

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und
Kinderchirurgie der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfram T. Knoefel

**ACGH detektiert genomische Alterationen des
intrahepatischen Cholangiokarzinoms sowie
der korrespondierenden
Lymphknotenmetastasen und identifiziert eine
Subklasse mit signifikanter Korrelation zum
Überleben.**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ruben Jansen

2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekanin/Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfram T. Knoefel

Referentin/Referent: PD Dr. med. Anja Lachenmayer

Korreferentin/Korreferent: Prof. Dr. med. Nikolas Stoecklein

Meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Jansen R, Moehlendick B, Bartenhagen C, Toth C, Lehwald N, Stoecklein NH, et al. ACGH detects distinct genomic alterations of primary intrahepatic cholangiocarcinomas and matched lymph node metastases and identifies a poor prognosis subclass. *Sci Rep.* 2018;8(1):10637. doi: 10.1038/s41598-018-28941-6. PubMed PMID: 30006612; PubMed Central PMCID: PMC6045619 [1]

I Zusammenfassung

Das intrahepatische cholangiozelluläre Karzinom (ICC) ist der zweithäufigste maligne primäre Lebertumor mit einer weltweit zunehmenden Inzidenz [2, 3]. Obwohl das Vorkommen von Lymphknotenmetastasen (LKM) bereits als negativer Prädiktor für das Gesamtüberleben identifiziert werden konnte, sind die den Primärtumoren und LKM zugrundeliegenden genetischen Alterationen noch weitestgehend unverstanden [4].

In dieser Arbeit wurden mittels der komparativen genomischen Hybridisierung auf DNA-Microarrays (aCGH) 37 primäre intrahepatische ICCs und 14 korrespondierende LKM analysiert. Insgesamt wurden 60 Patienten mit ICC in diese Studie eingeschlossen, um relevante histo-pathologische und klinische Daten zu analysieren und mit den Ergebnissen zu korrelieren.

Die aCGH Analyse aller Proben bestätigte die bereits bekannten Kopienzahlalterationen (Copy Number Alterations, CNAs) für das ICC und identifizierte zudem bisher nicht beschriebene Zugewinne auf Chromosom 19q. N1 Primärtumore zeigten insgesamt mehr CNAs und exklusive Zugewinne auf den Chromosomen 3p, 4q, 5p und 13q sowie Verlusten auf 17p und 20p im Vergleich zu den N0 Primärtumoren. In der gepaarten Analyse hatte ein Großteil der LKM (86%) die gleichen CNAs wie der korrespondierende Primärtumor, jedoch zeigten 79% der LKM auch isolierte Zugewinne auf (12q14 (36%); 1p13, 2p23, 7p22, 7q11, 11q12, 13q13 und 14q12 (>20%)). Die Clusteranalyse der Primärtumore konnte 2 unterschiedliche Gruppen identifizieren. Cluster B zeichnete sich durch eine hohe Anzahl an CNAs aus und zeigte eine signifikante Korrelation zu einer schlechten Tumordifferenzierung (G3/4) sowie ein signifikant schlechteres Überleben. Die Mehrzahl der Primärtumore clusterte bei der Analyse aller Tumore aufgrund der großen Ähnlichkeit der CNAs mit ihren korrespondierenden LKM ohne signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Paaren. *TP53* und *KRAS* Mutationen konnten in 19% bzw. 6% der N1 Primärtumore und LKM detektiert werden. Gene, die in den neuen Zugewinnen und Verlusten der N1 Primärtumore und der LKM lagen, waren in wichtige Karzinom-assoziierte Signalwege involviert. Rauchen, Carbohydrat-Antigen 19-9 (CA 19-9) Serumlevel, Tumorstadium, mikrovaskuläre- und Perineuralscheideninvasion und R1-Resektion waren signifikant mit dem Lymphknotenstatus korreliert, während der Lymphknotenstatus, die R1-Resektion, eine schlechte Tumordifferenzierung (G3/4) signifikant mit einem schlechten Überleben korrelierten.

Die aCGH Analyse der ICC Primärtumore und LKM identifizierte eindeutige genetische Unterschiede zwischen N0 und N1 Primärtumoren, wohingegen die N1 Primärtumore und ihre korrespondierenden LKM eine große Ähnlichkeit mit jedoch einigen exklusiven Zugewinnen in den Metastasen aufwiesen. Eine neue Subklasse an Tumoren zeigte eine signifikante Korrelation zu schlechter Tumordifferenzierung und schlechterem Überleben. Die in den alterierten Regionen lokalisierten Gene könnten möglicherweise für den Prozess der Metastasierung und der Tumorprogression ursächlich sein und stellen somit potentielle Zielstrukturen für eine zielgerichtete Krebstherapie dar.

II Summary

Intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) is the second most common primary liver malignancy with increasing incidence worldwide [2, 3]. While the occurrence of lymph node metastases (LNM) has been identified as a prognostic factor [4], genetic alterations in metastases and matched primary tumors have not been analyzed yet.

Whole genome array comparative genomic hybridization (aCGH) was performed in 37 primary ICCs and 14 matched LNM. Sixty patients were studied for correlation of clinical and histopathological data.

ACGH of all primary tumors confirmed known copy number alterations (CNAs) in ICC and identified to date undescribed gains in 19q. N1 tumors had more CNAs and harbored exclusive gains (3p, 4q, 5p, 13q) and losses (17p and 20p) compared to N0 tumors. LNM shared most of the CNAs with their matched primary tumor (86%), but 79% acquired new isolated gains (12q14 (36%); 1p13, 2p23, 7p22, 7q11, 11q12, 13q13 and 14q12 (>20%)). Unsupervised clustering revealed 2 significantly different groups. Cluster B was characterized by a high amount of the CNAs and was significantly associated to poor differentiation and worse survival. The majority of the primary tumors clustered with their matched LNM when analyzed together due to the high similarity of the CNAs. TP53 and KRAS occurred in 19% of tumors and in 6% of metastases. Pathway analyses revealed that genes located in the altered regions of N1 tumors and LNM were involved in cancer-associated pathways. Several clinical factors like advanced tumor stage, microvascular/perineural invasion, R1-resection, smoking and high carbohydrate-antigen 19-9 (CA-19-9) level were significantly correlated to the occurrence of LNM, while N1-status, R1-resection, and poor tumor differentiation were significantly correlated to survival.

ACGH identified clear differences between N0 and N1 tumors, while N1 tumors and their LNM displayed great similarity with exclusive gains in the metastases. A novel cluster with a high amount of CNAs and poor tumor differentiation was significantly correlated to poor survival. Genes located in the altered regions are most likely involved in important cancer associated signaling pathways and might represent potential therapeutic targets for anti-tumoral therapy.

III Abkürzungsverzeichnis

AASLD	Amerikanische Gesellschaft für Studien bei Lebererkrankungen
ACG	Amerikanische Gesellschaft für Gastroenterologie
aCGH	Array comparative genomic hybridization
ADM-2	Aberration detection method 2
AFP	Alpha Fetoprotein
AP	Alkalische Phosphatase
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bp	Baasenpaare
BRAF	V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
BRCA1	Breast Cancer 1
CA 19-9	Carbohydrat-Antigen 19-9
CA-125	Carbohydrat-Antigen 125
CAND1	Cullin Associated And Neddylation Dissociated 1
CCC	Cholangiocellular Carcinoma (Cholangiozelluläres Karzinom)
CD10	Cluster of differentiation 10
CDK6	Cyclin Dependent Kinase 6
CDKN2A	cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CK	Cytokeratin
c-Met	Tyrosine-protein kinase Met
CNA	Kopienzahlalterationen
COX-2	Cyclooxygenase-2
CSNK2A1	Casein Kinase 2 Alpha 1
CT	Computertopographie
CTC	Circulating tumor cell
DNA	Deoxyribonucleic acid
DP1	Transcription Factor Dp-1

DTC	Disseminated tumor cell
ECC	Extrahepatisches/Distales Cholangiokarzinom
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERBB3	Erb-B2 Rezeptor Tyrosinkinase 3
FFPE	Formaldehyde-fixed paraffin-embedded
FGFR2	Fibroblast growth factor receptor 2
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FTL1	Fms Related Tyrosine Kinase 1
GHR	Growth Hormone Receptor
GNS	Glucosamine (N-Acetyl)-6-Sulfatase
GSTP	Glutathione S-Transferase Pi 1
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HE	Hämatoxylin-Eosin
HepPar-1	Hepatozyten-assoziierten monoklonalen Antikörper
HI	Heterogenitätsindex
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HMGA2	High Mobility Group AT-Hook 2
ICC	Intrahepatisches Cholangiokarzinom
IDH1	Isocitrat Dehydrogenase 1
IDH2	Isocitrat Dehydrogenase 2
IgG4	Immunglobulin G4
IL-6	Interleukin-6
INR	International Normalized Ratio
JAK-STAT	JAK = Januskinase, STAT = Signal Transducers and Activators of Transcription
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LIFR	Leukemia Inhibitory Factor Receptor Alpha

LNM	Lymph node metastasis
LKM	Lymphknotenmetastase
LTX	Lebertransplantation
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase 1
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MRT	Magnetresonanztomographie
MSKCC	Memorial Sloan-Kettering Cancer Center
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
NF1	Neurofibromin 1
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NRAS	Neuroblastom RAS viral Onkogen homolog
PCC	Perihiläre Cholangiokarzinom
PCR	Polymerase chain reaction
PDT	Photodynamische Therapie
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PLCB1	Phospholipase C Beta 1
PLCB4	Phospholipase C Beta 4
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptors
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PT	Primärtumor
PTCH1	Patched 1
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog
RASSF1A	Ras Association Domain Family Member 1
RKI	Robert Koch Institut
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TBK1	TANK Binding Kinase 1

TERT	Telomerase-reverse Transkriptase
TGF-β	Transforming Growth Factor β
Tif	Tagged Image File Format
TNM	Tumor-nodes-metastasis
TP53	Tumor Protein P53
TSC1	Tuberous Sclerosis 1
TTD	Therapeutic Targets Database
VEGF	Vaskulärer Wachstumsfaktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Wnt	Wingless und Int-1 Signalweg
γ-GT	Gamma-Glutamyl-Transferase

IV Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Epidemiologie	1
1.2 Risikofaktoren.....	2
1.3 Screening und Früherkennung.....	2
1.4 Symptomatik und Diagnostik	3
1.5 Pathologie und Tumorklassifikation	4
1.6 Therapie	6
1.6.1 Chirurgische Resektion und Lebertransplantation	6
1.6.2 Chemotherapie und Radiotherapie.....	7
1.7 Prognose.....	7
1.8 Pathogenese und genetische Charakterisierung des ICC.....	7
1.8.1 Pathogenese des ICC	7
1.8.2 Chromosomale Aberrationen im ICC	8
1.8.3 Mutationen beim ICC.....	10
1.9 Ziele der Arbeit	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Patienten und Gewebeproben.....	12
2.2 DNA-Gewinnung	13
2.2.1 Schnitthanfertigung des FFPE Gewebes.....	13
2.2.2 Deparaffinierung.....	13
2.2.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung	14
2.2.4 DNA Extraktion.....	15
2.2.5 Messung der DNA-Konzentration mittels Qubit® 2.0 Fluorometer	17
2.3 Komparative genomische Hybridisierung auf DNA-Microarrays (aCGH).....	19
2.3.1 Vorfragmentierung der DNA.....	20
2.3.2 Fluoreszenzmarkierung der DNA	21
2.3.3 Aufreinigung und Bestimmung der spezifischen Aktivität.....	22
2.3.4 Hybridisierung	22
2.3.5 Waschen des DNA-Microarrays.....	22
2.3.6 Scannen des DNA-Microarrays	23
2.3.7 Extraktion der Daten & Analyse	23
2.4 Mutationsanalysen	25

2.5 Immunhistochemie.....	26
2.6 Analyse der aktivierten Signaltransduktionswege und möglicher Zielgene für antitumorale Therapien.....	28
2.7 Statistische Analyse.....	29
3 Ergebnisse	30
3.1 Klinische Daten	30
3.2 Histopathologische Daten.....	32
3.3 Resektionsverfahren.....	33
3.4 Überlebenszeitanalysen.....	33
3.5 Gesamt-aCGH-Analyse der Primärtumore und der LKM	35
3.6 Vergleich der zwei Primärtumorgruppen (N0 vs. N1).....	36
3.6.1 CNAs der Primärtumore im Vergleich mit den LKM.....	36
3.6.2 CNAs in N1-Tumoren vs. N0-Tumoren.....	37
3.7 Paarvergleich der Primärtumore mit der korrespondierenden Lymphknotenmetastase	39
3.8 Clusteranalyse der Primärtumore (N0 und N1).....	40
3.9 Mutationsanalysen	44
3.10 Signalweg Analysen	44
3.11 Abgleich der potentiellen Gene auf Therapierbarkeit.....	45
4 Diskussion	46
5 Literatur- und Quellenverzeichnis.....	54
6 Anhang	64

1 Einleitung

Das ICC gehört zu den primären Leberkarzinomen und stellt nach dem hepatozellulären Karzinom (HCC) den weltweit zweithäufigsten primären malignen Lebertumor dar [2, 5]. Ausgehend von den kleinen Gallengängen innerhalb der Leber, unterscheidet es sich vom perihilären Cholangiokarzinom (PCC), welches die Hepatikusgabel betrifft (Klatskin-Tumor), und dem extrahepatischen bzw. distalen Cholangiokarzinom (ECC), das die Gallengänge unterhalb des Zystikusabgangs befällt (Abb. 1) [6].

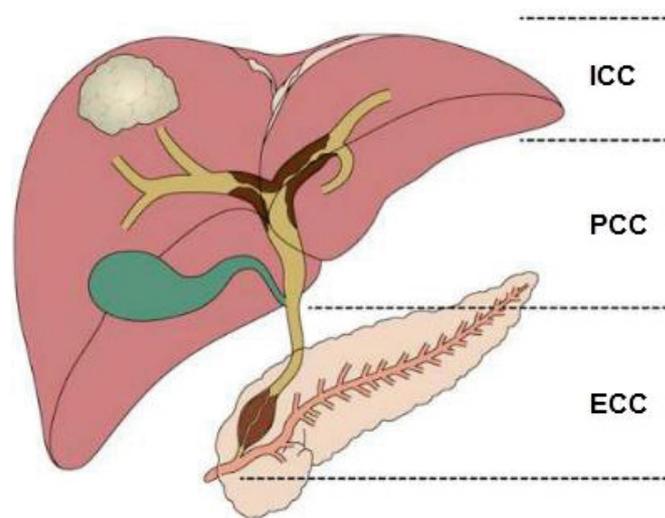


Abb.1. Anatomische Einteilung des cholangiozellulären Karzinoms. Das ICC betrifft die kleinen Gallengänge innerhalb der Leber, das PCC befällt die Hepatikusgabel und das ECC die Gallengänge unterhalb des Zystikusabgangs [7, 8].

1.1 Epidemiologie

Das ICC stellt mit 10% aller Gallengangskarzinome den kleinsten Anteil dar, gefolgt von den ECCs mit 20-30% und den PCCs mit 50-60% [3, 9]. Große epidemiologische Daten aus Großbritannien und den USA zeigten jedoch einen steten und stabilen Anstieg der Inzidenz- und Mortalitätsraten des ICCs [3, 10], während die Inzidenz der ECCs und PCCs sinkt, bzw. stabil bleibt [10]. Als möglicher Grund für die zunehmende Inzidenz des ICCs wird der demographische Wandel angenommen, da die meisten Tumore sporadisch und ohne eindeutigen Risikofaktor nach dem 50. Lebensjahr auftreten. Ab dem 50. Lebensjahr nehmen die Erkrankungsraten zu und erreichen ein Maximum in der Gruppe der über 85-Jährigen [11]. Obwohl es bisher keine eindeutige Erklärung für die zunehmende Inzidenz

gibt, und diese nicht allein durch eine Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten erklärt werden kann [10, 12, 13], wird eine frühere Fehlklassifikation der ICCs als Klatskin-Tumore als mögliche Erklärung diskutiert [10].

1.2 Risikofaktoren

Nur ca. 30% der ICCs entstehen bei Patienten mit bekannten Risikofaktoren für diese Tumorentität [14]. Im Gegensatz zum HCC ist die Entstehung eines ICCs in einer nicht-zirrhatischen und damit nicht-vorerkrankten Leber häufig und kann oft nicht mit den bekannten Risikofaktoren assoziiert werden [13]. Als Risikoerkrankungen ist in der westlichen Welt vor allem die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) bekannt. Bei einem jährlichen Transformationsrisiko von 0,5-1,5% entwickeln 5-10% der Patienten in ihrem Leben ein ICC [8, 15]. In Südostasien dagegen stellt die Infektion mit den dort endemischen Leberegel *Clonorchis sinensis* oder *Opisthorchis viverrini* einen wichtigen Risikofaktor da [12], der in den westlichen Breiten jedoch nur als sehr selten Folge einer Reiseerkrankung oder bei Einwanderern auftritt. Kongenitale Gallenwegsanomalien wie Gallenganzsysteme oder eine chronische Erweiterung der Gallengänge gepaart mit chronischer Entzündung und Steinbildung wie bei der Caroli-Krankheit sind ebenfalls mit dem Risiko an einem ICC zu erkranken assoziiert [16]. Nicht zuletzt konnten einige Toxine, wie das bis Ende der 50er Jahre benutzte Kontrastmittel Thorotrast, oder die kanzerogenen Toxine Nitrosamin und Dioxin als mögliche Risikofaktoren für die Entwicklung eines ICCs identifiziert werden [13]. Vereinzelt wurden auch die chronische Hepatitis B und C Virus-Infektion, eine HIV-Infektion, Diabetes mellitus Typ II, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Hepatolithiasis, Cholelithiasis, Adipositas, das metabolische Syndrom, Alkoholabusus, Leberzirrhose und Rauchen als mögliche Risikofaktoren beschrieben, jedoch konnten diese bisher nicht für große Patientenzahlen validiert werden [17-23].

1.3 Screening und Früherkennung

Eine Vorsorgeuntersuchung für die allgemeine Bevölkerung wird aktuell nicht empfohlen, jedoch sollten sich Patienten in Abhängigkeit von evtl. vorliegenden Risikofaktoren regelmäßigen Screenings unterziehen. Obwohl ein Überlebensvorteil für Patienten mit PSC und regelmäßigen Vorsorgeuntersuchungen nicht nachgewiesen werden konnte, wird ein regelmäßiges Screening von einem Expertenkonsens empfohlen [24]. Die amerikanische

und europäische Gesellschaft für Lebererkrankungen (AASLD, ACG und EASL) empfehlen für Patienten mit PSC eine 6 bis 12-monatige Bildgebung der Leber inklusive Bestimmung des Tumormarkers Carbohydrat-Antigen 19-9 (CA 19-9) [24, 25]. Die amerikanische Gesellschaft für Studien bei Lebererkrankungen (AASLD) empfiehlt eine halbjährliche Leberultraschalluntersuchung (Klasse Ib Empfehlung) für Patienten mit Leberzirrhose zur Früherkennung des ICCs und HCCs [26, 27].

1.4 Symptomatik und Diagnostik

Während perihiläre und extrahepatische cholangiozelluläre Karzinome oft früh durch die Symptome der bilären Obstruktion diagnostiziert werden [24], werden Patienten mit ICC meist erst im fortgeschrittenen Stadium durch lokale Schmerzsymptomatik, Gewichtsverlust, Nachtschweiß, Fatigue oder Malaise auffällig [28]. Für die Diagnosestellung des ICCs weist die Computertomographie (CT) eine gute Sensitivität (89%) und Spezifität (92%) zur Lokalbeurteilung sowie zum gesamten Tumorstaging auf [29]. Während die CT und die Magnetresonanztomographie (MRT) gleichwertig zur Evaluation der Tumorgröße und Detektion von Satellitenmetastasen sind [30], hat die MR-Schnittbildgebung einen Vorteil bei der Differenzierung zwischen ICC und HCC durch Zugabe von Kontrastmittel und charakteristischer Kontrastmittelanreicherung in der venösen Phase [8, 31] (Abb. 2).

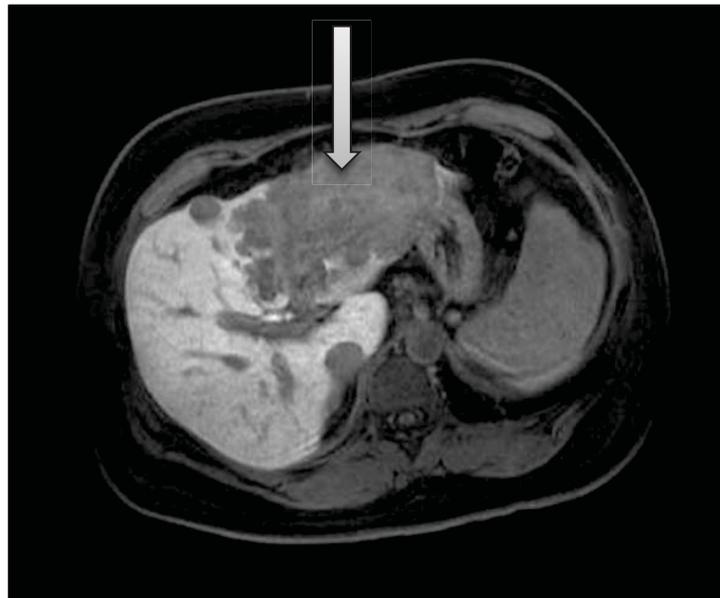


Abb. 2. ICC in der Schnittbildgebung. Der Pfeil markiert das ICC in der MRT-Aufnahme mit Kontrastmittel. Das ICC präsentiert sich deutlich hyperintens im Vergleich zum restlichen Lebergewebe. Hier zeigt sich die charakteristische Kontrastmittelanreicherung im MRT in der venösen Phase [32].

Obwohl eine Probebiopsie mit einer Spezifität von nahezu 100% und einer Sensitivität von 70% häufig gelingt [33], ist sie vor einer geplanten Operation nicht indiziert und wird häufig nur im palliativen Setting durchgeführt.

CA 19-9 ist der beim ICC am häufigsten verwendete Tumormarker, der jedoch auch bei anderen gastrointestinalen Tumoren (Magenkarzinom und Pankreaskarzinom) und bei nicht malignen Erkrankungen wie der PSC, oder einer Choledocholithiasis mit Cholestase erhöht sein kann. Somit besteht für die ICC-Diagnostik nur eine Sensitivität von 40-70% und eine Spezifität von 50-80% [28, 34]. Sehr hohe CA 19-9 Werte (>1000 U/L) finden sich jedoch oft im metastasierten Stadium und können somit ein erster Hinweis auf das Vorliegen von Metastasen sein [34]. Bei der Interpretation gilt zu beachten, dass Patienten mit der Blutgruppe Lewis negativ (10% der Menschen) kein CA 19-9 bilden können [28, 34] und Patienten nach Rauch-Stopp häufig erhöhte CA 19-9 Werte ohne Tumorerkrankung haben [35].

1.5 Pathologie und Tumorklassifikation

Das ICC ist ein vom Gallengangsepithel der intrahepatischen Gallenwege ausgehendes Adenokarzinom [14]. Die Tumore werden nach der Tumor-nodes-metastasis (TNM)-Klassifikation (Tabelle 1) eingeteilt [10].

Tabelle 1. TNM Klassifikation des ICC.

Staging von intrahepatischen Cholangiokarzinomen [36]

T Kategorie:

TX: Information bezüglich des Tumors inkomplett, keine Beurteilung möglich.

T0: Keine Hinweise für das Vorliegen eines Tumors.

Tis: Krebszellen lediglich in der Mukosa (der inneren Gallengangsschicht) und keine Ausbreitung in andere Schichten. Dieses Stadium wird auch als *intramucosal carcinoma* bezeichnet.

T1: Tumor noch auf Gallengang begrenzt, Mukosa jedoch überschritten. Keine Infiltration der umliegenden Gefäße.

T2: Wird in 2 Gruppen unterteilt:

T2a: Ein einzelner Tumor der durch die Gallengangswand wächst und umliegende Gefäße infiltriert.

T2b: Zwei oder mehr Tumore die umliegende Gefäße infiltrieren, oder nicht infiltrieren.

T3: Der Tumor infiltriert benachbarte Strukturen wie Darm, Magen, Ductus choledochus, Abdominalwand, Zwerchfell oder portal-venöse Lymphknoten.

T4: Der Tumor streut entlang der Gallengänge durch die Leber.

N Kategorie:

NX: Beurteilung der regionalen Lymphknoten nicht möglich.

N0: Keine Lymphknotenmetastasen vorhanden.

N1: Lymphknotenmetastasen vorhanden.

M Kategorie:

M0: Keine Fernmetastasierung in andere Organe oder Gewebe außerhalb der Gallengänge.

M1: Fernmetastasierung in andere Organe oder Gewebe außerhalb der Gallengänge

Stadien:

Stadium 0: (Tis, N0, M0)

Stadium I: (T1, N0, M0)

Stadium II: (T2, N0, M0)

Stadium III: (T3, N0, M0)

Stadium IVA: (T4, N0, M0) oder (jedes T, N1, M0)

Stadium IVB: (Jedes T, jedes N, M1)

Neuere Klassifikationssysteme wie das ICD- und MSKCC-System berücksichtigen zusätzlich die Größe des Tumors, das Ausmaß der betroffenen Gallengänge, die Beteiligung der Arteria hepatica und der Pfortader, Vorhandensein von LKM, Vorhandensein von Fernmetastasen und das voraussichtliche verbleibende Restlebertvolumen nach Resektion [37]. Um histopathologisch ICCs von HCCs, intrahepatischen Metastasen und gemischt hepatozellulär-cholangiozellulären Karzinomen unterscheiden zu können, sind immunhistochemische Färbetechniken hilfreich. Typischerweise zeigen CCCs für Zytokeratin (CK) 7 und 19 eine positive (Abb. 3) und für CK20 eine negative Färbereaktion.

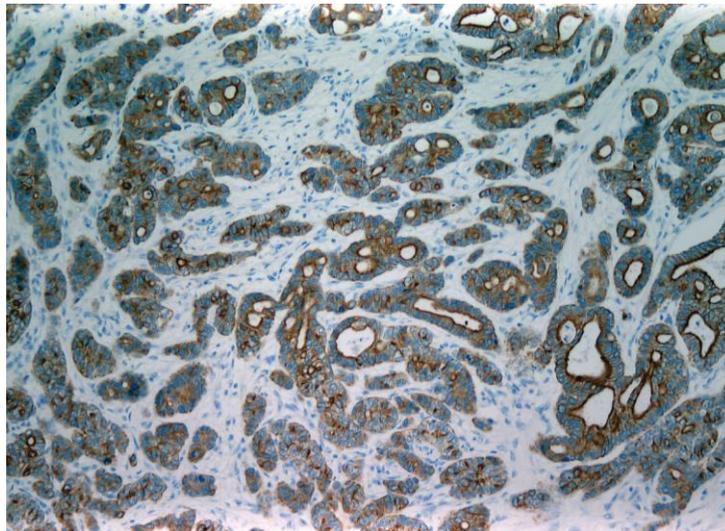


Abb. 3. CK19 positive immunhistochemische Färbereaktion beim ICC. Diese Abbildung zeigt ein Beispiel für eine positive Färbereaktion mit dem Cytokeratin 19. Klassischerweise zeigen ICCs immunhistochemisch eine positive Färbereaktion für CK7 und CK19 und keine Anfärbarkeit für CK20.

HCCs hingegen exprimieren den Hepatozyten-assoziierten monoklonalen Antikörper HepPar-1, CD10 und Glypican-3 [38]. Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) ermöglicht beim ICC den Nachweis einer Hyperdiploidie der Tumorzellen. Ein wesentlicher Vorteil ist, dass so bereits eine kleine Anzahl an malignen Zellen ausreicht, um ein ICC bei unklaren Fällen zu identifizieren [39, 40].

1.6 Therapie

1.6.1 Chirurgische Resektion und Lebertransplantation

Die chirurgische Resektion ist derzeit die einzige kurative Behandlung für Patienten mit ICC, die jedoch aufgrund der späten Diagnosestellung lediglich bei einem Drittel der Patienten erfolgen kann [41]. Das Vorliegen von Fernmetastasen (M1) oder einer Peritonealkarzinose stellen eine Kontraindikation für die chirurgische Therapie dar [42]. Eine routinemäßige Lymphadenektomie wird bisher in den aktuellen Leitlinien nicht empfohlen, da ältere Daten keine Korrelation mit einem besseren Überleben feststellen konnten. [24, 43]. Eine Studie aus dem Jahr 2010 zeigte jedoch ein signifikant besseres 5-Jahres krankheitsfreies Überleben für Patienten mit vollständiger Lymphadenektomie und keinen Lymphknotenmetastasen [44], so dass viele Zentren heute die Lymphknotendisektion im Rahmen der Leberresektion routinemäßig durchführen. Neben den typischen Leberresektionen kann bei unzureichendem Volumen der nach Resektion verbleibenden Restleber durch eine Portalvenenembolisation des tumortragenden Anteils oder durch eine In-situ Splittechnik eine Hypertrophie des verbleibenden Restlebergewebes induziert werden um ein postoperatives Leberversagens aufgrund eines *small for size syndroms* zu verhindern beziehungsweise eine kurative Resektionen überhaupt erst möglich zu machen [45-47]. Die Lebertransplantation (LTX) kommt nur für die wenigsten Patienten in Frage, zeigt bei einem streng ausgewählten Patientenkollektiv jedoch 5-Jahres Überlebensraten von bis zu 73% [48]. Bisher werden ICCs nur in Ausnahmefällen elektiv transplantiert, die meisten Daten stammen von Patienten, bei denen erst in der histologischen Aufarbeitung des Explantats die Diagnose gestellt wurde [49, 50]. Lokal ablative Verfahren wie die transarterielle Chemoembolisation (TACE) und die Radioembolisation werden in Einzelfällen bei inoperablen ICCs eingesetzt, jedoch muss ihre Evidenz noch mit weiteren Studien belegt werden [51, 52].

1.6.2 Chemotherapie und Radiotherapie

Neoadjuvante und adjuvante Chemotherapie, Radiotherapie oder eine kombinierte Radiochemotherapie werden als Therapiekonzepte für das CCC kontrovers diskutiert. Während die Gabe einer adjuvanten Chemotherapie bei Patienten mit positivem Lymphknotenstatus und R1-Resektion zu einem signifikanten Überlebensvorteil führte, konnte für die adjuvante Chemotherapie bei Patienten nach R0 Resektion und negativem Lymphknotenstatus kein Überlebensvorteil gezeigt werden [53, 54]. Die Kombination von Gemcitabin und Cisplatin als palliative Therapie für unresektable und/oder metastasierte ICCs wird mit einer Evidenz Grad A empfohlen [24]. Die Kombination mit Cisplatin im Vergleich zu der alleinigen Therapie mit Gemcitabin führte hierbei zu einem signifikant längerem Überleben [55]. Die Rolle der lokalen Radiotherapie ist noch unklar und muss durch weitere Studien geklärt werden [56].

1.7 Prognose

Die Prognose des ICC ist mit einem 5-Jahres-Gesamtüberleben von 3,2% sehr schlecht [57-59] und kann lediglich durch kurative Therapien verbessert werden. Das postoperative 1-Jahres-Überleben liegt bei 77,5%, das 3-Jahres-Überleben bei 44,3% und das 5-Jahres-Überleben bei 30,7% [4]. Ein positiver Lymphknotenstatus, vaskuläre Invasion, ein positiver Resektionsrand und schlechtes Tumorgrading sind Negativprädiktoren die mit einem signifikant schlechterem Überleben assoziiert sind [4, 44, 60, 61]. Ein Lymphknotenbefall liegt durchschnittlich bereits bei 30% der Patienten bei Diagnosestellung vor und stellt durch die signifikante Korrelation mit einem schlechteren Überleben einen unabhängigen Risikofaktor dar [4].

1.8 Pathogenese und genetische Charakterisierung des ICC

1.8.1 Pathogenese des ICC

In dem klassischen Model der Pathogenese des ICCs spielen die chronische Gallengangsentzündung und die Cholestase eine zentrale Rolle. Dabei wird angenommen,

dass durch inflammatorische Zytokine die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) der Cholangiozyten aktiviert wird und es durch die vermehrte NO-Freisetzung zu einer erhöhten Mutagenese und fehlerhaften DNA-Reparatur kommt [62]. Zusätzlich soll es durch die Aktivierung der Signalwege der Gallensalze im Rahmen einer Cholestase zu einem Proliferationsreiz der Cholangiozyten durch verschiedene Wachstumsfaktoren kommen [41, 62]. Der epidermale Wachstumsfaktor (*Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR*), der Hepatozyten-Wachstumsfaktor *c-MET*-Protein, die RAS/Mitogen-aktivierte Proteinkinase (*Mitogen-Activated Protein Kinase 1, MAPK*) und Interleukin-6 (*IL-6*) spielen bei der Tumorprogression eine wichtige Rolle [14]. Die Aktivierung der Telomerase-Reverse Transkriptase (*TERT*) und der Cyclooxygenase-2 (*COX-2*), des *Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)* Proteins und des Vaskulären Wachstumsfaktors (*VEGF*) sowie eine Überexpression der Matrix Metalloproteinasen mit einer Herunterregulierung der (Ca²⁺)-abhängigen transmembran Glykoproteine *E-Cadherine* führen zu verminderter Replikation, Apoptosehemmung, Metastasierung und Neoangiogenese [41]. Diese Faktoren werden vor allem durch genetische und epigenetische Mechanismen der Cholangiozyten induziert [14, 41]. Obwohl die Mehrzahl der ICCs ihren Ursprung aus Cholangiozyten hat, wird eine Untergruppe von ICCs beschrieben, die möglicherweise aus Progenitorzellen bzw. determinierten Stammzellen entsteht [63]. Die genomische Analyse dieser Subgruppe zeigte dabei gemeinsame genetische Eigenschaften mit dem HCC, so dass von einer gemeinsamen Ursprungszelle bei dieser speziellen Subgruppe ausgegangen wird [63]. Für das HCC konnte in diesem Zusammenhang bereits gezeigt werden, dass 20-25% der Tumore aus Stammzellen entstehen [64].

1.8.2 Chromosomale Aberrationen im ICC

Es wurden bereits einige chromosomale Veränderungen für das ICC, jedoch deutlich weniger für die LKM beschrieben. Einen wesentlichen Beitrag zur chromosomalen Charakterisierung des ICC leisteten Sia *et al.* mit einer gesamt-genomischen Analyse mittels aCGH, FISH, *direct sequencing* und Immunhistochemie [65]. Dabei konnte gezeigt werden, dass beim ICC chromosomale Verluste deutlich überwiegen und Zugewinne eher eine untergeordnete Rolle spielen. So wurden bei 149 ICC Gewebeproben Zugewinne auf Chromosom 1q und 7p und Verluste auf 3p, 4q, 6q, 9p, 9q, 13q und 17p mit einer Prävalenz von über 20% identifiziert. Zusätzlich wurden Verluste auf den Chromosomen 8p, 14q und 21q beschrieben, deren Prävalenz allerdings unter 20% lag [65]. Koo *et al.* untersuchten ebenfalls mittels aCGH HCC und ICC Gewebeproben auf chromosomale Veränderungen und fanden chromosomale Verluste auf 16q, 17p, und 18q, und Zugewinne auf 8q in gleicher

Frequenz beim ICC und HCC [66]. Zugewinne auf 20q fanden sich hingegen nur beim ICC und auf 1q nur bei den HCC Gewebeproben [66]. CGH-Analysen von 19 koreanischen ICC Gewebeproben zeigten zudem Zugewinne mit einer Prävalenz von über 20% auf 8q22, 5p14, 2q33, 7p, 17q21~q22, 18q12~q21 und 19q13 und Verluste auf den Chromosomen 1p34, 4q, 18q21, 19p 5q11~q14, 8p, 9p und 17p auf [67]. Eine weitere Studie konnte durch die genomische Analyse mittels DNA Hybridisierung für 53 ICCs chromosomale Verluste auf 1p, 3p und 14q und Zugewinne in den Regionen 1q, 7p, 7q und 8q identifizieren [68]. Bei den Zugewinnen auf 7p wurde *EGFR* als mögliche Zielstruktur für eine zielgerichtete Krebstherapie beim ICC identifiziert [68]. Arnold *et al.* untersuchten 13 extrahepatische und 11 ICCs auf molekulare Gemeinsamkeiten und Unterschiede. Während beide Tumortypen chromosomale Verluste in 1p, 3p, 6q und Chromosom 9 sowie gleiche Zugewinne in 1q, 8q und in den kompletten Chromosomen 17 und 20 zeigten, fanden sich beim ICC signifikant häufiger Verluste (70% der Proben) in den Chromosomen 3 und 14 im Vergleich zum ECC (10%) [69]. Obwohl die prognostische Relevanz der LKM für das ICC bereits gezeigt werden konnte [4], bleiben die dem Metastasierungsprozess zugrunde liegenden Pathomechanismen und die in den LKM vorhandenen genetischen Alterationen bislang unverstanden. Während die Korrelation einer vermehrten Genexpression (*Sox2*, *iNOS*, *COX-2*, *STAT3* und *CXCL7*) mit dem vermehrten Auftreten von Lymphknoten- und Fernmetastasen gezeigt wurde [70-73], fehlen bisher Daten zu genetischen Alterationen in den LKM im Vergleich zu den Primärtumoren, insbesondere aus paarweisen Analysen von Primärtumoren und ihren korrespondierenden LKM. Die CGH wurde bereits erfolgreich eingesetzt um molekulare Alterationen in Primärtumoren und dessen Metastasen zu identifizieren [74, 75]. Als akzeptierter Standard zur Detektion von CNAs ermöglicht die CGH auf Microarrays (*array CGH*) einen hohen Durchsatz bei geringen Kosten und somit Vorteile im Vergleich zur *next generation sequencing* Technologie bei der Bearbeitung von vielen Proben [76-78]. Paarvergleiche von Primärtumoren und LKM wurden erfolgreich beim Kolonkarzinom, Pankreaskarzinom und dem malignem Melanom eingesetzt um Polyklonalität und genetische Heterogenität zu untersuchen [79-81]. Für das Kolonkarzinom konnte so gezeigt werden, dass die Hälfte aller analysierten Metastasen denselben klonalen Ursprung wie ihre Primärtumore aufzeigen. Während sich in der gepaarten Analyse entsprechend viele gleichartige Mutationen von relevanten Kandidatengenen im Primärtumor und der dazugehörigen Metastase zeigten, konnten zusätzlich auch einige spezielle genetische Unterschiede zwischen Primarius und Metastase festgestellt werden [79]. Beim Pankreaskarzinom hingegen zeigte sich eine starke genetische Heterogenität zwischen den Metastasen und den korrespondierenden Primärtumoren [80]. Eine weitere Untersuchung von Melanomen und ihren LKM zeigte wiederum eine große Übereinstimmung der CNAs und

SNVs (single nucleotide variation) im direkten Paarvergleich ohne Nachweis von neuen SNVs in den untersuchten LKM [81].

