

Expression mitophagieassoziierter Proteine im cholangiozellulären Karzinom

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Jan Pfeifer
aus Kassel
2023

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: Prof. Dr. Marieta Toma

2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Kunz

Tag der Mündlichen Prüfung: 22.06.2023

Aus dem Institut für Pathologie

Direktor: Prof. Dr. med. Glen Kristiansen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung.....	8
1.1 Überblick	8
1.2 Epidemiologie.....	8
1.3 Risikofaktoren	9
1.3.1 Geschlecht und Alter	9
1.3.2 Herkunft.....	9
1.3.3 Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC)	9
1.3.4 Gallengangszysten.....	10
1.3.5 Parasiten	10
1.3.6 Hepatolithiasis	11
1.3.7 Thorotrast.....	11
1.3.8 Sonstige	11
1.4 Histologie und <i>Grading</i>	12
1.5 Molekulare Pathogenese	14
1.5.1 Chronische Entzündung	14
1.5.2 Cholestase	15
1.6 TNM-Klassifikation	16
1.7 Therapie des cholangiozellulären Karzinoms.....	22
1.8 Prognosefaktoren beim cholangiozellulären Karzinom	22
1.9 Mitophagie.....	23
1.9.1 Grundlagen der Mitophagie.....	23
1.9.2 Mitophagie und Krebs	23
1.9.3 Rolle von PINK1, Parkin und PACRG in der Mitophagie.....	24
1.9.4 Rolle von PINK1, Parkin und PACRG bei Krebs	26
1.10 Zielsetzung der Studie	27
2. Material und Methoden	28
2.1 Patientenkollektiv	28
2.2 Organoide	28
2.3 Tissue Microarray.....	30

2.4 Immunhistologie	30
2.5 Scannen der TMAs	31
2.6 Semiquantitative Einteilung der TMAs	32
2.7 RNA-Extraktion	32
2.8 Messung der isolierten RNA-Menge	33
2.9 cDNA-Umschreibung	34
2.10 qPCRs.....	34
2.11 $\Delta\Delta C_t$ -Methode.....	38
2.12 Statistische Auswertung.....	39
3. Ergebnisse	41
3.1 RNA-Expression von PINK1, PARK2 und PACRG im CCC.....	41
3.2 Protein-Expression von PINK1, PARK2 und PACRG im CCC.....	42
3.2.1 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung	42
3.2.2 Überlebensanalyse des Patientenkollektivs in Bezug auf T-Stadium und N-Stadium	45
3.2.3 Proteinexpression von PINK1, Parkin und PACRG in Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Daten	48
3.2.3.1 Proteinexpression von PINK1 in Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Daten	49
3.2.3.2 Proteinexpression von Parkin in Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Daten	51
3.2.3.2 Proteinexpression von PACRG in Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Daten	52
4. Diskussion	54
4.1 PINK1 mit ambivalenter Rolle in Karzinomen.....	54
4.2 Parkin als Tumorsuppressor	55
4.3 PACRG ohne nachweisbaren Zusammenhang zwischen Expression und Tumorverhalten.....	55
4.4 Andere Studien über PINK1, Parkin und PACRG im CCC.....	56
4.5 Ein Blick auf PTEN – Namensgebend für PINK1	57
4.6 Andere Mitophagieassoziierte Proteine im CCC	58
4.7 Eigenheiten des Patientenkollektivs der vorliegenden Studie	58

5. Zusammenfassung.....	61
6. Anhang	62
7. Abbildungsverzeichnis	67
8. Tabellenverzeichnis.....	68
9. Literaturverzeichnis.....	69
10. Danksagung.....	76

Abkürzungsverzeichnis

AID	Activation-Induced cytidine Deaminase
BNIP1	BCL2 interacting protein 1
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
CDKN2A	Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A
COX-2	Cyclooxygenase 2
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DCC	Distales extrahepatisches cholangiozelluläres Karzinom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT1	DNA-Methyltransferase 1
dsDNA	doppelsträngige DNA
ECC	Extrahepatisches cholangiozelluläres Karzinom (PCC und DCC gemeinsam)
EGF	Epidermal Growth Factor
EGF-R	Epidermal Growth Factor Receptor
ERK1/2	Extracellular signal-Regulated Kinase
FUNDC1	FUN14 Domain Containing 1
GPBAR1	G-Protein coupled Bile Acid Receptor 1
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HER-2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HRP	Horseradish peroxidase
HSP	Heat Shock Protein
ICC	Intrahepatisches cholangiozelluläres Karzinom
IHC	Immunhistochemie
IL-6	Interleukin-6
INK4a	Inhibitors of CDK4
JAK	Januskinase
(K)RAS	(Kirsten) Rat Sarcoma
MAPK	Mitogen-Aktivated Protein Kinase
Mcl-1	Myeloid cell leukemia 1

MUC-2	Mucin 2
MYC	Avian Myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog
NF- κ B	Nuclear Factor-Kappa B
NTC	Non-template control
OPTN	Optineurin
PACRG	Parkin Coregulated Gene protein
PARL	Presenilin-Associated Rhomboid-Like
PCC	Perihiläres cholangiozelluläres Karzinom
PINK1	PTEN-induzierte Kinase 1
PIP2 bzw. PIP3	Phosphatidylinositolbi- bzw. triphosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PKB	Proteinkinase B
PPIA	Peptidylpropyl Isomerase A
PSC	Primär Sklerosierende Cholangitis
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma/ rat fibrosarcoma
RASSF1A	Ras association domain family 1 A
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
S1PR2	Sphingosin-1-Phosphatatrezeptor 2
SOCS3	Suppressor Of Cytokine Signaling 3
STAT	Signal Transducers and Activators of Transkription
TBP	TATA-Box Binding Protein
TGR5	Transmembraner G-Protein gekoppelter Rezeptor 5
TIM	Translocase of the Inner Membrane
TMA	Tissue-Microarray
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
TOM	Translocase of the Outer Membrane
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1. Einleitung

1.1 Überblick

Weltweit sind die malignen Tumorerkrankungen die zweithäufigste Todesursache dicht hinter den kardiovaskulären Erkrankungen (Statistisches Bundesamt (Destatis), 2021).

Krebs entsteht durch eine Dysbalance von wachstumshemmenden und wachstumsfördernden Signalen. Gewinnen Letztere die Oberhand können sich Zellen unter Umständen unbegrenzt oft teilen und erlangen eventuell auch die Fähigkeit, sich aus dem Zellverband zu lösen und an anderer Stelle wieder anzusiedeln, das heißt zu metastasieren.

Einige Gene wurden bereits als zentrale Schaltstellen in der Tumorgenese entdeckt, viele sind noch unverstanden. Je nach Tumorart können auch verschiedene Mechanismen eine Rolle spielen.

Das cholangiozelluläre Karzinom (CCC) stellt zwar keinen häufigen Vertreter von malignen Tumorerkrankungen dar, ist aber durch seine oftmals sehr aggressive Natur eine nicht zu vernachlässigende Erkrankung.

Der Selbstverdau von beschädigten Mitochondrien, die Mitophagie, ist ein Prozess, der Einfluss auf den natürlichen Zelltod, die Apoptose, und somit auch auf die Tumorgenese nehmen kann.

In der Mitophagie wurden einige Moleküle von zentraler Bedeutung gefunden. PINK1, Parkin und PACRG interagieren miteinander und sind nicht nur bei der Entstehung von Krebs beteiligt. Sie spielen teils auch eine Schlüsselrolle in der hereditären Form der Parkinson-Krankheit.

Diese Doktorarbeit hat untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem cholangiozellulären Karzinom und mitophagieassoziierten Proteinen besteht.

1.2 Epidemiologie

Das cholangiozelluläre Karzinom ist mit einer Inzidenz von 0,4 bis 1,8/100.000 Einwohner/Jahr nach dem hepatozellulären Karzinom der zweithäufigste primäre, maligne Tumor des hepatobiliären Systems (Blechacz, 2016). Auch wenn dieser seltene

Krebs damit nur 3% aller gastrointestinalen Tumoren ausmacht, macht ihn seine hohe Letalität mit einer 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) von 18% zu einem der aggressivsten Krebsarten (DeOliveira et al., 2007; Vogel et al., 2014).

Je nach seiner Lokalisation wird das cholangiozelluläre Karzinom in intrahepatisch (ICC) und extrahepatisch unterteilt. Letztere werden noch in perihiläre (PCC) (auch bekannt als Klatskin-Tumor) und distale Tumoren (DCC) unterschieden. Der intrahepatische Typ ist laut einer Studie im John Hopkins Hospital die seltenste Form mit 8%. In 50% der Fälle handelt es sich um die perihiläre Form. Auch der distale Typ wird mit 42% aller CCCs häufiger entdeckt (DeOliveira et al., 2007).

1.3 Risikofaktoren

Zuerst wendet sich dieses Unterkapitel den Risikofaktoren zu, die definitiv nicht zu beeinflussen sind, wie Alter und Geschlecht. Die darauf folgenden Abschnitte sind den Risikofaktoren gewidmet, die extern womöglich bzw. mit Sicherheit beeinflussbar sind.

1.3.1 Geschlecht und Alter

Unter Männern ist das Risiko, an einem cholangiozellulären Karzinom zu erkranken, leicht erhöht. Die Wahrscheinlichkeit liegt ca. 1,2-1,5-fach höher als bei Frauen (Tyson und El-Serag, 2011). Typischerweise manifestiert sich das CCC bei Patienten der 7. Lebensdekade. Ohne das Vorliegen von weiteren Risikofaktoren ist das cholangiozelluläre Karzinom bei Menschen unter 40 Jahren ungewöhnlich (Tyson und El-Serag, 2011; Blechacz, 2016).

1.3.2 Herkunft

Auch die Herkunft korreliert mit dem Risiko für die Entwicklung eines CCCs. So haben Asiaten und Hispanoamerikaner mit 3,3 bzw. 2,8/100.000 Einwohnern/Jahr die größte, nicht-hispanische Weiße und Schwarze mit jeweils 2,1/100.000 Einwohner/Jahr die geringste Wahrscheinlichkeit, ein CCC zu bekommen (Everhart und Ruhl, 2009).

1.3.3 Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC)

Bei Patienten, die an PSC erkrankt sind, erhöht sich das Risiko, ein CCC zu entwickeln drastisch, sodass sich auch das mediane Erkrankungsalter in die 4.-5. Lebensdekade

vorverschiebt, meist wenige Jahre nachdem die Patienten an PSC erkranken (Tyson und El-Serag, 2011; Boonstra et al., 2012). Zirka 10% aller Patienten, die ein CCC entwickeln, sind ebenfalls an PSC erkrankt (LaRusso et al., 2006). Währenddessen liegt die statistische Wahrscheinlichkeit, ein CCC zu entwickeln, wenn man von der Diagnose PSC erfährt, bei 6%-36%. Damit gilt die PSC in westlichen Ländern als der größte bekannte Risikofaktor, an einem CCC zu erkranken (Tyson und El-Serag, 2011).

1.3.4 Gallengangszysten

Ein weiterer bedeutender angeborener Risikofaktor für die Entwicklung eines CCCs, stellen Gallengangszysten dar. Insbesondere in Asien zeichnet sich das Vorliegen solcher Zysten als Risikofaktor für CCCs ab. Im Vergleich zu mit Gallengangszysten Betroffenen aus den USA, welche eine Inzidenz von 6% für ein CCC besitzen, haben Asiaten mit Gallengangszysten mit einer Inzidenz von 16% ein wesentlich erhöhtes Risiko für ein CCC (Tyson und El-Serag, 2011; Watanabe et al., 1999). Hinzu kommt eine im Vergleich zu den USA oder Australien erhöhte Inzidenz für Gallengangszysten in Asien, insbesondere in Japan (Söreide et al., 2004). Personen, die aufgrund von Gallengangszysten ein CCC entwickeln, tun dies früher als die normale Bevölkerung. Das mittlere Alter der Erstdiagnose eines CCCs liegt bei diesen Menschen bei 32 Jahren (Tyson und El-Serag, 2011).

Die Genese der Zysten ist nicht abschließend geklärt, es lassen sich jedoch Rückschlüsse auf das gemeinsame Vorliegen eines langen (>15 mm) Ductus choledochus und eines anormalen pankreatikobiliären Zusammenflusses ziehen. Auch die deutlich unterschiedliche Geschlechterverteilung (Frauen sind ca. acht Mal häufiger betroffen als Männer) ist unklarer Ätiologie (Söreide et al., 2004).

Die erfolgreiche Exzision der Gallengangszysten senkt das Risiko an einem CCC zu erkranken auf 1/20 des Risikos ohne Entfernung. Allerdings ist die Inzidenz mit einem Wert von 0,7% trotz des chirurgischen Eingriffs ungefähr 200-fach höher als in der Normalbevölkerung (hier: Japan) (Watanabe et al., 1999).

1.3.5 Parasiten

Außerhalb des industrialisierten Westens gilt insbesondere in Südostasien die Infektion mit Leberegelns als wichtiger Risikofaktor für die Entstehung eines cholangiozellulären

Karzinoms. So lassen sich in Endemiegebieten in Thailand und Laos bis zu 2/3 aller CCCs auf eine Infektion mit *Opisthorchis viverrini* zurückführen. 90% aller malignen Lebertumoren stellen sich dort als intrahepatisches CCC dar. In Endemiegebieten in Korea sind immerhin 22,6% der CCCs auf Infektionen mit *Clonorchis sinensis* zurückzuführen (Stanley et al., 2000; Shaib und El-Serag, 2004; Shin et al., 2010).

1.3.6 Hepatolithiasis

Als weiterer etablierter Risikofaktor für die Erkrankung mit einem CCC ist insbesondere in Asien die Hepatolithiasis anzusehen. Darunter versteht man das Vorliegen von Gallensteinen in den intrahepatischen Gallenwegen (Shaib und El-Serag, 2004; Tyson und El-Serag, 2011). In westlichen Staaten spielt weder die Hepatolithiasis eine wesentliche Rolle, noch ist der Zusammenhang zum CCC ausreichend erforscht.

1.3.7 Thorotrast

Ein weiterer kausaler Zusammenhang besteht zwischen der Exposition mit karzinogenen Stoff Thorotrast, einem bis 1960 verwendeten Röntgenkontrastmittel und dem Auftreten von CCCs. Mit langen Latenzzeiten von 16 bis zu 45 Jahren ist das Risiko eines CCCs nach Thorotrast-Exposition im Vergleich zu Kontrollgruppen ohne Exposition zu diesem Kontrastmittel bis zu 300-fach erhöht (Tyson und El-Serag, 2011).

1.3.8 Sonstige

Zu diskutieren sind folgende noch nicht vollständig geklärte Risikofaktoren: Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen haben ein erhöhtes Risiko für CCCs. Dennoch ist es unklar, ob dieses Risiko durch die häufige Komorbidität PSC zu erklären ist oder ob die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen einen eigenständigen Risikofaktor darstellen. Eine ähnliche Stellung nimmt die Cholangitis ein. Auch hier ist es nicht geklärt, ob das beobachtete höhere Risiko der Erkrankung an einem CCC durch PSC bedingt ist (Tyson und El-Serag, 2011).

Das Vorliegen von Gallensteinen in den Gallenwegen scheint kein Risikofaktor für das Entwickeln extrahepatischer CCCs zu sein (Stanley et al., 2000). Für intrahepatische CCCs wiederum gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang mit einer Choledocholithiasis.

Chronische Hepatitis, Leberzirrhose, Diabetes mellitus, Adipositas, Alkoholabusus und Rauchen werden von einigen Studien als jeweils signifikant bewertet, während andere Studien keinen signifikanten Zusammenhang zum Entwickeln eines CCCs darstellen können (Tyson und El-Serag, 2011).

1.4 Histologie und *Grading*

Das CCC stellt sich mikroskopisch meistens als ein Adenokarzinom dar. Es bildet Drüsen aus, welche überwiegend von reichlich fibrösem Stroma umgeben sind. Erkennlich wird das CCC auch daran, dass es kein intrazelluläres Gallenpigment und keine hyalinen Einschlüsse besitzt. Im Gegensatz dazu sind die Zellen oft stark mit Muzinen gefüllt (Kumar et al., 2013).

Die Adenokarzinome der extrahepatischen CCCs werden je nach Drüsenanteil in gut differenzierte, mäßig differenzierte und schlecht differenzierte Typen unterschieden. Der Differenzierungsgrad der intrahepatischen CCCs wird anhand der Morphologie in die gleichen Gruppen unterteilt. Während gut differenzierte intrahepatische CCCs durch ihre einheitlichen tubulären und papillären Strukturen zu erkennen sind, kennzeichnen mäßig sowie schlecht differenzierte intrahepatische CCCs zunehmend deformierte tubuläre Strukturen, solides Wachstum und hochgradige Kernpleomorphie (Stanley et al., 2000).

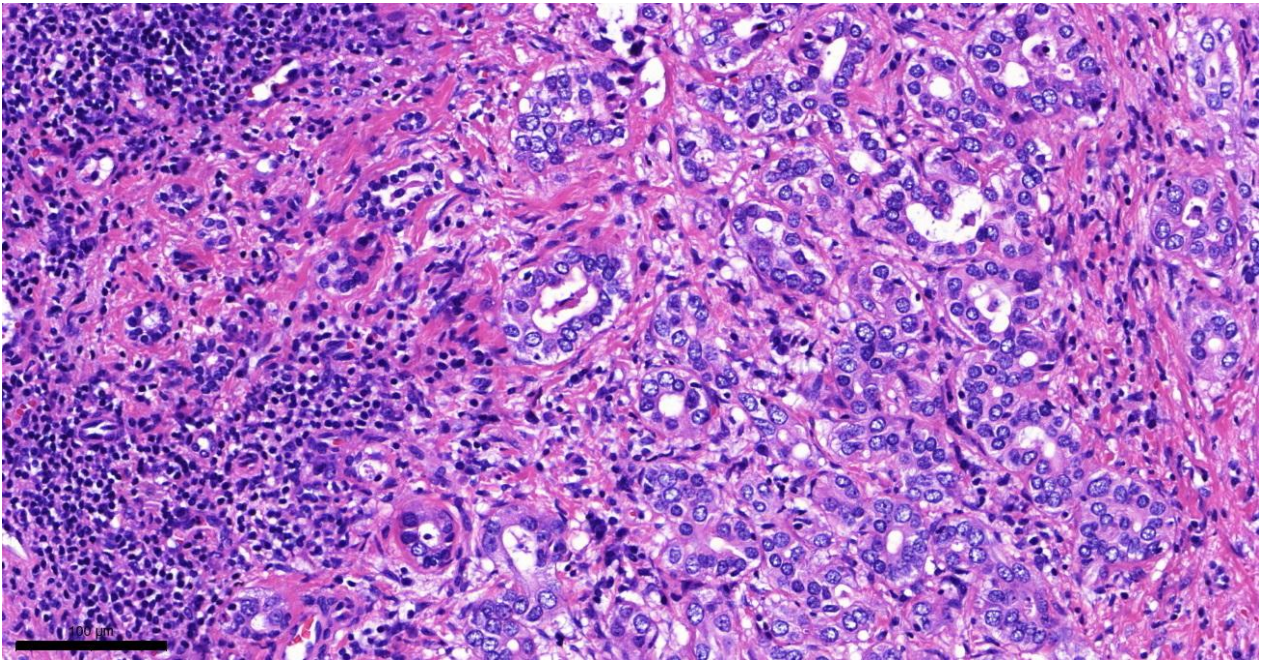


Abb. 1: Lichtmikroskopische Aufnahme eines intrahepatischen CCCs mit tubulärer Komponente (HE-Färbung) (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn), Skalierungsbalken links unten im Bild entsprechend 100 µm

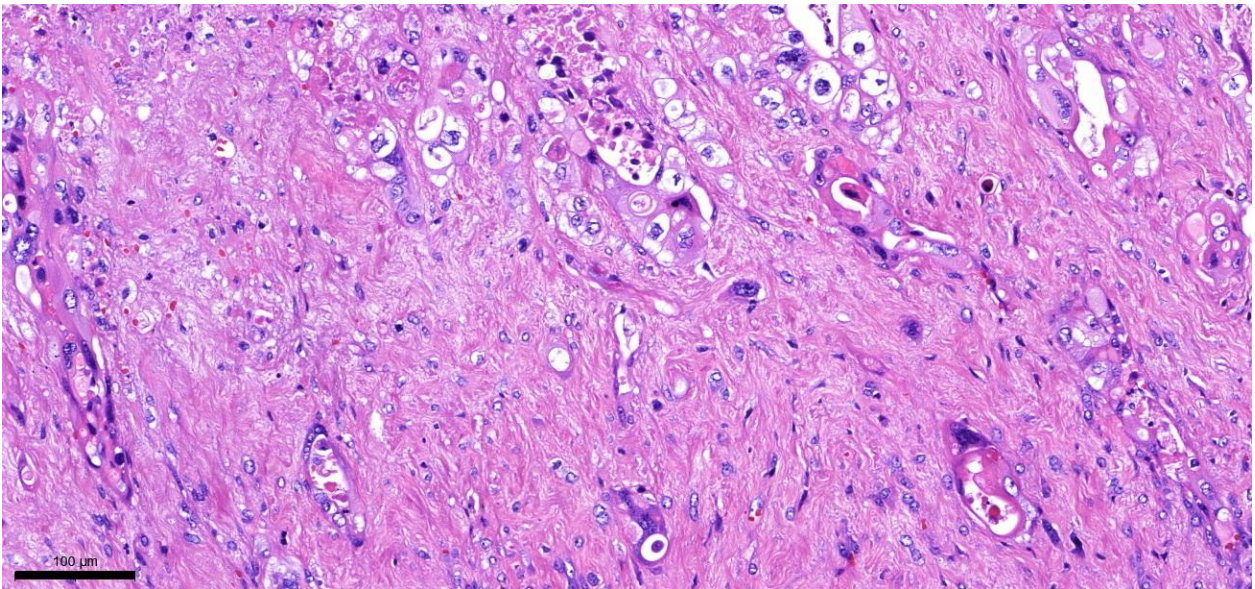


Abb. 2: Lichtmikroskopische Aufnahme eines intrahepatischen CCCs mit stark ausgeprägtem fibrösem Stroma (HE-Färbung) (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn), Skalierungsbalken links unten im Bild entsprechend 100 µm

1.5 Molekulare Pathogenese

Es konnte bereits eine Reihe von zugrundeliegenden Mechanismen der Karzinogenese von CCCs beschrieben werden. Viele der oben genannten Risikofaktoren lassen sich auf zwei Treiber der Karzinogenese zurückführen: Zum einen die chronische Entzündung und zum anderen die Cholestase, bei der es sich um den Stau von Gallensäuren handelt. Beide können eine Vielzahl von molekularen Kaskaden auslösen, die in ausgesetzten Cholangiozyten in Kultur oder in Mäusen Mutationen begünstigen, welche in Tumorsuppressorgenen, Proto-Onkogenen und DNA-*Mismatch-Repair*-Genen kritische Folgen haben. Außerdem fördern bestimmte Signaltransduktionsprozesse auf direktem Weg Proliferation, Migration sowie Angiogenese oder verhindern die Apoptose (Labib et al., 2019).

