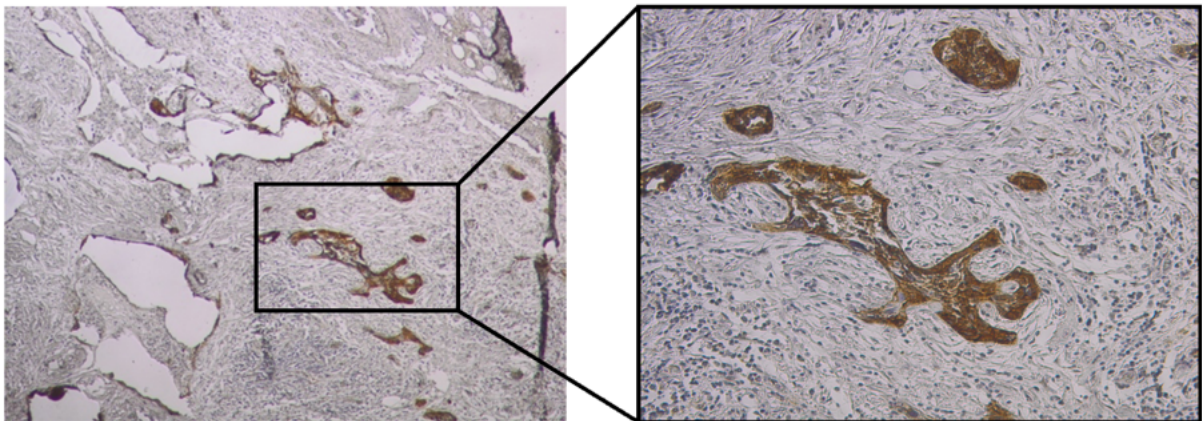


Abbildung 19: starke Färbung (140) auf Argpyrimidin, links 40-fache Vergrößerung, rechts 100-fache Vergrößerung

Durch die Multiplikation von Intensität und Anteil der gefärbten Zellen ergeben sich im IRS sogenannte Percent Points (PP). Die Verteilung der PP lässt sich der untenstehenden Abbildung 20 entnehmen.

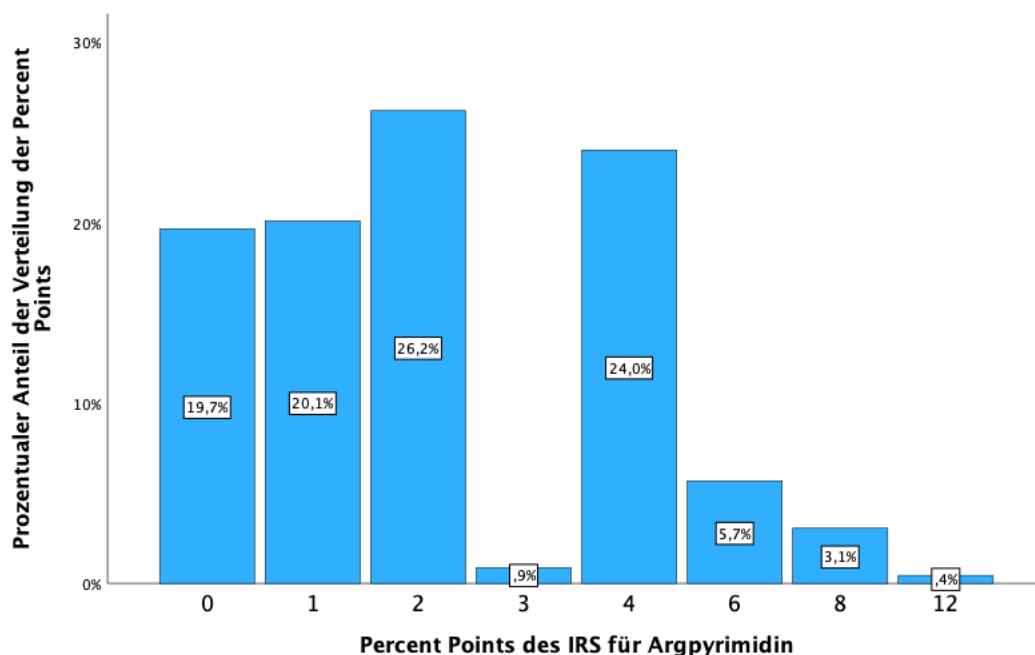


Abbildung 20: Verteilung der Percent Points (PP) des immunreaktiven Scores (IRS für Argpyrimidin)

Anhand der Verteilung der Percent Points des IRS für Argpyrimidin wurde ein Cut Off Wert zur Unterscheidung von negativ versus positiv bei 1 gesetzt. So wurden Präparate mit Percent Points von 0 bis 1 als negativ und mit Percent Points von 2 bis 12 als positiv bewertet. Daraus ergab sich eine Bewertung von 91 (39,7%) Argpyrimidin-negativen und 138 (60,3%) positiven Präparaten (vgl. Tabelle 17).

Tabelle 17: Verteilung der Argpyrimidin-negativen und -positiven Präparate anhand der Verteilung der Percent Points beim IRS für Argpyrimidin. Der Cut Off wurde bei einem (1) Percent Point gesetzt. Die Bewertung eine Bewertung von 91 (39,7%) negativen und 138 (60,3%) positiven Präparaten. Bei Patienten mit eCCC überwog der Anteil an Argpyrimidin-positiven (69,1%) Präparaten, wohingegen die Verteilung bei iCCC nahezu ausgeglichen war. Alle Patienten mit Gallenblasentumoren wiesen Argpyrimidin im Tumor auf.

Cut Off IRS Argpyrimidin

PP 0 bis 1: negativ n (%)	91 (39,7)
	extrahepatisch 21 (30,9% der eCCC)
	intrahepatisch 70 (44,9% der iCCC)
	Gallenblase 0 (0% der GBT)
PP 2 bis 12: positiv n (%)	138 (60,3)
	extrahepatisch 47 (69,1% der eCCC)
	intrahepatisch 86 (55,1% der iCCC)
	Gallenblase 5 (100% der GBT)
gesamt	229 (100)

69,1% der eCCC und 55,1% der iCCC wurden als Argpyrimidin-positiv gewertet, ebenso alle Karzinome der Gallenblase. Der Median der Percent Points lag sowohl für intrahepatische als

auch für extrahepatische Karzinome bei 2 PP, bei Gallenblasentumoren bei 4. Der Interquartilsabstand (IQA) für eCCC lag bei 3 (1-4), für iCCC bei 4 (0-4) und für Gallenblasenkarzinome bei 2 (2-4). Abbildung 21 zeigt die Verteilung der Percent Points anhand von Kreisdiagrammen.

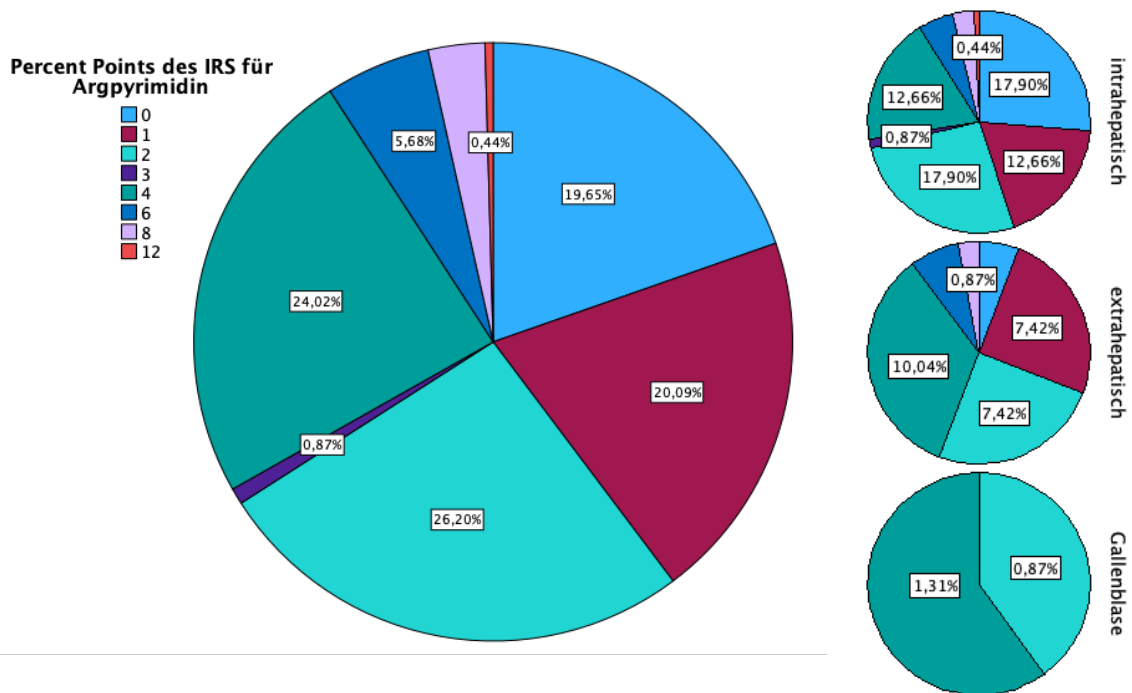


Abbildung 21: Kreisdiagramme zur Verteilung der Percent Points für Argpyrimidin im Gesamtkollektiv (links) und in Abhängigkeit der Lokalisation des Tumors (rechts). 19,65% des Gesamtkollektivs wiesen kein Argpyrimidin im Tumor auf, knapp dreiviertel aller Präparate verteilten sich auf 1 bis 4 Percent Points. Der Median der Percent Points sowohl für iCCC als auch für eCCC lag bei 2. Bei Karzinomen der Gallenblase lag der Median bei 4. Der Interquartilsabstand (IQA) für eCCC bei 3 (1-4), für iCCC lag bei 4 (0-4), für eCCC bei 3 (1-4) und für Gallenblasenkarzinome bei 2 (2-4).

Zwischen den Geschlechtern ergab sich kein Unterschied zwischen der Verteilung der Percent Points (vgl. Tabelle 47 im Anhang).

4.2.1.2 Argpyrimidin in der Leber

Es erfolgte zudem der quantitative Nachweis von Argpyrimidin und Angabe der Färbeintensität von 0 (= negativ) graduell bis 3 (= stark gefärbt) in der den Tumor umgebenden Leber. Auch hier war Argpyrimidin nur im Zytosol zu finden (vgl. Abbildung 22). Eine Angabe der gefärbten Fläche erfolgte nicht.

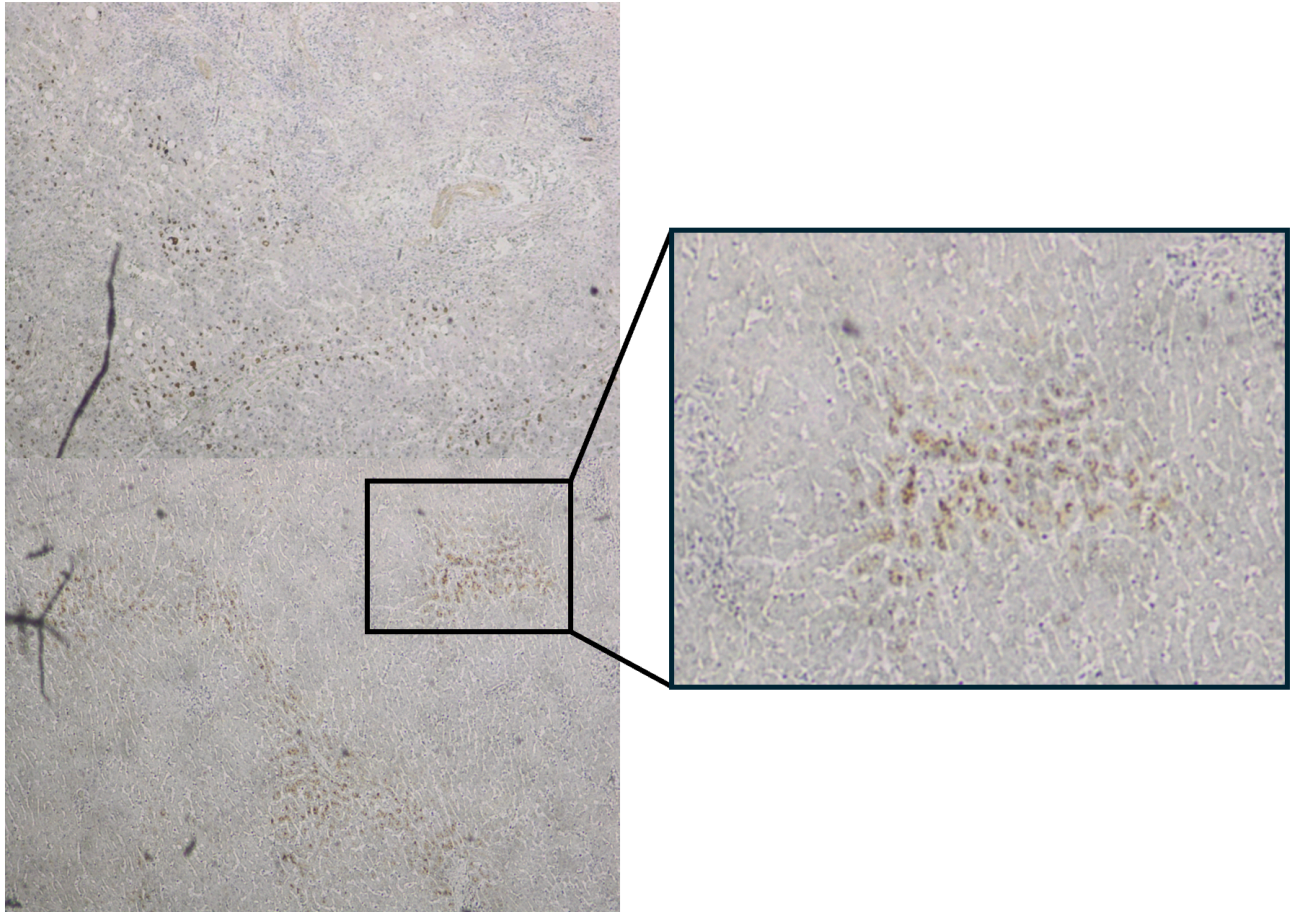


Abbildung 22: Nachweis von Argpyrimidin in der Leber. Man erkennt den Nachweis im Zytosol der Hepatozyten. 40-fache Vergrößerung.

Es zeigte sich die folgende Verteilung des quantitativen Argpyrimidinnachweises in der Leber, welche sich Tabelle 18 entnehmen lässt.

Tabelle 18: quantitativer Nachweis von Argpyrimidin in der den Tumor umgebenden Leber. In über zwei Drittel aller Fälle konnte Argpyrimidin quantitativ in der den Tumor umgebenden Leber nachgewiesen werden. Werden Präparate ohne Leberanschnitt exkludiert, so ist die umgebende Leber in 96% aller eCCC Argpyrimidin-positiv und bei 85% aller iCCC.

Argpyrimidinnachweis in der Leber	Gesamtkollektiv n (%)	eCCC n (%)	iCCC n (%)	GB-Tumoren n (%)
Kein Argpyrimidin-Nachweis in der Leber	26 (11,4)	2 (2,9)	24 (15,4)	0 (0)
Argpyrimin-Nachweis in der Leber	161 (70,3)	49 (72,1)	107 (68,6)	5 (100)
Keine Leber im Präparat	42 (18,3)	17 (25)	25 (16)	0 (0)
Gesamt	229 (100)	68 (100)	156 (100)	5 (100)

Es zeigte sich folgende Verteilung der Färbintensitäten in der Leberfärbung für alle bewerteten Präparate (gesamt (n): 187: eCCC: 51, iCCC: 131, GBT: 5) (Tabelle 19):

Tabelle 19: Intensität der Argpyrimidinfärbung der den Tumor umgebenden Leber im Gesamtkollektiv und aufgeteilt nach Lokalisation des Primarius. Insgesamt konnten 187 Präparate (davon 51 eCCC, 131 iCCC und 5 GBT) auf den Nachweis von Argpyrimidin in der den Tumor umgebenden Leber untersucht werden. Im Gesamtkollektiv ergab sich bei 161 Patienten der Nachweis von Argpyrimidin in der Leber. Bei den extrahepatischen Karzinomen wiesen 96% Argpyrimidin in der Leber auf, bei den intrahepatischen Karzinomen waren es 84,6% und bei dem kleinen Kollektiv von Patienten mit Gallenblasenkarzinom waren es alle Patienten (100%). In der Gruppe der Gallenblasentumoren waren Argpyrimidin in allen Fällen mäßig stark (=2) gefärbt. Bei der kleinen Fallzahl wurden die Gallenblasentumoren im paarweisen Vergleich ausgeschlossen. Im Vergleich von extra- und intrahepatischen Tumoren wurde der Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit einem p-Wert (Chi-Quadrat) von 0,014 statistisch unterstrichen.

Intensität der Argpyrimidin-Leberfärbung	Gesamtkollektiv n (%) exkl. GBT	eCCC n (%)	iCCC n (%)	p-Wert (Chi-Quadrat)
0 (= negativ)	26 (14,3)	2 (3,9)	24 (18,3)	
1 (= schwach positiv)	33 (18,1)	6 (11,8)	27 (20,6)	
2 (= mäßig positiv)	117 (64,3)	40 (78,4)	77 (58,8)	
3 (= stark positiv)	6 (3,3)	3 (5,9)	3 (2,3)	
Gesamt	182 (100)	51 (100)	131 (100)	0,014

4.2.2 Sirtuin 6

4.2.2.1 Sirtuin 6 im Tumor

Die untenstehenden Abbildungen (Abbildung 23, Abbildung 24, Abbildung 25, Abbildung 26) zeigen exemplarisch die Färbeintensität für Sirtuin 6 in aufsteigender Intensität:

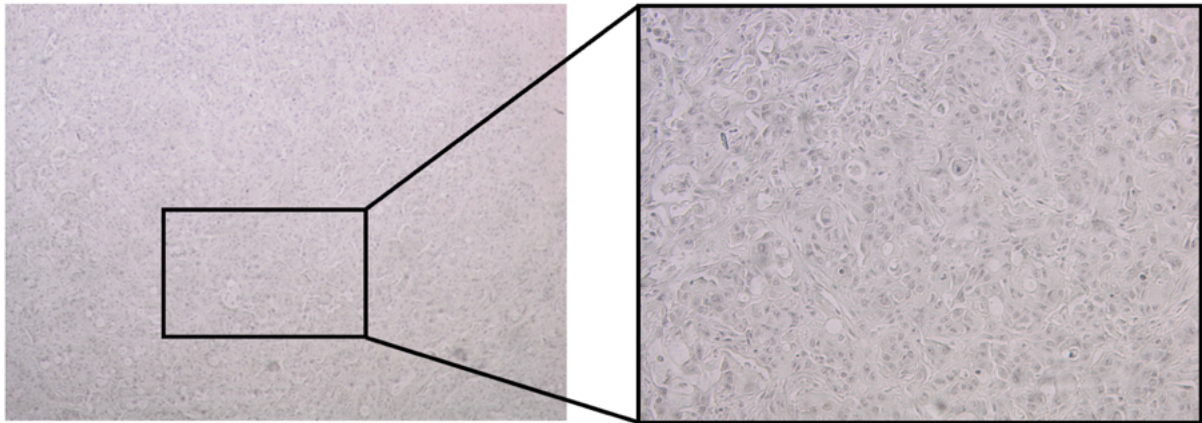


Abbildung 23: fehlende Färbung (0) auf Sirtuin 6, links 40-fache Vergrößerung, rechts 100-fache Vergrößerung

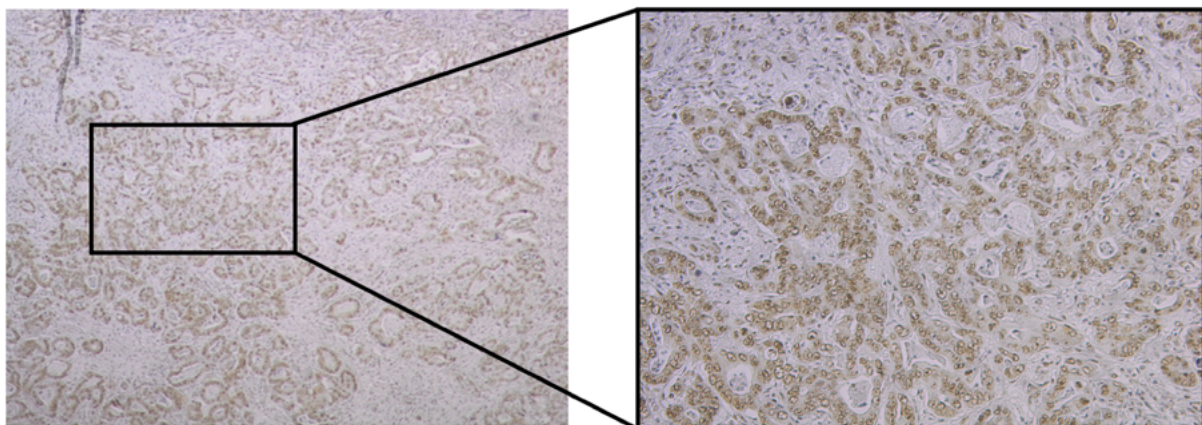


Abbildung 24: schwache Färbung (1) auf Sirtuin 6, links 40-fache Vergrößerung, rechts 100-fache Vergrößerung. Zu erkennen ist eine Färbung von sowohl Zytosol als auch Nukleus.

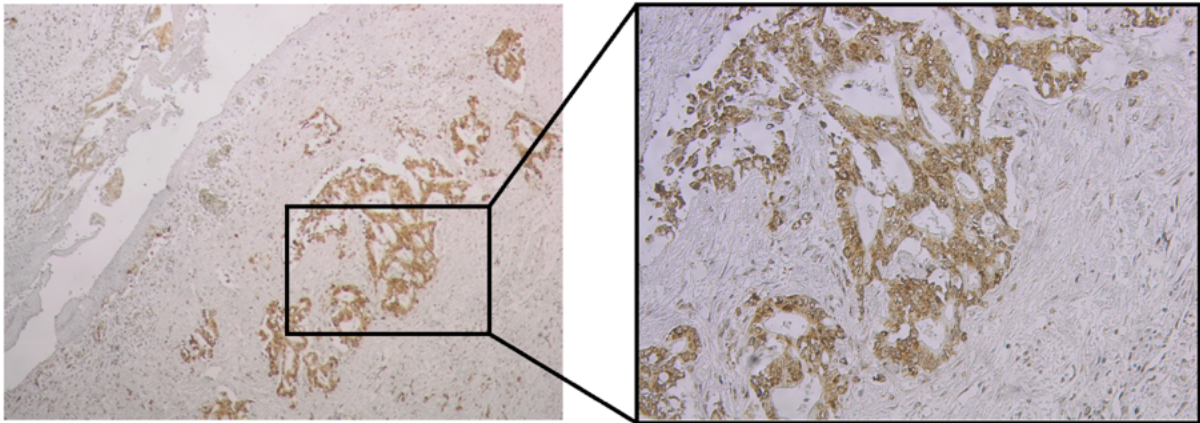


Abbildung 25: moderate Färbung (2) auf Sirtuin 6, links 40-fache Vergrößerung, rechts 100-fache Vergrößerung

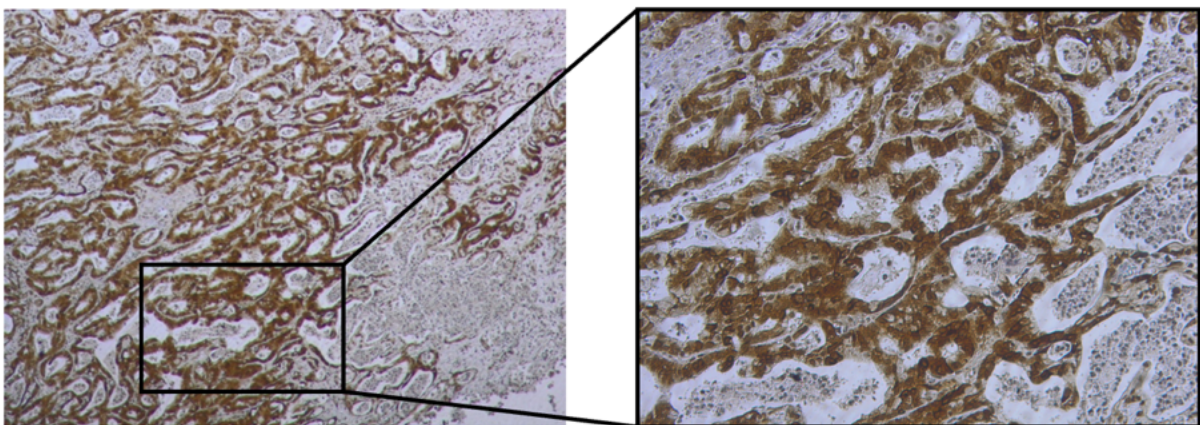


Abbildung 26: starke Färbung (140) auf Sirtuin 6, links 40-fache Vergrößerung, rechts 100-fache Vergrößerung

In der Bewertung der Präparate fiel auf, dass Sirtuin 6 sowohl im Zytosol als auch im Nukleus zu finden war (vgl. Abbildung 27). Dabei herrschte jedoch eine deutliche Inhomogenität sowohl innerhalb der Kohorte als auch im individuellen Tumor. Unter dem Punkt „Fläche“ floss in der Bewertung der jeweils höhere Prozentwert in den IRS, unabhängig davon, ob es der der Zy-
tosol- oder der Kernfärbung war.

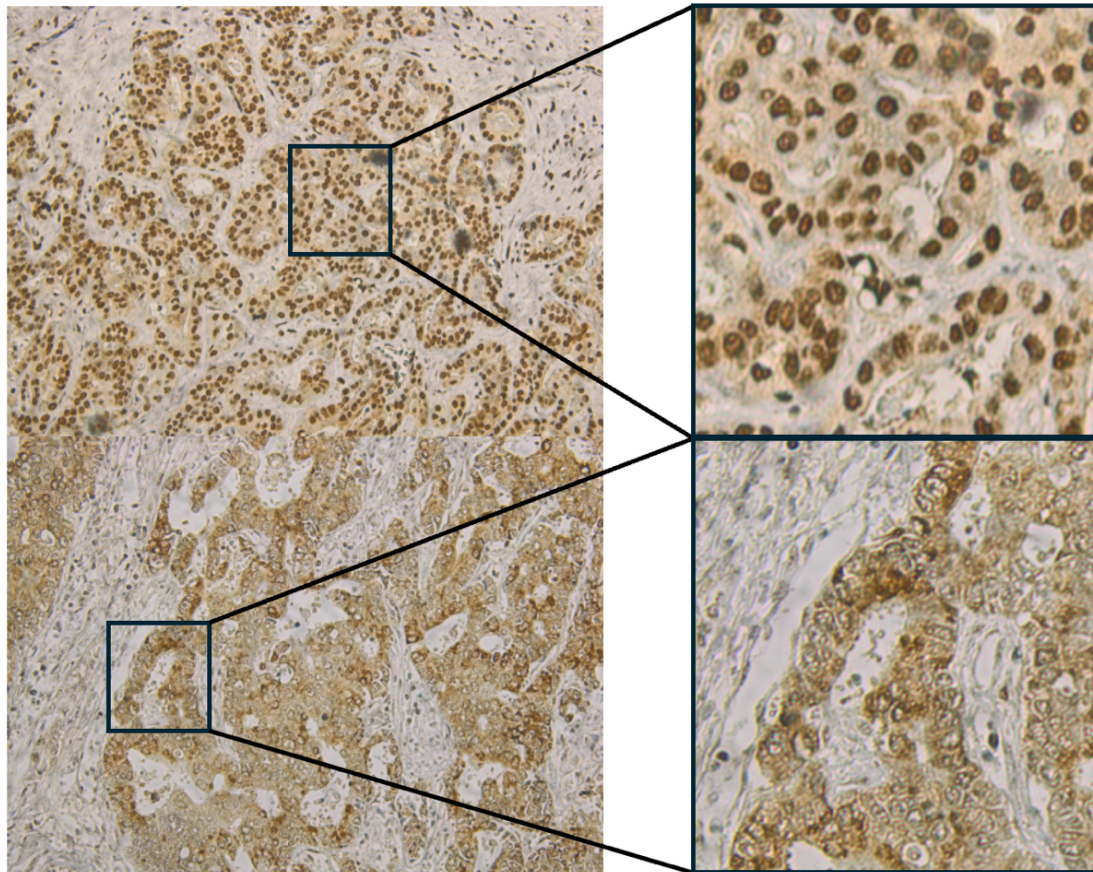


Abbildung 27: Vergleich Kernfärbung (oben) versus Zytosolfärbung (unten) für Sirtuin 6 im Tumorgewebe, 100-fache Vergrößerung. Auf dem oberen Bild erkennt man eine deutliche Färbung nahezu aller Zellkerne, wohingegen die Färbung auf Sirtuin6 im unteren Bild im Zytosol zu finden ist.

Die Verteilung der Percent Points lässt sich der untenstehenden Abbildung 28 entnehmen.

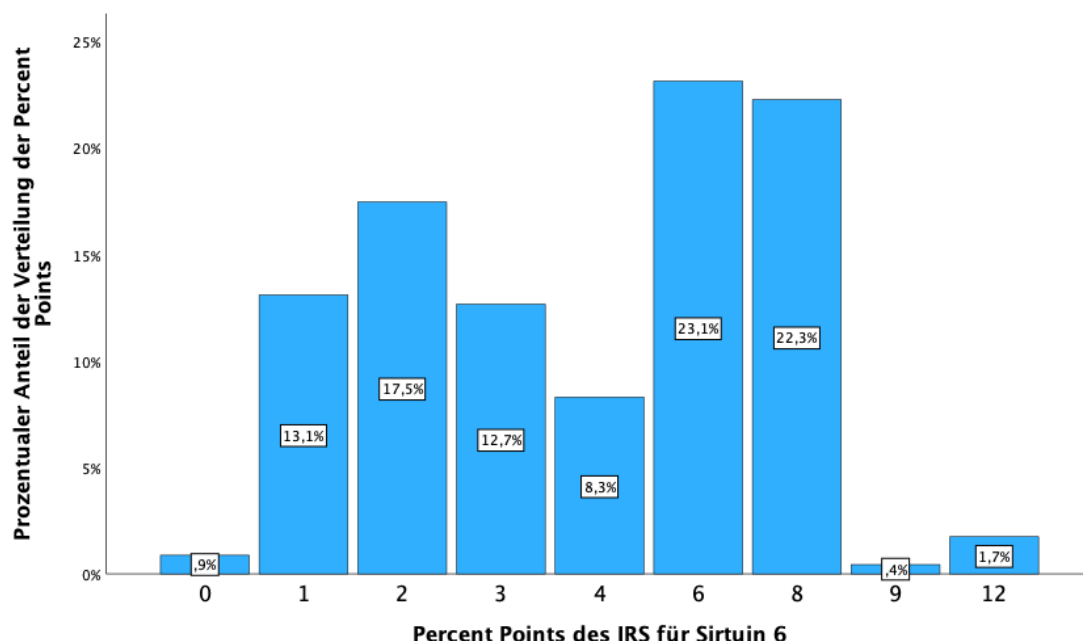


Abbildung 28: Säulendiagramm: Verteilung der Percent Points des IRS für Sirtuin 6 im Tumorgewebe

Anhand der Verteilung der Percent Points des IRS für Sirtuin 6 wurde ein Cut Off Wert zur Unterscheidung von negativ versus positiv bei 3 gesetzt. So wurden Präparate mit Percent Points von 0 bis 3 als negativ und Percent Points von 4 bis 12 als positiv bewertet, sodass sich daraus eine Bewertung von 101 (44,1%) negativen und 128 (55,9%) SIRT6 gefärbten Präparaten ergab (siehe Tabelle 20). Zudem wurde die Verteilung der Percent Points anhand eines Kreisdiagramms veranschaulicht (vgl. Abbildung 29)

Tabelle 20: Verteilung der negativen und positiven Präparate anhand der Verteilung der Percent Points beim IRS für Sirtuin 6. Der Cut Off wurde bei 3 Percent Points gesetzt. Dadurch ergab die Bewertung 101 (44,1%) negative und 128 (55,9%) positive Tumoren im Gesamtkollektiv. Bei allen drei Lokalisationen überwog der Anteil positiv bewerteter Präparate.

Cut Off IRS Sirtuin 6

PP 0 bis 3: negativ n (%)	101 (44,1)	extrahepatisch 29 (42,6% der eCCC)
		intrahepatisch 70 (44,9% der iCCC)
		Gallenblase 2 (40% der GBT)
PP 4 bis 12: positiv n (%)	128 (55,9)	Extrahepatisch 39 (57,4% der eCCC)
		Intrahepatisch 86 (55,1% der eCCC)
		Gallenblase 3 (60% der GBT)
gesamt	229 (100)	

Percent Points des IRS für SIRT

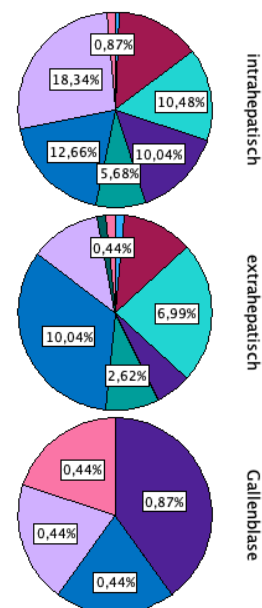
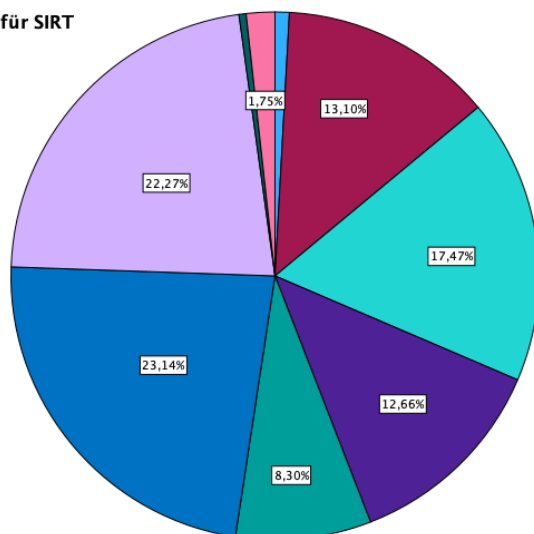


Abbildung 29: Kreisdiagramme zur Verteilung der Percent Points für Sirtuin 6 im Gesamtkollektiv (links) und in Abhängigkeit der Lokalisation des Tumors (rechts). Im Gesamtkollektiv zeigten nur wenige Präparate (0,87%) keine Färbung auf Sirtuin 6 im Tumormaterial. Der Median der Percent Points sowohl für eCCC als auch für iCCC lag bei 4. Bei Karzinomen der Gallenblase lag der Median bei 6. Der Interquartilsabstand (IQA) für eCCC bei 4 (2-6), für iCCC lag bei 6 (2-8) und für Gallenblasenkarzinome bei 5 (3-8).