1.8.3 Mutationen beim ICC

Es gibt eine Reihe von Studien, die Mutationen für bekannte Onkogene und Tumorsuppressorgene wie *KRAS*, *IDH 1* und *2*, *Tumor Protein P53 (TP53)*, *BRAF* und *EGFR* im ICC beschreiben [65, 82-87]. Die Prävalenz dieser Mutationen unterliegt dabei allerdings einer sehr großen Spannweite: Mutationen im *KRAS*-Gen kommen beim ICC mit einer Prävalenz von 5-57% und somit durchschnittlich in 22% der Fälle vor und konnten zudem mit einer erhöhten Sterblichkeit nach Resektion in Verbindung gebracht werden [82]. Das in vielen Tumortypen mutierte *p53*-Gen ist beim ICC durchschnittlich in lediglich 15% (0.7-37%) der Fälle mutiert [65, 83, 88]. Mutationen im *EGFR*- und *BRAF*-Gen werden beim ICC mit 2% (0-20%) und 7% (1-22%) der Fälle noch deutlich seltener beschrieben [65, 84, 85]. Ähnlich häufig wie eine *TP53*-Mutation kommen Mutationen in den *IDH1* und *IDH2*-Genen vor. Zusammengenommen wird in 14% der ICCs eine Mutation in einer der beiden Gene nachgewiesen [86, 87]. Die erste gesamt-genomische Analyse des ICCs mittels Next-Generation Sequenzierung von Ross *et al.* konnte weitere Mutationen für den Fibroblasten Wachstumsfaktor *FGFR2* (14%), die Phosphatase *Phosphatase And Tensin Homolog (PTEN)* (11%), dem Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitor *CDKN2A (cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A)* (7%), der Erb-B2 Rezeptor Tyrosinkinase *ERBB3* (7%), *MET* (7%), dem *Neuroblastom RAS viral Onkogen homolog (NRAS)* (7%), der Cyclin-abhängigen Kinase *CDK6* (7%), dem Brustkrebsgen *Breast Cancer 1 (BRCA1)* (4%), Neurofibromin *NF1* (4%), der Phosphatidylinositol-Kinase *PIK3CA (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha)* (4%), *Patched 1 (PTCH1)* (4%) und Hamartin *TSC1 (Tuberous Sclerosis 1)* (4%) aufzeigen [89].

1.9 Ziele der Arbeit

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, genetische Alterationen des ICCs und der korrespondierenden LKM zu analysieren und mit klinischen und histopathologischen Daten zu korrelieren.

In der vorliegenden Arbeit sollten diesbezüglich insbesondere folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Welche klinischen und histopathologische Daten sind mit dem Auftreten von LKM assoziiert?
- Welche Faktoren können das Überleben signifikant beeinflussen?
- Durch welche CNAs lassen sich die Primärtumore charakterisieren und wie unterscheiden sich die chromosomalen Veränderungen zwischen N0 und N1 Primärtumoren bzw. welche Gemeinsamkeiten gibt es?
- Welche Unterschiede und Gemeinsamkeiten finden sich zwischen Primärtumor und korrespondierender LKM in der gepaarten Paaranalyse?
- Welche Gene liegen in den alterierten Chromosomenregionen und welche Signaltransduktionswege sind ggf. involviert?
- Lassen sich durch Clusteranalysen Untergruppen der Tumore identifizieren und wie verhalten sich Primärtumore und LKM wenn sie zusammen mittels Clusteranalyse untersucht werden?
- Sind die für das ICC bekannten KRAS und TP53 Mutationen in unserer Kohorte nachweisbar?
- Kann man durch eine Analyse der Therapeutic Target Database mögliche Zielgene für eine evtl. medikamentöse Behandlung identifizieren?

2 Material und Methoden

2.1 Patienten und Gewebeproben

Insgesamt wurden für diese Studie 60 Patienten mit ICC, die zwischen 2003 und 2013 an der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf operiert wurden, ausgewählt. Jeder dieser Patienten erhielt unabhängig von der Art der Resektion eine Lymphadenektomie. Von diesen 60 Patienten wurden 78 Formalin-fixierte, paraffin-eingebettete (FFPE) Gewebeblöcke und 5 Kryogewebeproben aus der Biomaterialbank des Instituts für Pathologie und dem Funktionsbereich Zytopathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf gesammelt. Einschlusskriterien waren die eindeutige Diagnose eines ICC durch einen Facharzt der Pathologie. Follow-up Daten (59/60, ein *lost-to-follow*) und klinische Parameter wurden aus den Patientenakten erhoben (Tabelle 2).

Tabelle 2. Klinische Parameter der Studie

Klinische Parameter

Geburtsdatum
Datum der Operation
Alter bei der Operation
Sterbedatum
Postoperatives Überleben
Rezidivfreiheit
Metastasenfreies Überleben
Geschlecht
Körpergewicht in KG
Körpergröße in Metern
BMI (Body-Mass-Index)
Nikotinabusus
Alkoholabusus
Diabetes Typ I und II
Computertomographie Untersuchung
Magnetresonanztomographie Untersuchung
Kontrastmittelsonographie Untersuchung
CHILD-Klassifikation (Child-Pugh-Score)
Hepatitis A-E
Therapiemodus
Histologie
Tumormarker (CA 19-9, CEA und AFP)
Betroffenes Lebersegment
Tumorgöße in der Pathologie (in cm)
Tumorstaging

Die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität votierte die Untersuchung von Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten (FFPE) Tumorproben positiv (Votum No.: 3821).

2.2 DNA-Gewinnung

2.2.1 Schnitthanfertigung des FFPE Gewebes

Für die antizipierte DNA-Gewinnung musste in einem ersten Schritt mithilfe eines Schlittenmikrotoms das vorliegende FFPE-Gewebe geschnitten werden. An einem auf Schienen gelagerten Schlitten war hierzu eine Klinge befestigt, die über den fixierten Paraffinblock geführt wurde. Die Schnittdicke ist somit einstellbar und der Block kann zusätzlich individuell adjustiert werden so dass eine gerade Schnitfführung bei möglichst geringem Materialverbrauch ermöglicht wird. Mittels dem *Leica SM 2000R* (Leica, Nussloch, Deutschland) Schlittenmikrotom wurden so von den vorliegenden Paraffinblöcken jeweils 10x9 µm dicke Schnitte für die DNA Gewinnung angefertigt. Zusätzlich wurde immer ein 2 µm Schnitt für die anschließende Hämatoxylin-Eosin Färbung hergestellt. Zuvor wurde das in Paraffin gebettete Gewebe für mindestens eine Minute bei 4°C gelagert, da die Kühlung des Paraffinblocks eine bessere Schnitthanfertigung ermöglichte. Da der HE-Schnitt (Hämatoxylin-Eosin Schnitt) zur späteren Abgrenzung des Tumorgewebes vom Normalgewebe dient, wurde dieser zuletzt durchgeführt. Somit konnte sichergestellt werden, dass das spätere histologische Bild die tatsächliche Position des Tumors in den 10 zuvor angefertigten Schnitten so gut wie möglich widerspiegelt, da die Dreidimensionalität des in Paraffin eingebetteten Gewebes berücksichtigt werden muss.

2.2.2 Deparaffinierung

Zur Weiterverarbeitung der Schnitte war dann eine Deparaffinierung des Gewebes erforderlich. Hierfür wurden die einzelnen Schnitte auf Objektträgern in eine Folge von Färbebänken (Xylol, eine absteigende Alkoholreihe, und schlussendlich Glycerin) getaucht. Die Abbildung 4 verdeutlicht die aufeinander folgenden Arbeitsschritte.

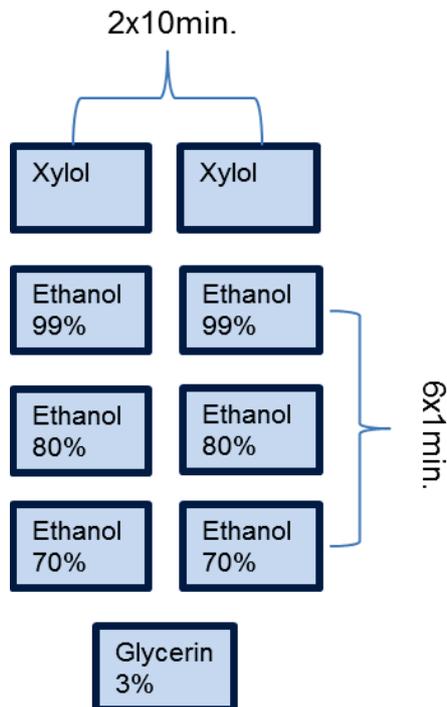


Abb. 4. Deparaffinierungsprotokoll. Die Schnitte wurden für zehn Minuten in Xylol gestellt, herausgenommen und weitere zehn Minuten in die andere Glasküvette mit Xylol gestellt. Anschließend verblieben die Schnitte immer für eine Minute im Ethanol bis die Alkoholreihe endete und die Schnitte ins dreiprozentige Glycerin gestellt wurden. Hier sollten die Schnitte mindestens eine Minute bleiben bis sie weiterverarbeitet wurden. Wurden die Lösungen sichtbar trüb, sollten sie erneuert und ausgewechselt werden.

2.2.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Im Anschluss an die Deparaffinierung konnte die Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung) erfolgen. Hierbei färbt das Hämatoxylin alle sauren Strukturen wie Zellkerne (und der darin enthaltenen sauren DNA) und Zytoplasmabestandteile blau-violett, während das Eosin die basischen Zytoplasmaanteile wie Zellplasmaproteine, Mitochondrien, das glatte endoplasmatische Retikulum, Kollagen und die Mitochondrien rot anfärbt. In unserer Versuchsreihe wurden die 2 µm dicken, zur Färbung bestimmten Schnitte, in Aqua-dest. gespült und anschließend für 45 Sekunden mit Hämalaun nach P. Mayer gefärbt. Daraufhin wurden die Schnitte für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser und anschließend mit Aqua-dest. für wenige Sekunden gespült. Dann folgte der zweite Färbeschritt mit Eosin 1% wässriger Lösung für eine Minute. Mit einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70% (fünf Sekunden), 96% (zwei Minuten) und 99,5% (zwei Minuten) Konzentrationen und Xylol (zehn Minuten) endete das Protokoll. Die gefärbten Schnitte wurden dann mit einem Deckglas verschlossen so lange sie feucht waren. Dazu wurden ein bis zwei Tropfen Corbit-Balsam auf das deparaffinierte und gefärbte Gewebe gegeben und mit einem Deckglas ohne

Luft einschließen. Die Abbildung 5 zeigt vier Gewebebeispiele einer Hämatoxylin-Eosin Färbung.

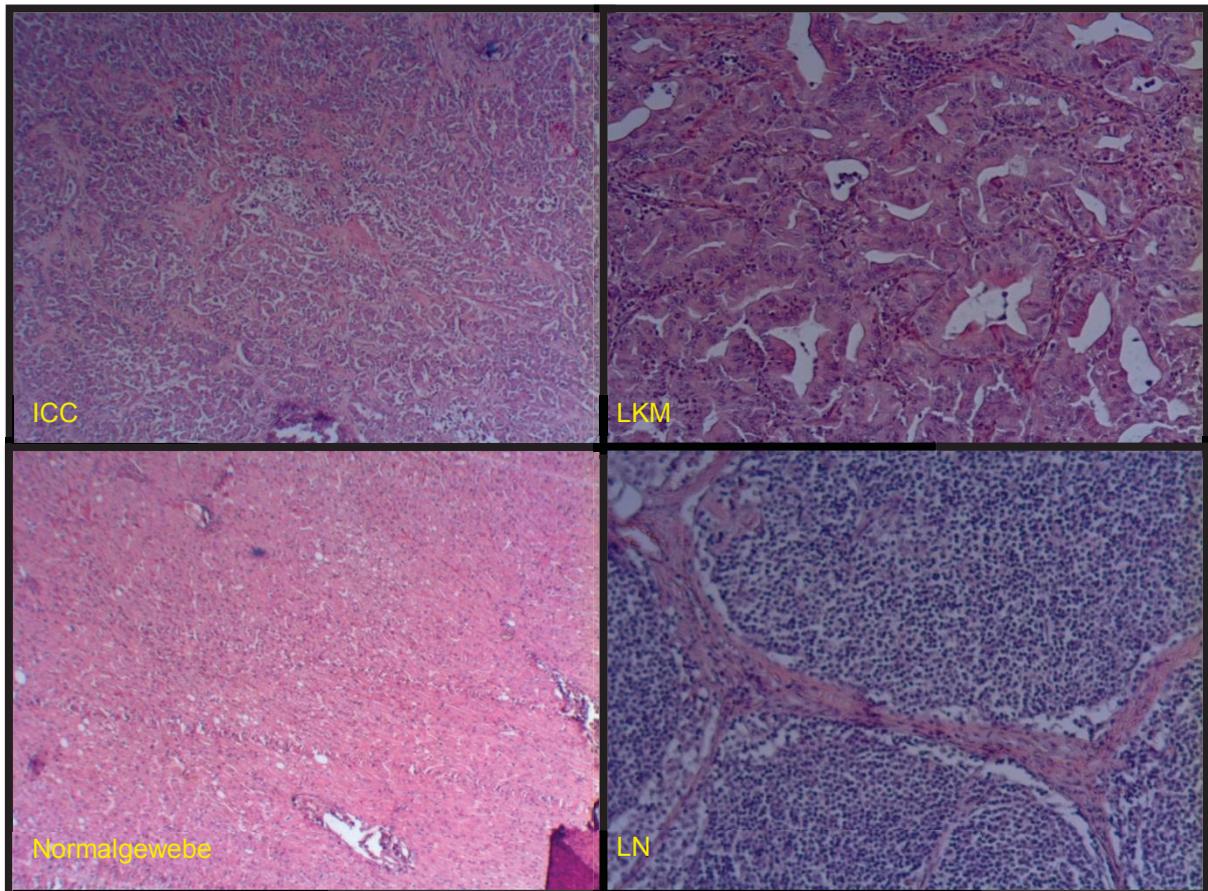


Abb. 5. Hämatoxylin-Eosin Färbung von Tumor- und Normalgewebe. Dargestellt sind die lichtmikroskopischen HE-Färbungen vom Primärtumor (ICC), der LKM (LKM), dem hepatischem Normalgewebe (Normalgewebe) und einem tumorfreien Lymphknoten (LN). Die Neoplasie ist im Vergleich zum jeweiligen Normalgewebe vor allem durch ihre adenoides (drüsenähnliches) Wachstumsmuster zu erkennen. Für die Vergrößerung des Lebergewebes wurden eine 26fache und der Lymphknoten eine 100fache Vergrößerung gewählt.

2.2.4 DNA Extraktion

Mit Hilfe des HE-Schnitts wurde lichtmikroskopisch das Tumorgewebe identifiziert und falls vorhanden, vom Normalgewebe abgegrenzt. Dazu wurde der Bereich des Tumors auf dem Objektträger nachgezeichnet (Abb. 6) und diente in den folgenden Schritten als Vorlage für die Makrodissektion des Gewebes.

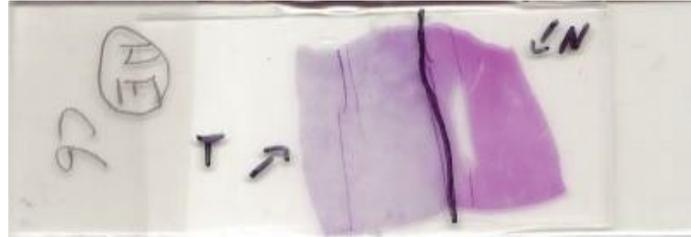


Abb. 6. Beispiel für die Abgrenzung von Tumor- von Normalgewebe. Die rechte Seite des Gewebeschnitts wurde histologisch als hepatisches Normalgewebe (N) und die linke Seite als Tumorgewebe (T) identifiziert.

Dabei wurde wahlweise mit Hilfe einer Kanüle oder einer Rasierklinge Gewebe vom Objektträger abgeschabt und in 180 µl *ATL Puffer* in *Eppendorf tubes* gegeben. Nach der vollständigen Gewebeextraktion wurde 20-50 µl *Proteinkinase K* (bei sehr trüber Lösung 50 µl) hinzugefügt. Die *Eppendorf tubes* wurden anschließend gevortext, über Nacht bei 56°C auf einem Heizblock gelagert und am nächsten Tag für 30 Minuten auf 90°C erhitzt. Für die weitere Verarbeitung des Gewebes kam dann das Arbeitskit *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit* (QIAGEN, Hilden, Germany) zum Einsatz (Tabelle 3).

Tabelle 3. Protokoll für die Isolierung der DNA.

Isolation genomischer DNA aus FFPE-Schnitten mittels QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

- Bis zu zehn deparaffinierte Schnitte (5-10 µm) in 180 µl *Puffer ATL* geben
- 20-50 µl *Proteinkinase K* zufügen und vortexen
- Über Nacht bei 56°C inkubieren
- 30 Minuten bei 90°C inkubieren (nicht über eine Stunde, eine längere Dauer führt zur stärkeren Fragmentierung der DNA)
- Auf Raumtemperatur abkühlen lassen
- Kurz zentrifugieren
- 2 µl *RNase (100mg/µl)* hinzugeben und 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- 200 µl *Puffer AL* zufügen und Probe vortexen
- 200 µl 100% *Ethanol* zufügen und Probe erneut vortexen
- Lysat auf *QIAamp MinElute Säule* geben und bei 6000 x g für 2 Minuten zentrifugieren
- Säule in ein neues 2 ml *Eppendorf tube* geben
- 500 µl *Puffer AW1* auf die Säule geben
- 2 Minuten bei Raumtemperatur und 6000 x g zentrifugieren
- Säule in ein neues 2 ml *Eppendorf tube* geben
- 500 µl *Puffer AW2* auf die Säule geben
- 2 Minuten bei Raumtemperatur und 6000 x g zentrifugieren
- Säule in ein neues 2 ml *Eppendorf tube* geben und für 3 Minuten mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren
- Säule in ein 1,5 ml *Eppendorf tube* stellen und 30 µl *Puffer ATE* auf die Säule geben
- 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- 2 Minuten bei Raumtemperatur und maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren
- Lagerung bei -20°C

2.2.5 Messung der DNA-Konzentration mittels Qubit® 2.0 Fluorometer

Die Konzentration der isolierten DNA wurde per Fluoreszenz quantitativ analysiert. Dafür wurde das *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet (QUBIT 2.0, REF: Q32888, SN: 1210000580, DC SV, 133A max.). Die DNA wird hierbei an fluoreszierende Färbemittel spezifisch gebunden und gemessen, der genaue Ablauf der Messung kann aus Tabelle 4 entnommen werden. Die Probe wurde als annehmbar befunden, wenn der DNA Gehalt $\geq 100\text{ng}/\mu\text{l}$ war.

Tabelle 4. Ablauf der Konzentrationsbestimmung.

Konzentrationsbestimmung mittels *Qubit® 2.0 Fluorometer*

Reagenzien:

- Doppelsträngige DNA:
 - Qubit dsDNA BR Assay Kit Konzentrationsbereich 2-1000ng
(100 assays Q32850 / 500 assays Q32853 Invitrogen)
 - Qubit DNA BR Buffer
 - Qubit dsDNA BR Standard #1
 - Qubit dsDNA BR Standard #2
 - Qubit dsDNA BR Reagent *200X

- RNA:
 - Qubit RNA BR Assay Kit Konzentrationsbereich 20-1000ng
(100 assays Q10210 / 500 assays Q10211 Invitrogen)
 - Qubit RNA BR Buffer
 - Qubit RNA BR Standard #1
 - Qubit RNA BR Standard #2
 - Qubit RNA BR Reagent

- Laut Tabelle für jede Anwendung Arbeitslösung aus Puffer und Farbstoffreagenz in einem 15 ml Falconröhrchen ansetzen und vortexen.

	5 Proben + 2 Standards	10 Proben + 2 Standards	20 Proben + 2 Standards	30 Proben + 2 Standards
Puffer	1791 µl	2786 µl	4776 µl	6766 µl
Reagenz	9 µl	14 µl	24 µl	34 µl
Summe	1800 µl	2800 µl	4800 µl	6800 µl

Verdünnung 1:200

- Standards in Assaytubes ansetzen:
 - 10 µl Standard 1 in 190 µl Arbeitslösung geben
 - 10 µl Standard 2 in 190 µl Arbeitslösung geben
 - Proben in Assaytubes ansetzen:
 - 1 µl Probe in 199 µl Arbeitslösung geben (finales Volumen 200 µl)
 - Alle Proben und Standards vortexen und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
 - Qubit Fluorometer einschalten und RNA oder DNA Anwendung auswählen
 - Proben im Qubit Fluorometer der Reihe nach messen und Stock Conc. in ng/µl anzeigen lassen
-

2.3 Komparative genomische Hybridisierung auf DNA-Microarrays (aCGH)

Die komparative genomische Hybridisierung (*comparative genomic hybridisation*=CGH) ermöglicht den Nachweis von Verlusten und Zugewinnen der genomischen DNA. Hierbei wurden die DNA des Tumorgewebes und die Kontroll-DNA (Normalgewebe) mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und anschließend auf einem mit künstlich hergestellten Oligonukleotiden bedrucktem Objektträger (*Microarray*) hybridisiert. Anhand des Verhältnisses der Fluoreszenzsignale der zu untersuchenden DNA und der Kontroll-DNA können so Zugewinne und Verluste nachgewiesen werden. Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Chips sind *8x60k-DNA-Microarrays* der Firma Agilent Technologies (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Die Anzahl der künstlich hergestellten Oligonukleotide auf dem Objektträger bestimmt dabei die Auflösung. Bei einem *60k-Microarray* befinden sich ca. 60`000 Oligonukleotide auf einem der acht Probenfelder und repräsentieren gut beschriebene und tumorspezifische Regionen. Dabei verteilen sich die Oligonukleotide über den gesamten Bereich des Microarrays und verhindern somit einen lokalisierten Ausfall von mehreren Proben. Der Arbeitsablauf einer aCGH-Analyse wird schematisch in Abbildung 7 dargestellt.

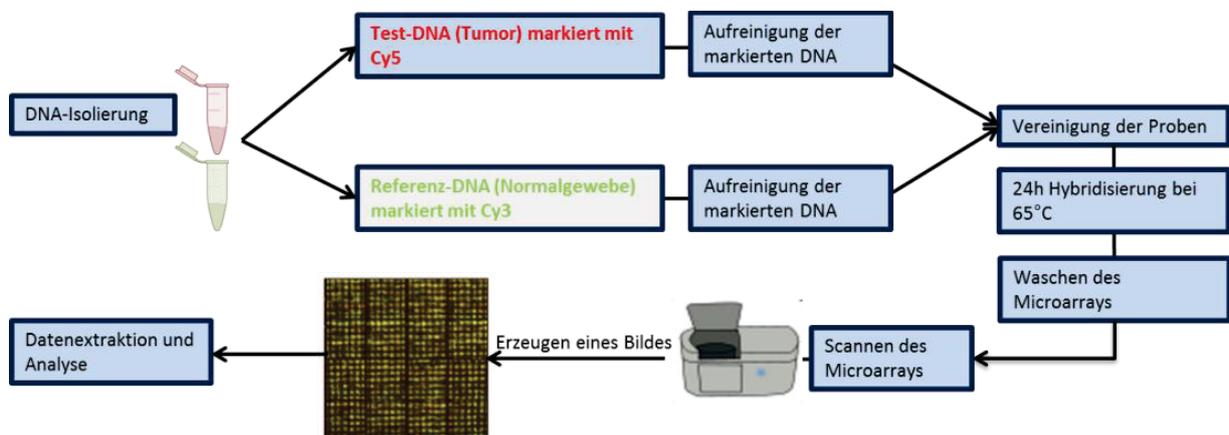


Abbildung 7. Ablauf einer aCGH-Analyse. Die zu untersuchende DNA wurde zunächst mittels Gelelektrophorese analysiert und je nach Größe der DNA Fragmente für drei bis zehn Minuten im PCR-Cycler auf eine gleiche Größe vorfragmentiert. Anschließend erfolgten die Markierung mit den Fluoreszenzstoffen und eine Aufreinigung der nun markierten DNA. Die DNA des Tumor- und des Normalgewebes wurde dann vereinigt und auf dem *DNA-Microarray* hybridisiert. Nach 24h wurde der *Microarray* gewaschen und anschließend gescannt. Computergestützt wurden dann die Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten analysiert und so genomische Amplifikationen (Zugewinne) und Deletionen (Verluste) detektiert.

2.3.1 Vorfragmentierung der DNA

Bevor die DNA mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden konnte, musste sichergestellt werden, dass die DNA Fragmente eine einheitliche Länge von 200-500 bp (bp=Basenpaare) haben. Hierfür wurde eine 2 µl Probe mit 5 µl H₂O und 3 µl 6x-Ladepuffer vermischt und neben einer 100 bp-Leiter auf einem 1,5% Agarosegel für 55-60 Minuten bei 125V und 400mA laufen gelassen. Im anschließenden Bild zeigte sich dann, in welchem Größenbereich die DNA Fragmente der einzelnen Proben liegen (Abb. 8).

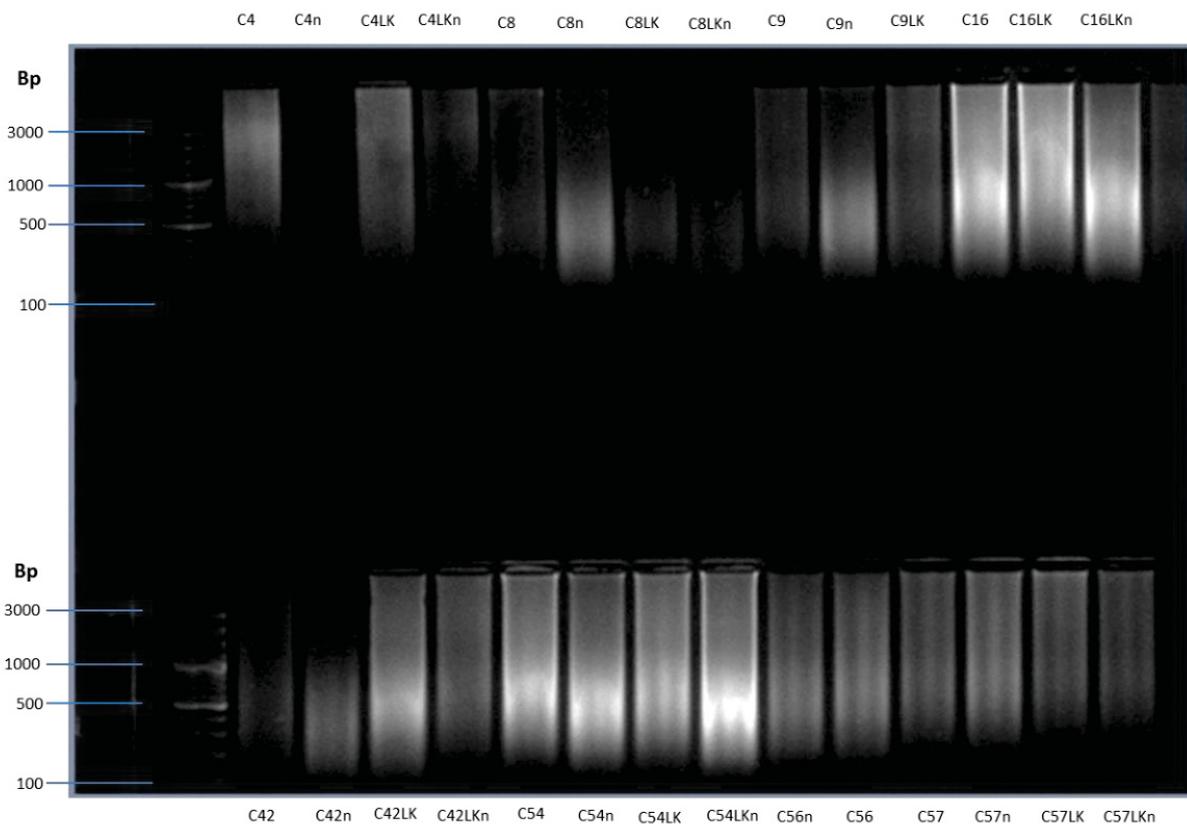


Abb. 8. Bild einer Gelelektrophorese. Je nach Größe der DNA Fragmente ergab sich für jede Probe ein individuelles Bild. Probe „C4“ wies beispielsweise den größten Anteil zwischen 1000 und 3000 Basenpaaren (Bp) auf. Bei Probe „C54“ lagen hingegen die meisten DNA Fragmente in der Größenordnung von 500 Basenpaaren vor. Je nach Probe ergaben sich so unterschiedlich lange Vorfragmentierungszeiten.

Abhängig von der Größe der DNA Fragmente erfolgte eine drei (~500bp), fünf (~1000bp) oder zehn (~3000bp) minütige Vorfragmentierung bei 95°C im PCR-Cycler (11 µl der Probe). Im Anschluss konnte direkt mit der Markierung fortgefahren werden oder die vorfragmentierte DNA bei -20°C gelagert werden.

2.3.2 Fluoreszenzmarkierung der DNA

Bevor die zu untersuchende DNA markiert werden konnte, musste diese in denaturierter Form vorliegen. Hierzu wurden 11 µl der Probe mit 2,5 µl *Random Primer* durch Invertieren gemischt und drei Minuten bei 95°C im PCR-Cycler erhitzt, gefolgt von einer Inkubation auf Eis für fünf Minuten. Das Prinzip der Markierungsreaktion beruht auf der Neusynthese der DNA-Stränge, wobei die Fluoreszenzmarker markierte Nukleotide sind (*Cyanine 3-dUTP* für Normalgewebe und *Cyanine 5-dUTP* für Tumorgewebe) die bei der Synthese neben den normalen Nukleotiden eingebaut werden. Für die Markierungsreaktion wurde folgender Labeling-Master Mix verwendet (Tabelle 5):

Tabelle 5. Labeling-Master Mix.

	Volumen pro Reaktion
H ₂ O	2 µl
5x Puffer	5 µl
10x dNTP	2,5 µl
Cyanine 3-dUTP (Normalgewebe)	1,5 µl
Cyanine 5-dUTP (Tumorgewebe)	
Exo-Klonow Fragment	0,5 µl
Gesamtvolumen	11,5 µl

11,5 µl des Mastermixes wurden mit 13,5 µl der Probe durch Invertieren gemischt und anschließend kurz zentrifugiert. Im PCR-Cycler wurden die Proben zwei Stunden bei 37°C und zehn Minuten bei 65°C inkubiert, bis zum Schluss eine Temperatur von 4°C gehalten wurde. Die Proben wurden anschließend auf Eis gegeben und konnten so bei -20°C bis zu einem Monat gelagert werden oder direkt weiterverarbeitet werden

2.3.3 Aufreinigung und Bestimmung der spezifischen Aktivität

Bevor die spezifische Aktivität gemessen werden konnte, mussten die Proben aufgereinigt werden. Dafür wurde die fluoreszenzmarkierte DNA auf spezielle Amicon 30kDa-Säulen (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) gegeben und nach Herstellerangaben (Vers. 6.1) aufgereinigt. Mit einem *NanoDrop*[®]-Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) wurde die Absorption der Fluoreszenzfarbstoffe Cyanin 5 und 3 gemessen. Die spezifische Aktivität beschreibt die Anzahl erfolgreich in die DNA eingebauter Fluoreszenzfarbstoffe und wurde folgendermaßen berechnet: $[(\text{pmol}/\mu\text{l Farbe})/(\mu\text{g}/\mu\text{l gDNA})]$. Bei Werten von 20-30 pmol/ μg wurde von einer ausreichenden Einbaurrate ausgegangen.

2.3.4 Hybridisierung

Die Hybridisierung der DNA-Proben auf den 8x60k-DNA-*Microarrays* erfolgte bei 65°C für 24h und unter kontinuierlicher Rotation der Objektträger. Hierfür wurden die Objektträger in einen speziellen Hybridisierungssofen (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) eingespannt und eine Rotationsgeschwindigkeit von 20 rpm (*rounds per minute*) eingestellt. Die Rotation gewährleistete dabei die gleichmäßige Hybridisierung der DNA-Proben auf dem Oligonukleotidarray.

2.3.5 Waschen des DNA-*Microarrays*

Da der Fluoreszenzfarbstoff Cyanin 5 für Ozondegradierung sehr anfällig ist, wurde beim Waschen der *Microarrays* mit einer Stabilisierungslösung gearbeitet. Zunächst wurde das *Backing* (Haltevorrichtung) vom *Microarray*-Objektträger gelöst. Dazu wurde der *Microarray*-Objektträger inklusive des zu lösenden *Backings* in *Oligo aCGH Wash Buffer 1* getaucht und mittels Pinzette das *Backing* abgelöst. Die Arrayobjektträger wurden dann in *Oligo aCGH Wash Buffer 1* für 5 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Danach wurde der Arrayobjektträger für eine weitere Minute bei 37°C in *Oligo aCGH Wash Buffer 2* gewaschen. Abschließend erfolgte bei Raumtemperatur ein Waschschrift für 10 Sekunden in Acetonitril und für 30 Sekunden in der Stabilisierungs- und Trockenlösung. Sämtliche Waschschriffe wurden unter ständigem Rühren durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Arrayobjektträger langsam und unter Vermeidung von Tropfenbildung aus der Stabilisierungs- und Trockenlösung genommen und direkt in die vorgesehenen Halterungen

eingespannt. Alle hier aufgezählten Instrumente und Lösungen wurden von der Firma Agilent bezogen (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

2.3.6 Scannen des DNA-Microarrays

Die DNA-Microarrays wurden als Bilddatei gescannt um mit einem Datenextraktionsprogramm chromosomale Zugewinne und Verluste auszuwerten. Dafür wurden die Microarrays in das Scannerkarussell des *Microarray Scanner G2565CA* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) eingespannt. Der Fluoreszenzfarbstoff Cyanin 3 wurde mit einer Emissionswellenlänge von 532 nm (*second harmonic generation-Yttrium-Aluminium-Granat Laser*) und Cyanin 5 mit einer Emissionswellenlänge von 633 nm (*Helium-Neon Laser*) angeregt. Durch spezifische Filter und einem Photomultiplier, der die elektrischen Signale verstärkt, wurde abschließend eine Bilddatei im tif-Format angefertigt (Abb. 9).

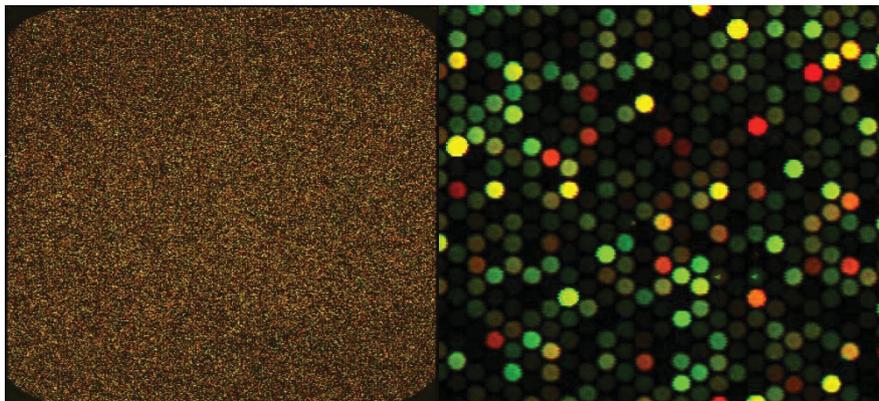


Abb. 9. Tif-Bilddatei nach Scannen der DNA-microarrays. Die Abbildung zeigt eine Tif-Bilddatei, wie sie nach dem Scannen eines Oligonukleotidarrays entstanden ist. Erfolgte eine gleichmäßige Hybridisierung der Proben-DNA (Tumor-DNA) und Kontroll-DNA, so erschienen die einzelnen Spots gelb. Das rechte Bild zeigt einen vergrößerten Bildausschnitt, eine Überrepräsentation von Tumor-DNA lässt die Spots rot-orange, eine Unterrepräsentation grün erscheinen.

2.3.7 Extraktion der Daten & Analyse

Zur Datenanalyse wurde die tif-Bilddatei in das Datenextraktionsprogramm *Feature Extraction* (Version 10.7.3.1, Protocol CGH_107_Sep09) eingespielt und die daraus entstandene Textdatei in die *Genomic Workbench 5.0.14* Software importiert (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Um die aCGH-Dateien zu untersuchen wurde der

aberration detection method 2 (ADM-2) Algorithmus mit einer Schwelle von 6.0 und eine *diploid peak* Zentralisierung zur Beurteilung der Kopienzahlalterationen benutzt. Da genetische Mutationen in Tumoren nicht in 100% der Zellen vorkommen, wurde ein Aberrationsfilter definiert, der nur solche Ereignisse als eindeutig positiv erkennt, die eine Minimum $\log_2\text{ratio}$ von ± 0.25 aufweisen. Zudem mussten mindestens drei Oligonukleotide betroffen sein. Um nun zu analysieren wie die Zugewinne und Verluste auf der genomischen DNA verteilt sind, wurden die Ergebnisse in so genannten *penetrance plots* betrachtet. Hierbei wird der prozentuale Anteil der Zugewinne und Verluste auf den betroffenen Regionen angezeigt (Abb. 10).