1.5.1 Chronische Entzündung

Das inflammatorische Zytokin Interleukin-6 (IL-6) wird in einer Vielzahl von CCCs verstärkt exprimiert und entfaltet über eine Reihe von intrazellulären Wegen seine karzinogene Wirkung (Labib et al., 2019). Über eine Aktivierung von STAT3 wird die Expression des Apoptose-Inhibitors Mcl-1 erhöht (Isomoto et al., 2007; Kobayashi et al., 2005). IL-6 fördert die Aktivierung von p38 MAPK, was eine verminderte Synthese von p21, einem Hemmer der Mitose, nach sich zieht (Tadlock und Patel, 2001). Des Weiteren stimuliert IL-6 die Aktivität der Telomerase, was ebenfalls ein verlängertes Leben des Cholangiozyten bewirkt (Stanley et al., 2000; Brito et al., 2015). Progranulin, ein Vorläuferprotein von Granulinen, wird ebenfalls durch IL-6 vermehrt gebildet. Granuline stimulieren den ProteinkinaseB- (PKB) bzw. *AKT*-Signalweg, welcher Zellteilung, Invasion, Angiogenese und Langlebigkeit der Zellen fördert. Interessanterweise produziert der Leberegel *O. viverrini* ein den Granulinen ähnelndes Protein (Ov-GRN-1), welches PKB auch direkt aktivieren kann (Labib et al., 2019). Zudem verändert IL-6 die Aktivität von bestimmten Mikro-RNAs (miRNA). Beispielsweise wird die DNMT1-Translation durch die verminderte Aktivität von miR-148a und miR-152 enthemmt. Dadurch werden Tumorsuppressorgene wie CDKN2A (p16^{INK4a}) und RASSF1A durch DNMT1 methyliert und dadurch gehemmt (Braconi et al., 2010; Labib et al., 2019). Ein möglicher Grund für die oft hohen Expressionslevel von IL-6 in CCCs konnte auch identifiziert werden: In CCCs konnte eine Störung der negativen Rückkopplung über SOCS3 nach-

gewiesen werden (Isomoto et al., 2007). Normalerweise stimuliert IL-6 seine eigene Hemmung über JAK/STAT, welches SOCS3 aktiviert. Dieses wiederum hemmt die Bildung von neuem IL-6. Epigenetisches *Silencing* (Stilllegen) von SOCS3 konnte in CCCs beschrieben werden und führt so zu einer übermäßigen Produktion von IL-6 (Isomoto et al., 2007).

Ein weiteres infektionsassoziiertes Zytokin, TNF- α , aktiviert ein in CCCs nahezu immer exprimiertes Protein: die sogenannte *Activation-Induced cytidine Deaminase* (AID). Dieses Enzym wandelt Cytosin in Uracil um und bewirkt so Mutationen in kritischen Tumorsuppressorgenen wie beispielsweise in p53 oder in MYC-Protoonkogenen. AID ist in Patienten mit PSC und CCCs stark exprimiert, in normalen Cholangiozyten jedoch kaum nachzuweisen (Komori et al., 2008).

Über Makrophagen wird der Wnt-Signalweg aktiviert, an dessen Ende ein verminderter Abbau von Beta-Catenin steht (Boulter et al., 2015). Beta-Catenin reichert sich zytoplasmatisch und nukleär an und fördert die Transkription von Onkogenen wie MYC oder cyclinD-1 (Shang et al., 2017).

Die Cyclooxygenase-2 (COX-2) ist ebenfalls in die molekulare Pathogenese des CCCs eingebunden. Inhibitoren der COX-2 wie Celecoxib können in Cholangiokarzinomen die Apoptose induzieren und den Mitosehemmer p21 stimulieren (Han et al., 2004).

1.5.2 Cholestase

Der Stau von Gallensäuren führt zu einer verstärkten und andauernden Stimulation von Rezeptoren, die auf (konjugierte) Gallensäuren reagieren. Eine Aktivierung des Transmembranären G-Protein gekoppelten Rezeptors 5 (TGR5; auch: *G-protein coupled bile acid receptor 1* (GPBAR1)) reduziert Apoptose und fördert Proliferation (Jones et al., 2015). Durch den Sphingosin-1-Phosphatatrezeptor 2 (S1PR2) werden über ERK1/2, AKT, NF- κ B und COX-2 Zellproliferation, Migration und Überlebenszeit der Cholangiozyten gefördert (Dai et al., 2013; Liu et al., 2015; Wang et al., 2017). Auch Signaltransduktionswege, die durch chronische Entzündung gefördert werden, können durch Gallensäuren stimuliert werden. Neben Mcl-1, welches die Apoptose verhindert, wird so beispielsweise auch der EGF-Rezeptor (EGF-R) durch konjugierte Gallensäuren aktiviert. Eine Aktivierung des EGF-R wiederum verhindert durch p38 MAPK-Aktivierung die Bildung von p21 (Mitosehemmer) und stimuliert die Aktivität von Mcl-1 (Yoon et al.,

2002; Yoon et al., 2004). Teils konnten auch bestimmte Gallensäuren, wie Taurocholsäure oder Desoxycholsäure als Treiber der Proliferation von Cholangiozyten identifiziert werden (Liu et al., 2015; Labib et al., 2019).

1.6 TNM-Klassifikation

Die von der *Union for International Cancer Control (UICC) / American Joint Committee on Cancer (AJCC)* herausgegebene TNM-Klassifikation (American Joint Committee on Cancer, 2022) dient einer Beschreibung des Ausmaßes vieler Tumorerkrankungen. TNM ist die Kurzbezeichnung für Tumor, Nodus lymphoideus (Lymphknoten) und Fernmetastasen. Bei dieser Klassifikation wird jede der einzelnen Kategorien anhand von klinischen, bildgebenden und pathologischen Daten möglichst genau beschrieben. Unter „T“ spielen Größe und Ausdehnung des Primärtumors sowie das Vorhandensein von Gefäßneubildungen eine Rolle. „N“ beschreibt das Ausmaß der regionalen lymphoiden Metastasierung und „M“ gibt Aufschluss über den Fernmetastasenstatus. Jeder Kategorie wird je nach Ausprägungsgrad eine Stufe zugeordnet. Je höher die Stufe, desto stärker die Ausprägung.

T reicht meist von 1 bis 4, wobei sich auch Untergruppen wie T2a oder T2b etablieren können. N0 besagt, dass keine Lymphknotenmetastasen festgestellt werden konnten. N1 und (je nach Tumorentität auch) N2 zeigen das Vorhandensein bzw. das Ausmaß der lymphogenen Tumorausbreitung an. Zu guter Letzt zeigt ein sogenannter M0- Status an, dass keine Fernmetastasen vorliegen. M1 bedeutet, dass Fernmetastasen detektiert werden konnten.

Jede Tumorentität besitzt eine spezifische Klassifikation. In **Tab. 1** wird die TNM-Klassifikation des intrahepatischen cholangiozellulären Karzinoms gezeigt, welche auch für andere intrahepatische Tumoren gültig ist. **Tab. 2** listet die TNM-Klassifikation für perihiläre cholangiozelluläre Karzinome. In **Tab. 3** findet sich die spezifische Klassifikation für Tumoren der distalen extrahepatischen Gallenwege. Die Ampulla vateri hat eine eigene Klassifikation, welche hier nicht aufgeführt ist.

Tab. 1: TNM-Klassifikation für intrahepatische CCCs (The American Cancer Society medical und editorial content team, 2017b)

TNM-Stufe		Beschreibung	
T	TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden	
	Tis	<i>Karzinoma in situ</i> = auf das Epithel beschränkte Ausbreitung	
	T1	T1a	Einzelner Tumor, 5 cm oder weniger im größten Durchmesser, ohne Gefäßeinbruch
		T1b	Einzelner Tumor, mehr als 5 cm im größten Durchmesser, ohne Gefäßeinbruch
	T2	Einzelner Tumor 2 mit Gefäßeinbruch oder multiple Tumoren, mit oder ohne Gefäßeinbruch	
	T3	Tumor perforiert das viszerale Peritoneum	
	T4	Direkte Tumorinvasion in lokale extrahepatische Strukturen	
N	NX	Regionale Lymphknotenmetastasen können nicht beurteilt werden	
	N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen	
	N1	Regionale Lymphknotenmetastasen	
M	M0	Keine Fernmetastasen nachweisbar	
	M1	Fernmetastasen	

Tab. 2: TNM-Klassifikation für perihiläre CCCs (The American Cancer Society medical und editorial content team, 2017c)

TNM-Stufe		Beschreibung	
T	TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden	
	Tis	<i>Karzinoma in situ</i> = auf das Epithel beschränkte Ausbreitung	
	T1	Tumor auf den Gallengang begrenzt	
	T2	T2a	Tumor erreicht durch die Wand des Gallengangs das umliegende Fettgewebe
		T2b	Tumor bricht in das umliegende Lebergewebe ein
	T3	Unilateraler Tumoreinbruch in Äste der Vena porta oder der Arteria hepatica	
	T4	Tumoreinbruch in die Vena porta oder Arteria hepatica oder ihre jeweiligen Äste beidseits; oder unilateraler Tumorbefall von Gallengängen 2. Ordnung bei kontralateralem Befall von Ästen der Vena porta oder der Arteria hepatica	
N	NX	Regionale Lymphknotenmetastasen können nicht beurteilt werden	
	N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen	
	N1	1-3 regionale Lymphknotenmetastasen	
	N2	4 oder mehr regionale Lymphknotenmetastasen	
M	M0	Keine Fernmetastasen nachweisbar	
	M1	Fernmetastasen	

Tab. 3: TNM-Klassifikation für distale extrahepatische CCCs (The American Cancer Society medical und editorial content team, 2017a)

TNM-Stufe		Beschreibung
T	TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
	Tis	<i>Karzinoma in situ</i> = auf das Epithel beschränkte Ausbreitung
	T1	Tumoreinbruch in die Gallengangwand mit einer Tiefe von weniger als 5 mm
	T2	Tumoreinbruch in die Gallengangwand mit einer Tiefe von 5 mm bis 12 mm
	T3	Tumoreinbruch in die Gallengangwand mit einer Tiefe von mehr als 12 mm
	T4	Tumoreinbruch in Truncus coeliacus, Arteria mesenterica superior und/oder Arteria hepatica communis
N	NX	Regionale Lymphknotenmetastasen können nicht beurteilt werden
	N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
	N1	1-3 regionale Lymphknotenmetastasen
	N2	4 oder mehr regionale Lymphknotenmetastasen
M	M0	Keine Fernmetastasen nachweisbar
	M1	Fernmetastasen

Je nachdem, auf welche Weise die Einteilung vorgenommen wurde, kann der TNM-Befund mit einem vorangestellten „c“ (cTNM) oder „p“ (pTNM) bezeichnet werden. Während der cTNM-Status auf einem klinischen Eindruck und/ oder bildgebenden Verfahren basiert, stellt der pTNM-Status das pathologische Stadium dar und kann daher oft erst nach Resektion des Tumors bestimmt werden. Manchmal ist nach einer Operation eine Änderung der Einteilung von einem cTNM- Status in einen pTNM-Status notwendig.

Außer den im Akronym TNM verwendeten Buchstaben finden oft noch andere Abkürzungen Verwendung. Prognostisch besonders wichtig ist das „R“, welches abbildet, wie viel Residualtumor sich nach einer Resektion noch im Patienten befindet. Chirurgisch anzustreben ist grundsätzlich R0, was mikroskopische Tumorfreiheit an den

Schnittträgern des Exzidates bedeutet. Bei einem R1-Status muss oft nachreseziert werden, da die Tumorränder mikroskopisch nicht tumorfrei sind. Bei R2 ist sich der Operateur bereits über verbliebenen Tumor im Patienten bewusst, da es makroskopische Schnittträger anzeigt.

Während die TNM-Klassifikation einen guten Überblick über den aktuellen Status der Tumorprogression gibt, ermöglicht das Einbeziehen aller drei Buchstaben in Stadien von 0 bis IV, dem sogenannten *Staging*, eine bessere Korrelation zur Prognose des Patienten.

Bei Tumoren des Stadium I handelt es sich meist um regional beschränkte Tumoren, Stadium II und III sind invasivere, lokal ausbreitende Tumoren, öfter mit Lymphknotenmetastasen. Stadium IV zeigt eine Fernmetastasierung und damit beinahe ausnahmslos eine schlechte Prognose an. Tumoren des Stadiums 0 stellen die Ausnahme dar, da sie entartete, dysplastische Zellen umfassen, die noch nicht die Basalmembran des Epithels überschritten haben.

Die folgenden Tabellen (**Tab. 4**, **Tab. 5** und **Tab. 6**) listen die Stadieneinteilungen für das intrahepatische und das perihiläre cholangiozelluläre Karzinom sowie der Tumoren der distalen extrahepatischen Gallenwege auf.

Tab. 4: Stadieneinteilung intrahepatischer CCCs (The American Cancer Society medical and editorial content team, 2017b)

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

Tab. 5: Stadieneinteilung perihilärer CCCs (The American Cancer Society medical und editorial content team, 2017c)

Stadium		T	N	M
0		Tis	N0	M0
I		T1	N0	M0
II		T2	N0	M0
III	IIIA	T3	N0	M0
	IIIB	T4	N0	M0
	IIIC	jedes T	N1	M0
IV	IVA	jedes T	N2	M0
	IVB	jedes T	jedes N	M1

Tab. 6: Stadieneinteilung distaler extrahepatischer CCCs (The American Cancer Society medical und editorial content team, 2017a)

Stadium		T	N	M
0		Tis	N0	M0
I		T1	N0	M0
II	IIA	T1	N1	M0
		T2	N0	M0
	IIB	T2	N1	M0
		T3	N0-N1	M0
III	IIIA	T1-T3	N2	M0
	IIIB	T4	N0-N2	M0
IV		jedes T	jedes N	M1

1.7 Therapie des cholangiozellulären Karzinoms

Die bislang einzige Möglichkeit einer kurativen Therapie des CCCs besteht in der vollständigen chirurgischen Exzision des Tumors. Ist keine R0- Resektion möglich oder liegen Fern-metastasen vor, gilt die palliative Chemotherapie mit der Kombination von Gemcitabin und Cisplatin als der Goldstandard mit guter Verträglichkeit, der das Leben verlängern kann. Ein medianes Überleben von 11,7 Monaten kann so erreicht werden (Valle et al., 2010).

Je nach Lokalisation sind jedoch noch andere Therapieformen möglich. Bei intrahepatischen CCCs kann eine Transarterielle Chemoembolisation (TACE) womöglich einen ebenfalls gut verträglichen Überlebensvorteil erbringen. Kleine, perihiläre CCCs (<3 cm Durchmesser) können, sofern keine Fernmetastasen zu finden sind sowie keine Operabilität aufgrund technischer Schwierigkeiten oder aufgrund einer anderen Lebererkrankung vorliegt, mit einer Lebertransplantation behandelt werden. Insbesondere bei Patienten mit einer ausgeprägten PSC ist die Lebertransplantation in diesem Fall der chirurgischen Variante vorzuziehen (Vogel et al., 2014).

Auch der Einsatz mit verschiedenen Inhibitoren wie zum Beispiel EGF-R-Inhibitoren, RAF-Kinase-Inhibitoren, VEGF-Inhibitoren, HER-2-Inhibitoren, Tyrosinkinase-Inhibitoren oder COX-2-Inhibitoren ist Gegenstand der Forschung, findet aber noch keine breite Anwendung (Brito et al., 2015).

1.8 Prognosefaktoren beim cholangiozellulären Karzinom

Postoperativ stellt die R0-Resektion den wichtigsten prognostischen Faktor für das Überleben eines CCC dar. Der Lymphknotenstatus ist der wohl zweitwichtigste Prognosefaktor, während die Überlebenswahrscheinlichkeit von Menschen mit perihilären und distalen CCCs vermutlich auch durch die Größe und den Malignitätsgrad des Tumors beeinflusst wird (DeOliveira et al., 2007).

Auch histologische Subtypen des Tumors geben Hinweise auf die Prognose: Bei intrahepatischen CCCs zeigen squamöse, sarkomatöse und muzinöse Komponenten eine schlechtere Prognose an. Die Prognose von extrahepatischen CCCs verschlechtert sich von polypoiden über nicht-invasive papilläre hin zu invasiven Subtypen (Stanley et al., 2000).

Molekularpathologisch scheint die MUC-2 Expression Hinweise auf eine bessere Prognose bei intrahepatischen CCCs zu geben (Stanley et al., 2000). Auch Veränderungen der Expression von p53 oder KRAS sind mit einer ungünstigen Prognose vergesellschaftet (Stanley et al., 2000; Brito et al., 2015).

1.9 Mitophagie

1.9.1 Grundlagen der Mitophagie

Als Autophagie bezeichnet man den Selbstverdau von Zellbestandteilen wie Zellorganellen oder Proteinen, bei dem ein Autophagosom gebildet wird. Dieses besteht aus einer Lipiddoppelschicht und grenzt so abzubauenendes Material vom Rest der Zelle ab. Um den zu degradierenden Inhalt abzubauen, verschmilzt ein Autophagosom mit einem Lysosom. Die durch den Verdau neu gewonnenen Bausteine stehen der Zelle anschließend zur Verfügung (Youle und Narendra, 2011).

Neben diesem unspezifischen Verdau von Zellmaterial, (zytosolische Proteine und Zellorganellen) der vorwiegend unter exogenem Nährstoffmangel geschieht, gibt es spezifischere Prozesse, die ebenfalls ein Autophagosom bilden. So werden bei der sogenannten Mitophagie vorrangig beschädigte Mitochondrien erkannt und autophagozytiert. Dieser Vorgang geschieht bei exogenem Nährstoffreichtum, ist also im Gegensatz zu der oben genannten unspezifischen Autophagie zu sehen. Prozesse wie die Mitophagie dienen dem Entsorgen von potenziellen Gefahrenquellen im Zellinneren oder im Überfluss vorhandenen Zellinhalten (Youle und Narendra, 2011).

1.9.2 Mitophagie und Krebs

Bei einer Reihe von Krankheiten spielen Störungen des Mitophagie-Prozesses eine Rolle. Insbesondere in der autosomal-rezessiven hereditären Parkinsonkrankheit sind einige Gene, die für Mitophagie-relevante Proteine kodieren, verändert. Auch in verschiedenen bösartigen Neubildungen wurden bereits relevante Gene identifiziert. Wie genau die Mitophagie in Tumoren eine Rolle spielt, ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Wahrscheinlich hängen der veränderte Energiestoffwechsel im Rahmen der verbleibenden, geschädigten Mitochondrien sowie die Entstehung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in selbigen damit zusammen. Klar ist, dass einzelne Proteine, die auch in der Mitophagie eine tragende Rolle spielen, sowohl tumorsuppressiv als

auch tumorinduzierend wirken können (Toma et al., 2013; Vara-Perez et al., 2019; Vernucci et al., 2019).