Der Sirtuin 6-Nachweis zeigte sich sowohl innerhalb des Kollektivs als auch innerhalb eines Präparats inhomogen. Die folgende Tabelle gibt wieder, in welchem Zellkompartiment Sirtuin 6 überwiegend zu finden war (vgl. Tabelle 21):

Tabelle 21: Vorwiegende Lokalisation von Sirtuin 6 innerhalb der Zelle: Kern versus Zytoplasma. SIRT6 war sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma nachzuweisen. In der kleinen Gruppe der Gallenblasentumoren waren drei (60%) Präparate überwiegend im Zytoplasma, ein Präparat (20%) überwiegend im Kern und ein Präparat (20%) ausgeglichen gefärbt. Im paarweisen Vergleich wurde die Gruppe der Gallenblasentumoren aufgrund der kleinen Fallzahl ausgeschlossen. Der Vergleich von extra- und intrahepatischen Tumoren ergab einen statistisch signifikanten Unterschied (p -Wert (Chi-Quadrat) $< 0,001$) zwischen den beiden Lokalisationen. Es zeigte sich ein Übergewicht (55,8%) an iCCC, die überwiegend Kernfärbung zeigten, wohingegen etwa zwei Drittel (67,6%) der eCCC SIRT6 überwiegend im Zytoplasma aufwiesen.

Sirtuin 6-Nachweis	Gesamtkohorte n (%)	Extrahepatisch n (%)	Intrahepatisch n (%)	p-Wert (Chi-Quadrat)
überwiegend Kernfärbung	105 (46,9)	18 (26,5)	87 (55,8)	
überwiegend Zytoplasmafärbung	105 (46,9)	46 (67,6)	59 (37,8)	
Ausgeglichene Färbung	14 (6,3)	4 (5,9)	10 (6,4)	
	224 (100)	68 (100)	156 (100)	$< 0,001$

In der Gesamtkohorte war die Verteilung des überwiegenden Nachweisorts für SIRT6 nahezu ausgeglichen: 46,3% der Präparate zeigten Sirtuin überwiegend im Nukleus und 47,2% der Präparate überwiegend im Zytosol. Die Subgruppenanalyse nach Lokalisation des Primarius ergaben jedoch Unterschiede: 67,6% der extrahepatischen Präparate wiesen Sirtuin 6 vorwiegend im Zytosol auf, wohingegen bei 55,8% der intrahepatischen Karzinome Sirtuin 6 in den Nuklei zu finden war.

4.2.2.2 Sirtuin 6 in der Leber

Auf 189 Schnitten (77,1%) waren ausreichend Leberzellen vorhanden, um diese ebenfalls auf Sirtuin 6 zu bewerten. Dabei wurde sich wiederum dem Immunreaktiven Score nach Remmele und Stegner bedient und in derselben modifizierten Variante angewandt. Die Verteilung der Percent Points ist der untenstehenden Abbildung 30 zu entnehmen.

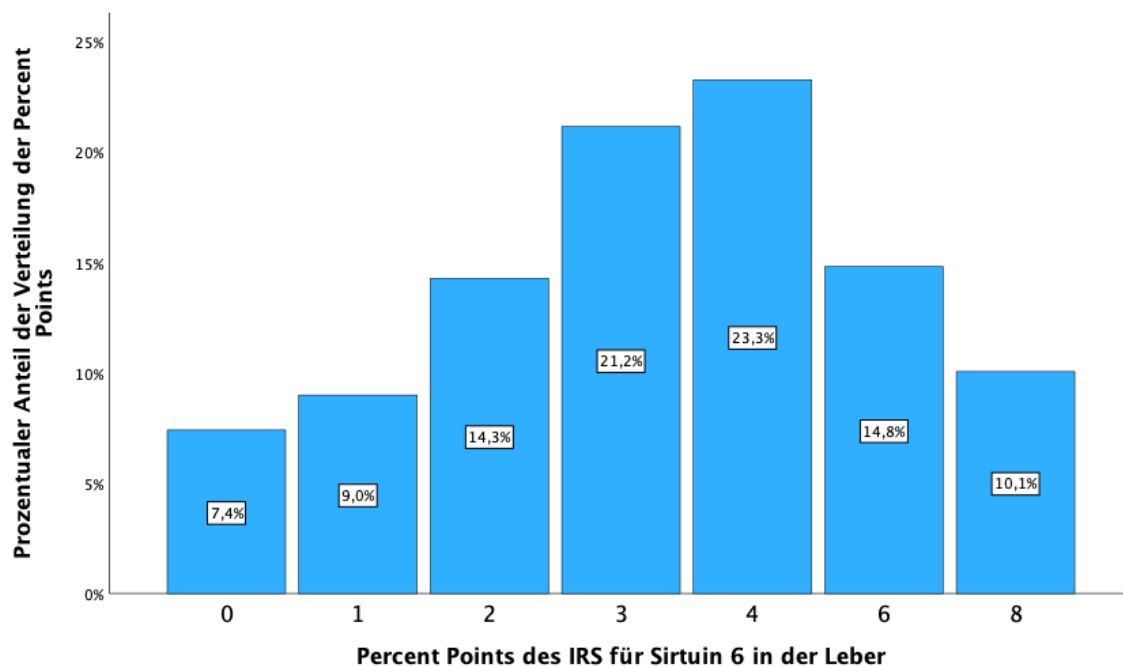


Abbildung 30: Percent Points des IRS für Sirtuin 6 in der Leber

Bei Verwendung desselben Cut Off-Wertes von 3 ergab sich wiederum folgende Verteilung an negativen (PP 0 bis 3) und positiven (PP 4 bis 12) Leberpräparaten (vgl. Tabelle 22).

Tabelle 22: Verteilung der negativen und positiven Leberpräparate anhand der Verteilung der Percent Points beim IRS für Sirtuin 6, Cut Off bei drei (140) Percents Points. Es ergab sich eine Verteilung von 98 (51,9%) negativen und 91 (48,1%) positiven Leberpräparaten. Bei allen Tumorlokalisationen war die Verteilung von positiven und negativen Leberpräparaten in etwa ausgeglichen.

IRS Sirtuin 6-Nachweis in der Leber

PP 0 bis 3: negativ n (%)	98 (51,9)
	extrahepatisch 25 (49% der eCCC)
	intrahepatisch 70 (52,6% der iCCC)
	Gallenblase 3 (60% der GBT)
PP 4 bis 12: positiv n (%)	91 (48,1)
	extrahepatisch 26 (51% der eCCC)
	intrahepatisch 63 (47,4% der iCCC)
	Gallenblase 2 (40% der GBT)
gesamt	189 (100)

4.3 Korrelationen

Nachfolgend wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Nachweis des immunhistochemischen Markers und den patienten- und tumorspezifischen Merkmalen untersucht. Dabei wurden insbesondere Alter, Geschlecht, Vorerkrankungen, Laborparameter sowie Parameter zur Tumorgroße und -stadium geprüft und anhand von Kreuztabellen dargestellt. Aufgrund der geringen Fallzahl von Patienten mit Gallenblasenkarzinomen wurden die Korrelationen zum Teil auf extra- und intrahepatische CCC beschränkt.

4.3.1 Argyrimidin

4.3.1.1 Patientenspezifische Eigenschaften

Weder das Geschlecht noch allgemeingültige Risikofaktoren wie Diabetes mellitus Typ 2, Alkohol- oder Nikotinkonsum ergaben einen Zusammenhang mit dem Argyrimidin-Nachweis im Tumor. So zeigten sich beispielsweise ähnlich viele Männer (57,9%) wie Frauen (63%) positiv auf Argyrimidin. Da keine der Variablen einen p-Wert von unter 0,05 aufwies, war von keiner Korrelation auszugehen (p-Werte (Chi-Quadrat) Geschlecht 0,499; Alkohol 1; Nikotin 0,823; Diabetes mellitus Typ 2 0,695). Vergleiche hierzu die Tabelle 48 im Anhang.

Anders verhielt es sich in der Korrelation zwischen dem Nachweis von Argyrimidin und dem Alter: bereits in Anbracht der Gesamtkohorte war ein Alterstrend zu erahnen (p-Wert (Chi-Quadrat): 0,08, Tabelle 23). Deutlicher wurde dieser Zusammenhang bei zusätzlicher Betrachtung der Lokalisation. Vorwiegend Patienten ≥ 65 Jahre mit extrahepatischen Tumoren zeigten Argyrimidin im Tumorgewebe (81,8%). Dies wurde durch einen p-Wert (Chi-Quadrat) von 0,037 (vgl. Tabelle 23) untermauert.

Tabelle 23: Kreuztabelle Argyrimidin-Nachweis in Abhängigkeit zum Alter. Oben: im Gesamtkollektiv, unten: gesondert für extrahepatische CCCs. Vorwiegend Patienten ≥ 65 Jahre mit extrahepatischen Tumoren zeigten Argyrimidin vermehrt im Tumorgewebe (81,8%). Der Unterschied wurde mit einem p-Wert (Chi-Quadrat) von 0,037 unterstrichen.

		Argyrimidin- Nachweis im Tumorgewebe			p-Wert (Chi-Quadrat)
		Negativ n (%)	Positiv n (%)	Gesamt n (%)	
Alter	< 65 Jahre	52 (45,6)	62 (54,4)	114 (100)	0,08
	≥ 65 Jahre	39 (33,9)	76 (66,1)	115 (100)	
		91 (39,7)	138 (60,3)	229 (100)	
eCCC	< 65 Jahre	15 (42,9)	20 (57,1)	35 (100)	0,037
	≥ 65 Jahre	6 (18,2)	27 (81,8)	33 (100)	
		21 (30,9)	47 (69,1)	68 (100)	

4.3.1.2 Tumorspezifische Eigenschaften

Aufgrund der niedrigen Fallzahl von Patienten mit Gallenblasenkarzinomen (n=5) wurden für Korrelationen der Tumorlokalisation ausschließlich die intra- und extrahepatischen Gallengangskarzinome einbezogen. Zunächst wurde der Argpyrimidinnachweis im Tumor mit der Tumorlokalisation korreliert (vgl. Tabelle 24).

Tabelle 24: Kreuztabelle Argpyrimidin-Nachweis in Abhängigkeit zur Tumorlokalisation. Der prozentuale Anteil Argpyrimidin-positiver Tumoren ist beim eCCC (69,1%) höher als beim iCCC (55,1%). Der p-Wert (Chi-Quadrat) lag bei 0,055.

		Argpyrimidin- Nachweis im Tumorgewebe			p-Wert (Chi-Quadrat)
		Negativ n (%)	Positiv n (%)	Gesamt n (%)	
Lokalisation	extrahepatisch	21 (30,9)	47 (69,1)	68 (100)	0,055
	intrahepatisch	70 (44,9)	86 (55,1)	156 (100)	
		91 (40,6)	133 (59,4)	224 (100)	

Der p-Wert (Chi-Quadrat) von 0,055 schien eine Tendenz auf einen Zusammenhang zwischen Argpyrimidin-Nachweis und Tumorlokalisation anzudeuten, wobei der prozentuale Anteil Argpyrimidin-positiver Tumoren beim eCCC höher war als beim iCCC (siehe Tabelle 24).

Kleine Tumoren (bis einschließlich T2) waren eher Argpyrimidin-positiv als größere (T3 bis T4) (p (Chi-Quadrat) = 0,014, siehe Tabelle 25). Unter Ausschluss der Gallenblasentumoren lag der p-Wert (Chi-Quadrat) bei 0,008. Dieser Hinweis verstärkte sich bei alleiniger Betrachtung extrahepatischer Tumoren (p (Chi-Quadrat) < 0,001, siehe Tabelle 26).

Tabelle 25: Kreuztabelle Argpyrimidin-Expression in Abhängigkeit zur Tumorgröße. Kleinere Tumoren (Tis-T2) scheinen eher Argpyrimidin-positiv zu sein als größere Tumoren (T3-T4) (p (Chi-Quadrat) = 0,014).

		Argpyrimidin- Nachweis im Tumorgewebe			p-Wert (Chi-quadrat)
		Negativ n (%)	Positiv n (%)	Gesamt n (%)	
Tum- or- größe	Tis-T2	53 (34,2)	102 (65,8)	68 (100)	0,014
	T3-T4	38 (52,1)	35 (47,9)	156 (100)	
		91 (39,9)	137 (90,1)	228 (100)	

Tabelle 26: Kreuztabelle Argpyrimidin-Nachweis und der Tumorgroße bei Patienten mit eCCC. Hier zeigte sich der Zusammenhang zwischen Argpyrimidin-Positivität und Tumorgroße $\leq T2$ noch deutlicher (p (Chi-Quadrat) $< 0,001$).

Extrahepatische CCC		Argpyrimidin-Nachweis im Tumorgewebe			p-Wert Chi-Quadrat)
		Negativ n (%)	Positiv n (%)	Gesamt n (%)	
Tumorgroße	Tis-T2	7 (15,6)	38 (84,4)	45 (100)	
	T3-T4	14 (60,9)	9 (39,1)	23 (100)	
		21 (30,9)	47 (69,1)	68 (100)	< 0,001

Eine Korrelation zwischen Argpyrimidin- und dem Lymphknotenstatus (p (Chi-Quadrat) = 0,31), dem Vorliegen von Fernmetastasen (p (Chi-Quadrat) = 0,225) sowie dem UICC-Status (p (Chi-Quadrat) = 0,213) und Tumorgading (p (Chi-Quadrat) = 0,748) konnte nicht herausgestellt werden (vgl. Tabelle 49 im Anhang). Bei der alleinigen Betrachtung extrahepatischer Tumoren gab es einen Hinweis auf den Zusammenhang von Argpyrimidin und UICC-Stadium (p (Chi-Quadrat) = 0,06, siehe Tabelle 27), welches sich unter anderem der Tumorgroße (Korrelation p (Chi-Quadrat) $< 0,001$, siehe Tabelle 26) bedient.

Tabelle 27: Zusammenhang zwischen dem Argpyrimidin-Nachweis und dem UICC-Stadium bei Patienten mit eCCC: bei Tumoren im früheren Krankheitsstadium (UICC 0-2) konnte in 82,1% der Fälle Argpyrimidin im Tumor nachgewiesen werden. Bei Patienten mit UICC-Stadium 3 oder 4 waren es nur noch 57,9% (p (Chi-Quadrat) = 0,06)

Extrahepatische CCC		Argpyrimidin-Nachweis im Tumorgewebe			p-Wert (Chi-Quadrat)
		Negativ n (%)	Positiv n (%)	Gesamt n (%)	
UICC-Stadium	Low (0-2)	5 (17,9)	23 (82,1)	28 (100)	
	High (3-4)	16 (42,1)	22 (57,9)	38 (100)	
		21 (31,8)	45 (68,2)	66 (100)	0,06

4.3.1.3 Laborparameter

Keiner der erhobenen Laborparameter, inklusive dem Tumormarker CA 19-9, schien einen Zusammenhang zum Argpyrimidin-Nachweis aufzuweisen. Die Kreuztabelle mit der Korrelation zwischen Argpyrimidin-Status und den jeweiligen Laborparametern ist dem Anhang (Tabelle 50) zu entnehmen.

4.3.1.4 Argpyrimidin-Nachweis in der Leber

Es erfolgte der quantitative Nachweis von Argpyrimidin in der den Tumor umgebenden Leber. Hierbei zeigte sich, dass sowohl die Leber bei intrahepatischen als auch bei extrahepatischen Tumoren zumeist angefärbt war, der Anteil an Argpyrimidin-gefärbter Leber beim eCCC jedoch noch höher war (81,8% versus 96,1%). Dies ist der untenstehenden Tabelle 28 zu entnehmen (p (Chi-Quadrat) = 0,016).

Tabelle 28: Zusammenhang zwischen dem Argpyrimidin-Nachweis in der Leber und der Lokalisation des Primarius. Sowohl bei intrahepatischen als auch bei extrahepatischen Präparaten konnte im Großteil der Fälle eine Leberfärbung nachgewiesen werden. Es fiel jedoch auf, dass nahezu in jedem extrahepatischen Präparat (96,1%), jedoch nur in etwa vier Fünftel aller intrahepatischen Präparate (81,7%), Argpyrimidin-positive Leber zu finden war. Der Unterschied zeigte sich mit einem p -Wert (Chi-Quadrat) von 0,016.

		Argpyrimidin-Nachweis in der den Tumor umgebenden Leber			p-Wert (Chi-Quadrat)
		Negativ n (%)	Positiv n (%)	Gesamt n (%)	
Tumorlokalisation	iCCC	24 (18,3)	107 (81,7)	131 (100)	0,016
	eCCC	2 (3,9)	49 (96,1)	51 (100)	
		26 (14,2)	156 (85,8)	182 (100)	

Es ergaben sich keine weiteren Korrelationen bezüglich des Argpyrimidin-Nachweises in der Leber und patienten- oder tumorspezifischen Charakteristika.

4.3.1.5 Überleben

Tabelle 29: Zusammenfassende Tabelle zu den Überlebenszeiten in verschiedenen Subgruppenanalysen bezogen auf den Argpyrimidin-Nachweis im Tumor

mediane Überlebenszeit		Argpyrimidin-negativ in Monaten (95% KI)	Argpyrimidin-positiv in Monaten (95% KI)	Log Chi Quadrat (p-Wert)
Gesamtkollektiv		23,2 (15,2-31,7)	23,6 (17,8-29,5)	2,546 (p=0,111)
Geschlecht	Männer	15 (0-30,3)	24,5 (6,6-42,4)	4,669 (p=0,031)
	Frauen	25,7 (20,8-30,6)	22,8 (16,2-29,5)	0,002 (p=0,964)
Lokalisation	eCCC	9,0 (0-19,2)	29,5 (17,3-41,8)	5,148 (p=0,023)
	iCCC	26,1 (20,1-32,1)	20,5 (14,9-26,1)	1,027 (p=0,311)
Männer	alle Männer	15 (0-30,3)	24,5 (6,6-42,4)	4,669 (p=0,031)
	eCCC	4,5 (0—12,6)	29,5 (1,7-57,2)	4,911 (p=0,027)
	iCCC	18,4 (0-37,8)	23,6 (0-48,8)	3,456 (p=0,063)
Frauen	alle Frauen	25,7 (20,8-30,6)	22,8 (16,2-29,5)	0,002 (p=0,964)
	eCCC	12,1 (10,5-13,7)	27,2 (13,9-40,5)	1,418 (p=0,234)
	iCCC	27,1 (24,3-29,9)	19,8 (15,9-23,6)	0,18 (p=0,671)
Alter < 65 Jahre	Gesamt	23,4 (8,2-38,7)	39,2 (19,2-59,1)	4,584 (p=0,032)
	eCCC	12,1 (0-24,6)	43 (31,6-54,3)	5,311 (p=0,021)
	iCCC	27,1 (16,1-38,1)	23,6 (12,4-34,9)	1,190 (p=0,275)
Alter ≥ 65 Jahre	Gesamt	22,3 (10,3-34,3)	19,9 (17,1-22,8)	0,047 (p=0,828)
	eCCC	2 (0-11,5)	21,6 (2,3-40,8)	2,746 (p=0,097)
	iCCC	25,7 (18,8-32,7)	19,7 (17-22,6)	0,115 (p=0,735)

Nach Lokalisation des Primarius

Patienten mit extrahepatischen Tumoren zeigten bei Argpyrimidin-Positivität ein längeres Überleben (Log Rank (Mantel Cox) $p = 0,023$, siehe Abbildung 31).

Patienten mit einem extrahepatischen Gallengangstumor, welcher als Argpyrimidin-negativ klassifiziert wurden, zeigten eine Überlebenszeit von 9,0 Monaten im Median (95% KI 0-19,2 Monate), wohingegen Patienten mit Argpyrimidin-positiven, extrahepatischen Tumoren Überlebenszeiten von 29,5 Monaten im Median (95% KI 17,3-41,8 Monate) aufwiesen. Dieser Unterschied ließ sich für intrahepatische Tumoren nicht bestätigen (Log Rank (Mantel Cox) $p = 0,311$) (Viergruppenvergleich im Angang, vgl. Abbildung 52).

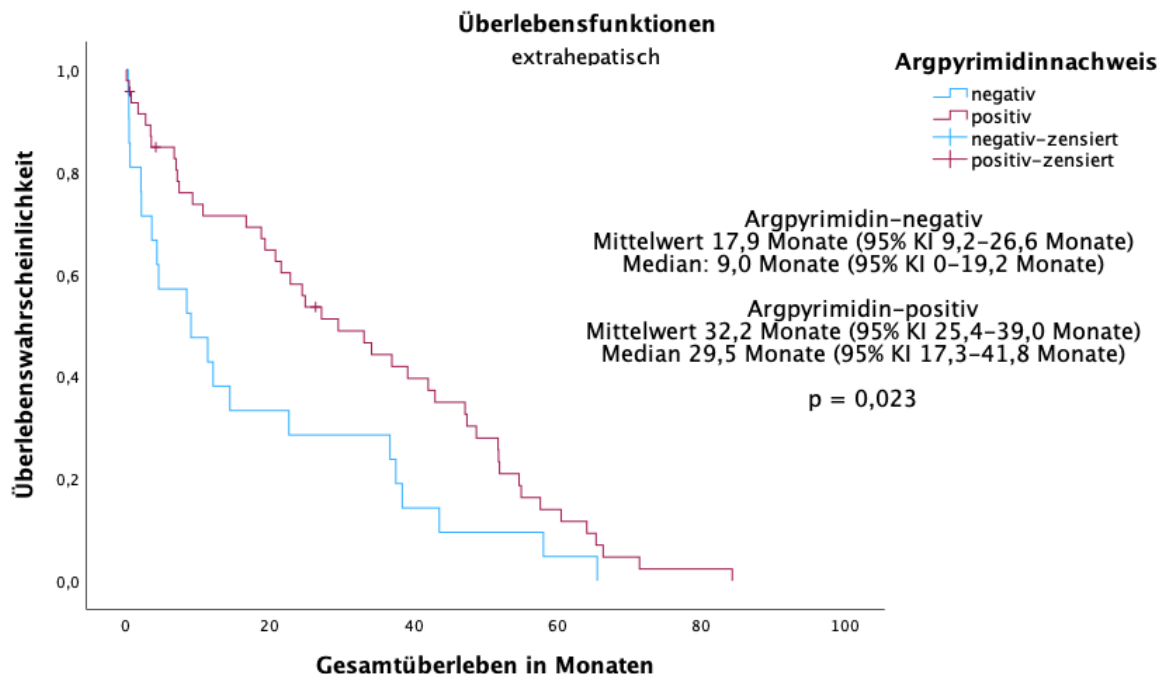


Abbildung 31: Vergleich des Gesamtüberlebens bei extrahepatischen CCCs und graphische Darstellung anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms: Patienten mit Argpyrimidin-positiven Tumoren zeigten ein signifikant (Log Rank (Mantel Cox) $p = 0,023$) verlängertes Gesamtüberleben von 32,2 Monaten im Mittel und 29,5 Monaten im Median (95% KI 17,3-41,8 Monate) (versus 17,9 Monate bei Argpyrimidin-negativen Tumoren, 9,0 Monaten im Median (95% KI 0-19,2))

Nach Alter/Geschlecht

Im Gesamtkollektiv konnte man bei Männern mit Argyrimidin-Nachweis im Tumor eine bessere Prognose nachweisen als bei Männern mit Tumoren, welche als Argyrimidin-negativ klassifiziert wurden (Log Rank (Mantel Cox) $p = 0,031$, siehe Abbildung 32). Bei Frauen war dieser Unterschied nicht zu beobachten (Log Rank (Mantel Cox) $p = 0,964$) (vgl. Viergruppenvergleich Abbildung 53 im Anhang).

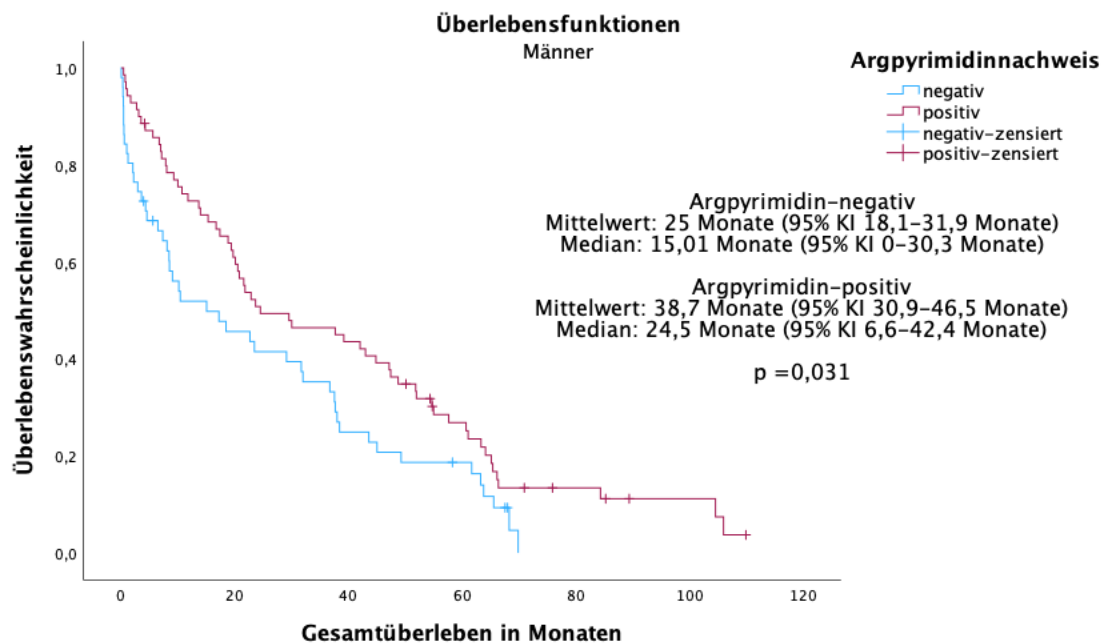


Abbildung 32: Vergleich des Gesamtüberlebens von allen Männern im Gesamtkollektiv in Hinblick auf das Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Argyrimidinnachweis. Hierbei war zu erkennen, dass Männer mit Argyrimidinnachweis länger überlebten (Gesamtüberleben im Median 24,5 Monate (95% KI 6,6-42,4 Monate) als jene ohne Argyrimidinnachweis (im Median 15,01 Monate (95% KI 0-30,3 Monate)), Log Rank (Mantel Cox) $p = 0,031$. Verbildlicht anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms.

Patienten unter 65 Jahre haben bei Argyrimidin-Positivität ein medianes Überleben von 39,2 Monate (95% KI 19,2-59,1 Monate), wohingegen Patienten der gleichen Altersgruppe mit Argyrimidin-negativen Tumoren deutlich kürzer überlebten (Median 23,4 Monate, 95% KI 8,2-38,7 Monate) (Log Rank (Mantel Cox) $p = 0,032$, siehe Abbildung 33).

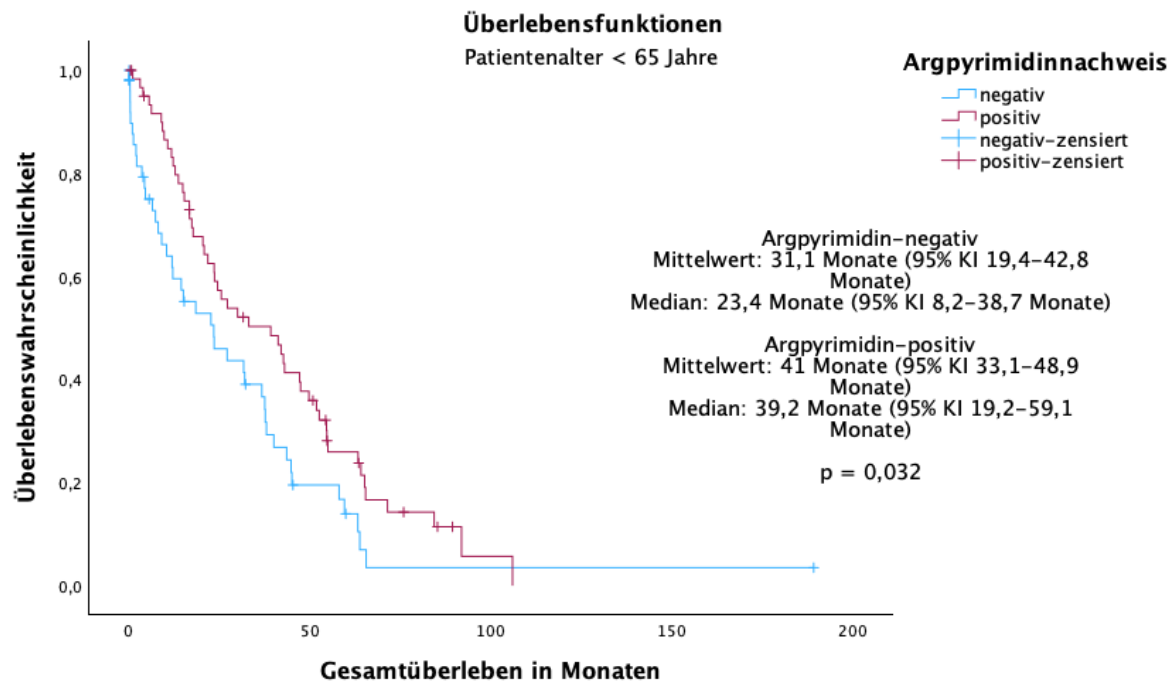


Abbildung 33: Vergleich des Gesamtüberlebens von allen Patienten, die jünger als 65 Jahre waren, im Hinblick auf das Gesamtüberleben in Abhängigkeit des Argpyrimidinnachweises. Hierbei ist zu erkennen, dass ein jüngeres Patientenalter unter 65 Jahre bei gleichzeitigem Nachweis von Argpyrimidin im Tumor mit einem längeren Überleben einherging (Median: 39,2 Monate (95% KI 19,2–59,1 Monate)) als bei Patienten in der gleichen Alterskategorie ohne Argpyrimidinnachweis (Median: 23,4 Monate (95% KI 8,2–38,7 Monate)). Log Rank (Mantel Cox) $p = 0,032$. Bildliche Darstellung anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms.

Nach Laborparametern

Bei Patienten mit erhöhten Transaminasen (AST, ALT) schien es keinen Überlebensvorteil bei Argpyrimidin-Nachweis im Tumor zu geben. Lediglich bei Männern mit erhöhtem AST (GOT) über 50 U/l schien die Argpyrimidin-Positivität des Tumors hinweisgebend auf ein längeres Überleben zu sein (mittleres Überleben: 32,5 versus 19,9 Monate; medianes Überleben: 24,5 versus 10,1 Monate; Log Rank (Mantel Cox) $p = 0,071$).

Patienten mit normwertigem De-Ritis-Quotienten (zwischen 0,6 und 0,8) schienen von einer Argpyrimidin-Positivität im Tumor zu profitieren im Vergleich zu Patienten, deren Tumor als Argpyrimidin-negativ klassifiziert wurde (mittleres Überleben 47,9 Monate (95% KI 33,7–62,1 Monate), medianes Überleben 44,8 Monate (95% KI 8,3–81,3 Monate)). Bei Patienten mit einem De-Ritis-Quotienten außerhalb der Norm schien der Argpyrimidin-Status jedoch keinen Unterschied im Hinblick auf das Überleben zu haben. Der p-Wert (Log Rank (Mantel Cox)) lag bei 0,074, siehe Abbildung 34).