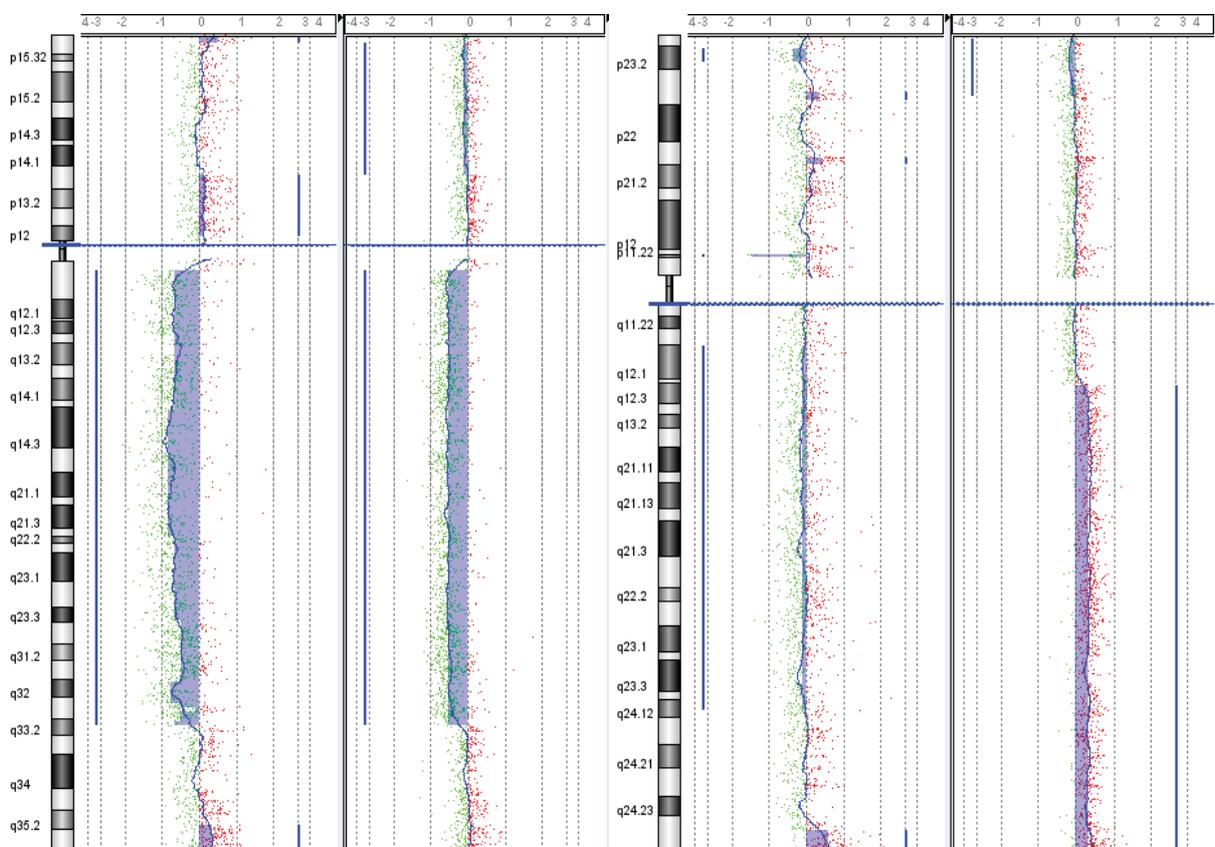


Abb. 10. Ansicht eines aCGH-Profiles mit chromosomalen Verlusten und Zugewinnen. Dargestellt ist die Chromosomenebene eines aCGH-Profiles aus dem Programm *Genomic Workbench*. Die Ordinatenachse bildet das komplette Chromosom 5 (links) und Chromosom 8 (rechts) ab. Die obere horizontale Achse gibt Auskunft über das $\log_2\text{ratio}$. Die blaue Linie bildet eine Ausgleichsgerade zwischen den Oligonukleotiden und lässt erkennen, ob Oligonukleotide ein hohes $\log_2\text{ratio}$ (Zugewinne nach rechts verschoben), oder ein negatives $\log_2\text{ratio}$ (Verluste nach links verschoben) haben. In dieser Darstellung wird jeweils der Primärtumor mit der korrespondierenden LKM verglichen. Für Chromosom 5 fallen eindeutige Verluste von Primärtumor und LKM (negatives $\log_2\text{ratio}$ blau hervorgehoben) im Bereich von 5q auf. Bei Chromosom 8 hat nur die LKM Zugewinne (hohes $\log_2\text{ratio}$ blau hervorgehoben) im Bereich von 8q.

Die spezifischeren Gruppen- und Paarvergleiche der Primärtumore und LKM wurden mit dem internetbasierten Analyseprogramm für genomische Daten *progenetix* (www.progenetix.org) durchgeführt. Für die *Cluster* Analysen der *microarray* Daten wurde mit dem Eisen cluster Algorithmus gearbeitet.

2.4 Mutationsanalysen

Für die Mutationsanalysen wurde die PCR-Technik verwendet. Getestet wurden Mutationen für die Onkogene *Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog (KRAS)* (Exon 2) und *tumor suppressor p53 (TP53)* (Exon 5 und 7). Hierbei wurden 18 Primärtumore und 18 LKM analysiert. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 12,5 µl DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland), 0,5 µl PrimerMix (10x, finale Konzentration 0,2 µM), 11,5 µl H₂O und 0,5 µl Template DNA wurden gemixt und das folgende Programm in einem Thermocycler durchgeführt: 95°C für 3 min, 95°C für 30 sec, Schmelztemperatur (T_m) für 30 sec, 72°C für 20 sec, 30 Wiederholungen und schlussendlich 72°C für 5 min. Die Primersequenzen und die entsprechende Schmelztemperatur können aus der Tabelle 6 entnommen werden.

Tabelle 6. Primersequenzen und T_m für die Mutationsanalysen. Die Primer wurden von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Primer	5´-3´	3´-5´	Größe (bp)	T _m (°C)
KRAS Exon 2	TTGGATCATATTCGTCCACAA	CCTTATGTGTGACATGTTCTAAT ATAGT	167	57,5
TP53 Exon 5	CTTGTGCCCTGACTTTCAACTC TGTCTC	TGGGCAACCAGCCCTGTCGTCT CTCCA	270	65
TP53 Exon 7	GCCTCATCTTGGGCCTGTGTTA TCTCC	GGCCAGTGTGCAGGGTGGCAA GTGGCTC	173	65

Die Aufarbeitung der Proben erfolgte nach den Herstellerangaben der Firma Quiagen mittels *MinElute PCR Purification Kit* (QUIAGEN, Düsseldorf, Deutschland). Die Analyse wurde stets mit Positiv- und Negativkontrollen validiert. Die PCR-Produkte wurden anschließend zur Sanger Sequenzierung an GATC Biotech (Konstanz, Germany) gesendet. Nach Übermittlung der DNA-Sequenzen wurden diese dann manuell mit der Software *Chormas Lite* (Version 2.0) ausgewertet.

2.5 Immunhistochemie

Zusätzlich zu der pathologischen Sicherung der Diagnose eines ICCs wurden in 44 Fällen der 60 Patienten Gewebeproben mittels immunhistochemischen Färbetechniken analysiert. Hierzu wurde ein Gewebepblock entnommen der repräsentativ für den gesamten Tumorbereich war. Zunächst wurden 4 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt und über Nacht getrocknet. Am Folgetag erfolgte die immunhistochemische Färbung mit folgenden Antikörpern: Zytokeratin (CK) 7 (Dako, Dänemark, monoclonal antibody, clone OV-TL 12/30, dilution 1/6000), CK20 (Dako, Dänemark, monoclonal antibody, clone Ks20.8, dilution 1/400), CK8 (Becton, Dickinson and Company, monoclonal antibody, clone CAM5.2, dilution 1/400), CK19 (Dako, Dänemark, monoclonal antibody, dilution 1/200) und Carcinoembryonales Antigen (CEA) (Dako, Dänemark, polyclonal, dilution 1/40.000). Das Tumorgewebe wurde als ICC betrachtet, wenn das Gewebe bei Zytokeratin 7 und 19 eine positive (Abb. 11 und 12) und bei Zytokeratin 20 eine negative Färbereaktion (Abb. 13) aufwies.

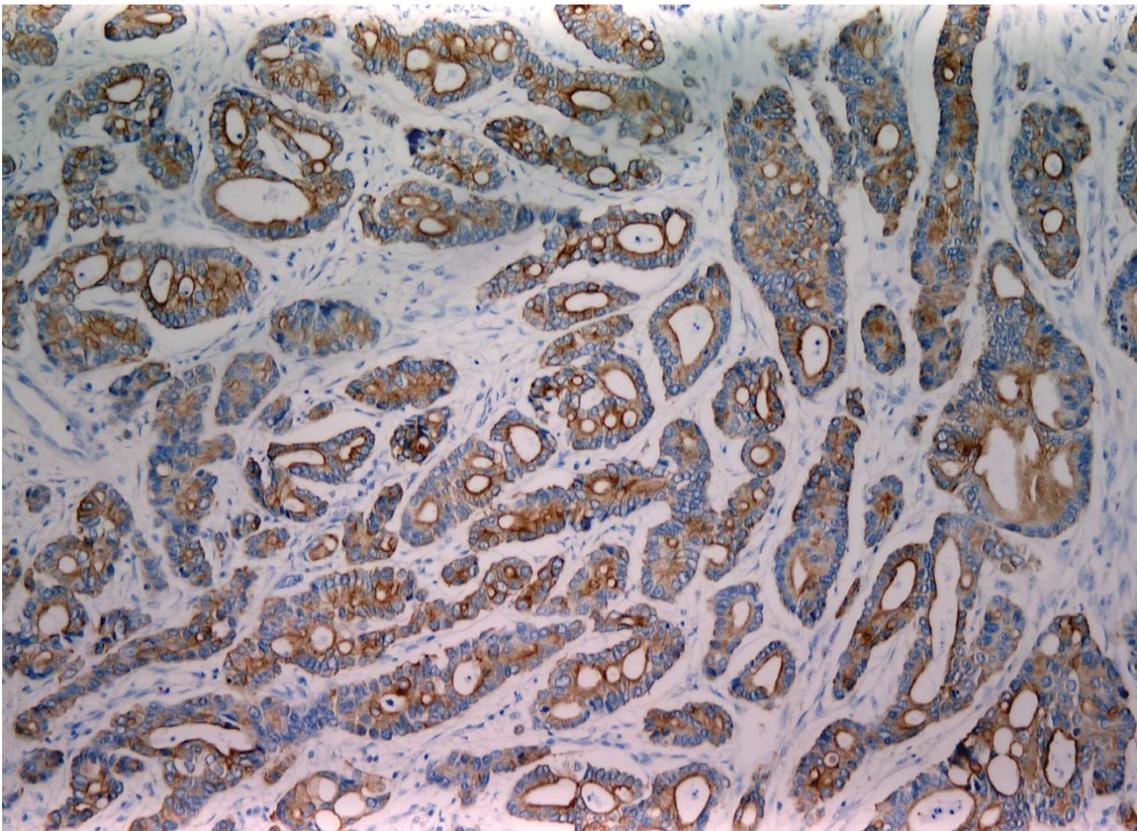


Abb. 11: CK 7 positive Färbereaktion eines ICCs

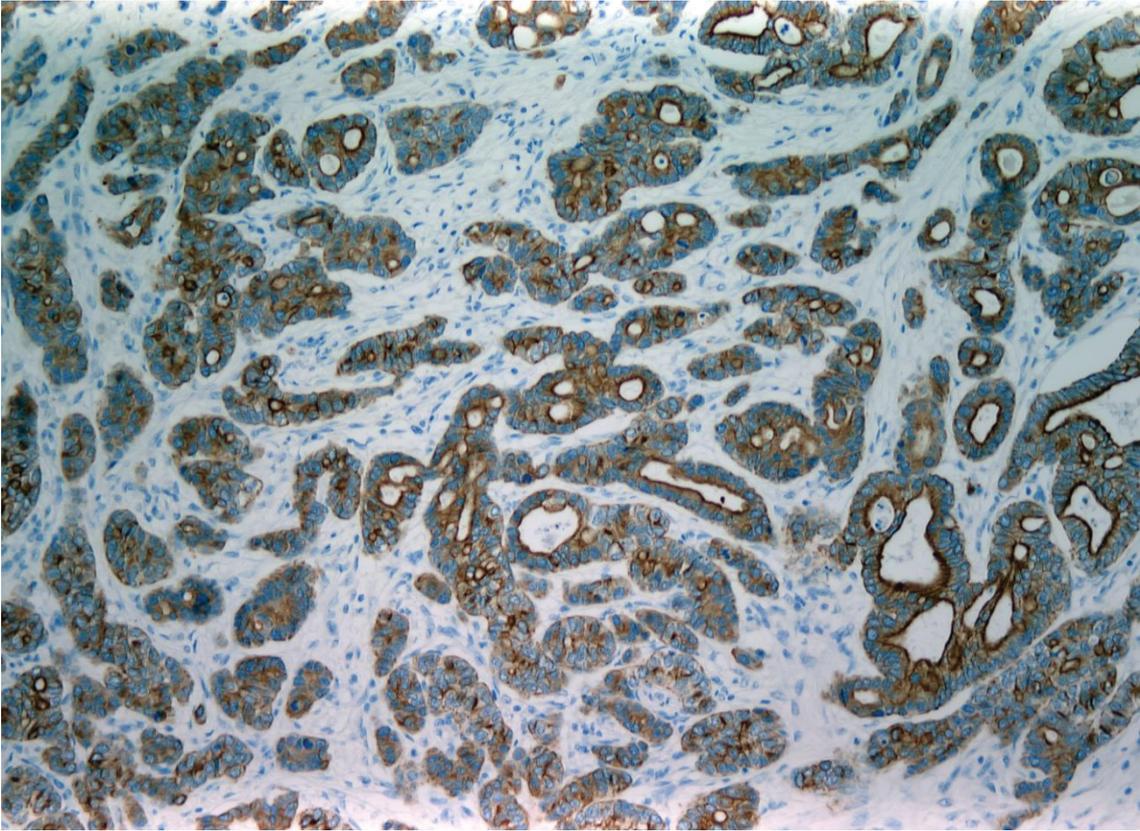


Abb. 12: CK 19 positive Färberaktion eines ICCs.

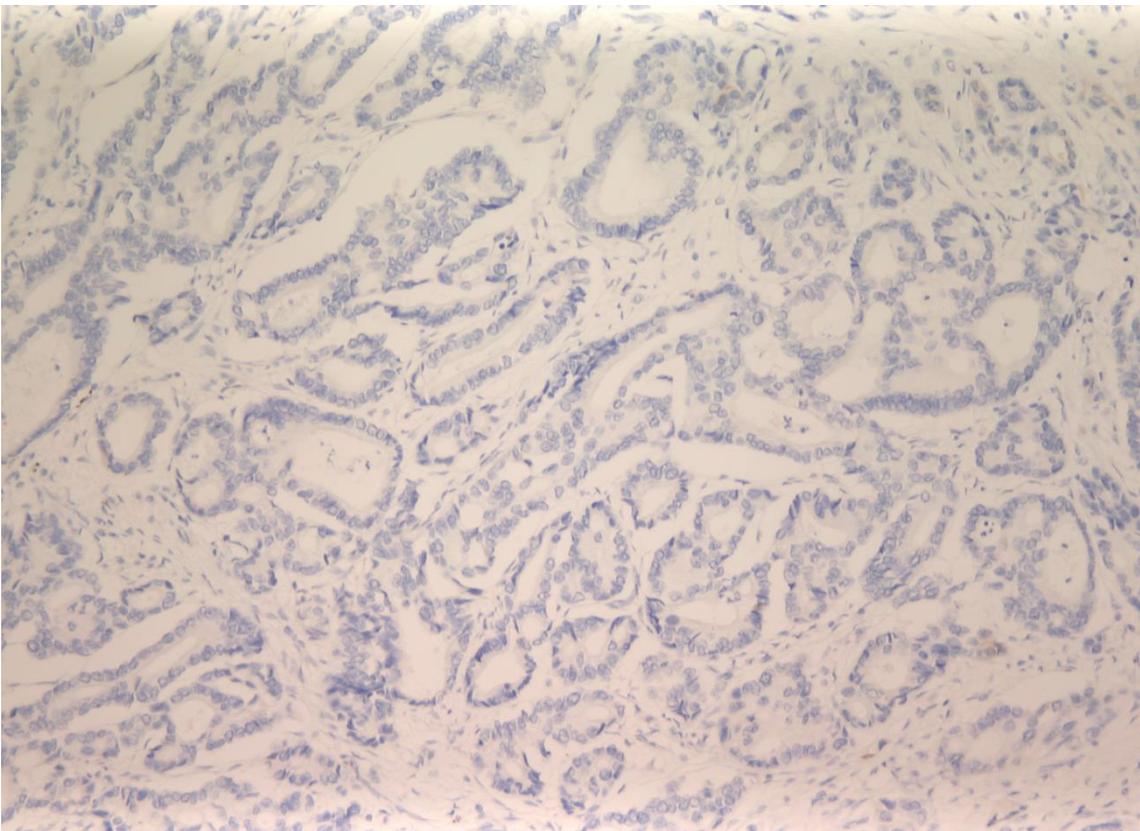


Abb. 13: CK 20 negative Färbereaktion eines ICCs

Zur Darstellung der Antikörperbindung an die entsprechenden Antigene wurde mit der Avidin-Biotin-Komplex-Technik gearbeitet. Dabei binden biotinylierte Primärantikörper an das entsprechende Antigen. Ein tetraivalentes Avidin bindet anschließend an den Primärantikörper. Die drei verbleibenden Bindungsstellen des Avidins werden nun von biotinylierten Amplifikatoren besetzt. Die Färbungen wurden alle an einem automatisiertem Ventana ICH Färbeautomaten mit dem *Ventana basic DAB detection kit* (Roche, Basel, Schweiz) durchgeführt. Die Immunhistochemie wurde stets mittels Positiv- und Negativkontrollen (Weglassen des Primärantikörpers) validiert.

2.6 Analyse der aktivierten Signaltransduktionswege und möglicher Zielgene für antitumorale Therapien

Um die Bedeutsamkeit der alterierten Gene näher zu charakterisieren wurde die mögliche Aktivierung bekannter Signaltransduktionswege untersucht. Hierzu wurde mit der *KEGG*-Analyse [90] untersucht, ob die in den Regionen der Zugewinne und Verluste liegenden Gene eine Rolle in bekannten Krebs-assoziierten Signalwegen spielen. Es wurde eine hypergeometrische Testung und die R Funktion $p.adjust$ gewählt, und das Signifikanzniveau wurde so eingestellt, dass nur die zehn signifikantesten Signalwege mit einer Mindestanzahl von zwei beteiligten Genen angezeigt wurden. Außerdem wurden die alterierten Gene unserer Studie mit der Therapeutic Targets Database (TTD) [91] analysiert um mögliche Zielstrukturen für bereits bekannte oder neue antitumorale Therapien zu identifizieren. Es wurden Gensymbole als Suchbegriffe für „*targets*“ benutzt und nach Substanzen gesucht, die diese Gene als Zielstruktur besitzen.

2.7 Statistische Analyse

Zur Generierung der statistischen Ergebnisse wurde die Statistiksoftware *SPSS* (Version 22.0) von IBM verwendet. Die deskriptive Statistik der demografischen Daten und Grundcharakteristika der Patienten wurde durch Errechnen der Minima, Maxima und Mittelwerte für Intervall skalierte Werte und der Häufigkeiten und Prozentwerte für nominal skalierte Werte ermittelt. Der Kolmogorov-Smirnov-Test wurde benutzt um die Normalverteilung für Tumorgroße und der Tumormarker zu beurteilen. Um Unterschiede zwischen den Lymphknotenstatus, Tumormarker Level und Tumorgroße zu untersuchen, wurde der Student's T-test eingesetzt. Unterschiede in den ätiologischen Daten und der Tumorcharakteristika wurden mittels des Chi-Quadrat-Tests überprüft. Die Überlebenszeitanalyse wurde mit dem Kaplan-Meier Schätzer und die multivariate Analyse mit der Cox-Regressionsanalyse durchgeführt. Um Unterschiede in der Anzahl der CNAs zwischen den Primärtumoren und LKM zu errechnen, wurde der One-Way Anova mittels Kruskal-Wallis Test mit Korrektur auf multiple Vergleiche nach Dunn, sowie der Mann Whitney *U* Test verwendet. In dieser Studie werden Ergebnisse mit einem *p*-Wert von 0,05 oder weniger als signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Daten

In dieser Studie wurden 60 Patienten mit ICC, die zwischen 2003 und 2013 an der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf operiert wurden, analysiert. Das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt der Operation betrug 65 Jahre. Die Geschlechter waren mit 31 Männern und 29 Frauen nahezu gleich verteilt. In dieser Kohorte fiel auf, dass Frauen häufiger Tumore mit LKM (61%) hatten als Männer (39%), allerdings war dieser deutliche Unterschied statistisch nicht signifikant ($p=0,107$). Die Analyse der ätiologischen Daten zeigte deutliche Unterschiede zwischen Patienten mit N1 und N0 Primärtumoren (Tabelle 7).

Tabelle 7. Klinische Charakteristika.

Eigenschaften	Total (n=60)	N0 (n=31)	N1 (n=23)	p-Wert
Geschlecht				
Männlich	31 (52%)	19 (61%)	9 (39%)	
Weiblich	29 (48%)	12 (39%)	14 (61%)	0,107
Alter (Jahre)				
Median	65 (15-81)	65	66	0,322
Ätiologie				
Diabetes	10 (17%)	6 (19%)	1 (4%)	0,154
Raucher	11 (18%)	2 (6%)	7 (30%)	0,008
Alkoholabusus	4 (7%)	3 (9%)	0	n.s.
Leberzirrhose (durch)	14 (23%)	10 (32%)	1 (4%)	0,012
Alkohol	2 (14%)	1 (10%)	0	n.s.
Hepatitis A	1 (7%)	0	1 (100%)	n.s.
Hepatitis B	2 (14%)	1 (10%)	0	n.s.
Hepatitis C	3 (21%)	3 (30%)	0	n.s.
Steatosis hepatis	5 (36%)	4 (40%)	1 (100%)	n.s.
Hepatitis B	3 (5%)	1 (3%)	1 (4%)	n.s.
Hepatitis C	4 (7%)	3 (10%)	1 (4%)	n.s.
Tumormarker				
CA 19-9 (U/ml)	869 (0,6-10000) 33/60	136 (n=20)	2160 (n=12)	0,028
CEA (µg/l)	4,3 (0,5-24,8) 27/60	3,5 (n=16)	5,5 (n=10)	0,072
AFP (µg/l)	7,8 (1-82,5) 21/60	10,1 (n=14)	3,1 (n=7)	0,396
Ereignisse				
Tod	49 (82%)	23 (74%)	21 (91%)	0,455
Rezidiv	8 (13%)	4 (13%)	3 (13%)	0,597

Interessanterweise rauchten 30% der Patienten mit N1 Tumoren, jedoch nur 6% der Patienten mit N0 Primärtumoren ($p=0,008$). Zudem fand sich bei 32% der N0 Primärtumore eine zugrundeliegende Leberzirrhose, während nur bei 4% der Patienten mit N1 Primärtumoren zum Diagnosezeitpunkt eine Lebergrunderkrankung bekannt war ($p=0,012$). Der Tumormarker CA 19-9 war bei Patienten mit LKM im Mittel signifikant höher (2160 U/ml), als bei Patienten ohne LKM (136 U/ml) ($p=0,028$). Es konnte keine signifikante Korrelation der zusätzlich untersuchten klinischen Parameter (Diabetes mellitus Typ II, Alkoholabusus, Hepatitis B/C) in Abhängigkeit des Lymphknotenstatus festgestellt werden.

3.2 Histopathologische Daten

Eine Übersicht über alle relevanten histopathologischen Unterschiede zeigt Tabelle 8.

Tabelle 8. Histologische und pathologische Daten.

Eigenschaften	Total (n=60)	N0 (n=31)	N1 (n=23)	p-Wert
Tumorstadium				
T1+2	31 (52%)	22 (71%)	9 (39%)	
T3+4	22 (37%)	7 (23%)	14 (61%)	0,007
Mediane Tumorgröße				
Pathologie (in cm)	6.6 (1,5-16)	6.3 (0.7-14)	7.1 (2.3-13)	0,466
Mediane Anzahl der resezierten Lymphknoten				
Positive Lymphknoten		0	7 (1-36)	<0,001
Fernmetastasen				
M0	48 (80%)	29 (94%)	17 (74%)	
M1	7 (12%)	1 (3%)	4 (17%)	0,063
Differenzierung				
Gut	1 (2%)	1 (3%)	0	n.s.
Moderat	29 (48%)	17 (55%)	11 (48%)	0,523
Schlecht	25 (42%)	12 (39%)	12 (52%)	0,378
Tumorchirurgie				
R0	48 (80%)	28 (90%)	15 (65%)	
R1	12 (20%)	3 (10%)	8 (35%)	0,024
Vaskuläre Invasion				
V0	41 (68%)	29 (94%)	11 (48%)	
V1 (mikrovaskulär)	13 (22%)	1 (3%)	11 (48%)	<0,001
Invasion der Perineuralscheide				
Pn0	33 (55%)	25 (81%)	6 (26%)	
Pn1	13 (22%)	4 (13%)	9 (39%)	0,001

Die Kohorte umfasste 23 (38%) Patienten mit positivem Lymphknotenstatus. Patienten ohne LKM hatten zu 71% Tumore im T1 oder T2 Stadium (vs. 39% bei den N1 Primärtumoren), wohingegen 61% der N1 Primärtumore Tumore im Stadium T3 oder T4 waren (vs. 23% bei den N0 Primärtumoren) ($p=0,007$). Entsprechend betrug die durchschnittliche Tumorgröße im Resektionspräparat bei den N1 Primärtumoren 7,1cm, während die N0 Primärtumore im Durchschnitt 6,3cm groß waren. Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant.

Die durchschnittlich resezierte Anzahl der Lymphknoten lag im Median bei 9, jedoch wurden bei den N1 Primärtumoren signifikant mehr Lymphknoten entfernt (15 vs. 7, $p < 0,001$). Eine Fernmetastasierung trat häufiger bei positivem Lymphknotenstatus auf, jedoch war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant. Die meisten Primärtumore waren moderat (48%) oder schlecht (42%) differenziert, ohne eine erkennbare Korrelation mit dem Lymphknotenstatus. Interessanterweise waren jedoch der R1-Status ($p=0,024$), die vaskuläre Invasion ($p < 0,001$) und die Perineuralscheideninvasion ($p=0,001$) signifikant mit dem Auftreten von LKM assoziiert.

3.3 Resektionsverfahren

Das häufigste Resektionsverfahren in unserer Kohorte stellte die linke oder rechte Hemihepatektomie dar. Andere Resektionsverfahren kamen deutlich seltener vor. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Resektionsmodus zwischen N0 und N1 Primärtumoren, ebenso keine signifikante Korrelation mit der Überlebenszeit (Tabelle 9).

Tabelle 9. Resektionsverfahren im Vergleich.

Resektionsverfahren	Total (n=60)	N0 (n=31)	N1 (n=23)	p -Wert
Rechte Hepatektomie	17 (28%)	12 (39%)	3 (13%)	n.s.
Linke Hepatektomie	20 (33%)	12 (39%)	7 (30%)	n.s.
Erweiterte rechte Hepatektomie	5 (8%)	2 (6%)	2 (9%)	n.s.
Erweiterte linke Hepatektomie	4 (7%)	0	3 (13%)	n.s.
Zentrale Hepatektomie	4 (7%)	3 (10%)	2 (9%)	n.s.
Trisegmentektomie	8 (13%)	2 (6%)	6 (26%)	n.s.

3.4 Überlebenszeitanalysen

Die Kaplan Meier Analyse zeigte ein signifikant schlechteres Überleben für Patienten mit LKM im Vergleich zu Patienten ohne LKM ($p=0,049$) (Abb. 14). Die mittlere Überlebenszeit für Patienten mit positivem Lymphknotenstatus betrug 18 Monate verglichen mit 26 Monaten bei Patienten mit negativem Lymphknotenstatus. Weitere Faktoren die das Überleben signifikant beeinträchtigten waren ein positiver Resektionsrand (R1) ($p < 0,001$) und eine

schlechte Differenzierung des Tumors (G3) ($p < 0,001$) (Abb. 14). Die Tumorgroße beeinflusste das Überleben nicht signifikant, jedoch zeigte sich ein deutlicher Trend für ein schlechteres Überleben der Patienten mit größeren Tumoren ($p = 0,061$) (Anhang Abb. 1).

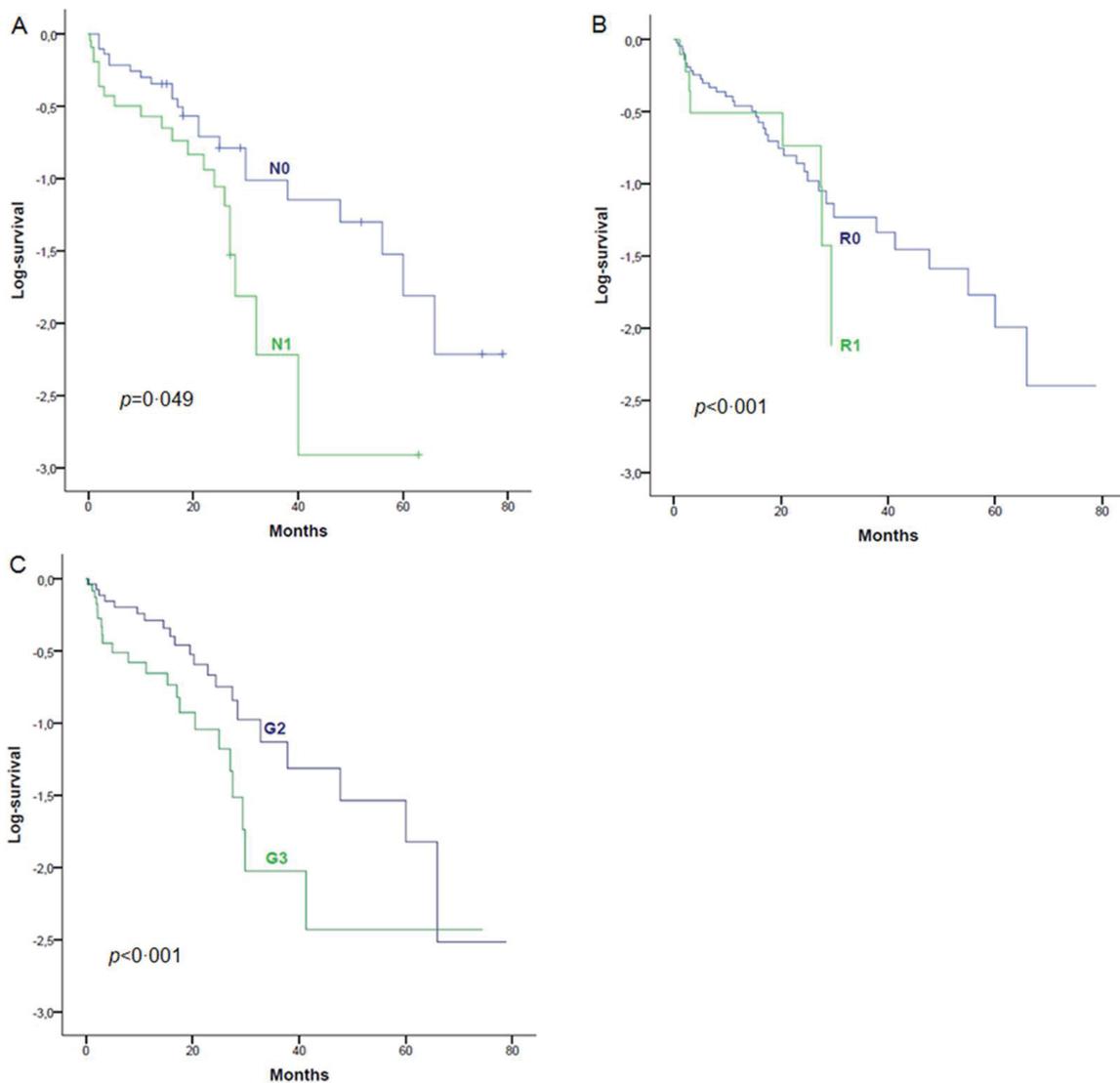


Abb. 14 Parameter die das Überleben beim ICC signifikant beeinflussen. Patienten mit Lymphknotenmetastasen zeigen ein signifikant ($p = 0,049$) schlechteres Überleben als Patienten ohne LKM (A). Ein positiver Resektionsrand (B) und eine schlechte Tumordifferenzierung (C) sind ebenfalls mit einem schlechteren Überleben korreliert ($p < 0,001$ und $p < 0,001$).

In der multivariaten Analyse erreichte jedoch keiner der o.a. Faktoren eine statistische Signifikanz. Andere analysierte Faktoren wie das Geschlecht, vaskuläre Invasion, Perineuralscheideninvasion und Fernmetastasierung zeigten keine signifikante Korrelation zum Überleben. Das durchschnittliche Überleben und der mediane Beobachtungszeitraum betragen 21 Monate, die meisten Patienten wurden bis zu ihrem Tod nachuntersucht. In dieser Kohorte betrug das 1/3/5-Jahres Überleben 60%, 16% und 11,6%. Postoperativ

entwickelten 16 Patienten Fernmetastasen (durchschnittliche Zeit zur Metastasierung: 10 Monate) und acht Patienten entwickelten ein Lokalrezidiv (durchschnittliche Zeit zum Lokalrezidiv: 12 Monate), dennoch beeinflussten beide Parameter das Überleben nicht signifikant. Patienten mit positivem Lymphknotenstatus entwickelten postoperativ signifikant ($p=0,016$) häufiger Fernmetastasen im Vergleich zu Patienten ohne LKM (11 vs. 6 Fälle), im Gegensatz dazu zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem Lymphknotenstatus und dem Auftreten eines Lokalrezidivs. Während sich die Zeit zum Auftreten eines Lokalrezidivs zwischen positivem und negativem Lymphknotenstatus nicht unterschied (14 vs. 13 Monate), zeigte die Zeit bis zum Auftreten einer Fernmetastasierung einen eindeutigen, wenn auch nicht signifikanten Unterschied zwischen positivem und negativem Lymphknotenstatus (8 vs. 17 Monate).

3.5 Gesamt-aCGH-Analyse der Primärtumore und der LKM

Die Ergebnisse der aCGH Analyse umfasst die chromosomalen Zugewinne und Verluste, die beim Vergleich aller ICCs (N0 und N1 Primärtumore, LKM) mit gesundem Normalgewebe auffallen. Dabei zeigten sich einige wesentliche chromosomale Zugewinne (Zunahme der Kopienzahlen von einem spezifischen DNA-Fragment) und Verluste (Verlust eines spezifischen DNA-Fragments). In dieser Kohorte war die Anzahl an chromosomalen Verlusten höher als die der Zugewinne. In Abbildung 15 sind die identifizierten Zugewinne auf den Chromosomen 1q, 7p, 7q, 8q, 17q und 19q und Verluste in 1p, 3p, 4q, 6q, 9p, 9q und 13q zu erkennen.

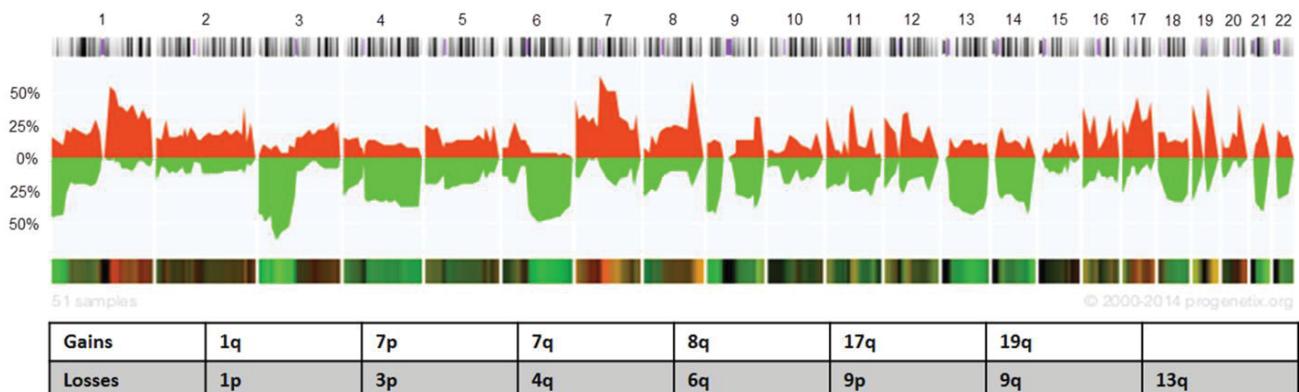


Abb. 15. Allgemeine array-CGH Ergebnisse. In diesem *penetrance plot* werden alle ICC Gewebeprobe (N0 und N1 Primärtumore und LKM) zusammen betrachtet. Die Zugewinne („Gains“) ragen dabei nach oben und sind in rot dargestellt. Die chromosomalen Verluste („Losses“) sind grün aufgetragen und ragen nach unten. Beschrieben wird der prozentuale Anteil der Zugewinne und Verluste auf den betroffenen Regionen. Gewertet werden nur Zugewinne und Verluste von

mindestens 30%. Die Zahlen 1-22 stehen für die 22 Autosomen, der linke Teil repräsentiert den kurzen Chromosomenarm (p) und der rechte Teil den längeren Chromosomenarm (q).