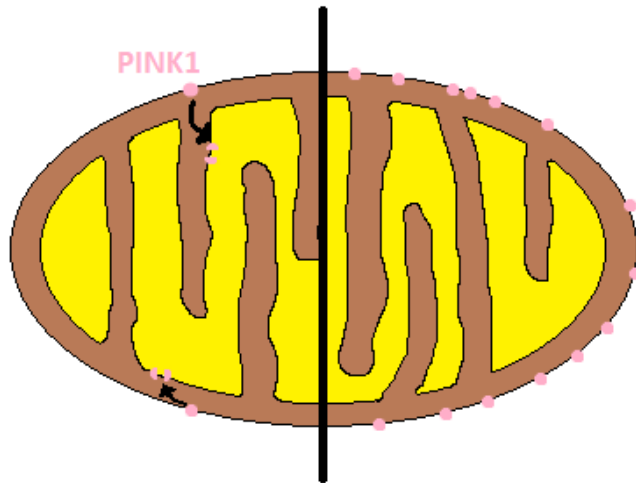


Abb. 3: Schemazeichnung – Akkumulation von PINK1 bei gestörtem Membranpotential: Links ist ein gesundes Mitochondrium gezeigt, welches PINK1 internalisieren und degradieren kann. Rechts ist ein geschädigtes Mitochondrium mit fehlendem Membranpotential dargestellt, was zur Akkumulation von PINK1 an der Oberfläche der äußeren Mitochondrienmembran führt. Modifiziert nach (Youle und Narendra, 2011)

1.9.3 Rolle von PINK1, Parkin und PACRG in der Mitophagie

PTEN-induced kinase 1 (PINK1) und Parkin (kodiert im PARK2-Gen) spielen eine tragende Rolle in der Mitophagie. Zurzeit gilt der folgende Signaltransduktionsweg als einer der am besten untersuchten Pfade zur Initiation von Mitophagie (Williams und Ding, 2018; Vara-Perez et al., 2019): PINK1 wird in funktionierenden Mitochondrien konstant durch die TOM- und TIM-Komplexe (Translocase of the Outer Membrane/ Translocase of the Inner Membrane) in das Innere des Mitochondriums importiert. Dort wird es rasch durch PARL (Presenilin-Associated Rhomboid-Like) gespalten und durch Proteolyse degradiert. Ohne ausreichendes Membranpotential gelingt der Transport von PINK1 in das Innere des Mitochondriums nicht. Außerdem wird bei depolarisiertem Membranpotential PARL phosphoryliert, was eine anschließende Spaltung von PINK1 verhindert. Gelingt es einem beschädigten Mitochondrium also nicht, das erforderliche Membranpotential zu halten, so akkumuliert PINK1 in der äußeren Membran des Mitochondriums. Dort wird es von der E3-Ubiquitin-Ligase Parkin erkannt. Parkin markiert daraufhin durch Ubiquitylierung mitochondriale Oberflächenproteine. Einige

dieser ubiquitinylierten Strukturen verhindern die Fusion des geschädigten Mitochondriums mit anderen gesunden Mitochondrien. Außerdem stellt eine Polyubiquitinylierung mitochondrialer Proteine das Signal für weitere Proteine wie p62 oder OPTN dar, die Autophagozytierung des betroffenen Mitochondriums einzuleiten (Youle und Narendra, 2011; Vara-Perez et al., 2019).

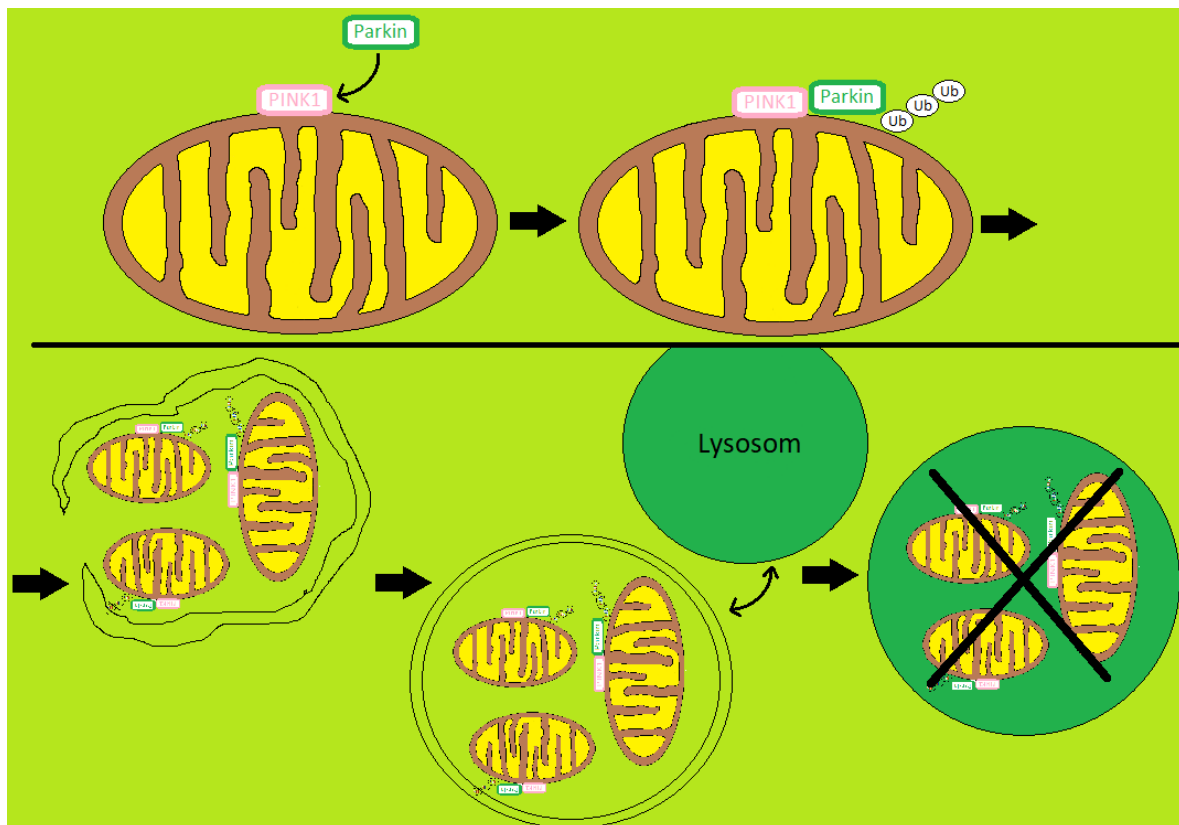


Abb. 4: Schemazeichnung – Mitophagie und lysosomale Degradation markierter Mitochondrien: Bei Akkumulation von PINK1 an der Mitochondrienoberfläche lagert sich Parkin an, welches mitochondriale Strukturen ubiquitinyliert. Als Folge wird das Mitochondrium von Isolatonsmembranen umgeben, welche dann mit dem Lysosom verschmelzen. Modifiziert nach Youle und Narendra, 2011 (Ub = Ubiquitin)

Das Protein „*parkin coregulated gene protein*“ (kodiert von PACRG) ist in seiner Funktion noch weitestgehend unbekannt. Das Gen wird in zahlreichen Geweben exprimiert und besitzt mit PARK2 einen gemeinsamen, bi-direktionalen Promoter und wird mit PARK2 ko-reguliert. Das *parkin coregulated gene protein* bildet mit Chaperonen einen großen Komplex. Über eine potenzielle Rolle von PACRG in der Mitophagie ist bislang nichts bekannt (National Library of Medicine, 2022).

1.9.4 Rolle von PINK1, Parkin und PACRG bei Krebs

Die Expression von PINK1 (Chromosom 1p36.12) ist in einigen malignen Tumoren alteriert. So finden sich in Lungenkrebs und in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus erhöhte Proteinlevel von PINK1 (Chang et al., 2018; Vara-Perez et al., 2019; Lu et al., 2020). In Ovarialkarzinomen konnte eine signifikant verminderte Menge an PINK1-mRNA nachgewiesen werden (Unoki und Nakamura, 2001). Auch in Glioblastomen konnte PINK1 eine interessante Rolle beigemessen werden. So zeigten Agnihotri et al. (2016), dass PINK1 sowohl in gesundem Gewebe als auch in Tumoren in vivo vor dem Zelltod schützen. Sie führten dies auf den Schutz vor ROS zurück, welche gesundem wie auch malignem Gewebe gleichermaßen schaden können. Andererseits demonstrierte das Forscherteam, dass der Verlust von PINK1 durch die Entstehung von ROS den Warburg-Effekt fördert. So war die Expression von PINK1 in einer großen Anzahl der von ihnen untersuchten Hirntumoren signifikant herunterreguliert (Agnihotri et al., 2016).

PINK1 kann somit je nach Kontext sowohl als Tumorsuppressor als auch als Onkogen gesehen werden. Auch andere Proteine, die eine zentrale Rolle in der Mitophagie spielen, können (gewebeabhängig) über- und unterexprimiert werden (Vara-Perez et al., 2019).

Obwohl Parkin (Chromosom 6q26) in der Mitophagie eine ähnliche Funktion wie PINK1 einnimmt, sind hier im Gegensatz zu PINK1 nur Herunterregulationen der Expression in malignen Geweben bekannt. Beispiele dafür sind die akute lymphoblastische Leukämie (ALL), das kolorektale Karzinom, das klarzellige Nierenzellkarzinom, Melanome, Plattenepithelkarzinome des Ösophagus, Ovarialkarzinome und Pankreaskarzinome (Toma et al., 2013; Vara-Perez et al., 2019). Auch hier kann der vermehrte oxidative Stress, der in der Abwesenheit von Parkin-gestützter Mitophagie stattfindet, als Erklärung für eine tumorsuppressive Wirkung von Parkin herangeführt werden.

Für PACRG (Chromosom 6q26) konnte gezeigt werden, dass es in Leukämien und im klarzelligen Nierenzellkarzinom herunterreguliert ist (Agirre et al., 2006; Toma et al., 2013).

1.10 Zielsetzung der Studie

Diese Studie möchte einen potenziellen Zusammenhang zwischen dem PINK1- und Parkin-vermittelten Signalweg der Mitophagie und dem cholangiozellulären Karzinom herstellen. Wir postulieren, dass die Expression von PINK1 in cholangiozellulären Karzinomen verändert ist, wobei die Veränderung in beide Richtungen (Herunterregulation bzw. Hochregulation) denkbar ist. Des Weiteren postulieren wir, dass die Expression Parkins bzw. PARK2s ebenso wie die des mit Parkin ko-regulierte PACRGs im cholangiozellulären Karzinom erniedrigt sind. Wir möchten Nachweise sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Proteinebene erbringen. Dabei soll Cholangiokarzinom mit gesundem Gewebe verglichen werden. Außerdem soll eine Analyse der Höhe der Expression des jeweiligen Proteins in Relation zu klinischen Daten wie dem TNM-Stadium des Tumors sowie zu den Überlebensdaten der zugehörigen Patienten durchgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

In die vorliegende Studie wurden zwei Kollektive eingeschlossen: Für die Analyse der RNA-Expression standen nicht fixiertes, frisch-asserviertes Tumormaterial von zwölf Patienten sowie zwei aus cholangiozellulären Karzinomen kultivierte Organoide zur Verfügung. Die Patientenproben wurden anonymisiert in der BioBank der Universitätsklinik Bonn aufbewahrt, weshalb keine klinischen Informationen bezüglich der Patienten vorlagen.

Zur Untersuchung der Protein-Expression verwendeten wir das Formalin-fixierte, Paraffin-eingebettete Material einer zweiten Kohorte von 53 Patienten mit cholangiozellulärem Karzinom. Alle Patienten wurden zwischen 2012 und 2017 in der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Bonn operiert. Aus dem Material wurden *Tissue Microarrays* (TMAs) konstruiert. Als interne Kontrolle diente hierbei Biopsiematerial von nicht-neoplastischen Gallenblasen. Eine Auflistung der Patientendaten findet sich in **Tab. 7**. Gesicherte Daten zur Überlebensrate der Patienten lagen bei 37 der 53 Patienten vor.

Das Studienvorhaben wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn auf Basis der Deklaration des Weltärztebundes von Helsinki in seiner letzten revidierten Fassung genehmigt (Ethikkommissionen 233/20, 027/18 und 417/17).

2.2 Organoide

Bei den verwendeten Organoiden handelte es sich um cholangiozelluläre Karzinome, welche unter definierten Bedingungen in einer 3D-Zellmatrix (Matrigel, Corning Inc., USA) *in vitro* gezüchtet wurden. Diese Methode liefert vergleichbare Ergebnisse zu einer gewöhnlichen zweidimensionalen Zellkultur. Der Vorteil der verwendeten 3D-Kultur besteht darin, dass sich die Zellen in der dreidimensionalen extrazellulären Struktur der extrazellulären Matrix eher in einer Umgebung befinden, wie sie im Körper auch vorliegt. Diese Methode kann also hinsichtlich des Zellverhaltens und der zellulären Reaktion auf Medikamente unter Umständen aussagekräftigere Ergebnisse liefern. **Tab.**

8 gibt Aufschluss über die TNM-Daten der Patienten, aus denen das Gewebe für die Organoide gewonnen wurde.

Tab. 7: Patientenkollektiv der untersuchten Proben - Proteinexpression

Patientenkollektiv nach Parameter		Anzahl der für die Analyse der Proteinexpression eingeschlossenen Patientenproben
Gesamt		53 (100%)
Geschlecht	männlich	27 (50,9%)
	weiblich	26 (49,1%)
Lokalisation des CCCs	Intrahepatisch	22 (41,5%)
	Perihilär (Klatskin)	16 (30,2%)
	Distal extrahepatisch	15 (28,3%)
pT	pTX	1 (1,9%)
	pT1	15 (28,3%)
	pT2	15 (28,3%)
	pT3	20 (37,7%)
	pT4	2 (3,8%)
pN	pNX	1 (1,9%)
	pN0	27 (50,9%)
	pN1	25 (47,2%)
M	MX	1 (1,9%)
	M0	48 (90,6%)
	M1	4 (7,5%)
Grading	No data	3 (5,7%)
	G1	3 (5,7%)
	G2	29 (54,7%)
	G3	18 (34,0%)
PSC	Ja	2 (3,8%)
	Nein	51 (96,2%)

Tab. 8: Patientendaten zu den verwendeten Organoiden (T = Tumorausdehnung, N = Nodalstatus, L = Invasion in Lymphgefäße, V = Invasion in Venen, Pn = Perineurale Invasion, PDO = Patient-derived Organoid)

Organoid	Alter	Geschlecht	T	N	L	V	Pn	Grading
PDO_719	72	Weiblich	pT3	pN0 (0/12)	L0	V2	Pn1	G2
PDO_7409	75	Männlich	pT3	pN0 (0/17)	L0	V0	Pn0	G2

Für die Analyse der Organoide wurden diese vorsichtig mitsamt der 3D-Zellmatrix (Matrigel) in ein 15 ml fassendes Zentrifugenröhrchen überführt. Das mit PBS aufgefüllte Röhrchen wurde dann bei 1500 rpm für 3-5 min zentrifugiert, bis der Überstand und das zellfreie Matrigel aspiriert werden konnten. Die in PBS resuspendierten Organoide standen nun zur RNA-Extraktion bereit.

Verwendete Chemikalien, Geräte, etc. befinden sich im Anhang unter **Tab. 20-Tab. 23**.

2.3 Tissue Microarray

Zur Untersuchung der Protein-Expression wurden die aus den Patienten gewonnenen Formalin-fixierten Gewebeproben als Stanzzylinder mit einem Durchmesser von ungefähr 1,0 mm in Paraffinblöcken zusammengesetzt. Diese Paraffinblöcke wurden dann mit einem Mikrotom in 2 µm dicke Scheiben geschnitten, welche zur weiteren Analyse und mikroskopischen Betrachtung auf einen Objektträger gebracht wurden. Pro Gewebeprobe standen so drei bis sechs histologisch repräsentative Ausschnitte zur Verfügung.

Zur internen Kontrolle der TMAs waren - wie oben erwähnt - auch nicht-neoplastische Gallenblasen vorhanden. Diese fanden in der statistischen Auswertung keine Berücksichtigung.

2.4 Immunhistologie

Anschließend wurden die TMAs der zur Verfügung stehenden CCCs immunhistochemisch gegen die Proteine PINK1, Parkin und PACRG gefärbt.

Dabei wurde nach Standardprotokollen des immunhistochemischen Labors des Instituts für Pathologie an der Uniklinik Bonn verfahren. Auf dem VENTANA BenchMark ULTRA von Roche wurden sowohl das VENTANA OptiView Detektions-Kit (PINK1, Parkin), als auch das VENTANA UltraView Detektions-Kit (PACRG) verwendet. Beiden gemeinsam ist das folgende Prinzip der indirekten Immunmarkierung: Primäre, unkonjugierte Antikörper binden an das gewünschte Antigen. Daraufhin binden sekundäre Antikörper, welche entweder direkt HRP (*Horseradish peroxidase*) gebunden haben oder Antigene für tertiäre Antikörper aufweisen, die dann HRP gebunden haben. Die HRP reagiert dann mit Wasserstoffperoxid und dem Chromogen DAB (3,3'-Diaminobenzidin), welches sich daraufhin braun färbt. Um diese Schritte möglich zu machen, mussten zunächst die TMAs mit EZ Prep (Roche, Deutschland) entparaffiniert werden. Für die Zugänglichkeit der Antigene wurden die TMAs im Anschluss bei hohen Temperaturen in Citratpuffer inkubiert. In einem weiteren Schritt wurden die TMAs dann mit den entsprechenden Antikörpern behandelt. Folgend der blauen Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer wurden die TMAs mit einer aufsteigenden Alkoholreihe vollständig entwässert und mit dem Eindeckmedium Pertex von Medite eingedeckt.

Tab. 9: Verwendete Antikörper und deren Verdünnung in der immunhistochemischen Färbung der TMAs

Antikörper	Firma	Verdünnung	Klon
Anti-PINK1	Abcam	1:50	ab23707
Anti-Parkin	Santa Cruz Biotechnology	1:50	sc-32282
Anti-PACRG	Abcam	1:200	ab115465

2.5 Scannen der TMAs

Diese TMAs wurden nun mit dem Digital Slide Scanner „Pannoramic Midi“ von 3D-Histech eingescannt, als CZI Datei gespeichert und anschließend mit dem Programm „Zen 2.6 Blue“ analysiert. Für den seltenen Fall, dass ein Scan nicht gelungen war, wurden die TMAs alternativ unter dem Lichtmikroskop „Leica DM500“ von Leica Microsystems betrachtet.

2.6 Semiquantitative Einteilung der TMAs

Die Tumorzellen wurden je nach Intensität der Färbung in vier Grade unterteilt: 0 = keine Färbung der Tumorzellen, 1 = schwache Färbung der Tumorzellen, 2 = mittelstarke Färbung der Tumorzellen, 3 = starke Färbung der Tumorzellen.

Besaß eine Stanze mehrere unterschiedlich stark gefärbte Areale von Tumorzellen, so wurden zwei Grade mit ihrer jeweiligen prozentualen Repräsentation vermerkt.

Um dennoch nur einen Wert pro Stanze zu erhalten, wurde ein gewichteter Mittelwert verwendet, um den Färbungsintensitäten 2 und 3 die doppelte bzw. die dreifache Gewichtung zu geben.

[Beispielhaft ist hier das Zustandekommen eines Wertes demonstriert: Die Tumorzellen einer Stanze besitzen zu 75 % den Färbungsgrad 1 und zu 25 % den Färbungsgrad 3. Rechnung: $(0,75 \times 1 + 0 \times 2 + 0,25 \times 3) / 3 = 0,5$; entsprechend dem Wert 50 %.]

Da mehrere Schnitte pro Tumor vorlagen, wurden die verschiedenen Werte jedes Tumors gemittelt, sodass am Ende ein einzelner Wert zwischen 0 und 100 % pro Tumor bzw. Patient vorlag.

2.7 RNA-Extraktion

Um die Expression von PINK1, PARK2 und PACRG auf RNA-Ebene beurteilen zu können, wurden Gewebeproben aus Patienten mit CCC entnommen sowie 3D-Zellkulturen genutzt. Da das Kollektiv mit insgesamt 14 Tumoren recht klein war, fokussierte sich die vorliegende Studie nur auf den Vergleich der Genexpression von Tumor versus nicht-neoplastisches Gewebe und verzichtete auf weitere statistische Analysen. Deshalb wurden die Proben auch anonymisiert aufgearbeitet.