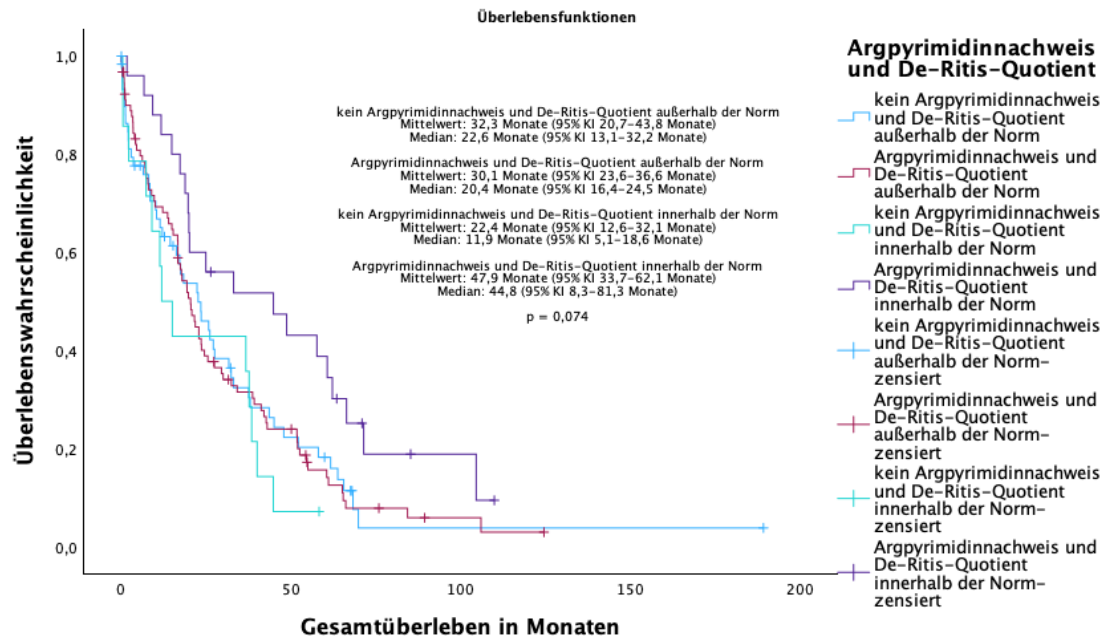


Abbildung 34: Vergleich des Gesamtüberlebens in Monaten, verbildlicht anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms. Es zeigte sich, dass Patienten mit normwertigem De-Ritis-Quotienten (Normwert: 0,6–0,8) und Nachweis von Argpyrimidin im Tumor am längsten überlebten (mittleres Überleben 47,9 Monate (95% KI 33,7–62,1 Monate), medianes Überleben 44,8 Monate (95% KI 8,3–81,3 Monate). Bei Patienten mit einem De-Ritis-Quotienten außerhalb der Norm schien der Argpyrimidin-Status jedoch keinen Unterschied im Hinblick auf das Überleben zu haben. Der p-Wert (Log Rank (Mantel Cox)) lag bei 0,074.

Nach Leberfärbung

Es ergab sich für die Patienten kein Überlebensvorteil aus dem Argpyrimidin-Nachweis in der den Tumor umgebenden Leber. Das mittlere Überleben bei fehlendem Argpyrimidin-Nachweis lag bei 37,5 Monaten (95% KI 20,7–54,2 Monate), bei Argpyrimidin-Nachweis bei 36 Monaten (95% KI 30,5–41,5 Monate), (Log Rank (Mantel Cox) $p = 0,875$).

4.3.2 Sirtuin 6

4.3.2.1 Patientenspezifische Eigenschaften

Folgender Abschnitt behandelt die Korrelation von Sirtuin 6 mit patientenspezifischen Eigenschaften. Das Geschlecht (p (Chi-Quadrat) = 0,895) sowie das Vorliegen eines Alkoholabusus (p (Chi-Quadrat) = 0,556) und Diabetes mellitus (p (Chi-Quadrat) = 0,563) schienen keinen Zusammenhang zum Nachweis von Sirtuin 6 zu haben. Exemplarisch sei das Geschlecht genannt: hier ist zu erkennen, dass sowohl in etwa bei der Hälfte der Tumoren der Männer (55,4%) als auch der Frauen (56,5%) ein Sirtuin 6-Nachweis zu verzeichnen war.

Hinweisgebend auf einen Zusammenhang schien jedoch das Alter zu sein. Mit einem $p = 0,084$ war ein Trend zu erkennen (vgl. Tabelle 30). Deutlicher wird eine Abhängigkeit zwischen dem Nikotinabusus und dem Sirtuin 6-Nachweis, wobei insbesondere Raucher einen Nachweis von Sirtuin 6 im Tumorgewebe aufwiesen. Der p -Wert (Chi-Quadrat) lag bei 0,026 (vgl. Tabelle 31)

Tabelle 30: Kreuztabelle SIRT6-Nachweis und Alter. Patienten unter 65 Jahren zeigten eine ausgeglichene Verteilung zwischen SIRT6-positiven und -negativen Tumoren, wohingegen ältere Patienten mit 61,7% etwas mehr SIRT6-positive Tumoren aufwiesen (p (Chi-Quadrat) = 0,084).

		Sirtuin 6-Nachweis im Tumorgewebe			p-Wert (Chi-Quadrat)
		Negativ n (%)	Positiv n (%)	Gesamt n (%)	
Alter	< 65 Jahre	57 (50)	57 (50)	114 (100)	0,084
	≥ 65 Jahre	44 (38,3)	71 (61,7)	115 (100)	
		101 (44,1)	128 (55,9)	229 (100)	

Tabelle 31: Kreuztabelle SIRT6-Nachweis und Nikotinabusus. Trotz der eher geringen Fallzahl an Rauchern im Patientenkollektiv zeigte sich bei den Patienten mit Nikotinkonsum ein Übergewicht an SIRT6-positiven Tumoren (p (Chi-Quadrat) = 0,026).

		Sirtuin 6-Nachweis im Tumorgewebe			p-Wert (Chi-Quadrat)
		Negativ n (%)	Positiv n (%)	gesamt n (%)	
Nikotinabusus	Nein	96 (46,8)	109 (53,2)	205 (100)	0,026
	ja	5 (21,7)	18 (78,3)	23 (100)	
		101 (44,3)	127 (55,7)	228 (100)	

4.3.2.2 Tumorspezifische Parameter

Lokalisation, Tumorgröße, N- und M-Status, UICC-Stadium sowie Tumorgrading schienen in keinem direkten Zusammenhang mit dem Sirtuin 6-Nachweis im Tumor zu stehen. Die entsprechenden p-Werte (Chi-Quadrat) sind dem Anhang (vgl. Tabelle 51) zu entnehmen.

Außerdem behandelt dieses Unterkapitel eine mögliche Korrelation zwischen dem SIRT6-Nachweis und der Lokalisation des Primarius. Bei Betrachtung der Patienten mit extra- und intrahepatischen Tumoren zeigte sich kein Unterschied (p (Chi-Quadrat) = 0,772). Im Hinblick auf eine Subgruppenanalyse ergab sich jedoch der Hinweis, dass ältere Patienten (≥ 65 Jahre) mit intrahepatischen Tumoren häufiger SIRT6-positive Tumoren aufzuweisen als jüngere Patienten mit iCCC (p (Chi-Quadrat) = 0,053) (vgl. Tabelle 32).

Tabelle 32: Kreuztabelle SIRT6-Nachweis und Alter für iCCCs. Ältere Patienten (≥ 65 Jahre) mit intrahepatischen Tumoren schienen häufiger SIRT6-positive Tumoren zu zeigen als jüngere Patienten mit iCCC: 63,3% versus 46,8% (p (Chi-Quadrat) = 0,053)

intrahepatische CCC		Sirtuin 6-Nachweis des Tumors			p-Wert (Chi-Quadrat)
		Negativ n (%)	Positiv n (%)	Gesamt n (%)	
Alter	< 65 Jahre	41 (53,2)	36 (46,8)	77 (100)	
	≥ 65 Jahre	29 (36,7)	50 (63,3)	79 (100)	
		70 (44,9)	86 (55,1)	156 (100)	0,053

4.3.2.3 Laborparameter

In Anbetracht der Laborparameter ergab sich ein statistisch auffälliger (p (Chi-Quadrat) = 0,013) Zusammenhang zwischen dem Sirtuin 6-Nachweis und dem Albumin im Serum des untersuchten Kollektivs (vgl. Tabelle 33). Hierbei zeigte sich, dass 70,4% der Patienten mit normwertigen Albuminspiegeln einen Nachweis von SIRT6 im Tumor nachweisen konnten. Bei Patienten mit reduziertem Serumalbumin ($< 3,5$ g/dl) war die Verteilung in etwa ausgeglichen (48,4 versus 51,6%). Alle weiteren erhobenen Laborparameter standen in keinem direkten Zusammenhang mit Sirtuin 6 im Tumor. Eine Tabelle mit allen dokumentierten Laborparametern ist dem Anhang zu entnehmen (vgl. Tabelle 52) im Anhang).

Tabelle 33: Kreuztabelle Sirtuin6-Nachweis im Tumor und Serumalbumin. Bei Patienten mit normwertigem Serumalbumin zeigte sich ein Übergewicht (70,4%) von Fällen, bei denen der Tumor SIRT6-positiv war, bei Patienten mit erniedrigtem Serumalbumin war die Verteilung an SIRT6-positiven und SIRT6-negativen Tumoren in etwa ausgeglichen. p (Chi-Quadrat) = 0,013.

		Sirtuin 6-Nachweis im Tumor		p-Wert (Chi-Quadrat)	
		Negativ (%)	Positiv (%)	Gesamt (%)	
Albumin	< 3,5 g/d	44 (48,4)	47 (51,6)	91 (100)	
	≥3,5 g/dl (bis 5,4 g/dl)	24 (29,6)	57 (70,4)	81 (100)	
		68 (39,5)	104 (60,5)	172 (100)	0,013

4.3.2.4 überwiegende Färbelokalisation im Tumor (Nukleus versus Zytosol)

SIRT6 konnte sowohl im Nukleus als auch im Zytosol nachgewiesen werden. Intra- und extrahepatische Tumoren unterschieden sich im Hinblick auf den überwiegenden Ort in der Zelle, bei dem SIRT6 nachgewiesen werden konnte. Bei extrahepatischen Karzinomen war SIRT6 vorwiegend im Zytosol, bei intrahepatischen CCC eher im Nukleus zu detektieren (p (Chi-Quadrat) < 0,001, vgl. Abbildung 35).

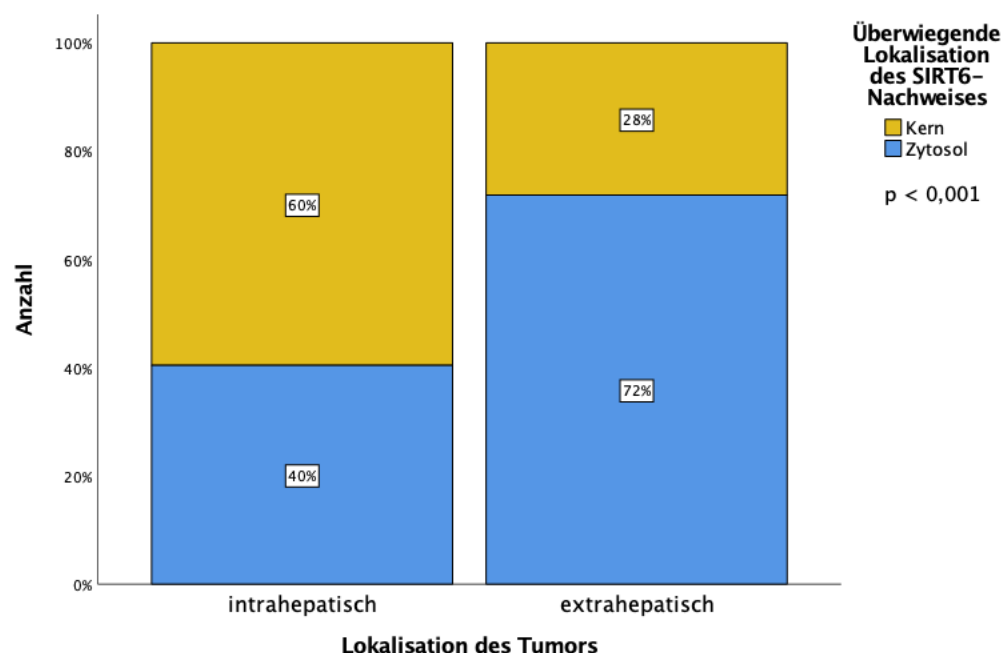


Abbildung 35: gestapeltes Säulendiagramm zum vorwiegenden Nachweisort von SIRT6 (Nukleus versus Zytosol) bei intra- und extrahepatischen Tumoren. Dieser zeigte sich signifikant unterschiedlich: SIRT6 war bei extrahepatischen Tumoren vorwiegend im Zytosol, bei intrahepatischen Tumoren vorwiegend im Nukleus nachweisbar (p (Chi-Quadrat) < 0,001).

Ebenso deutlich schien die Korrelation zwischen fortgeschrittenem UICC-Stadium und zytosolischem Sirtuin 6-Nachweis (p (Chi-Quadrat) < 0,001, Tabelle 34). Dazu passend gingen größere (T3+4) sowie Lymphknoten-metastasierte Tumoren eher mit einem Sirtuin-6-Nachweis

im Zytosol einher (p (Chi-Quadrat) = 0,013 und 0,039, siehe Tabelle 34). Für den Fernmetastasenstatus und dem Nachweis der Lokalisation von Sirtuin 6 schien es bislang nur Hinweise zu geben (p (Chi-Quadrat) = 0,076).

Tabelle 34: Kreuztabelle Lokalisation (Kern versus Zytosol) des überwiegenden SIRT6-Nachweises und Tumorcharakteristika. Bei extrahepatischen Karzinomen fand man SIRT6 vorwiegend im Zytosol, bei intrahepatischen CCC eher im Nukleus (p -Wert (Chi-Quadrat) < 0,001). Die Lokalisation des SIRT6-Nachweises zeigte sich in einem Zusammenhang zur Tumorgroße (p (Chi-Quadrat) = 0,013), dem Nachweis von Lymphknotenmetastasen (p (Chi-Quadrat) = 0,039) und dem konsekutiv höheren UICC-Stadium (p (Chi-Quadrat) < 0,001).

		Überwiegende Lokalisation des SIRT6-Nachweises		Gesamt n (%)	p-Wert (Chi-Quadrat)
		Kern n (%)	Zytosol n (%)		
Lokalisation	Extrahepatisch	18 (28,1)	46 (71,9)	64 (100)	
	Intrahepatisch	87 (59,6)	59 (40,4)	136 (100)	
		105 (50)	105 (50)	210 (100)	< 0,001
Tumorgroße	Tis-T2	80 (55,9)	63 (44,1)	143 (100)	
	T3-T4	26 (37,1)	44 (62,9)	70 (100)	
		106 (49,8)	107 (50,2)	213 (100)	0,013
TNM – N	N0	70 (55,1)	57 (44,9)	127 (100)	
	N+	28 (39,4)	43 (60,6)	71 (100)	
		98 (49,5)	100 (50,5)	198 (100)	0,039
TNM – M	M0	93 (53,4)	81 (46,6)	174 (100)	
	M+	5 (29,4)	12 (70,6)	17 (100)	
		98 (51,3)	93 (48,7)	191 (100)	0,076
UICC-Stadium	Low (0-2)	59 (63,4)	34 (36,6)	93 (100)	
	High (3-4)	39 (37,5)	65 (62,5)	104 (100)	
		98 (49,7)	99 (50,3)	197 (100)	< 0,001

4.3.2.5 Sirtuin 6 in der Leber

Im Gesamtkollektiv lag bei 189 Präparaten Lebergewebe vor. Davon wurden 98 (51,9%) Sirtuin-6-negativ und 91 (48,1%) positiv bewertet. Wegen der anatomischen Nähe des Tumors zur Leber wurden im Folgenden insbesondere die intrahepatischen Karzinome betrachtet: 133 (81,6%) der intrahepatischen Tumorpräparate wiesen Leberanschnitte auf. Von den 133 (100%) intrahepatischen Präparaten mit Leberanschnitt wurden 63 (47,4%) als Sirtuin-6-positiv deklariert (= IRS 4-12). Auffällig schien ein Zusammenhang zwischen Sirtuin 6 von Leber und Tumor zu sein. Kommt es im Tumor zu einem verstärkten Auftreten von Sirtuin 6, so zeigte sich dieser auch verstärkt in der den Tumor umgebenden Leber. Dies war für intrahepatische CCC statistisch relevant nachweisbar (p (Chi-Quadrat) $< 0,001$, Tabelle 35). 69% der Präparate mit SIRT6-Nachweis im Tumor zeigten sich auch in der Leber positiv auf Sirtuin 6. Andersherum waren 77,4% der SIRT6-negativen Tumorpräparate auch frei von Sirtuin 6 in der Leber.

Eine Tendenz zum Zusammenhang zwischen dem Sirtuin 6-Nachweis in der tumorumgebenden Leber und dem Vorhandensein von Fernmetastasen konnte ebenfalls beobachtet werden (p (Chi-Quadrat) = 0,103, Tabelle 54).

Tabelle 35: Kreuztabelle SIRT6-Nachweis im Tumor und in der Leber. Für intrahepatische Tumoren lässt sich ein Zusammenhang zwischen dem SIRT6-Nachweis von Tumor- und umgebendem Lebergewebe feststellen: zeigt sich der Tumor positiv auf SIRT6, so ist in 69% der Fälle auch die Leber positiv. Andersherum waren 77,4% der SIRT6-negativen Tumoren auch ohne Nachweis des immunhistochemischen Markers in der Leber (p (Chi-Quadrat) $< 0,001$).

intrahepatische CCC		Sirtuin 6-Nachweis der Leber			p-Wert (Chi-Quadrat)
		Negativ n (%)	Positiv n (%)	Gesamt n (%)	
SIRT6-Nachweis des Tumors	negativ	48 (77,4)	14 (22,6)	62 (100)	
	positiv	22 (31)	49 (69)	71 (100)	
		70 (52,6)	63 (47,4)	133 (100)	< 0,001

4.3.2.6 Überleben

Tabelle 36: Zusammenfassende Tabelle zu den medianen Überlebenszeiten in verschiedenen Subgruppenanalysen bezogen auf den SIRT6-Nachweis im Tumor

Mediane Überlebenszeiten		SIRT6-negativ in Monaten (95% KI)		SIRT6-positiv in Monaten (95% KI)		Log Chi Quadrat Wert	Rank (p-Wert)
Gesamtkollektiv		22,8	(14,7-31)	22,5	(18,9-30,1)	0,013	(p=0,91)
Geschlecht	Männer	29,1	(16,5-41,6)	20,1	(12,9-27,2)	0,036	(p=0,849)
	Frauen	17,7	(10,6-24,8)	26,1	(23,5-28,7)	0,475	(p=0,491)
Lokalisation	eCCC	9,2	(4,3-14,2)	34,1	(19,4-48,9)	6,551	(p=0,01)
	iCCC	30	(19,5—40,5)	21,8	(16,6-26,9)	0,891	(p=0,345)
Männer	alle Männer	29,1	(16,5-41,6)	20,1	(12,9-27,2)	0,036	(p=0,849)
	eCCC	9,2	(3,7-14,7)	36,7	(14,7-58,7)	4,152	(p=0,042)
	iCCC	45	(22,4-67,6)	17,2	(6,8-27,6)	1,955	(p=0,162)
	alle Frauen	17,7	(10,6-24,8)	26,1	(23,5-28,7)	0,475	(p=0,491)
Frauen	eCCC	7,4	(0-16,9)	33,1	(22,2-43,9)	4,889	(p=0,027)
	iCCC	19,9	(11-28,8)	25,7	(19,8-31,7)	0,113	(p=0,737)
Frauen (Viergruppenvergleich)	normwertige GOT	32,4	(11,7-53,1)	27,4	(25,4-29,5)	21,147	(p < 0,001)
	erhöhte GOT	9,7	(2-17,4)	20,4	(12,5-28,3)		
Frauen (Viergruppenvergleich)	normwertige GPT	17,7	(5,5-29,9)	25,5	(20-31)	12,087	(p=0,007)
	erhöhte GPT	7,4	(0-17,5)	32,4	(11-53,7)		
Gesamtkollektiv (Viergruppenvergleich)	normwertiges Bilirubin	23,5	(4,6-42,5)	23,4	(18-28,9)	10,489	(p=0,015)
	erhöhtes Bilirubin	17,4	(6,8-28,1)	24,9	(5,7-44,1)		
Gesamtkollektiv (Viergruppenvergleich)	normwertiges CA 19-9	51,8	(24,4-79,3)	32,4	(17,2-47,6)	17,855	(p < 0,001)
	erhöhtes CA 19-9	7,4	(0,8-13,9)	20,4	(11,9-28,9)		

Nach Lokalisation des Primarius

Ähnlich wie bei Argpyrimidin-Nachweis wiesen Patienten mit extrahepatischen Tumoren bei SIRT6-Positivität ein längeres Überleben auf: im Median überlebten Patienten mit SIRT6-positiven eCCC 34,1 Monate (95% KI 19,4-48,9) und eCCC-Patienten mit SIRT6-negativen Tumoren 9,2 Monate (95% KI 4,3-14,2). Der p-Wert lag dafür bei 0,01 (Log Rank (Mantel Cox)) (siehe Abbildung 36). Im Gegensatz dazu machte der SIRT6-Status bei intrahepatischen Tumoren sowie im Gesamtkollektiv (abzüglich Gallenblasentumoren) keinen Unterschied ((Log Rank (Mantel Cox) $p = 0,345$ und $p = 0,91$; vgl. Tabelle 36).

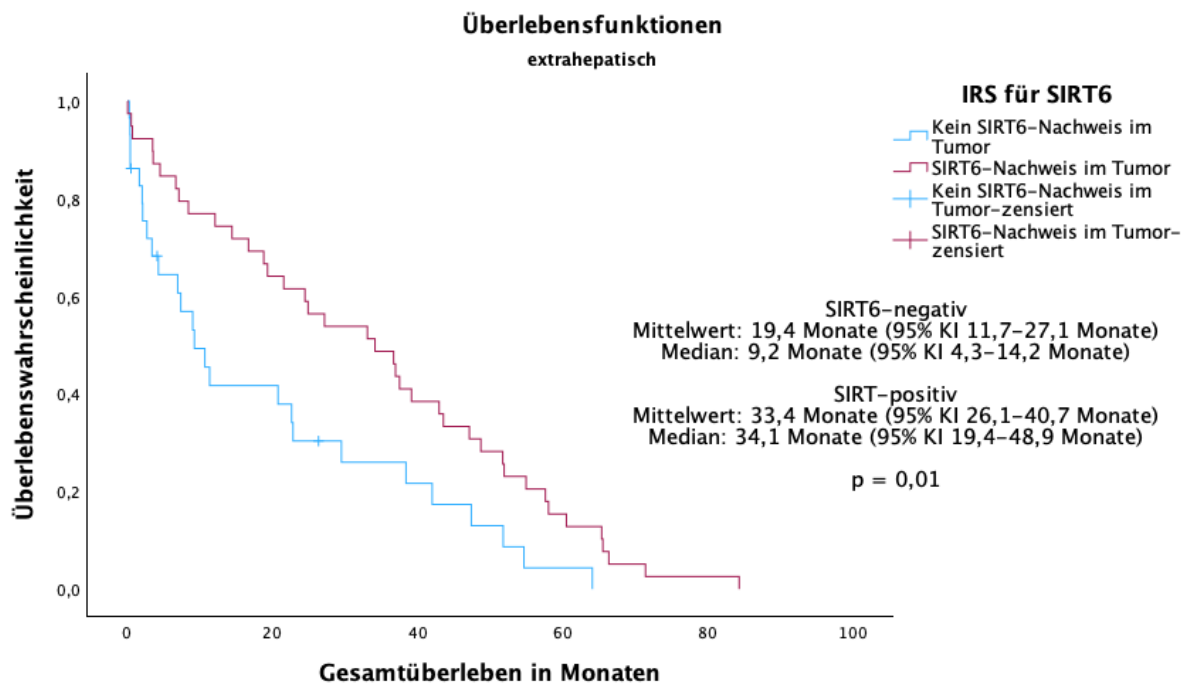


Abbildung 36: Gesamtüberleben für SIRT6 bei Patienten mit extrahepatischem CCC, dargestellt anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms. Patienten mit SIRT6-positiven Tumoren überlebten im Median 34,1 Monate (95% KI 19,4-48,9) und Patienten mit SIRT6-negativen Tumoren im Median 9,2 Monate (95% KI 4,3-14,2) (Log Rank (Mantel Cox) $p = 0,01$).

Nach Laborparametern

Frauen mit erhöhten Leberenzymen (GOT (AST) und GPT (ALT) jeweils > 35 U/l) wiesen im Vergleich ein kürzeres Gesamtüberleben auf, wenn der Tumor SIRT6-negativ bewertet wurde. In Anbetracht aller Frauen gab es keinen statistisch nachweisbaren Unterschied zwischen normwertiger GOT (medianes Überleben 25,5 Monate (95% KI 21,3-29,7 Monate)) und erhöhter GOT (medianes Überleben 16,7 Monate (95% KI 13,2-20,1 Monate)), Log Rank (Mantel Cox) $p=0,161$).

Es zeigte sich bei erhöhter **GOT** und fehlendem SIRT6-Nachweis im Tumor ein mittleres Überleben von 12,8 Monaten (95% KI 7,5-18,1 Monate) und ein medianes Überleben von 9,7 Monate (95% KI 2-17,4 Monate (vgl. Abbildung 37)).

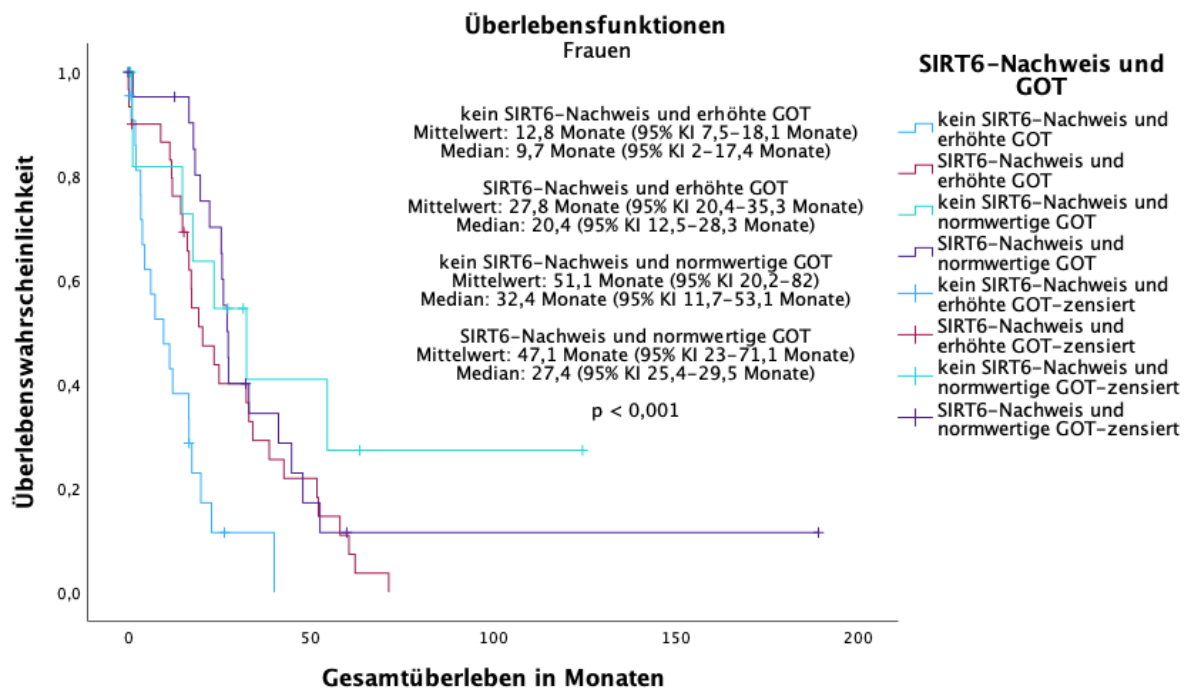


Abbildung 37: Vergleich aller weiblichen Patienten im Hinblick auf den SIRT6-Nachweis im Tumor und GOT. Es zeigte sich, dass weibliche Patienten ohne SIRT6-Nachweis und erhöhtem GOT am kürzesten überlebten (mittleres Überleben 12,8 Monate (95% KI 7,5-18,1 Monate), medianes Überleben 9,7 Monate (95% KI 2-17,4 Monate). Mit einem p -Wert von $< 0,001$ hob sich diese Subgruppe der Vergleichsgruppen ab. Patientinnen mit SIRT6-positiven Tumoren unterschieden sich hinsichtlich des Überlebens nicht trotz unterschiedlich erhöhter GOT-Werte (Log Rank (Mantel Cox) $p=0,272$). Graphische Darstellung anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms.

Vergleich man im Anschluss die weiblichen Patienten mit erhöhten GOT > 35 U/l in Hinblick auf die SIRT6-Positivität im Tumor, so bestätigte sich hier der Unterschied (Log Rank (Mantel Cox) $p = 0,004$, medianes OS 20,4 Monate (95% KI 12,5-28,3 Monate) bei SIRT6-Nachweis versus 9,7 Monate (95% KI 2-17,4 Monate) bei SIRT6-Negativität) (vgl. Abbildung 38).

Die männliche Kohorte zeigte diesen Unterschied nicht.

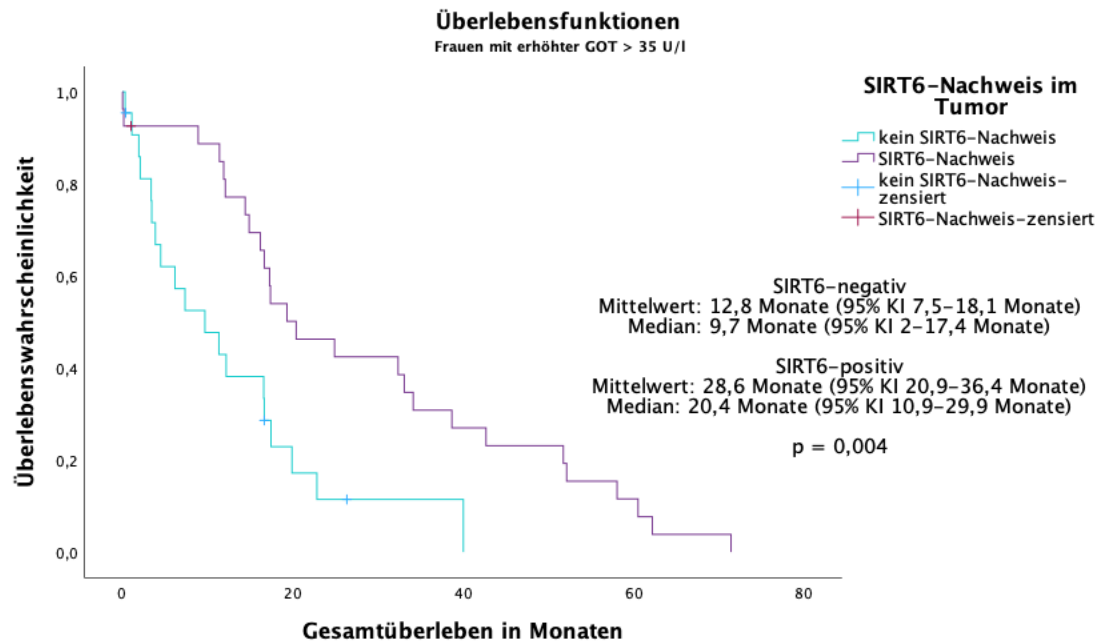


Abbildung 38: Vergleich der weiblichen Patienten mit erhöhter GOT in Hinblick auf die SIRT6-Positivität. Es zeigte sich, dass Patientinnen mit SIRT6-Nachweis im Tumor länger überlebten (im Mittel 28,6 Monate (95% KI 20,9–36,4 Monate), im Median 20,4 Monate (95% KI 10,9–29,9 Monate)) als jene ohne SIRT6-Nachweis im Tumor (im Mittel 12,8 Monate (95% KI 7,5–18,1 Monate), im Median 9,7 Monate (95% KI 2–17,4 Monate)). Der p-Wert lag bei 0,004 (Log Rank (Mantel Cox)). Graphische Darstellung anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms.

Bei Patientinnen mit erhöhter **GPT** und fehlendem SIRT6-Nachweis war ein mittleres Überleben von 13,5 Monaten (95% KI 7,4-19,6 Monate) und ein medianes Überleben von 7,4 Monaten (95% KI 0-17,5 Monate) zu verzeichnen. Mit einem p-Wert von 0,007 (Log Rank (Mantel Cox)) zeigte die Kombination aus SIRT6-Negativität und erhöhter GPT das kürzeste Überleben und hob sich von den anderen Subgruppen (SIRT-Positivität+erhöhte GPT versus SIRT6-Positivität+normwertige GPT versus SIRT6-Negativität+normwertige GPT) ab (vgl. *Abbildung 39*).