3.6 Vergleich der zwei Primärtumorgruppen (N0 vs. N1)

3.6.1 CNAs der Primärtumore im Vergleich mit den LKM

Primärtumore mit LKM zeigten mehr CNAs im Vergleich zu Primärtumoren mit negativem Lymphknotenstatus. Mit einer durchschnittlichen Anzahl von 45,13 CNAs lagen diese deutlich über der Anzahl der N0 Primärtumore mit 37,43 CNAs. Zusätzlich war das Maximum an CNAs bei den N1 Primärtumoren mit 161 CNAs deutlich höher, als bei N0 Primärtumoren mit einem Maximum von 137 CNAs. Weiterhin beherbergten die LKM selber ebenfalls deutlich mehr CNAs als die N0 Primärtumore (Tabelle 10).

Tabelle 10. CNAs der Primärtumore und LKM

	N0	N1	LKM
Probenanzahl	14	23	14
CNAs (min)	4	3	1
CNAs (max)	137	161	150
CNAs (durchschnittlich)	37,43	45,13	44,22

N0, Primärtumore ohne LKM. N1, Primärtumore mit LKM.

Dieses Ergebnis erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (*One-Way* Anova mittels Kruskal-Wallis Test mit Korrektur auf multiple Vergleiche nach Dunn; $p=0,9896$). Diese Ergebnisse unterstreichen die eindeutigen chromosomalen Unterschiede zwischen N1 und N0 Primärtumoren, wie sie auch in Abbildung 16 dargestellt sind.

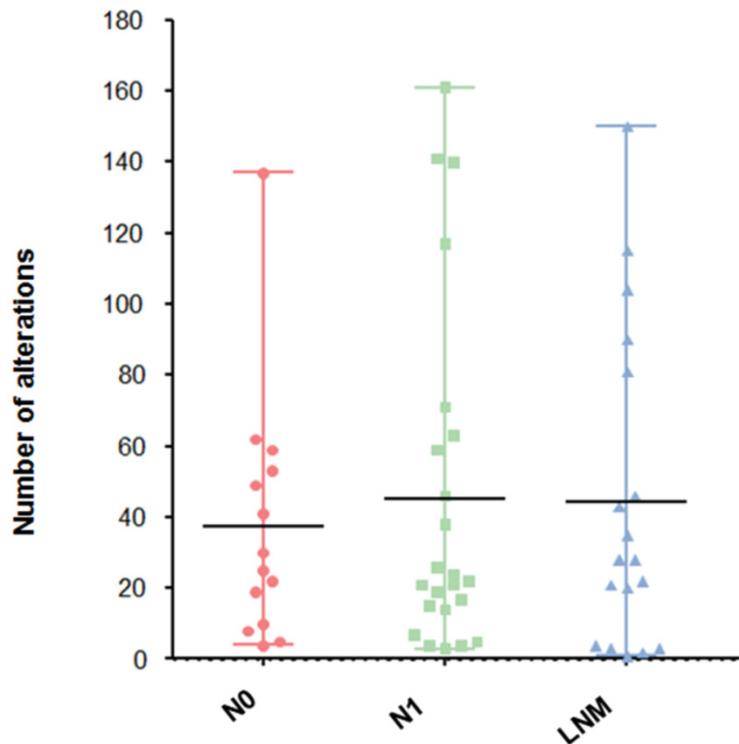


Abb. 16. Anzahl der Kopienzahlalterationen der drei Gruppen. Aufgetragen sind die Kopienzahlalterationen („Number of alterations“) der zwei Primärtumortypen (N0 und N1) und der LKM (LKM). Angezeigt werden die durchschnittliche Anzahl an CNAs (schwarze Balken) und die maximale Anzahl an CNAs. Die einzelnen Punkte geben die einzelnen Werte, und somit die Verteilung an. Im Vergleich zu N0 Primärtumoren wiesen N1 Tumore und LKM mehr CNAs auf. N0, Primärtumore ohne LKM. N1, Primärtumore mit LKM. LKM, Lymphknotenmetastasen.

3.6.2 CNAs in N1-Tumoren vs. N0-Tumoren

Werden die *penetrance plots* der N1 und N0 Primärtumore einzeln analysiert und gegenübergestellt, so werden die Unterschiede im genomischen Profil deutlich. Bei dieser Analyse wurden 14 N0 Primärtumore mit 23 N1 Primärtumoren verglichen. Der Hauptunterschied zwischen N1 und N0 Primärtumoren waren dabei signifikant neue Zugewinne und Verluste der N1 Primärtumore. Diese Zugewinne fanden sich auf den Chromosomen 3p ($p=0,006$), 4q ($p=0,016$), 5p ($p=0,002$) und 13q ($p=0,039$) und die Verluste auf den Chromosomen 17p ($p<0,001$) und 20p ($p=0,006$) (Abb. 17).

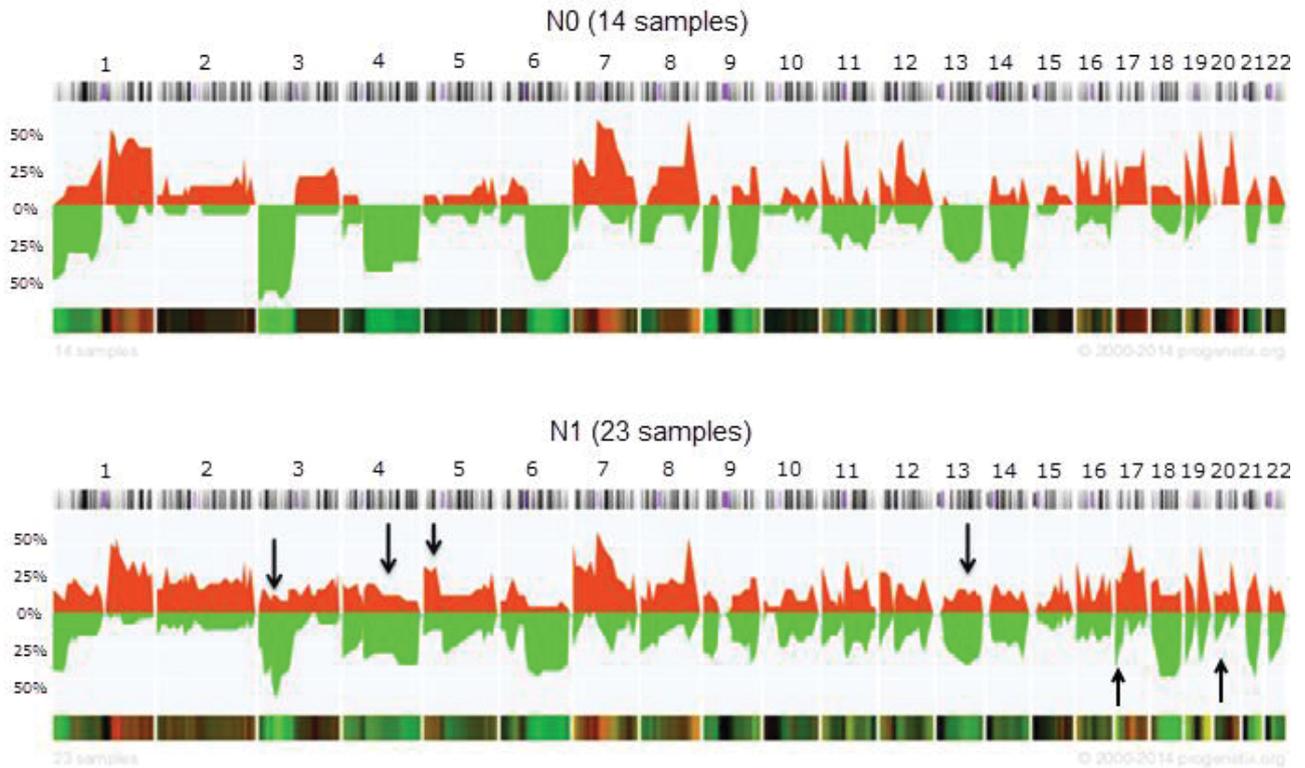


Abb. 17. Array CGH Ergebnisse der verschiedenen Primärtumore. Hier werden die *penetrance plots* der verschiedenen Primärtumore gegenübergestellt. Hierbei werden Unterschiede zwischen den N0 Primärtumoren (N0) und den N1 Primärtumoren (N1) deutlich. Die Zugewinne werden hier ebenfalls in rot nach oben und die Verluste in grün nach unten aufgetragen. Neue Zugewinne sind auf den Chromosomen 3p, 4q, 5p und 13q und neue Verluste auf 17p und 20p zu erkennen (hervorgehoben mit Pfeilen).

Interessanterweise blieben Zugewinne und Verluste die bereits in den N0 Primärtumoren zu finden waren in den N1 Primärtumoren erhalten. Die Analyse der Gene der in N1 Primärtumoren alterierten Chromosomenbanden mittels *KEGG*-Analyse (hypergeometrische Testung) deckte dabei wichtige Krebs-assoziierte Gene auf wie beispielsweise *LIFR*, *GHR*, *DP1*, *FTL1*, *TP53*, *PLCB1* und *PLCB4* (siehe Anhang Tabelle 1).

3.7 Paarvergleich der Primärtumore mit der korrespondierenden Lymphknotenmetastase

Um die Übereinstimmungen und Unterschiede zwischen Primärtumor und LKM genauer zu analysieren, wurden in einem nächsten Schritt jeweils nur der Primärtumor mit der LKM desselben Patienten miteinander verglichen (Paarvergleich). Der Primärtumor und die korrespondierende LKM (vom gleichen Patienten) werden im weiteren Verlauf als Paar bezeichnet. Im Paarvergleich zeigten sich wenige, aber spezifische Unterschiede zwischen dem N1 Primärtumor und der korrespondierenden LKM. Weitere Analysen zeigten, dass lediglich 14% der Paare unterschiedliche CNAs hatten während die große Mehrheit der Paare (86%) auf mindestens einer Zytobande (bei einer Auflösung von 320 Zytobanden bei 22 Chromosomen) eine Übereinstimmung der Alterationen (Zugewinn oder Verlust) zeigte. Von diesen Paaren zeigten die Mehrzahl (79%) Übereinstimmungen auf 1-20 Zytobanden und 7% auf 21 bis 40 Zytobanden (Abb. 18).

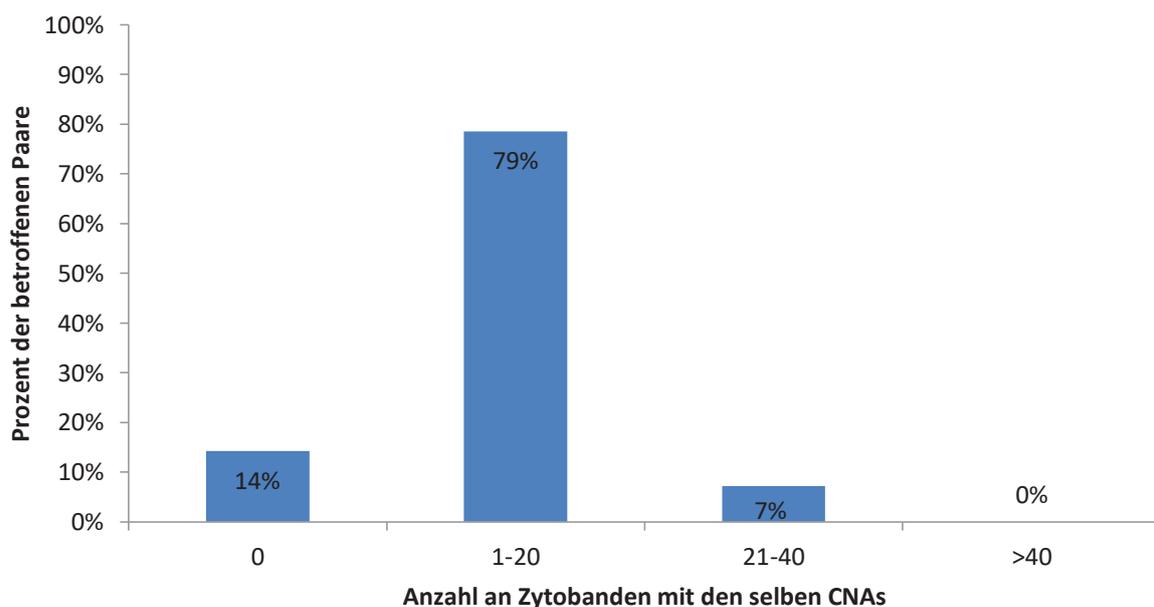


Abb. 18. Anzahl der Zytobanden mit gleichen CNAs zwischen Primärtumor und korrespondierender LKM. Lediglich 14% der Paare teilten keine gemeinsamen chromosomalen Veränderungen. Bei 79% der Paare fanden sich auf einer bis zu 20 Zytobanden die gleichen CNAs. Bei 7% der Paare waren dieselben CNAs sogar auf 21 bis zu 40 Zytobanden vorhanden.

Analysiert man die Unterschiede zwischen Primärtumor und korrespondierender LKM finden sich neben den vielen chromosomalen Gemeinsamkeiten bei 79% der LKM neue spezifische isolierte Zugewinne. Die betroffenen Regionen auf denen sich die isolierten Zugewinne

fanden, waren dabei in 36% der Fälle auf Chromosom 12q14. In mehr als 20% fanden sich weitere isolierte Zugewinne auf den Chromosomen 1p13, 2p23, 7p22, 7q11, 11q12, 13q13 und 14q12 (Abb. 19).

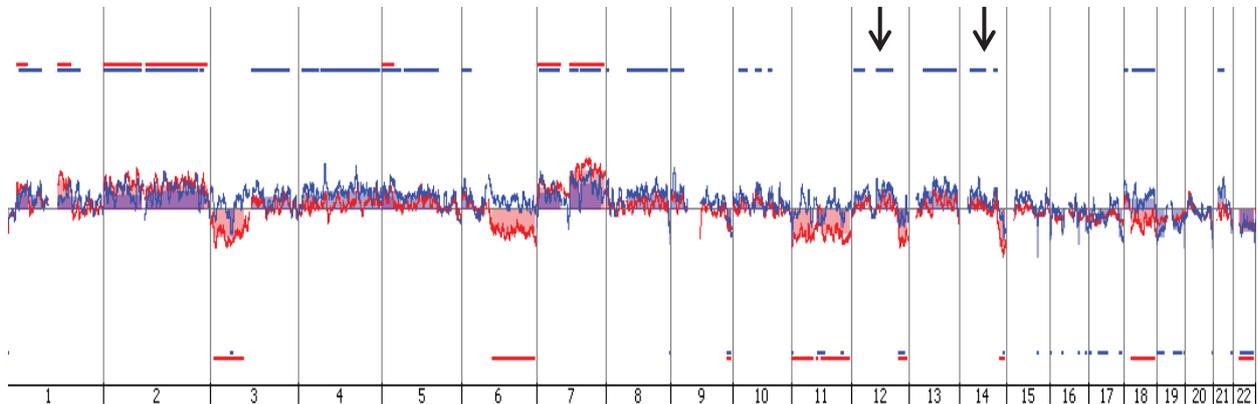


Abb. 19. Spezifische isolierte Zugewinne der LKM auf Chromosom 12q14 und 14q12. Dieser *penetrance plot* ist ein Beispiel für den Vergleich von einem Primärtumor und der zugehörigen LKM. Das *aCGH* Profil des Primärtumors ist in rot dargestellt, das der LKM in blau. Legt man die beiden Profile übereinander („*overlap*“), so werden die isolierten Zugewinne der LKM im Vergleich zum Primärtumor deutlich. Zugewinne und Verluste die signifikant sind, werden mit Balken in der entsprechenden Farbe an der entsprechenden Position angezeigt (als „*calls*“ bezeichnet). Wird ein roter und blauer Balken angezeigt, so kommt die Veränderung in Primärtumor und LKM vor (Beispiel: Zugewinn auf Chromosom 7). Die Zugewinne die nur in der LKM vorkommen werden auf Chromosom 12q14 und 14q12 deutlich (durch Pfeile hervorgehoben). Solche, in der LKM einzigartig vorkommenden Zugewinne, fanden sich bei insgesamt 79% der LKM im Vergleich zu ihrem Primärtumor.

Isolierte Verluste in den LKM zeigten sich hingegen nicht vermehrt. Die isolierten Zugewinne der LKMs beherbergen eine Vielzahl Krebs-assoziiertes Gene wie beispielsweise *TBK1*, *HMGA2*, *MDM2*, *GNS* und *CAND1* (siehe Anhang Tabelle 2).

3.8 Clusteranalyse der Primärtumore (N0 und N1)

Die nichtüberwachte Clusteranalyse (*unsupervised clustering*), die die Ähnlichkeit der CNAs der Primärtumore vergleicht, konnte zwei unterschiedliche Gruppen von Primärtumoren identifizieren ohne Korrelation zum Lymphknotenstatus.

Die Clustergruppe B beinhaltete signifikant mehr schlecht differenzierte Tumore (G3/4 vs. G1/2, $p=0,034$) und war signifikant mit einem schlechteren Überleben (13 vs. 31 Monate, $p=0,035$) assoziiert (Abb. 20).

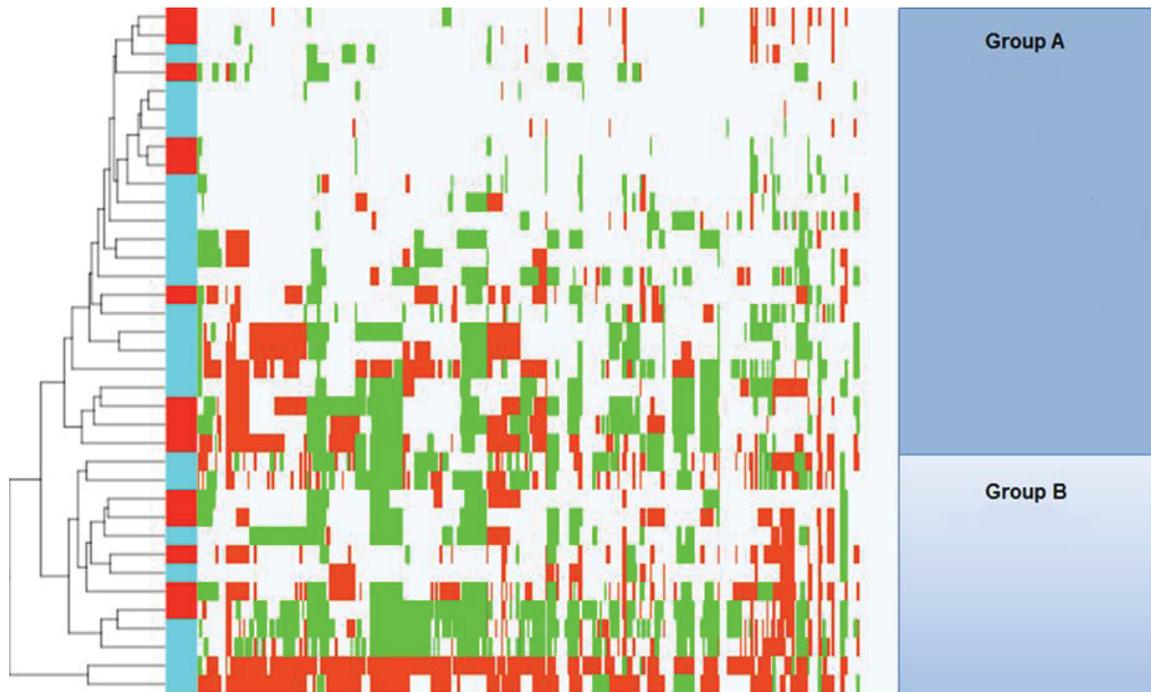


Abb. 20. Clusteranalyse der N0 und N1 Primärtumore. Die Clusteranalyse zeigt zwei verschiedene Gruppen von Primärtumoren. Die Gruppen bildeten sich unabhängig vom Lymphknotenstatus heraus. Dabei zeigten die Primärtumore der Gruppe A (Group A) ein signifikant längeres Überleben und eine höhere Differenzierung des Tumorgewebes. (Gruppe A beinhaltet zwei Patienten zweimal, da diese zweimal eine Operation erhielten. Dies wurde in der statistischen Analyse berücksichtigt). Chromosomale Zugewinne werden in Rot dargestellt, chromosomale Verluste in Grün. Die roten und blauen Kästen auf der linken Seite zeigen die unterschiedlichen Primärtumore an (N1=blau; N0=rot).

Die Tumore der Gruppe B wiesen ebenso signifikant mehr CNAs auf als die der Clustergruppe A (60,5 vs. 21,5 CNAs, $p=0,0246$, Mann Whitney U test). Zusätzlich war auch die maximale Anzahl der CNAs in der Clustergruppe B höher (161 vs. 71) als in Gruppe A (Abb. 21).

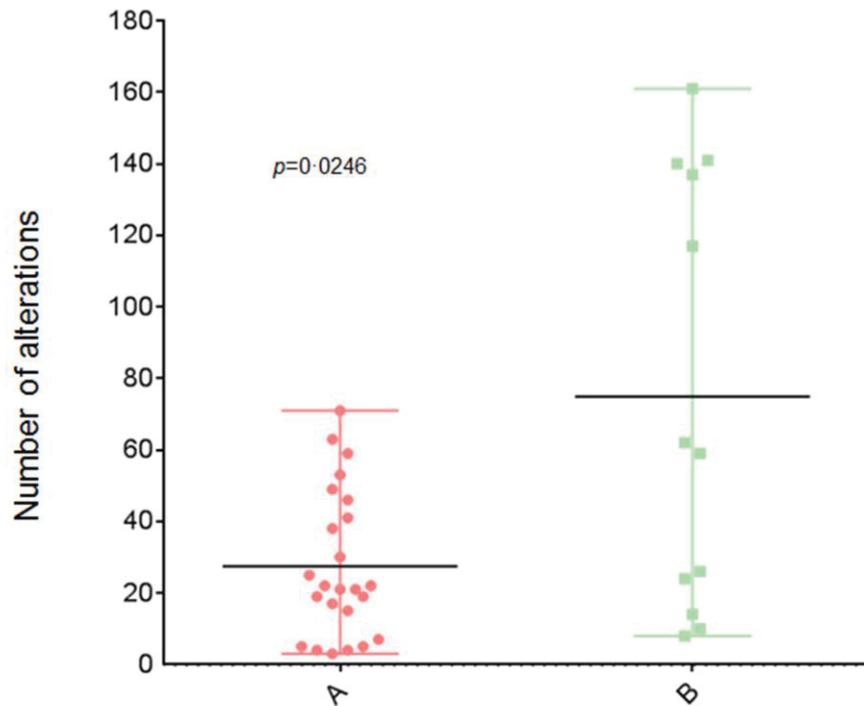


Abb. 21. CNAs der zwei Primärtumor Clustergruppen. Aufgetragen sind die CNAs („Number of alterations“) der zwei Primärtumor Clustergruppen (A und B). Angezeigt werden die durchschnittliche Anzahl an CNAs (schwarze Balken) und die maximale Anzahl an CNAs. Die einzelnen Punkte geben die einzelnen Werte, und somit die Verteilung an. Es finden sich signifikant ($p=0,0246$) mehr CNAs in Clustergruppe B.

Die Clustergruppe B zeigte zudem noch signifikant mehr neue CNAs im Vergleich zur Clustergruppe A (Tabelle 11).

Tabelle 11. Signifikante zusätzliche CNAs in Clustergruppe B.

Chromosom	CNAs	p-Wert
2p25-2p11	Verlust	0·003
2q11-2q35	Verlust	0·003
4q12-4q35	Verlust	0·013
5q11-5q35	Verlust	0·014
7q35	Verlust	0·005
9p24-9p13	Verlust	0·013
9q33-9q34	Zugewinn	<0·001
10q11-10q23	Verlust	<0·001
11p11	Zugewinn	0·003
11q12-11q13	Zugewinn	<0·001
12q13	Zugewinn	0·006
14q32	Zugewinn	0·001
15q24	Zugewinn	0·014
17q11-17q25	Zugewinn	<0·001
19p13-19p12	Zugewinn	<0·001
20q11-20q12	Zugewinn	0·001
21q11-21q21	Verlust	<0·001

Signifikante Zugewinne und Verluste der Clustergruppe B (LKM unabhängige und signifikant schlechter differenzierte Gruppe an Primärtumoren mit signifikant schlechterer Prognose).

Bei diesen zusätzlichen chromosomalen Zugewinnen und Verlusten, konnten ebenfalls zahlreiche relevante Krebs-assoziierte Gene identifiziert werden (Anhang Tabelle 3). Andere analysierte Parameter wie Lymphknotenstatus, Fernmetastasen, Rezidiv, Tumorgröße, Geschlecht, Alter und vaskuläre und perineurale Invasion wiesen keine signifikante Korrelation zu eine der beiden Gruppen auf.

Die Clusteranalyse von N1 Primärtumoren und den korrespondierenden LKM identifizierte ebenfalls zwei Gruppen, allerdings fanden sich hierbei keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Clustern. Aufgrund der großen genetischen Gemeinsamkeiten zwischen Primärtumor und LKM beim ICC, clusterten Primärtumor und korrespondierende LKM in der Mehrzahl der Fälle zusammen (Abb. 22).

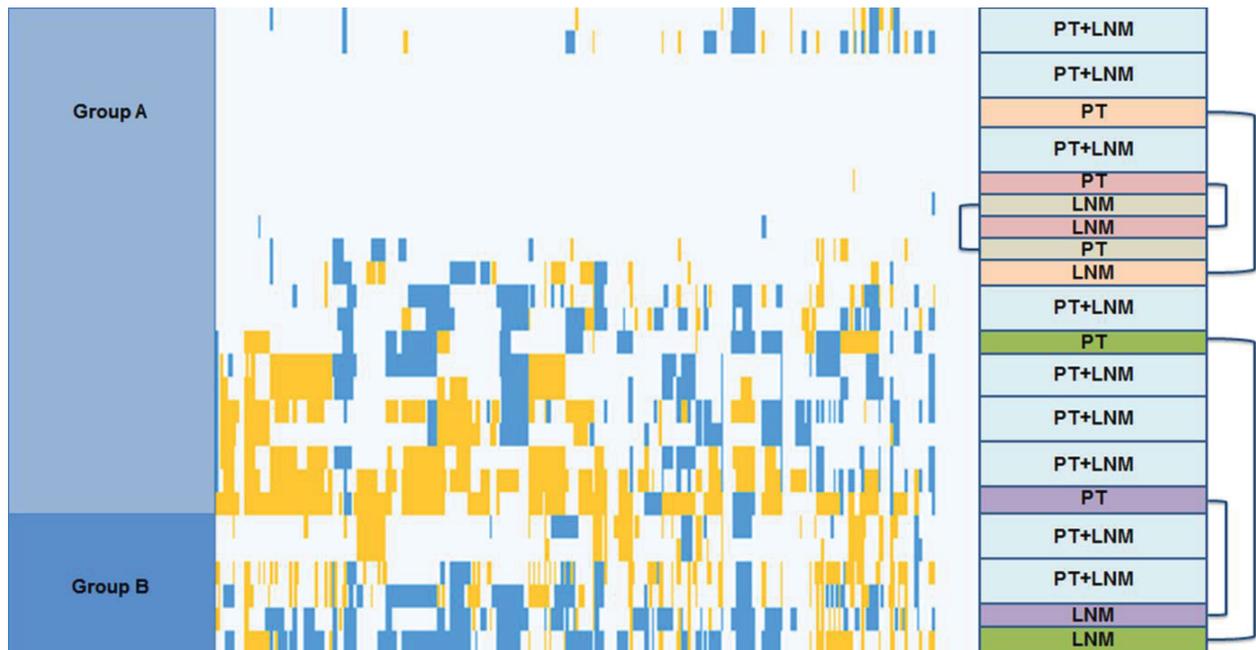


Abb. 22. Clusteranalyse der N1 Primärtumore und der korrespondierenden LKM. Die Abbildung 22 stellt die Clusteranalyse der 18 Primärtumore (PT) und den 18 korrespondierenden LKM (LKM) dar. Hier finden sich zwei Clustergruppen (A und B), jedoch fanden sich keinerlei signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Aufgrund der großen genetischen Gemeinsamkeiten der Primärtumore und LKM beim ICC, zeigte sich ein paarweises clustern der PT und LKM (Kästen auf der rechten Bildseite). Chromosomale Zugewinne werden in Gelb dargestellt, chromosomale Verluste in Blau.

3.9 Mutationsanalysen

Die Mutationsanalysen für *KRAS* (Exon 2) und *TP53* (Exon 5 und 7) bei 18 N1 Primärtumoren und 18 korrespondierenden LKM zeigte Mutationen für *TP53* in sechs Fällen (19%) und *KRAS*-Mutationen in zwei Fällen (6%). Von den sechs *TP53*-Mutationen wurden vier für Exon 7 (11%) und zwei für Exon 5 (6%) gefunden. Die *KRAS*-Mutationen betrafen Exon 2. Mutationen die im Primärtumor detektiert wurden, zeigten sich (abgesehen von einem Fall) ebenfalls in der korrespondierenden LKM. Informationen zu Mutationen in N0 Primärtumoren liegen nicht vor, da die Mutationsanalysen lediglich für N1 Primärtumore und LKM durchgeführt wurden.

3.10 Signalweg Analysen

Die KEGG-Signalweg Analyse der Gene, die auf den neuen chromosomalen Zugewinnen und Verlusten der N1 Primärtumore und auf den isolierten Zugewinnen der LKM liegen, zeigte eine signifikante Assoziation mit einigen Krebs-assoziierten

Signaltransduktionswegen. Die alterierten Genregionen der N1 Primärtumore sind in die *Wnt*-, *MAPK*-, *JAK-STAT*-, *PPAR*-, *mTOR*-, *TGF- β* -, *p53*- und *VEGF*-Signaltransduktionswege involviert. Eine *Ecm-receptor* Interaktion konnte ebenfalls gezeigt werden (Anhang Abb. 2). Die Gene die in den isolierten Zugewinnen der LKM zu finden waren, waren hauptsächlich in *chemokin*-Signaltransduktionswegen, die zelluläres Wachstum, Zellüberleben, Zellmigration und Apoptose beeinflussen, involviert (Anhang Abb. 3). Eine Übersicht aller Gene der N1 Primärtumore und LKM die in Krebs-assoziierten Signalwegen involviert sind, bietet die Tabelle 4 im Anhang. Für die Gene der zusätzlichen chromosomalen Zugewinne und Verluste der Clustergruppe B, konnte ebenfalls eine Korrelation zu wichtigen Krebs-assoziierten Signalwegen gezeigt werden (*JAK-STAT*-, *SCLC*-, *Thyroid cancer*-, *p53*-, *DNA replication*-, *MAPK*-, *Wnt*-, *TGF-beta*-, *Hedgehog*- und *Chemokin* Signalwege) (Anhang Tabelle 5).

3.11 Abgleich der potentiellen Gene auf Therapierbarkeit

Die neuen Zugewinne und Verluste der N1 Primärtumore beinhalten 1721 Gene. Diese Gene beinhalten 43 Gene die bekanntermaßen eine Rolle in Krebs-assoziierten Signalwegen spielen. Von diesen 43 Genen konnten 20 Gene beim Abgleich mit der *Therapeutic Target Database* als potentielle Ziele für eine medikamentöse Therapie identifiziert werden. Es wurden 41 Substanzen gefunden, von denen sich bereits 26 in der Phase 2, oder einer späteren Phase der Medikamententestung befinden, *Ponatinib*, *IDR-105* und *Sermorelin* sind darunter für andere Indikationen bereits zugelassene Substanzen (siehe Anhang Tabelle 6). Von den isolierten Zugewinnen der LKM wurden alle 529 Gene mit der *Therapeutic Target Database* abgeglichen. Hierbei wurden 35 Gene als potentielle Ziele identifiziert und 206 Substanzen ausfindig gemacht. Von diesen befinden sich zurzeit 132 Substanzen in der Phase 2 oder späteren Phase der Medikamententestung. *Filgrastim*, *Lestaurtinib* und *Indinavir* sind hierbei Beispiele für andere Indikationen bereits zugelassener Substanzen (siehe Anhang Tabelle 7). Unter den Genen der zusätzlichen Kopienzahlalterationen der Clustergruppe B fanden sich 180 Gene, welche bekanntermaßen eine wichtige Rolle in Krebs-assoziierten Signalwegen spielen. Von diesen Genen zeigten 14 einen Treffer als potentielles therapeutisches Ziel für 53 mögliche therapeutische Substanzen (Anhang Tabelle 8). Für Gene die auf Regionen liegen die von chromosomalen Verlusten betroffen sind, wurde nach Substanzen gesucht, die einen modulierenden oder aktivierenden Wirkmechanismus ausweisen. Für die Gene, welche auf Regionen liegen die Zugewinne aufweisen, sollte der Wirkmechanismus der potentiellen Therapeutika hingegen inhibieren, antagonisieren, modulieren oder als Antikörper arbeiten.

4 Diskussion

Das ICC ist die zweithäufigste primäre Lebermalignität mit einer weltweit steigenden Inzidenz und sehr schlechter Prognose, welche der aggressiven Tumorbiologie und der limitierten Therapieoptionen bei häufig später Diagnosestellung geschuldet ist [92]. Da zudem das Auftreten von LKM bei Patienten mit ICC mit einem schlechteren Patientenüberleben assoziiert ist, war es Ziel dieser Studie die genetischen Veränderungen anhand von CNAs der Primärtumore und ihrer korrespondierenden LKM in Abhängigkeit von klinischen und histo-pathologischen Daten zu analysieren.

Obwohl sich der Hauptteil dieser Arbeit mit der Analyse der genomischen Alterationen in Primärtumoren und ihren LKM befasst, konnten wir gleichsam einige der kürzlich publizierten Faktoren, die mit dem Auftreten von LKM bzw. einem schlechteren Überleben beim ICC assoziiert sind, in unserer eigenen Kohorte bestätigen. Während unsere Studie das typische Patientengut der westlichen Welt mit entsprechender Alters- und Geschlechtsverteilung umfasst [65], konnte beide Faktoren nicht signifikant mit dem Lymphknotenstatus oder dem Überleben korreliert werden. Interessanterweise war in unserer Kohorte das Auftreten einer Leberzirrhose signifikant mit dem negativen Lymphknotenstatus (N0) assoziiert und zeigte nicht, wie in der Literatur beschrieben eine Korrelation mit dem Auftreten von LKM [93]. Am Universitätsklinikum Düsseldorf werden Patienten mit bekannter Leberzirrhose einem engmaschigen Screening Programm unterstellt, so dass man spekulieren könnte, dass bei diesen Patienten Tumore in einem früheren Krankheitsstadium entdeckt werden als bei Patienten mit ICCs in der gesunden Leber, die leider oft erst im Spätstadium mit bereits stattgefundenener Metastasierung diagnostiziert werden [28, 41]. Die Rolle der Leberzirrhose als Risikofaktor für das ICC scheint weiterhin unklar, da die meisten Tumore in einer nicht-zirrhatischen Leber entstehen. Nichtsdestotrotz werden auch bei zirrhatischen Patienten immer wieder ICCs im Rahmen des HCC-Screenings entdeckt. Die meisten Daten basieren hier auf Zufallsbefunden, die im Rahmen der Lebertransplantation für HCC diagnostiziert wurden. Ob und warum ICCs auf dem Boden einer Leberzirrhose mit LKM-freien Tumorstadien assoziiert sein könnten muss demnach zunächst weiter in größeren Patientenkohorten untersucht werden [19, 94]. Die klinischen Daten unserer Studie zeigten ebenfalls, dass Patienten mit N1 ICCs signifikant häufiger rauchen, als Patienten die keine LKM entwickelten. Während das Rauchen selber ein anerkannter Risikofaktor für das ICC ist [22], wird die Korrelation zu einem positiven Lymphknotenstatus hier erstmals beschrieben. Für das Oropharynxkarzinom, das Kolonkarzinom und das Prostatakarzinom konnte bereits gezeigt werden, dass Rauchen das Auftreten von Lymphknoten- und Fernmetastasen signifikant erhöht [95-97]. Der genaue

pathophysiologische Zusammenhang bleibt jedoch ungeklärt und sollte weiter untersucht werden. In dieser Studie wiesen Patienten mit positivem Lymphknotenstatus zudem signifikant höhere Serumwerte (im Mittel 2160 U/ml, $p=0,028$) des Tumormarkers CA 19-9 auf, als Patienten ohne LKM (136 U/ml). Da erhöhte CA 19-9 Serumlevel mit metastasierten ICCs assoziiert sind, wurde CA 19-9 bereits als prognostischer Faktor in Kombination mit präoperativer Bildgebung vorgeschlagen [34, 37]. Dennoch bleibt die diagnostische Wertigkeit für CA 19-9 beim ICC unbestimmt, da Limitierungen bezüglich der Sensitivität und Spezifität bekannt sind und der Tumormarker somit nicht als Screeninguntersuchung eingesetzt werden kann [28, 33, 34]. Das Tumorstadium sowie die vaskuläre und perineurale Invasion wurden bereits von verschiedenen Autoren als unabhängige prognostische Faktoren für das ICC beschrieben [4]. Unsere Daten bestätigen diese Ergebnisse und zeigen ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang von vaskulärer und perineuraler Invasion sowie dem Verbleiben mikroskopische Tumorreste nach Resektion (R1) mit dem Auftreten von LKM. Patienten mit LKM hatten zudem signifikant häufiger ein fortgeschrittenes Tumorstadium (T3/4) als Patienten ohne LKM. Obwohl die N1-Tumore entsprechend größer waren als die N0-Tumore, war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant. Studien an anderen Tumorentitäten konnten keine signifikante Korrelation zwischen Tumorgröße und lymphogener Metastasierung nachweisen [98, 99]. Es bleibt unverstanden ob die N1-Tumoren einen aggressiveren Tumorsubtyp repräsentieren der zu einem vermehrten Auftreten von LKM führt oder ob es sich bei dieser Gruppe um ein fortgeschrittenes Tumorstadium handelt mit entsprechender lymphogener Metastasierung. Interessanterweise war die Anzahl der entnommenen Lymphknoten bei Patienten mit LKM signifikant höher als bei Patienten ohne Metastasen. Eine groß angelegte Metaanalyse zur Rolle der Lymphadnektomie beim ICC und HCC konnte zeigen, dass durchschnittlich 13,8 (beim ICC) und 6,4 (beim HCC) Lymphknoten entnommen wurden und in der Hälfte der Fälle LKM gefunden wurden. Eine Differenzierung bezüglich der Anzahl der entnommenen Lymphknoten zwischen N1 und N0 Tumoren wurde jedoch nicht vorgenommen, allerdings schien die prognostische Relevanz einer routinemäßigen Lymphadnektomie beim ICC (bei generell höherer Inzidenz von LKM beim ICC) zu überwiegen [100]. Zusätzlich zur lokalen lymphogenen Metastasierung zeigte sich eine deutliche, aber nicht statistisch signifikante Tendenz bei unseren Patienten, dass Patienten mit LKM auch mehr Fernmetastasen entwickeln. Dies lässt sich ggf. durch die deutlich häufiger auftretende vaskuläre Invasion bei diesem Tumorstadium erklären. Die Überlebenszeitanalysen unserer Kohorte zeigten ein signifikant schlechteres Überleben für Patienten mit LKM ($p=0,049$), einem R1-Status und schlechter Tumordifferenzierung ($p<0,001$) auf. Diese signifikanten Prognosefaktoren wurden für das ICC bereits vielfach beschrieben [4, 44, 60, 61]. Der Einfluss der Tumorgröße auf das Überleben beim ICC bleibt letztendlich unklar [101, 102], obwohl eine große multi-

institutionelle Studie mit hoher Patientenzahl bereits zeigen konnte, dass die Tumorgröße keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben beim ICC hat [4]. In unserer Kohorte beeinflusste die Tumorgröße das Überleben ebenfalls nicht signifikant, jedoch zeigte sich ein deutlicher Trend für ein schlechteres Überleben der Patienten mit größeren Tumoren ($p=0,061$).