Aus den Proben wurde RNA extrahiert, welche dann in cDNA umgeschrieben wurde. Die Expression von PINK1, PARK2 und PACRG sowie der *Housekeeping*-Gene PPIA, Aktin und TBP wurde mittels qPCR beurteilt. Als Vergleich diente dabei ein aus nicht-malignem Lebergewebe kultiviertes Organoid, welches auf jeder qPCR-Platte mitbeurteilt wurde.

Je nach Gewebe wurden zwei unterschiedliche Protokolle zur RNA-Extraktion verwendet: War wenig Gewebe vorhanden, wie bei den Organoiden, wurde ein manuelles Protokoll mit Trizol verwendet (s. Anhang: **Tab. 24**). Eine kurze Beschreibung folgt hier: Mit der Zugabe von TRIzol™ Reagent (Life Technologies, USA) und Chloro-

form (Carl Roth, Deutschland) zum zerkleinerten Gewebe bildeten sich drei Phasen aus. In der oberen, wässrigen Phase befand sich die RNA, welche zur weiteren Bearbeitung in ein neues Gefäß überführt wurde. Die anderen beiden Phasen mit DNA und Proteinen konnten verworfen werden. Nach dem Fällern der RNA mit Isopropanol sowie Ethanol konnte im letzten Schritt die RNA in RNase-freiem Wasser resuspendiert werden.

War viel Gewebe vorhanden und damit viel RNA zu erwarten, wie es bei den Patientenproben der Fall war, wurde die RNA-Extraktion mit einem frei verkäuflichen Kit (Roboklon, Deutschland) gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. In Schritt 1 wurden die Gewebeproben in den MP BiomedicalsTM Lysing Matrix A 2 ml tubes mittels der SpeedMill PLUS zerkleinert. Da die Proben in cDNA umgeschrieben werden sollten und absolut keine DNA mehr enthalten sein durfte, wurde der optionale DNA-Verdau durchgeführt.

2.8 Messung der isolierten RNA-Menge

Im Anschluss an die RNA-Isolation wurde der RNA-Gehalt der Proben mittels eines NanoDrop 1000 Spectrophotometers ermittelt. Dabei wurde auch auf den Reinheitsgrad anhand der 260 nm/ 280 nm Ratio geachtet. Diese sollte zwischen 1,7 und 2 liegen. Aus den dabei ermittelten RNA-Mengen ließen sich die zu verwendenden Mengen für die folgende cDNA-Umschreibung errechnen (s.u. und **Tab. 10**).

Tab. 10: Überblick über extrahierbare Mengen an RNA und daraus folgende cDNA-Konzentrationen

Probennummer	Art	Konzentration der RNA; ng/µl	Verwendete Menge in der cDNA-Herstellung; µl	cDNA; ng/µl
1. = Kontrolle	Organoid	170,16	2,9	25,0
2.	Organoid	131,76	3,8	25,0
3.	Gewebe	1116,68	0,4	25,0
4.	Gewebe	923,59	0,5	25,0
5.	Gewebe	130,21	3,8	25,0
6.	Gewebe	39,81	10,0	20,0
7.	Gewebe	29,03	10,0	14,5
8.	Gewebe	167,62	3,0	25,0
9.	Gewebe	140,76	3,6	25,0
10.	Gewebe	174,4	2,9	25,0
11.	Gewebe	454,51	1,1	25,0
12.	Gewebe	775,63	0,6	25,0
13.	Gewebe	38,33	10,0	19,3
14.	Gewebe	306,1	1,6	25,0
15.	Organoid	139,32	3,6	25,0

2.9 cDNA-Umschreibung

Die hergestellte Menge an cDNA sollte genug Material für mindestens eine PCR bieten. Bei den meisten Proben, die genug RNA boten, konnte eine cDNA-Zielkonzentration von 25ng/µl erreicht werden (s. auch **Tab. 10**). Etwaige Abweichungen mussten später einzeln berücksichtigt werden.

Die cDNA-Umschreibung wurde nach dem Protokoll der SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, USA) durchgeführt. Statt der optionalen RNaseOUT™ wurde jedoch das als gleichwertig angesehene RiboLock™ (Thermo Fisher Scientific, USA) verwendet. Beide Produkte hemmen laut Hersteller RNase A, B sowie C.

2.10 qPCRs

Eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung von DNA. Standardmäßig werden dabei Primer des zu vervielfältigenden Abschnittes DNA sowie temperaturabhängige Polymerasen verwendet. In PCR-Maschinen wird dann die

Temperatur zyklisch durch drei Bereiche gebracht. Der erste Temperaturbereich von ca. 95°C dient der Denaturierung der doppelsträngigen DNA (dsDNA) in Einzelstränge. Die zweite Temperatur ist mit 60°C so gewählt, dass die Primer an ihre spezifischen DNA-Bindungsstellen binden können. Zuletzt wird die Temperatur noch auf das Arbeitsoptimum der Polymerase erhöht, was gemäß des in der vorliegenden Studie verwendeten Protokolls ebenfalls ca. 60°C entspricht (s. auch **Tab. 13**). Durch Wiederholung dieser Zyklen wird somit vereinfacht gesprochen die Ziel-DNA in der exponentiellen Phase, in der noch genug Reaktionspartner gefunden werden können, pro Zyklus einmal verdoppelt.

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion, kurz qPCR, erweitert die PCR in der Hinsicht, dass Rückschlüsse auf die Menge der verwendeten Ursprungs-DNA getroffen werden können. In dem in dieser Studie verwendeten Protokoll wurde mit SYBR[®] Green (Molecular Probes, Inc., USA) eine farbstoffbasierte qPCR gewählt. Dabei bindet im Vergleich zu einer normalen PCR der Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green spezifisch an doppelsträngige DNA (dsDNA). Dieser entfaltet seine Fluoreszenz erst dann, wenn er an DNA gebunden hat. Dadurch nimmt mit jedem Zyklus der PCR die Fluoreszenz proportional zur vervielfältigten dsDNA zu. Zu beachten war bei dieser Methode jedoch, dass der verwendete Farbstoff zwar spezifisch an dsDNA bindet. Allerdings konnte so jede unspezifische Vervielfältigung von anderer dsDNA bzw. eine Dopplung der Primer nicht unterschieden werden. Hier konnte am Ende der Zyklen eine Schmelzkurvenanalyse wichtige Informationen liefern. Da alle DNA-Doppelstränge bei einer spezifischen Länge denaturieren und somit den Farbstoff wieder freigeben, entstehen bei langsamem Erhitzen spezifische Schmelzkurven. Sie lassen darauf schließen, ob eine Probe mit Nebenprodukten verunreinigt ist oder nicht (Life Technologies, 2010).

Die qPCRs wurden nach den folgenden Schemata durchgeführt. In je einem Well der MicroAmp[®] Fast Optical 96 Well Reaction Plate wurde ein Ansatz von insgesamt 10 µl gewählt (**Tab. 11**).

Tab. 11: Inhalt je eines Wells für die qPCR

Reagenz	Volumen
SYBR [®] Green	5 µl
jeweiliger Forward Primer (10 µmol/l)	0,4 µl
jeweiliger Reverse Primer (10 µmol/l)	0,4 µl
ddH ₂ O	3,2 µl
5 ng/µl der jeweiligen cDNA; bzw. ddH ₂ O als NTC	1 µl

Neben den zu untersuchenden Genen PARK2, PACRG und PINK1 wurde die Expression von TBA, PPIA und Aktin mitbestimmt. Sie dienten als endogene Kontrolle und zur Errechnung des ΔC_t -Wertes (s. 2.11 $\Delta\Delta C_t$ -Methode)

Tab. 12: Die folgenden Oligonukleotidsequenzen (Eurofins Genomics, Deutschland) wurden in den qPCRs der vorliegenden Studie verwendet.

Primer	Sequenz
PINK1 forward	5' - CAT GCC TAC ATT GCC CCA GA - 3'
PINK1 reverse	5' - TGA CTG CTC CAT ACT CCC CA - 3'
PARK2 forward	5' - TAG CTT TGC ACC TGA TCG CA - 3'
PARK2 reverse	5' - CCA CAC AAG GCA GGG AGT AG - 3'
PACRG forward	5' - CCG GAA TTC ATG GTG GCA GAA AAA GAG ACC - 3'
PACRG reverse	5' - CGC GGA TCC TCA AGT TTA GCA AGC AAG ACT CG - 3'
TBP forward	5' - GCC GAA TAT AAT CCC AAG CG - 3'
TBP reverse	5' - TGG ACT GTT CTT CAC TCT TGG C - 3'
PPIA forward	5' - TGG TAT AAA AGG GGC GGG AG - 3'
PPIA reverse	5' - AAG AAC ACG GTG GGG TTG A - 3'
Beta-Aktin forward	5' - AGA GCT ACG AGC TGC CTG AC - 3'
Beta-Aktin reverse	5' - AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG - 3'

Jedes Primerpaar, bestehend aus *Forward*- und *Reverse*-Primern wurde mit jeder cDNA-Probe, bzw. der *non-template control* (NTC) gepaart, wobei von jeder Kombination Triplikate erstellt wurden. Das bedeutet, jede Kombination wurde dreimal pipettiert und in der qPCR analysiert. So konnte gezeigt werden, dass die in der qPCR

erhobenen Daten intern reproduzierbar sind. Außerdem waren auf diese Weise stark abweichende Einzelwerte erkennbar und konnten gegebenenfalls eliminiert werden.

Zum Pipettieren wurden „*Mastermixe*“ von SYBR[®] Green, ddH₂O sowie den jeweiligen Primern angefertigt. Diese wurden in einem ersten Schritt zu je 9 µl in die einzelnen Wells der 96-Well qPCR-Platten verteilt. Danach wurden die Triplikate der cDNA-Proben bzw. die NTC zu je 1 µl pipettiert. Anschließend wurde die 96-Well qPCR Platte mittels spezieller PCR-Plattenverschlussfolie verschlossen, zum Zwecke eines kurzen Transportes in Alufolie (Schutz vor UV-Strahlung) eingewickelt und für 2 min bei 1600 rpm zentrifugiert. Danach wurde die Alufolie wieder entfernt und qPCR-Platte in der qPCR-Maschine platziert. Schlussendlich lief dann die qPCR nach dem in der zugehörigen Software programmierten Protokoll ab (siehe **Tab. 13**).

Tab. 13: Temperaturprotokoll der qPCR

Phase	Schritt	Zeit	Temperatur
Holding Stage	1	02:00 min	50°C
	2	10:00 min	95°C
Zyklusphase Diese wurde 45-mal hintereinander durchlaufen.	1	00:15 min	95°C
	2	00:02 min	63°C
	3	01:00 min	60°C
Schmelzkurve Die Proben wurden langsam kontinuierlich von 60°C auf 95°C erhitzt.	1	00:15 min	95°C
	2	01:00 min	60°C
	3	30:00 min	95°C
	4	00:15 min	60°C

Die Schmelzkurven der Proben wurden primerübergreifend miteinander verglichen. Die denaturierenden DNA-Fragmente haben je nach Sequenz und Länge einen charakteristischen *Peak*. Verunreinigte Proben konnten so im Vergleich zu den anderen Proben erkannt werden (siehe **Abb. 5**).

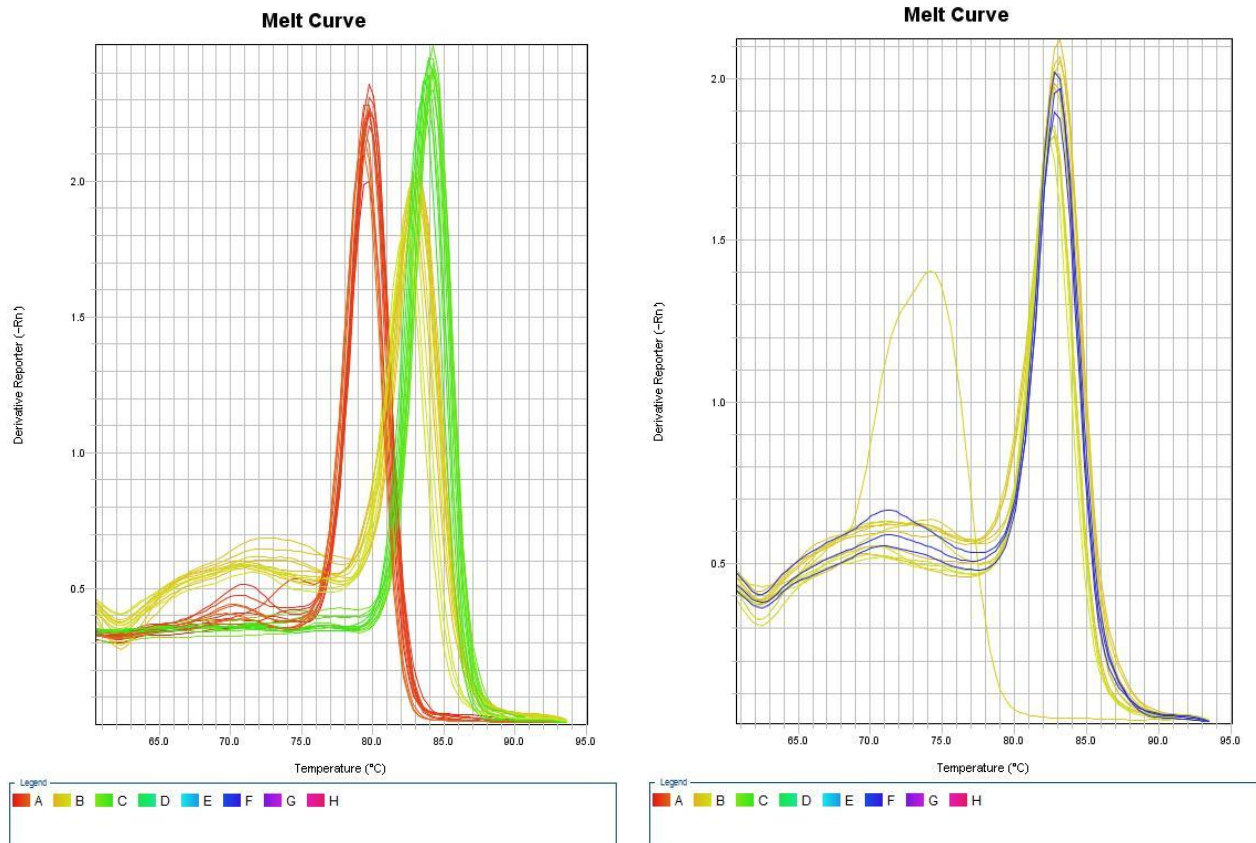


Abb. 5: Beispiele für Schmelzkurven. Eine Farbe entspricht zwölf Schmelzkurven eines Primers. Bei den 3x12 Ansätzen links sind keine verschobenen Kurvenverläufe erkenntlich. Rechts ist eine Probe erkennbar an dem nach links verschobenen Maximum verunreinigt.

2.11 $\Delta\Delta C_t$ -Methode

Die qPCRs wurden anschließend mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet (Livak and Schmittgen, 2001). Diese Methode benötigt den C_t -Wert der einzelnen Proben und setzt ihn in Korrelation zu dem C_t -Wert anderer Proben, der *Housekeeping*-Gene sowie der Normalgewebe-Probe. *Housekeeping*-Gene sowie Normalgewebe wurden auf jeder qPCR-Platte mituntersucht. C_t steht für *cycle threshold*, was so viel wie Zyklusschwelle bedeutet. Der C_t -Wert kennzeichnet den Punkt in der PCR, in dem die Fluoreszenz des Farbstoffs erstmalig die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. In der $\Delta\Delta C_t$ -Methode wurde der C_t -Wert aller Triplikate zunächst gemittelt. Die Mittelwerte der zu untersuchenden Gene (*PINK1*, *PACRG* und *PARK2*) wurden darauf mittels Subtraktion mit dem Mittelwert einer der drei *Housekeeping*-Gene in Beziehung gesetzt. Der ermittelte Wert lautet ΔC_t -Wert. Im nächsten Schritt wurde der ΔC_t -Wert der Probe

Normalgewebe von dem ΔC_t -Wert der zu untersuchenden Probe subtrahiert. Dies ist der $\Delta\Delta C_t$ -Wert. In einem letzten Schritt wurde dieser Wert in folgende Gleichung eingesetzt:

$$\text{n-fache Expression} = 2^{\Delta\Delta C_t\text{-Wert}}$$

Diese n-fache Expression (= „*fold-change*“) wurde mit jeder Probe gegen alle drei eingesetzten *Housekeeping*-Gene berechnet. Die n-fache Expression verglichen mit den einzelnen *Housekeeping*-Genen wurde danach auf alle *Housekeeping*-Gene gemittelt. Sie gibt wieder, um wie viel mehr bzw. weniger eine Probe im Vergleich zum Normalgewebe das entsprechende Gen exprimiert.

Zuletzt wurden noch alle n-fachen Expressionen gleicher Gene auf alle Proben des jeweiligen Gens gemittelt.

2.12 Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse wurde das Programm IBM SPSS Statistics (Version 25) genutzt. Zur graphischen Darstellung der Daten fand das Programm GraphPad Prism 8 Anwendung.

Die verschiedenen Färbungsintensitäten der Immunhistologie wurden statistisch mit gesammelten klinisch-pathologischen Daten zu den Patienten verglichen. Aufgrund der meist ordinal skalierten Daten fand der Kruskal-Wallis-Test Verwendung (Kruskal und Wallis, 1952), um Unterschiede innerhalb der Gruppen (z.B. innerhalb der T-Stadien) festzustellen. Signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Subgruppen (z.B. zwischen T1 und T2) konnten im Anschluss mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests analysiert werden (Mann und Whitney, 1947). Außerdem wurden Überlebenskurven nach Kaplan und Meier (Kaplan und Meier, 1958) erstellt, welche mittels Log-rank-Test (Mantel, 1966) untereinander verglichen wurden.

Bei der Untersuchung der RNA-Expression war für jedes Gen eine gemittelte gesteigerte bzw. verminderte Synthese im Vergleich von Tumorgewebe zu Normalgewebe als auch deren Streuung bekannt. Um zu testen, ob diese Veränderungen der Expression signifikant sind, wurde der zweiseitige T-Test gewählt, da keine Richtung der Veränderung anzunehmen war. Da die n-fache Expression nicht normalverteilt ist, wurden die T-Tests auf die jeweiligen ΔC_t -Werte angewendet. Dies trifft aber dennoch eine Aussage über die dazugehörigen n-fachen Expressionen.

Tab. 14: Überblick über verwendete statistische Tests

Proteinexpression	Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test
RNA-Expression	Zweiseitiger T-Test

Als statistisch signifikant wurden alle Ergebnisse mit einer α -Fehlerwahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ gewertet.

3. Ergebnisse

3.1 RNA-Expression von PINK1, PARK2 und PACRG im CCC

Nach Verrechnung mit den *Housekeeping*-Genen standen zu jedem untersuchten Gen je $n = 42$ ΔC_t -Werte der 14 Tumorproben und $n = 18$ ΔC_t -Werte des Normalgewebes zur statistischen Bewertung zur Verfügung. Die Auswertung der Gewebe mittels der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ergab eine Verringerung der Expression für PINK1 auf das 0,32-Fache. Im zweiseitigen T-Test unterschieden sich die ΔC_t -Werte der Tumorproben von den ΔC_t -Werten des Normalgewebes signifikant ($p = 0,03$).