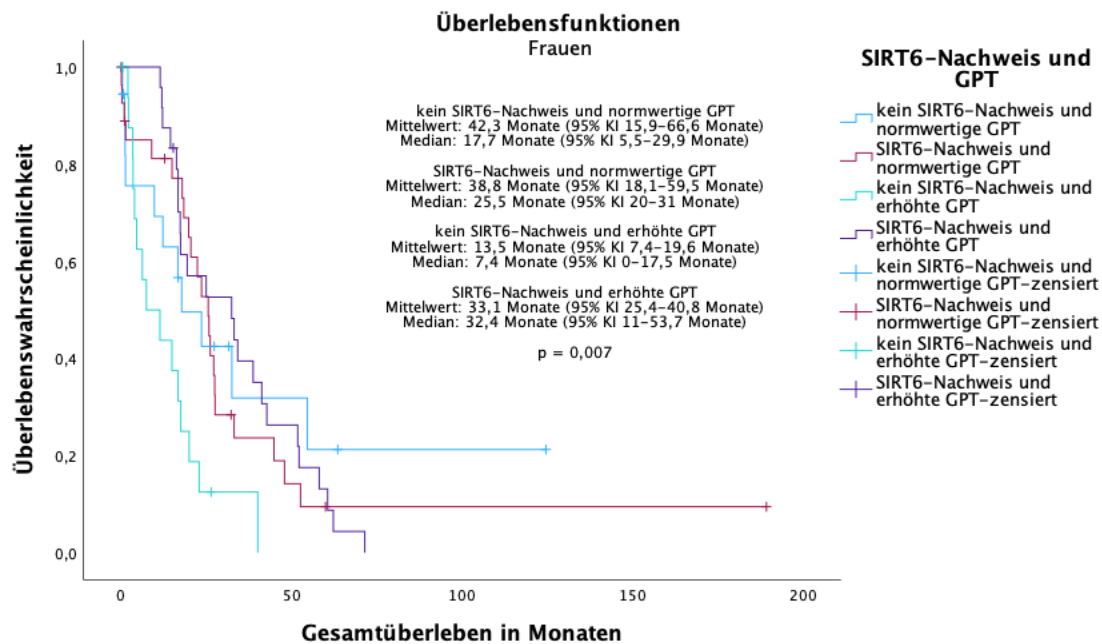


Abbildung 39: Vergleich aller weiblichen Patienten im Hinblick auf den SIRT6-Nachweis im Tumor und GPT. Es zeigte sich, dass weibliche Patienten ohne SIRT6-Nachweis und erhöhter GPT am kürzesten überlebten (mittleres Überleben 13,5 Monate (95% KI 7,4-19,6 Monate), medianes Überleben 7,4 Monate (95% KI 0-17,5 Monate). Mit einem p-Wert von 0,007 (Log Rank (Mantel Cox)) hob sich diese Subgruppe der Vergleichsgruppen ab. Patientinnen mit SIRT6-positiven Tumoren unterschieden sich hinsichtlich des Überlebens nicht trotz unterschiedlicher GPT-Werte. Graphische Darstellung anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms.

Der Vergleich der Patientinnen mit erhöhter GPT im Hinblick auf die Sirtuin-6-Positivität zeigte mit einem p-Wert von 0,001 (Log Rank (Mantel Cox)) einen deutlichen Unterschied der mittleren und medianen Überlebenszeit. Das entsprechende Kaplan-Meier-Diagramme ist der untenstehenden Abbildung 40 zu entnehmen.

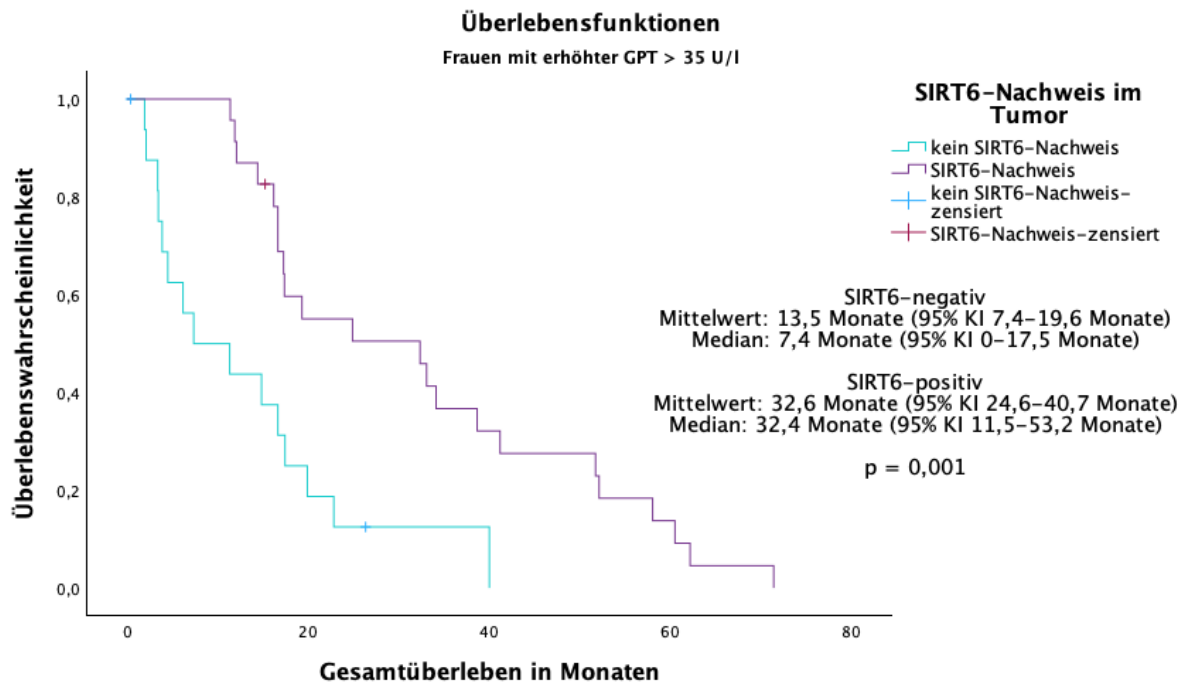


Abbildung 40: Vergleich der weiblichen Patienten mit erhöhter GPT in Hinblick auf die SIRT6-Positivität. Es zeigte sich, dass Patientinnen mit SIRT6-Nachweis im Tumor länger überlebten (im Mittel 32,6 Monate (95% KI 24,6–40,7 Monate), im Median 32,4 Monate (95% KI 11,5–53,2 Monate)) als jene ohne SIRT6-Nachweis im Tumor (im Mittel 13,5 Monate (95% KI 7,4–19,6 Monate), im Median 7,4 Monate (95% KI 0–17,5 Monate)). Der p-Wert (Log Rank (Mantel Cox)) lag bei 0,001. Graphische Darstellung anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms.

Im Gesamtkollektiv lebten Patienten mit erhöhtem **Bilirubin** und fehlendem SIRT6-Nachweis am kürzesten (im Mittel 18,4 Monate (95% KI 13-23,8 Monate), im Median 17,4 Monate (95% KI 6,8-28,1 Monate), Log Rank (Mantel Cox) $p = 0,015$). Die entsprechende Kaplan-Meier-Darstellung ist der untenstehenden *Abbildung 41* zu entnehmen.

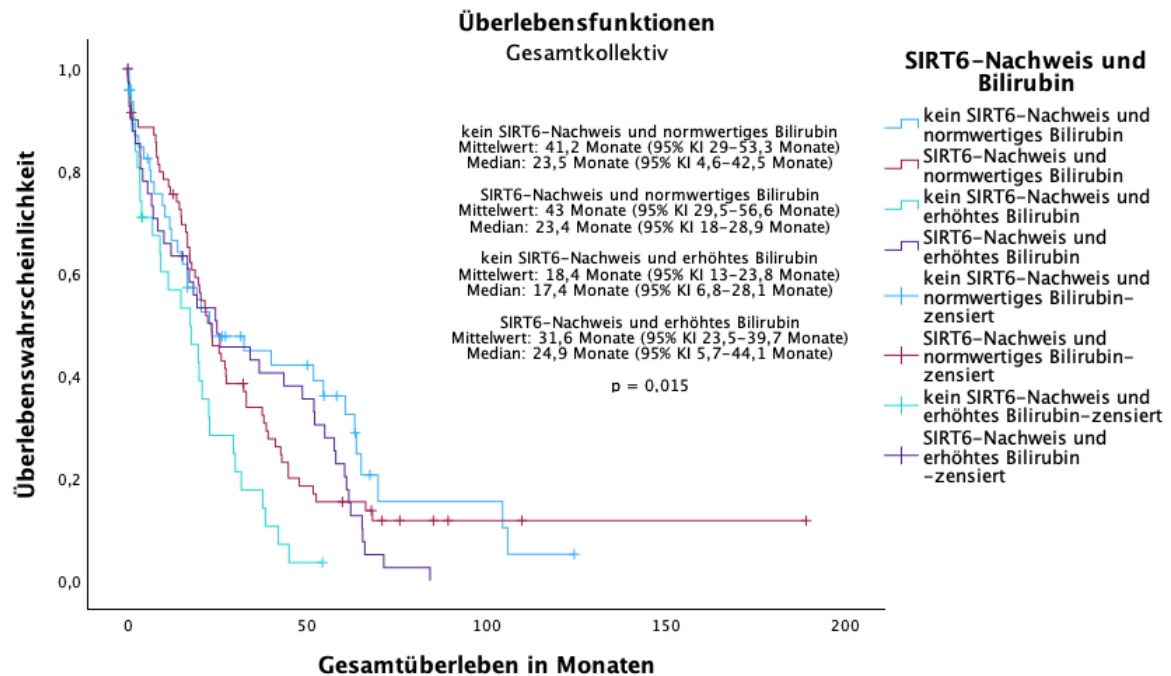


Abbildung 41: Vergleich des Gesamtüberlebens aller Patienten im Hinblick auf den Nachweis von SIRT6 im Tumor und Bilirubin. Patienten mit erhöhtem Bilirubin und fehlendem SIRT6-Nachweis lebten am kürzesten (im Mittel 18,4 Monate (95% KI 13-23,8 Monate), im Median 17,4 Monate (95% KI 6,8-28,1 Monate), Log Rank (Mantel Cox) $p = 0,015$). Graphische Darstellung anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms.

Selektierte man alle Patienten mit Bilirubinerhöhung und verglich diese bezüglich des Überlebens in Hinblick auf den SIRT6-Nachweis, so war festzustellen, dass Patienten mit SIRT6-Nachweis länger überlebten (im Mittel 31,6 Monate (95% KI 23,5-39,7 Monate), im Median 24,9 Monate (95% KI 5,7-44,1 Monate)). Ohne SIRT6-Nachweis im Tumor lag die mittlere Überlebenszeit bei 18,4 Monaten (95% KI 13-23,8 Monate), die mediane Überlebenszeit bei 14,4 Monaten (95% KI 6,8-28,1 Monate). Der p-Wert (Log Rank (Mantel Cox)) lag dabei bei 0,01. Eine graphische Darstellung erfolgte im folgenden Kaplan-Meier-Diagramm (siehe Abbildung 42).

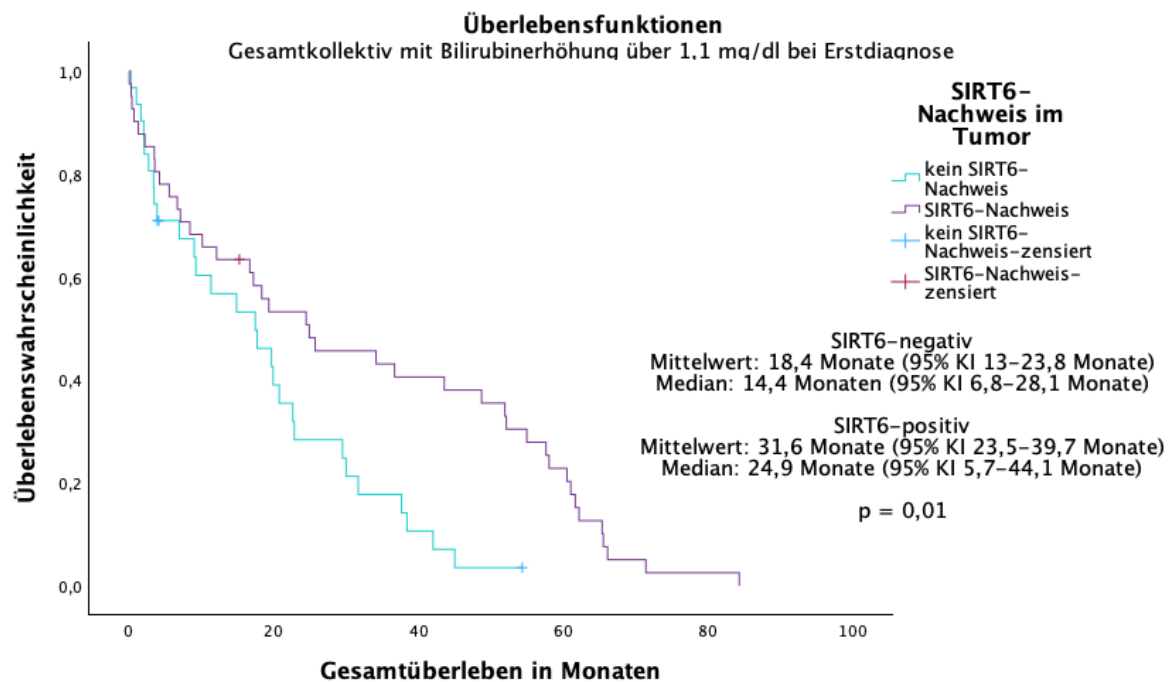


Abbildung 42: Selektion aller Patienten mit Bilirubinerhöhung. Hierbei war ersichtlich, dass Patienten mit SIRT6-Nachweis länger überlebten (im Mittel 31,6 Monate (95% KI 23,5-39,7 Monate, im Median 24,9 Monate (95% KI 5,7-44,1 Monate)). Ohne SIRT6-Nachweis im Tumor lag die mittlere Überlebenszeit bei 18,4 Monaten (95% KI 13-23,8 Monate), die mediane Überlebenszeit bei 14,4 Monaten (95% KI 6,8-28,1 Monate). Der p-Wert (Log Rank (Mantel Cox)) lag dabei bei 0,01. Graphische Darstellung anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms.

Auch hier schien SIRT6 einen Überlebensvorteil beim weiblichen Geschlecht zu bieten: bei Bilirubinerhöhung über 1,1 mg/dl überlebten Frauen mit SIRT6-Positivität im Tumor länger (im Median 25,7 Monate (95% KI 9,8-41,7 Monate)) im Vergleich zu Frauen ohne SIRT6-Nachweis im Tumor (im Median 11,3 Monate (95% KI 0-23,3 Monate)), p (Log Rank (Mantel Cox) 0,002 (Chi-Quadrat 9,566, df 1 (vgl. Abbildung 43)).

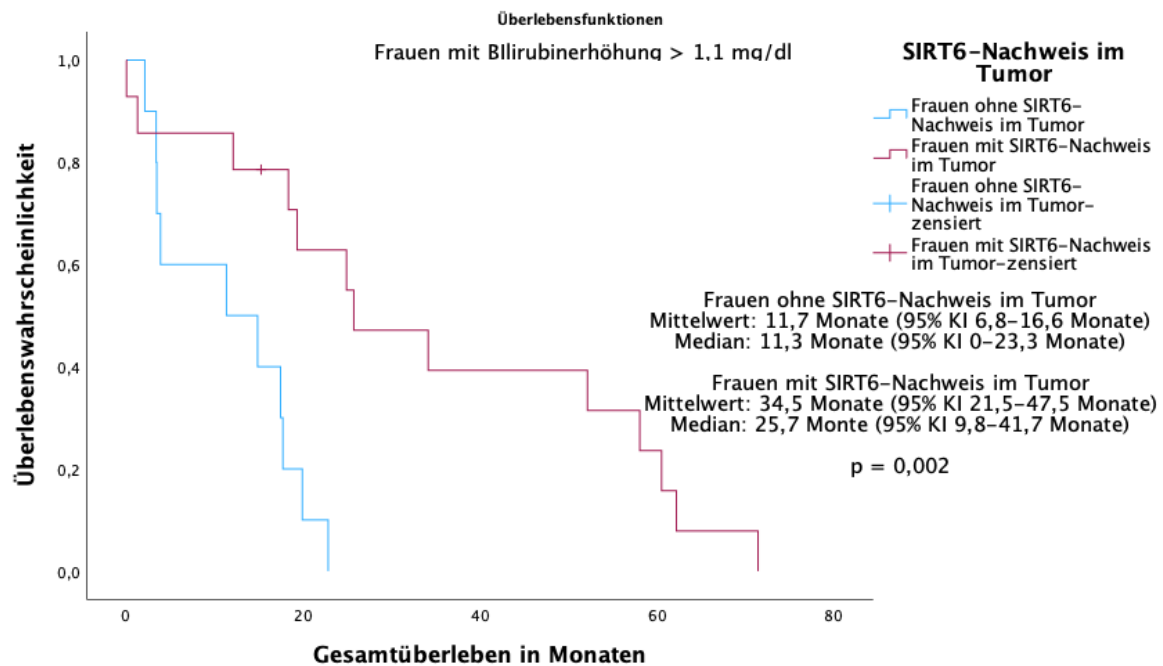


Abbildung 43: Selektion aller weiblichen Patienten mit Bilirubinerhöhung in Abhängigkeit vom Nachweis von SIRT6 im Tumor. Es zeigt sich ein Überlebensvorteil der Frauen mit SIRT6-Nachweis (medianes Überleben 25,7 Monate (95% KI 9,8-41,7 Monate) versus 11,3 Monate (95% KI 0-23,3 Monate)), $p = 0,002$ (Log Rank (Mantel Cox)).

Männliche Patienten dieses Kollektivs zeigten diesen Unterschied nicht (p (Log Rank (Mantel Cox) 0,144 (Chi Quadrat 2,126 (df 1))). Das entsprechende Kaplan-Meier-Diagramm ist im Anhang zu finden (siehe Abbildung 54).

Ähnliche Ergebnisse konnten in Hinblick auf den **CA 19-9** Spiegel beobachtet werden. Im Gesamtkollektiv schienen Patienten ohne SIRT6-Nachweis im Tumor und erhöhtem CA 19-9 die kürzeste Überlebenszeit aufzuweisen (Mittelwert: 17,8 Monate (95% KI 8,6-27 Monate), Median: 7,4 Monate (95% KI 0,8-13,9 Monate)). Interessant hier erscheint jedoch, dass Patienten mit Sirtuin-6-negativen Tumoren und normwertigen CA 19-9-Spiegeln am längsten überlebten (Mittelwert: 47,5 Monate (95% KI 28,8-50,8 Monate), Median: 51,8 Monate (95% KI 24,4-79,3 Monate)). Der Unterschied wurde mit einem p -Wert (Log Rank (Mantel Cox)) von $< 0,001$ unterstrichen (vgl. Abbildung 44).

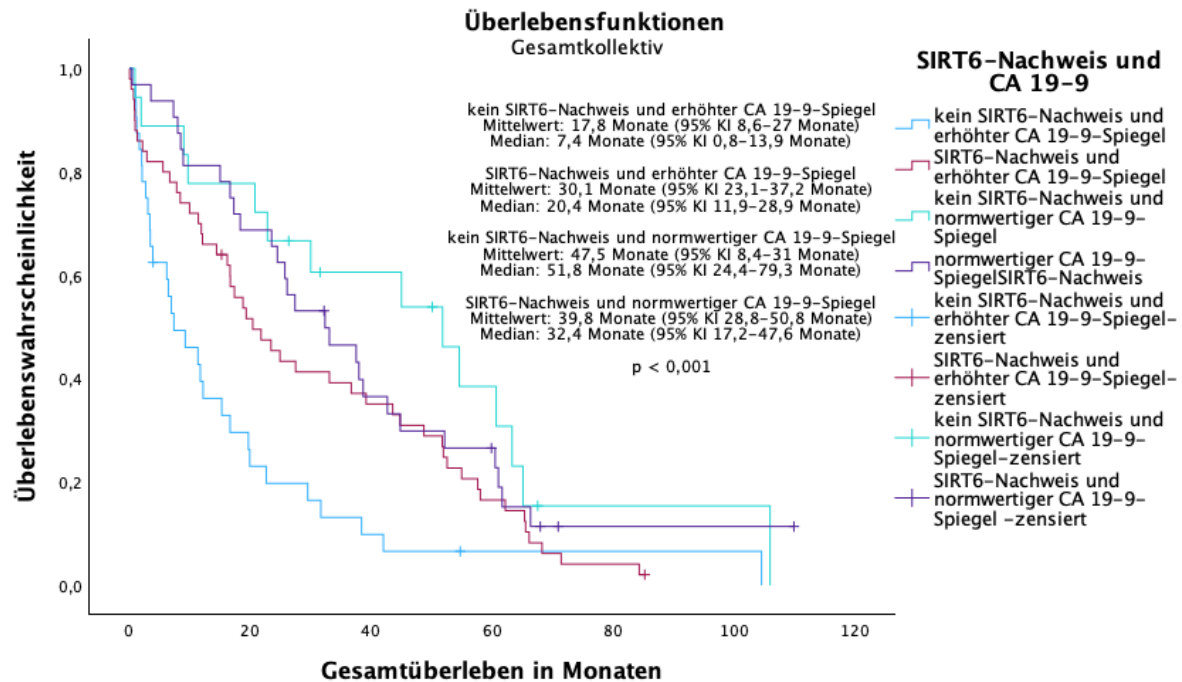


Abbildung 44: Vergleich aller Patienten im Hinblick auf den Nachweis von SIRT6 im Tumor und dem CA 19-9-Spiegel anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms. Patienten ohne SIRT6-Nachweis im Tumor und erhöhtem CA 19-9 wiesen die kürzeste Überlebenszeit auf (Mittelwert: 17,8 Monate (95% KI 8,6–27 Monate), Median: 7,4 Monate (95% KI 0,8–13,9 Monate). Der p-Wert (Log Rank (Mantel Cox)) lag bei $<0,001$. Graphische Darstellung anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms.

Im Vergleich aller Patienten mit Erhöhung des CA 19-9-Spiegels im Hinblick auf den Nachweis von SIRT6 im Tumor konnte ein längeres Gesamtüberleben von Patienten mit SIRT6-Positivität festgestellt werden (Mittelwert: 30,1 Monate (95% KI 23,1–37,1 Monate), Median: 20,4 Monate (95% KI 11,9–28,9 Monate), Log Rank (Mantel Cox) $p = 0,021$, Abbildung 45). Eine Überlebenszeitverlängerung sah man demnach nur bei erhöhten CA 19-9-Spiegeln

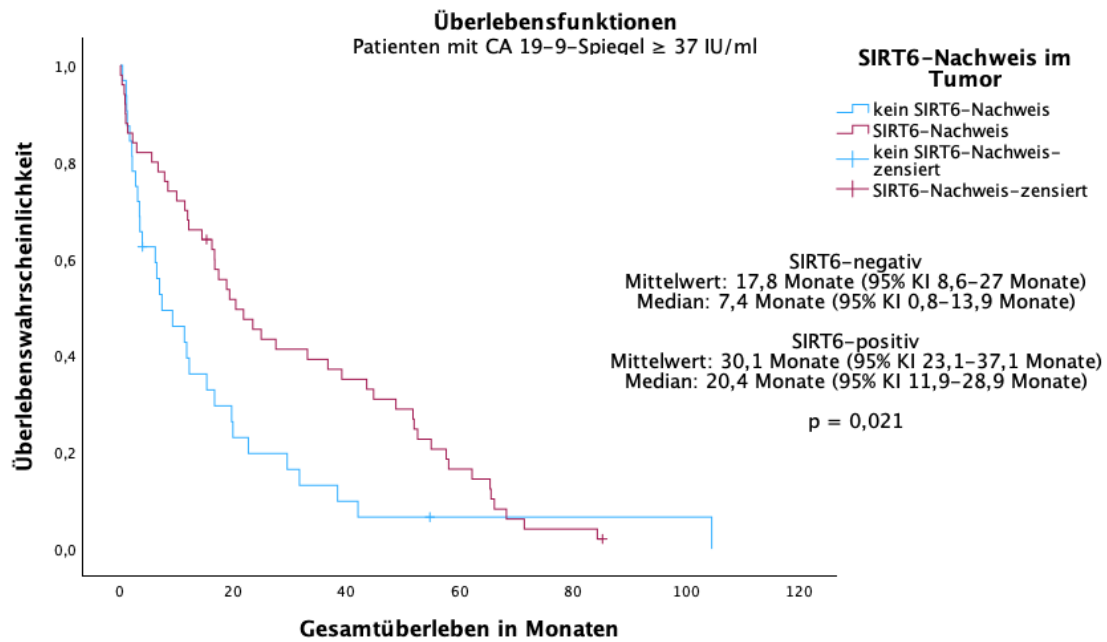


Abbildung 45: Selektion aller Patienten mit erhöhtem Tumormarker CA 19-9 in Abhängigkeit zum Nachweis von SIRT6 im Tumor. Ohne SIRT6-Nachweis im Tumor war eine mittlere Überlebenszeit von 17,8 Monaten (95% KI 8,6-27 Monate) und eine mediane Überlebenszeit von 7,4 Monaten (95% KI 0,8-13,9 Monate) zu verzeichnen. Bei Patienten mit SIRT6-positiven Tumoren lag die mittlere Überlebenszeit bei 30,1 Monaten (95% KI 23,1-37,1 Monate) und die mediane Überlebenszeit bei 20,4 Monaten (95% KI 11,9-28,9 Monate). Der p-Werte (Log Rank (Mantel Cox)) wurde mit 0,021 ausgegeben. Graphische Darstellung anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms.

Und auch hier profitierten besonders Frauen vom Nachweis von SIRT6 im Tumor: bei SIRT6-Positivität zeigte sich ein medianes Überleben von 19,3 Monaten (95% KI 13,8-24,8 Monate) versus beim Fehlen von SIRT von 3,9 Monaten (95% KI 0-8,5 Monate), p (Log Rank (Mantel Cox)) $< 0,001$ (Chi-Quadrat 13,562) (vgl. Abbildung 46). Bei Männern zeigte sich kein Unterschied (p (Log Rank (Mantel Cox)) 0,312; Chi Quadrat 1,021).

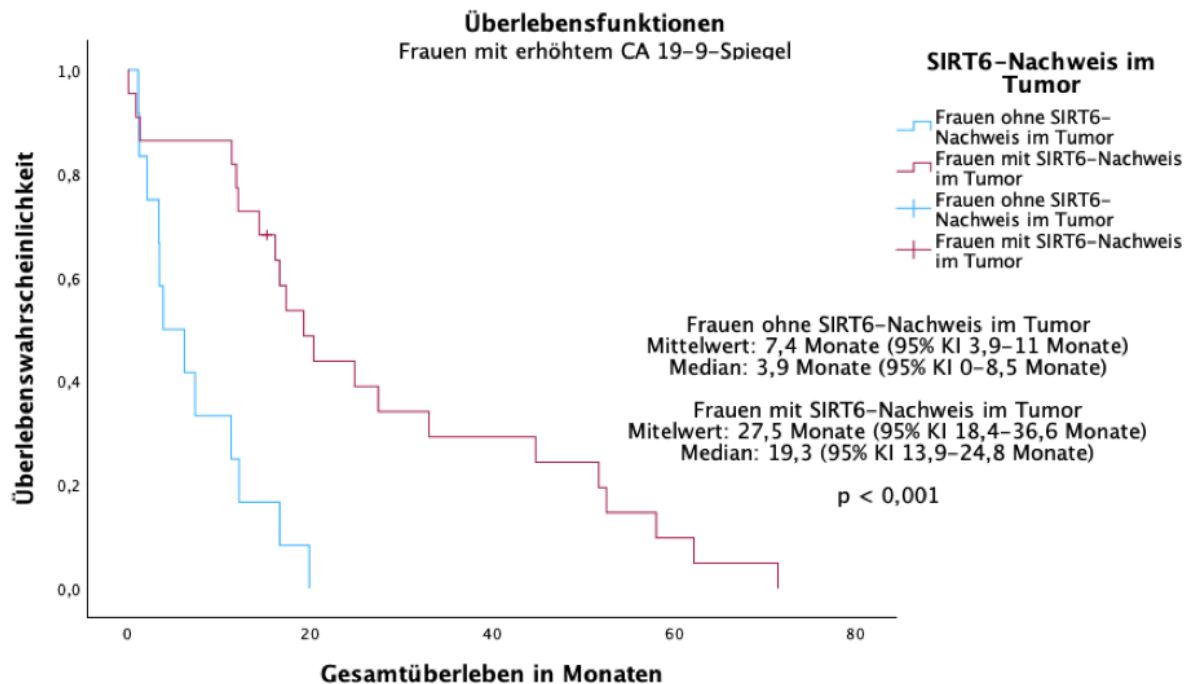


Abbildung 46: Selektion aller weiblichen Patienten mit erhöhtem CA 19-9-Spiegel. Es ist zu erkennen, dass der Nachweis von SIRT6 im Tumor eine protektive Rolle zu spielen scheint: medianes Überleben 19,3 Monate (95% KI 13,8–24,8 Monate) versus 3,9 Monate (95% KI 0–8,5 Monate) beim Fehlen von SIRT6, p (Log Rank (Mantel Cox)) $< 0,001$ (Chi-Quadrat 13,562).

Nach vorwiegendem Nachweisort von SIRT6 innerhalb der Zelle

Im Folgenden wurden alle Fälle SIRT6-positiven Fälle selektiert. Es erfolgte eine Kaplan-Meier-Darstellung des Gesamtüberlebens mit dem Vergleich zwischen überwiegend nukleären SIRT6-Nachweis und überwiegend zytosolischen SIRT6-Nachweis unter Ausschluss der Fälle mit 50:50-Verteilung von nukleärer und Zytosol-Färbung. Dabei ergab sich kein Anhalt für einen Unterschied im Gesamtüberleben (Log Rank (Mantel Cox) $p = 0,447$), vgl. Abbildung 55 im Anhang.

Nach Leberfärbung

In der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier ergab sich kein Hinweis auf einen Zusammenhang des Sirtuin 6-Nachweises in Tumor und Leber in Hinblick auf das Gesamtüberleben (Log Rank (Mantel Cox) $p = 0,867$).

4.3.3 Koexpression von Argpyrimidin und Sirtuin 6

Es konnte kein Zusammenhang zwischen Argpyrimidin und SIRT6 im Tumor festgestellt werden (p (Chi-Quadrat, exakter Test nach Fischer) = 0,279) (vgl. Tabelle 37).

Tabelle 37: Kreuztabelle über den Zusammenhang zwischen Argpyrimidin- und SIRT6-Koexpression. Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Argpyrimidin und SIRT6 im Tumor (p (Chi-Quadrat, exakter Test nach Fischer) = 0,279).

Argpyrimidin-Nachweis im Tumor							Chi-Quadrat – (zweiseitig) (exakter Test nach Fischer)	
			Negativ (%)	n	Positiv (%)	n	Gesamt (%)	n
Sirtuin 6-Nach- weis im Tumor	Negativ (%)	n	36 (35,6)		65 (64,4)			
	Positiv (%)	n	55 (43)		73 (57)			
			91 (39,7)		138 (60,3)		229 (100)	0,279

Auch in Subgruppenanalysen zeigte sich kein Unterschied.

5 Diskussion

5.1 Einführung

Diese Dissertation basiert auf der Analyse einer Kohorte von 245 Patientinnen und Patienten mit cholangiozellulärem Karzinom. Das Kollektiv hatte etwas mehr männlichen Patienten (53,1%) und mit 163 Fällen (66,5%) ein Übergewicht an intrahepatischen Karzinomen. Insgesamt wurden 93,1% der Patienten initial operiert, sodass es sich bei der folgenden immunhistochemischen Färbung um Nativpräparate handelte. Im Gesamtkollektiv wies der Großteil (68,2%) der Patienten eine Tumorgöße kleiner T3 auf, 58,8% hatten zum Diagnosezeitpunkt keine Lymphknoten- und in 80,4% keine Fernmetastasen. Im Median überlebte das Patientenkollektiv 23,5 Monate (95% KI 19,2-27,9 Monate).

Es erfolgte die immunhistochemische Färbung auf Argpyrimidin und Sirtuin 6. In die Auswertung konnten 229 Präparate eingeschlossen werden, 16 Präparate wurden der Auswertung aufgrund unzureichender Tumormasse oder schlechter Präparatqualität entzogen. Dadurch änderte sich die Zusammensetzung des Gesamtkollektivs jedoch nicht wesentlich. Anhand eines modifizierten Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele und Stegner wurden 60,3% der Präparate als Argpyrimidin-positiv und 55,9% der Präparate als Sirtuin 6-positiv klassifiziert. Zudem wurde die Färbung der beiden Marker in der den Tumor umgebenden Leber bestimmt. Anhand dieser Färbeergebnisse wurden Korrelationen zu Patienten- und Tumorcharakteristika sowie insbesondere zum Überleben durchgeführt.

Hierbei ließ sich Argpyrimidin bevorzugt in Präparaten älterer Patienten (≥ 65 Jahre) (p (Chi-Quadrat) = 0,037, vgl. Tabelle 23) und in extrahepatischen cholangiozellulären Karzinomen (p (Chi-Quadrat) = 0,014, vgl. Tabelle 25) nachweisen. Bei Letzteren korrelierte der Nachweis von Argpyrimidin im Tumor mit einer kleineren Tumorgöße ($< T3$) (p (Chi-Quadrat) $< 0,001$, vgl. Tabelle 26) und konsekutiv mit einem frühen Tumorstadium (UICC < 3) (p (Chi-Quadrat) = 0,06, vgl. Tabelle 27) sowie auch mit einem längeren Überleben (p (Log Rank) = 0,023, vgl. Tabelle 29).

Für Sirtuin 6 schien es interessant, den überwiegenden Ort der Färbung zu betrachten. Hier konnte festgehalten werden, dass extrahepatische Karzinome SIRT6 bevorzugt (72%) im Zytosol aufwiesen, wohingegen intrahepatische Karzinome SIRT6 eher im Zellkern (60%) zeigten (p (Chi-Quadrat) $< 0,001$, vgl. Abbildung 35). Extrahepatische Tumoren sind mit einem längeren Überleben einhergegangen, wenn der Tumor SIRT6-positiv war. Bei Frauen mit erhöhten Transaminasen (GOT und GPT) schien der Nachweis protektiv zu wirken und mit einem längeren Überleben einherzugehen ($p = 0,004$ und $p = 0,001$, vgl. Abbildung 38 und Abbildung 40). Ähnliche Ergebnisse konnten im Gesamtkollektiv für Patienten mit Bilirubin- und CA 19-9-Erhöhung festgehalten werden ($p = 0,01$ und $p = 0,021$, vgl. Abbildung 42 und Abbildung 45).

Bei beiden immunhistochemischen Markern war eine Färbung der Leber insbesondere dann nachzuweisen, wenn auch der Tumor positiv bewertet wurde.