Die Ergebnisse der Array CGH Analyse aller Primärtumore und LKM zusammengenommen zeigten mehr chromosomale Verluste als Zugewinne auf. Dabei wurden die in der Literatur bereits beschriebenen chromosomalen Alterationen bestätigt [94]. Interessanterweise wurden in dieser Kohorte häufige (>30%) Zugewinne auf Chromosom 19q identifiziert, welche zuvor nicht für das ICC beschrieben wurden. 19q beinhaltet Gene, welche in Krebs-assoziierte Signalwegen wie dem MAPK-Signalweg involviert sind [90]. Eine mendelsche randomisierte Metaanalyse konnte zeigen, dass zirkulierendes TGF- β 1, ein Homodimer, welches in der Lage ist Zellproliferation und Zelldifferenzierung zu beeinflussen und auf Chromosom 19q lokalisiert ist, mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung des hepatozellulären Karzinoms, jedoch bisher nicht mit der Entstehung des ICCs, assoziiert ist [103]. Dennoch sollten diese Ergebnisse vorsichtig interpretiert werden und eine zukünftige Validierung mit anderen Methoden erfolgen, da Chromosom 19 in aCGH Analysen generell eine hohe Anfälligkeit für Artefaktbildungen aufweist [104, 105].

Die Anzahl der Kopienzahlalterationen war in den N1 Primärtumoren deutlich höher im Vergleich zu den Primärtumoren ohne LKM. Weiterhin zeigte der Vergleich der beiden array CGH Profile eindeutige genetische Unterschiede zwischen den Primärtumoren mit und denen ohne LKM (neue Zugewinne auf den Chromosomen 3p, 4q, 5p und 13q und neue Verluste auf 17p und 20p der N1 Primärtumore). Dieses erstmals beschriebene, einzigartige genetische Profil der N1 Primärtumore beim ICC, beinhaltet dabei Gene, welche in wichtige Signalwege für Tumorprogression und Metastasierung involviert sind. Diese spielen eine wichtige Rolle im MAPK-, Wnt-, JAK-STAT-, PPAR-, TGF- β -, p53- VEGF- und mTOR-Signalweg und repräsentieren möglicherweise chromosomale Alterationen die ursächlich für die Tumorprogression und die Entwicklung von LKM sind [90]. Zugewinne auf den Chromosomen 3p und 4q werden in der Literatur selten beschrieben, da Verluste auf diesen Allelen häufiger vorkommen [106-108] und für das ICC bereits beschrieben sind [94]. Die N1 Primärtumore dieser Kohorte zeigten jedoch vor allem signifikante neue Zugewinne auf 3p und 4q im Vergleich zu N0. Bereits publizierte genetische Analysen des ICCs, welche hauptsächlich Verluste auf 3p und 4q aufzeigen, wurden immer an allen Primärtumoren durchgeführt, ohne dass eine Differenzierung zwischen N0 und N1 vorgenommen wurde [94]. Hier liegt ein möglicher Erklärungsansatz für das zunächst widersprüchlich erscheinende Ergebnis. Auch in unserer Kohorte finden sich zunächst Verluste auf 3p und 4q, wenn alle ICC Proben (N0 und N1 Primärtumore und LKM) zusammen analysiert werden

(Abb. 16). Erst bei der Differenzierung zwischen N0 und N1 Tumoren zeigten sich die zusätzlichen Zugewinne auf 3p und 4q bei den N1 Primärtumoren, möglicherweise eine für die lymphogene Metastasierung wichtige Veränderung. Amplifikationen auf 5p wurden für das ICC ebenfalls bereits beschrieben [66, 109], so wie auch für das Bronchial-, Kolon-, Pankreas- und Urothelkarzinom [110-113]. Auf dem kurzen Arm von Chromosom 5 liegen einige vielversprechende, für die zielgerichtete Krebstherapie in Frage kommende, Gene. *Leukemia Inhibitory Factor Receptor Alpha (LIFR)* und *Growth Hormone Receptor (GHR)* sind beide in den JAK-STAT-Signalweg involviert und im Fokus einer intensiven Krebsforschung [90]. Der *LIFR*-Inhibitor 17-Inhibitor HO-3867 konnte das Tumorwachstum beim Osteosarkom signifikant reduzieren und weist somit auf die mögliche Onkogenfunktion dieses Gens mit potentieller Therapierbarkeit hin [114]. Für das Cholangiokarzinom konnte eine erhöhte Expression von *LIFR* in CCC-Zellkulturlinien gezeigt werden. Dabei führte eine experimentelle Überexpression von *LIFR* zwar nicht direkt zu einer vermehrten Proliferation und Invasion, jedoch bedingte die gesteigerte Expression eine erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapie. Wurde *LIFR* in der Zelllinie hingegen herunterreguliert, kam es zu einer vermehrten Apoptoserate durch die Chemotherapie [115]. Entsprechend dieser Ergebnisse könnte der *LIFR*-Inhibitor Emfilermin möglicherweise das Ansprechen des ICC auf Chemotherapie erhöhen. Randomisierte klinische Studien, die einen solchen Ansatz unterstützen, fehlen allerdings bislang [91]. Ein weiteres alteriertes und möglicherweise für die Metastasierung wichtiges Gen auf 5p ist *GHR*. Es wird vermutet, dass eine vermehrte *GHR* Expression beim Mammakarzinom eine aggressive Tumorbilogie bedingt und Prozesse der Metastasierung aktiviert [116]. Für das ICC liegen derzeit noch keine Daten vor, so dass die biologische Bedeutung einer Überexpression unklar bleibt. Zugewinne auf Chromosom 13q wurden bereits für das ICC, sowie auch für das Ösophaguskarzinom, Harnblasenkarzinom, Gliom und Glioblastom beschrieben [66, 117-120]. In dieser alterierten Region liegen wichtige Gene wie z.B. der *Transcription Factor Dp-1 (DP1)* der für eine entscheidende Rolle in der Zellzyklus Progression durch Kooperation mit dem *RAS* Onkogen, welches ebenfalls auf Chromosom 1p13 lokalisiert ist, bekannt ist [121]. *Fms Related Tyrosine Kinase 1 (FTL1)* ist ein weiteres potentiell Onkogen welches Metastasierung induzieren kann und auf Chromosom 13q12 lokalisiert ist. In Brustkrebs-Modellen wurde gezeigt, dass nach initialer Streuung der Krebszellen die metastatische Effizienz des Tumors durch eine *FTL1*-Inhibition reduziert werden konnte [122]. Interessanterweise war beim cholangiozellulären Karzinom die Expression von *FTL1* signifikant mit dem Gesamtüberleben der Patienten assoziiert [123]. Nichtsdestotrotz liegen für die Behandlung mit z.B. einem *FTL1*-Inhibitor wie VATALANIB bei Patienten mit Cholangiokarzinom derzeit noch keine Daten vor. Die chromosomale Region 17p zeigte in unserer Kohorte signifikante Verluste bei N1 Primärtumoren im Vergleich zu N0

Primärtumoren auf sowie bei 7 Patienten Mutationen des bekannten Tumor Suppressor Gens *TP53*, dessen Protein die Zellvermehrung hemmt und im Falle einer Mutation Tumorwachstum bedingt. *TP53* ist in etwa 50% aller menschlichen Tumore mutiert oder in seiner Funktion verloren gegangen. Es wurde bereits nachgewiesen, dass auch das metastatische Potential von Krebszellen durch einen Verlust von *TP53* beeinflusst werden kann [124]. Somit könnte die *TP53* Mutation auch beim ICC eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Metastasen und der Tumorprogression spielen. Die Tatsache, dass die im Primärtumor identifizierte *TP53*-Mutation auch in der korrespondierenden LKM erhalten blieb, unterstreicht die eventuelle Bedeutsamkeit für den Prozess der lymphogenen Metastasierung. Die ebenfalls veränderten Regionen 20p12 und 20p13 beherbergen weitere relevante Tumor Suppressor Gene wie *Phospholipase C Beta 1* und *4 (PLCB1, PLCB4)* und *Casein Kinase 2 Alpha 1 (CSNK2A1)*, die alle drei zuvor bereits im Zusammenhang mit fortgeschrittenen Tumorstadien und schlechtem Überleben bei Kopf-Hals-Karzinomen, schlecht differenzierten Endometriumkarzinomen und dem klarzelligem Nierenkarzinom beschrieben wurden [125-127], jedoch bis jetzt nicht beim ICC. Insgesamt zeigte sich also eine erhöhte Anzahl an CNAs in den N1 Primärtumoren, mit interessanten Zugewinnen und Verlusten von Regionen, deren alterierte Gene möglicherweise zum Tumorprogress und somit auch zur lymphogenen Metastasierung beitragen.

Interessanterweise zeigte der direkte Paarvergleich von Primärtumoren und der korrespondierenden LKM eine große Ähnlichkeit bezüglich der chromosomalen Zugewinne und Verluste und auch in der Anzahl der CNAs. Nichtsdestotrotz gab es in den LKM noch einige einzigartige isolierte Zugewinne auf Chromosom 12q14 (36% der LKM) und auf den Chromosomen 1p13, 2p23, 7p22, 7q11, 11q12, 13q13 und 14q12 (über 20% der LKM). Der spezifische isolierte Zugewinn auf Chromosom 12q14 der in 36% aller LKM vorkommt beinhaltet einige interessante Gene wie die NF- κ B aktivierende *TANK Binding Kinase 1 (TBK1)*, der Transkriptionsfaktor *High Mobility Group AT-Hook 2 (HMGA2)* und weitere Gene die Proteine wie *MDM2 Proto-Oncogene (MDM2)*, *Glucosamine (N-Acetyl)-6-Sulfatase (GNS)* und *Cullin Associated And Neddylation Dissociated 1 (CAND1)* codieren. *CAND1* spielt eine wesentliche Rolle für die chromosomale Stabilität und wurde kürzlich erst beim Prostatakarzinom beschrieben und als wesentlicher Promotor für das Tumorwachstum identifiziert [128, 129]. Erste Therapieansätze die auf *TBK1* zielen, führten im Osteosarkom und oralen Plattenepithelkarzinom bereits erfolgreich zu einer geringeren tumoralen Aktivität [130, 131], welche im ICC jedoch bisher nicht nachgewiesen werden konnte. *MDM2* Amplifikationen wurden zuvor bereits beim Liposarkom beschrieben [132, 133] und es ist bekannt, dass *MDM2* ein spezifischer *p53*-Inhibitor ist und somit eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese spielen kann [134]. Der Transkriptionsfaktor *HMGA2* repräsentiert beim Magenkarzinom einen maligneren Phänotyp und eine zielgerichtete Therapie gegen *HMGA2*

verminderte beim hepatozellulärem Karzinom die Tumorpheriferation und Invasion [135, 136]. Zusätzlich wird *HMGA2* von Jun et. al. und Sun et. al. als entscheidender Faktor für Metastasierung und frühe Lokalrezidive beim Magenkarzinom und Mammakarzinom gesehen [136, 137]. In einem Modell für das Zungenkarzinom führte die Abschaltung von *HMGA2* zu einer geringeren Zellinvasion und Migration [138] und im Versuch an Zelllinien vom Prostatakarzinom und Harnblasenkarzinom führte eine Herunterregulation von *HMGA2* ebenfalls zu einer geringeren Zellinvasion und Proliferation [139, 140]. Diese für die LKM einzigartigen Zugewinne könnten somit möglicherweise ein schlechtes Therapieansprechen einer Systemtherapie erklären. Die weitere Analyse dieser Alterationen scheint insbesondere in Anbetracht einer zielgerichteten Krebstherapie essenziell, da 30% der Patienten mit ICC bei Diagnosestellung LKM aufweisen [4].

Bei allen hier zitierten Studien wurden die genetischen Analysen ausschließlich an Primärtumoren durchgeführt, Analysen der LKM fehlen bislang vollständig. Trotz der identifizierten Alterationen bleibt die Relevanz der Einzelnen ungeklärt. In zukünftigen Studien sollte untersucht werden ob einzelne Gene für den Prozess der Metastasierung identifiziert werden können, oder ob vielmehr eine Reihe an molekulare Alterationen notwendig ist, damit Metastasierung stattfinden kann. Diese zentralen Fragen sollen auch in Anbetracht der Tatsache, dass Metastasierung die Haupttodesursache der Krebs-assoziierten Sterblichkeit darstellt analysiert werden [141].

Die Clusteranalyse identifizierte eine Gruppe von Tumoren mit signifikant mehr CNAs, schlechter Tumordifferenzierung und einem signifikant schlechterem Gesamtüberleben. Während das Vorliegen von LKM generell einen negativen Prognosefaktor darstellt, war der Lymphknotenstatus nicht mit dieser von uns identifizierten Clustergruppen assoziiert. Die Primärtumore dieses Clusters beherbergten zusätzliche chromosomale Zugewinne (9q, 11p, 11q, 12q, 14q, 15q, 17q, 19p und 20q) und Verluste (2p, 2q, 4q, 5q, 7p, 9p, 10q und 21q). Die chromosomalen Alterationen in 7p, 9p und 17q wurden für das ICC bereits beschrieben, eine signifikante Korrelation zu einer Tumorsubgruppe wurde bislang jedoch nicht gezeigt. Allerdings konnten Sia et. al. bereits zuvor zwei molekulare Gruppen des ICCs, die Proliferations- und Inflammationsgruppe, beschreiben. Dabei war die Proliferationsgruppe ebenfalls durch schlechtes Überleben, eine geringe Tumordifferenzierung und zusätzlich durch häufige Lokalrezidive charakterisiert [65]. Möglicherweise deutet die höhere Anzahl an CNAs in der Clustergruppe B auf eine größere chromosomale Instabilität hin. Dies beschreibt jedoch viel mehr ein Gruppenphänomen als ein individuelles Charakteristikum des einzelnen Tumors, weswegen eine Interpretation dieses Ergebnisses schwierig ist. Möglicherweise ist dies ein Erklärungsansatz für ein schlechtes Therapieansprechen bei ICCs mit sehr individuellen CNA Profilen. Die genetischen Veränderungen unserer Clustergruppe B, sind möglicherweise verantwortlich für eine schlechtere Tumordifferenzierung und ein

schlechteres Gesamtüberleben. So beinhalten die CNAs der Clustergruppe B einige Krebs-assoziierte Gene, die bereits von anderen Arbeitsgruppen untersucht wurden. In Zellkulturstudien konnte für das hiläre Cholangiokarzinom nachgewiesen werden, dass eine Stummschaltung von *C-X-C Motif Chemokine Receptor 4 (CXCR4)* die Proliferation von Tumorzellen und die neurale Invasion gehemmt wird [142]. Für das ICC konnte für *Toll Like Receptor 2 (TLR2)* nachgewiesen werden, dass durch *TLR2* die Zellmigration und Zellinvasion durch Modulation des NF- κ B Signalwegs gefördert wird [143]. *Interleukin-8 (IL8)* ist ein prognostischer Marker beim PCC, da eine Überexpression von *IL8* mit einem schlechteren TNM Stadium und frühen Tumorrezidiven assoziiert ist [144]. Weiterhin konnte beim ICC für den *C-X-C Motif Chemokine Ligand 5 (CXCL5)* gezeigt werden, dass auch hier eine Überexpression mit einem vermehrten Tumorwachstum und Metastasierung durch die Rekrutierung intratumoraler neutrophiler Granulozyten einhergeht [145]. Der Transkriptionsfaktor *FOS Like 1 (FOSL1)* wurde beim Cholangiokarzinom identifiziert eine wichtige Rolle in der Tumorgenese zu spielen [146]. Die *Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2 (ErbB2)* wurde bereits in die molekulare Pathogenese des ICC implementiert, da *ErbB2* die Tumorprogression beim ICC vorantreibt [147]. Die Gene, welche in der Tumorsubklasse mit schlechterem Überleben alteriert waren, zeigten zudem eine Aktivierung in Krebs-assoziierten Signaltransduktionswegen. Hier fand sich eine Aktivierung in JAK-STAT-, SCLC-, Thyroid cancer-, p53-, DNA replication-, MAPK-, Wnt-, TGF-beta-, Hedgehog- und Chemokin Signaltransduktionswegen. Auch wenn diese Ergebnisse zunächst validiert werden müssen, ist es zumindest denkbar, dass diese neu-identifizierte molekulare Klasse des ICC einen zusätzlichen Weg darstellen könnte Patienten mit ICC und einer schlechten Prognose zu identifizieren. In einer weiteren Clusternalyse bei der alle Proben gemeinsam analysiert wurden, clusterten die meisten N1 Primärtumore in der Nähe ihrer korrespondierenden LKM. Dies unterstreicht die große genetische Ähnlichkeit zwischen Primärtumor und LKM, die in der aCGH Analyse gezeigt werden konnte.

In dieser Studie konnten insgesamt 35 Gene in LKM identifiziert werden, die auf chromosomalen Zugewinnen oder Verlusten liegen und als mögliche therapeutische Ziele für 206 potentielle Therapeutika fungieren könnten. Auch für die Gene der einzigartigen chromosomalen Zugewinne und Verluste der N1 Primärtumore fanden sich 43 Gene die bekanntermaßen eine Rolle in Krebs-assoziierten Signalwegen spielen. Von diesen konnten 20 Gene als potentielle therapeutische Ziele identifiziert werden. Auch für die Gene in den CNAs der Tumore der Clustergruppe B ließen sich potentielle therapeutische Zielstrukturen identifizieren. Die einzige sich bereits in präklinischer Testung befindliche Substanz ist der *ErbB2*-Inhibitor Lapatinib, der *in vitro* zu einer Inhibition von Zellwachstum und einer Induktion von Apoptose führte [148]. Keine der anderen identifizierten Substanzen befanden sich zum Zeitpunkt der Arbeit in der Testung für das ICC. Möglicherweise könnten solche

zielgerichtete medikamentöse Therapien beim ICC also eine vielversprechende Therapieoption darstellen und sollten dringend in präklinischen Modellen untersucht werden. Therapeutische Ansätze der Zukunft könnten demnach sowohl auf die spezifischen Alterationen der N1 Primärtumore als auch auf die potentiellen Onkogene und Tumorsuppressorgene der isolierten Zugewinne der LKM zielen.

In dieser Studie wurden erstmals ICC Primärtumore und ihre zugehörigen LKM genetisch analysiert. Dieser Ansatz zeigte mit Hilfe der hochauflösenden komparativen genomischen Hybridisierung eindeutige Unterschiede zwischen N1 und N0 Primärtumoren mit einzigartigen Alterationen der Tumore die LKM entwickeln. Eine große Übereinstimmung zeigt sich hingegen zwischen den N1 Primärtumoren und den korrespondierenden LKM im besonders aussagekräftigen Paarvergleich, mit einigen isolierten Zugewinnen auf der Seite der LKM. Die identifizierten CNAs beinhalten potentielle Onkogene und Tumorsuppressorgene die möglicherweise ursächlich für den Prozess der Metastasierung und der Tumorprogression zu einem aggressiveren Tumortyp beim ICC sind. Diese Onkogene und Tumorsuppressorgene sind zudem möglicherweise hoffnungsvolle Zielstrukturen für eine zielgerichtete Krebstherapie. Zusätzlich ließ sich mittels Clusteranalyse eine vom Lymphknotenstatus unabhängige Tumorsubgruppe mit signifikant schlechterem Überleben identifizieren, assoziiert auch mit einer schlechteren Tumordifferenzierung. Wichtige klinische und histopathologische Charakteristika konnten zudem die mit einem positivem Lymphknotenstatus und schlechterem Überleben assoziiert werden und können zu einer besseren Prognoseeinschätzung bei ICC Patienten beitragen.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Jansen R, Moehlendick B, Bartenhagen C, Toth C, Lehwald N, Stoecklein NH, et al. ACGH detects distinct genomic alterations of primary intrahepatic cholangiocarcinomas and matched lymph node metastases and identifies a poor prognosis subclass. *Sci Rep.* 2018;8(1):10637. doi: 10.1038/s41598-018-28941-6. PubMed PMID: 30006612; PubMed Central PMCID: PMC6045619.
2. Blechacz BR, Gores GJ. Cholangiocarcinoma. *Clinics in liver disease.* 2008;12(1):131-50, ix. doi: 10.1016/j.cld.2007.11.003. PubMed PMID: 18242501.
3. DeOliveira ML, Cunningham SC, Cameron JL, Kamangar F, Winter JM, Lillemoe KD, et al. Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. *Annals of surgery.* 2007;245(5):755-62. doi: 10.1097/01.sla.0000251366.62632.d3. PubMed PMID: 17457168; PubMed Central PMCID: PMC1877058.
4. de Jong MC, Nathan H, Sotiropoulos GC, Paul A, Alexandrescu S, Marques H, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: an international multi-institutional analysis of prognostic factors and lymph node assessment. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2011;29(23):3140-5. doi: 10.1200/JCO.2011.35.6519. PubMed PMID: 21730269.
5. Vauthey JN, Blumgart LH. Recent advances in the management of cholangiocarcinomas. *Seminars in liver disease.* 1994;14(2):109-14. doi: 10.1055/s-2007-1007302. PubMed PMID: 8047893.
6. Blechacz B, Komuta M, Roskams T, Gores GJ. Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology.* 2011;8(9):512-22. doi: 10.1038/nrgastro.2011.131. PubMed PMID: 21808282; PubMed Central PMCID: PMC3331791.
7. Rizvi S, Gores GJ. Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma. *Gastroenterology.* 2013;145(6):1215-29. doi: 10.1053/j.gastro.2013.10.013. PubMed PMID: 24140396.
8. Razumilava N, Gores GJ. Classification, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013;11(1):13-21 e1; quiz e3-4. doi: 10.1016/j.cgh.2012.09.009. PubMed PMID: 22982100; PubMed Central PMCID: PMC3596004.
9. Yang JD, Kim B, Sanderson SO, Sauver JS, Yawn BP, Larson JJ, et al. Biliary tract cancers in Olmsted County, Minnesota, 1976-2008. *Am J Gastroenterol.* 2012;107(8):1256-62. doi: 10.1038/ajg.2012.173. PubMed PMID: 22751468; PubMed Central PMCID: PMC3654834.
10. Khan SA, Emadossadaty S, Ladep NG, Thomas HC, Elliott P, Taylor-Robinson SD, et al. Rising trends in cholangiocarcinoma: is the ICD classification system misleading us? *Journal of hepatology.* 2012;56(4):848-54. doi: 10.1016/j.jhep.2011.11.015. PubMed PMID: 22173164.
11. Institut RK. <krebs_in_deutschland_2009_2010.pdf>. Robert Koch Institut. 2009.
12. Shaib Y, El-Serag HB. The epidemiology of cholangiocarcinoma. *Seminars in liver disease.* 2004;24(2):115-25. doi: 10.1055/s-2004-828889. PubMed PMID: 15192785.
13. Khan SA, Toledano MB, Taylor-Robinson SD. Epidemiology, risk factors, and pathogenesis of cholangiocarcinoma. *HPB (Oxford).* 2008;10(2):77-82. doi: 10.1080/13651820801992641. PubMed PMID: 18773060; PubMed Central PMCID: PMC2504381.
14. Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD. Cholangiocarcinoma. *The Lancet.* 2005;366(9493):1303-14. doi: 10.1016/s0140-6736(05)67530-7.
15. Lutz H, Trautwein C, Tischendorf JW. Primary sclerosing cholangitis: diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 2013;110(51-52):867-74. doi: 10.3238/arztebl.2013.0867. PubMed PMID: 24529302; PubMed Central PMCID: PMC3928533.
16. Gatto M, Bragazzi MC, Semeraro R, Napoli C, Gentile R, Torrice A, et al. Cholangiocarcinoma: update and future perspectives. *Dig Liver Dis.* 2010;42(4):253-60. doi: 10.1016/j.dld.2009.12.008. PubMed PMID: 20097142.

17. Shaib YH, El-Serag HB, Davila JA, Morgan R, McGlynn KA. Risk factors of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: A case-control study. *Gastroenterology*. 2005;128(3):620-6. doi: 10.1053/j.gastro.2004.12.048.
18. Ye XH, Huai JP, Ding J, Chen YP, Sun XC. Smoking, alcohol consumption, and the risk of extrahepatic cholangiocarcinoma: a meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2013;19(46):8780-8. doi: 10.3748/wjg.v19.i46.8780. PubMed PMID: 24379600; PubMed Central PMCID: PMC3870528.
19. Welzel TM, Graubard BI, El-Serag HB, Shaib YH, Hsing AW, Davila JA, et al. Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a population-based case-control study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5(10):1221-8. doi: 10.1016/j.cgh.2007.05.020. PubMed PMID: 17689296; PubMed Central PMCID: PMC2083573.
20. Bergquist A, Ekblom A, Olsson R, Kornfeldt D, Loof L, Danielsson A, et al. Hepatic and extrahepatic malignancies in primary sclerosing cholangitis. *Journal of hepatology*. 2002;36(3):321-7. PubMed PMID: 11867174.
21. Welzel TM, Mellekjær L, Gloria G, Sakoda LC, Hsing AW, El Ghormli L, et al. Risk factors for intrahepatic cholangiocarcinoma in a low-risk population: a nationwide case-control study. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2007;120(3):638-41. doi: 10.1002/ijc.22283. PubMed PMID: 17109384.
22. Palmer WC, Patel T. Are common factors involved in the pathogenesis of primary liver cancers? A meta-analysis of risk factors for intrahepatic cholangiocarcinoma. *Journal of hepatology*. 2012;57(1):69-76. doi: 10.1016/j.jhep.2012.02.022. PubMed PMID: 22420979; PubMed Central PMCID: PMC3804834.
23. Welzel TM, Graubard BI, Zeuzem S, El-Serag HB, Davila JA, McGlynn KA. Metabolic syndrome increases the risk of primary liver cancer in the United States: a study in the SEER-Medicare database. *Hepatology*. 2011;54(2):463-71. doi: 10.1002/hep.24397. PubMed PMID: 21538440.
24. Khan SA, Davidson BR, Goldin RD, Heaton N, Karani J, Pereira SP, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update. *Gut*. 2012;61(12):1657-69. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301748. PubMed PMID: 22895392.
25. Lindor KD, Kowdley KV, Harrison ME, American College of G. ACG Clinical Guideline: Primary Sclerosing Cholangitis. *Am J Gastroenterol*. 2015;110(5):646-59; quiz 60. doi: 10.1038/ajg.2015.112. PubMed PMID: 25869391.
26. Ezoë Y, Muto M, Uedo N, Doyama H, Yao K, Oda I, et al. Magnifying narrowband imaging is more accurate than conventional white-light imaging in diagnosis of gastric mucosal cancer. *Gastroenterology*. 2011;141(6):2017-25 e3. doi: 10.1053/j.gastro.2011.08.007. PubMed PMID: 21856268.
27. Bruix J, Sherman M, American Association for the Study of Liver D. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*. 2011;53(3):1020-2. doi: 10.1002/hep.24199. PubMed PMID: 21374666; PubMed Central PMCID: PMC3084991.
28. Gores GJ. Early detection and treatment of cholangiocarcinoma. *Liver Transpl*. 2000;6(6 Suppl 2):S30-4. doi: 10.1053/jlts.2000.18688. PubMed PMID: 11084082.
29. Ruys AT, van Beem BE, Engelbrecht MR, Bipat S, Stoker J, Van Gulik TM. Radiological staging in patients with hilar cholangiocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Br J Radiol*. 2012;85(1017):1255-62. doi: 10.1259/bjr/88405305. PubMed PMID: 22919007; PubMed Central PMCID: PMC3487057.
30. Vilgrain V. Staging cholangiocarcinoma by imaging studies. *HPB (Oxford)*. 2008;10(2):106-9. doi: 10.1080/13651820801992617. PubMed PMID: 18773065; PubMed Central PMCID: PMC2504386.
31. Choi SB, Kim KS, Choi JY, Park SW, Choi JS, Lee WJ, et al. The prognosis and survival outcome of intrahepatic cholangiocarcinoma following surgical resection: association of lymph node metastasis and lymph node dissection with survival. *Annals of surgical oncology*. 2009;16(11):3048-56. doi: 10.1245/s10434-009-0631-1. PubMed PMID: 19626372.
32. Patel CBaT. Cholangiocarcinoma: New insights into disease pathogenesis and biology. *Infect Dis Clin North Am*. 2010. doi: 10.1016/j.idc.2010.07.006.

33. Charatcharoenwitthaya P, Enders FB, Halling KC, Lindor KD. Utility of serum tumor markers, imaging, and biliary cytology for detecting cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Hepatology*. 2008;48(4):1106-17. doi: 10.1002/hep.22441. PubMed PMID: 18785620.
34. Patel AH, Harnois DM, Klee GG, LaRusso NF, Gores GJ. The utility of CA 19-9 in the diagnoses of cholangiocarcinoma in patients without primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol*. 2000;95(1):204-7. doi: 10.1111/j.1572-0241.2000.01685.x. PubMed PMID: 10638584.
35. Kawai S, Suzuki K, Nishio K, Ishida Y, Okada R, Goto Y, et al. Smoking and serum CA19-9 levels according to Lewis and secretor genotypes. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2008;123(12):2880-4. doi: 10.1002/ijc.23907. PubMed PMID: 18803289.
36. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology*. 2010;17(6):1471-4. doi: 10.1245/s10434-010-0985-4. PubMed PMID: 20180029.
37. Deoliveira ML, Schulick RD, Nimura Y, Rosen C, Gores G, Neuhaus P, et al. New staging system and a registry for perihilar cholangiocarcinoma. *Hepatology*. 2011;53(4):1363-71. doi: 10.1002/hep.24227. PubMed PMID: 21480336.
38. Sempoux C, Jibara G, Ward SC, Fan C, Qin L, Roayaie S, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: new insights in pathology. *Seminars in liver disease*. 2011;31(1):49-60. doi: 10.1055/s-0031-1272839. PubMed PMID: 21344350.
39. Navaneethan U, Njei B, Venkatesh PG, Vargo JJ, Parsi MA. Fluorescence in situ hybridization for diagnosis of cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis: a systematic review and meta-analysis. *Gastrointest Endosc*. 2014;79(6):943-50 e3. doi: 10.1016/j.gie.2013.11.001. PubMed PMID: 24360654.
40. Vasilieva LE, Papadimitriou SI, Dourakis SP. Modern diagnostic approaches to cholangiocarcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2012;11(4):349-59. PubMed PMID: 22893461.
41. Blechacz B, Gores GJ. Cholangiocarcinoma: advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Hepatology*. 2008;48(1):308-21. doi: 10.1002/hep.22310. PubMed PMID: 18536057; PubMed Central PMCID: PMC2547491.
42. Khan SA, Davidson BR, Goldin R, Pereira SP, Rosenberg WM, Taylor-Robinson SD, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: consensus document. *Gut*. 2002;51 Suppl 6:VI1-9. PubMed PMID: 12376491; PubMed Central PMCID: PMC1867742.
43. Bagante F, Gani F, Spolverato G, Xu L, Alexandrescu S, Marques HP, et al. Intrahepatic Cholangiocarcinoma: Prognosis of Patients Who Did Not Undergo Lymphadenectomy. *J Am Coll Surg*. 2015;221(6):1031-40 e1-4. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2015.09.012. PubMed PMID: 26474514.
44. Nuzzo G, Giuliante F, Ardito F, De Rose AM, Vellone M, Clemente G, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: prognostic factors after liver resection. *Updates Surg*. 2010;62(1):11-9. doi: 10.1007/s13304-010-0007-x. PubMed PMID: 20845096.
45. Yi B, Xu AM, Lai EC, Qu ZQ, Cheng QB, Liu C, et al. Preoperative portal vein embolization for hilar cholangiocarcinoma--a comparative study. *Hepatogastroenterology*. 2010;57(104):1341-6. PubMed PMID: 21443082.
46. Palavecino M, Abdalla EK, Madoff DC, Vauthey JN. Portal vein embolization in hilar cholangiocarcinoma. *Surg Oncol Clin N Am*. 2009;18(2):257-67, viii. doi: 10.1016/j.soc.2008.12.007. PubMed PMID: 19306811.
47. Schnitzbauer AA, Lang SA, Goessmann H, Nadalin S, Baumgart J, Farkas SA, et al. Right portal vein ligation combined with in situ splitting induces rapid left lateral liver lobe hypertrophy enabling 2-staged extended right hepatic resection in small-for-size settings. *Annals of surgery*. 2012;255(3):405-14. doi: 10.1097/SLA.0b013e31824856f5. PubMed PMID: 22330038.
48. Sapisochin G, Rodriguez de Lope C, Gastaca M, Ortiz de Urbina J, Suarez MA, Santoyo J, et al. "Very early" intrahepatic cholangiocarcinoma in cirrhotic patients: should liver transplantation be reconsidered in these patients? *Am J Transplant*. 2014;14(3):660-7. doi: 10.1111/ajt.12591. PubMed PMID: 24410861.
49. Radtke A, Konigsrainer A. Surgical Therapy of Cholangiocarcinoma. *Visc Med*. 2016;32(6):422-6. doi: 10.1159/000452921. PubMed PMID: 28229077; PubMed Central PMCID: PMC5290435.

50. Hashimoto K, Miller CM. Liver transplantation for intrahepatic cholangiocarcinoma. *Journal of hepato-biliary-pancreatic sciences*. 2015;22(2):138-43. doi: 10.1002/jhbp.159. PubMed PMID: 25214036.
51. Hoffmann RT, Paprottka PM, Schon A, Bamberg F, Haug A, Durr EM, et al. Transarterial hepatic yttrium-90 radioembolization in patients with unresectable intrahepatic cholangiocarcinoma: factors associated with prolonged survival. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2012;35(1):105-16. doi: 10.1007/s00270-011-0142-x. PubMed PMID: 21431970.
52. Wu ZF, Zhang HB, Yang N, Zhao WC, Fu Y, Yang GS. Postoperative adjuvant transcatheter arterial chemoembolisation improves survival of intrahepatic cholangiocarcinoma patients with poor prognostic factors: results of a large monocentric series. *Eur J Surg Oncol*. 2012;38(7):602-10. doi: 10.1016/j.ejso.2012.02.185. PubMed PMID: 22417704.
53. Horgan AM, Amir E, Walter T, Knox JJ. Adjuvant therapy in the treatment of biliary tract cancer: a systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(16):1934-40. doi: 10.1200/JCO.2011.40.5381. PubMed PMID: 22529261.
54. Kim YS, Oh SY, Go SI, Kang JH, Park I, Song HN, et al. The role of adjuvant therapy after R0 resection for patients with intrahepatic and perihilar cholangiocarcinomas. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016. doi: 10.1007/s00280-016-3206-4. PubMed PMID: 27928598.
55. Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthoney A, Maraveyas A, et al. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N Engl J Med*. 2010;362(14):1273-81. doi: 10.1056/NEJMoa0908721. PubMed PMID: 20375404.
56. Pollom EL, Alagappan M, Park LS, Whittmore AS, Koong AC, Chang DT. Does radiotherapy still have a role in unresected biliary tract cancer? *Cancer Med*. 2016. doi: 10.1002/cam4.975. PubMed PMID: 27891822.
57. Everhart JE, Ruhl CE. Burden of digestive diseases in the United States Part III: Liver, biliary tract, and pancreas. *Gastroenterology*. 2009;136(4):1134-44. doi: 10.1053/j.gastro.2009.02.038. PubMed PMID: 19245868.
58. Tyson GL, El-Serag HB. Risk factors for cholangiocarcinoma. *Hepatology*. 2011;54(1):173-84. doi: 10.1002/hep.24351. PubMed PMID: 21488076; PubMed Central PMCID: PMC3125451.
59. Patel T. Increasing incidence and mortality of primary intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *Hepatology*. 2001;33(6):1353-7. doi: 10.1053/jhep.2001.25087. PubMed PMID: 11391522.
60. Ramacciato G, Nigri G, Bellagamba R, Petrucciani N, Ravaioli M, Cescon M, et al. Univariate and multivariate analysis of prognostic factors in the surgical treatment of hilar cholangiocarcinoma. *Am Surg*. 2010;76(11):1260-8. PubMed PMID: 21140696.
61. Shaib YH, Davila JA, Henderson L, McGlynn KA, El-Serag HB. Endoscopic and surgical therapy for intrahepatic cholangiocarcinoma in the united states: a population-based study. *J Clin Gastroenterol*. 2007;41(10):911-7. doi: 10.1097/MCG.0b013e31802f3132. PubMed PMID: 18090160.
62. Berthiaume EP, Wands J. The molecular pathogenesis of cholangiocarcinoma. *Seminars in liver disease*. 2004;24(2):127-37. doi: 10.1055/s-2004-828890. PubMed PMID: 15192786.
63. Roskams T. Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncogene*. 2006;25(27):3818-22. doi: 10.1038/sj.onc.1209558. PubMed PMID: 16799623.
64. Lee JS, Heo J, Libbrecht L, Chu IS, Kaposi-Novak P, Calvisi DF, et al. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nature medicine*. 2006;12(4):410-6. doi: 10.1038/nm1377. PubMed PMID: 16532004.
65. Sia D, Hoshida Y, Villanueva A, Roayaie S, Ferrer J, Tabak B, et al. Integrative molecular analysis of intrahepatic cholangiocarcinoma reveals 2 classes that have different outcomes. *Gastroenterology*. 2013;144(4):829-40. doi: 10.1053/j.gastro.2013.01.001. PubMed PMID: 23295441; PubMed Central PMCID: PMC3624083.
66. Koo SH, Ihm CH, Kwon KC, Park JW, Kim JM, Kong G. Genetic alterations in hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2001;130(1):22-8. PubMed PMID: 11672769.