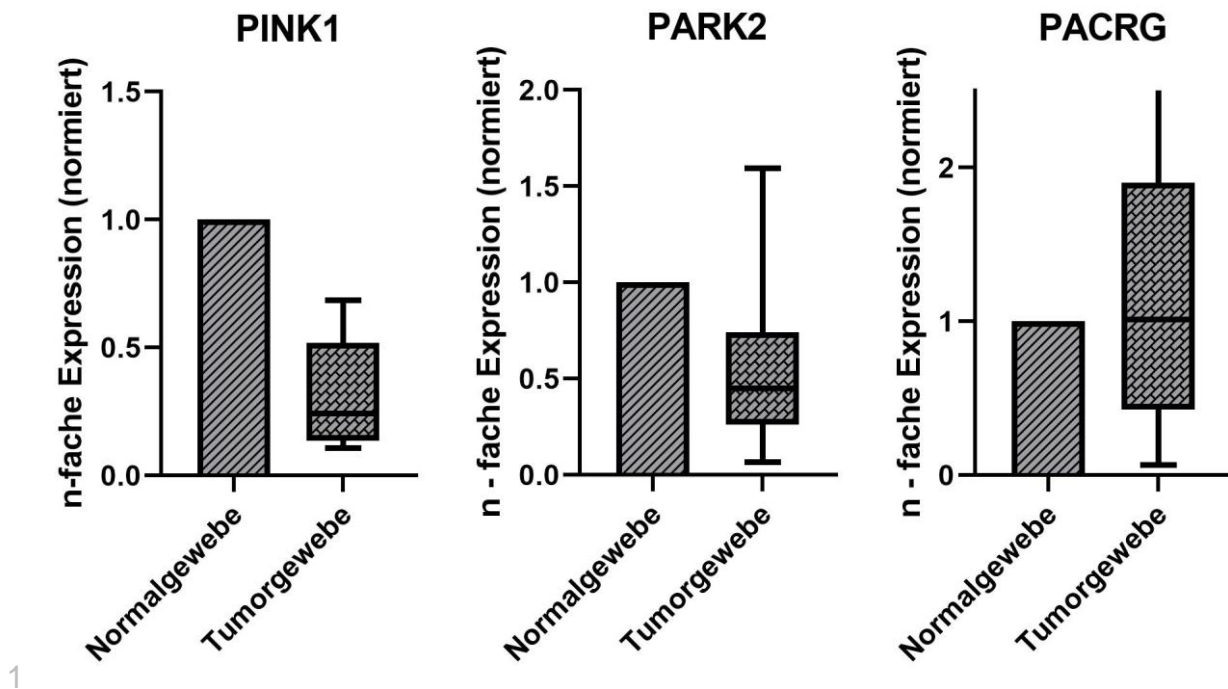
PARK2 ist im Tumorgewebe durchschnittlich 0,56-fach im Vergleich zum Normalgewebe exprimiert. Der zweiseitige T-Test wertet diese Daten über ihre jeweiligen ΔC_t -Werte als nicht signifikant ($p = 0,14$).

PACRG war im Tumor nicht signifikant erhöht oder erniedrigt ($p = 0,71$).

Tab. 15: Vergleich der RNA-Expressionen in Tumor- und Normalgewebe;

Da die n-fache Expression nicht normalverteilt ist, mussten die Signifikanz-Testungen (mittels T-Tests) auf die jeweiligen ΔC_t -Werte angewendet werden. Zwecks besserer Anschaulichkeit sind dennoch die dazugehörigen n-fachen Expressionen (gemittelt) dargestellt. Die zugehörigen Rechenschritte finden sich in Abschnitt 2.11. Zum Vergleich mit dem in **Abb. 6** gezeigten Box-Whisker-Plot ist der Median ebenfalls angegeben.

Gen	Gewebeart	n	Gemittelte n-fache Verringerung bzw. Erhöhung der Expression im Tumor, normiert auf Aktin, PPIA und TBP (in Klammern: Median)	Signifikanzlevel (zweiseitiger T-Test der ΔC_t -Werte)
PINK1	Tumor	42	0,317 (0,242)	p = 0,03
	Normal	18		
PARK2	Tumor	42	0,555 (0,449)	p = 0,14
	Normal	18		
PACRG	Tumor	42	2,960 (1,012)	p = 0,71
	Normal	18		



1

Abb. 6: n-fache RNA-Expression der Gene PINK1, PARK2 und PACRG von cholangiozellulärem Karzinom (n = 14 Gewebeproben) im Vergleich zu Normalgewebe (n = 1 Gewebeprobe), normiert auf die *Housekeeping*-Gene TBA, PPIA sowie Beta-Aktin;

Die mehrfach getestete und auf o.g. Standardproteine normierte Expression im Normalgewebe ist in der Abbildung als normale Expression der RNA mit dem Wert „1“ repräsentiert. In Relation dazu sind die n-fachen Expressionen der jeweiligen Gene in Tumorgeweben mittels Box-Whisker-Plot dargestellt (Whisker oben bzw. unten: Maximum bzw. Minimum; Kanten der Box: unteres bzw. oberes Quartil, zentraler Strich: Median). Die Signifikanz-Testungen mussten auf der Ebene der ΔC_T -Werte stattfinden, da die n-fache Expression nicht normalverteilt ist. Die Darstellung mittels n-facher Expression dient der besseren Anschaulichkeit und Verständlichkeit der Daten.

3.2 Protein-Expression von PINK1, PARK2 und PACRG im CCC

3.2.1 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung

Die immunhistochemischen Färbungen zeigten sich bei allen drei Proteinen primär zytoplasmatisch. Zu allen 53 Patientenfällen lagen ausreichend Stenzen vor, um die Proteinexpression von PINK1, Parkin und PACRG beurteilen zu können. Stenzen in den TMAs, die nicht genug Gewebe aufwiesen oder in denen keine Tumorzellen zu sehen waren, wurden von vornerein ausgeschlossen. Repräsentative Scans der Färbungsgrade je nach Protein sind in den **Abb. 7 - Abb. 9** dargestellt. Die Verteilung aller Werte nach gewichtetem Mittelwert der Färbungsintensität des jeweiligen Proteins findet sich in **Abb. 10**.

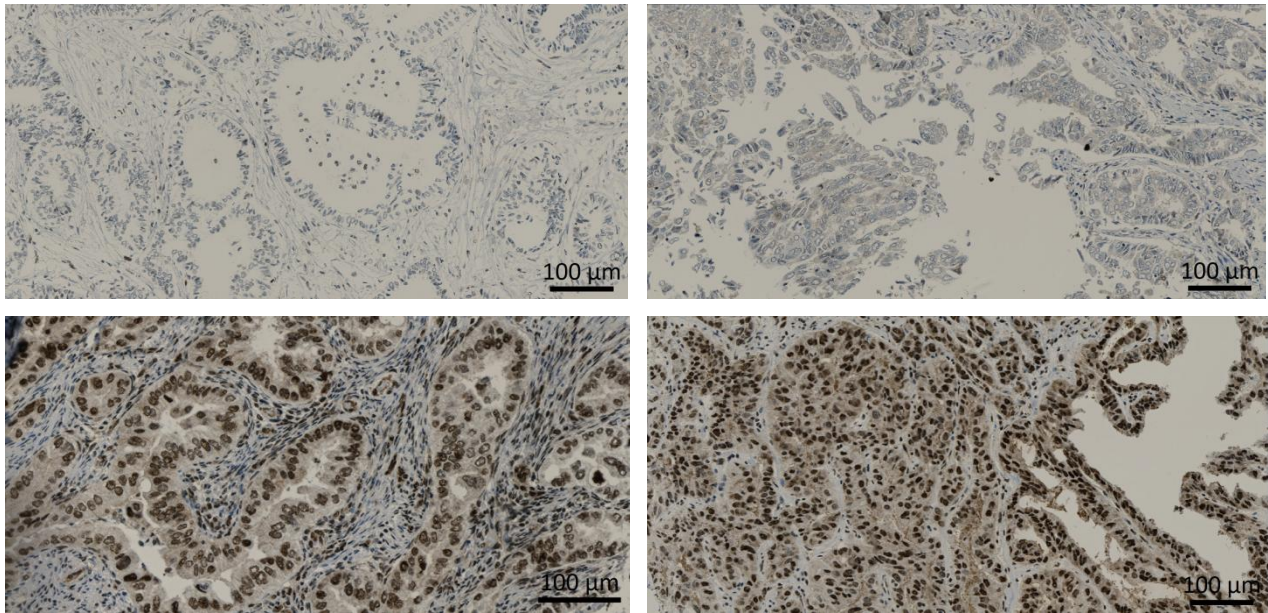


Abb. 7: Semiquantitative Einteilung der immunhistochemischen Färbung – PINK1-Protein: Die immunhistochemische Färbung gegen PINK1-Protein wurde in die folgenden vier Intensitätsgrade unterteilt: 0 = keine Färbung (links oben), 1 = schwache Färbung (rechts oben), 2 = mittelstarke Färbung (links unten), 3 = starke Färbung (rechts unten).

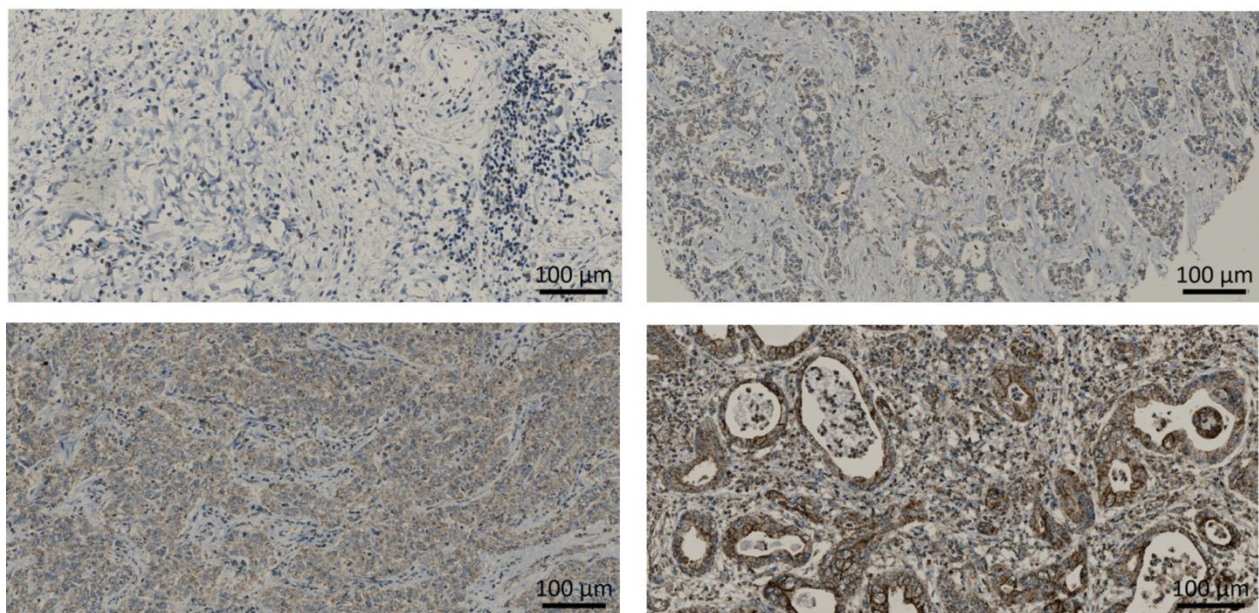


Abb. 8: Semiquantitative Einteilung der immunhistochemischen Färbung – Parkin: Die immunhistochemische Färbung gegen Parkin wurde in die folgenden vier Intensitätsgrade unterteilt: 0 = keine Färbung (links oben), 1 = schwache Färbung (rechts oben), 2 = mittelstarke Färbung (links unten), 3 = starke Färbung (rechts unten).

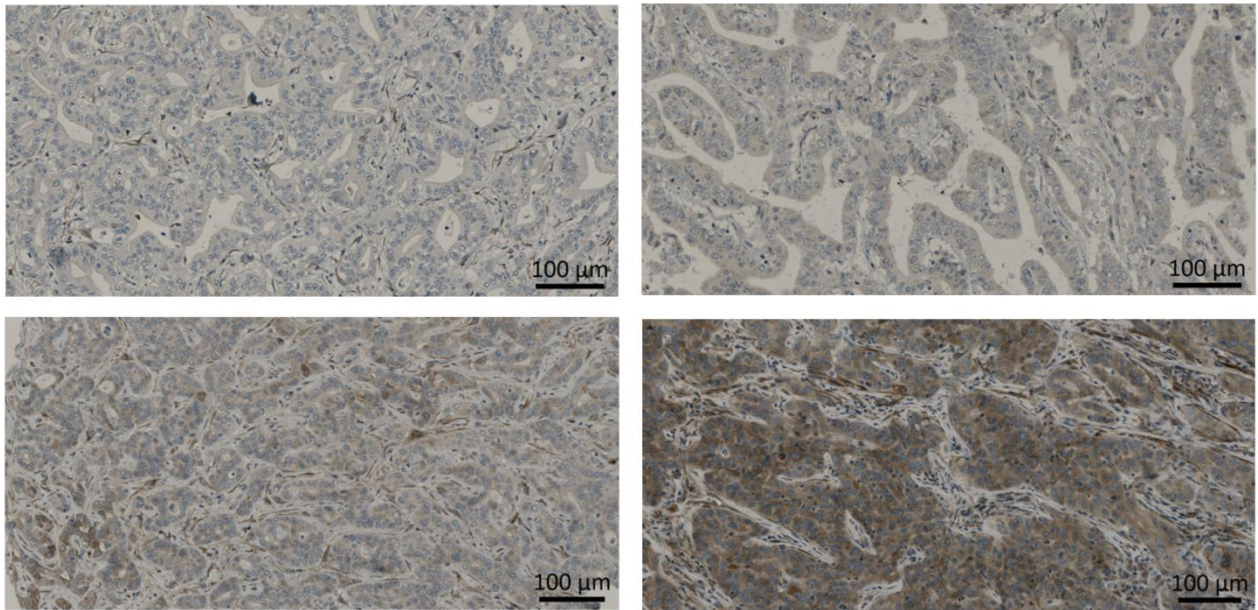


Abb. 9: Semiquantitative Einteilung der immunhistochemischen Färbung – PACRG-Protein: Die immunhistochemische Färbung gegen PACRG-Protein wurde in die folgenden vier Intensitätsgrade unterteilt: 0 = keine Färbung (links oben), 1 = schwache Färbung (rechts oben), 2 = mittelstarke Färbung (links unten), 3 = starke Färbung (rechts unten).

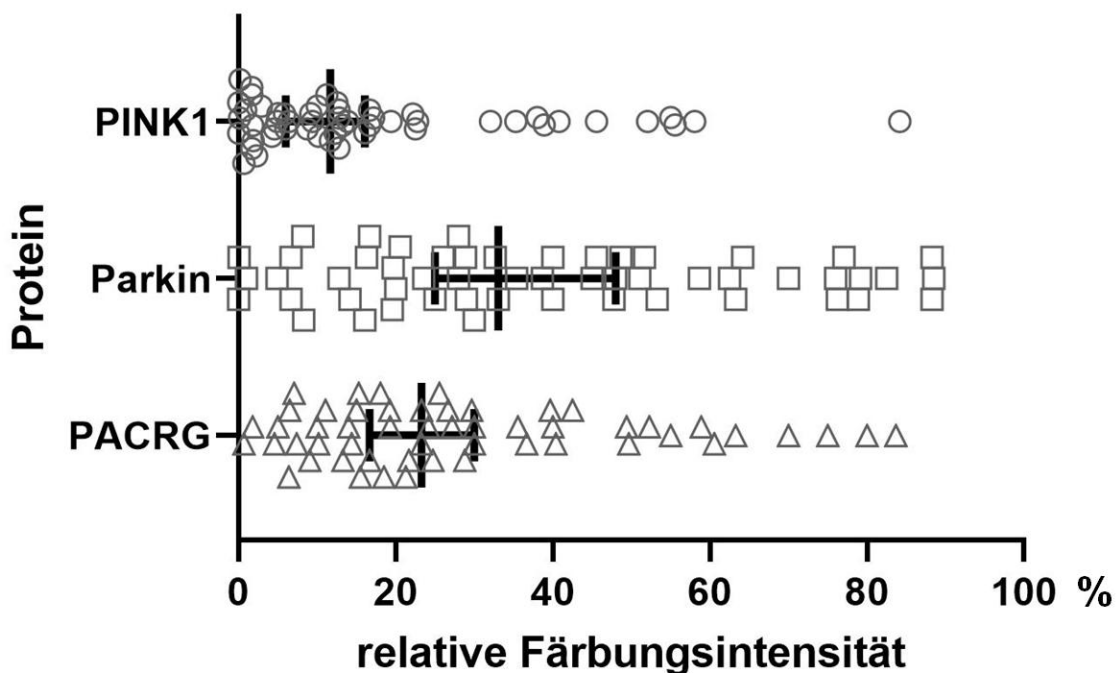


Abb. 10: Verteilung der relativen Färbungsintensität nach immunhistochemischer Proteinmarkierung von PINK1, Parkin und PACRG in der Testgruppe: Dargestellt sind Median mit Terzilen sowie die prozentualen Werte der Färbungsintensität jedes Patientenfalls (je Färbung n = 53 Patientenfälle).

3.2.2 Überlebensanalyse des Patientenkollektivs in Bezug auf T-Stadium und N-Stadium sowie in Bezug auf die Proteinexpression von PINK1, Parkin und PACRG

Anhand der erfassten Daten zur Überlebenszeit von Patienten nach der Diagnose eines CCCs führten wir eine Analyse nach Kaplan und Meier durch. Die Überlebenszeiten lagen bei 37 Patienten des Gesamtkollektivs der Proteinexpressionsanalyse von 53 Patienten vor. Wir konnten dort keine signifikanten Unterschiede zwischen niedrigem und hohem T-Stadium sowie zwischen niedrigem und hohem N-Stadium feststellen. Jedoch zeigte sich die Tendenz, dass ein höheres T-Stadium (T3 und T4) ein schlechteres Gesamtüberleben vorhersagt als kleinere Tumoren (T1 und T2) ($p = 0,19$). Ein noch stärkerer Trend zeigte sich innerhalb des Lymphknotenstadiums. Ein höheres Lymphknotenstadium (N1/2) zeigte eine höhere Sterblichkeit an als ein niedrigeres (N0). Diese Beobachtung ist jedoch auch nicht statistisch signifikant ($p = 0,11$).

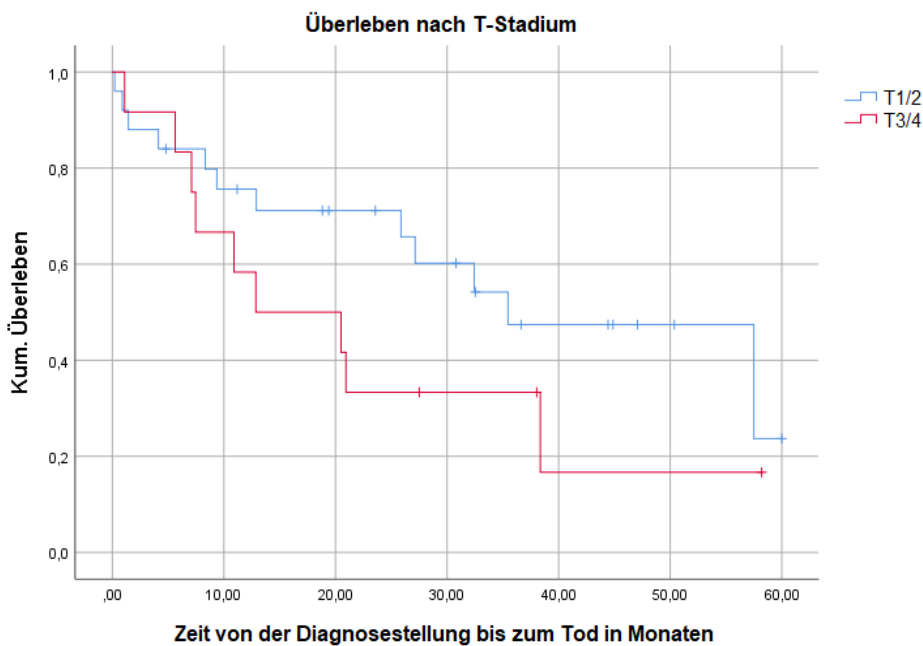


Abb. 11: Kaplan-Meier-Kurven nach dem T-Stadium: Zwischen einem niedrigen T-Stadium (T1/2) und einem hohen T-Stadium (T3/4) gab es keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf das Gesamtüberleben in dem betrachteten Kollektiv von CCC-Patienten ($n = 37$ Patienten). log-rank-Test: $p = 0,19$; (blau: T1/2, rot: T3/4)

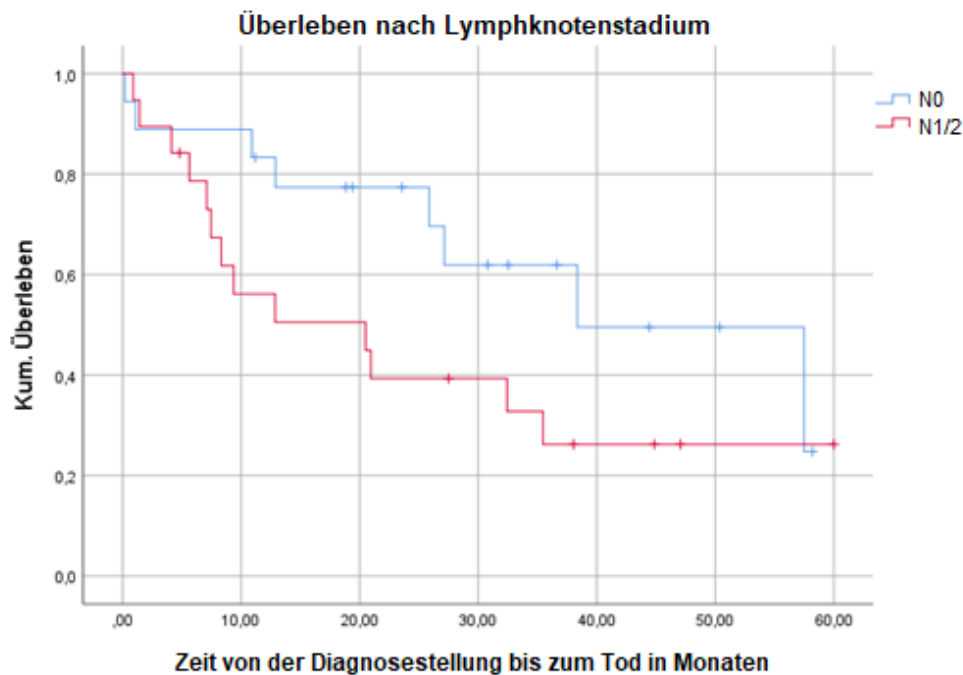


Abb. 12: Kaplan-Meier-Kurven nach dem Lymphknotenstadium: Zwischen der Gruppe von Patienten ohne Lymphknoten (N0) und der Gruppe mit Lymphknoten (N1/2) gab es keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf das Gesamtüberleben in dem betrachteten Kollektiv von CCC-Patienten (n = 37 Patienten). log-rank-Test: p = 0,11; (blau: N0, rot: N1/2)

Zur Analyse der Überlebensdaten im Vergleich mit den Färbungsintensitäten wurden die Werte eines Proteins an ihrem jeweiligen Median in zwei Gruppen dichotomisiert. Log-rank-Tests zeigten hier weder für PINK1 noch für Parkin und PACRG signifikante Unterschiede im Überleben zwischen den beiden jeweiligen, dichotomisierten Gruppen.