Thema dieser Dissertation war es, den Einfluss von Argpyrimidin und Sirtuin 6 in einem Kollektiv von Patienten mit cholangiozellulären Karzinomen zu analysieren. Hierbei fiel insbesondere in Subgruppenanalysen ein Überlebensvorteil bei Nachweis der beiden Marker auf. Hierbei waren insbesondere intra- und extrahepatische Tumoren von Interesse. Welchen Einfluss diese jedoch auf insbesondere Gallenblasentumoren haben, blieb bei der geringen Fallzahl von 5 offen.

5.2 Argpyrimidin

Argpyrimidin hat bislang nur wenig Aufmerksamkeit in der Krebsforschung erhalten. Vorreiter für die Untersuchung des Auftretens von Argpyrimidin in verschiedenen Krebsektitäten waren Van Heijst et al. und Chiavarina et al., die bislang jedoch sehr unterschiedliche Ergebnisse zum Nachweis von Argpyrimidin in Tumoren festhalten konnten (103, 104). So zeigten das Plattenepithelkarzinom des Larynx und das Adenokarzinom der Mamma einen ausgeprägten Argpyrimidinnachweis, wohingegen der Nachweis in kolorektalen Karzinomen und Leiomyosarkomen eher negativ bis schwach positiv ausfiel. Von Gallengangskarzinomen wurde bislang nicht berichtet (Stand der Literaturrecherche August 2025). Daher gab es im Vorfeld keinen Hinweis, ob es zu einem Nachweis von Argpyrimidin in Gallengangskarzinomen kommen und wie intensiv dieser ausfallen werde. Der wissenschaftliche und hypothesengenerierende Aspekt stand hier im Vordergrund.

Die Auswertung erfolgte auf Basis eines modifizierten **immunreaktiven Scores** nach Remmele und Stegner, wobei die Berechnung in Percent Points (PP) vorgenommen wurde. Der Schwellenwert zur Unterscheidung zwischen negativem und positivem Nachweis wurde bei ≥ 1 PP festgelegt, was eine Abweichung vom originalen Bewertungsschema darstellt. Die Analyse zeigte, dass der überwiegende Anteil der untersuchten Proben entweder negativ oder nur schwach positiv gefärbt war, während lediglich ein geringer Anteil hohe Percent Points aufwies. Insgesamt waren 39,7 % der Präparate als negativ und 60,3 % als positiv zu bewerten. In allen drei untersuchten Lokalisationen überwog der Anteil positiv bewerteter Proben, wobei insbesondere beim intrahepatischen cholangiozellulären Karzinom (eCCC) ein deutlich positiver Befund vorherrschte (69,1 % positiv, 30,9 % negativ).

Chiavarina et al. sowie Van Heijst et al. nutzten ebenfalls einen Maus-**Antikörper**, jedoch in einer Verdünnung von 1:6.000 bzw. 1:10.000 (zum Vergleich im Rahmen dieser Dissertationsarbeit: 1:1.000). Bei einem Verdünnungsverhältnis, das um den Faktor 6 bzw. 10 abweicht,

sind die Ergebnisse also nicht vollständig miteinander zu vergleichen. Ebenfalls wurden nicht dieselben Bewertungsscores genutzt.

Hier schien die Nachweisausprägung von Argpyrimidin im cholangiozellulären Karzinom eher der im kolorektalen Karzinom der Van Heijst-Studie zu ähneln. Bisher (Stand August 2025) wurde Argpyrimidin im hepatozellulären Karzinom nicht erforscht, welches wegen seiner anatomischen Nähe am ehestens Vergleichspunkte hätte aufweisen können. Der Nachweis von Advanced Glycation End Products (AGEs) und Methylglyoxal (MG), einem wichtigen Baustein von Argpyrimidin, sowie die abbauenden Enzymen (GLO-I und GLO-II) im Zusammenhang mit dem HCC wurden jedoch intensiver beleuchtet. Es zeigte sich, dass im Rahmen des Warburg-Effekts mit gesteigerter Glykolyse im Tumorgewebe mehr Methylglyoxal anfällt. Um schädliche MG-Spiegel im Gewebe zu vermindern, greift das Detoxifizierungssystem der beiden Glyoxalase-Enzyme, indem ihre Expression hochreguliert wird (1). Eine Verminderung des Argpyrimidinvorkommens durch verstärktes Wirken von GLO-I und -II und damit dem Abbau des Bausteins Methylglyoxal ist nur anzunehmen, bisher jedoch noch nicht bewiesen. Im Kontrast dazu steht, dass das HCC eine Erkrankung des mittleren bis hohen Alters ist (Durchschnittsalter bei Diagnose: 62 Jahre) (144). Alter und Alterserkrankungen können, wie bereits beschrieben, mit dem vermehrten Auftreten von AGEs einher gehen (siehe Literaturdiskussion).

Ein erhöhter Anteil Argpyrimidin-positiver Präparate fand sich insbesondere bei Patienten im **Alter** von ≥ 65 Jahren (66,1 % vs. 33,9 %, (p (Chi-Quadrat) = 0,08, Tabelle 23), wobei dieser Befund bei Patienten mit extrahepatischen Tumoren besonders ausgeprägt war (81,8 % vs. 18,2 %, (p (Chi-Quadrat) = 0,037, Tabelle 23). Argpyrimidin ist als sogenanntes Advanced Glycation Endproduct (AGE) ein Biomarker für altersassoziierte Prozesse (70), sodass der vermehrte Nachweis bei älteren PatientInnen nicht zu überraschen schien. Ahmed et al. sprachen davon, dass die Entgiftung von Methylglyoxal im Alter abnehme (145). Dadurch erscheint es auch naheliegend, dass mehr Argpyrimidin entstehen kann. Wie bereits aus früheren Arbeiten zu erwarten war (145), konnte bei älteren Patienten (≥ 65 Jahren) in dieser Arbeit tendenziell häufiger ein Argpyrimidinnachweis im Tumor festgestellt werden als bei jüngeren (< 65 Jahren), wobei dieser Zusammenhang in dieser Arbeit knapp statistisch nicht signifikant war (p (Chi-Quadrat-Test) = 0,08, vgl. Tabelle 23). In der Literatur wird Argpyrimidin gelegentlich antioxidatives Potenzial zugeschrieben. So beschreiben Sreejayan et al. (146) entsprechende Effekte im Kontext von AGE-Akkumulation. Gleichzeitig betiteln Hayes et al. die Rolle von Antioxidantien auf die „Progression und die metastatischen Stadien der Tumorentwicklung nach wie vor [als] rätselhaft“ (147).

Auffällig war zudem, dass **kleinere Tumoren** ($< T3$) signifikant häufiger Argpyrimidin-positiv waren (p (Chi-Quadrat) = 0,014, vgl. Tabelle 25). Dieser Zusammenhang war bei den extra-

hepatischen Tumoren noch deutlicher (p (Chi-Quadrat) $< 0,001$, vgl. Tabelle 26). In der analysierten Kohorte korrelierten kleinere Tumoren zudem mit einem günstigeren histopathologischen Grading (vgl. Tabelle 56 im Anhang; p (Chi-Quadrat) $= 0,048$). Interessanterweise zeigte sich jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad des Tumors und dem Nachweis von Argpyrimidin (p (Chi-Quadrat-Test) $= 0,748$, vgl. Tabelle 49). Es kann daher lediglich spekuliert werden, ob bei gering differenzierten Tumoren – möglicherweise infolge veränderter metabolischer Eigenschaften und gestörter Glukoseverwertung – die Fähigkeit zur Bildung bzw. Akkumulation von Argpyrimidin verloren geht. Bislang existieren keine Studien, die den Zusammenhang zwischen Argpyrimidinnachweis, Tumorgroße oder Differenzierungsgrad systematisch untersucht haben.

Van Heist et al. wiesen Argpyrimidin sowohl im **Zytosol** als auch „reichlich im **Nukleus**“ (104) nach, wohingegen es in den Präparaten des hier beschriebenen Kollektivs nur zytosolisch zu finden war. Zudem dokumentierte die o. g. Studie in über der Hälfte der Fälle eine „mäßig bis stark ausgeprägte“ Färbung. Im vorliegenden Kollektiv fiel das Färbeergebnis eher schwach aus und die Anzahl an Präparaten mit niedriger Anzahl an Percent Points überwog. Hierbei ist jedoch erneut auf die geringe Fallzahl der van Heijst-Studie ($n = 20$, davon je fünf Plattenepithelkarzinome des Kehlkopfs, fünf Adenokarzinome der Brust, fünf Adenokarzinome des Dickdarms, fünf Leiomyosarkome) hinzuweisen.

In dieser Arbeit wurde zudem der quantitative Nachweis von Argpyrimidin in der den Tumor umgebenden **Leber** aufgeführt. Im Gesamtkollektiv sowie nach Tumorlokalisation differenziert, zeigte sich in der Mehrzahl der Leberpräparate eine mäßige Färbeintensität (Score 2 auf einer Skala von 0 bis 3). Da in diesem Bereich ausschließlich eine quantitative Auswertung erfolgte, wurde kein immunreaktiver Score (IRS) für die Leberproben berechnet. Bislang wurden keine Studien zum Nachweis von Argpyrimidin in der Leber veröffentlicht.

Hinsichtlich des **Überlebens** schien der Nachweis von Argpyrimidin im Tumor bei extrahepatischen Tumoren (p (Log Rank) $= 0,023$, vgl. Abbildung 31) und bei männlichen Patienten im Gesamtkollektiv (p (Log Rank) $= 0,031$, vgl. Abbildung 32) mit einem längeren Überleben einherzugehen. Patienten mit extrahepatischen Tumoren und Argpyrimidinnachweis zeigten eine Überlebenszeit von 29,5 Monaten im Median (95% KI 17,3-41,8 Monate), wohingegen die mediane Überlebenszeit bei fehlendem Nachweis bei 9,0 Monaten (95% KI 0-19,2) lag. Männliche Patienten, deren Tumoren als positiv klassifiziert wurden, überlebten im Median 24,5 Monate (95% KI 6,6-42,4 Monate), wohingegen jene ohne Argpyrimidinnachweis eine mediane Überlebenszeit von 15 Monaten (95% KI 0-30,3 Monate) aufwiesen. Interessanterweise zeigten Frauen diesen Unterschied nicht. Ein Zusammenhang für ein längeres Überleben bei Männern mit Argpyrimidinnachweis, nicht jedoch bei Frauen, blieb bislang unklar. Hinsichtlich des Nach-

weises von Argpyrimidin im Tumor zeigten Männer und Frauen in etwa die gleiche Nachweis-häufigkeit im Tumor. Auch die Verteilung der Färbeintensität und Fläche des Argpyrimi-dinnachweises, angezeigt durch die Percent Points, unterschied sich nicht signifikant zwischen den Geschlechtern. Zwar konnten verschiedene Studien einen geschlechtsspezifischen Un-terschied im Nachweis von Advanced Glycation End Products (AGE) zeigen (148) (149), doch bisher hat sich keine Forschungsgruppe mit geschlechtsspezifischen Unterschieden in der Überlebenszeit beschäftigt – insbesondere im Zusammenhang mit Argpyrimidin und Krebser-krankungen. Interessanterweise war im Gesamtkollektiv das Überleben bei PatientInnen unter 65 Jahren signifikant verlängert, wenn ein Argpyrimidinnachweis im Tumor vorlag: Die medi-ane Überlebenszeit betrug in dieser Gruppe 39,2 Monate (95 % KI: 19,2–59,1 Monate) im Ver-gleich zu 23,4 Monaten (95 % KI: 8,2–38,7 Monate) bei Argpyrimidin-negativen Tumoren (p (Log Rank) = 0,032, vgl. Abbildung 33).

Ein möglicher Erklärungsansatz für eine Überlebenszeitverlängerung kann einerseits in der Apoptosewirkung gesucht werden. In mehreren Studien konnte ein Zusammenhang zwischen Argpyrimidin-Akkumulation und gesteigerter Apoptoseaktivität gezeigt werden (150) (151). So demonstrierten Kim et al. (150), dass die Ansammlung von Argpyrimidin in den Linsen diabe-tischer Mäuse sowohl in vitro als auch in vivo mit einer erhöhten Apoptoserate assoziiert war. Dieser Effekt wurde durch eine Argpyrimidin-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B vermittelt, welcher wiederum die Expression apoptosefördernder Gene reguliert. Er-gänzend konnte in einer Studie von Kang et al. gezeigt werden, dass endogenes Methylglyo-xal, dem Hauptbaustein für Argpyrimidin, in Leukämiezellen durch die Bildung von MG-DNA-Addukten ein Zellzyklusarrest in der G1-Phase sowie Apoptose induzierte (62). Ebenso führte die experimentelle Inhibition von GLO-I in einer Arbeit von Thornalley et al. zur Akkumulation von Methylglyoxal und konsekutiv zur Induktion apoptotischer Signalwege (152). Zu ähnlichen Ergebnissen kam das Studienteam um Jeong insbesondere hinsichtlich eins vermehrten Auf-tretens von Zellen in der G1-Phase. Zudem berichteten sie von einer Aktivierung von NF- κ B, welches zufolge weiterer Studien die Expression pro-apoptotischer Gene bewirkt (151) (153). Auch andere Studien belegen die Apoptose-induzierende Wirkung von Methylglyoxal. Seo et al. (154) zeigten in Hepatozyten, dass MG durch eine Erhöhung reaktiver Sauerstoffspezies und gleichzeitige Reduktion intrazellulärer Glutathionkonzentrationen Apoptose auslösen kann. Darüber hinaus kam es zu strukturellen Schädigungen der Mitochondrien (insbesondere eine gesteigerte Permeabilität), was zusätzlich zur Aktivierung des Zelltods beitrug. Der An-stieg von Methylglyoxal ging interessanterweise in dieser Studie mit erhöhten Leberenzym-werten (GOT/AST und GPT/ALT) einher. In dieser Dissertationsarbeit konnte kein Zusammen-hang zwischen Argpyrimidinnachweis und Transaminasenerhöhung hergestellt werden und Methylglyoxal war nicht Bestandteil dieser Forschung.

Andererseits soll hier auch nochmal auf die zellulären und Zellstoffwechsel-abhängigen Prozesse hingewiesen werden. Argpyrimidin entsteht durch die nicht-enzymatische Reaktion von Methylglyoxal (MG) mit Argininresten in Proteinen. Im Kontext der Tumorbilogie rückten daher auch die Enzyme der Methylglyoxal-Detoxifikation, Glyoxalase 1 und 2 (GLO-I und GLO-II), in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen. Eine Studie von Kreytzy et al. zeigte, dass PatientInnen mit oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen, insbesondere bei nukleärer Expression von GLO-I, ein signifikant verkürztes Überleben aufwiesen (155). Die Autoren führten dies sowohl auf die Beteiligung von GLO-I an Tumorentstehung und -progression als auch auf dessen mögliche Rolle bei der Förderung invasiven Wachstums und der Metastasierung zurück. Auch im Prostatakarzinom wurde GLO-I mit der Tumorprogression in Verbindung gebracht (156). Bair et al. (140) zeigten, dass die pharmakologische Hemmung von GLO-I in malignen Melanomzellen zu einer Akkumulation von Methylglyoxal führte, was wiederum einen Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und damit oxidativen Stress mit zytotoxischer Wirkung auslöste. Vermehrt anfallendes Methylglyoxal ging insbesondere mit Argpyrimidinbildung im Heat-Shock-Protein 27 (HSP27) einher, was zu einer schlechteren Prognose (157) und Therapieresistenz gegenüber Chemotherapeutika (158) führte. Dies konnte auf die verstärkte anti-apoptotische Wirkung von HSP27 nach Modifikation durch Methylglyoxal zurückgeführt werden (159). Sakamoto et al. zeigten, dass Wildtyp-HSP27 in verschiedenen Tumorzelllinien (Lungen-, Nieren- und Prostatakarzinom sowie Leukämiezellen) Komplexe in einer Größe zwischen 50 und 650 kDa bildet, während methylglyoxalmodifiziertes HSP27 überwiegend als große Oligomere von bis zu 800 kDa vorlag (100). Das Auftreten von überwiegend großen oligomeren Strukturen behinderte die Cytochrom-c-induzierte Caspase-Aktivierung und hemmte so die Apoptose (100) (160). Interessanterweise resultierte die gezielte Hemmung der MG-bedingten HSP27-Modifikation in einer gesteigerten Sensitivität gegenüber Topoisomerase-Inhibitoren (in diesem Fall Etoposid und Camptothecin) (100).

Zusammengefasst gibt es wenig Studienmaterial hinsichtlich der direkten Apoptosewirkung von Argpyrimidin und die Studienlage zu Methylglyoxal und seinen abbauenden Enzymen GLO-I und -II zeigten sich bislang uneinig. Vielmehr ist davon auszugehen, dass es durch oxidativen Stress dosisabhängig zu einer Aktivierung von Überlebensmechanismen sowie Zellproliferation und bei hohen Konzentrationen zur Aktivierung von Apoptose kommt (161) (139) (162). Zudem bedarf es noch reichlich Studien zum Thema Argpyrimidin in Tumoren, um seine Rolle im Krebs zu verstehen.

5.3 Sirtuin 6

Im Vergleich zu Argpyrimidin zeigte Sirtuin 6 (SIRT6) einen stärkeren Färbenachweis. Der Cut-off-Wert zur Unterscheidung zwischen negativer und positiver Färbung wurde hierbei – in gleicher Scoreverwendung – bei 3 gesetzt. Es erfolgte ebenfalls eine Anpassung des originalen Immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegner, die ihren Cut-off bei 2 setzten.

Im Hinblick auf potenzielle **Risikofaktoren** wie Alter und Nikotinkonsum zeigte sich, dass 61,7 % der Patienten im Alter von ≥ 65 Jahren einen positiven Tumor aufwiesen (p (Chi-Quadrat) = 0,084, vgl. Tabelle 30), ebenso wie 78,3 % der Raucher (p (Chi-Quadrat) = 0,026, vgl. Tabelle 31). Letzterer Befund war statistisch signifikant. Bei isolierter Betrachtung intrahepatischer Cholangiokarzinome verstärkte sich der Verdacht auf einen altersassoziierten Zusammenhang mit der Sirtuin 6-Expression (p (Chi-Quadrat) = 0,053, vgl. Tabelle 32). Sirtuin 6 ist ein bekanntes Regulatorprotein im Kontext der zellulären Seneszenz (113). Ob ältere Patienten unabhängig vom Tumorwachstum eine erhöhte Expression von Sirtuin 6 im Gallengangsepithel aufweisen, konnte im Rahmen dieser Untersuchung nicht abschließend geklärt werden, da keine gesunde Referenzproben hinsichtlich des Alters bewertet wurden. Mehrere Studien zeigten im Gegensatz zu dieser Hypothese eine abnehmende Sirtuin-6-Expression mit steigendem Alter (163), (164), (165).

Bezüglich des **Tumorstadiums** und der **Differenzierung** ergab sich kein signifikanter Zusammenhang mit dem Alter der Patient. Dies galt sowohl im Gesamtkollektiv als auch bei alleiniger Betrachtung intrahepatischer Karzinome.

Ein auffälliges Merkmal der Sirtuin 6-Immunhistochemie war die variable **zelluläre Lokalisation** des Proteins: Während einige Präparate eine primär nukleäre Färbung zeigten, war in anderen überwiegend eine zytoplasmatische Verteilung erkennbar. Teilweise zeigte sich auch eine intraindividuelle Inhomogenität innerhalb des Tumorgewebes. Für die quantitative Bewertung wurde daher jeweils die überwiegende Färbelokalisation berücksichtigt. Beispielhaft wurde bei einem Anteil von 15 % Zytoplasmafärbung und 60 % Kernfärbung ausschließlich der dominante Kernfärbungsanteil (60 %) zur Berechnung des IRS herangezogen. Auf die Lokalisation des Sirtuin 6-Nachweises wird im Folgenden noch eingegangen. Hinsichtlich des **Sirtuin 6-Nachweises im Tumor** zeigt die bisherige Forschung Folgendes: Jing et al. fassten in einer Metaanalyse zusammen, dass die Expression von Sirtuin 6 im nicht-tumorösen Gewebe höher war als im Tumorgewebe; dies galt für kolorektale und nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (166). In einer Studie von Huang et al. zum Ösophaguskarzinom sah man eine Überexpression von Sirtuin 6 im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe und diese Überexpression korrelierte mit Geschlecht, der Tumorpathologie, dem Lymphknotenstatus und der Zelldifferenzierung (167). Kugel et al. zeigten, dass die Inaktivierung von

Sirtuin 6 im Pankreaskarzinom mit einem beschleunigten Metastasierungsverhalten einhergehend (168), anders als im HCC: hier zeigte sich die Überexpression im engen Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad, der Tumorgroße, der Gefäßinvasion und einer kürzeren Überlebenszeit (134). In der vorliegenden Studie korrelierte der Nachweis von Sirtuin 6 im Tumor nicht mit dem TNM-Stadium oder dem UICC-Stadium sowie dem histopathologischen Grading (p (Chi-Quadrat) 0,469; 0,771; 1; 0,261 0,524, vgl. Tabelle 51).

Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem **Serumalbuminspiegel** und Sirtuin-6 im Tumor festgestellt werden: 70,4 % der PatientInnen mit normwertigem Albumin wiesen einen Sirtuin-6-positiven Tumor auf (p (Chi-Quadrat) = 0,013, vgl. Tabelle 33). Ob dieser Befund auf eine erhaltene hepatische Syntheseleistung und damit indirekt auf eine bessere Leberfunktion zurückzuführen ist – etwa infolge des Fehlens von Komorbiditäten wie Steatosis hepatis, Leberfibrose oder Lebermetastasen – bleibt spekulativ. Eine histologische Bewertung des Leberparenchyms hinsichtlich lebereigener Erkrankungen (wie z. B. Fibrose, Zirrhose, Steatosis hepatis) erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nur eingeschränkt, stellt jedoch einen relevanten Ansatzpunkt für zukünftige Untersuchungen dar. Studien wiesen darauf hin, dass Sirtuin 6 regelhaft im gesunden Lebergewebe zu finden ist und dort sogar vor der Entwicklung einer Leberfibrose schützen kann (169) (4). Ebenso sprachen Marquart et al. davon, dass der Verlust von Sirtuin 6 zur Entwicklung von hepatozellulären Karzinomen führen könne (4). Dagegen hielten Song et al. mit der Annahme, dass die Hemmung von Sirtuin 6 im HCC zu einer Verminderung der Malignität führe (170).

In den Lebergewebeanteilen der untersuchten Präparate wurde Sirtuin 6 in etwa der Hälfte der Fälle nachgewiesen: 51,9 % der Leberproben wurden als Sirtuin 6-negativ, 48,1 % als positiv klassifiziert. Diese Verteilung blieb auch bei Unterteilung nach Tumorlokalisation (z. B. intra- vs. extrahepatisch) weitgehend konstant. Der Sirtuin 6-Nachweis im Tumor korrelierte statistisch signifikant mit dem Nachweis in angrenzendem Lebergewebe (Chi-Quadrat-Test, $p < 0,001$). Beauharnois et al. beschrieben die Leber als ein zentrales Organ für die Expression von Sirtuin 6 (171). Dass in der vorliegenden Untersuchung dennoch über die Hälfte der Leberpräparate als negativ bewertet wurden, könnte auf methodische Limitationen zurückzuführen sein – insbesondere auf den Umstand, dass häufig nur kleine Leberanteile erfasst wurden. Es bleibt offen, ob in weiter vom Tumor entfernten Leberarealen ein Nachweis häufiger gelungen wäre oder ob das Tumorwachstum Einfluss auf den fehlenden Nachweis von **SIRT6 in der Leber** hatte. Im analysierten Kollektiv ließ sich jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Nachweis (bzw. dem Fehlen) von SIRT6 in der Leber und dem Tumorstadium, TNM-Stadium oder dem Differenzierungsgrad des Tumors feststellen. Der Nachweis von SIRT6 im angrenzenden Lebergewebe zeigte ebenfalls keinen altersabhängigen Unterschied (p (Chi-Quadrat) = 1, vgl. Tabelle 57).

Sirtuin 6 wurde in verschiedenen Studien als ein zentraler Schutzfaktor gegenüber Steatosis

hepatitis und Leberfibrose identifiziert (172) (169) (173). Die potenziellen Auswirkungen solcher Lebererkrankungen auf die Entstehung und Prognose von Gallengangskarzinomen stellen einen interessanten Ansatzpunkt für zukünftige Untersuchungen dar, waren jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Wie auch bei Argpyrimidin nutzte jede Studie andere Antikörperkonzentrationen, was eine **Vergleichbarkeit**, ebenso wie die Verwendung anderer Scores, deutlich erschwert. Azuma et al. nutzen beispielsweise eine Antikörperverdünnung von 1:200 (174), wohingegen Balestrieri eine Antikörperverdünnung von 1:500 nutzen (175).

Bei Patienten mit extrahepatischem Cholangiokarzinom (eCCC) war ein Nachweis von Sirtuin 6 im Tumorgewebe mit einem signifikant verlängerten **Gesamtüberleben** assoziiert. Das mediane Überleben lag in der Sirtuin-6-positiven Gruppe bei 34,1 Monaten (95 %-Konfidenzintervall (KI): 19,4–48,9 Monate) gegenüber 9,2 Monaten (95 %-KI: 4,3–14,2 Monate) bei Patienten mit negativen Tumoren (p (Log Rank) = 0,01, vgl. Abbildung 36).

Im Gesamtkollektiv hingegen ließ sich kein signifikanter Überlebensvorteil im Zusammenhang mit dem Nachweis von Sirtuin 6 im Tumorgewebe feststellen. Dieser Befund steht im Widerspruch zu einer 2020 publizierten Metaanalyse von Shi et al. (176), welche bei PatientInnen mit gastrointestinalen Tumoren (einschließlich kolorektalem Karzinom, Magenkarzinom, Pankreaskarzinom und hepatozellulärem Karzinom) eine Assoziation zwischen Sirtuin-6-Expression und verbessertem Gesamtüberleben zeigte. Gallengangskarzinome wurden in dieser Metaanalyse jedoch nicht berücksichtigt. Darüber hinaus sah man dort einen Zusammenhang zwischen Sirtuin 6 und einem niedrigeren Tumorstadium. Gleichzeitig wiesen Studien auch auf eine stadienabhängige Wirkung von Sirtuin 6 hin. So berichten Min et al. sowie Wu et al. über eine differenzielle Funktion von SIRT6 in Abhängigkeit vom Tumorstadium, unter anderem bei Urothelkarzinomen der Harnblase (128). Im vorliegenden Kollektiv ließ sich jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Sirtuin-6-Expression und klinisch-pathologischen Tumorparametern wie Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Fernmetastasierung oder UICC-Stadium nachweisen (p (Chi-Quadrat) = 0,469; 0,771; 1,000; 0,261).

In einer Studie von Han et al. war die Hochregulation von Sirtuin 6 im HCC mit einem schlechteren Gesamtüberleben, schlechterem krankheitsfreien Überleben sowie einer schlechteren Metastasierungsrate verbunden (177). Ebenso identifizierten Ran et al. Sirtuin 6 als Onkogen für das HCC (134) und Song et al. beobachteten eine Verminderung der Malignität im HCC, wenn man Sirtuin 6 hemmte (170). Wu et al. beleuchteten in einer Metaanalyse die Rolle von Sirtuin 6 in verschiedenen soliden Tumoren und fassten ihre Ergebnisse wie folgt zusammen: „geringe SIRT6-Expression könnte als potenzieller Biomarker für verbesserte Überlebenschancen bei Patienten mit einer Vielzahl solider Tumoren dienen“. Dies galt jedoch nicht für gastrointestinale Tumoren (Magen- und Kolonkarzinome), bei denen der Nachweis geringer

Sirtuin-6-Expression mit einem schlechteren Gesamtüberleben korrelierte (178). Auch eine weitere Metaanalyse bestätigte das schlechtere Gesamtüberleben bei Leberzellkarzinomen, Osteosarkomen und nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (166). Gallengangskarzinome waren in beiden Metaanalysen nicht eingeschlossen.

Besonders bemerkenswert war der Befund bei weiblichen Patientinnen mit erhöhten Transaminasenwerten (GOT/AST und GPT/ALT > 35 U/l): In dieser Subgruppe war ein Sirtuin-6-Nachweis im Tumor signifikant mit einem verlängerten Überleben assoziiert. So zeigten Frauen mit erhöhter GOT und positiven Tumoren ein medianes Überleben von 20,4 Monaten (95 %-KI: 10,9–29,9 Monate) gegenüber 9,7 Monaten (95 %-KI: 2,0–17,4 Monate) in der negativen Gruppe (p (Log Rank) = 0,004, vgl. Abbildung 38). Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei erhöhter GPT (p (Log Rank) = 0,001, Abbildung 40). Erhöhte Leberenzyme können als Indikator für eine eingeschränkte Leberfunktion, z. B. durch hepatische Metastasierung oder Leberzelluntergang, interpretiert werden. Unabhängig vom Geschlecht korrelierte der Sirtuin-6-Nachweis nicht mit dem Differenzierungsgrad des Tumors als Hinweis auf seine Aggressivität. Woher also der scheinbar protektive Charakter von Sirtuin 6 im Fall von weiblichen Patientinnen mit erhöhten Transaminasen rührt, bleibt weiterhin offen. Die bereits oben genannte Studie von Zhao et al. im Hinblick auf den abnehmenden Sirtuin-6-Nachweis im Alter beleuchtete zudem die geschlechtsspezifischen Unterschiede: hier zeigte sich, dass Frauen im jungen und mittleren Alter höhere Sirtuin-6-Spiegel aufwiesen als Männer in derselben Altersgruppe. Zudem schien es bei Männern zu einem kontinuierlichen Abfall von Sirtuin 6 zu kommen, wohingegen bei Frauen dieser Abfall erst im höheren Alter auftrat (165). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Sirtuin 6 einen negativen Einfluss auf den Insulinstoffwechsel in ausschließlich weiblichen Mäusen hatte und dass dieser Zusammenhang darin beruhte, dass Sirtuin 6 den Östrogenrezeptor Era herunterreguliert. Nach seiner Aktivierung fördert Era die Insulinsynthese (179).

Auch im Zusammenhang mit dem Bilirubin- und CA 19-9-Spiegel zeigten sich relevante Unterschiede: Patienten mit erhöhtem Bilirubin und gleichzeitig negativem SIRT6-Status im Tumor wiesen die kürzesten Überlebenszeiten auf. Innerhalb der Subgruppe mit erhöhter Bilirubinkonzentration war ein Sirtuin-6-Nachweis im Tumor mit einem signifikant verlängerten Überleben assoziiert (p (Log Rank) = 0,01; vgl. Abbildung 41, Abbildung 42, Abbildung 43). Im Mausmodell zeigten Hao et al., dass Sirtuin 6 einen protektiven Faktor bei Cholestase (unter anderem angezeigt durch eine Bilirubinerhöhung) darstellt (180). Gleiches galt für PatientInnen mit erhöhtem CA 19-9: Auch hier war ein fehlender SIRT6-Nachweis mit einem signifikant ungünstigeren Verlauf verbunden, während PatientInnen mit Sirtuin-6-positiven Tumoren ein signifikant längeres Überleben zeigten (p (Log Rank) < 0,001, vgl. Abbildung 44, Abbildung 45, Abbildung 46). Erhöhte Bilirubin- und CA 19-9-Spiegel sind Indikatoren für eine Cholestase,

die im Kontext des Gallengangskarzinoms typischerweise durch tumorbedingte Abflussbehinderungen verursacht wird (181). Das damit assoziierte schlechtere Überleben von Patienten mit erhöhten Werten erscheint plausibel, da erhöhte Cholestasemarkers mit Cholestase durch größere Tumorlast und fortgeschrittenem Krankheitsstadium einhergehen können.

Obwohl Sirtuin 6 nicht mit klassischen Prognoseparametern wie Tumorstadium oder Differenzierungsgrad korrelierte, deutet sich in bestimmten Subgruppen – insbesondere bei Patientinnen mit Laborparametern, die auf eine eingeschränkte Leberfunktion hinweisen – ein möglicher protektiver Einfluss von SIRT6 an. Die biologischen Mechanismen, die diesem Zusammenhang zugrunde liegen, sind bislang unklar und bedürfen weiterführender Analysen. Vor diesem Hintergrund könnte die beobachtete Assoziation zwischen einer Sirtuin-6-Positivität und einem verlängerten Überleben auf **tumorsuppressive Eigenschaften** von SIRT6 zurückgeführt werden. Studien deuten auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen Sirtuin-6-Aktivität und der Regulation der Apoptose hin (182). Besonders hervorzuheben ist die Interaktion zwischen Sirtuin 6 und dem Anti-Apoptose-Protein Survivin: SIRT6 unterdrückt dessen Expression durch Deacetylierung am Promotor von BIRC5 (Survivin) sowie durch Hemmung der NF- κ B-Bindung an ebendiesen Promotor über Deacetylierung des Histon-3-Lysin-9-Rests (H3K9) (127).

Darüber hinaus wurde SIRT6 in Melanomzellen positiv mit dem Tumorsuppressor Forkhead-Box-Protein O3 (FoxO3a) korreliert, einem bekannten Regulator pro-apoptotischer Signalwege. FoxO3a hemmt unter anderem die aerobe Glykolyse durch Suppression glykolyseassoziierter Gene (183) (116), was möglicherweise zu einer metabolischen Reprogrammierung in Richtung Apoptose führen kann. Marquart et al. (4) zeigten außerdem, dass eine erhöhte Sirtuin-6-Expression zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika wie Doxorubicin und Daunorubicin führte – vermutlich vermittelt über verstärkte Apoptoseinduktion.