67. Uhm KO, Park YN, Lee JY, Yoon DS, Park SH. Chromosomal imbalances in Korean intrahepatic cholangiocarcinoma by comparative genomic hybridization. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2005;157(1):37-41. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2004.05.007. PubMed PMID: 15676145.
68. Dalmaso C, Carpentier W, Guettier C, Camilleri-Broet S, Borelli WV, Campos Dos Santos CR, et al. Patterns of chromosomal copy-number alterations in intrahepatic cholangiocarcinoma. *BMC cancer*. 2015;15:126. doi: 10.1186/s12885-015-1111-6. PubMed PMID: 25879652; PubMed Central PMCID: PMC4373066.
69. Arnold A, Bahra M, Lenze D, Bradtmoller M, Guse K, Gehlhaar C, et al. Genome wide DNA copy number analysis in cholangiocarcinoma using high resolution molecular inversion probe single nucleotide polymorphism assay. *Exp Mol Pathol*. 2015;99(2):344-53. doi: 10.1016/j.yexmp.2015.08.003. PubMed PMID: 26260902.
70. Gu MJ, Jang BI. Clinicopathologic Significance of Sox2, CD44 and CD44v6 Expression in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Pathology oncology research : POR*. 2014. doi: 10.1007/s12253-014-9745-2. PubMed PMID: 24482053.
71. Aishima S, Mano Y, Tanaka Y, Kubo Y, Shirabe K, Maehara Y, et al. Different roles of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in carcinogenesis and metastasis of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Human pathology*. 2013;44(6):1031-7. doi: 10.1016/j.humpath.2012.09.004. PubMed PMID: 23260331.
72. Yang XW, Li L, Hou GJ, Yan XZ, Xu QG, Chen L, et al. STAT3 overexpression promotes metastasis in intrahepatic cholangiocarcinoma and correlates negatively with surgical outcome. *Oncotarget*. 2017;8(5):7710-21. doi: 10.18632/oncotarget.13846. PubMed PMID: 28032598.
73. Guo Q, Jian Z, Jia B, Chang L. CXCL7 promotes proliferation and invasion of cholangiocarcinoma cells. *Oncol Rep*. 2017;37(2):1114-22. doi: 10.3892/or.2016.5312. PubMed PMID: 27959418.
74. Diep CB, Kleivi K, Ribeiro FR, Teixeira MR, Lindgjaerde OC, Lothe RA. The order of genetic events associated with colorectal cancer progression inferred from meta-analysis of copy number changes. *Genes, chromosomes & cancer*. 2006;45(1):31-41. doi: 10.1002/gcc.20261. PubMed PMID: 16145679.
75. Cardoso J, Boer J, Morreau H, Fodde R. Expression and genomic profiling of colorectal cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1775(1):103-37. doi: 10.1016/j.bbcan.2006.08.004. PubMed PMID: 17010523.
76. Costa JL, Meijer G, Ylstra B, Caldas C. Array comparative genomic hybridization copy number profiling: a new tool for translational research in solid malignancies. *Semin Radiat Oncol*. 2008;18(2):98-104. doi: 10.1016/j.semradonc.2007.10.005. PubMed PMID: 18314064.
77. Pinkel D, Albertson DG. Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. *Nature genetics*. 2005;37 Suppl:S11-7. doi: 10.1038/ng1569. PubMed PMID: 15920524.
78. Idris SF, Ahmad SS, Scott MA, Vassiliou GS, Hadfield J. The role of high-throughput technologies in clinical cancer genomics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2013;13(2):167-81. doi: 10.1586/erm.13.1. PubMed PMID: 23477557.
79. Lee SY, Haq F, Kim D, Jun C, Jo HJ, Ahn SM, et al. Comparative genomic analysis of primary and synchronous metastatic colorectal cancers. *PloS one*. 2014;9(3):e90459. doi: 10.1371/journal.pone.0090459. PubMed PMID: 24599305; PubMed Central PMCID: PMC3944022.
80. Campbell PJ, Yachida S, Mudie LJ, Stephens PJ, Pleasance ED, Stebbings LA, et al. The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature*. 2010;467(7319):1109-13. doi: 10.1038/nature09460. PubMed PMID: 20981101; PubMed Central PMCID: PMC3137369.
81. Turajlic S, Furney SJ, Lambros MB, Mitsopoulos C, Kozarewa I, Geyer FC, et al. Whole genome sequencing of matched primary and metastatic acral melanomas. *Genome Res*. 2012;22(2):196-207. doi: 10.1101/gr.125591.111. PubMed PMID: 22183965; PubMed Central PMCID: PMC3266028.
82. Chen T-C, Jan Y-Y, Yeh T-S. K-ras Mutation is Strongly Associated with Perineural Invasion and Represents an Independent Prognostic Factor of Intrahepatic Cholangiocarcinoma after Hepatectomy. *Annals of surgical oncology*. 2012;19(S3):675-81. doi: 10.1245/s10434-012-2224-7.

83. Tannapfel A, Weinans L, Geissler F, Schutz A, Katalinic A, Kockerling F, et al. Mutations of p53 tumor suppressor gene, apoptosis, and proliferation in intrahepatic cholangiocellular carcinoma of the liver. *Digestive diseases and sciences*. 2000;45(2):317-24. PubMed PMID: 10711445.
84. Tannapfel A, Sommerer F, Benicke M, Katalinic A, Uhlmann D, Witzigmann H, et al. Mutations of the BRAF gene in cholangiocarcinoma but not in hepatocellular carcinoma. *Gut*. 2003;52(5):706-12. PubMed PMID: 12692057; PubMed Central PMCID: PMC1773624.
85. Leone F, Cavalloni G, Pignochino Y, Sarotto I, Ferraris R, Piacibello W, et al. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor in bile duct and gallbladder carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(6):1680-5. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1692. PubMed PMID: 16551849.
86. Kipp BR, Voss JS, Kerr SE, Barr Fritcher EG, Graham RP, Zhang L, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cholangiocarcinoma. *Human pathology*. 2012;43(10):1552-8. doi: 10.1016/j.humpath.2011.12.007. PubMed PMID: 22503487.
87. Borger DR, Tanabe KK, Fan KC, Lopez HU, Fantin VR, Straley KS, et al. Frequent mutation of isocitrate dehydrogenase (IDH)1 and IDH2 in cholangiocarcinoma identified through broad-based tumor genotyping. *The oncologist*. 2012;17(1):72-9. doi: 10.1634/theoncologist.2011-0386. PubMed PMID: 22180306; PubMed Central PMCID: PMC3267826.
88. Furubo S, Harada K, Shimonishi T, Katayanagi K, Tsui W, Nakanuma Y. Protein expression and genetic alterations of p53 and ras in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Histopathology*. 1999;35(3):230-40. PubMed PMID: 10469215.
89. Ross JS, Wang K, Gay L, Al-Rohil R, Rand JV, Jones DM, et al. New Routes to Targeted Therapy of Intrahepatic Cholangiocarcinomas Revealed by Next-Generation Sequencing. *The oncologist*. 2014. doi: 10.1634/theoncologist.2013-0352. PubMed PMID: 24563076.
90. Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(Web Server issue):W741-8. doi: 10.1093/nar/gki475. PubMed PMID: 15980575; PubMed Central PMCID: PMCPMC1160236.
91. Yang H, Qin C, Li YH, Tao L, Zhou J, Yu CY, et al. Therapeutic target database update 2016: enriched resource for bench to clinical drug target and targeted pathway information. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D1069-74. doi: 10.1093/nar/gkv1230. PubMed PMID: 26578601; PubMed Central PMCID: PMC4702870.
92. Bartella I, Dufour JF. Clinical Diagnosis and Staging of Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *J Gastrointest Liver Dis*. 2015;24(4):481-9. doi: 10.15403/jgld.2014.1121.244.chl. PubMed PMID: 26697575.
93. Li YY, Li H, Lv P, Liu G, Li XR, Tian BN, et al. Prognostic value of cirrhosis for intrahepatic cholangiocarcinoma after surgical treatment. *J Gastrointest Surg*. 2011;15(4):608-13. doi: 10.1007/s11605-011-1419-8. PubMed PMID: 21246412.
94. Sia D, Tovar V, Moeini A, Llovet JM. Intrahepatic cholangiocarcinoma: pathogenesis and rationale for molecular therapies. *Oncogene*. 2013;32(41):4861-70. doi: 10.1038/onc.2012.617. PubMed PMID: 23318457; PubMed Central PMCID: PMC3718868.
95. Moreira DM, Aronson WJ, Terris MK, Kane CJ, Amling CL, Cooperberg MR, et al. Cigarette smoking is associated with an increased risk of biochemical disease recurrence, metastasis, castration-resistant prostate cancer, and mortality after radical prostatectomy: results from the SEARCH database. *Cancer*. 2014;120(2):197-204. doi: 10.1002/cncr.28423. PubMed PMID: 24127391; PubMed Central PMCID: PMCPMC4149056.
96. Amri R, Bordeianou LG, Sylla P, Berger DL. Does active smoking induce hematogenous metastatic spread in colon cancer? *Am J Surg*. 2015;210(5):930-2. doi: 10.1016/j.amjsurg.2015.03.034. PubMed PMID: 26251219.
97. McBride SM, Ali NN, Margalit DN, Chan AW. Active tobacco smoking and distant metastasis in patients with oropharyngeal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012;84(1):183-8. doi: 10.1016/j.ijrobp.2011.11.044. PubMed PMID: 22330993.
98. Xie Y, Liu YW, Wang MY, Wang WZ, Liu HF, Li XY, et al. Risk Factors of Lymphnode Metastasis in Patients with Thyroid
Papillary Carcinoma Associated with Graves Disease. *Zhongguo Yi Xue*

- Ke Xue Yuan Xue Bao. 2016;38(5):554-8. doi: 10.3881/j.issn.1000-503X.2016.05.011. PubMed PMID: 27825413.
99. Ashturkar AV, Pathak GS, Deshmukh SD, Pandave HT. Factors predicting the axillary lymph node metastasis in breast cancer: is axillary node clearance indicated in every breast cancer patient?: factors predicting the axillary lymphnode metastases in breast cancer. *Indian J Surg.* 2011;73(5):331-5. doi: 10.1007/s12262-011-0315-5. PubMed PMID: 23024536; PubMed Central PMCID: PMC3208716.
100. Amini N, Ejaz A, Spolverato G, Maithel SK, Kim Y, Pawlik TM. Management of lymph nodes during resection of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma: a systematic review. *J Gastrointest Surg.* 2014;18(12):2136-48. doi: 10.1007/s11605-014-2667-1. PubMed PMID: 25300798.
101. Nathan H, Aloia TA, Vauthey JN, Abdalla EK, Zhu AX, Schulick RD, et al. A proposed staging system for intrahepatic cholangiocarcinoma. *Annals of surgical oncology.* 2009;16(1):14-22. doi: 10.1245/s10434-008-0180-z. PubMed PMID: 18987916.
102. Nathan H, Mentha G, Marques HP, Capussotti L, Majno P, Aldrighetti L, et al. Comparative performances of staging systems for early hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford).* 2009;11(5):382-90. doi: 10.1111/j.1477-2574.2009.00070.x. PubMed PMID: 19768142; PubMed Central PMCID: PMC32742607.
103. Lu WQ, Qiu JL, Huang ZL, Liu HY. Enhanced circulating transforming growth factor beta 1 is causally associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma: a mendelian randomization meta-analysis. *Oncotarget.* 2016. doi: 10.18632/oncotarget.13218. PubMed PMID: 27835897.
104. Lestou VS, Lomax BL, Barrett IJ, Kalousek DK. Screening of human placentas for chromosomal mosaicism using comparative genomic hybridization. *Teratology.* 1999;59(5):325-30. doi: 10.1002/(SICI)1096-9926(199905)59:5<325::AID-TERA3>3.0.CO;2-N. PubMed PMID: 10332958.
105. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, et al. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes, chromosomes & cancer.* 1994;10(4):231-43. PubMed PMID: 7522536.
106. Chen J, Fu L, Zhang LY, Kwong DL, Yan L, Guan XY. Tumor suppressor genes on frequently deleted chromosome 3p in nasopharyngeal carcinoma. *Chin J Cancer.* 2012;31(5):215-22. doi: 10.5732/cjc.011.10364. PubMed PMID: 22360856; PubMed Central PMCID: PMC3777521.
107. Whang-Peng J. 3p deletion and small cell lung carcinoma. *Mayo Clin Proc.* 1989;64(2):256-60. PubMed PMID: 2537919.
108. Zhang HK, Wang HY, Xia JC. [Cytogenetic and molecular genetic alterations on chromosome 4q in human hepatocellular carcinoma]. *Ai Zheng.* 2008;27(9):998-1005. PubMed PMID: 18799044.
109. Shiraishi K, Kusano N, Okita S, Oga A, Okita K, Sasaki K. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization in biliary tract cancers. *Oncology.* 1999;57(1):42-9. doi: 11999. PubMed PMID: 10394124.
110. Savelieva E, Belair CD, Newton MA, DeVries S, Gray JW, Waldman F, et al. 20q gain associates with immortalization: 20q13.2 amplification correlates with genome instability in human papillomavirus 16 E7 transformed human uroepithelial cells. *Oncogene.* 1997;14(5):551-60. doi: 10.1038/sj.onc.1200868. PubMed PMID: 9053853.
111. Fukushige S, Waldman FM, Kimura M, Abe T, Furukawa T, Sunamura M, et al. Frequent gain of copy number on the long arm of chromosome 20 in human pancreatic adenocarcinoma. *Genes, chromosomes & cancer.* 1997;19(3):161-9. PubMed PMID: 9218997.
112. Koo SH, Kwon KC, Ihm CH, Jeon YM, Park JW, Sul CK. Detection of genetic alterations in bladder tumors by comparative genomic hybridization and cytogenetic analysis. *Cancer genetics and cytogenetics.* 1999;110(2):87-93. PubMed PMID: 10214355.
113. Voorter C, Joos S, Bringuier PP, Vallinga M, Poddighe P, Schalken J, et al. Detection of chromosomal imbalances in transitional cell carcinoma of the bladder by comparative genomic hybridization. *The American journal of pathology.* 1995;146(6):1341-54. PubMed PMID: 7778674; PubMed Central PMCID: PMC1870895.

114. Liu B, Lu Y, Li J, Liu Y, Liu J, Wang W. Leukemia inhibitory factor promotes tumor growth and metastasis in human osteosarcoma via activating STAT3. *APMIS*. 2015;123(10):837-46. doi: 10.1111/apm.12427. PubMed PMID: 26271643.
115. Morton SD, Cadamuro M, Brivio S, Vismara M, Stecca T, Massani M, et al. Leukemia inhibitory factor protects cholangiocarcinoma cells from drug-induced apoptosis via a PI3K/AKT-dependent Mcl-1 activation. *Oncotarget*. 2015;6(28):26052-64. doi: 10.18632/oncotarget.4482. PubMed PMID: 26296968; PubMed Central PMCID: PMC4694885.
116. Stajduhar E, Sedick M, Lenicek T, Radulovic P, Kerenji A, Kruslin B, et al. Expression of growth hormone receptor, plakoglobin and NEDD9 protein in association with tumour progression and metastasis in human breast cancer. *Tumour Biol*. 2014;35(7):6425-34. doi: 10.1007/s13277-014-1827-y. PubMed PMID: 24676793.
117. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Citro G, Sauter G, DeVries S, Kerschmann R, et al. Identification of gains and losses of DNA sequences in primary bladder cancer by comparative genomic hybridization. *Genes, chromosomes & cancer*. 1995;12(3):213-9. PubMed PMID: 7536461.
118. Shinomiya T, Mori T, Ariyama Y, Sakabe T, Fukuda Y, Murakami Y, et al. Comparative genomic hybridization of squamous cell carcinoma of the esophagus: the possible involvement of the DPI gene in the 13q34 amplicon. *Genes, chromosomes & cancer*. 1999;24(4):337-44. PubMed PMID: 10092132.
119. Weber RG, Sabel M, Reifemberger J, Sommer C, Oberstrass J, Reifemberger G, et al. Characterization of genomic alterations associated with glioma progression by comparative genomic hybridization. *Oncogene*. 1996;13(5):983-94. PubMed PMID: 8806688.
120. Rijken AM, Hu J, Perlman EJ, Morsberger LA, Long P, Kern SE, et al. Genomic alterations in distal bile duct carcinoma by comparative genomic hybridization and karyotype analysis. *Genes, chromosomes & cancer*. 1999;26(3):185-91. PubMed PMID: 10502315.
121. Jooss K, Lam EW, Bybee A, Girling R, Muller R, La Thangue NB. Proto-oncogenic properties of the DP family of proteins. *Oncogene*. 1995;10(8):1529-36. PubMed PMID: 7731707.
122. Qian BZ, Zhang H, Li J, He T, Yeo EJ, Soong DY, et al. FLT1 signaling in metastasis-associated macrophages activates an inflammatory signature that promotes breast cancer metastasis. *J Exp Med*. 2015;212(9):1433-48. doi: 10.1084/jem.20141555. PubMed PMID: 26261265; PubMed Central PMCID: PMC4548055.
123. Hoffmann AC, Goekkurt E, Danenberg PV, Lehmann S, Ehninger G, Aust DE, et al. EGFR, FLT1 and heparanase as markers identifying patients at risk of short survival in cholangiocarcinoma. *PLoS one*. 2013;8(5):e64186. doi: 10.1371/journal.pone.0064186. PubMed PMID: 23704979; PubMed Central PMCID: PMC3660514.
124. Powell E, Piwnica-Worms D, Piwnica-Worms H. Contribution of p53 to metastasis. *Cancer Discov*. 2014;4(4):405-14. doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0136. PubMed PMID: 24658082; PubMed Central PMCID: PMC4063123.
125. Rabjerg M, Bjerregaard H, Halekoh U, Jensen BL, Walter S, Marcussen N. Molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma identifies CSNK2A1, SPP1 and DEFB1 as promising novel prognostic markers. *APMIS*. 2016;124(5):372-83. doi: 10.1111/apm.12519. PubMed PMID: 26876164.
126. Orchel J, Witek L, Kimsa M, Strzalka-Mrozik B, Kimsa M, Olejek A, et al. Expression patterns of kinin-dependent genes in endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2012;22(6):937-44. doi: 10.1097/IGC.0b013e318259d8da. PubMed PMID: 22706224.
127. Guerrero-Preston R, Michailidi C, Marchionni L, Pickering CR, Frederick MJ, Myers JN, et al. Key tumor suppressor genes inactivated by "greater promoter" methylation and somatic mutations in head and neck cancer. *Epigenetics*. 2014;9(7):1031-46. doi: 10.4161/epi.29025. PubMed PMID: 24786473; PubMed Central PMCID: PMC4143405.
128. Korzeniewski N, Hohenfellner M, Duensing S. CAND1 promotes PLK4-mediated centriole overduplication and is frequently disrupted in prostate cancer. *Neoplasia*. 2012;14(9):799-806. PubMed PMID: 23019411; PubMed Central PMCID: PMC3459275.

129. Murata T, Takayama K, Katayama S, Urano T, Horie-Inoue K, Ikeda K, et al. miR-148a is an androgen-responsive microRNA that promotes LNCaP prostate cell growth by repressing its target CAND1 expression. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2010;13(4):356-61. doi: 10.1038/pcan.2010.32. PubMed PMID: 20820187.
130. Liu S, Feng P. MiR-203 Determines Poor Outcome and Suppresses Tumor Growth by Targeting TBK1 in Osteosarcoma. *Cell Physiol Biochem.* 2015;37(5):1956-66. doi: 10.1159/000438556. PubMed PMID: 26584294.
131. Bai LY, Chiu CF, Kapuriya NP, Shieh TM, Tsai YC, Wu CY, et al. BX795, a TBK1 inhibitor, exhibits antitumor activity in human oral squamous cell carcinoma through apoptosis induction and mitotic phase arrest. *Eur J Pharmacol.* 2015. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.11.032. PubMed PMID: 26607461.
132. Coindre JM, Pedeutour F, Aurias A. Well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas. *Virchows Arch.* 2010;456(2):167-79. doi: 10.1007/s00428-009-0815-x. PubMed PMID: 19688222.
133. Hameed M. Pathology and genetics of adipocytic tumors. *Cytogenet Genome Res.* 2007;118(2-4):138-47. doi: 10.1159/000108294. PubMed PMID: 18000364.
134. Toledo F, Wahl GM. MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anticancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(7-8):1476-82. doi: 10.1016/j.biocel.2007.03.022. PubMed PMID: 17499002; PubMed Central PMCID: PMC2043116.
135. Liu Y, Liang H, Jiang X. miR-1297 promotes apoptosis and inhibits the proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells by targeting HMGA2. *Int J Mol Med.* 2015;36(5):1345-52. doi: 10.3892/ijmm.2015.2341. PubMed PMID: 26398017.
136. Jun KH, Jung JH, Choi HJ, Shin EY, Chin HM. HMGA1/HMGA2 protein expression and prognostic implications in gastric cancer. *Int J Surg.* 2015;24(Pt A):39-44. doi: 10.1016/j.ijsu.2015.10.031. PubMed PMID: 26537313.
137. Sun M, Gomes S, Chen P, Frankenberger CA, Sankarasharma D, Chung CH, et al. RKIP and HMGA2 regulate breast tumor survival and metastasis through lysyl oxidase and syndecan-2. *Oncogene.* 2014;33(27):3528-37. doi: 10.1038/onc.2013.328. PubMed PMID: 23975428; PubMed Central PMCID: PMC4096871.
138. Zhao XP, Zhang H, Jiao JY, Tang DX, Wu YL, Pan CB. Overexpression of HMGA2 promotes tongue cancer metastasis through EMT pathway. *J Transl Med.* 2016;14(1):26. doi: 10.1186/s12967-016-0777-0. PubMed PMID: 26818837; PubMed Central PMCID: PMC4730598.
139. Cai J, Shen G, Liu S, Meng Q. Downregulation of HMGA2 inhibits cellular proliferation and invasion, improves cellular apoptosis in prostate cancer. *Tumour Biol.* 2015. doi: 10.1007/s13277-015-3853-9. PubMed PMID: 26242267.
140. Shi Z, Li X, Wu D, Tang R, Chen R, Xue S, et al. Silencing of HMGA2 suppresses cellular proliferation, migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer. *Tumour Biol.* 2015. doi: 10.1007/s13277-015-4625-2. PubMed PMID: 26684800.
141. Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer research.* 2010;70(14):5649-69. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1040. PubMed PMID: 20610625; PubMed Central PMCID: PMC4037932.
142. Tan XY, Chang S, Liu W, Tang HH. Silencing of CXCR4 inhibits tumor cell proliferation and neural invasion in human hilar cholangiocarcinoma. *Gut Liver.* 2014;8(2):196-204. doi: 10.5009/gnl.2014.8.2.196. PubMed PMID: 24672662; PubMed Central PMCID: PMC403964271.
143. Liu B, Yan S, Jia Y, Ma J, Wu S, Xu Y, et al. TLR2 promotes human intrahepatic cholangiocarcinoma cell migration and invasion by modulating NF-kappaB pathway-mediated inflammatory responses. *The FEBS journal.* 2016;283(20):3839-50. doi: 10.1111/febs.13894. PubMed PMID: 27616304.
144. Sun Q, Li F, Sun F, Niu J. Interleukin-8 is a prognostic indicator in human hilar cholangiocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(7):8376-84. PubMed PMID: 26339407; PubMed Central PMCID: PMC4555735.
145. Zhou SL, Dai Z, Zhou ZJ, Chen Q, Wang Z, Xiao YS, et al. CXCL5 contributes to tumor metastasis and recurrence of intrahepatic cholangiocarcinoma by recruiting infiltrative intratumoral

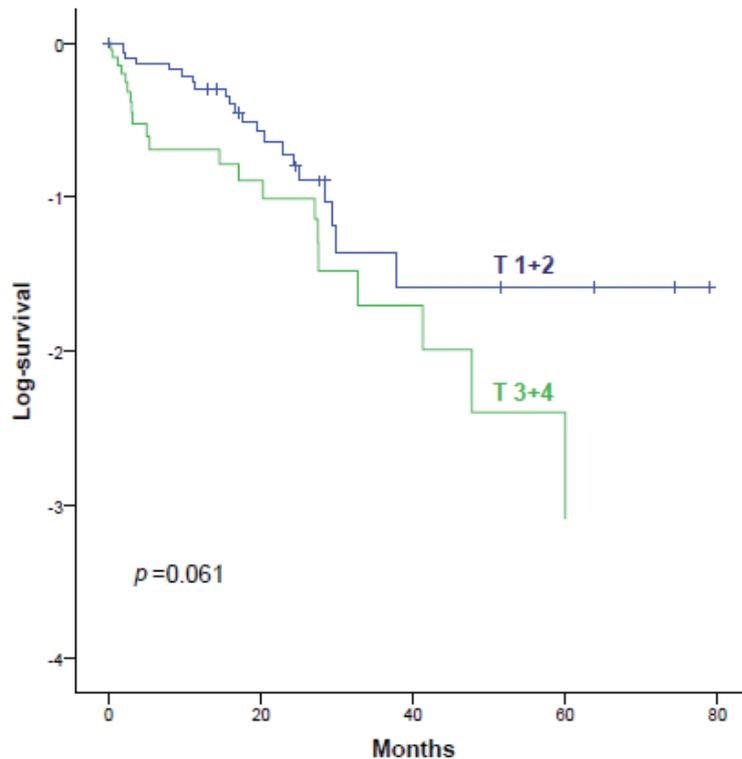
neutrophils. *Carcinogenesis*. 2014;35(3):597-605. doi: 10.1093/carcin/bgt397. PubMed PMID: 24293410.

146. Yang L, Feng S, Yang Y. Identification of transcription factors (TFs) and targets involved in the cholangiocarcinoma (CCA) by integrated analysis. *Cancer Gene Ther*. 2016;23(12):439-45. doi: 10.1038/cgt.2016.64. PubMed PMID: 27857060.

147. Sirica AE. Role of ErbB family receptor tyrosine kinases in intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2008;14(46):7033-58. PubMed PMID: 19084911; PubMed Central PMCID: PMC2776834.

148. Zhang Z, Oyesanya RA, Campbell DJ, Almenara JA, Dewitt JL, Sirica AE. Preclinical assessment of simultaneous targeting of epidermal growth factor receptor (ErbB1) and ErbB2 as a strategy for cholangiocarcinoma therapy. *Hepatology*. 2010;52(3):975-86. doi: 10.1002/hep.23773. PubMed PMID: 20607690.

6 Anhang



Anhang Abb. 1. Tumorgröße beeinflusst die Sterblichkeit beim ICC. Die Kaplan-Meier Analyse zeigt ein schlechteres Überleben für Patienten mit einem großen Primärtumor (T3+T4) verglichen mit einer kleineren Tumorgröße (T1+T2). Dieses Ergebnis war nicht signifikant, jedoch konnte ein Trend gezeigt werden ($p=0,061$).

Anhang Abb. 2. Aktivierung in Krebs-assoziierten Signaltransduktionswegen der Gene der N1 CNAs. (siehe PDF Dokument im digitalen Anhang).

Anhang Abb. 3. Aktivierung in Krebs-assoziierten Signaltransduktionswegen der Gene der isolierten CNAs der LKM. (siehe PDF Dokument im digitalen Anhang).

Anhang Tabelle 1. Gene der signifikanten Zugewinne und Verluste der N1 Primärtumore im Vergleich der N0 Primärtumore.

Zugewinne				Verluste	
3p	4q	5p	13q	17p	20p
CHL1	DCUN1D4	PLEKHG4 B	DKFZp686A16 27	CRK	CSNK2A1
VHL	LRRC66	RICTOR	FGF9	FGF11	PLCB1
PPARG	SGCB	PRKAA1	FLT3	TP53	PLCB4
RAF1	SPATA18	PRLR	BRCA2	MAP2K4	SOX12
WNT7A	USP46	IL7R	CCNA1	MAPK7	TRIB3
RARB	RASL11B	LIFR	FOXO1	MAP2K3	TBC1D20

TGFBR2	SCFD2	OSMR	RB1	RPH3AL	ANGPT4
MLH1	FIP1L1	GHR	FGF14	C17orf97	RSPO4
CTNNB1	LNX1	CCDC127	COL4A1	VPS53	PSMF1
LAMB2	CHIC2	PDCD6	COL4A2	FAM57A	C20orf46
RHOA	GSX2	AHRR	TUBA3C	GLOD4	RAD21L1
RASSF1	PDGFRA	EXOC3	LOC100101938	NXN	SNPH
WNT5A	KIT	ZDHHC11	TPTE2	ABR	SDCBP2
APPL1	KDR	BRD9	MPHOSPH8	TUSC5	FKBP1A
MITF	SRD5A3	NKD2	PSPC1	YWHAE	NSFL1C
CNTN6	TMEM165	SLC12A7	ZMYM5	MYO1C	SIRPD
CNTN4	CLOCK	SLC6A18	ZMYM2	INPP5K	SIRPB1
IL5RA	PDCL2	TERT	GJA3	PITPNA	SIRPG
CRBN	NMU	CLPTM1L	GJB2	SLC43A2	SIRPA
LRRN1	LOC644145	SLC6A3	GJB6	SCARF1	PDYN
SETMAR	EXOC1	LPCAT1	CRYL1	RILP	STK35
SUMF1	CEP135	SDHAP3	IFT88	PRPF8	TGM3
ITPR1	KIAA1211	MRPL36	IL17D	C17orf91	TGM6
EGO	AASDH	IRX4	N6AMT2	SERPINF2	SNRPB
ARL8B	PPAT	C5orf38	XPO4	SERPINF1	ZNF343
GRM7	PAICS	LOC340094	LATS2	SMYD4	TMC2
LMCD1	SRP72	ADAMTS16	SAP18	RPA1	NOP56
LOH3CR2A	HOPX	KIAA0947	C13orf3	RTN4RL1	EBF4
C3orf32	SPINK2	NSUN2	MRP63	DPH1	CPXM1
CAV3	REST	SRD5A1	ZDHHC20	SMG6	C20orf141
RAD18	C4orf14	POLS	EFHA1	SRR	FAM113A
SRGAP3	POLR2B	ADCY2	SGCG	TSR1	VPS16
THUMPD3	IGFBP7	MTRR	SACS	SGSM2	PTPRA
SETD5	LPHN3	SEMA5A	TNFRSF19	MNT	GNRH2
LHFPL4	SRD5A2L2	LOC285692	MIPEP	METT10D	MRPS26
MTMR14	EPHA5	CMBL	SPATA13	PAFAH1B1	OXT
ARPC4	CENPC1	MARCH6	PARP4	KIAA0664	AVP
CRELD1	STAP1	ROPN1L	RNF17	GARNL4	UBOX5
TMEM111	UBA6	DAP	CENPJ	OR1D2	FASTKD5
FANCD2	GNRHR	CTNND2	LOC646405	OR1G1	DDRKG1
C3orf24	TMPRSS11D	DNAH5	FAM123A	OR3A1	ITPA
C3orf10	TMPRSS11A	TRIO	MTMR6	OR1E2	SLC4A11
IRAK2	TMPRSS11F	FAM105A	NUPL1	SPATA22	C20orf194
TATDN2	LOC100130017	FAM105B	ATP8A2	ASPA	ATRN
C3orf42	FLJ41562	ANKH	RNF6	TRPV3	GFRA4
GHRLOS	TMPRSS11B	FBXL7	CDK8	TRPV1	ADAM33
GHRL	YTHDC1	MARCH11	WASF3	SHPK	SIGLEC1
SEC13	UGT2A3	ZNF622	GPR12	CTNS	HSPA12B
ATP2B2	UGT2B11	FAM134B	USP12	TMEM93	C20orf27
SLC6A11	UGT2B4	MYO10	RPL21P28	P2RX5	SPEF1

SLC6A1	UGT2A1	LOC285696	SNORD102	GSG2	CENPB
HRH1	UGT2A2	BASP1	RPL21	ITGAE	CDC25B
ATG7	SULT1B1	CDH18	GTF3A	C17orf85	C20orf29
VGLL4	SULT1E1	CDH12	MTIF3	CAMKK1	PANK2
C3orf31	CSN1S1	PRDM9	LNX2	P2RX1	RNF24
SYN2	CSN2	CDH10	POLR1D	ATP2A3	SMOX
TIMP4	STATH	CDH9	PDX1	ZZEF1	ADRA1D
TSEN2	HTN3	CDH6	CDX2	CYB5D2	PRNP
MKRN2	HTN1	RNASEN	PAN3	ANKFY1	PRND
TMEM40	CSN1S2B	C5orf22	FLT1	UBE2G1	PRNT
CAND2	ODAM	PDZD2	POMP	SPNS3	RASSF2
IQSEC1	C4orf7	GOLPH3	SLC46A3	SPNS2	SLC23A2
NUP210	CSN3	MTMR12	KIAA0774	MYBBP1A	C20orf30
FBLN2	C4orf35	ZFR	SLC7A1	GGT6	PCNA
LOC285375	SMR3A	SUB1	UBL3	ALOX15	CDS2
TPRXL	SMR3B	NPR3	KATNAL1	PELP1	PROKR2
CHCHD4	PROL1	C5orf23	LOC100188949	ARRB2	RP5-1022P6.2
TMEM43	MUC7	TARS	HMGB1	CXCL16	C20orf196
XPC	AMBN	ADAMTS12	USPL1	TM4SF5	CHGB
LSM3	ENAM	SLC45A2	ALOX5AP	VMO1	TRMT6
SLC6A6	IGJ	AMACR	C13orf33	PSMB6	MCM8
GRIP2	UTP3	C1QTNF3	C13orf26	PLD2	CRLS1
C3orf19	RUFY3	RAI14	HSPH1	MINK1	LRRN4
C3orf20	GRSF1	TTC23L	B3GALTL	CHRNE	FERMT1
FGD5	MOBKL1A	RAD1	RXFP2	LOC100130311	BMP2
NR2C2	DCK	BXDC2	EEF1DP3	GP1BA	HAO1
MRPS25	SLC4A4	DNAJC21	FRY	SLC25A11	TMX4
ZFYVE20	GC	AGXT2	N4BP2L1	RNF167	C20orf103
CAPN7	NPFFR2	SPEF2	N4BP2L2	PFN1	PAK7
SH3BP5	ADAMTS3	CAPSL	PDS5B	ENO3	ANKRD5
METTL6	COX18	UGT3A1	KL	SPAG7	SNAP25
EAF1	ANKRD17	UGT3A2	STARD13	CAMTA2	MKKS
COLQ	ALB	LMBRD2	RFC3	INCA1	C20orf94
HACL1	AFP	SKP2	NBEA	KIF1C	JAG1
BTD	AFM	C5orf33	MAB21L1	GPR172B	BTBD3
ANKRD28	RASSF6	RANBP3L	DCLK1	ZFP3	SPTLC3
OXNAD1	IL8	SLC1A3	SOHLH2	ZNF232	ISM1
RFTN1	CXCL6	NIPBL	C13orf38	ZNF594	TASP1
DAZL	PF4	C5orf42	SPG20	C17orf87	ESF1
PLCL2	PPBP	NUP155	RFXAP	RABEP1	C20orf7
TBC1D5	CXCL5	WDR70	SMAD9	NUP88	SEL1L2
SATB1	CXCL3	GDNF	ALG5	RPAIN	MACROD2
KCNH8	PPBPL2	EGFLAM	EXOSC8	C1QBP	FLRT3
EFHB	CXCL2	FYB	FAM48A	DHX33	KIF16B