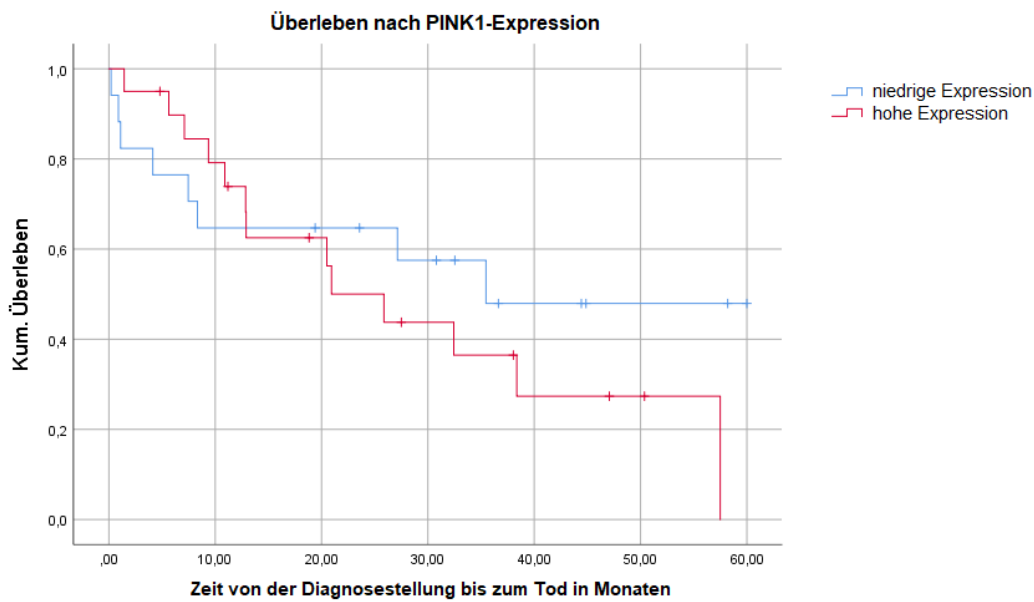


Abb. 13: Kaplan-Meier-Kurven nach der PINK1-Proteinexpression: Zwischen einer niedrigen PINK1-Proteinexpression und einer hohen PINK1-Proteinexpression gab es keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf das Gesamtüberleben in dem betrachteten Kollektiv von CCC-Patienten ($n = 37$ Patienten). log-rank-Test: $p = 0,37$; (blau: alle Färbungsintensitäten unterhalb des Medians, rot: alle Färbungsintensitäten oberhalb des Medians)

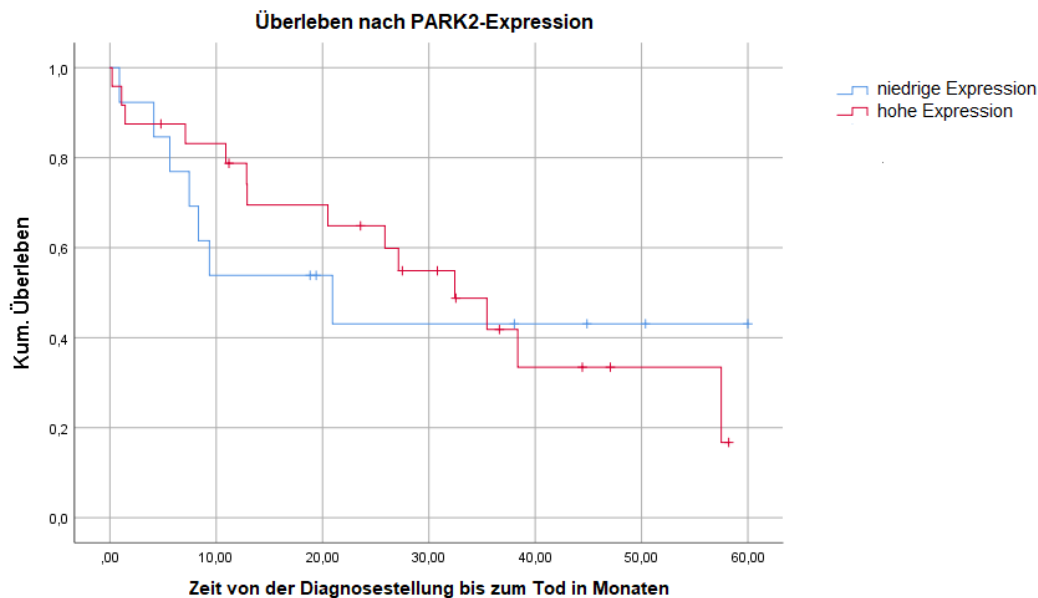


Abb. 14: Kaplan-Meier-Kurven nach der PARK2-Protein-(=Parkin-)Expression: Zwischen einer niedrigen Parkin-Proteinexpression und einer hohen Parkin-Proteinexpression gab es keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf das Gesamtüberleben in dem betrachteten Kollektiv von CCC-Patienten ($n = 37$ Patienten). log-rank-Test: $p = 0,88$; (blau: alle Färbungsintensitäten unterhalb des Medians, rot: alle Färbungsintensitäten oberhalb des Medians)

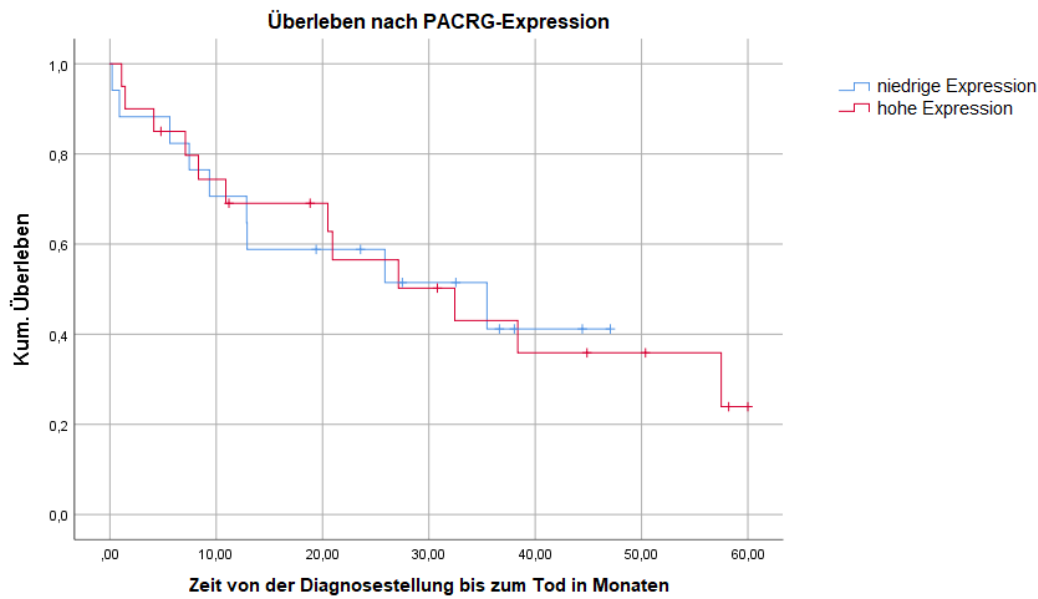


Abb. 15: Kaplan-Meier-Kurven nach der PACRG-Proteinexpression: Zwischen einer niedrigen PACRG-Proteinexpression und einer hohen PACRG-Proteinexpression gab es keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf das Gesamtüberleben in dem betrachteten Kollektiv von CCC-Patienten ($n = 37$ Patienten). log-rank-Test: $p = 0,98$; (blau: alle Färbungsintensitäten unterhalb des Medians, rot: alle Färbungsintensitäten oberhalb des Medians)

3.2.3 Proteinexpression von PINK1, Parkin und PACRG in Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Daten

Die in **Tab. 16** beschriebenen klinisch-pathologischen Daten konnten mit den Expressionen der Proteine verglichen werden. In den folgenden Unterkapiteln werden die Ergebnisse der Analyse mittels Kruskal-Wallis-Test und falls erforderlich mittels Mann-Whitney-U-Test dargestellt.

Tab. 16: Übersicht über die klinisch-pathologischen Parameter und deren durchschnittliche Färbungsintensität in der Immunhistologie. (In Einzelfällen lagen zu Patienten nicht alle klinischen Daten vor, daher wurden sie dort nicht berücksichtigt.)

Parameter		n	Durchschnittliche Färbeintensität in %		
			PINK1	Parkin	PACRG
Geschlecht	männlich	27	14,35	43,49	24,99
	weiblich	26	19,82	34,64	32,84
Lokalisation	ICC	22	19,81	41,80	30,04
	PCC	16	12,62	25,42	29,08
	DCC	15	17,67	49,92	26,84
T-Stadium	pT1	15	8,13	34,44	29,16
	pT2	15	27,45	44,62	32,10
	pT3	20	18,05	40,58	28,29
	pT4	2	3,22	35,42	15,33
N-Stadium	pN0	27	15,75	44,11	32,43
	pN1/pN2	25	19,04	35,09	25,59
M-Stadium	pM0	48	18,35	42,19	28,99
	pM1	4	5,11	10,81	30,94
PSC	Ja	2	17,92	65,01	16,32
	Nein	51	17,00	38,14	29,33
Grading	G1	3	14,31	50,89	34,24
	G2	29	17,29	43,20	25,59
	G3	18	19,73	36,36	36,29

3.2.3.1 Proteinexpression von PINK1 in Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Daten

Der statistische Globaltest nach Kruskal und Wallis zeigte einen signifikanten Unterschied innerhalb der Gruppe der T-Stadien ($p = 0,026$). Im U-Test nach Mann und Whitney zeigte sich ein signifikanter Unterschied innerhalb der Gruppe von T1 zu T2 ($p = 0,021$) und von T1 zu T3 ($p = 0,016$). Andere Differenzen waren nicht signifikant. Im Durchschnitt war die Proteinexpression von PINK1 im Stadium T1 niedriger als bei T2 bzw. T3 (vgl. **Tab. 16**). Die PINK1-Proteinexpression stieg von intrahepatischen CCCs

über perihiläre CCCs zu distalen extrahepatischen CCCs. Dieser Anstieg war jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$). Im U-Test nach Mann und Whitney zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen N0 und N1/N2 ($p = 0,30$). Die höhere Proteinexpression von PINK1 im Stadium M0 war gegenüber M1 nicht signifikant ($p = 0,09$). Auch bei Patienten mit PSC unterschied sich die Proteinexpression von PINK1 nicht signifikant von der bei Patienten ohne PSC ($p = 0,35$). Mit höherem Grading stieg die Proteinexpression im Patientenkollektiv an. Nach dem H-Test von Kruskal und Wallis musste die Hypothese, dass dieser Unterschied signifikant ist, verworfen werden ($p > 0,05$). Geschlechtsspezifische Unterschiede gab es in der PINK1-Expression nicht ($p = 0,32$).

Tab. 17: PINK1-Proteinexpression koordiniert mit klinisch-pathologischen Daten; H-Test nach Kruskal und Wallis, U-Test nach Mann und Whitney (nn = Test nicht notwendig)

PINK1		
Parameter	Signifikanzlevel (H-Test)	Signifikanzlevel (U-Test)
männlich vs. weiblich	nn	$p = 0,32$
ICC vs. PCC	$p > 0,05$	nn
PCC vs. DCC		nn
ICC vs. DCC		nn
T1 vs. T2	$p = 0,03$	$p = 0,02$
T1 vs. T3		$p = 0,02$
T1 vs. T4		$p = 0,37$
T2 vs. T3		$p = 0,56$
T2 vs. T4		$p = 0,10$
T3 vs. T4		$p = 0,08$
N0 vs. N1/N2		nn
M0 vs. M1	nn	$p = 0,09$
PSC vs. noPSC	nn	$p = 0,35$
G1 vs. G2	$p > 0,05$	nn
G2 vs. G3		nn
G1 vs. G3		nn

3.2.3.2 Proteinexpression von Parkin in Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Daten

Die Lokalisation des Tumors spielte eine Rolle in der Parkinexpression (H-test: $p = 0,021$). So fand sich in perihilären Cholangiokarzinomen eine signifikant niedrigere Expression als in sowohl intrahepatischen ($p = 0,020$) als auch distalen extrahepatischen Cholangiokarzinomen ($p = 0,019$). Während das Patientenkollektiv in Bezug auf Tumorausdehnung und Lymphknotenbefall keinen Unterschied in der Parkinexpression zeigte, fand sich im Fernmetastasenstatus ein hochsignifikanter Unterschied. Tumoren, bei deren zugehörigen Patienten Fernmetastasen gefunden werden konnten, hatten einen niedrigeren Parkin-Spiegel als diejenigen, bei denen keine Metastasen assoziiert waren ($p = 0,008$). Zwar hatten die Patienten mit PSC einen höheren Parkin-Spiegel in ihren Tumoren. Aber diese Differenz stellte sich als nicht signifikant dar ($p = 0,15$). Ebenfalls konnte man die nicht signifikante Tendenz vermerken, dass ein höheres Grading eine niedrigere Parkin-Expression hatte ($p > 0,05$). Das Geschlecht hatte keinen Einfluss auf die Parkin-Expression ($p = 0,18$).

Tab. 18: Parkin-Proteinexpression koordiniert mit klinisch-pathologischen Daten; H-Test nach Kruskal und Wallis, U-Test nach Mann und Whitney (nn = Test nicht notwendig)

Parkin		
Parameter	Signifikanzlevel (H-Test)	Signifikanzlevel (U-Test)
männlich vs. weiblich	nn	p = 0,18
ICC vs. PCC	p = 0,02	p = 0,02
PCC vs. DCC		p = 0,01
ICC vs. DCC		p = 0,35
T1 vs. T2	p > 0,05	nn
T1 vs. T3		nn
T1 vs. T4		nn
T2 vs. T3		nn
T2 vs. T4		nn
T3 vs. T4		nn
N0 vs. N1/N2		nn
M0 vs. M1	nn	p = 0,01
PSC vs. noPSC	nn	p = 0,15
G1 vs. G2	p > 0,05	nn
G2 vs. G3		nn
G1 vs. G3		nn

3.2.3.2 Proteinexpression von PACRG in Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Daten

Für PACRG stellte sich in keinem der untersuchten Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen heraus. Weder Lokalisation (p > 0,05), noch T-Stadium (p > 0,05), N-Stadium (p = 0,21) oder M-Status (p = 0,71) waren demnach in verschiedene Gruppen zu unterteilen. Auch die höhere PACRG-Proteinexpression in nicht PSC-assoziierten Tumoren (p = 0,43) war ebenso wie das Grading (p > 0,05) und das Geschlecht (p = 0,39) nicht signifikant.

Tab. 19: PACRG-Proteinexpression koordiniert mit klinisch-pathologischen Daten; H-Test nach Kruskal und Wallis, U-Test nach Mann und Whitney (nn = Test nicht notwendig)

PACRG		
Parameter	Signifikanzlevel (H-Test)	Signifikanzlevel (U-Test)
männlich vs. weiblich	nn	p = 0,39
ICC vs. PCC	p > 0,05	nn
PCC vs. DCC		nn
ICC vs. DCC		nn
T1 vs. T2	p > 0,05	nn
T1 vs. T3		nn
T1 vs. T4		nn
T2 vs. T3		nn
T2 vs. T4		nn
T3 vs. T4		nn
N0 vs. N1/N2	nn	p = 0,21
M0 vs. M1	nn	p = 0,71
PSC vs. noPSC	nn	p = 0,43
G1 vs. G2	p > 0,05	nn
G2 vs. G3		nn
G1 vs. G3		nn

4. Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die Mitophagie eine besondere Rolle in cholangiozellulären Karzinomen einnimmt.

4.1 PINK1 mit ambivalenter Rolle in Karzinomen

Einen vermeintlichen Widerspruch zeigen die dargestellten Ergebnisse für PINK1. So war PINK1 im cholangiozellulären Karzinom auf der RNA-Ebene signifikant verringert. Dagegen zeigte sich eine höhere Proteinexpression bei höherem T-Stadium. In den Stadien T2 und T3 wurde jeweils signifikant mehr PINK1 als im Stadium T1 exprimiert. Dieses Ergebnis ist interessant, da die PINK1-Expression in Tumoren tatsächlich in beide Richtungen alteriert beschrieben wurde (Unoki und Nakamura, 2001; Agnihotri et al., 2016; Chang et al., 2018; Vara-Perez et al., 2019; Lu et al., 2020). Insbesondere Agnihotri et al. (2016) machten diesbezüglich interessante Observationen. Als sie PINK1 in Glioblastom-Zelllinien stabil exprimieren ließen, beobachteten sie eine signifikante Senkung der Proliferationsrate und der Entstehung von ROS. Ein Knockdown von PINK1 hingegen machte die Tumorzellen sensibel für strahleninduzierte Apoptose. Glioblastome profitieren also einerseits von dem Zelltod-Schutz durch PINK1, sind dadurch andererseits aber auch in ihrem Wachstum eingeschränkt. Letzteres konnte von den Autoren auch in einem in-vivo Mausmodell nachgewiesen werden (Agnihotri et al., 2016). Ihrem Modell zufolge tritt PINK1 in jeder Zelle – ob maligne oder nicht – als Schützer vor ROS auf, welche in normalen Zellen die Transformation zu Krebs via Warburg-Effekt begünstigen. In Tumorzellen hemmt PINK1 das Wachstum, macht sie jedoch auch robuster gegen den Zelltod oder Strahlung (Agnihotri et al., 2016). Diese Ergebnisse lassen sich gut auf das auf den ersten Blick widersprüchliche Ergebnis der vorliegenden Arbeit übertragen. Generell erhöht das Fehlen von PINK1 durch ROS-Bildung den Druck auf Cholangiozyten zu Karzinomen zu entdifferenzieren. Dies zeigt sich in den hier vorliegenden Ergebnissen in einer allgemein niedrigeren Expression von PINK1 in CCCs. Andererseits ist das Vorhandensein von PINK1 ein Überlebensvorteil für cholangiozelluläre Karzinome. Dass höhere T-Stadien mit erhöhten PINK1-Leveln einhergehen, stützt diese These. Potenziell handelt es sich um verschiedene

Pathogenesen beim Eintritt in das cholangiozelluläre Karzinom. Die meisten CCCs entstehen unter niedriger PINK1-Expression. Aber die CCCs, die ihre Fähigkeit, mit PINK1 funktionsgestörte Mitochondrien und damit ROS zu kontrollieren, erhalten, können besonders ausgedehnt wachsen. Chang et al. beobachteten eine Resistenz gegen Chemotherapie in Adenokarzinomen der Lunge, die hohe PINK1-Spiegel aufwiesen. Auch dies untermauert die Funktion von PINK1 als möglichen Schutzfaktor vor Apoptose, wenn PINK1 in Tumoren (über-)exprimiert wird (Chang et al., 2018). Es bedarf dringend weiterer Forschung, um das ambivalente Verhalten von PINK1 besser zu verstehen.