Ein weiterer tumorsuppressiver Mechanismus von Sirtuin 6 liegt in der Inhibition des **Warburg-Effekts**. Dieser Effekt beschreibt die bevorzugte Nutzung der anaeroben Glykolyse trotz ausreichender Sauerstoffverfügbarkeit in Tumorzellen. Sirtuin 6 hemmt diesen Prozess durch Suppression des hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1 α) (182). Es wäre daher naheliegend, dass SIRT6-positive Tumoren eine reduzierte glykolytische Aktivität aufweisen. Obgleich in der vorliegenden Arbeit keine direkte Messung der Tumorstoffwechselaktivität erfolgte, wurde neben Sirtuin 6 mit Argpyrimidin ein Marker untersucht, der potenziell als Surrogatparameter für eine veränderte Glukoseverwertung im Sinne verstärkter Glykolyse dienen kann. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von SIRT6 und Argpyrimidin konnte jedoch nicht festgestellt werden (p (Chi-Quadrat) = 0,279, vgl. Tabelle 37).

Im Vergleich zu den soeben beschriebenen Studien über die pro-apoptotische und tumorsuppressive Wirkung von Sirtuin 6 zeigen immer mehr Studien jedoch, dass es zudem eine **onkogene Funktion** besitzt. Dies wurde für mehrere Tumorentitäten bestätigt, insbesondere für das hepatozelluläre Karzinom (HCC). Hier war der Nachweis von SIRT6 mit einem fortgeschrittenem Tumorstadium und einer höheren Metastasierungsrate assoziiert. Han et al. fanden heraus, dass Sirtuin 6 die Migration, Invasion und epithelial-mesenchymale Transition (EMT) von HCC-Zellen förderte. Dies schien in engem Zusammenhang mit der Deacetylierung von Beclin-1, einem wichtigen Protein der Autophagie, zu stehen. Anders als die im Melanom nachgewiesene tumorsuppressive Funktion von FoxO3a, führte die Deacetylierung von FoxO3a durch Sirtuin 6 im HCC zu einer verstärkten Expression von N-Cadherin und Vimentin. Beides sind Proteine, die der Zelladhäsion und -migration und somit auch der EMT dienen (177). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Ran et al.: diese stellten jedoch das BCL2-assoziiertes X-Protein (Bax) als zentrales Protein heraus, dessen Promotor von SIRT6 deacetyliert wird und so die Apoptose verhindert. Zudem erschwert die Deacetylierung des Bax-Promotors die Zugänglichkeit des Tumorsuppressors p53 am Promotor und vermindert so seine Funktion als Regulator der Apoptose (134). Auch Tao et al. sahen Bax als zentrales Element für die tumorigene Wirkung von SIRT im HCC. Interessanterweise stellten sie fest, dass SIRT6 auch im Zytosol nachgewiesen werden konnte und dort mit Ku70 interagierte, einem Protein mit zentraler Bedeutung für die DNA-Reparatur im Rahmen der nicht-homologen Endverknüpfungsweg (NHEJ). Sie vermuteten, dass ein durch Sirtuin 6 deacetyliertes Ku70-Protein an Bax binde, welches dann seine Rolle in der Apoptose durch Blockierung der mitochondrialen Translokation nicht mehr erfüllen könne (184). Sirtuin 6 wurde in dieser Dissertationsarbeit sowohl im Nukleus als auch im Zytosol nachgewiesen. Intra- und extrahepatische Tumoren unterschieden sich im Hinblick auf den überwiegenden Ort in der Zelle, an dem Sirtuin 6 nachgewiesen werden konnte. Bei extrahepatischen Karzinomen war Sirtuin 6 vorwiegend im Zytosol, bei intrahepatischen CCC eher im Nukleus zu detektieren (p (Chi-Quadrat) $< 0,001$, vgl. Tabelle 21). Dazu gingen größere (T3+4) sowie Lymphknoten-metastasierte Tumoren mit einem vermehrten Sirtuin-6-Nachweis im Zytosol einher (p (Chi-Quadrat) = 0,013 und 0,039, vgl. Tabelle 34). Dieses Ergebnis passt zu den Forschungen, die SIRT6 eine onkogene Rolle zusprechen. Man konnte jedoch nicht feststellen, dass eine der beiden Tumorlokalisationen (iCCC und eCCC) tendenziell schlechter differenziert war, ebenso ging der Nachweis auch nicht mit einer schlechteren oder besseren Differenzierung einher. Daher schien die Beobachtung von Tao et al. interessant und ein Unterschied im Überleben war zu erwarten. Im vorliegenden Kollektiv sah man jedoch keinen Überlebensunterschied hinsichtlich des vorwiegenden Nachweisortes von Sirtuin 6 innerhalb der Zelle (p (Log Rank) = 0,447, vgl. Abbildung 55). Azuma et al. konnten nachweisen, dass Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom und

reichlich zytoplasmatischem und geringem nukleären Nachweis nicht nur aggressivere Tumoren zeigten, sondern auch ein kürzeres Gesamtüberleben und ein kürzeres progressionsfreies Überleben aufwiesen (174).

Abschließend fassten Teixeira et al. die Rolle von SIRT6 passend zusammen: „je nach Zell- und Tumortyp führt die Überexpression oder das Ausschalten von SIRT6 zu unterschiedlichen biologischen Reaktionen als Tumorsuppressor oder -promotor. Daher könnte die Hemmung oder Aktivierung von SIRT6 je nach den biologischen Wirkmechanismen in den einzelnen Tumoren von therapeutischem Wert sein.“ (123). Es lässt sich im Vorfeld nicht hervorsehen, welche Funktion SIRT6 in den einzelnen Tumorentitäten einnimmt. Diese Erkenntnis macht neugierig auf weitere Forschungen jeder einzelnen Tumorentität.

5.4 Kritik

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen einer Dissertation angefertigt. Insgesamt ist ein Kollektiv aus knapp 250 Patienten mit CCC eine recht große Gruppe, die insbesondere die Aussagekraft von Subgruppenanalysen ermöglicht. Im Rahmen von größer angelegten Studien mit mehr Personalkraft und Fördermitteln könnten dennoch in Zukunft ausgeweitete Studien mit qualifizierten Wissenschaftlern (Pathologen, Biologen, Ärzte, etc.) und anschließendem Einschluss in Metaanalysen erfolgen.

Im Rahmen der immunhistochemischen Färbungen auf Argpyrimidin wurde der Leberanteil innerhalb der Präparate nicht qualitativ bewertet. Eine solche Bewertung erscheint jedoch aus mehreren Gründen nur eingeschränkt sinnvoll: zum einen lässt sich anhand des untersuchten Schnittpräparats nicht zuverlässig abschätzen, in welchem Verhältnis die dargestellte Leberfläche zur Gesamtleber steht. Zum anderen ist unklar, ob das Lebergewebe in unmittelbarer Tumornähe immunhistochemisch mit dem peripher gelegenen, tumorfernen Lebergewebe vergleichbar ist. Eine Klärung dieser Fragestellung wäre nur durch zusätzliche Biopsien gesunder Leberabschnitte möglich – ein Vorgehen, das unter ethischen Gesichtspunkten im Rahmen einer nicht-therapeutischen Studie kaum vertretbar wäre. Gleiches gilt dementsprechend für die auf Sirtuin-6-gefärbten Präparate, sodass sich hieraus nur eingeschränkte Aussagen ableiten lassen.

Referenzfärbungen wurden nicht im gesunden Gallengangs- und Lebergewebe angefertigt, sondern an Präparaten aus dem Ösophagus und der Mamma bzw. Ösophagus und Magen. Wie sich beide immunhistochemischen Marker also im Gallengangs- und Lebergewebe, welches nicht durch die Tumorerkrankung beeinflusst ist, verhält, blieb offen.

Bisher gibt es für beide Marker keine Standardisierung und Scoring zur Vergleichbarkeit von Studien untereinander. Auch hier konnte man feststellen, dass jede Studie ihre individuellen Färbeprotokolle nutzt und sich nicht auf dieselbe Scoringmethode bezog.

Letztlich konnten wir durch diese Studie nicht zeigen, wie sich der Nachweis von SIRT6 und Argpyrimidin hinsichtlich der Therapie verhält oder ob der Nachweis der Marker das Therapieansprechen beeinflusst. Dem vorliegenden Kollektiv mit Erstdiagnosen aus dem Zeitraum von 1998 bis 2015 konnten keine große Therapieoptionen angeboten werden. Es belief sich vielmehr auf eine operative Resektion und/oder Chemotherapie. Dies könnte sich in Zukunft stark ändern. Durch die in den letzten zwei Jahren immens erweiterten personalisierten Therapieoptionen (MSI, IDH, Her2, FGFR, uvm.) im fortgeschrittenen Stadium mit Durvalumab/Pembrolizumab, Ivosidenib, Trastuzumab, Pemigatinib/Futibatinib, etc. könnte auch die stoffwechselbedingte Tumorprogression in den Vordergrund der Forschung gelangen. Der Einfluss von insbesondere SIRT6 auf den Tumorstoffwechsel erschien besonders interessant, da die Auswirkungen je nach Tumorentität bislang sehr unterschiedlich ausgefallen sind. Hierzu lohnt sich weitere Forschung, die den Tumormetabolismus von cholangiozellulären Karzinomen im Hinblick auf die Rolle von SIRT6 beleuchtet.

Argpyrimidin und Sirtuin 6 könnten sich als prognostisch interessante Marker anbieten, um nach primärer Therapie durch eine Operation und anschließender histopathologischen Aufarbeitung des Tumors Hinweise auf die Prognose zu erlangen. Ebenso könnten sich in Zukunft neue zielgerichtete Therapien mit Argpyrimidin und Sirtuin 6 als Target entwickeln.

Insgesamt bedarf es also noch weitere, ausführlichere Studien, um Argpyrimidin und Sirtuin 6 in Gallengangskarzinomen besser zu verstehen.

6 Zusammenfassung

Das cholangiozelluläre Karzinom (CCC) stellt nach dem hepatozellulären Karzinom (HCC) die zweithäufigste Form primärer maligner Lebertumoren dar. Die schlechte Überlebensrate macht daher deutlich, dass strategische und effektive Therapien zur Behandlung entwickelt werden müssen.

Ziel dieser Dissertation war es, 245 Tumorproben von CCC-Patienten immunhistochemisch auf Argpyrimidin und Sirtuin 6 zu untersuchen und deren Einfluss auf patienten- oder tumorspezifische Merkmale sowie das Überleben zu analysieren.

Argpyrimidin, ein Advanced Glycation Endproduct (AGE), hat in der Krebsforschung bislang wenig Aufmerksamkeit erhalten. Es zeigte sich vermehrt bei Patienten ≥ 65 Jahren und in kleineren Tumoren (p (Chi-Quadrat) = 0,08 und 0,014), ohne, dass Argpyrimidin mit dem Differenzierungsgrad korreliert. Außerdem konnte Argpyrimidin auch in der den Tumor umgebenden Leber nachweisen werden.

In Subgruppen war ein positiver Nachweis mit einem verlängerten Gesamtüberleben assoziiert: bei Patienten mit extrahepatischen Tumoren (p (Log Rank) = 0,023), bei männlichen Patienten (p (Log Rank) = 0,031) und bei Patienten jünger als 65 Jahre (p (Log Rank) = 0,032). Frühere Studien beschrieben eine proapoptotische Wirkung durch Aktivierung von NF- κ B, wohingegen Argpyrimidin durch Akkumulation in Heat Shock Protein 27 auch apoptosehemmend wirken und mit einer schlechteren Prognose und Chemotherapeutikaresistenz assoziiert werden kann.

Es bedarf noch reichlich Forschung zum Thema Argpyrimidin, um seine Rolle im Krebs zu verstehen.

Bei Sirtuin 6 ist eine Deacetylasen und wurde in dieser Arbeit bevorzugt bei Rauchern (p (Chi-Quadrat) = 0,026) und bei älteren Patienten (≥ 65 Jahre), insbesondere mit intrahepatischen Tumoren (p (Chi-Quadrat) = 0,053) gefunden.

Auffällig in dieser Kohorte war zudem die variable zelluläre Lokalisation des Proteins: es überwog der zytosolische Nachweis bei extrahepatischen und der nukleäre Nachweis bei intrahepatischen Karzinomen, teils mit intraindividuellem Inhomogenität.

Frühere Studien zeigten widersprüchliche Ergebnisse zur Rolle von Sirtuin 6 mit sowohl pro- als auch anti-apoptotischen Eigenschaften. In dieser Arbeit ließ sich keine Korrelation zur Tumorgroße, Lymphknoten- und Fernmetastasenstatus, UICC-Stadium oder Differenzierungsgrad herstellen.

In bisherigen Studien wurde Sirtuin 6 eine protektive Rolle in der Entwicklung von Leberfibrose und Steatosis hepatis zugeschrieben. In dieser Kohorte korrelierte der Nachweis von Sirtuin 6 im Tumor mit dem Nachweis im angrenzenden Lebegewebe.

Beim extrahepatischem CCC war Sirtuin 6 mit einem verlängertem Gesamtüberleben assoziiert (p (Log Rank) = 0,01). Und auch in bestimmten Subgruppen – z. B. bei weiblichen Patientinnen mit erhöhten Transaminasen (p (Log Rank) = 0,004 für GOT und 0,001 für GPT) oder im Gesamtkollektiv mit erhöhtem Bilirubin- oder CA-19-9-Spiegeln (p (Log Rank) = 0,01 und $< 0,001$) – zeigte sich ein Überlebensvorteil bei Nachweis von Sirtuin 6.

Bisherige Daten beleuchteten sowohl als pro- aber auch als anti-apoptotischer Eigenschaften von Sirtuin 6, was darauf hindeutet, dass Sirtuin 6 kontextabhängig untersucht und verstanden werden muss.

7 Literaturverzeichnis

1. 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.
2. Aishima S, Fujita N, Mano Y, Kubo Y, Tanaka Y, Taketomi A, et al. Different roles of S100P overexpression in intrahepatic cholangiocarcinoma: carcinogenesis of perihilar type and aggressive behavior of peripheral type. *Am J Surg Pathol.* 2011;35(4):590-8.
3. Chalkiadaki A, Guarente L. The multifaceted functions of sirtuins in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(10):608-24.
4. Marquardt JU, Fischer K, Baus K, Kashyap A, Ma S, Krupp M, et al. Sirtuin-6-dependent genetic and epigenetic alterations are associated with poor clinical outcome in hepatocellular carcinoma patients. *Hepatology.* 2013;58(3):1054-64.
5. Bauer I, Grozio A, Lasigliè D, Basile G, Sturla L, Magnone M, et al. The NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT6 promotes cytokine production and migration in pancreatic cancer cells by regulating Ca²⁺ responses. *J Biol Chem.* 2012;287(49):40924-37.
6. Khongkow M, Olmos Y, Gong C, Gomes AR, Monteiro LJ, Yagüe E, et al. SIRT6 modulates paclitaxel and epirubicin resistance and survival in breast cancer. *Carcinogenesis.* 2013;34(7):1476-86.
7. G. Lurje WS, U. P. Neumann, J. Bednarsch. Expertise Allgemein- und Viszeralchirurgie Leber und Gallenwege. 1. Auflage ed. Stuttgart: Bechstein W, Schnitzbauer A; 2018.
8. 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.
9. Rizvi S, Khan SA, Hallemeier CL, Kelley RK, Gores GJ. Cholangiocarcinoma - evolving concepts and therapeutic strategies. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(2):95-111.
10. Dr. Björn Krollner DmDMK. ICD-CODE, C22.-

Bösartige Neubildung der Leber und der intrahepatischen Gallengänge, zitiert am 19. August 20222022.

11. Dr. Björn Krollner DmDMK. ICD-CODE, C24.- Bösartige Neubildung sonstiger nicht näher bezeichneter Teile der Gallenwege, zitiert am 19. August 20222022.
12. Robert-Koch-Institut GPDZfKudGdeKiDeV. Krebs in Deutschland für 2017/2018, zitiert am 19. August 2022. 13. Ausgabe ed. Berlin2021.
13. Lazcano-Ponce EC, Miquel JF, Muñoz N, Herrero R, Ferrecio C, Wistuba, II, et al. Epidemiology and molecular pathology of gallbladder cancer. *CA Cancer J Clin.* 2001;51(6):349-64.
14. Banales JM, Cardinale V, Carpino G, Marzioni M, Andersen JB, Invernizzi P, et al. Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA). *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology.* 2016;13(5):261-80.
15. Vogel AW, H; Caca, K; Nashan, B; Neumann, U. The Diagnosis and Treatment of Cholangiocarcinoma. *Deutsches Ärzteblatt International.* 2014;44/2014.
16. Ulrich Rosien TB, Peter Layer. Facharztwissen Gastroenterologie und Hepatologie. 2. Auflage ed: Urban & Fischer in Elsevier; 2021.
17. Robert-Koch-Institut GPDZfKudGdeKiDeV. Krebs in Deutschland, zitiert am 19. August 2022. 13. Auflage ed2021.
18. Krebsregisterdaten Zf. Leberkrebs ICD-10 C22, zitiert am 19. August 2022Stand: 29.11.2021.
19. Bildung Bfp. Bevölkerung nach Altersgruppen und Geschlecht 10.08.2020 [Available from: https://www.bpb.de/kurz-knapp/zahlen-und-fakten/soziale-situation-in-deutschland/61538/bevoelkerung-nach-altersgruppen-und-geschlecht/?utm_source=chatgpt.com].
20. Robert Koch-Institut SB. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut: Datenbankabfrage mit Schätzung der Inzidenz, Prävalenz und des Überlebens von Krebs in

Deutschland auf Basis der epidemiologischen Landeskrebsregisterdaten, abgerufen am 23. August 2022 Letzte Aktualisierung: 21.12.2021.

21. Mosadeghi S, Liu B, Bhuket T, Wong RJ. Sex-specific and race/ethnicity-specific disparities in cholangiocarcinoma incidence and prevalence in the USA: An updated analysis of the 2000–2011 Surveillance, Epidemiology and End Results registry. *Hepatology Research*. 2016;46(7):669-77.
22. Patel N, Benipal B. Incidence of Cholangiocarcinoma in the USA from 2001 to 2015: A US Cancer Statistics Analysis of 50 States. *Cureus*. 2019;11(1):e3962.
23. Molodecky NA, Kareemi H, Parab R, Barkema HW, Quan H, Myers RP, et al. Incidence of primary sclerosing cholangitis: a systematic review and meta-analysis. *Hepatology*. 2011;53(5):1590-9.
24. Saiman Y. Primär sklerosierende Cholangitis (PSC) MSD Manual Profi-Ausgabe: MSD Manual; 2023 [updated 2023/08. Available from: <https://www.msdmanuals.com/de-de/profi/erkrankungen-der-leber-der-gallenblase-und-der-gallenwege/gallenblase-und-gallenwegserkrankungen/primär-sklerosierende-cholangitis-psc>.
25. Shaib YH, Davila JA, McGlynn K, El-Serag HB. Rising incidence of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a true increase? *Journal of Hepatology*. 2004;40(3):472-7.
26. Valle JW, Borbath I, Khan SA, Huguet F, Gruenberger T, Arnold D. Biliary cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2016;27(suppl 5):v28-v37.
27. Constance Percy AFaLR. CONVERSION of NEOPLASMS BY TOPOGRAPHY AND MORPHOLOGY from the

INTERNATIONAL CLASSIFICATION OF DISEASES FOR ONCOLOGY, SECOND EDITION to INTERNATIONAL CLASSIFICATION OF DISEASES FOR ONCOLOGY, THIRD EDITION
Cancer Statistics Branch, Division of Cancer Control and Population Sciences

Surveillance, Epidemiology and End Results Program National Cancer Institute; 2001.

28. Welzel TM, McGlynn KA, Hsing AW, O'Brien TR, Pfeiffer RM. Impact of classification of hilar cholangiocarcinomas (Klatskin tumors) on the incidence of intra- and extrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(12):873-5.
29. Khan SA, Emadossadat S, Ladep NG, Thomas HC, Elliott P, Taylor-Robinson SD, et al. Rising trends in cholangiocarcinoma: is the ICD classification system misleading us? *J Hepatol*. 2012;56(4):848-54.
30. Ben-Menachem T. Risk factors for cholangiocarcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2007;19(8):615-7.
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.
32. 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.
33. Bergquist A, Ekbom A, Olsson R, Kornfeldt D, Lööf L, Danielsson A, et al. Hepatic and extrahepatic malignancies in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol*. 2002;36(3):321-7.
34. Claessen MM, Vleggaar FP, Tytgat KM, Siersema PD, van Buuren HR. High lifetime risk of cancer in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol*. 2009;50(1):158-64.
35. Fung BM, Lindor KD, Tabibian JH. Cancer risk in primary sclerosing cholangitis: Epidemiology, prevention, and surveillance strategies. *World J Gastroenterol*. 2019;25(6):659-71.
36. Welzel TM, Graubard BI, Zeuzem S, El-Serag HB, Davila JA, McGlynn KA. Metabolic syndrome increases the risk of primary liver cancer in the United States: a study in the SEER-Medicare database. *Hepatology*. 2011;54(2):463-71.
37. Izquierdo-Sanchez L, Lamarca A, La Casta A, Buettner S, Utpatel K, Klumpen HJ, et al. Cholangiocarcinoma landscape in Europe: Diagnostic, prognostic and therapeutic insights from the ENSCCA Registry. *J Hepatol*. 2022;76(5):1109-21.

38. Tyson GL, El-Serag HB. Risk factors for cholangiocarcinoma. *Hepatology*. 2011;54(1):173-84.
39. Park JY, Hong SP, Kim YJ, Kim HJ, Kim HM, Cho JH, et al. Long-term follow up of gallbladder polyps. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009;24(2):219-22.
40. Schmidt MA, Marcano-Bonilla L, Roberts LR. Gallbladder cancer: epidemiology and genetic risk associations. *Chinese Clinical Oncology*. 2019;8(4):2.
41. Wardell CP, Fujita M, Yamada T, Simbolo M, Fassan M, Karlic R, et al. Genomic characterization of biliary tract cancers identifies driver genes and predisposing mutations. *J Hepatol*. 2018;68(5):959-69.
42. Nakamura H, Arai Y, Totoki Y, Shiota T, Elzawahry A, Kato M, et al. Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nat Genet*. 2015;47(9):1003-10.
43. Razumilava N, Gores GJ. Cholangiocarcinoma. *Lancet*. 2014;383(9935):2168-79.
44. Zhou Y, Zhao Y, Li B, Huang J, Wu L, Xu D, et al. Hepatitis viruses infection and risk of intrahepatic cholangiocarcinoma: evidence from a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2012;12(1):289.
45. Wang Y, Yuan Y, Gu D. Hepatitis B and C virus infections and the risk of biliary tract cancers: a meta-analysis of observational studies. *Infectious Agents and Cancer*. 2022;17(1):45.
46. Murakami S. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. *J Gastroenterol*. 2001;36(10):651-60.
47. Wang WL, Gu GY, Hu M. Expression and significance of HBV genes and their antigens in human primary intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 1998;4(5):392-6.
48. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*. 2020;76(2):182-8.
49. Andrea Tannapfel GmKp. *Pathologie : Leber, Gallenwege und Pankreas 3. Ausgabe* ed. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg: herausgegeben von Andrea Tannapfel, Günter Klöppel; 2020.
50. Ursus-Nikolaus Riede MW. *Allgemeine und Spezielle Pathologie. 2. Ausgabe* ed. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg: herausgegeben von Ursus-Nikolaus Riede, Martin Werner; 2017.
51. Kirill Karlin TC. *PathoMaps Klinisch-pathologische Übersichtskarten. 1. Auflage* ed: Springer-Verlag; 2018.
52. Komuta M, Spee B, Vander Borgh S, De Vos R, Verslype C, Aerts R, et al. Clinicopathological study on cholangiolocellular carcinoma suggesting hepatic progenitor cell origin. *Hepatology*. 2008;47(5):1544-56.
53. B. Romanehsen GO, A. W. Lohse, F. Bittinger, S. Herber, K. Oberholzer, M. B. Pitton, M. Thelen. *Tumordiagnostik und Therapie: Die Diagnostik des hil ären Cholangiokarzinoms: Wertigkeit von pr operativer ERC, MRC und PTC im Vergleich zur Histopathologie*. Stuttgart · New York: Georg Thieme Verlag KG 2005.
54. Marianne Sinn DA, Markus Borner, Karel Caca, Thorsten Oliver Götze, Jens Ricke, Daniel Seehofer, Alexander Stein, Arndt Vogel, Henning Wege, Wilko Weichert, Thomas Winder. *Maligne biliäre Tumoren: Karzinome der Gallengänge und Gallenblase*, abgerufen am 19. August 2022: Onkopedia-Leitlinie, Stand Oktober 2021; Oktober 2021.
55. Stöver I, Feyer P. *Tumoren der intra- und extrahepatischen Gallenwege, cholangiozelluläres Karzinom. Praxismanual Strahlentherapie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018. p. 227-32.
56. Ali AH, Tabibian JH, Nasser-Ghods N, Lennon RJ, DeLeon T, Borad MJ, et al. Surveillance for hepatobiliary cancers in patients with primary sclerosing cholangitis. *Hepatology*. 2018;67(6):2338-51.
57. Navaneethan U, Njei B, Lourdusamy V, Konjeti R, Vargo JJ, Parsi MA. Comparative effectiveness of biliary brush cytology and intraductal biopsy for detection of malignant biliary strictures: a systematic review and meta-analysis. *Gastrointest Endosc*. 2015;81(1):168-76.
58. *Klinisches Krebsregister ZVG. Klinisches Krebsregister Kodierhilfe - Allgemeingültige Kodierungen (1)*, abgerufen am 19. August 2022: Uniklinik Freiburg; Stand Januar 2010.

59. Control UfIC, Wiley-VCH, Wittekind C. TNM - Klassifikation maligner Tumoren. Achte Auflage ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2017.

60. Koop I. Gastroenterologie compact: Alles für Klinik und Praxis: Thieme; 2009.

61. Bauer I, Grozio A, Lasigliè D, Basile G, Sturla L, Magnone M, et al. The NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT6 promotes cytokine production and migration in pancreatic cancer cells by regulating Ca²⁺ responses. *J Biol Chem.* 2012;287(49):40924-37.

62. Kang JS, Hong SY, Han Y, Sohn HJ, Lee M, Kang YH, et al. Limits of serum carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 as the diagnosis of gallbladder cancer. *Ann Surg Treat Res.* 2021;101(5):266-73.

63. Haab BB, Huang Y, Balasenthil S, Partyka K, Tang H, Anderson M, et al. Definitive Characterization of CA 19-9 in Resectable Pancreatic Cancer Using a Reference Set of Serum and Plasma Specimens. *PLoS One.* 2015;10(10):e0139049.

64. Wolter CL, Peter; Breul, Jürgen; Fink, Ulrich; Hanauske, Axel-Rainer; Präuer, Wolfgang; Sendler, Andreas; Wilhelm, Olaf; Neumeier, Dieter. Humorale Tumormarker: Praxisorientierte Vorschläge für ihren effizienten Einsatz, abgerufen am 19. August 2022: Deutsches Ärzteblatt; 1996.

65. Bridgewater J, Galle PR, Khan SA, Llovet JM, Park JW, Patel T, et al. Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol.* 2014;60(6):1268-89.

66. Harder J, Kummer O, Olschewski M, Otto F, Blum HE, Opitz O. Prognostic relevance of carbohydrate antigen 19-9 levels in patients with advanced biliary tract cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(10):2097-100.

67. 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.

68. 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.

69. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol.* 1982;5(6):649-55.

70. 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.

71. Yoo C, Jeong H, Kim K-P, Hwang DW, Lee J-H, Kim K-H, et al. Adjuvant gemcitabine plus cisplatin (GemCis) versus capecitabine (CAP) in patients (pts) with resected lymph node (LN)-positive extrahepatic cholangiocarcinoma (CCA): A multicenter, open-label, randomized, phase 2 study (STAMP). *Journal of Clinical Oncology.* 2022;40(16_suppl):4019-.

72. Yang L, Shan J, Shan L, Saxena A, Bester L, Morris DL. Trans-arterial embolisation therapies for unresectable intrahepatic cholangiocarcinoma: a systematic review. *J Gastrointest Oncol.* 2015;6(5):570-88.

73. Park SY, Kim JH, Yoon HJ, Lee IS, Yoon HK, Kim KP. Transarterial chemoembolization versus supportive therapy in the palliative treatment of unresectable intrahepatic cholangiocarcinoma. *Clin Radiol.* 2011;66(4):322-8.

74. Weber SM, Ribero D, O'Reilly EM, Kokudo N, Miyazaki M, Pawlik TM. Intrahepatic cholangiocarcinoma: expert consensus statement. *HPB (Oxford).* 2015;17(8):669-80.

75. Søreide K, Guest RV, Harrison EM, Kendall TJ, Garden OJ, Wigmore SJ. Systematic review of management of incidental gallbladder cancer after cholecystectomy. *Br J Surg.* 2019;106(1):32-45.

76. Coimbra FJF, Torres OJM, Alikhanov R, Agarwal A, Pessaux P, Fernandes ESM, et al. BRAZILIAN CONSENSUS ON INCIDENTAL GALLBLADDER CARCINOMA. *Arq Bras Cir Dig.* 2020;33(1):e1496.

77. Michael Gnant PMS. Chirurgische Onkologie: Strategien und Standards für die Praxis. Wien Springer Verlag; 2008.

78. 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.
79. 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. *The Lancet Oncology*. 2021;22(5):690-701.
80. Malka D, Cervera P, Foulon S, Trarbach T, de la Fouchardi re C, Boucher E, et al. Gemcitabine and oxaliplatin with or without cetuximab in advanced biliary-tract cancer (BINGO): a randomised, open-label, non-comparative phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(8):819-28.
81. Rizzo A, Ricci AD, Brandi G. Recent advances of immunotherapy for biliary tract cancer. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021;15(5):527-36.
82. Moehler M, Maderer A, Schimanski C, Kanzler S, Denzer U, Kolligs FT, et al. Gemcitabine plus sorafenib versus gemcitabine alone in advanced biliary tract cancer: a double-blind placebo-controlled multicentre phase II AIO study with biomarker and serum programme. *Eur J Cancer*. 2014;50(18):3125-35.
83. Chen X, Wang D, Liu J, Qiu J, Zhou J, Ying J, et al. Genomic alterations in biliary tract cancer predict prognosis and immunotherapy outcomes. *J Immunother Cancer*. 2021;9(11).
84. Xu C, Li L, Xu W, Du C, Yang L, Tong J, et al. Ultrasound-guided percutaneous microwave ablation versus surgical resection for recurrent intrahepatic cholangiocarcinoma: intermediate-term results. *Int J Hyperthermia*. 2019;36(1):351-8.
85.   NG. NCCN Guidelines for Patients: Gallbladder and Bile Duct Cancers2021.
86. Hans-Dieter Belitz WG, Peter Schieberle. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 6. vollständig  berarbeitete Auflage ed. Berlin: Springer Verlag; 2008.
87. Vistoli G, De Maddis D, Cipak A, Zarkovic N, Carini M, Aldini G. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radic Res*. 2013;47 Suppl 1:3-27.
88. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006;114(6):597-605.
89. Siska PJ, Singer K, Evert K, Renner K, Kreutz M. The immunological Warburg effect: Can a metabolic-tumor-stroma score (MeTS) guide cancer immunotherapy? *Immunol Rev*. 2020;295(1):187-202.
90. Thornalley PJ. Advances in glyoxalase research. Glyoxalase expression in malignancy, anti-proliferative effects of methylglyoxal, glyoxalase I inhibitor diesters and S-D-lactoylglutathione, and methylglyoxal-modified protein binding and endocytosis by the advanced glycation endproduct receptor. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1995;20(1-2):99-128.
91. Nokin MJ, Durieux F, Bellier J, Peulen O, Uchida K, Spiegel DA, et al. Hormetic potential of methylglyoxal, a side-product of glycolysis, in switching tumours from growth to death. *Sci Rep*. 2017;7(1):11722.
92. Shipanova IN, Glomb MA, Nagaraj RH. Protein modification by methylglyoxal: chemical nature and synthetic mechanism of a major fluorescent adduct. *Arch Biochem Biophys*. 1997;344(1):29-36.
93. Nakadate Y, Uchida K, Shikata K, Yoshimura S, Azuma M, Hirata T, et al. The formation of argpyrimidine, a methylglyoxal-arginine adduct, in the nucleus of neural cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;378(2):209-12.
94. Van Schaftingen E, Delpierre G, Collard F, Fortpied J, Gemayel R, Wiame E, et al. Fructosamine 3-kinase and other enzymes involved in protein deglycation. *Adv Enzyme Regul*. 2007;47:261-9.
95. Westwood ME, Thornalley PJ. Molecular characteristics of methylglyoxal-modified bovine and human serum albumins. Comparison with glucose-derived advanced glycation endproduct-modified serum albumins. *J Protein Chem*. 1995;14(5):359-72.
96. Zhang Q, Ames JM, Smith RD, Baynes JW, Metz TO. A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease. *J Proteome Res*. 2009;8(2):754-69.