RAB5A	MTHFD2L	C9	CSNK1A1L	DERL2	SNRPB2
KAT2B	EREG	DAB2	POSTN	MIS12	OTOR
SGOL1	BTC	PTGER4	TRPC4	NLRP1	PCSK2
ZNF385D	DKFZP564O0823	TTC33	UFM1	WSCD1	BFSP1
UBE2E2	RCHY1	RPL37	FREM2	AIP1	DSTN
UBE2E1	THAP6	CARD6	STOML3	FAM64A	RRBP1
NKIRAS1	C4orf26	C7	C13orf23	PITPNM3	BANF2
RPL15	CDKL2	HEATR7B2	LHFP	KIAA0753	C20orf72
NR1D2	G3BP2	C6	COG6	TXNDC17	OVOL2
THRB	USO1	PLCXD3	LOC646982	MED31	CSRP2BP
TOP2B	PPEF2	OXCT1	MRPS31	SLC13A5	ZNF133
NGLY1	NAAA	C5orf51	SLC25A15	XAF1	FOXA2
OXSM	SDAD1	FBXO4	SUGT1L1	FBXO39	THBD
LRRC3B	CXCL9	SEPP1	ELF1	TEKT1	CD93
NEK10	CXCL10	ZNF131	WBP4	ALOX12	NXT1
SLC4A7	CXCL11	MGC42105	KBTBD6	C17orf49	GZF1
EOMES	ART3	HMGCS1	KBTBD7	BCL6B	NAPB
CMC1	NUP54	CCL28	MTRF1	SLC16A11	CSTL1
AZI2	SCARB2	C5orf28	NARG1L	CLEC10A	CST11
ZCWPW2	FAM47E	PAIP1	C13orf15	ASGR2	CST8
RBMS3	STBD1	NNT	KIAA0564	ASGR1	LOC164380
GADL1	CCDC158	FGF10	DGKH	DLG4	CST9L
STT3B	SHROOM3	MRPS30	AKAP11	ACADVL	CST3
OSBPL10	CCNI	HCN1	TNFSF11	DVL2	CST5
GPD1L	CCNG2		C13orf30	PHF23	C20orf39
CMTM8	CXCL13		EPSTI1	GABARAP	CST7
CMTM7	CNOT6L		DNAJC15	DULLARD	C20orf3
CMTM6	MRPL1		ENOX1	C17orf81	ACSS1
DYNC1LI1	FRAS1		CCDC122	SLC2A4	VSX1
CNOT10	ANXA3		C13orf31	EIF5A	LOC284798
TRIM71	BMP2K		LOC121838	GPS2	ENTPD6
CCR4	PAQR3		SERP2	NEURL4	PYGB
GLB1	ARD1B		TSC22D1	ACAP1	ABHD12
TMPPE	GK2		NUFIP1	TNK1	GINS1
CRTAP	GDEP		KIAA1704	PLSCR3	NLP
SUSD5	ANTXR2		GTF2F2	C17orf61	NANP
FBXL2	PRDM8		TPT1	NLGN2	ZNF337
UBP1	FGF5		LOC100190939	SPEM1	
CLASP2	C4orf22		SLC25A30	C17orf74	
PDCD6IP	BMP3		COG3	TMEM102	
ARPP-21	PRKG2		FLJ32682	CHRNA1	
STAC	RASGEF1B		SPERT	ZBTB4	
DCLK3	HNRNPD		SIAH3	POLR2A	
LBA1	HNRPDL		ZC3H13	TNFSF12	

EPM2AIP1	ENOPH1		CPB2	TNFSF12- TNFSF13	
LRRFIP2	FLJ12993		LCP1	SENP3	
GOLGA4	SCD5		C13orf18	EIF4A1	
ITGA9	SEC31A		LRCH1	MPDU1	
CTDSPL	THAP9		ESD	SOX15	
VILL	LIN54		HTR2A	FXR2	
PLCD1	COPS4		SUCLA2	SAT2	
DLEC1	PLAC8		NUDT15	SHBG	
ACAA1	COQ2		MED4	ATP1B2	
MYD88	HPSE		ITM2B	WRAP53	
OXSRI	HELQ		RB1	EFNB3	
SLC22A13	MRPS18C		RCBTB2	DNAH2	
SLC22A14	FAM175A		CYSLTR2	LSMD1	
XYLB	AGPAT9		FNDC3A	CYB5D1	
ACVR2B	NKX6-1		MLNR	CHD3	
EXOGL	CDS1		CDADC1	KCNAB3	
SCN5A	WDFY3		CAB39L	TRAPPC1	
SCN10A	ARHGAP24		SETDB2	CNTROB	
SCN11A	MAPK10		PHF11	GUCY2D	
WDR48	PTPN13		RCBTB1	ALOX15B	
GORASP1	SLC10A6		ARL11	ALOX12B	
TTC21A	C4orf36		EBPL	HES7	
CSRNP1	AFF1		KPNA3	PER1	
XIRP1	KLHL8		C13orf1	VAMP2	
CX3CR1	HSD17B13		TRIM13	TMEM107	
CCR8	HSD17B11		KCNRG	C17orf59	
SLC25A38	NUDT9		DLEU2	AURKB	
RPSA	SPARCL1		DLEU1	C17orf44	
MOBP	DSPP		DLEU7	C17orf68	
MYRIP	DMP1		RNASEH2B	PFAS	
EIF1B	IBSP		GUCY1B2	SLC25A35	
ENTPD3	MEPE		FAM124A	RANGRF	
RPL14	SPP1		SERPINE3	ARHGEF15	
ZNF619	PKD2		INTS6	ODF4	
ZNF621	ABCG2		WDFY2	LOC100128288	
ULK4	PPM1K		DHRS12	KRBA2	
TRAK1	HERC6		FLJ37307	RPL26	
CCK	HERC5		CCDC70	NDEL1	
LYZL4	HERC3		ATP7B	MYH10	
SEC22C	NAP1L5		ALG11	CCDC42	
SS18L2	FAM13AOS		NEK5	SPDYE4	
NKTR	FAM13A		NEK3	MFSD6L	
ZBTB47	TIGD2		THSD1P	PIK3R6	
CCDC13	GPRIN3		THSD1	PIK3R5	
HIGD1A	SNCA		VPS36	NTN1	

CCBP2	MMRN1		CKAP2	STX8	
CYP8B1	KIAA1680		LOC220115	WDR16	
LOC729085	TMSL3		SUGT1	USP43	
C3orf39	GRID2		LECT1	DHRS7C	
SNRK	ATOH1		PCDH8	GLP2R	
ANO10	SMARCAD1		OLFM4	RCVRN	
ABHD5	PGDS		PCDH17	GAS7	
LOC375337	PDLIM5		DIAPH3	MYH13	
C3orf23	BMPR1B		TDRD3	MYH8	
ZNF445	UNC5C		PCDH20	MYH4	
ZNF167	PDHA2		PCDH9	MYH2	
ZNF660	C4orf37		KLHL1	MYH3	
ZNF197	RAP1GDS1		ATXN8OS	C17orf48	
ZNF35	TSPAN5		DACH1	FLJ45455	
ZNF502	EIF4E		C13orf37	DNAH9	
ZNF501	METAP1		C13orf34	ZNF18	
KIAA1143	ADH4		C13orf34	MYOCD	
KIF15	ADH6		DIS3	RICH2	
TMEM42	ADH1B		PIBF1	ELAC2	
TGM4	ADH1C		KLF5	HS3ST3A1	
ZDHHC3	ADH7		KLF12	COX10	
EXOSC7	C4orf17		TBC1D4	HS3ST3B1	
CLEC3B	RG9MTD2		COMMD6	PMP22	
CDCP1	MTTP		UCHL3	TEKT3	
TMEM158	DAPP1		LMO7	CDRT4	
LARS2	DNAJB14		KCTD12	FAM18B2	
LIMD1	H2AFZ		CLN5	CDRT1	
SACM1L	DDIT4L		FBXL3	TRIM16	
SLC6A20	EMCN		MYCBP2	ZNF286A	
LZTFL1	PPP3CA		SCEL	ADORA2B	
CCR9	BANK1		SLAIN1	TTC19	
FYCO1	SLC39A8		EDNRB	NCOR1	
CXCR6	NFKB1		POU4F1	PIGL	
XCR1	MANBA		RNF219	CENPV	
CCR1	UBE2D3		RBM26	TRPV2	
CCR3	CISD2		NDFIP2	C17orf45	
LTF	NHEDC1		SPRY2	C17orf76	
RTP3	NHEDC2		SLITRK6	ZNF287	
LRRC2	BDH2		GPC5	ZNF624	
TDGF1	CENPE		GPC6	TNFRSF13B	
ALS2CL	TACR3		DCT	MPRIP	
TMIE	CXXC4		TGDS	PLD6	
TSP50	TET2		GPR180	FLCN	
TESSP2	PPA2		SOX21	COPS3	
MYL3	FLJ20184		ABCC4	NT5M	

CCDC12	INTS12		CLDN10	MED9	
LOC100129354	GSTCD		DZIP1	RASD1	
SETD2	NPNT		DNAJC3	PEMT	
KIF9	TBCKL		UGCGL2	RAI1	
KLHL18	SCYE1		HS6ST3	SMCR5	
PTPN23	DKK2		OXGR1	SREBF1	
SCAP	PAPSS1		MBNL2	TOM1L2	
C3orf75	SGMS2		RAP2A	LRRC48	
CSPG5	CYP2U1		IPO5	ATPAF2	
SMARCC1	HADH		FARP1	C17orf39	
DHX30	LEF1		RNF113B	DRG2	
MAP4	LOC285456		STK24	MYO15A	
CDC25A	RPL34		SLC15A1	ALKBH5	
CAMP	OSTC		DOCK9	LLGL1	
ZNF589	AGXT2L1		UBAC2	FLII	
NME6	COL25A1		GPR18	SMCR7	
FBXW12	SEC24B		GPR183	TOP3A	
PLXNB1	CCDC109B		FKSG29	SHMT1	
CCDC51	CASP6		TM9SF2	FBXW10	
CCDC72	PLA2G12A		CLYBL	PRPSAP2	
ATRIP	CFI		ZIC5	SLC5A10	
SHISA5	GAR1		ZIC2	FAM83G	
PFKFB4	RRH		PCCA	GRAP	
UCN2	EGF		A2LD1	EPN2	
COL7A1	ELOVL6		TMTC4	B9D1	
UQCRC1	ENPEP		NALCN	MFAP4	
SLC26A6	PITX2		ITGBL1	RNF112	
CELSR3	C4orf32		TPP2	SLC47A1	
NCKIPSD	C4orf16		C13orf27	ALDH3A2	
IP6K2	TIFA		BIVM	SLC47A2	
PRKAR2A	ALPK1		ERCC5	ALDH3A1	
SLC25A20	NEUROG2		LOC121952	ULK2	
ARIH2	LOC91431		SLC10A2	AKAP10	
P4HTM	C4orf21		DAOA	CYTSB	
WDR6	LARP7		EFNB2	CCDC144NL	
DALRD3	ANK2		ARGLU1	USP22	
IMPDH2	CAMK2D		FAM155A	DHRS7B	
QRICH1	ARSJ		LIG4	TMEM11	
QARS	UGT8		ABHD13	C17orf103	
CCDC71	NDST4		TNFSF13B	KCNJ12	
KLHDC8B	TRAM1L1		MYO16	C17orf51	
CCDC36	NDST3		IRS2		
USP4	PRSS12		RAB20		
GPX1	CEP170L		CARKD		
TCTA	METTL14		CARS2		

AMT	SEC24D		ING1		
NICN1	SYNPO2		ANKRD10		
DAG1	MYOZ2		ARHGEF7		
BSN	USP53		C13orf16		
APEH	FABP2		SOX1		
RNF123	PDE5A		C13orf28		
GMPPB	MAD2L1		TUBGCP3		
IP6K1	PRDM5		C13orf35		
UBA7	C4orf31		ATP11A		
TRAIP	TNIP3		MCF2L		
CAMKV	QRFPR		F7		
MST1R	ANXA5		F10		
MON1A	TMEM155		PROZ		
RBM6	EXOSC9		PCID2		
RBM5	CCNA2		CUL4A		
SEMA3F	BBS7		LAMP1		
GNAT1	TRPC3		GRTP1		
SEMA3B	KIAA1109		ADPRHL1		
C3orf45	ADAD1		DCUN1D2		
HYAL1	IL2		TMCO3		
HYAL2	IL21		TFDP1		
TUSC2	BBS12		ATP4B		
ZMYND10	FGF2		GRK1		
TUSC4	NUDT6		GAS6		
CYB561D2	SPATA5		FAM70B		
TMEM115	LOC285419		RASA3		
CACNA2D2	ANKRD50		CDC16		
C3orf18	FAT4		UPF3A		
HEMK1	INTU				
CISH	SLC25A31				
MAPKAPK3	HSPA4L				
DOCK3	PLK4				
RBM15B	MFSD8				
VPRBP	C4orf29				
RAD54L2	LARP2				
TEX264	PGRMC2				
GRM2	PHF17				
IQCF2	SCLT1				
IQCF1	C4orf33				
RRP9	PCDH10				
PARP3	PCDH18				
GPR62	SLC7A11				
PCBP4	CCRN4L				
ABHD14B	ELF2				
ACY1	C4orf49				

RPL29	NDUFC1				
WDR51A	NARG1				
ALAS1	RAB33B				
TLR9	SETD7				
TWF2	MGST2				
PPM1M	MAML3				
WDR82	SCOC				
GLYCTK	CLGN				
DNAH1	ELMOD2				
BAP1	UCP1				
PHF7	TBC1D9				
SEMA3G	RNF150				
TNNC1	ZNF330				
NISCH	IL15				
STAB1	INPP4B				
NT5DC2	USP38				
PBRM1	GAB1				
GNL3	SMARCA5				
GLT8D1	GYPA				
SPCS1	HHIP				
NEK4	ANAPC10				
ITIH1	ABCE1				
ITIH3	OTUD4				
ITIH4	SMAD1				
TMEM110	MMAA				
SFMBT1	LOC646603				
RFT1	ZNF827				
PRKCD	SLC10A7				
TKT	POU4F2				
DCP1A	TTC29				
CACNA1D	EDNRA				
CHDH	TMEM184C				
IL17RB	LOC90826				
ACTR8	ARHGAP10				
SELK	NR3C2				
CACNA2D3	DCLK2				
LRTM1	LRBA				
ERC2	MAB21L2				
C3orf51	RPS3A				
CCDC66	SH3D19				
C3orf63	ESSPL				
ARHGEF3	FAM160A1				
SPATA12	PET112L				
IL17RD	FBXW7				
HESX1	TMEM154				

ASB14	TIGD4				
DNAH12	ARFIP1				
PDE12	FHDC1				
ARF4	TRIM2				
FAM116A	MND1				
SLMAP	KIAA0922				
FLNB	TLR2				
DNASE1L3	RNF175				
ABHD6	DCHS2				
RPP14	PLRG1				
PXK	FGB				
PDHB	FGA				
KCTD6	FGG				
ACOX2	LRAT				
FAM107A	RBM46				
FAM3D	NPY2R				
C3orf67	MAP9				
FHIT	GUCY1A3				
PTPRG	GUCY1B3				
C3orf14	ACCN5				
FEZF2	TDO2				
CADPS	CTSO				
SYNPR	PDGFC				
C3orf49	GLRB				
THOC7	GRIA2				
ATXN7	C4orf18				
PSMD6	TMEM144				
PRICKLE2	RXFP1				
ADAMTS9	ETFDH				
MAG11	PPID				
SLC25A26	FNIP2				
LRIG1	C4orf45				
KBTBD8	RAPGEF2				
SUCLG2	FSTL5				
FAM19A1	NAF1				
FAM19A4	NPY1R				
C3orf64	NPY5R				
TMF1	TKTL2				
UBA3	MARCH1				
ARL6IP5	TRIM61				
LMOD3	TRIM60				
FRMD4B	TMEM192				
FOXP1	KLHL2				
EIF4E3	SC4MOL				
PROK2	CPE				

RYBP	TLL1				
SHQ1	SPOCK3				
GLT8D4	ANXA10				
PPP4R2	DDX60				
FLJ10213	DDX60L				
PDZRN3	PALLD				
CNTN3	CBR4				
ROBO2	SH3RF1				
ROBO1	NEK1				
GBE1	CLCN3				
CADM2	C4orf27				
VGLL3	MFAP3L				
CHMP2B	AADAT				
POU1F1	GALNTL6				
HTR1F	GALNT7				
CGGBP1	HMGB2				
C3orf38	SAP30				
EPHA3	SCRG1				
	HAND2				
	NBLA00301				
	FBXO8				
	KIAA1712				
	HPGD				
	GLRA3				
	ADAM29				
	GPM6A				
	WDR17				
	SPATA4				
	ASB5				
	VEGFC				
	NEIL3				
	AGA				
	LOC285501				
	MGC45800				
	ODZ3				
	DCTD				
	C4orf38				
	WWC2				
	CDKN2AIP				
	ING2				
	RWDD4A				
	C4orf41				
	STOX2				
	ENPP6				
	IRF2				

	CASP3				
	CCDC111				
	MLF1IP				
	ACSL1				
	SLC25A4				
	KIAA1430				
	SNX25				
	LRP2BP				
	ANKRD37				
	UFSP2				
	C4orf47				
	CCDC110				
	PDLIM3				
	SORBS2				
	TLR3				
	FAM149A				
	CYP4V2				
	KLKB1				
	F11				
	FAT1				
	ZFP42				
	TRIML2				
	TRIML1				

Anhang Tabelle 2. Gene der isolierten Zugewinne der LKM. Diese Tabelle bietet einen Überblick über alle Gene, die auf den isolierten Zugewinnen der LKM liegen.

1p13	2p23	7p22	7q11	11q12	12q14	13q13	14q12
PRMT6	ATAD2B	FAM20C	ZNF679	APLNR	SLC26A10	RXFP2	LRRC16B
NTNG1	UBXN2A	PDGFA	ZNF680	TNKS1BP1	B4GALNT1	EEF1DP3	CPNE6
VAV3	C2orf44	PRKAR1B	ZNF107	SSRP1	OS9	FRY	NRL
SLC25A24	FKBP1B	HEATR2	ZNF138	P2RX3	AGAP2	BRCA2	PCK2
FAM102B	SF3B14	UNC84A	ZNF117	PRG3	LOC100130776	N4BP2L1	WDR23
C1orf59	TP53I3	C7orf20	INTS4L1	PRG2	TSPAN31	N4BP2L2	FAM158A
PRPF38B	LOC375190	C7orf50	CCT6P1	SLC43A3	CDK4	PDS5B	PSME2
FNDC7	ITSN2	GPER	VKORC1L1	RTN4RL2	MARCH9	KL	RNF31
STXBP3	NCOA1	ZFAND2A	GUSB	SLC43A1	METTL1	STARD13	IRF9
C1orf62	CENPO	INTS1	CRCP	TIMM10	FAM119B	RFC3	REC8
GPSM2	ADCY3	TMEM184A	TPST1	UBE2L6	TSFM	NBEA	IPO4
CLCC1	DNAJC27	MAFK	NCRNA00174	SERPING1	AVIL	MAB21L1	TM9SF1
WDR47	EFR3B	KIAA1908	LOC493754	YPEL4	CTDSP2	DCLK1	TSSK4

KIAA1324	POMC	MAD1L1	KCTD7	CLP1	XRCC6BP1	SOHLH2	CHMP4A
SARS	DNMT3A	FTSJ2	RABGEF1	ZDHHC5	LRIG3	C13orf38	MDP-1
CELSR2	DTNB	NUDT1	C7orf42	MED19	SLC16A7	SPG20	NEDD8
PSRC1	ASXL2	EIF3B	TYW1	TMX2	FAM19A2	CCNA1	GMPR2
SORT1	KIF3C	CHST12	AUTS2	C11orf31	USP15	RFXAP	TINF2
PSMA5	RAB10	IQCE	WBSCR17	CTNND1	MON2	SMAD9	TGM1
SYPL2	HADHA	TTYH3	CALN1	OR9Q1	C12orf61	ALG5	RABGGT A
CYB561D1	HADHB	GNA12	TYW1B	OR10W1	PPM1H	EXOSC8	DHRS1
GPR61	GPR113	CARD11	POM121	LPXN	AVPR1A	FAM48A	C14orf21
GNAI3	SELI	SDK1	TRIM50	ZFP91	DPY19L2	CSNK1A1L	LTB4R2
GNAT2	C2orf39	FOXK1	FKBP6	CNTF	TMEM5	POSTN	CIDEB
AMPD2	OTOF	RADIL	BAZ1B	ZFP91-CNTF	SRGAP1	TRPC4	LTB4R
GSTM4	CIB4	PAPOLB	TBL2	GLYAT	C12orf66	UFM1	ADCY4
GSTM5	KCNK3	MMD2	MLXIPL	GLYATL1	C12orf56	FREM2	NFATC4
GSTM3	C2orf18	RBAK	DNAJC30	FAM111B	XPOT	STOML3	KIAA1305
EPS8L3	CENPA	WIPI2	WBSCR22	FAM111A	TBK1	C13orf23	SDR39U1
CSF1	DPYSL5	TNRC18	STX1A	DTX4	RASSF3	LHFP	KIAA0323
AHCYL1	MAPRE3	FBXL18	ABHD11	OSBP	GNS	COG6	CMA1
ALX3	TMEM214	RNF216	CLDN3	PATL1	WIF1		CTSG
SLC6A17	AGBL5	ZNF815	CLDN4	STX3	LEMD3		GZMH
KCNC4	KHK	OCM	WBSCR27	MRPL16	MSRB3		GZMB
RBM15	CGREF1	PMS2	WBSCR28	GIF	RPSAP52		STXBP6
SLC16A4	ABHD1	EIF2AK1	ELN	TCN1	HMGA2		NOVA1
HBXIP	PREB	USP42	LIMK1	PLAC1L	LLPH		FOXG1
PROK1	C2orf53	CYTH3	EIF4H	MS4A3	TMBIM4		C14orf23
KCNA10	SLC5A6	MGC12966	LAT2	MS4A2	IRAK3		PRKD1
KCNA2	C2orf28	RAC1	RFC2	MS4A6A	HELB		SCFD1
KCNA3	CAD	KDEL2	CLIP2	MS4A7	GRIP1		COCH
CD53	DNAJC5G	GRID2IP	GTF2IRD1	MS4A14	CAND1		STRN3
C1orf103	TRIM54	ZDHHC4	GTF2I	MS4A5	MDM2		AP4S1
TMEM77	MPV17	ZNF853	WBSCR16	MS4A1	TMBIM4		HECTD1
CEPT1	GTF3C2	PMS2CL	POM121C	MS4A12	IRAK3		HEATR5A
DENND2D	EIF2B4	PMS2CL	HIP1	C11orf64	HELB		C14orf126
CHI3L2	SNX17	PMS2CL	CCL26	MS4A8B	GRIP1		NUBPL
CHIA	ZNF513	PMS2CL	CCL24	MS4A15	CAND1		C14orf1

						28
C1orf88	PPM1G		RHBDD2	MS4A10	MDM2	ARHGAP5
OVGP1	NRBP1		POR	CCDC86		C14orf126
WDR77	FNDC4		TMEM120A	GPR44		NUBPL
ATP5F1	GCKR		STYXL1	PRPF19		C14orf128
C1orf162	C2orf16		MDH2	TMEM109		ARHGAP5
ADORA3	ZNF512		FLJ37078	TMEM132A		
RAP1A	GPN1		HSPB1	SLC15A3		
C1orf183	SUPT7L		YWHAG	CD6		
DDX20	SLC4A1A P		SRCRB4D	CD5		
KCND3	MRPL33		ZP3	VPS37C		
CTTNBP2 NL	RBKS		UPK3B	PGA5		
WNT2B	BRE		CCDC146	VWCE		
ST7L	FOSL2		FGL2	DDB1		
CAPZA1	PLB1		PION	DAK		
MOV10	PPP1CB		PTPN12	CYBASC3		
RHOC	SPDYA		RSBN1L	TMEM138		
FAM19A3	TRMT61B		TMEM60	TMEM216		
SLC16A1	WDR43		PHTF2	FLJ12529		
LRIG2	FAM179A		PHTF2	C11orf79		
MAGI3	CLIP4		PHTF2	SYT7		
PHTF1	ALK		PHTF2	DAGLA		
RSBN1	YPEL5			C11orf9		
PTPN22	LBH			C11orf10		
AP4B1	LCLAT1			FEN1		
DCLRE1B	CAPN13			FADS1		
HIPK1	GALNT14			FADS2		
OLFML3	CAPN14			FADS3		
SYT6	EHD3			BEST1		
TRIM33	XDH			FTH1		
BCAS2	SRD5A2			INCENP		
DENND2C				SCGB1D1		
AMPD1				SCGB2A1		
NRAS				SCGB1D2		
CSDE1				SCGB2A2		
SIKE				ASRGL1		
SYCP1				SCGB1A1		
TSHB				AHNAK		

TSPAN2			EEF1G
NGF			TUT1
VANGL1			MTA2
CASQ2			EML3
NHLH2			ROM1
SLC22A15			B3GAT3
C1orf161			GANAB
ATP1A1			C11orf48
C1orf203			UBXN1
CD58			BSCL2
IGSF3			GNG3
CD2			TTC9C
PTGFRN			ZBTB3
IGSF2			POLR2G
TTF2			TAF6L
TRIM45			NXF1
VTCN1			STX5
NOTCH2			SLC3A2
			CHRM1
			SLC22A6
			SLC22A24
			SLC22A25
			SLC22A10
			SLC22A9
			HRASLS5
			LGALS12
			RARRES3
			HRASLS2
			PLA2G16
			HRASLS2
			PLA2G16

Anhang Tabelle 3. Gene der Zugewinne und Verluste der Clustergruppe B. Die chromosomalen Zugewinne und Verluste der Clustergruppe B beherbergen Krebs-relevante Gene.

Verlust												Zugewinn	Verlust	Zugewinn
2p25-2p11	2q11-2q35	4q12-4q35	5q11-5q35	7q35	9p24-9p13	9q33-9q34	10q11-10q23	11p11						
FAM110C	MAL	DCUN1D4	PARP8	EPHA1	DOCK8	TNFSF8	LOC84856	TTC17						
ACP1	MRPS5	LRRRC66	ISL1	TAS2R60	KANK1	TNC	BMS1	HSD17B12						
SNTG2	ZNF514	SGCB	PELO	TAS2R41	DMRT1	DEC1	RET	ALKBH3						
TPO	ZNF2	SPATA18	ITGA1	ARHGGEF5	SMARCA2	C9orf27	CSGALNACT2	ACCS						
PXDN	PROM2	USP46	ITGA2	TPK1	FLJ35024	PAPPA	RASGEF1A	EXT2						
MYT1L	KCNIP3	RASL11B	MOC52	CNTNAP2	VLDLR	ASTN2	FXYD4	ALX4						
TSSC1	FAHD2A	SCFD2	FST		KIAA0020	TRIM32	HNRNPF	CD82						
TTC15	ADRA2B	FIP1L1	NDUFS4		RFX3	TLR4	ZNF487	TSPAN18						
ADI1	STARD7	LNX1	ARL15		GLIS3	DBC1	ZNF239	TP5311						
RPS7	TMEM127	CHIC2	HSPB3		SLC1A1	CDK5RAP2	ZNF485	PRDM11						
COLEC11	SNRNP200	GXS2	SNX18		C9orf68	MEGF9	ZNF32	SYT13						
ALLC	ITPRIPL1	PDGFRA	ESM1		CDC37L1	FBXW2	HNRNPA3P1	CHST1						
SOX11	NCAPH	KIT	GZMK		AK3	PSMD5	CXCL12	SLC35C1						
CMPK2	NEURL3	KDR	GZMA		RCL1	PHF19	RASSF4	CRY2						
RNF144A	KIAA1310	SRD5A3	CDC20B		JAK2	TRAF1	C10orf10	MAPK8IP1						
LOC339788	FER1L5	TMEM165	CCNO		INSL6	C5	C10orf25	GYLTL1B						
KIDINS220	LMAN2L	CLOCK	DHX29		C9orf46	CEP110	ZNF22	PHF21A						
MBOAT2	CNNM4	PDCL2	SKIV2L2		PDCD1LG2	RAB14	LOC100133308	CREB3L1						
ASAP2	CNNM3	NMU	SKIV2L2		KIAA1432	GSN	OR13A1	DGKZ						
ITGB1BP1	ANKRD23	LOC644145	PPAP2A		ERMP1	STOM	ALOX5	CHRM4						
CPSF3	ANKRD39	EXOC1	SLC38A9		MLANA	GGTA1	MARCH8	AMBRA1						
ADAM17	SEMA4C	CEP135	DDX4		KIAA2026	DAB2IP	ANUBL1	HARB1						
YWHAQ	FAM178B	KIAA1211	IL31RA		TPD52L3	TTL11	ZNF488	KIAA0652						
TAF1B	COX5B	AASDH	IL6ST		UHRF2	NDUFA8	RBP3	ZNF408						

GRHL1	ACTR1B	PPAT	ANKRD55	GLDC	MORN5	GDF2	F2
KLF11	ZAP70	PAICS	MAP3K1	KDM4C	LHX6	GDF10	CKAP5
RRM2	TMEM131	SRP72	C5orf35	PTPRD	RBM18	FRMPD2	LRP4
C2orf48	VWA3B	HOPX	MIER3	TYRP1	MRRF	MAPK8	C11orf49
HPCAL1	CNGA3	SPINK2	GPBP1	MPDZ	PTGS1	ARHGAP22	ARFGAP2
ODC1	INPP4A	REST	PLK2	NFIB	PDCL	WDFY4	PACSIN3
NOL10	UNC50	C4orf14	GAPT	ZDHHC21	RC3H2	C10orf72	DBB2
ATP6V1C2	MGAT4A	POLR2B	RAB3C	CER1	ZBTB6	DRGX	ACP2
PDIA6	C2orf55	IGFBP7	PDE4D	FREM1	ZBTB26	ERCC6	NR1H3
C2orf50	TSGA10	LPHN3	PART1	TTC39B	RABGAP1	PGBD3	MADD
PQLC3	C2orf15	SRD5A2L2	DEPDC1B	SNAPC3	GPR21	CHAT	MYBPC3
ROCK2	LIPT1	EPHA5	ELOVL7	PSIP1	C9orf45	C10orf53	SPI1
E2F6	MITD1	CENPC1	ERCC8	C9orf93	STRBP	OGDHL	PSMC3
GREB1	MRPL30	STAP1	NDUFAF2	BNC2	CRB2	PARG	RAPSN
NTSR2	LYG2	UBA6	ZSWIM6	CNTLN	DENND1A	MSMB	CUGBP1
LPIN1	LYG1	GNRHR	FLJ37543	SH3GL2	LHX2	NCOA4	PTPMT1
TRIB2	TXNDC9	TMPRSS11D	KIF2A	ADAMTSL1	NEK6	TIMM23	KBTBD4
FAM84A	EIF5B	TMPRSS11A	DIMT1L	FAM154A	PSMB7	ASAH2	NDUFS3
NBAS	REV1	TMPRSS11F	IPO11	RRAGA	NR5A1	SGMS1	C1QTNF4
DDX1	AFF3	FLJ41562	LRRRC70	HAUS6	NR6A1	A1CF	AGBL2
MYCN	LONRF2	TMPRSS11B	HTR1A	ADFP	OLFML2A	PRKG1	FNBP4
FAM49A	CHST10	YTHDC1	RNF180	DENND4C	RPL35	CSTF2T	NUP160
VSNL1	PDCL3	UGT2A3	RGS7BP	ACER2	ARPC5L		PTPRJ
SMC6	NPAS2	UGT2B11	SFRS12IP1	SLC24A2	GOLGA1		LOC440040
GEN1	RPL31	UGT2B4	SDCCAG10	MLLT3	C9orf126		LOC646813
KCNS3	TBC1D8	UGT2A1	ADAMTS6	KIAA1797	PPP6C		
RDH14	C2orf29	SULT1B1	CENPK	IFNB1	RABEPK		
NT5C1B	RNF149	SULT1E1	PPWD1	IFNW1	HSPA5		
OSR1	CREG2	CSN1S1	TRIM23	KLHL9	GAPVD1		

WDR35	LOC731220	CSN2	C5orf44	IFNA2	MAPKAP1	
MATN3	MAP4K4	STATH	SGTB	IFNA8	PBX3	
LAPTM4A	IL1R2	HTN3	NLN	LOC554202	FAM125B	
SDC1	IL1R1	HTN1	ERBB2IP	IFNE	LMX1B	
PUM2	IL1RL2	CSN1S2B	SFRS12	MTAP	ZBTB43	
RHOB	IL1RL1	ODAM	MAST4	C9orf53	ZBTB34	
HS1BP3	IL18R1	C4orf7	CD180	CDKN2A	RALGPS1	
GDF7	IL18RAP	CSN3	PIK3R1	CDKN2BAS	ANGPTL2	
C2orf43	SLC9A4	C4orf35	SLC30A5	ELAVL2	GARNL3	
APOB	SLC9A2	SMR3A	CCNB1	C9orf82	SLC2A8	
ATAD2B	MFSD9	SMR3B	CENPH	PLAA	ZNF79	
UBXN2A	TMEM182	PROL1	MRPS36	LRRC19	RPL12	
C2orf44	LOC150568	MUC7	CDK7	IFT74	LRSAM1	
FKBP1B	MRPS9	AMBN	CCDC125	TEK	FAM129B	
SF3B14	GPR45	ENAM	TAF9	NCRNA00032	STXBP1	
TP53I3	TGFBRAP1	IGJ	RAD17	MOBKL2B	TTC16	
LOC375190	C2orf49	UTP3	MARVELD2	IFNK	TOR2A	
ITSN2	FHL2	RUFY3	OCLN	C9orf72	SH2D3C	
NCOA1	NCK2	GRSF1	BDP1	LINGO2	CDK9	
CENPO	C2orf40	MOBKL1A	MCCC2	ACO1	FPGS	
ADCY3	UXS1	DCK	CARTPT	DDX58	ENG	
DNAJC27	ST6GAL2	SLC4A4	MAP1B	TOPORS	AK1	
EFR3B	SLC5A7	GC	MRPS27	NDUFB6	ST6GALNAC6	
POMC	SULT1C3	NPFFR2	PTCD2	APTX	ST6GALNAC4	
DNMT3A	SULT1C2	ADAMTS3	ZNF366	DNAJA1	PIP5KL1	
DTNB	SULT1C4	COX18	TNPO1	SMU1	DPM2	
ASXL2	GCC2	ANKRD17	FCHO2	B4GALT1	FAM102A	
KIF3C	LIMS1	ALB	TMEM171	SPINK4	NAIF1	
RAB10	RANBP2	AFP	TMEM174	BAG1	PTGES2	

HADHA	CCDC138	AFM	FOXD1	NFX1	C9orf16		
HADHB	EDAR	RASSF6	BTF3	SUGT1P	DNM1		
GPR113	SH3RF3	IL8	ANKRA2	AQP3	GOLGA2		
SELI	Sep 10	CXCL6	UTP15	NOL6	TRUB2		
C2orf39	MALL	PF4	RGNEF	PRSS3	COQ4		
OTOF	NPHP1	PPBP	ENC1	UBE2R2	SLC27A4		
CIB4	NCRNA00116	CXCL5	HEXB	UBAP2	URM1		
KCNK3	BUB1	CXCL3	GFM2	WDR40A	CERCAM		
C2orf18	ACOXL	PPBPL2	TINP1	UBAP1	ODF2		
CENPA	BCL2L11	CXCL2	FAM169A	KIF24	GLE1		
DPYSL5	ANAPC1	MTHFD2L	GCNT4	NUDT2	SPTAN1		
MAPRE3	MERTK	EREG	HMGCR	C9orf24	WDR34		
TMEM214	TMEM87B	BTC	COL4A3BP	C9orf25	SET		
AGBL5	FBLN7	DKFZP564O0823	POLK	DNAI1	PKN3		
KHK	ZC3H8	RCHY1	C5orf37	CNTFR	ZDHHC12		
CGREF1	ZC3H6	THAP6	SV2C	C9orf23	ZER1		
ABHD1	TTL	C4orf26	IQGAP2	DCTN3	TBC1D13		
PREB	POLR1B	CDKL2	F2RL2	SIGMAR1	ENDOG		
C2orf53	CHCHD5	G3BP2	F2R	GALT	C9orf114		
SLC5A6	SLC20A1	USO1	F2RL1	IL11RA	CCBL1		
C2orf28	CKAP2L	PPEF2	S100Z	CCL27	PHYHD1		
CAD	IL1A	NAAA	CRHBP	CCL19	DOLK		
DNAJC5G	IL1B	SDAD1	AGGF1	DNAJB5	SH3GLB2		
TRIM54	IL1F7	CXCL9	ZBED3	VCP	FAM73B		
MPV17	IL1F9	CXCL10	PDE8B	FANCG	DOLPP1		
GTF3C2	IL1F6	CXCL11	WDR41	PIGO	CRAT		
EIF2B4	IL1F8	ART3	OTP	STOML2	PPP2R4		
SNX17	IL1F5	NUP54	TBCA	KIAA1539	METTLL11A		
ZNF513	IL1F10	SCARB2	AP3B1	UNC13B	ASB6		

PPM1G	IL1RN	FAM47E	SCAMP1	LOC158381	PRRX2	
NRBP1	PSD4	STBD1	LHFPL2	RUSC2	PTGES	
FNDC4	PAX8	CCDC158	ARSB	TESK1	TOR1B	
GCKR	LOC654433	SHROOM3	DMGDH	CD72	TOR1A	
C2orf16	RPL23AP7	Sep 11	BHMT2	C9orf100	C9orf78	
ZNF512	SLC35F5	CCNI	BHMT	CA9	USP20	
GPN1	ACTR3	CCNG2	JMY	TPM2	FNBP1	
SUPT7L	DPP10	CXCL13	HOMER1	TLN1	GPR107	
SLC4A1AP	DDX18	CNOT6L	PAPD4	CREB3	FREQ	
MRPL33	CCDC93	MRPL1	CMYA5	GBA2	ASS1	
RBKS	INSIG2	FRAS1	THBS4	NPR2	FUBP3	
BRE	EN1	ANXA3	SERINC5	SPAG8	PRDM12	
FOSL2	MARCO	BMP2K	SPZ1	HINT2	EXOSC2	
PLB1	C1QL2	PAQR3	ZFYVE16	C9orf127	ABL1	
PPP1CB	STEAP3	ARD1B	FAM151B	RECK	FIBCD1	
SPDYA	DBI	GK2	DHFR	GLIPR2	LAMC3	
TRMT61B	TMEM37	GDEP	MSH3	CCIN	AIF1L	
WDR43	SCTR	ANTXR2	RASGRF2	CLTA	NUP214	
FAM179A	PCDP1	PRDM8	CKMT2	GNE	FAM78A	
CLIP4	TMEM177	FGF5	ZCCHC9	RNF38	PPAPDC3	
ALK	PTPN4	C4orf22	ACOT12	MELK	BAT2L	
YPEL5	EPB41L5	BMP3	SSBP2	PAX5	POMT1	
LBH	RALB	PRKG2	ATG10	ZCCHC7	UCK1	
LCLAT1	INHBB	RASGEF1B	RPS23	GRHPR	RAPGEF1	
CAPN13	GLI2	HNRNPD	ATP6AP1L	ZBTB5	MED27	
GALNT14	TFCP2L1	HNRPDL	TMEM167A	POLR1E	NTNG2	
CAPN14	CLASP1	ENOPH1	XRCC4	FBXO10	SETX	
EHD3	MKI67IP	FLJ12993	VCAN	FRMPD1	TTF1	
XDH	TSN	SCD5	HAPLN1	RG9MTD3	C9orf171	