4.2 Parkin als Tumorsuppressor

Bei Parkin wurde im Gegensatz zu PINK1 bisher nur beobachtet, dass es in Tumoren herunterreguliert ist. Es ist noch unklar, warum es nicht auch wie PINK1 in beide Richtungen alteriert (Hoch- und Herunterregulation) beschrieben wurde. Möglicherweise liegt einem der beiden Proteine noch ein anderer Mechanismus zugrunde. Denkbar wäre, dass Parkin den gleichen Standpunkt wie PINK1 einnehmen müsste, da PINK1 Parkin zur Mitophagie rekrutiert. Jedoch tut es dies nach den vorliegenden Daten dieser Studie ebenfalls nicht. Es konnte gezeigt werden, dass Metastasen des cholangiozellulären Karzinoms begünstigt unter Parkin-Mangel entstehen. Hervorzuheben ist auch, dass perihiläre cholangiozelluläre Karzinome im Vergleich zu intrahepatischen oder distal-extrahepatischen Karzinomen eine niedrigere Parkin-Expression aufweisen. Diese Ergebnisse sind von besonderem Interesse, da molekulare Differenzen zwischen den Lokalisationen des CCCs insbesondere für Klatskin-Tumoren bislang nicht hinlänglich beschrieben sind (Munding und Tannapfel, 2012).

4.3 PACRG ohne nachweisbaren Zusammenhang zwischen Expression und Tumorverhalten

Das dritte untersuchte Protein, PACRG, wies in keiner der Analysen signifikante Veränderungen auf. Ohnehin sind bei PACRG noch weitere Studien zur normalen Funktion notwendig. Als Teil von großen Komplexen mit Chaperonen wie HSP 70 und HSP 90 ist es möglich, dass PACRG eine Rolle in der Tumorgenese einnimmt. Im klarzelligen Nierenkarzinom ist bereits eine Mindereexpression von PACRG beschrieben

worden (Toma et al., 2013). Einen engen Zusammenhang von PACRG zur Tumorentstehung kann basierend auf den Daten der vorliegenden Studie für das cholangiozelluläre Karzinom bisher nicht angenommen werden.

4.4 Andere Studien über PINK1, Parkin und PACRG im CCC

Während es in anderen Tumorentitäten bereits Untersuchungen zu den mitophagie-assoziierten Proteinen PINK1, Parkin und PACRG gibt, ist das bei dem cholangiozellulären Karzinom bisher weitestgehend nicht der Fall. Lediglich für Parkin zeigten Chen et al., dass es im ICC durch Überexpression von CNRIP1 (Cannabinoid receptor-interacting protein 1) aktiviert werden kann und die Degradierung von PKM2 (Pyruvat-Kinase M2) bewirkt (Chen et al., 2021). PKM2 ist ein bekannter Tumormarker, welcher in vielen Tumorentitäten eine wichtige Rolle in der Invasion und Metastasierung spielt (Zhang et al., 2019). Auf die Mitophagie gehen die Autoren Chen et al. (2021) allerdings nicht ein. Dennoch konnten sie eine im Vergleich zu Normalgewebe in ICCs niedrigere Parkin-Expression nachweisen (Chen et al., 2021), was mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie übereinstimmt. Die vorliegende Studie zeigte eine zwar nicht signifikante Verringerung der RNA-Expression von Parkin in CCCs auf das 0,56-Fache ($p = 0,14$), aber in diesen Untersuchungen war die Fallzahl mit 14 Tumoren auch relativ klein. In der Analyse der Proteinexpression hingegen konnte nachgewiesen werden, dass ein niedriger Parkin-Spiegel in dem hier analysierten Patientenkollektiv besonders stark in der Gruppe der Patienten mit Fernmetastasen vorlag ($p < 0,01$). Diese Beobachtung legt nahe, dass insbesondere weit fortgeschrittene CCCs Veränderungen am Genom zeigen, welche eine verminderte Translation von Parkin nach sich ziehen. Des Weiteren zeigten Chen et al. (2021), dass Patienten mit niedrigen CCC-Parkin-Expressionen in Kombination mit einer hohen DNA-Methylierung von CNRIP1 ein niedrigeres Gesamtüberleben hatten (Chen et al., 2021). Dieses Ergebnis passt nicht zu der Beobachtung, dass die Parkin-Expression nicht in Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben des hier untersuchten Patientenkollektivs steht. Es ist denkbar, dass der beobachtete Effekt auf das Gesamtüberleben CNRIP1 zuzuschreiben ist und nicht Parkin.

Eine Studie von Jiang et al. (2022) zeigte eine negative Korrelation von der von ihnen hauptsächlich untersuchten Mikro-RNA miR-181b-5p und der Parkin-Expression in

cholangiozellulären Karzinomen. Sie konnten zeigen, dass Knockdown von PARK2 die Expression von PTEN, einem Tumorsuppressor, herunterreguliert, was zur Aktivierung des AKT-Signalweges führt. Genauere Untersuchungen, ob die Expression von Parkin in CCCs vermindert war, führten die Autoren nicht durch. Sie verwiesen bei Parkin in seiner Funktion als Tumorsuppressor auf Studien, die dies in anderen Geweben nachweisen konnten (Jiang et al., 2022). Ihre Vermutung, dass dies auch im CCC der Fall ist, kann hier nur eingeschränkt bestätigt werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie haben gezeigt, dass die Expression von Parkin im CCC tendenziell erniedrigt ist (s. **Tab. 15**) – jedoch nicht signifikant.

4.5 Ein Blick auf PTEN – Namensgebend für PINK1

PTEN stellt einen wichtigen Tumorsuppressor dar, der auch im cholangiozellulären Karzinom eine Rolle für das Gesamtüberleben spielt (Wang et al., 2015). Dies wird primär über seine dephosphorylierende Funktion von PIP3 zu PIP2 erreicht. PTEN antagonisiert somit den Effekt der PI3K. PIP3 stimuliert den anfangs erwähnten AKT-Signalweg, welcher proliferative Prozesse in Gang setzen kann (Wang et al., 2020). Die zugrundeliegenden Mechanismen von PTEN in der Mitophagie sind noch nicht in Gänze verstanden. Wang et al. schreiben sowohl der langen Form PTEN-L bzw. PTEN α als auch dem klassischen, kürzeren PTEN eine negativ regulierende Wirkung auf die Mitophagie zu (Wang et al., 2020). Auch wenn PTEN die Autophagie im Allgemeinen stimuliert (Ueno et al., 2008; Cai et al., 2018), so konnte gezeigt werden, dass PTEN über AKT die PINK1-Parkin-gesteuerte Mitophagie inhibiert, wenn auch nicht unter allen Umständen (Soutar et al., 2018). So wurde der Effekt in der Studie bei Insulingabe und daraus resultierender AKT-Stimulation invertiert. Der Einfluss der AKT-Signalwege auf die Mitophagie bedarf noch intensiver Forschung. Auch über andere Signaltransduktionswege wie beispielsweise über die Dephosphorylierung von RAB7A kann PTEN die Mitophagie inhibieren. RAB7A stimuliert im phosphorylierten Zustand (pSer72-RAB7A) die Mitophagie, während ihm dies im unphosphorylierten Zustand nicht gelingt (Heo et al., 2018).

PTEN ist (neben AKT) das bislang einzige Protein, das einen engeren Zusammenhang zur PINK1-Parkin-gesteuerten Mitophagie aufweist und gleichzeitig im cholangiozellulären Karzinom verändert nachweisbar ist.

4.6 Andere mitophagieassoziierte Proteine im CCC

Andere mitophagieassoziierte Proteine wurden noch nicht im cholangiozellulären Karzinom untersucht. Signaltransduktionswege der Mitophagie wie beispielsweise über BNIP3/NIX oder über FUNDC1 sind zwar im Allgemeinen noch nicht so ausgeprägt beforscht wie der PINK1/Parkin-Pfad. Nichtsdestotrotz lassen sich hier bezüglich des CCCs bislang keine Zusammenhänge berichten. Über andere mitophagieassoziierte Proteine kann im Rahmen dieser Studie ebenfalls keine Aussage getroffen werden. Dies zeigt den weiteren Forschungsbedarf an, den das Feld der Mitophagie im cholangiozellulären Karzinom bedarf.

4.7 Eigenheiten des Patientenkollektivs der vorliegenden Studie

Im Folgenden wird noch auf mögliche Eigenheiten des in der vorliegenden Studie untersuchten Patientenkollektivs eingegangen. Einerseits lagen bei der RNA-Analyse überwiegend anonymisierte Daten vor, was lediglich den Vergleich von cholangiozellulären Karzinomen zu Normalgewebe ermöglichte. Zum anderen besaßen die nicht-anonymisierten Fälle, die zur Analyse der Proteinexpression zur Verfügung standen, eine etwas andere Verteilung von CCCs als in Teilen der Literatur beschrieben. Vor allem die Lokalisation des CCCs war in diesem Kollektiv anders verteilt. Während nach DeOliveira et al (2007) nur 8% aller cholangiozellulären Karzinome intrahepatisch waren, war diese Gruppe in der vorliegenden Studie mit knapp 40% am häufigsten vertreten. Die perihilären Tumoren sind mit 50% als häufigste Vertreter beschrieben. Sie machten in der vorliegenden Studie nur ungefähr 30% der Fälle aus. Distale extrahepatische Tumoren sind in der vorliegenden Studie im Gegensatz zu Ergebnissen des John Hopkins Hospitals zu 28% statt zu 42% vertreten (DeOliveira et al., 2007). Diese Beobachtung könnte auf einer tatsächlich anderen Verteilung in der Bevölkerung beruhen. So ist die globale Verteilung aller CCCs auch äußerst heterogen. Informationen zu einer möglichen Stichprobenverzerrung im Sinne eines „*selection bias*“ liegen nicht vor. Daten aus ganz Deutschland zeigten eine Verteilung, die der Verteilung der Patienten der vorliegenden Studie ähnelt. Demnach lagen 42% aller CCCs intrahepatisch, während 43% extrahepatisch, also perihilär oder distal lokalisiert waren (Walter et al., 2019). Auch neuere Daten aus den USA zeigen einen weitaus höheren

Anteil an ICCs (54%) als ECCs (46%) (Tyson et al., 2014). Die zitierte andere Verteilung, die im John Hopkins Hospital beobachtet wurde, (DeOliveira et al., 2007) geht vermutlich auf irrtümliche Klassifikationen aus vergangenen Jahren, insbesondere aus der Zeit vor dem Jahr 2000 zurück, in der PCCs auch nicht den ECCs, sondern den ICCs zugeordnet wurden. Umfassende Hintergrundinformationen zu dieser Klassifizierung liefern zwei Studien (Tyson et al., 2014; Walter et al., 2019).

Die Geschlechterverteilung des in der Proteinexpression untersuchten Patientenkollektivs ist ähnlich wie in der Literatur beschrieben. Etwas mehr Männer als Frauen erkrankten generell an CCCs (DeOliveira et al., 2007; Tyson et al., 2014; Walter et al., 2019), in der vorliegenden Studie genau einer mehr (26 Frauen und 27 Männer). Zum Alter lagen außer zu den 2 Patienten, aus denen die Organoide erstellt wurden, keine Angaben vor. Diese beiden Patienten hatten das typische Erkrankungsalter von ca. 70 Jahren.

Überraschend war die geringe Anzahl von PSC-assoziierten CCCs in dem untersuchten Kollektiv. Nur 2 der 53 Patienten, die in der Proteinanalyse untersucht wurden, wiesen PSC auf. Angaben aus der Literatur deuten auf einen Anteil von PSC von zirka 10% unter allen CCCs hin (LaRusso et al., 2006). Folglich sind die vorliegenden Auswertungen zu der Korrelation von PSC und den mitophagieassoziierten Proteinen nicht besonders aussagekräftig und bedürfen weiterer Testungen, um gegebenenfalls signifikante Ergebnisse zu erzielen.

Sämtliche Gewebeproben konnten nur von operationsgeeigneten Patienten gewonnen werden. Durch diese Selektion kann ein verzerrender Effekt entstehen, der weniger aggressive Tumoren bevorzugt. Aggressivere Tumorentitäten könnten beim Patienten möglicherweise schon zu einer palliativen (nicht mehr heilbaren) Situation geführt haben, was bedeutet, dass dieses Tumormaterial dann nicht für die vorliegende Studie zur Verfügung steht. Das Gewicht dieses Effekts kann schlecht eingeschätzt werden, soll aber an dieser Stelle Erwähnung finden.

Zusammenfassend fügt sich die Studie in die zugegebenermaßen etwas heterogene Landschaft der bereits als mitophagieassoziiert beschriebenen Tumoren ein. PINK1 nimmt im cholangiozellulären Karzinom seinen ambivalenten Platz ein, dass es in Tumoren sowohl unter- als auch übermäßig exprimiert sein kann. Parkin ist wie zuvor für

andere Tumoren beschrieben bei niedriger Expression mit schlechter Prognose vergesellschaftet. PACRG besetzt schließlich als wenig verstandenes Molekül eine neutrale Stellung. Wie groß das Ausmaß der Rolle von PINK1 und Parkin bzw. die von ihnen gesteuerte Mitophagie für das cholangiozelluläre Karzinom sind, bleibt dennoch fraglich. Zumindest konnten für Parkin nicht viele signifikante Unterschiede festgestellt werden und PINK1 muss definitiv noch weiter erforscht werden, um seine Rolle als Tumorsuppressor oder auch als Onkogen besser zu etablieren. Nichtsdestotrotz können die beiden Proteine PINK1 und Parkin in einer Zukunft, in der personalisierte Medizin zunehmend wichtiger wird, eine beachtliche Rolle spielen. Nicht bei jedem CCC wird demzufolge ein Inhibitor oder Stimulator bzw. Imitator der molekularen Signaltransduktionswege, die PINK1 und Parkin aktivieren, eingesetzt werden. Doch einzelne Patienten könnten hiervon profitieren. Des Weiteren ist die Verwendung von PINK1 und Parkin als histologische Marker für die Prognose des Tumorpatienten denkbar. Ebenso ist eine Verwendung im Screening für CCCs, ggf. in Kombination mit anderen Merkmalen, möglich.

5. Zusammenfassung

In dieser Studie wurde der Zusammenhang zwischen den mitophagieassoziierten Proteinen PINK1, Parkin sowie dem Parkin-koregulierten Gen-Protein, PACRG und dem cholangiozellulären Karzinom untersucht. Das cholangiozelluläre Karzinom bedarf bei häufig zu später Diagnose und oft palliativer Therapie dringend neuer Forschungsansätze. Die PINK1-Parkin-gesteuerte Mitophagie ist bereits in einigen anderen Tumorentitäten als dem cholangiozellulären Karzinom als signifikant verändert beschrieben worden.

Methodisch wurden zwei getrennte Kollektive betrachtet. Ein kleineres Kollektiv diente der Begutachtung der RNA-Expression via RNA-Extraktion, reverser Transkription und qPCR. Das größere Kollektiv wurde zur Analyse der Proteinexpression mittels immunhistochemisch gefärbter TMAs genutzt. Hier standen im Gegensatz zum ersten Kollektiv klinisch-pathologische Hintergrundinformationen zu den Patienten zur Verfügung, während bei der RNA-Analyse lediglich zwischen cholangiozellulärem Karzinom und Normalgewebe unterscheiden konnte.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Expression von PINK1 im cholangiozellulären Karzinom signifikant erniedrigt ist, jedoch hauptsächlich im Stadium T1 und wesentlich weniger in den Stadien T2 und T3. Parkin war überraschenderweise in perihilären cholangiozellulären Karzinomen gegenüber intrahepatischen oder distal extrahepatischen Karzinomen signifikant geringer exprimiert. In Patientengewebe, in dem Fernmetastasen zu finden waren, zeigte sich eine besonders niedrige Parkin-Expression. Die Expression von PACRG war in den untersuchten CCCs nicht signifikant verändert.

Die vorliegenden Ergebnisse für die Proteine PINK1, Parkin und PACRG im CCC reihen sich größtenteils in die Beobachtungen für andere Tumoren ein. PINK1 ist auch anderen Tumoren ambivalent, jedoch meist unterexprimiert. Andererseits bietet es einen Überlebensvorteil für die Tumorzellen, wenn es weiterhin exprimiert wird. Parkin findet sich bei schlechterer Prognose erniedrigt, was durch die hier gezeigte Assoziation zum Fernmetastasenstatus abgebildet ist. PACRG benötigt noch intensiverer Forschung, ebenso wie alternative Signaltransduktionswege der Mitophagie.

6. Anhang

Tab. 20: Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Thermomixer	Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vollautomatisches Färbesystem	VENTANA BenchMark ULTRA	Roche, Basel, Schweiz
Mikrozentrifuge	MiniStar Silverline	VWR™, Darmstadt, Deutschland
qPCR Maschine	7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems™, Waltham, USA
Kühlzentrifuge	Heraceus™ Biofuge™ primo R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vortex Schüttler	IKA: Vortex Schüttler VF2	IKA, Staufen, Deutschland
Microtube PCR System	GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems™, Waltham, USA
Spektrophotometer	NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Schlittenmikrotom	Leica SM2010 R	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Digital Slide Scanner	Pannoramic Midi	3D-Histech, Norderstedt, Deutschland
Lichtmikroskop	Leica DM500	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Homogenisator	SpeedMill Plus	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Research®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Zentrifuge für PCR-Platten	Multifuge 3S-R	Heraeus, Hanau, Deutschland
----------------------------	----------------	--------------------------------

Tab. 21: Software und Programme

Software/ Programm	Hersteller
Zen 2.6 (blue edition)	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland
7500 Software	Applied Biosystems™, Waltham, USA
NanoDrop 1000 Operating Software, version 3.8.1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SPSS (version 25)	IBM, Armonk, USA
Graph Pad Prism 8	Graphpad Software Inc., San Diego, USA
Microsoft Office 365	Microsoft Corporation, Redmond, USA

Tab. 22: Chemikalien und Kits

Produkt	Bezeichnung	Hersteller
Trizol	TRIZOL™ Reagent	Life Technologies, Carlsbad, USA
Trichlormethan/ Chloroform	ROTIPURAN®	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol/ 2-Propanol	ROTIPURAN®	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Ethanol absolut	PanReac Applichem, Darmstadt, Deutschland
ddH ₂ O	Water for Molecular Biology DNA/ DNase/ RNase free	BioConcept, Allschwil, Schweiz
Extrazelluläre Matrix	Matrigel®	Corning, Inc., Corning, USA
PBS	DPBS	Life Technologies, Carlsbad, USA

RNA Extraktionskit	Universal RNA Purification Kit	Roboklon, Berlin, Deutschland
Reverse Transkriptase	SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Detektions-Kit	OptiView DAB IHC Detection Kit	Roche, Basel, Schweiz
Detektions-Kit	UltraView DAB Detektionssystem	Roche, Basel, Schweiz
Öl für IHC	BenchMark Ultra LCS	Roche, Basel, Schweiz
Puffer für ICH (pH = 8)	BenchMark Ultra CC1	Roche, Basel, Schweiz
Entparaffinierungsmedium	EZ PREP SOLUTION	Roche, Basel, Schweiz
Eindeckmedium	Pertex	MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland
Random Primers	Primer „random“	Roche, Basel, Schweiz
dNTP	dNTP	Roche, Basel, Schweiz
DTT	DTT	Invitrogen, Carlsbad, USA
RNase Inhibitor	RiboLock™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
qPCR- Farbstoff	SYBR® Green	Molecular Probes, Inc., Waltham, USA
Primer (Forward und Reverse)	RNA Oligonukleotide	Eurofins Genomics, Eberberg, Deutschland
Antikörper zur Immunhistochemischen Färbung	Anti-PINK1 antibody (ab23707)	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
	Anti-PACRG antibody (ab115465)	
	Parkin Antikörper (PRK8): sc-32282	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA
RNase Inhibitor für Flächen	RNase Away	Fisher scientific, Schwerte, Deutschland

Tab. 23: Verbrauchsmaterialien

Objekt	Bezeichnung	Hersteller
Pipettenspitzen	Filterspitze PP, oberflächenoptimiert, 0-100µl; 0-200µl; 100-1000µl	nerbe plus, Winsen, Deutschland
Objektträger	Adhäsionsobjektträger TOMO	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	Falcon™ konische Zentrifugenröhrchen, 15 ml	Corning, Inc., Corning, USA
Mikroreaktionsgefäße	MicroAmp® Fast Reaction Tubes	Applied Biosystems™, Waltham, USA
Deckel der Mikroreaktionsgefäße	MicroAmp® Optical 8-Cap Strip	Applied Biosystems™, Waltham, USA
PCR-Platten	MicroAmp® Fast Optical 96 Well Reaction Plate	Applied Biosystems™, Waltham, USA
Mikroreaktionsgefäße	Reagiergefäß 1,5ml; SafeSeal Reagiergef. 2ml, PP	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Gummihandschuhe	Peha-soft nitrile	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
PCR- Plattenverschlussfolie	Platemax® CycloSeal Sealing Film	Axygen Scientific, Union City (Kalifornien), USA