97. Oya T, Hattori N, Mizuno Y, Miyata S, Maeda S, Osawa T, et al. Methylglyoxal modification of protein. Chemical and immunochemical characterization of methylglyoxal-arginine adducts. *J Biol Chem*. 1999;274(26):18492-502.
98. 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.
99. Thornalley PJ. Modification of the glyoxalase system in human red blood cells by glucose in vitro. *Biochem J*. 1988;254(3):751-5.
100. Sakamoto H, Mashima T, Yamamoto K, Tsuruo T. Modulation of heat-shock protein 27 (Hsp27) anti-apoptotic activity by methylglyoxal modification. *J Biol Chem*. 2002;277(48):45770-5.
101. Michel M, Hess C, Kaps L, Kremer WM, Hilscher M, Galle PR, et al. Elevated serum levels of methylglyoxal are associated with impaired liver function in patients with liver cirrhosis. *Sci Rep*. 2021;11(1):20506.
102. Gomes R, Sousa Silva M, Quintas A, Cordeiro C, Freire A, Pereira P, et al. Argpyrimidine, a methylglyoxal-derived advanced glycation end-product in familial amyloidotic polyneuropathy. *Biochem J*. 2005;385(Pt 2):339-45.
103. Chiavarina B, Nokin MJ, 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).
104. van Heijst JW, Niessen HW, Hoekman K, Schalkwijk CG. Advanced glycation end products in human cancer tissues: detection of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine and argpyrimidine. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1043:725-33.
105. Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fischer MR, Gellon L, et al. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*. 2006;124(2):315-29.
106. Michishita E, McCord RA, Berber E, Kioi M, Padilla-Nash H, Damian M, et al. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature*. 2008;452(7186):492-6.
107. Kugel S, Mostoslavsky R. Chromatin and beyond: the multitasking roles for SIRT6. *Trends Biochem Sci*. 2014;39(2):72-81.
108. Yang B, Zwaans BM, Eckersdorff M, Lombard DB. The sirtuin SIRT6 deacetylates H3 K56Ac in vivo to promote genomic stability. *Cell Cycle*. 2009;8(16):2662-3.
109. Tasselli L, Xi Y, Zheng W, Tennen RI, Odrowaz Z, Simeoni F, et al. SIRT6 deacetylates H3K18ac at pericentric chromatin to prevent mitotic errors and cellular senescence. *Nat Struct Mol Biol*. 2016;23(5):434-40.
110. Lessel D, Oshima J, Kubisch C. [Werner syndrome. A prototypical form of segmental progeria.]. *Med Genet*. 2012;24(4):262-7.
111. Mao Z, Hine C, Tian X, Van Meter M, Au M, Vaidya A, et al. SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. *Science*. 2011;332(6036):1443-6.
112. Kaidi A, Weinert BT, Choudhary C, Jackson SP. Human SIRT6 promotes DNA end resection through CtIP deacetylation. *Science*. 2010;329(5997):1348-53.
113. Lu Y, Yang J, Wu Q, Wang X. The Role and Molecular Pathways of SIRT6 in Senescence and Age-related Diseases. *Adv Biol (Weinh)*. 2025;9(4):e2400469.
114. Lin Z, Yang H, Tan C, Li J, Liu Z, Quan Q, et al. USP10 antagonizes c-Myc transcriptional activation through SIRT6 stabilization to suppress tumor formation. *Cell Rep*. 2013;5(6):1639-49.
115. Zhong L, D'Urso A, Toiber D, Sebastian C, Henry RE, Vadysirisack DD, et al. The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha. *Cell*. 2010;140(2):280-93.
116. Al-Azzam N. Sirtuin 6 and metabolic genes interplay in Warburg effect in cancers. *J Clin Biochem Nutr*. 2020;66(3):169-75.
117. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab*. 2006;3(3):187-97.

118. Sebastián C, Zwaans BM, Silberman DM, Gymrek M, Goren A, Zhong L, et al. The histone deacetylase SIRT6 is a tumor suppressor that controls cancer metabolism. *Cell*. 2012;151(6):1185-99.
119. Kim HS, Xiao C, Wang RH, Lahusen T, Xu X, Vassilopoulos A, et al. Hepatic-specific disruption of SIRT6 in mice results in fatty liver formation due to enhanced glycolysis and triglyceride synthesis. *Cell Metab*. 2010;12(3):224-36.
120. Bae EJ, Park BH. Multiple Roles of Sirtuin 6 in Adipose Tissue Inflammation. *Diabetes Metab J*. 2023;47(2):164-72.
121. Van Gool F, Gallí M, Gueydan C, Kruys V, Prevot PP, Bedalov A, et al. Intracellular NAD levels regulate tumor necrosis factor protein synthesis in a sirtuin-dependent manner. *Nat Med*. 2009;15(2):206-10.
122. Jiang H, Khan S, Wang Y, Charron G, He B, Sebastian C, et al. SIRT6 regulates TNF- α secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine. *Nature*. 2013;496(7443):110-3.
123. de Céu Teixeira M, Sanchez-Lopez E, Espina M, Garcia ML, Durazzo A, Lucarini M, et al. Sirtuins and SIRT6 in Carcinogenesis and in Diet. *Int J Mol Sci*. 2019;20(19).
124. Kawahara TL, Michishita E, Adler AS, Damian M, Berber E, Lin M, et al. SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell*. 2009;136(1):62-74.
125. Gasparini C, Feldmann M. NF-kB as a target for modulating inflammatory responses. *Curr Pharm Des*. 2012;18(35):5735-45.
126. Song M-Y, Kim SH, Ryoo G-H, Kim M-K, Cha H-N, Park S-Y, et al. Adipose sirtuin 6 drives macrophage polarization toward M2 through IL-4 production and maintains systemic insulin sensitivity in mice and humans. *Experimental & Molecular Medicine*. 2019;51(5):1-10.
127. Min L, Ji Y, Bakiri L, Qiu Z, Cen J, Chen X, et al. Liver cancer initiation is controlled by AP-1 through SIRT6-dependent inhibition of survivin. *Nat Cell Biol*. 2012;14(11):1203-11.
128. Wu M, Dickinson SI, Wang X, Zhang J. Expression and function of SIRT6 in muscle invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(10):6504-13.
129. Wang X, Zhang P, Yan J, Huang J, Shen Y, He H, et al. SIRT6 deficiency impairs the deacetylation and ubiquitination of UHRF1 to strengthen glycolysis and lactate secretion in bladder cancer. *Cell Biosci*. 2024;14(1):153.
130. Lerrer B, Cohen HY. The guardian: metabolic and tumour-suppressive effects of SIRT6. *Embo j*. 2013;32(1):7-8.
131. Li F, Yu W, Zhou X, Hou J, Gao Y, Zhang J, et al. SIRT6 Inhibits Anoikis of Colorectal Cancer Cells by Down-Regulating NDRG1. *Int J Mol Sci*. 2024;25(11).
132. Ming M, Han W, Zhao B, Sundaresan NR, Deng CX, Gupta MP, et al. SIRT6 promotes COX-2 expression and acts as an oncogene in skin cancer. *Cancer Res*. 2014;74(20):5925-33.
133. Feng XX, Luo J, Liu M, Yan W, Zhou ZZ, Xia YJ, et al. Sirtuin 6 promotes transforming growth factor- β 1/H₂O₂/HOCl-mediated enhancement of hepatocellular carcinoma cell tumorigenicity by suppressing cellular senescence. *Cancer Sci*. 2015;106(5):559-66.
134. Ran LK, Chen Y, Zhang ZZ, Tao NN, Ren JH, Zhou L, et al. SIRT6 Overexpression Potentiates Apoptosis Evasion in Hepatocellular Carcinoma via BCL2-Associated X Protein-Dependent Apoptotic Pathway. *Clin Cancer Res*. 2016;22(13):3372-82.
135. Lang G. Histotechnik. 2. überarbeitete und aktualisierte Auflage ed. Wien: Springer Verlag; 2013.
136. München PldL-M-U. Immunhistochemie, abgerufen am 19. August 2022.
137. GmbH M. Immunhistochemie, abgerufen am 19. August 2022. 28.09.2019.
138. Lønborg C. DAKO EnVision™ FLEX + Rabbit, abgerufen am 10. Oktober 2022: DAKO Denmark A/S; 07/2011.
139. Chiavarina B, Nokin MJ, Durieux F, Bianchi E, Turtoi A, Peulen O, et al. Triple negative tumors accumulate significantly less methylglyoxal specific adducts than other human breast cancer subtypes. *Oncotarget*. 2014;5(14):5472-82.
140. Bair WB, 3rd, Cabello CM, Uchida K, Bause AS, Wondrak GT. GLO1 overexpression in human malignant melanoma. *Melanoma Res*. 2010;20(2):85-96.

141. Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*. 1987;8(3):138-40.
142. Charité P. Quantifizierung des Hormonrezeptorgehalts (Immunreaktiver Score = IRS), abgerufen am 19. August 2022.
143. Böcker W, Rüschoff J. Östrogen- und Progesteronrezeptoren sowie Her2. In: Klöppel G, Kreipe H, Remmele W, Dietel M, editors. *Pathologie: Mamma, Weibliches Genitale, Schwangerschaft und Kindererkrankungen*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 167-81.
144. Hwang SY, Danpanichkul P, Agopian V, Mehta N, Parikh ND, Abou-Alfa GK, et al. Hepatocellular carcinoma: updates on epidemiology, surveillance, diagnosis and treatment. *Clin Mol Hepatol*. 2025;31(Suppl):S228-s54.
145. Ahmed N, Thornalley PJ, Dawczynski J, Franke S, Strobel J, Stein G, et al. Methylglyoxal-derived hydroimidazolone advanced glycation end-products of human lens proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(12):5287-92.
146. Sreejayan N, Yang X, Palanichamy K, Dolence K, Ren J. Antioxidant properties of argpyrimidine. *Eur J Pharmacol*. 2008;593(1-3):30-5.
147. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell*. 2020;38(2):167-97.
148. Eaton CB, Sayeed M, Ameeranaz S, Roberts MB, Maynard JD, Driban JB, et al. Sex differences in the association of skin advanced glycation endproducts with knee osteoarthritis progression. *Arthritis Res Ther*. 2017;19(1):36.
149. Kilhovd BK, Juutilainen A, Lehto S, Rönnekaa T, Torjesen PA, Birkeland KI, et al. High serum levels of advanced glycation end products predict increased coronary heart disease mortality in nondiabetic women but not in nondiabetic men: a population-based 18-year follow-up study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(4):815-20.
150. Kim J, Kim OS, Kim CS, Sohn E, Jo K, Kim JS. Accumulation of argpyrimidine, a methylglyoxal-derived advanced glycation end product, increases apoptosis of lens epithelial cells both in vitro and in vivo. *Exp Mol Med*. 2012;44(2):167-75.
151. Antognelli C, Mezzasoma L, Fettucciari K, Talesa VN. A novel mechanism of methylglyoxal cytotoxicity in prostate cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45(4):836-44.
152. 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.
153. Baichwal VR, Baeuerle PA. Activate NF-kappa B or die? *Curr Biol*. 1997;7(2):R94-6.
154. Seo K, Ki SH, Shin SM. Methylglyoxal induces mitochondrial dysfunction and cell death in liver. *Toxicol Res*. 2014;30(3):193-8.
155. Kreyer 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.
156. Antognelli C, Mezzasoma L, Mearini E, Talesa VN. Glyoxalase 1-419C>A variant is associated with oxidative stress: implications in prostate cancer progression. *PLoS One*. 2013;8(9):e74014.
157. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones*. 2005;10(2):86-103.
158. Garrido C, Ottavi P, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Chaffert B, et al. HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs. *Cancer Res*. 1997;57(13):2661-7.
159. Oya-Ito T, Liu BF, Nagaraj RH. Effect of methylglyoxal modification and phosphorylation on the chaperone and anti-apoptotic properties of heat shock protein 27. *J Cell Biochem*. 2006;99(1):279-91.
160. Bruey JM, Paul C, Fromentin A, Hilpert S, Arrigo AP, Solary E, et al. Differential regulation of HSP27 oligomerization in tumor cells grown in vitro and in vivo. *Oncogene*. 2000;19(42):4855-63.
161. Pani G, Galeotti T, Chiarugi P. Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29(2):351-78.

162. Kalapos MP. The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chem Biol Interact.* 2008;171(3):251-71.
163. Owczarz M, Budzinska M, Domaszewska-Szostek A, Borkowska J, Polosak J, Gewartowska M, et al. miR-34a and miR-9 are overexpressed and SIRT genes are downregulated in peripheral blood mononuclear cells of aging humans. *Exp Biol Med (Maywood).* 2017;242(14):1453-61.
164. Stein D, Mizrahi A, Golova A, Saretzky A, Venzor AG, Slobodnik Z, et al. Aging and pathological aging signatures of the brain: through the focusing lens of SIRT6. *Aging (Albany NY).* 2021;13(5):6420-41.
165. Zhao Y, Bai X, Jia X, Lu Y, Cheng W, Shu M, et al. Age-related changes of human serum Sirtuin6 in adults. *BMC Geriatr.* 2021;21(1):452.
166. Jing T, Yang X-F, He Y-H. The Prognostic and Clinicopathological Roles of Sirtuin-6 in Various Cancers: A Meta-Analysis. *Matrix Science Medica.* 2023;7(4):95-103.
167. Huang N, Liu Z, Zhu J, Cui Z, Li Y, Yu Y, et al. Sirtuin 6 plays an oncogenic role and induces cell autophagy in esophageal cancer cells. *Tumour Biol.* 2017;39(6):1010428317708532.
168. Kugel S, Sebastián C, Fitamant J, Ross KN, Saha SK, Jain E, et al. SIRT6 Suppresses Pancreatic Cancer through Control of Lin28b. *Cell.* 2016;165(6):1401-15.
169. Zhong X, Huang M, Kim HG, Zhang Y, Chowdhury K, Cai W, et al. SIRT6 Protects Against Liver Fibrosis by Deacetylation and Suppression of SMAD3 in Hepatic Stellate Cells. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2020;10(2):341-64.
170. Song S, Yang Y, Liu M, Liu B, Yang X, Yu M, et al. MiR-125b attenuates human hepatocellular carcinoma malignancy through targeting SIRT6. *Am J Cancer Res.* 2018;8(6):993-1007.
171. Beauharnois JM, Bolívar BE, Welch JT. Sirtuin 6: a review of biological effects and potential therapeutic properties. *Mol Biosyst.* 2013;9(7):1789-806.
172. Chowdhury K, Huang M, Kim HG, Dong XC. Sirtuin 6 protects against hepatic fibrogenesis by suppressing the YAP and TAZ function. *Faseb j.* 2022;36(10):e22529.
173. Dong XC. Sirtuin 6-A Key Regulator of Hepatic Lipid Metabolism and Liver Health. *Cells.* 2023;12(4).
174. Azuma Y, Yokobori T, Mogi A, Altan B, Yajima T, Kosaka T, et al. SIRT6 expression is associated with poor prognosis and chemosensitivity in patients with non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol.* 2015;112(2):231-7.
175. Balestrieri ML, Rizzo MR, Barbieri M, Paolisso P, D'Onofrio N, Giovane A, et al. Sirtuin 6 expression and inflammatory activity in diabetic atherosclerotic plaques: effects of incretin treatment. *Diabetes.* 2015;64(4):1395-406.
176. Shi L, Wang Y, Oppong TB, Fu X, Yang H, Wang Y. Prognostic role of SIRT6 in gastrointestinal cancers: a meta-analysis. *Open Med (Wars).* 2020;15(1):358-65.
177. Han LL, Jia L, Wu F, Huang C. Sirtuin6 (SIRT6) Promotes the EMT of Hepatocellular Carcinoma by Stimulating Autophagic Degradation of E-Cadherin. *Mol Cancer Res.* 2019;17(11):2267-80.
178. Wu X, Wang S, Zhao X, Lai S, Yuan Z, Zhan Y, et al. Clinicopathological and prognostic value of SIRT6 in patients with solid tumors: a meta-analysis and TCGA data review. *Cancer Cell Int.* 2022;22(1):84.
179. Wong WP, Tiano JP, Liu S, Hewitt SC, Le May C, Dalle S, et al. Extranuclear estrogen receptor-alpha stimulates NeuroD1 binding to the insulin promoter and favors insulin synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(29):13057-62.
180. Hao L, Bang IH, Wang J, Mao Y, Yang JD, Na SY, et al. ERR γ suppression by Sirt6 alleviates cholestatic liver injury and fibrosis. *JCI Insight.* 2020;5(17).
181. Ulm U. Leistungsverzeichnis Cancer Antigen 19-9 FB-PÄ 6 CA19-9 OE 2020 [updated 25.06.2020. Available from: https://www.uniklinik-ulm.de/fileadmin/default/09_Sonstige/Klinische-Chemie/Seiteninhalte/Seiteninhalte_C/Cancer_Antigen_19-9_FB-PAE_6_CA19-9_OE.pdf.
182. Fiorentino F, Carafa V, Favale G, Altucci L, Mai A, Rotili D. The Two-Faced Role of SIRT6 in Cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(5).

183. Dong Z, Yang J, Li L, Tan L, Shi P, Zhang J, et al. FOXO3a-SIRT6 axis suppresses aerobic glycolysis in melanoma. *Int J Oncol.* 2020;56(3):728-42.
184. Tao NN, Ren JH, Tang H, Ran LK, Zhou HZ, Liu B, et al. Deacetylation of Ku70 by SIRT6 attenuates Bax-mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;485(4):713-9.

8 Anhang

8.1 Zum Kapitel 2.9.2 TNM-Klassifikation

Extrahepatische Gallenwege

Tabelle 38: TNM-Klassifikation der extrahepatischen Gallengangskarzinome

TNM	
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor auf den Gallengang beschränkt
T2	Tumor infiltriert jenseits des Gallengangs
T3	Tumor infiltriert benachbarte Organe
T4	Tumor infiltriert Truncus coeliacus oder A. mesenterica sup.
Nx	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Lymphknoten tumorfrei
N1	Metastasen in LK am Ductus cysticus, um den Choledochus und / oder am Leberhilus
Mx	Fernmetastasen nicht beurteilbar
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden

Modifiziert nach: (59)

Gallenblase

Tabelle 39: TNM-Klassifikation der Gallenblasenkarzinome

TNM	
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltriert Lamina propria (T1a) oder Muskulatur (T1b)
T2	Tumor infiltriert perimuskuläres Bindegewebe, aber keine Ausbreitung jenseits der Serosa oder in die Leber
T3	Tumor perforiert Serosa (viszerale Peritoneum) und/oder infiltriert direkt in nur ein Nachbarorgan (Leberinfiltration <2cm / Magen / Duodenum)
T4	Tumor infiltriert Stamm der Pfortader / A. hepatica und/oder Infiltration von zwei und mehr Nachbarorganen (Magen, Duodenum, Kolon, Pankreas, Netz, extrahepatische Gallengänge)
Nx	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar

N0	Lymphknoten tumorfrei
N1	Regionale Lymphknotenmetastasen in Lymphknoten des Ductus cysticus, des Ductus coleduchus, entlang der A. hepatica communis und der V. portae
Mx	Fernmetastasen nicht beurteilbar
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden

Modifiziert nach: (59)

8.2 Zum Kapitel 2.9.3 UICC-Stadium

Perihiläre Gallengangstumoren

Tabelle 40: UICC-Stadien für perihiläre Gallenganskarzinome

UICC-Stadien – perihiläre Gallengänge

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2a, T2b	N0	M0
Stadium IIIA	T3	N0	M0
Stadium IIIB	T4	N0	M0
Stadium IIIC	Jedes T	N1	M0
Stadium IVA	Jedes T	N2	M0
Stadium IVB	Jedes T	Jedes N	M1

Aus: (59), (60)

Distale extrahepatische Gallengangskarzinome

Tabelle 41: UICC-Stadien für distale extrahepatische Gallengangskarzinome

UICC-Stadien – distale extrahepatische Gallengänge

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium IIA	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stadium IIB	T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
Stadium IIIA	T1-T3	N2	M0
Stadium IIIB	T4	Jedes N	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Aus: (59), (60)

Gallengangskarzinome

Tabelle 42: UICC-Stadien für Gallenblasenkarzinome

UICC-Stadien – Gallenblase

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1a	N0	M0
Stadium IB	T1b	N0	M0
			M0
Stadium IIA	T2a	N0	M0
Stadium IIB	T2b	N0	M0
Stadium IIIA	T3	N0	M0
Stadium IIIB	T1-T3	N1	M0
Stadium IVA	T4	N0, N1	M0
Stadium IVB	Jedes T	N2	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

Aus: (59), (60)

8.3 Zum Kapitel 3.2 Lister der verwendeten Materialien

Tabelle 43: Liste der verwendeten Materialien

Material	Anmerkung	Quelle
Antikörper		
MAGE Primärantikörper (1:1000), mouse	monoklonal, 1 µl MAGE-AK + 999 µl EnVision Antibody Diluent	DIANOVA, Hamburg, Deutschland, Bestellnummer: AGE06B
SIRT-6 Primärantikörper (1:300), rabbit	polyoklonal, 1 µl SIRT-6-AK + 299 µl EnVision Antibody Diluent	Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Deutschland, Bestellnummer: HPA071776
Material für Immunhistochemie		
EnVision™ Wash Buffer (20x) (K8007, DM831)	1:20 in Aqua dest. verdünnen	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
EnVision™ Substrate Buffer (DM823)		Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution (50x), low pH, Citratpuffer pH 6,1 (K8005, DM829)	1:50 in Aqua dest. Verdünnen	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (DM821)		Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Dako Real™ Cytomation Pen		Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
EnVision™ Antibody Diluent (K8006, DM830)		Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark

Tertiärreagenz: EnVision™ FLEX + Rabbit (K8019, DM825) EnVision™ FLEX + Mouse (K8021)	Linker	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Sekundärantikörper: EnVision™ FLEX /HRP visualization reagent (DM822)		Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Chromogen: EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (DM827)		Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
EnVision™ FLEX Hematoxylin (K8018, DM826)	Hämatoxylin (= Hämalau)	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Entellan® (1.07960)		Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Deutschland
100% Ethanol	reinst	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
96% Ethanol	Entsprechende Verdünnung: 40 ml Aqua dest. + 960ml 100% Ethanol	SAV Liquid Production GmbH
80% Ethanol	Entsprechende Verdünnung: 200 ml Aqua dest. + 800ml 100% Ethanol	SAV Liquid Production GmbH
70% Ethanol	Entsprechende Verdünnung: 300 ml Aqua dest. + 700 ml 100% Ethanol	SAV Liquid Production GmbH
50% Ethanol	Entsprechende Verdünnung: 500 ml Aqua dest. + 500 ml 100% Ethanol	SAV Liquid Production GmbH
Xylol		Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Leitungswasser		Stadtwerke Mainz
Aqua dest.		B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Elektrogeräte		
Lichtmikroskop BX51		Olympus
Lichtmikroskopkamera U-TV1X-2, U-CMAD3, Color View II		Olympus
Mikrotom HistoCore AUTOCUT		Leica
Färbeautomat für Immunhistochemie DakoCytomation Autostainer Plus		DakoCytomation, Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA
Brutschrank Heraeus Function Line B6/Heraeus T 6060		Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co.KG, Darmstadt, Deutschland
Kühlschrank FKS 3600		Liebherr, Kirchdorf an der Iller, Baden-Württemberg, Deutschland
Dampfgarer 3216		Braun GmbH, Kronberg im Taunus, Hessen, Deutschland
Kühlplatte Tissue Cool Plate COP 30		Mediate GmbH, Berlin, Deutschland
Weitere Utensilien		

Adhäsionsobjektträger Superfrost® Plus		Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Deckgläser 24 x 50 mm		Knittel-Glass, Nummer: VD12450Y1A.01
Pipetten Eppendorf Reference®	0,5 – 10 µl 10 – 1000 µl 100 – 1000 µl	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
epT.I.P.S.®-Pipettenspitzen		Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Messzylinder 250 ml (612-3837), 1000 ml (612-3839)		VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
Glasküvette		VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
Metallbügel		VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
Hitzebeständige Küvette		VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA

8.4 Zum Kapitel 3.4.8 Vergleichsfärbungen Mamma/Ösophagus und Magen/Ösophagus

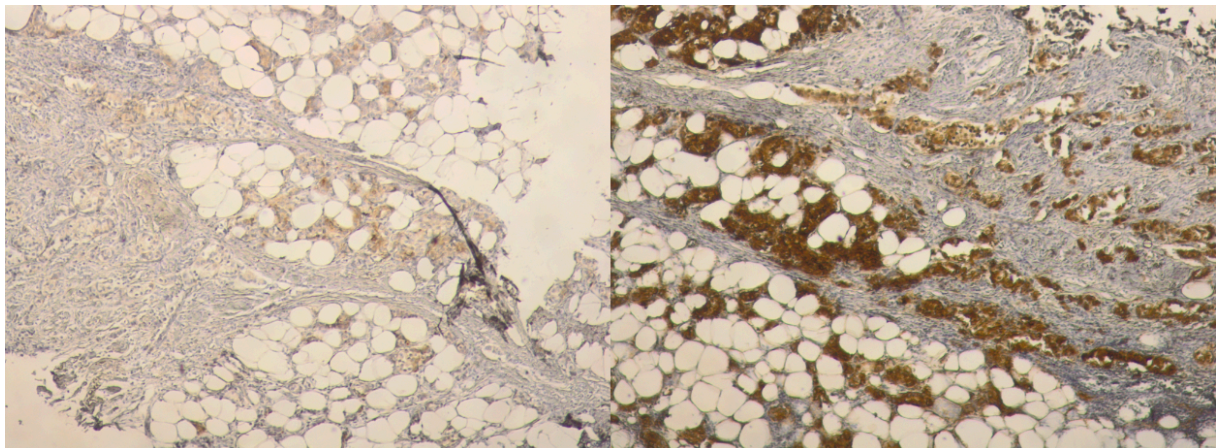


Abbildung 47: Nachweis von Argpyrimidin in der Mamma, links eher schwacher Nachweis und rechts eher starker Nachweis.

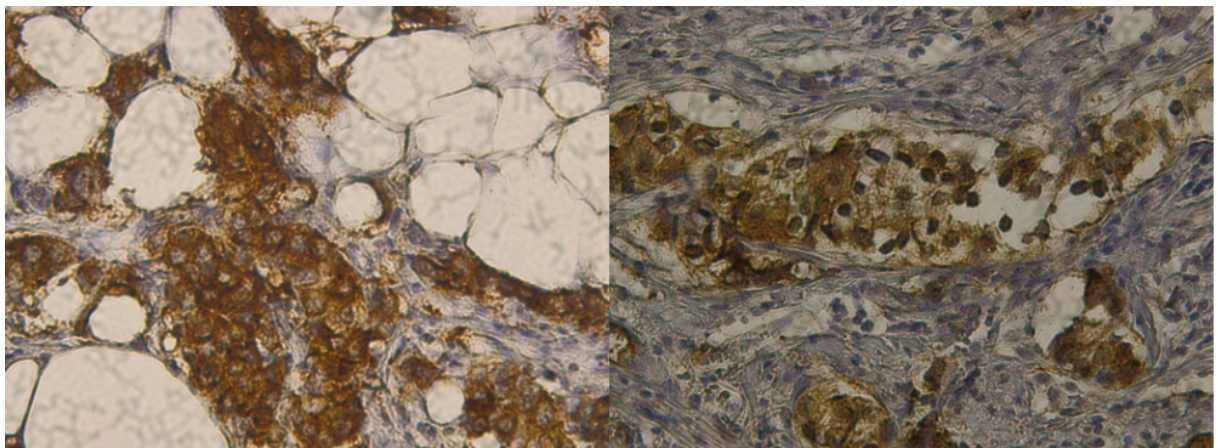


Abbildung 48: Argpyrimidinnachweis in der Mamma, links mit primär zytosolischem, rechts mit zusätzlich nukleärem Nachweis.

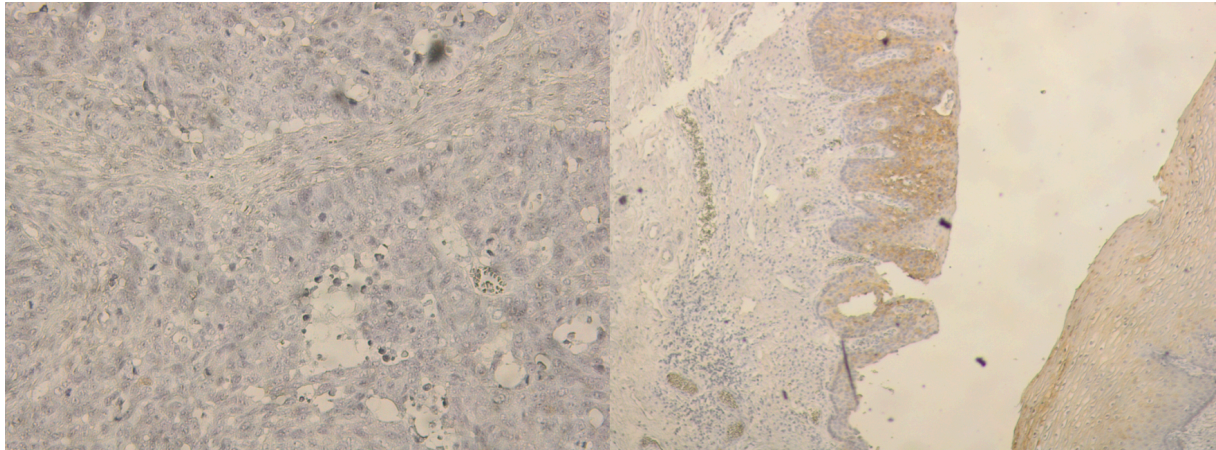


Abbildung 49: Nachweis von Argpyrimidin im Ösophagus, links kein Nachweis und rechts eher leicht bis mäßige Nachweisintensität.

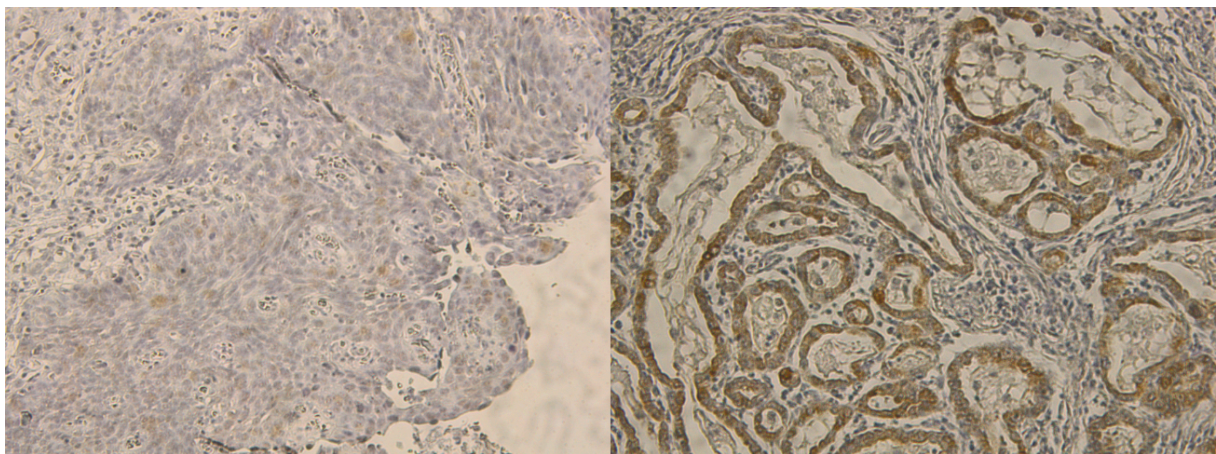


Abbildung 50: Nachweis von Sirtuin 6 im Magen, links dezenter Nachweis, rechts mittlere Nachweisintensität.

8.5 Zum Kapitel 4.1 Deskription

Tabelle 44: Paarweise Vergleiche der stetigen Variablen aus Tabelle 10 und Tabelle 11.

Paarweise Vergleiche		p-Wert (Kruskal-Wallis)
Alter	iCCC vs. eCCC	1
	iCCC vs. GBT	1
	eCCC vs. GBT	1
GPT	iCCC vs. eCCC	0,000
	iCCC vs. GBT	1
	eCCC vs. GBT	0,205
GOT	iCCC vs. eCCC	0,000
	iCCC vs. GBT	1
	eCCC vs. GBT	0,082
Albumin	iCCC vs. eCCC	0,242
	iCCC vs. GBT	1
	eCCC vs. GBT	1
Bilirubin	iCCC vs. eCCC	0,000
	iCCC vs. GBT	1
	eCCC vs. GBT	0,287
INR	iCCC vs. eCCC	0,925
	iCCC vs. GBT	0,569
	eCCC vs. GBT	0,335

CA 19-9	iCCC vs. eCCC	0,01
	iCCC vs. GBT	0,305
	eCCC vs. GBT	1

8.6 Zum Kapitel 4.1.3 Tumorcharakteristika

Tabelle 45: Kreuztabelle über den Zusammenhang zwischen Tumorgroße und Differenzierungsgrad. Es zeigte sich, dass kleinere Tumoren (kleiner T3) häufiger ein besseres histopathologisches Grading aufwiesen als große Tumoren. p-Wert (Chi-Quadrat) = 0,048.

		Tumorgroße		p-Wert (Chi-Quadrat)
		klein (Tis – T2) n (%)	groß (T3 – T4) n (%)	
Differenzierung	gut	127 (73)	47 (27)	174 (75)
	niedrig	34 (58,6)	24 (41,4)	58 (25)
		232		0,048

8.7 Zum Kapitel 4.1.4 Laborparameter

Tabelle 46: Zusammenschau der erhobenen Laborparameter im Gesamtkollektiv und aufgeteilt nach Tumorlokalisation. Für GOT, GPT und CA 19-9 sind ebenfalls die Mediane mit Interquartilabstand (IQA) aufgeführt.