Tab. 24: Protokoll zur manuellen RNA-Isolation mit Trizol

Nummer	Schritte
1.	Die in PBS gewaschenen Zellen bei 8000 rpm für 3-5 min zentrifugieren
2.	Überstand entfernen
3.	In 1 ml Trizol resuspendieren
4.	Für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubieren
5.	200 µl Chloroform hinzufügen
6.	Etwa 15s vortexen
7.	2-3min bei RT inkubieren
8.	Für 15 min bei 10600 rpm und 4°C zentrifugieren
9.	Die obere, wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Tube überführen, den Rest verwerfen
10.	500 µl Isopropanol hinzufügen und mixen
11.	Für 10 min bei RT inkubieren
12.	Für 10 min bei 10600 rpm und 4°C zentrifugieren
13.	Überstand verwerfen
14.	Mit 1 ml 70%-Ethanol + 30% ddH ₂ O waschen
15.	Für 2 min bei 8400 rpm und 4°C zentrifugieren
16.	Überstand verwerfen
17.	Schritte 14 bis 16 einmal wiederholen
18.	Rest Ethanol über Rückstand vorsichtig entfernen
19.	Rückstand zirka 30 min trocknen lassen
20.	Rückstand in 20-50 µl ddH ₂ O resuspendieren
21.	Für 10 min bei 55°C inkubieren, um den Rückstand zu lösen
22.	Probe weiterverarbeiten oder bei -20°C bzw. -80°C einfrieren

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Lichtmikroskopische Aufnahme eines intrahepatischen CCCs mit tubulärer Komponente (HE-Färbung).....	13
Abb. 2: Lichtmikroskopische Aufnahme eines intrahepatischen CCCs mit stark ausgeprägtem fibrösem Stroma (HE-Färbung)).....	13
Abb. 3: Schemazeichnung – Akkumulation von PINK1 bei gestörtem Membranpotential	24
Abb. 4: Schemazeichnung – Mitophagie und lysosomale Degradation markierter Mitochondrien.....	25
Abb. 5: Beispiele für Schmelzkurven.....	38
Abb. 6: n-fache RNA-Expression der Gene PINK1, PARK2 und PACRG von cholangiozellulärem Karzinom im Vergleich zu Normalgewebe.....	42
Abb. 7: Semiquantitative Einteilung der immunhistochemischen Färbung – PINK1-Protein.....	43
Abb. 8: Semiquantitative Einteilung der immunhistochemischen Färbung – Parkin	43
Abb. 9: Semiquantitative Einteilung der immunhistochemischen Färbung – PACRG-Protein.....	44
Abb. 10: Verteilung der relativen Färbungsintensität nach immunhistochemischer Proteinmarkierung von PINK1, Parkin und PACRG in der Testgruppe	44
Abb. 11: Kaplan-Meier-Kurven nach dem T-Stadium	45
Abb. 12: Kaplan-Meier-Kurven nach dem Lymphknotenstadium	46
Abb. 13: Kaplan-Meier-Kurven nach der PINK1-Proteinexpression	47
Abb. 14: Kaplan-Meier-Kurven nach der PARK2-Protein-(=Parkin-)Expression	47
Abb. 15: Kaplan-Meier-Kurven nach der PACRG-Proteinexpression.....	48

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: TNM-Klassifikation für intrahepatische CCCs.....	17
Tab. 2: TNM-Klassifikation für perihiläre CCCs	18
Tab. 3: TNM-Klassifikation für distale extrahepatische CCCs	19
Tab. 4: Stadieneinteilung intrahepatischer CCCs	20
Tab. 5: Stadieneinteilung perihilärer CCCs.....	21
Tab. 6: Stadieneinteilung distaler extrahepatischer CCCs.....	21
Tab. 7: Patientenkollektiv der untersuchten Proben - Proteinexpression.....	29
Tab. 8: Patientendaten zu den verwendeten Organoiden.....	30
Tab. 9: Verwendete Antikörper und deren Verdünnung in der immunhistochemischen Färbung der TMAs	31
Tab. 10: Überblick über extrahierbare Mengen an RNA und daraus folgende cDNA-Konzentrationen	34
Tab. 11: Inhalt je eines Wells für die qPCR	36
Tab. 12: Die folgenden Oligonukleotidsequenzen wurden in den qPCRs der vorliegenden Studie verwendet.....	36
Tab. 13: Temperaturprotokoll der qPCR.....	37
Tab. 14: Überblick über verwendete statistische Tests.....	40
Tab. 15: Vergleich der RNA-Expressionen in Tumor- und Normalgewebe.....	41
Tab. 16: Übersicht über die klinisch-pathologischen Parameter und deren durchschnittliche Färbungsintensität in der Immunhistologie	49
Tab. 17: PINK1-Proteinexpression koordiniert mit klinisch-pathologischen Daten	50
Tab. 18: Parkin-Proteinexpression koordiniert mit klinisch-pathologischen Daten.....	52
Tab. 19: PACRG-Proteinexpression koordiniert mit klinisch-pathologischen Daten	53
Tab. 20: Geräte.....	62
Tab. 21: Software und Programme.....	63
Tab. 22: Chemikalien und Kits.....	63
Tab. 23: Verbrauchsmaterialien.....	65
Tab. 24: Protokoll zur manuellen RNA-Isolation mit Trizol.....	66

9. Literaturverzeichnis

Agirre X, Román-Gómez J, Vázquez I, Jiménez-Velasco A, Garate L, Montiel-Duarte C, Artieda P, Cordeu L, Lahortiga I, Calasanz MJ, Heiniger A, Torres A, Minna JD, Prósper F. Abnormal methylation of the common PARK2 and PACRG promoter is associated with downregulation of gene expression in acute lymphoblastic leukemia and chronic myeloid leukemia. *International journal of cancer* 2006; 118: 1945–1953

Agnihotri S, Golbourn B, Huang X, Remke M, Younger S, Cairns RA, Chalil A, Smith CA, Krumholtz S-L, Mackenzie D, Rakopoulos P, Ramaswamy V, Taccone MS, Mischel PS, Fuller GN, Hawkins C, Stanford WL, Taylor MD, Zadeh G, Rutka JT. Molecular and Cellular Pathobiology PINK1 Is a Negative Regulator of Growth and the Warburg Effect in Glioblastoma. *Cancer Res* 2016; 76

American Joint Committee on Cancer. 2022. Cancer Staging Systems. Verfügbar unter <https://www.facs.org/quality-programs/cancer-programs/american-joint-committee-on-cancer/cancer-staging-systems/> (Zugriffsdatum: 2022-05-18)

Blechacz B. Cholangiocarcinoma: Current Knowledge and New Developments. *Gut and Liver* 2016

Boonstra K, Beuers U, Ponsioen CY. Epidemiology of primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis: A systematic review. *Journal of Hepatology* 2012; 56: 1181–1188

Braconi C, Huang N, Patel T. MicroRNA-dependent regulation of DNA methyltransferase-1 and tumor suppressor gene expression by interleukin-6 in human malignant cholangiocytes. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2010; 51: 881–890

Brito AF, Abrantes AM, Encarnação JC, Tralhão JG, Botelho MF. Cholangiocarcinoma: from molecular biology to treatment. *Medical Oncology* 2015; 32: 245

Cai J, Li R, Xu X, Zhang L, Lian R, Fang L, Huang Y, Feng X, Liu X, Li X, Zhu X, Zhang H, Wu J, Zeng M, Song E, He Y, Yin Y, Li J, Li M. CK1-alpha suppresses lung tumour growth by stabilizing PTEN and inducing autophagy. *Nature cell biology* 2018; 20: 465–478

Chang G, Zhang W, Ma Y, Wen Q. PINK1 Expression Is Associated with Poor Prognosis in Lung Adenocarcinoma. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 2018; 245: 115–121

Chen D, Wu H, Feng X, Chen Y, Lv Z, Kota VG, Chen J, Wu W, Lu Y, Liu H, Zhang Y, Zheng S, Wu J. DNA Methylation of Cannabinoid Receptor Interacting Protein 1 Promotes Pathogenesis of Intrahepatic Cholangiocarcinoma Through Suppressing Parkin-Dependent Pyruvate Kinase M2 Ubiquitination. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2021; 73: 1816–1835

Dai J, Wang H, Dong Y, Zhang Y, Wang J. Bile Acids Affect the Growth of Human Cholangiocarcinoma via NF- κ B Pathway. *Cancer Invest* 2013; 31: 111–120

DeOliveira ML, Cunningham SC, Cameron JL, Kamangar F, Winter JM, Lillemoe KD, Choti MA, Yeo CJ, Schulick RD. Cholangiocarcinoma: Thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. *Annals of Surgery* 2007; 245: 755–762

Everhart JE, Ruhl CE. Burden of Digestive Diseases in the United States Part III: Liver, Biliary Tract, and Pancreas. *Gastroenterology* 2009; 136: 1134–1144

Han C, Leng J, Demetris AJ, Wu T. Cyclooxygenase-2 Promotes Human Cholangiocarcinoma Growth. *Cancer Research* 2004; 64: 1369–1376

Heo J-M, Ordureau A, Swarup S, Paulo JA, Shen K, Sabatini DM, Harper JW. RAB7A phosphorylation by TBK1 promotes mitophagy via the PINK-PARKIN pathway. *Science Advances* 2018; 4

Isomoto H, Mott JL, Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Haan S, Gores GJ. Sustained IL-6/STAT-3 Signaling in Cholangiocarcinoma Cells due to SOCS-3 Epigenetic Silencing. *Gastroenterology* 2007; 132: 384–396

Jiang Z-L, Zhang F-X, Zhan H-L, Yang H-J, Zhang S-Y, Liu Z-H, Jiang Y, Lv L-Z, Ke R-S. miR-181b-5p Promotes the Progression of Cholangiocarcinoma by Targeting PARK2 via PTEN/PI3K/AKT Signaling Pathway. *Biochemical Genetics* 2022; 60: 223–240

Jones H, Alpini G, Francis H. Bile acid signaling and biliary functions. *Acta Pharmaceutica Sinica. B* 2015; 5: 123–128

- Kaplan EL, Meier P. Individual Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association* 1958; 53: 457–481
- Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Kaufmann SH, Gores GJ. Interleukin-6 Contributes to Mcl-1 Up-regulation and TRAIL Resistance via an Akt-Signaling Pathway in Cholangiocarcinoma Cells. *Gastroenterology* 2005; 128: 2054–2065
- Komori J, Marusawa H, Machimoto T, Endo Y, Kinoshita K, Kou T, Haga H, Ikai I, Uemoto S, Chiba T. Activation-induced cytidine deaminase links bile duct inflammation to human cholangiocarcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2008; 47: 888–896
- Kruskal WH, Wallis WA. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47(160) 1952; 47: 583–621
- Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins Basic Pathology* 2013
- Labib PL, Goodchild G, Pereira SP. Molecular Pathogenesis of Cholangiocarcinoma. *BMC cancer* 2019; 19: 185
- LaRusso NF, Shneider BL, Black D, Gores GJ, James SP, Doo E, Hoofnagle JH. Primary sclerosing cholangitis: Summary of a workshop. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2006; 44: 746–764
- Life Technologies. 2010. Introduction to Gene Expression Getting Started Guide. Verfügbar unter <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/gene-expression-analysis-real-time-pcr-information/introduction-gene-expression.html>
- Liu R, Li X, Qiang X, Luo L, Hylemon PB, Jiang Z, Zhang L, Zhou H. Taurocholate Induces Cyclooxygenase-2 Expression via the Sphingosine 1-phosphate Receptor 2 in a Human Cholangiocarcinoma Cell Line. *Journal of Biological Chemistry* 2015; 290: 30988–31002
- Lu X, Liu QX, Zhang J, Zhou D, Yang GX, Li MY, Qiu Y, Chen Q, Zheng H, Dai JG. PINK1 overexpression promotes cell migration and proliferation via regulation of autophagy and predicts a poor prognosis in lung cancer cases. *Cancer Management and Research* 2020; 24: 7703–7714

- Mann H, Whitney D. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Annals of mathematical Statistics* 1947; 18: 50–60
- Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemotherapy Reports* 1966; 50: 163–170
- Munding J, Tannapfel A. Anatomisch-pathologische Besonderheiten der Klatskin-Tumoren. Klassifikation, aktuelle molekularbiologische Aspekte, Prognosefaktoren. *Chirurg* 2012; 83: 208–214
- National Library of Medicine. 2022. PACRG parkin coregulated [*Homo sapiens* (human)]. Verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/135138> (Zugriffsdatum: 2022-05-18)
- Shaib Y, El-Serag HB. The epidemiology of cholangiocarcinoma. *Seminars in Liver Disease* 2004
- Shang S, Hua F, Hu Z-W. The regulation of β -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. *Oncotarget* 2017; 8: 33972–33989
- Shin HR, Oh JK, Lim MK, Shin A, Kong HJ, Jung KW, Won YJ, Park S, Park SJ, Hong ST. Descriptive epidemiology of cholangiocarcinoma and clonorchiasis in Korea. *Journal of Korean Medical Science* 2010; 25: 1011–1016
- Söreide K, Körner H, Havnen J, Söreide JA. Bile duct cysts in adults. *British Journal of Surgery* 2004; 91: 1538–1548
- Soutar MPM, Kempthorne L, Miyakawa S, Annuario E, Melandri D, Harley J, O’Sullivan GA, Wray S, Hancock DC, Cookson MR, Downward J, Carlton M, Plun-Favreau H. AKT signalling selectively regulates PINK1 mitophagy in SHSY5Y cells and human iPSC-derived neurons. *Scientific Reports* 2018; 8: 8855
- Stanley R, Aaltonen H, Aaltonen LA. *World Health Organization Classification of Tumours – Pathology & Genetics - Tumours of the Digestive System* 2000

Statistisches Bundesamt (Destatis). 2021. Anzahl der Gestorbenen nach Kapiteln der und nach Geschlecht für 2019. Verfügbar unter [https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-](https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/gestorbene_anzahl.html;jsessionid=1D9B90713F2F9F6AF4A697578CDC81EC.live721)

[Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/gestorbene_anzahl.html;jsessionid=1D9B90713F2F9F6AF4A697578CDC81EC.live721](https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/gestorbene_anzahl.html;jsessionid=1D9B90713F2F9F6AF4A697578CDC81EC.live721) (Zugriffsdatum: 2021-07-21)

Tadlock L, Patel T. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling in transformed growth of a cholangiocarcinoma cell line. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2001; 33: 43–51

The American Cancer Society medical, editorial content team. 2017a. Staging of Distal Bile Duct Cancers. Verfügbar unter <https://www.cancer.org/cancer/bile-duct-cancer/detection-diagnosis-staging/staging/staging-distal-extrahepatic-bile-duct.html> (Zugriffsdatum: 2022-05-18)

The American Cancer Society medical, editorial content team. 2017b. Staging of Intrahepatic Bile Duct Cancers. Verfügbar unter <https://www.cancer.org/cancer/bile-duct-cancer/detection-diagnosis-staging/staging/staging-intrahepatic-bile-duct.html> (Zugriffsdatum: 2022-05-18)

The American Cancer Society medical, editorial content team. 2017c. Staging of Perihilar Bile Duct Cancers. Verfügbar unter <https://www.cancer.org/cancer/bile-duct-cancer/detection-diagnosis-staging/staging/staging-extrahepatic-bile-duct.html> (Zugriffsdatum: 2022-05-18)

Toma MI, Wuttig D, Kaiser S, Herr A, Weber T, Zastrow S, Koch R, Meinhardt M, Baretton GB, Wirth MP, Fuessel S. PARK2 and PACRG are commonly downregulated in clear-cell renal cell carcinoma and are associated with aggressive disease and poor clinical outcome. *Genes Chromosomes and Cancer* 2013

Tyson GL, El-Serag HB. Risk factors for cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2011; 54: 173–184

Tyson GL, Ilyas JA, Duan Z, Green LK, Younes M, El-Serag HB, Davila JA. Secular trends in the incidence of cholangiocarcinoma in the USA and the impact of misclassification. *Digestive diseases and sciences* 2014; 59: 3103–3110

- Ueno T, Sato W, Horie Y, Komatsu M, Tanida I, Yoshida M, Ohshima S, Mak W, Watanabe S, Kominami E. Loss of Pten, a tumor suppressor, causes the strong inhibition of autophagy without affecting LC3 lipidation. *Autophagy* 2008; 4: 692–700
- Unoki M, Nakamura Y. Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. *Oncogene* 2001; 20: 4457–4465
- Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthony A, Maraveyas A, Madhusudan S, Iveson T, Hughes S, Pereira SP, Roughton M, Bridgewater J. Cisplatin plus Gemcitabine versus Gemcitabine for Biliary Tract Cancer. *The New England journal of medicine* 2010; 362: 1273–1281
- Vara-Perez M, Felipe-Abrio B, Agostinis P. Mitophagy in Cancer: A Tale of Adaptation. *Cells* 2019; 8: 493
- Vernucci E, Tomino C, Molinari F, Limongi D, Aventaggiato M, Sansone L, Tafani M, Russo MA. Mitophagy and Oxidative Stress in Cancer and Aging: Focus on Sirtuins and Nanomaterials. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019
- Vogel A, Wege H, Caca K, Nashan B, Neumann U. Diagnostik und Therapie des cholangiozellulären Karzinoms. *Deutsches Ärzteblatt* 2014; 111: 748–754
- Walter D, Ferstl P, Waidmann O, Trojan J, Hartmann S, Schnitzbauer AA, Zeuzem S, Kraywinkel K. Cholangiocarcinoma in Germany: Epidemiologic trends and impact of misclassification. *Liver International* 2019; 39: 316–323
- Wang L, Lu G, Shen HM. The Long and the Short of PTEN in the Regulation of Mitophagy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2020; 8: 299
- Wang L-J, He C-C, Sui X, Cai M-J, Zhou C-Y, Ma J-L, Wu L, Wang H, Han S-X, Zhu Q. MiR-21 promotes intrahepatic cholangiocarcinoma proliferation and growth in vitro and in vivo by targeting PTPN14 and PTEN. *Oncotarget* 2015; 6: 5932–5946
- Wang Y, Aoki H, Yang J, Peng K, Liu R, Li X, Qiang X, Sun L, Gurley EC, Lai G, Zhang L, Liang G, Nagahashi M, Takabe K, Pandak WM, Hylemon PB, Zhou H. The role of S1PR2 in bile acid-induced cholangiocyte proliferation and cholestasis-induced liver injury in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2017; 65: 2005–2018

Watanabe Y, Toki A, Todani T. Bile duct cancer developed after cyst excision for choledochal cyst. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery* 1999; 6: 207–212

Williams JA, Ding WX. Mechanisms, pathophysiological roles and methods for analyzing mitophagy - Recent insights. *Biological Chemistry* 2018; 399: 147–178

Yoon J-H, Canbay AE, Werneburg NW, Lee SP, Gores GJ. Oxysterols induce cyclooxygenase-2 expression in cholangiocytes: Implications for biliary tract carcinogenesis. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2004; 39: 732–738

Yoon J-H, Werneburg NW, Higuchi H, Canbay AE, Kaufmann SH, Akgul C, Edwards SW, Gores GJ. Bile Acids Inhibit Mcl-1 Protein Turnover via an Epidermal Growth Factor Receptor/Raf-1-dependent Mechanism 1. *Cancer Research* 2002; 62: 6500–6505

Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2011; 12: 9–14

Zhang Z, Deng X, Liu Y, Liu Y, Sun L, Chen F. PKM2, function and expression and regulation. *Cell & Bioscience* 2019; 9: 52

10. Danksagung

Ich spreche allen Personen, die mich während des Studiums und während der Entstehung dieser Doktorarbeit unterstützt haben, meinen Dank aus.

Vor allem möchte ich meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Marieta Toma für die Bereitstellung des Promotionsthemas und aller dafür benötigten Mittel danken. Die hervorragende wissenschaftliche und menschliche Betreuung und Beratung habe ich jederzeit geschätzt.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank der Arbeitsgruppe Toma, die mir stets mit Tat und Rat beiseite stand. Hervorheben möchte ich an dieser Stelle Kerstin Fuchs, Dr. Laura Eßer und Dr. Vittorio Branchi für ihre außerordentliche Unterstützung.

Auch vielen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der Uniklinik Bonn möchte ich danken, insbesondere Carsten Golletz und Susanne Steiner.

Ich bedanke mich neben Frau Prof. Dr. Toma bei Herrn Prof. Dr. Glen Kristiansen, der es mir ermöglicht hat, im Institut für Pathologie meine Dissertation anzufertigen.

Mein herzlicher Dank gilt auch Dr. Thomas Quast für die ausführliche Durchsicht der Doktorarbeit.

Nicht zuletzt möchte ich auch meiner Familie, meinen Freunden, meiner Freundin sowie ihrer Familie für die Unterstützung während des Studium und der Arbeit danken.