		Referenzwerte	eCCC n (%)	iCCC n (%)	GB n (%)	Gesamt n (%)
Gesamtanzahl			77 (31,4)	163 (66,5)	5 (2)	245 (100)
GOT						
♂	≤ 50 mg/dl		11 (20,4)	50 (67,6)	2 (100)	63 (48,4)
	> 50 mg/dl		31 (57,4)	15 (21,6)	0 (0)	47 (26,2)
	fehlend		12 (22,2)	8 (10,8)	0 (0)	20 (15,4)
	gesamt		54 (100)	74 (100)	2 (100)	130 (100)
GOT	Median in		78,5 (49-161,5)	35 (28-50,5)	41	46 (32-84,75)
♀	≤ 35 mg/dl		3 (13)	37 (41,6)	1 (33,3)	41 (35,7)
	> 35 mg/dl		18 (78,3)	35 (39,3)	1 (33,3)	54 (47)
	fehlend		2 (8,7)	17 (19,1)	1 (33,3)	20 (17,4)
	gesamt		23 (100)	89 (100)	3 (100)	115 (100)
GOT:	Median in		74 (42-124)	35 (28-54,75)	32,5	39 (29-71)
GPT						

♂	≤ 50 mg/dl	6 (11,1)	47 (63,5)	1 (50)	54 (41,5)
	> 50 mg/dl	36 (66,7)	19 (25,7)	1 (50)	56 (43,1)
	fehlend	12 (22,2)	8 (10,8)	0 (0)	20 (15,4)
	gesamt	54 (100)	74 (100)	2 (100)	130 (100)
GPT: Median in mg/dl (IQA)		116 (66,5- 235)	34,5 (23- 59,75)	55,5	52 (27,75- 112,25)
♀	≤ 35	4 (17,4)	46 (51,7)	2 (66,7)	52 (45,2)
	> 35	17 (73,9)	26 (29,2)	0 (0)	43 (37,4)
	fehlend	2 (8,7)	19 (19,1)	1 (33,3)	20 (17,4)
	gesamt	23 (100)	89 (100)	3 (100)	115 (100)
GPT Median in mg/dl (IQA)		71 (43,5- 209,5)	30,5 (19,25- 48,75)	31	33 (20-63)
DeRitis-Quotient					
	< 0,6	21 (27,3)	7 (4,3)	0 (0)	28 (11,4)
	0,6 – 0,8	15 (19,5)	23 (14,1)	1 (20)	39 (15,9)
	> 0,8	27 (35,1)	107 (65,6)	3 (60)	137 (56)
	fehlend	14 (18,2)	26 (16)	1 (20)	41 (16,7)
	gesamt	77 (100)	163 (100)	5 (100)	245 (100)
Gesamtbilirubin					
	≤ 1,1 mg/dl	16 (20,8)	105 (64,4)	3 (60)	124 (50,6)
	> 1,1 mg/dl	47 (61)	33 (20,2)	1 (20)	81 (33,1)
	fehlend	14 (18,2)	25 (15,3)	1 (20)	40 (16,3)
	gesamt	77 (100)	163 (100)	5 (100)	245 (100)
Serumalbumin					
	< 3,5 g/dL	42 (54,5)	55 (33,7)	2 (40)	99 (40,4)
	3,5 – 5,4 mg/dl	20 (26)	63 (38,7)	2 (40)	85 (34,7)
	> 5,4 mg/dl	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	fehlend	15 (19,5)	45 (27,6)	1 (20)	61 (24,9)
	gesamt	77 (100)	163 (100)	5 (100)	245 (100)
Quick					
	< 70%	5 (6,5)	5 (3,1)	1 (20)	11 (4,5)
	≥ 70%	58 (75,3)	133 (81,6)	3 (60)	194 (79,2)
	fehlend	14 (18,2)	25 (15,3)	1 (20)	40 (16,3)
	gesamt	77 (100)	163 (100)	5 (100)	245 (100)
INR					

	kleiner 0,85	1 (1,3)	1 (0,6)	0 (0)	2 (0,8)
	0,85 bis 1,15	56 (72,7)	128 (78,5)	3 (60)	187 (76,3)
	größer 1,15	6 (7,8)	9 (5,5)	1 (20)	16 (6,5)
	fehlend	14 (18,2)	25 (15,3)	1 (20)	40 (16,3)
	gesamt	77 (100)	163 (100)	5 (100)	245 (100)
CA 19-9	< 37 U/ml	14 (18,2)	42 (25,8)	1 (20)	57 (23,3)
	≥ 37 U/ml	40 (51,9)	44 (27)	2 (40)	86 (35,1)
	fehlend	23 (29,9)	77 (47,2)	3 (60)	102 (41,4)
	gesamt	77 (100)	163 (100)	5 (100)	245 (100)
CA 19-9 in U/l Median (IQA)		140 (35,125-749,85)	40,5 (15-182,1)	1180	67 (21,4-368,9)
Hb bei ED					
♂	< 13,5 g/dl	21 (38,9)	21 (28,4)	1 (50)	43 (33,1)
	13,5 – 17,5 g/dl	21 (38,9)	44 (59,5)	1 (50)	66 (50,8)
	≥ 17,5 g/dl	0 (0)	1 (1,4)	0 (0)	1 (0,8)
	fehlend	12 (22,2)	8 (10,8)	0 (0)	20 (15,4)
	gesamt	54 (100)	74 (100)	2 (100)	130 (100)
♀	< 12 g/dl	9 (39,1)	8 (9)	1 (33,3)	18 (15,7)
	12 – 16 g/dl	11 (47,8)	62 (69,7)	1 (33,3)	74 (64,3)
	≥ 16 g/dl	1 (4,3)	1 (1,1)	0 (0)	2 (1,7)
	fehlend	2 (8,7)	18 (20,2)	1 (33,3)	21 (18,3)
	gesamt	23 (100)	89 (100)	3 (100)	115 (100)

8.8 Zum Kapitel 4.1.6 Gesamtüberleben (Overall Survival)

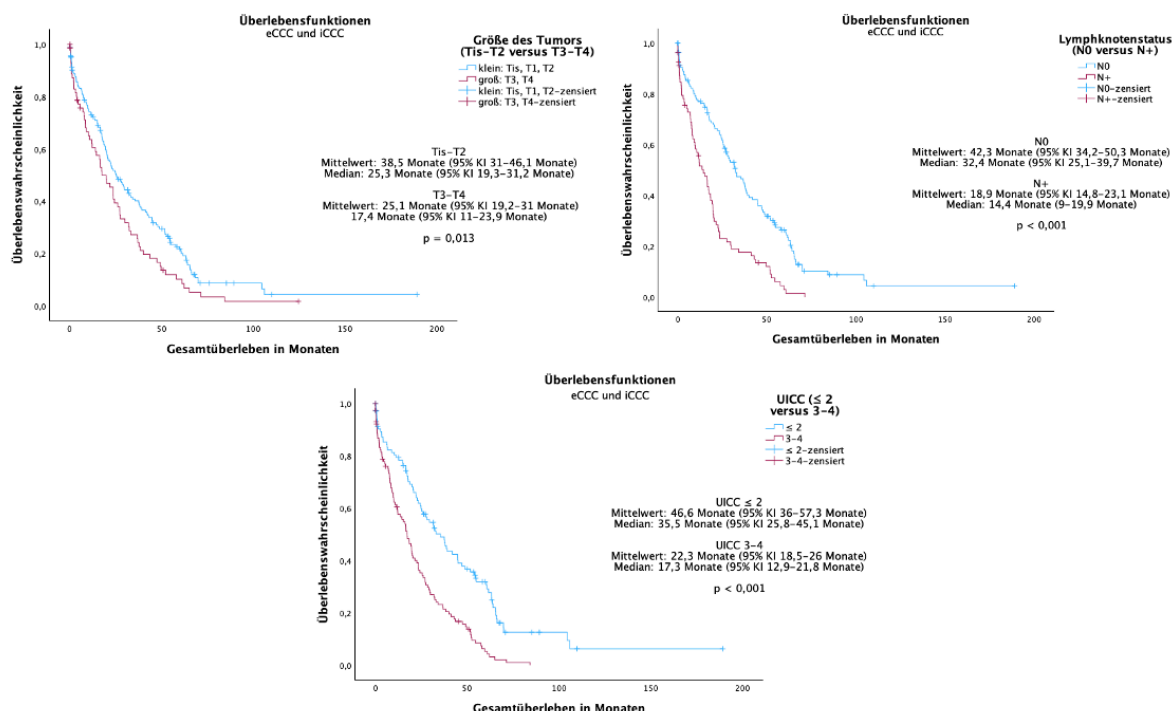


Abbildung 51: Überlebensfunktionen nach Kaplan-Meier für alle Patienten mit intra- und extrahepatischen Gallengangskarzinomen in Abhängigkeit von der Tumorgöße (T2 und kleiner versus T3 und größer), dem Lymphknotenstatus (N0 versus N+) und dem UICC-Stadium (kleiner gleich 2 versus drei und höher). Bei allen Vergleichen ergab sich eine statistische Signifikanz ($p = 0,013$, $p < 0,001$ und $p < 0,001$).

8.9 Zum Kapitel 4.2.1.1 Argpyrimidin im Tumor

Tabelle 47: Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich von Männern und Frauen hinsichtlich der Verteilung der Percent Points des IRS für Argpyrimidin. Mit einer asymptotischen Signifikanz von 0,431 zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern.

Percent Points des IRS für Argpyrimidin	n =	mittlerer Rang	Rangsumme	asypmt. Signifikanz (Mann-Whitney-U-Test)
Männer	121	112,24	13.581	
Frauen	108	118,09	12.754	0,431

8.10 Zum Kapitel 4.3.1.1 Argpyrimidin – Patientenspezifische Eigenschaften

Tabelle 48: Kreuztabellen zur Korrelation zwischen Argpyrimidinnachweis im Tumor und Geschlecht, Alkohol- und Nikotinabusus sowie Nachweis eines Diabetes mellitus Typ 2. Bei keinem der patientenspezifischen Parameter zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p = 0,499, 1, 0,828$ und $0,695$)

		Argpyrimidin- Nachweis im Tumorgewebe			p-Wert (Chi-Quadrat)
		Negativ n (%)	Positiv n (%)	Gesamt n (%)	
Geschlecht	männlich	51 (42,1)	70 (57,9)	121 (100)	
	weiblich	40 (37)	68 (63)	108 (100)	
				229 (100)	0,499
Alkoholabusus	nein	86 (39,8)	130 (60,2)	216 (100)	
	ja	5 (41,7)	7 (58,3)	12 (100)	
				228 (100)	1
Nikotinabusus	nein	81 (39,5)	124 (60,5)	205 (100)	
	ja	10 (43,5)	13 (56,5)	23 (100)	
				228 (100)	0,823
Diabetes mellitus	nein	80 (40,6)	117 (59,4)	197 (100)	
	ja	11 (35,5)	20 (64,5)	31 (100)	
				228 (100)	0,695

8.11 Zum Kapitel 4.3.1.2 Argpyrimidin – Tumorspezifische Eigenschaften

Tabelle 49: Kreuztabellen zur Korrelation zwischen Argpyrimidinnachweis im Tumor und Lymphknoten- sowie Fernmetastasenstatus, UICC-Stadium und Tumorigradung. Bei keinem der tumorspezifischen Parameter zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p = 0,31, 0,225, 0,213$ und $0,748$).

		Argpyrimidin- Nachweis im Tumorgewebe			p-Wert (Chi-Quadrat)
		Negativ n (%)	Positiv n (%)	Gesamt n (%)	
Lymphknotenstatus	N0	61 (44,9)	75 (55,1)	136 (100)	
	N+	28 (36,8)	48 (63,2)	76 (100)	
				212 (100)	0,31
Fernmetastasenstatus	M0	78 (42,2)	107 (57,8)	185 (100)	
	M+	5 (26,3)	14 (73,7)	19 (100)	
				204 (100)	0,225
UICC-Stadium	≤ 2	37 (37)	63 (63)	100 (100)	
	≥ 3	51 (45,5)	61 (54,5)	112 (100)	
				212 (100)	0,213
Tumorigradung	gut	62 (37,8)	102 (62,2)	164 (100)	
	niedrig	22 (40,7)	32 (59,3)	54 (100)	
				218 (100)	0,748

8.12 Zum Kapitel 4.3.1.3 Argpyrimidin – Laborparameter

Tabelle 50: Kreuztabellen Argpyrimidinnachweis im Tumor und Laborparameter. Hierbei ergab sich für keinen der erhobenen Laborparameter ein statistisch signifikanter Zusammenhang.

		Argpyrimidin- Nachweis im Tu- morgewebe		p-Wert (Chi- Quadrat)
		Negativ n (%)	Positiv n (%)	Gesamt n (%)
CA 19-9	< 37 KU/l	23 (46)	27 (54)	
	≥ 37 KU/l	28 (34,1)	54 (65,9)	
		132 (100)		0,2
DeRitis-Quotient	Außerhalb des Normbereichs	60 (39,2)	93 (60,8)	
	Normbereich	14 (36,8)	24 (63,3)	
		191 (100)		0,854
Serumbilirubin	Normwert (< 1,1 mg/dl)	45 (37,5)	75 (62,5)	
	erhöhtes Bilirubin (≥1,1 mg/dl)	29 (40,3)	43 (59,7)	
		192 (100)		0,76
Albumin	Unterhalb des Normwerts	36 (39,6)	55 (60,4)	
	Normwert	31 (38,3)	50 (61,7)	
		172 (100)		0,877
Quick	Unterhalb des Normwerts	1 (12,5)	7 (87,5)	
	Normbereich	73 (39,7)	111 (60,3)	
		192 (100)		0,155
INR	Norm	68 (38)	111 (62%)	

Oberhalb des
Normbereichs 6 (46,2) 7 (53,8)

192 (100) 0,568

8.13 Zum Kapitel 4.3.1.5 Argpyrimidin – Überleben

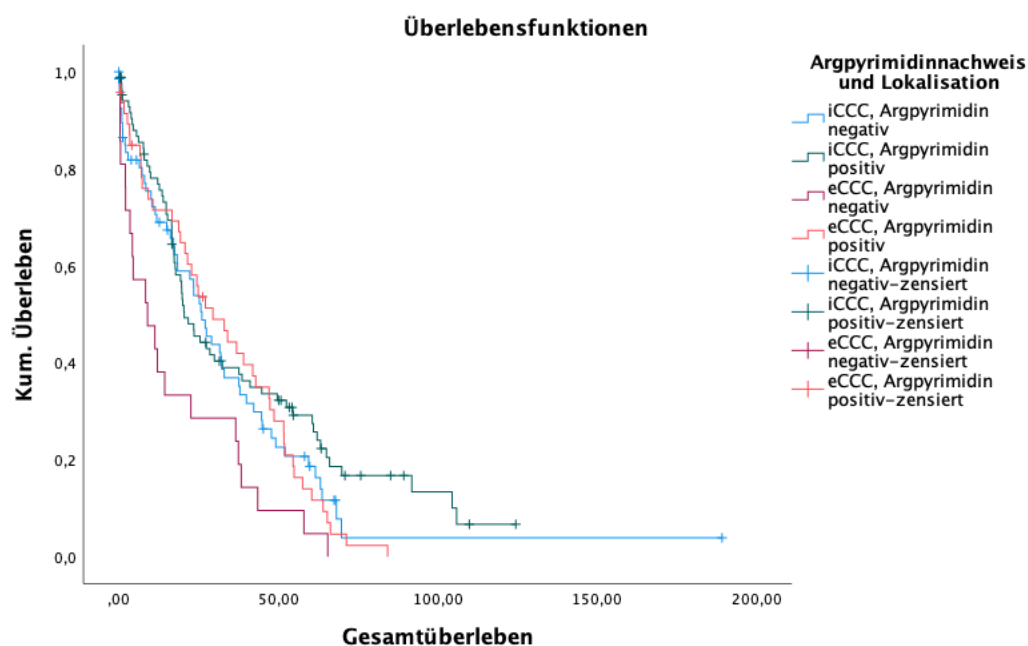


Abbildung 52: Viergruppenvergleich von Argpyrimidinnachweis und Lokalisation des Primarius. Argpyrimidinnegative extrahepatische Tumoren scheinen das kürzeste Überleben aufzuweisen.

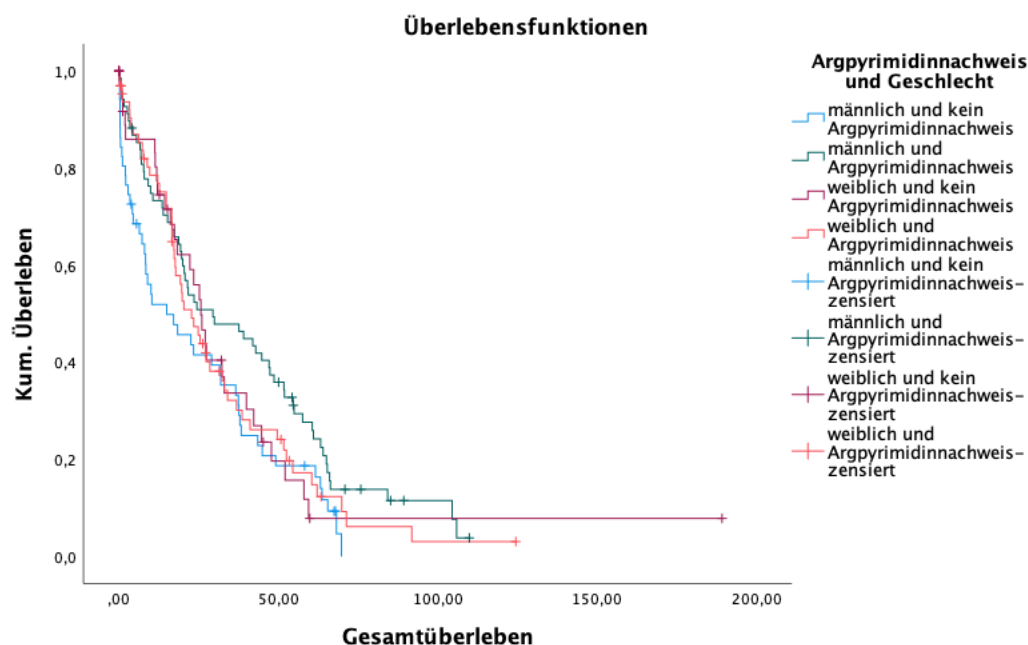


Abbildung 53: Viergruppenvergleich über das Überleben von Frauen und Männern mit bzw. ohne Argpyrimidinnachweis im Tumor, dargestellt anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms. Zu erkennen ist ein signifikanter Unterschied im Überleben im Vergleich zwischen Männern mit und ohne Argpyrimidinnachweis, wohingegen der Argpyrimidinstatus bei Frauen keinen statistisch bedeutsamen Unterschied im Überleben erbrachte.

8.14 Zum Kapitel 4.3.2.2 Sirtuin 6 – Tumorspezifische Parameter

Tabelle 51: Kreuztabelle für den Sirtuin 6 Nachweis im Tumor und tumorspezifischer Charakteristika. Hier ließ sich keine statistisch signifikante Korrelation erheben.

		Sirtuin 6- Nachweis im Tu- morgewebe			p-Wert (Chi-Quad- rat)
		Negativ n (%)	Positiv n (%)	Gesamt n (%)	
Lokalisation	extrahepatisch	29 (42,6)	39 (57,4)	68 (100)	0,772
	intrahepatisch	70 (44,9)	86 (55,1)	156 (100)	
Tumorgröße	Tis-T2	70 (45,8)	83 (54,2)	153 (100)	0,469
	T3-T4	28 (40)	42 (60)	70 (100)	
N-Status	N0	59 (44,4)	74 (55,6)	133 (100)	0,771
	N+	31 (41,9)	43 (58,1)	74 (100)	
M-Status	M0	77 (42,3)	105 (57,7)	182 (100)	1
	M+	7 (38,9)	11 (61,1)	18 (100)	
UICC-Stadium	0-2	47 (47,5)	52 (52,5)	99 (100)	0,261
	3-4	42 (38,9)	66 (61,1)	108 (100)	
Tumorgrading	gut	74 (46)	87 (54)	161 (100)	0,524
	schlecht	21 (40,4)	31 (59,6)	52 (100)	

8.15 Zum Kapitel 4.3.2.3 Sirtuin 6 – Laborparameter

Tabelle 52: Kreuztabellen Sirtuin 6-Nachweis im Tumor und erhobene Laborparameter.

		Sirtuin 6-Nachweis des Tumors			p-Wert (Chi- Quadrat)
CA 19-9		Negativ (%)	Positiv (%)	Gesamt (%)	
< 37 kU/l		18 (36)	32 (64)		0,853
≥ 37 kU/l		32 (39)	50 (61)		
		50 (37,9)	82 (62,1)	132 (100)	
DeRitis-Quoti- ent					
Außerhalb des Normbereichs		64 (41,8)	89 (58,2)		0,855
Innerhalb des Normbereichs		15 (39,5)	23 (60,5)		
		79 (41,4)	112 (58,6)	191 (100)	
Gesamtbiliru- bin					

	<1,1 mg/dl	49 (40,8)	71 (59,2)		
	≥1,1 mg/dl	31 (43,1)	41 (56,9)		
		80 (41,7)	112 (58,3)	192 (100)	0,765
Albumin					
	<3,5 g/dl	44 (48,4)	47 (51,6)		
	≥3,5 g/dl (bis 5,4 g/dl)	24 (29,6)	57 (70,4)		
		68 (39,5)	104 (60,5)	172 (100)	0,013
Quick					
	Unterhalb des Normbereichs	3 (37,5)	5 (62,5)		
	Im Normbereich	77 (41,8)	107 (58,2)		
		80 (41,7)	112 (58,3)	192 (100)	1
INR					
	Norm	72 (40,2)	107 (59,8)		
	erhöht	8 (61,5)	5 (38,5)		
		80 (41,7)	112 (58,3)	192 (100)	0,153

8.16 Zum Kapitel 4.3.2.5 Sirtuin 6 – Sirtuin 6 in der Leber

Tabelle 53: Kreuztabelle zwischen SIRT6-Nachweis in der den Tumor umgebenden Leber und der Tumorgroße. Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Tumorgroße und dem Nachweis von SIRT6 in der den Tumor umgebenden Leber (p -Wert (Chi-Quadrat) = 0,641).

		Sirtuin 6-Nachweis der Leber			p-Wert (Chi-Quadrat)
		Negativ n (%)	Positiv n (%)	gesamt n (%)	
Tumorgroße	klein (bis T2)	65 (67)	64 (70,3)	129 (68,6)	
	groß (T3-T4)	32 (33)	27 (29,7)	59 (31,4)	
				188 (100)	0,641

Tabelle 54: Kreuztabelle zwischen SIRT6-Nachweis in der den Tumor umgebenden Leber und dem Alter. Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Nachweis von SIRT6 in der den Tumor umgebenden Leber (p -Wert (Chi-Quadrat) = 1).

		SIRT6-Nachweis in der Leber			p-Wert (Chi-Quadrat)
		negativ n (%)	positiv n (%)	gesamt n (%)	
Alter	< 65 Jahre	47 (48)	44 (48,4)	91 (48,1)	
	≥ 65 Jahre	51 (52)	47 (51,6)	98 (51,9)	
				189 (100)	1

Tabelle 55: Kreuztabelle zwischen SIRT6-Nachweis in der den Tumor umgebenden Leber und dem Fernmetastasenstatus. Es zeigte sich nur eine Tendenz eines Zusammenhangs zwischen Fernmetastasenstatus und dem Nachweis von SIRT6 in der den Tumor umgebenden Leber (p -Wert (Chi-Quadrat) = 0,103)

		SIRT6-Nachweis in der Leber		p-Wert (Chi-Quadrat)
		negativ n (%)	positiv n (%)	
Fernmetastasen	M0	74 (87,1)	11 (12,9)	0,103
	M+	78 (95,1)	4 (4,9)	
		gesamt n (%)		167 (100)

8.17 Zum Kapitel 4.3.2.6 Sirtuin 6 – Überleben

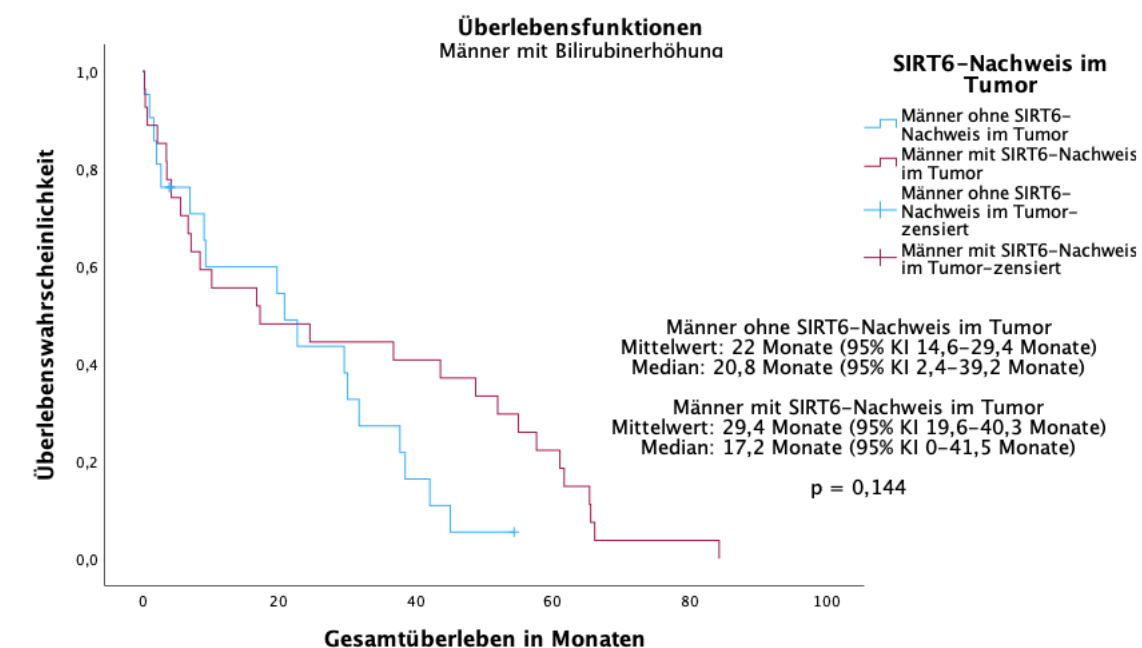


Abbildung 54: Selektion aller Männer mit Bilirubinerhöhung. Es zeigt sich, dass - im Gegensatz zu den weiblichen Patienten - kein Überlebensvorteil durch den Nachweis von SIRT6 im Tumor bietet. Mediane Überlebenszeit ohne SIRT6-Nachweis 20,8 Monate (95% KI 2,4–39,2 Monate) versus 17,2 Monate (95% KI 0–41,5 Monate) mit SIRT6-Nachweis, p (Log Rank) (Mantel Cox) 0,144 (Chi-Quadrat 2,136 (df 1)).

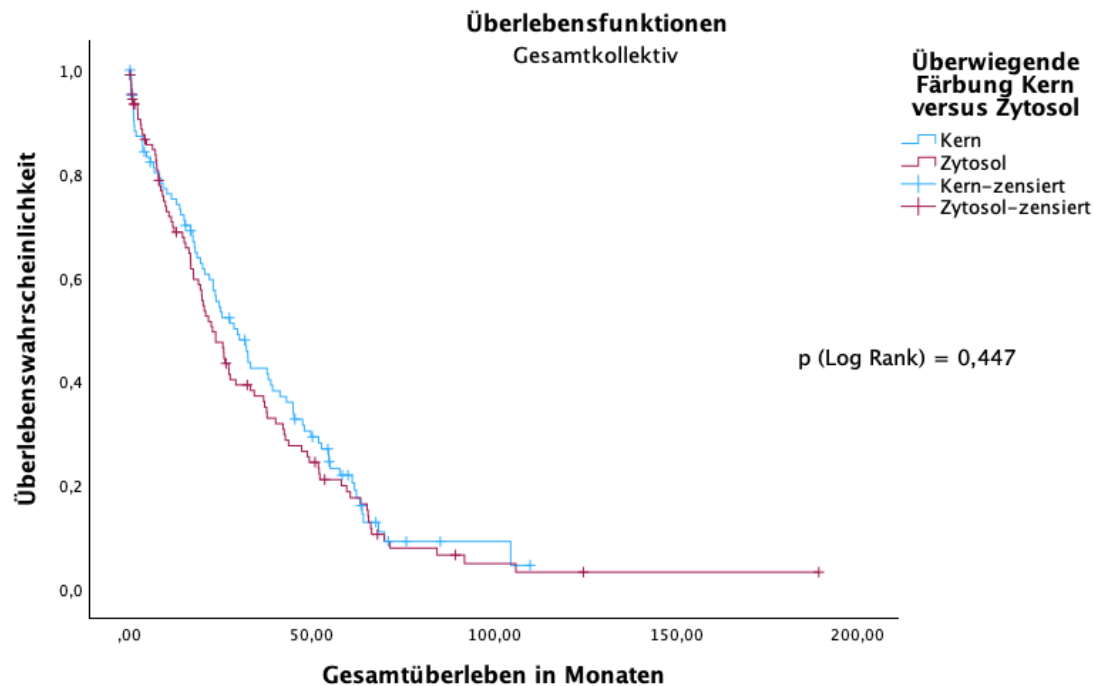


Abbildung 55: Vergleich der Überlebenszeit anhand eines Kaplan-Meier-Diagramms hinsichtlich dem überwiegen- den Nachweisort von SIRT6 im Tumor. Bei Tumoren mit überwiegendem nuklärem Nachweis zeigte sich eine mitt- lere Überlebenszeit von 36,2 Monaten (95% KI 29,8-42,5 Monate), im Median betrug sie 29,5 Monate (95% KI 21,4- 37,6 Monate). Dahingegen war die mittlere Überlebenszeit bei vorwiegend zytosolischem Nachweis 35 Monate (95% KI 27,1-42,8 Monate), im Median 22,6 Monate (95% KI 17,3-28 Monate). p (Lok Rank) = 0,447. Die Gruppe der Präparate mit 50:50-Verteilung hob sich deutlich von den beiden anderen Gruppen ab, wurde jedoch aufgrund der kleinen Fallzahl von $n = 15$ und der Ungenauigkeit einer menschlichen Bewertung aus dem Vergleich heraus- genommen.

8.18 Zum Kapitel 5.2 – Argpyrimidin

Tabelle 56: Kreuztabelle über den Zusammenhang zwischen Tumorgroße und Differenzierungsgrad. Es zeigte sich, dass kleinere Tumoren (kleiner T3) häufiger ein besseres histopathologisches Grading aufwiesen als große Tumoren. p-wert (Chi-Quadrat) = 0,048.

		Tumorgroße		Gesamt n (%)	p-Wert (Chi-Quadrat)
		klein (Tis – T2) n (%)	groß (T3 – T4) n (%)		
Differenzierung	gut	127 (73)	47 (27)	174 (75)	0,048
	niedrig	34 (58,6)	24 (41,4)	58 (25)	
				232	

8.19 Zum Kapitel 5.3 – Sirtuin 6

Tabelle 57: Kreuztabelle zwischen SIRT6-Nachweis in der den Tumor umgebenden Leber und dem Alter. Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Nachweis von SIRT6 in der den Tumor umgebenden Leber (p-Wert (Chi-Quadrat) = 1).

		SIRT6-Nachweis in der Leber		gesamt n (%)	p-Wert (Chi-Quadrat)
		negativ n (%)	positiv n (%)		
Alter	< 65 Jahre	47 (48)	44 (48,4)	91 (48,1)	1
	≥ 65 Jahre	51 (52)	47 (51,6)	98 (51,9)	
				189 (100)	

9 Danksagung

Mein gebührender Dank geht an Herrn Prof. Möhler aus der I. medizinischen Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz, der mir als mein Doktorvater die Möglichkeit gegeben hat, mich detailliert mit diesem spannenden Thema auseinandersetzen und promovieren zu dürfen. Vielen Dank an Priv.-Doz. Hollenbach für das zweite Gutachten dieser Arbeit.

Im Weiteren danke ich Frau Dr. rer. nat. Maderer aus tiefsten Herzen für die Betreuung über mehrere Jahre, hilfreiche Tipps und unterstützende Worte. Nicht nur für die Dissertation selbst, sondern auch für alle weiteren Projekte – wie die Postervorstellung auf dem GARPS – war sie stets fachliche und emotionale Unterstützung.

Vielen Dank an Herrn Dr. med. Michel, der im Rahmen seiner Post-Doc-Position an der Arbeit interessiert war und mit Engagement und freundschaftlichem Ehrgeiz meinen Prozess begleitet hat.

Ich danke dem Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz, allem voran Frau Prof. Univ. Prof. Straub und Herrn Dr. med. Ridder, für die Beratung hinsichtlich der histopathologischen Auswertung.

Ich danke dem Team der Arbeitsgruppe Prof. Möhler bei der Unterstützung und Anfertigung der histopathologischen Präparate.

Vielen Dank an das Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) der Johannes-Gutenberg-Universität, im Speziellen an Herrn Brahim Aboulmaouahib, für die statistische Beratung und Prüfung dieser Arbeit.

Mein tiefster Dank gilt meinem Ehemann Kevin, der mich auf dem Weg in und durch das Studium sowie während aller Höhen und Tiefen dieser Arbeit mit unermüdlicher emotionaler Unterstützung begleitet hat. Meiner Schwester Caroline danke ich dafür, dass sie stets an meiner Seite steht – als treue Cheerleaderin, die nie an mir gezweifelt hat. Ein besonderer Dank gilt meiner Mutter Dagmar, die mit ihrer Fürsorge, ihrer Stärke und all den kleinen großen Gesten genau das tut, was nur Mütter können.

Von Herzen danke ich zuletzt meinem Vater Ulrich, der schon früh meinen Forschergeist geweckt und mich ermutigt hat, Fragen zu stellen und neugierig zu bleiben. Wir haben uns oft ausgemalt, diese Arbeit eines Tages gemeinsam zu besprechen – dazu sollte es nicht mehr kommen. Doch ein Leitspruch von ihm hat mich durch viele Phasen begleitet und mir Orientierung gegeben:

„Der Weg ist das Ziel.“ – Konfuzius