SRD5A2	CNTNAP5	SEC31A	EDIL3	EXOSC3	BARHL1	
MEMO1	GYPC	THAP9	COX7C	WDR32	DDX31	
DPY30	BIN1	LIN54	RASA1	MCART1	GTF3C4	
SPAST	ERCC3	COPS4	CCNH	SHB	C9orf98	
SLC30A6	MAP3K2	PLAC8	TMEM161B	ALDH1B1	C9orf9	
NLRC4	PROC	COQ2	LOC645323	CNTNAP3	TSC1	
YIPF4	IWS1	HPSE	MEF2C		GFI1B	
BIRC6	MYO7B	HELQ	CETN3		GTF3C5	
TTC27	LIMS2	MRPS18C	POLR3G		CEL	
LOC285045	GPR17	FAM175A	GPR98		RALGDS	
LTP1	SFT2D3	AGPAT9	ARRDC3		GBGT1	
RASGRP3	WDR33	NKX6-1	LOC100129716		ABO	
CRIM1	AMMECR1L	CDS1	FLJ42709		SURF6	
FEZ2	SAP130	WDFY3	NR2F1		SURF4	
VIT	UGGGL1	ARHGAP24	FAM172A		REXO4	
STRN	HS6ST1	MAPK10	POU5F2		ADAMTSL2	
HEATR5B	LOC440905	PTPN13	C5orf36		DBH	
CCDC75	CCDC115	SLC10A6	ANKRD32		SARDH	
EIF2AK2	IMP4	C4orf36	MCTP1		VAV2	
CEBPZ	PTPN18	AFF1	FAM81B		BRD3	
C2orf56	FAM123C	KLHL8	TTC37		RXRA	
PRKD3	ARHGEF4	HSD17B13	ARSK		COL5A1	
QPCT	PLEKHB2	HSD17B11	RFESD		FCN2	
CDC42EP3	C2orf27A	NUDT9	RHOBTB3		FCN1	
FAM82A1	GPR39	SPARCL1	GLRX		OLFM1	
CYP1B1	LYPD1	DSPP	C5orf27		KIAA0649	
C2orf58	NAP5	DMP1	ELL2		MRPS2	
ATL2	MGAT5	IBSP	PCSK1		LCN1	
HNRPLL	TMEM163	MEPE	CAST		PAEP	

GALM	ACMSD	SPP1	ERAP1				GLT6D1	
SFRS7	CCNT2	PKD2	ERAP2				KCNT1	
GEMIN6	YSK4	ABCG2	LNPEP				CAMSAP1	
DHX57	RAB3GAP1	PPM1K	LIX1				UBAC1	
MORN2	ZRANB3	HERC6	RIOK2				NACC2	
LOC100271715	R3HDM1	HERC5	RGMB				LHX3	
SOS1	UBXN4	HERC3	CHD1				QSOX2	
CDKL4	LCT	NAP1L5	FAM174A				LOC26102	
MAP4K3	MCM6	FAM13AOS	ST8SIA4				GPSM1	
TMEM178	DARS	FAM13A	SLCO4C1				CARD9	
THUMPD2	CXCR4	TIGD2	SLCO6A1				SDCCAG3	
SLC8A1	THSD7B	GPRIN3	PAM				PMPCA	
EML4	HNMT	SNCA	GIN1				INPP5E	
COX7A2L	SPOPL	MMRN1	HISPPD1				SEC16A	
KCNG3	NXPH2	KIAA1680	C5orf30				C9orf163	
MTA3	LRP1B	TMSL3	NUDT12				NOTCH1	
HAAO	KYNU	GRID2	EFNA5				EGFL7	
LOC100129726	ARHGAP15	ATOH1	FBXL17				AGPAT2	
THADA	GTDC1	SMARCAD1	FER				FAM69B	
PLEKH2	ZEB2	PGDS	PJA2				LCN6	
DYNC2LI1	PABPCP2	PDLIM5	MAN2A1				LCN8	
ABCG5	ACVR2A	BMPR1B	FLJ43080				TMEM141	
ABCG8	ORC4L	UNC5C	SLC25A46				KIAA1984	
LRPPRC	MBD5	PDHA2	TSLP				C9orf86	
PPM1B	EPC2	C4orf37	WDR36				EDF1	
SLC3A1	KIF5C	RAP1GDS1	CAMK4				TRAF2	
PREPL	LYPD6B	TSPAN5	STARD4				PTGDS	
C2orf34	LYPD6	EIF4E	C5orf13				ABCA2	
SIX3	MMADHC	METAP1	C5orf26				MAN1B1	

SIX2	RND3	ADH4	EPB41L4A			GRIN1	
SRBD1	TNFAIP6	ADH6	APC			SSNA1	
PRKCE	RIF1	ADH1B	SRP19			C9orf75	
EPAS1	NEB	ADH1C	REEP5			NDOR1	
ATP6V1E2	ARL5A	ADH7	DCP2			COBRA1	
RHOQ	CACNB4	C4orf17	MCC			NRARP	
PIGF	STAM2	RG9MTD2	TSSK1B			EXD3	
CRIP1	FMNL2	MTPP	YTHDC2			PNPLA7	
SOCS5	PRPF40A	DAPP1	KCNN2			ZMYND19	
MCFD2	ARL6IP6	DNAJB14	TRIM36			ARRDC1	
TTC7A	RPRM	H2AFZ	PGGT1B			C9orf37	
C2orf61	GALNT13	DDIT4L	CCDC112			EHMT1	
CALM2	KCNJ3	EMCN	FEM1C			FLJ40292	
EPCAM	NR4A2	PPP3CA	TICAM2			CACNA1B	
MSH2	GPD2	BANK1	TMED7				
KCNK12	GALNT5	SLC39A8	CDO1				
MSH6	ERMN	NFKB1	ATG12				
FBXO11	CYTIP	MANBA	AP3S1				
FOXN2	ACVR1C	UBE2D3	LVRN				
KLRAQ1	ACVR1	CISD2	COMMD10				
STON1	UPP2	NHEDC1	SEMA6A				
STON1-GTF2A1L	CCDC148	NHEDC2	DTWD2				
GTF2A1L	PKP4	BDH2	DMXL1				
LHCGR	DAPL1	CENPE	TNFAIP8				
FSHR	TANC1	TACR3	HSD17B4				
NRXN1	WDSUB1	CXXC4	FAM170A				
ASB3	BAZ2B	TET2	PRR16				
C2orf30	MARCH7	PPA2	FTMT				
GPR75	CD302	FLJ20184	SRFBP1				

PSME4	LY75	INTS12	LOX					
ACYP2	PLA2R1	GSTCD	SNCAIP					
C2orf73	ITGB6	NPNT	SNX2					
SPTBN1	RBMS1	TBCKL	SNX24					
EML6	TANK	SCYE1	PPIC					
RTN4	PSMD14	DKK2	PRDM6					
C2orf63	TBR1	PAPSS1	CEP120					
RPS27A	SLC4A10	SGMS2	CSNK1G3					
MTIF2	DPP4	CYP2U1	ZNF608					
CCDC88A	GCG	HADH	GRAMD3					
CCDC104	FAP	LEF1	ALDH7A1					
SMEK2	IFIH1	LOC285456	PHAX					
PNPT1	GCA	RPL34	LMNB1					
EFEMP1	KCNH7	OSTC	MARCH3					
CCDC85A	FIGN	AGXT2L1	MEGF10					
VRK2	GRB14	COL25A1	PRRC1					
FANCL	COBLL1	SEC24B	FLJ33630					
BCL11A	SLC38A11	CCDC109B	SLC12A2					
PAPOLG	SCN3A	CASP6	FBN2					
REL	SCN2A	PLA2G12A	SLC27A6					
PUS10	CSRNP3	CFI	ISOC1					
PEX13	GALNT3	GAR1	ADAMTS19					
KIAA1841	TTC21B	RRH	CHSY3					
AHSA2	SCN1A	EGF	LYRM7					
USP34	SCN9A	ELOVL6	CDC42SE2					
XPO1	SCN7A	ENPEP	RAPGEF6					
CCT4	XIRP2	PITX2	FNIP1					
COMMD1	B3GALT1	C4orf32	ACSL6					
B3GNT2	STK39	C4orf16	IL3					

TMEM17	LASS6	TIFA	CSF2						
EHP1	NOSTRIN	ALPK1	P4HA2						
OTX1	SPC25	NEUROG2	PDLIM4						
C2orf86	G6PC2	LOC91431	SLC22A4						
MDH1	ABCB11	C4orf21	SLC22A5						
UGP2	DHRS9	LARP7	LOC441108						
VPS54	LRP2	ANK2	IRF1						
PELI1	BBS5	CAMK2D	IL5						
HSPC159	KBTBD10	ARSJ	RAD50						
AFTPH	FASTKD1	UGT8	IL13						
SERTAD2	PPIG	NDST4	IL4						
SLC1A4	C2orf77	TRAM1L1	KIF3A						
CEP68	PHOSPHO2	NDST3	Sep 08						
RAB1A	KLHL23	PRSS12	ANKRD43						
ACTR2	SSB	CEP170L	SHROOM1						
SPRED2	METTL5	METTL14	GDF9						
MEIS1	UBR3	SEC24D	UQCRQ						
ETAA1	MYO3B	SYNPO2	LEAP2						
C1D	GAD1	MYOZ2	AFF4						
WDR92	GORASP2	USP53	ZCCHC10						
PNO1	TLK1	FABP2	HSPA4						
PPP3R1	METTL8	PDE5A	FSTL4						
CNRIP1	C2orf37	MAD2L1	C5orf15						
PLEK	CYBRD1	PRDM5	VDAC1						
APLF	DYNC1I2	C4orf31	CDKN2AIPNL						
PROKR1	SLC25A12	TNIP3	TCF7						
ARHGAP25	HAT1	QRFPR	SKP1						
BMP10	MAP1D	ANXA5	PPP2CA						
GKN2	DLX1	TMEM155	CDKL3						

GKN1	DLX2	EXOSC9	UBE2B					
ANTXR1	ITGA6	CCNA2	PHF15					
GFPT1	PDK1	BBS7	SAR1B					
NFU1	RAPGEF4	TRPC3	SEC24A					
AAK1	ZAK	KIAA1109	CAMLG					
ANXA4	CDCA7	ADAD1	DDX46					
GMCL1	SP3	IL2	C5orf24					
SNRNP27	OLA1	IL21	TXNDC15					
MXD1	CIR	BBS12	PCBD2					
ASPRV1	SCRN3	FGF2	CATSPER3					
C2orf42	GPR155	NUDT6	H2AFY					
TIA1	WIPF1	SPATA5	C5orf20					
PCYOX1	CHRNA1	LOC285419	NEUROG1					
SNRPG	CHN1	ANKRD50	CXCL14					
TGFA	ATF2	FAT4	LOC153328					
ADD2	ATP5G3	INTU	IL9					
CLEC4F	KIAA1715	SLC25A31	FBXL21					
CD207	HOXD13	HSPA4L	LECT2					
VAX2	HOXD12	PLK4	TGFB1					
ATP6V1B1	HOXD11	MFSD8	SMAD5OS					
ANKRD53	HOXD10	C4orf29	SMAD5					
TEX261	HOXD8	LARP2	TRPC7					
NAGK	HOXD4	PGRMC2	SPOCK1					
MCEE	HOXD3	PHF17	KLHL3					
MPHOSPH10	HOXD1	SCLT1	HNRNPA0					
PAIP2B	MTX2	C4orf33	MYOT					
ZNF638	HNRNPA3	PCDH10	PKD2L2					
DYSF	NFE2L2	PCDH18	FAM13B					
CYP26B1	LOC100130691	SLC7A11	WNT8A					

EXOC6B	AGPS	CCRN4L	NME5				
SPR	TTC30B	ELF2	BRD8				
EMX1	TTC30A	C4orf49	KIF20A				
SFXN5	PDE11A	NDUFC1	CDC23				
RAB11FIP5	RBM45	NARG1	GFRA3				
C2orf7	OSBPL6	RAB33B	CDC25C				
CCT7	PRKRA	SETD7	KDM3B				
EGR4	FKBP7	MGST2	REEP2				
ALMS1	PLEKHA3	MAML3	EGR1				
ALMS1P	TTN	SCOC	ETF1				
TPRKB	CCDC141	CLGN	HSPA9				
DUSP11	SESTD1	ELMOD2	CTNNA1				
C2orf78	ZNF385B	UCP1	LRRTM2				
STAMPB	CWC22	TBC1D9	SIL1				
ACTG2	UBE2E3	RNF150	MATR3				
DGUOK	ITGA4	ZNF330	PAIP2				
TET3	CERKL	IL15	SLC23A1				
MOBKL1B	NEUROD1	INPP4B	MGC29506				
MTHFD2	SSFA2	USP38	DNAJC18				
SLC4A5	PPP1R1C	GAB1	TMEM173				
DCTN1	PDE1A	SMARCA5	UBE2D2				
WDR54	DNAJC10	GYP A	CXXC5				
RTKN	FRZB	HHIP	PSD2				
INO80B	NCKAP1	ANAPC10	NRG2				
WBP1	DUSP19	ABCE1	PURA				
MOGS	NUP35	OTUD4	C5orf32				
MRPL53	ZNF804A	SMAD1	PFDN1				
CCDC142	ZC3H15	MMAA	HBEGF				
TTC31	ITGAV	LOC646603	SLC4A9				

LOC151534	FAM171B	ZNF827	ANKHD1						
PCGF1	ZSWIM2	SLC10A7	APBB3						
DQX1	CALCRL	POU4F2	SLC35A4						
HTRA2	TFPI	TTC29	CD14						
LOXL3	GULP1	EDNRA	TMCO6						
DOK1	DIRC1	TMEM184C	NDUFA2						
C2orf65	COL3A1	LOC90826	IK						
SEMA4F	COL5A2	ARHGAP10	WDR55						
HK2	WDR75	NR3C2	HARS						
POLE4	SLC40A1	DCLK2	HARS2						
TACR1	ASNSD1	LRBA	ZMAT2						
FAM176A	ANKAR	MAB21L2	PCDHA1						
MRPL19	OSGEPL1	RPS3A	PCDHA2						
C2orf3	ORMDL1	SH3D19	PCDHA3						
LRRTM4	PMS1	ESSPL	PCDHA4						
REG1B	MSTN	FAM160A1	PCDHA5						
REG1P	C2orf88	PET112L	PCDHB1						
REG3A	HIBCH	FBXW7	PCDHB2						
CTNNA2	INPP1	TMEM154	PCDHB3						
LRRTM1	MFSD6	TIGD4	PCDHB4						
SUCLG1	TMEM194B	ARFIP1	PCDHB5						
DNAH6	NAB1	FHDC1	PCDHB6						
LOC129293	GLS	TRIM2	PCDHB7						
KCMF1	STAT1	MND1	PCDHB16						
TCF7L1	STAT4	KIAA0922	PCDHB9						
TGOLN2	MYO1B	TLR2	PCDHB10						
RETSAT	OBFC2A	RNF175	PCDHB11						
ELMOD3	SDPR	DCHS2	PCDHB12						
CAPG	TMEFF2	PLRG1	PCDHB14						

MAT2A	SLC39A10	FGB	PCDHB15					
GGCX	DNAH7	FGA	SLC25A2					
VAMP5	STK17B	FGG	TAF7					
RNF181	HECW2	LRAT	PCDHGA1					
TMEM150	CCDC150	RBM46	PCDHGA2					
USP39	GTF3C3	NPY2R	PCDHGA3					
GNLY	PGAP1	MAP9						
ATOH8	ANKRD44	GUCY1A3	DIAPH1					
ST3GAL5	SF3B1	GUCY1B3	HDAC3					
POLR1A	COQ10B	ACCN5	RELL2					
PTCD3	HSPD1	TDO2	FCHSD1					
IMMT	HSPE1	CTSO	ARAP3					
MRPL35	MOBK13	PDGFC	PCDH1					
REEP1	RFTN2	GLRB	KIAA0141					
KDM3A	MARS2	GRIA2	PCDH12					
VPS24	BOLL	C4orf18	RNF14					
RNF103	PLCL1	TMEM144	GNPDA1					
RMND5A	SATB2	RXFP1	NDFIP1					
CD8A	C2orf69	ETFDH	SPRY4					
CD8B	C2orf60	PPID	FGF1					
LOC285074	C2orf47	FNIP2	ARHGAP26					
NCRNA00152	LOC26010	C4orf45	NR3C1					
KRCC1	KCTD18	RAPGEF2	HIMHB1					
SMYD1	SGOL2	FSTL5	YIPF5					
FABP1	AOX1	NAF1	KCTD16					
THNSL2	CLK1	NPY1R	PRELID2					
C2orf51	PPIL3	NPY5R	GRXCR2					
EIF2AK3	NIF3L1	TKTL2	SH3RF2					
RPIA	ORC2L	MARCH1	LARS					

FAM126B	TRIM61	RBM27				
NDUFB3	TRIM60	TCERG1				
CFLAR	TMEM192	GPR151				
CASP10	KLHL2	PPP2R2B				
CASP8	SC4MOL	STK32A				
ALS2CR12	CPE	DPYSL3				
TRAK2	TLL1	JAKMIP2				
ALS2CR11	SPOCK3	SPINK1				
ALS2CR4	ANXA10	SCGB3A2				
MPP4	DDX60	SPINK5				
ALS2	DDX60L	SPINK5L2				
PFTK2	PALLD	SPINK7				
FZD7	CBR4	FBXO38				
SUMO1	SH3RF1	HTR4				
NOP58	NEK1	ADRB2				
BMPR2	CLCN3	SH3TC2				
FAM117B	C4orf27	ABLM13				
ICA1L	MFAP3L	AFAP1L1				
WDR12	AADAT	PCYOX1L				
ALS2CR8	GALNTL6	IL17B				
NBEAL1	GALNT7	LOC728264				
CYP20A1	HMGB2	CSNK1A1				
ABI2	SAP30	FLJ41603				
RAPH1	SCRG1	PPARGC1B				
CD28	HAND2	PDE6A				
CTLA4	NBLA00301	SLC26A2				
ICOS	FBXO8	TIGD6				
PARD3B	KIAA1712	CSF1R				
NRP2	HPGD	PDGFRB				

INO80D	GLRA3	CDX1					
NDUFS1	ADAM29	SLC6A7					
GPR1	GPM6A	CAMK2A					
ZDBF2	WDR17	TCOF1					
ADAM23	SPATA4	CD74					
DYTN	ASB5	RPS14					
FASTKD2	VEGFC	NDST1					
CPO	NEIL3	SYNPO					
KLF7	AGA	MYOZ3					
CREB1	LOC285501	RBM22					
FAM119A	MGC45800	DCTN4					
CCNYL1	ODZ3	MST150					
FZD5	DCTD	ZNF300					
PLEKHM3	C4orf38	LOC134466					
CRYGD	WWC2	GPX3					
CRYGC	CDKN2AIP	TNIP1					
CRYGB	ING2	ANXA6					
CRYGA	RWDD4A	CCDC69					
IDH1	C4orf41	GM2A					
PIP5K3	STOX2	SLC36A3					
PTH2R	ENPP6	SLC36A2					
MAP2	IRF2	SLC36A1					
C2orf21	CASP3	FAT2					
RPE	CCDC111	SPARC					
C2orf67	MLF1IP	ATOX1					
ACADL	ACSL1	G3BP1					
MYL1	SLC25A4	GLRA1					
LANCL1	KIAA1430	NMUR2					
CPS1	SNX25	GRIA1					

LOC29034	LRP2BP	FAM114A2					
ERBB4	ANKRD37	MFAP3					
IKZF2	UFSP2	GALNT10					
SPAG16	C4orf47	SAP30L					
VWC2L	CCDC110	HAND1					
BARD1	PDLIM3	LARP1					
ABCA12	SORBS2	C5orf4					
ATIC	TLR3	CNOT8					
FN1	FAM149A	GEMIN5					
MREG	CYP4V2	MRPL22					
PECR	KLKB1	SGCD					
TMEM169	F11	TIMD4					
XRCC5	FAT1	HAVCR1					
MARCH4	ZFP42	HAVCR2					
SMARCAL1	TRIML2	MED7					
RPL37A	TRIML1	ITK					
IGFBP2		CYFIP2					
IGFBP5		ADAM19					
TNP1		SOX30					
DIRC3		C5orf52					
TNS1		LSM11					
RUFY4		CLINT1					
IL8RA		EBF1					
ARPC2		RNF145					
AAMP		UBLCP1					
TMBIM1		IL12B					
PNKD		ADRA1B					
SLC11A1		TTC1					
CTDSP1		PWWP2A					

GLYATL1	CCDC65	ITPK1	LMAN1L	RPL23A	DAZAP1	SPAG4L	NCRNA00161
FAM111B	FKBP11	MOAP1	ULK3	TLCD1	RPS15	BPIL3	N6AMT1
FAM111A	ARF3	C14orf142	MPI	NEK8	APC2	C20orf185	RNF160
DTX4	WNT10B	UBR7	C15orf17	TRAF4	C19orf25	C20orf186	RWDD2B
OSBP	WNT1	BTBD7	COX5A	C17orf63	REEP6	BASE	USP16
PATL1	PRKAG1	COX8C	RPP25	ERAL1	MBD3	C20orf71	CCT8
STX3	MLL2	KIAA1409	SCAMP5	FLOT2	UQCR	PLUNC	C21orf7
MRPL16	RHEBL1	PRIMA1	PPCDC	DHRS13	TCF3	C20orf114	C21orf109
GIF	DHH	FAM181A	C15orf39	PHF12	ONECUT3	CDK5RAP1	BACH1
TCN1	LMBR1L	ASB2	COMM4	SEZ6	ATP8B3	SNTA1	C21orf41
PLAC1L	TUBA1B	C14orf48	NEIL1	PIPOX	REXO1	CBFA2T2	GRIK1
MS4A3	TUBA1A	OTUB2	MAN2C1	MYO18A	KLF16	E2F1	NCRNA00110
MS4A2	TUBA1C	DDX24	SIN3A	CRYBA1	FAM108A1	PXMP4	CLDN17
MS4A6A	PRPH	IFI27L1	PTPN9	NUFIP2	ADAT3	ZNF341	
MS4A7	TROAP	IFI27	SNUPN	TAOK1	SCAMP4	CHMP4B	
MS4A14	DNAJC22	IFI27L2	IMP3	ABHD15	CSNK1G2	RALY	
MS4A5	SPATS2	PPP4R4	SNX33	TP53I13	BTBD2	EIF2S2	
MS4A1	MCRS1	SERPINA10	CSPG4	GIT1	MKNK2	ASIP	
MS4A12	FAM186B	SERPINA6	ODF3L1	ANKRD13B	MOBK2A	AHCY	
C11orf64	PRPF40B	SERPINA1	UBE2Q2	CORO6	AP3D1	ITCH	
MS4A8B	FMNL3	SERPINA9	FBXO22	SSH2	DOT1L	DYNLRB1	
MS4A15	TMBIM6	SERPINA12	NRG4	EFCAB5	SF3A2	MAP1LC3A	
MS4A10	KIAA1602	SERPINA5	C15orf27	CCDC55	OAZ1	PIGU	
CCDC86	BCDIN3D	SERPINA3	ETFA	SLC6A4	LSM7	TP53INP2	
GPR44	FAIM2	SERPINA13	ISL2	BLMH	SPPL2B	NCOA6	
PRPF19	AQP2	GSC	SCAPER	CPD	TMPRSS9	GGT7	
TMEM109	AQP5	DICER1	RCN2	GOSR1	TIMM13	ACSS2	
TMEM132A	AQP6	CLMN	PSTPIP1	CRLF3	LMNB2	GSS	
SLC15A3	RACGAP1	C14orf139	TSPAN3	ATAD5	GADD45B	MYH7B	

CD6	ACCN2	C14orf49	SGK269	C17orf42	GNG7	TRPC4AP
CD5	SMARCD1	GLRX5	C15orf5	ADAP2	DIRAS1	EDEM2
VPS37C	GPD1	TCL6	HMG20A	RNF135	SLC39A3	PROCR
PGA5	C12orf62	TCL1B	LINGO1	NF1	SGTA	MMP24
VWCE	LASS5	TCL1A	TBC1D2B	OMG	THOP1	EIF6
DDB1	LIMA1	C14orf132		EVI2B	ZNF554	FAM83C
DAK	LARP4	BDKRB2		EVI2A	ZNF555	UQCC
CYBASC3	DIP2B	BDKRB1		RAB11FIP4	ZNF556	GDF5
TMEM138	ATF1	ATG2B		C17orf79	ZNF57	CEP250
TMEM216	TMPRSS12	C14orf129		UTP6	ZNF77	C20orf173
FLJ12529	METTL7A	AK7		SUZ12	TLE6	ERGIC3
C11orf79	SLC11A2	PAPOLA		RHOT1	TLE2	FER1L4
SYT7	LETMD1	VRK1		RHBDL3	AES	SPAG4
DAGLA	CSRNP2	C14orf177		C17orf75	GNA11	RBM12
C11orf9	TFCP2	BCL11B		ZNF207	GNA15	NFS1
C11orf10	POU6F1	SETD3		PSMD11	NCLN	ROMO1
FEN1	DAZAP2	CCNK		CDK5R1	BRUNOL5	RBM39
FADS1	SMAGP	CCDC85C		MYO1D	NFIC	PHF20
FADS2	BIN2	CYP46A1		TMEM98	FZR1	C20orf152
FADS3	ELA1	EML1		SPACA3	C19orf28	EPB41L1
BEST1	GALNT6	EVL		ACCN1	HMG20B	C20orf4
FTH1	SLC4A8	YY1		CCL7	GIPC3	DLGAP4
INCENP	SCN8A	SLC25A29		CCL11	TBXA2R	MYL9
SCGB1D1	ANKRD33	C14orf68		CCL8	PIP5K1C	TGIF2
SCGB2A1	ACVRL1	WARS		CCL13	TJP3	C20orf24
SCGB1D2	ACVR1B	WDR25		TMEM132E	APBA3	SLA2
SCGB2A2	GRASP	BEGAIN		CCT6B	MRPL54	NDRG3
ASRGL1	C12orf44	DLK1		ZNF830	MATK	DSN1
SCGB1A1	LOC283404	MEG3		LIG3	ZFR2	C20orf117

AHNAK	KRT7	MEG8			RFFL	ATCAY	SAMHD1	
EEF1G	KRT81	DIO3			RAD51L3	ITGB1BP3	RBL1	
TUT1	KRT86	PPP2R5C			FNDC8	DAPK3	C20orf132	
MTA2	KRT83	DYNC1H1			NLE1	EEF2	RPN2	
EML3	KRT85	HSP90AA1			UNC45B	PIAS4	GHRH	
ROM1	KRT84	WDR20			AMAC1	ZBTB7A	MANBAL	
B3GAT3	KRT82	RAGE			SLFN5	MAP2K2	SRC	
GANAB	KRT75	ZNF839			SLFN11	CREB3L3	NNAT	
C11orf48	KRT6B	CINP			SLFN12	SIRT6	BLCAP	
UBXN1	KRT6A	TECPR2			SLFN13	ANKRD24	CTNBL1	
BSCL2	KRT5	ANKRD9			SLFN12L	CCDC94	VSTM2L	
GNG3	KRT71	RCOR1			SLFN14	FSD1	KIAA0406	
TTC9C	KRT74	TRAF3			PEX12	STAP2	RPRD1B	
ZBTB3	KRT72	AMN			AP2B1	MPND	TGM2	
POLR2G	KRT73	CDC42BPB			GAS2L2	SH3GL1	BPI	
TAF6L	KRT2	TNFAIP2			C17orf50	CHAF1A	LBP	
NXF1	KRT1	EIF5			MMP28	UBXN6	SNHG11	
STX5	KRT76	MARK3			TAF15	HMGF2	KIAA1219	
SLC3A2	KRT3				C17orf66	LRG1	ADIG	
CHRM1	KRT4				CCL5	SEMA6B	SLC32A1	
SLC22A6	KRT79				RDM1	TNFAIP8L1	ACTR5	
SLC22A24	KRT78				LYZL6	C19orf10	PPP1R16B	
SLC22A25	KRT8				CCL15	DPP9	FAM83D	
SLC22A10	KRT18				CCL16	TICAM1	DHX35	
SLC22A9	EIF4B				CCL14	M6PRBP1	LOC339568	
HRASLS5	TENC1				CCL23	ARRDC5	MAFB	
LGALS12	SPRYD3				CCL18	UHRF1	TOP1	
RARRES3	IGFBP6				CCL3	KDM4B	PRO0628	
HRASLS2	CSAD				ZNHIT3	PTPRS	PLCG1	

PLA2G16	ITGB7				MYO19	ZNRF4	ZHX3	
ATL3	MFSD5				PIGW	SAFB2	CHD6	
RTN3	ESPL1				GGNBP2	SAFB	PTPRT	
C11orf84	PFDN5				DHRS11	HSD11B1L		
MARK2	C12orf10				MRM1	LONP1		
NAT11	AAAS				LHX1	TMEM146		
COX8A	SP7				AATF	NRTN		
OTUB1	SP1				ACACA	FUT6		
MACROD1	AMHR2				C17orf78	FUT3		
FLRT1	PRR13				TADA2L	FUT5		
STIP1	PCBP2				DUSP14	NDUFA11		
FERMT3	MAP3K12				AP1GBP1	CAPS		
TRPT1	TARBP2				DDX52	RANBP3		
NUDT22	NPFF				HNF1B	RFX2		
DNAJC4	ATF7				MRPL45	ACSBG2		
VEGFB	ATP5G2				SOCS7	MLLT1		
FKBP2	CALCOCO1				ARHGAP23	ACER1		
PLCB3	HOXC13				SNIP	CLPP		
BAD	HOXC12				MLLT6	GTF2F1		
GPR137	HOXC11				CISD3	KHSRP		
C11orf20	HOXC10				PCGF2	SLC25A41		
ESRRA	HOXC9				PSMB3	SLC25A23		
PRDX5	HOXC8				PIP4K2B	CRB3		
RPS6KA4	HOXC6				CCDC49	DENND1C		
SLC22A11	HOXC5				RPL23	TNFSF9		
SLC22A12	HOXC4				LASP1	CD70		
NRXN2	SMUG1				FBXO47	TNFSF14		
RASGRP2	CBX5				PLXDC1	C3		
PYGM	HNRNPA1				CACNB1	TRIP10		

SF1	NFE2				RPL19	SH2D3A		
MAP4K2	COPZ1				LOC90110	VAV1		
MEN1	GPR84				FBXL20	EMR1		
EHD1	ITGA5				MED1	EMR4P		
ATG2A	GTSF1				CRKRS	ZNF557		
PPP2R5B	NCKAP1L				NEUROD2	INSR		
GPHA2	PDE1B				PPP1R1B	ARHGEF18		
BATF2	PPP1R1A				STARD3	PEX11G		
ARL2	LACRT				TCAP	MCOLN1		
SNX15	MUCL1				PNMT	PNPLA6		
SAC3D1	NEUROD4				PERLD1	XAB2		
NAALADL1	METTL7B				ERBB2	STXBP2		
CDCA5	ITGA7				C17orf37	C19orf59		
ZFPL1	BLOC1S1				IKZF3	FCER2		
C11orf2	CD63				ZBP2	CD209		
FAU	GDF11				GSDMB	CLEC4M		
MRPL49	CIP29				ORMDL3	EVI5L		
SYVN1	ORMDL2				GSDMA	LRRC8E		
CAPN1	DNAJC14				PSMD3	MAP2K7		
SLC22A20	MMP19				CSF3	SNAPC2		
POLA2	WIBG				MED24	TIMM44		
CDC42EP2	DGKA				THRA	ELAVL1		
DPF2	SILV				NR1D1	CCL25		
TIGD3	CDK2				CASC3	FBN3		
SLC25A45	RAB5B				RAPGEFL1	LASS4		
FRMD8	IKZF4				WIPF2	NDUFA7		
SCYL1	RPS26				CDC6	RPS28		
LTBP3	ERBB3				RARA	ANGPTL4		
SSSCA1	PA2G4				TOP2A	RAB11B		

YIF1A	TAC3				KRT13	S1PR2		
TMEM151A	MYO1A				KRT15	MRPL4		
RIN1	NAB2				KRT19	ICAM1		
BRMS1	STAT6				KRT9	ICAM4		
B3GNT1	LRP1				EIF1	ICAM5		
SLC29A2	SHMT2				GAST	FDX1L		
NPAS4	NDUFA4L2				HAP1	RAVER1		
MRPL11	STAC3				JUP	ICAM3		
PELI3	R3HDM2				SC65	TYK2		
DPP3	INHBC				FKBP10	CDC37		
BBS1	INHBE				NT5C3L	PDE4A		
ACTN3	GLI1				KLHL10	KEAP1		
CTSF	ARHGAP9				KLHL11	S1PR5		
CCDC87	MARS				ACLY	ATG4D		
CCS	DDIT3				TTC25	KRI1		
RBM14	DCTN2				CNP	CDKN2D		
RBM4	KIF5A				DNAJC7	SLC44A2		
RBM4B	PIP4K2C				NKIRAS2	ILF3		
SPTBN2	DTX3				DHX58	DNM2		
C11orf80	GEFT				KAT2A	CARM1		
RCE1					HSPB9	YIPF2		
LRFN4					RAB5C	C19orf52		
PC					KCNH4	SMARCA4		
SYT12					HCRT	LDLR		
RHOD					GHDC	SPC24		
KDM2A					STAT5B	KANK2		
ADRBK1					STAT5A	TSPAN16		
SSH3					STAT3	RAB3D		
POLD4					PTRF	LOC126075		

CLCF1					ATP6V0A1	LPPR2		
RAD9A					NAGLU	C19orf39		
PTPRCAP					COASY	EPOR		
CORO1B					MLX	RGL3		
CABP4					PSMC3IP	CCDC151		
TMEM134					FAM134C	PRKCSH		
AIP					TUBG1	ELAVL3		
PITPNM1					TUBG2	ZNF653		
CDK2AP2					PLEKHH3	ECSIT		
CABP2					CCR10	CNN1		
GSTP1					GNTNAP1	ACP5		
NDUFV1					EZH1	ZNF823		
TBX10					RAMP2	ZNF491		
ACY3					VPS25	ZNF439		
ALDH3B2					WNK4	ZNF700		
UNC93B1					GNTD1	ZNF433		
ALDH3B1					BECN1	ZNF20		
NDUFS8					PSME3	ZNF625		
TCIRG1					AOC2	ZNF136		
CHKA					AOC3	ZNF44		
SUV420H1					LOC388387	ZNF563		
C11orf24					G6PC	ZNF442		
LRP5					AARSD1	ZNF709		
SAPS3					RUNDC1	ZNF564		
GAL					RPL27	ZNF490		
MTL5					IFI35	ZNF791		
CPT1A					VAT1	MAN2B1		
IGHMBP2					RND2	C19orf56		
MRGPRF					BRCA1	MORG1		

P2RY6					HIGD1B	CC2D1A		
ARHGEF17					EFTUD2	PODNL1		
RELT					CCDC103	C19orf72		
FAM168A					GFAP	RFX1		
PLEKHB1					C1QL1	RLN3		
RAB6A					DCAKD	IL27RA		
MRPL48					NMT1	PRKACA		
CHCHD8					PLCD3	ASF1B		
PAAF1					ACBD4	LPHN1		
UCP2					HEXIM1	DDX39		
UCP3					HEXIM2	PKN1		
C2CD3					FMNL1	PTGER1		
PPME1					C17orf46	GIPC1		
P4HA3					MAP3K14	DNAJB1		
PGM2L1					PLEKHM1	GPSN2		
KCNE3					C17orf69	EMR3		
POLD3					CRHR1	ZNF333		
CHRD12					IMP5	EMR2		
RNF169					LOC100128977	OR7A5		
XRRA1					MAPT	OR7C2		
SPCS2					KIAA1267	SLC1A6		
NEU3					NSF	CCDC105		
SLCO2B1					WNT3	CASP14		
ARRB1					WNT9B	SYDE1		
RPS3					GOSR2	ILVBL		
KLHL35					GDC27	NOTCH3		
GDPD5					MYL4	EPHX3		
SERPINH1					ITGB3	BRD4		
MAP6					C17orf57	AKAP8		

					ATP5G1	MYO9B			
					UBE2Z	USE1			
					SNF8	NR2F6			
					GIP	C19orf62			
					IGF2BP1	ANKLE1			
					B4GALNT2	ABHD8			
					GNGT2	MRPL34			
					ABI3	GTPBP3			
					PHOSPHO1	PLVAP			
					ZNF652	BST2			
					PHB	FAM125A			
					NGFR	NXNL1			
					NXPH3	PGLS			
					SPOP	FAM129C			
					SLC35B1	GLT25D1			
					FAM117A	UNC13A			
					MYST2	MAP1S			
					TAC4	FCHO1			
					DLX4	B3GNT3			
					DLX3	INSL3			
					ITGA3	JAK3			
					PDK2	RPL18A			
					SAMD14	SLC5A5			
					PPP1R9B	CCDC124			
					SGCA	KCNN1			
					COL1A1	ARRDC2			
					TMEM92	IL12RB1			
					XYL2	MAST3			
					MRPL27	PIK3R2			

					DGKE	NCAN		
					TRIM25	TM6SF2		
					COIL	KIAA0892		
					SCPEP1	GATAD2A		
					AKAP1	NDUFA13		
					MSI2	CILP2		
					MRPS23	PBX4		
					CUEDC1	GMIP		
					VEZF1	ATP13A1		
					SFRS1	ZNF101		
					DYNLL2	ZNF14		
					EPX	LOC284440		
					MKS1	ZNF253		
					LPO	ZNF93		
					MPO	ZNF682		
					BZRAP1	ZNF90		
					RNF43	ZNF486		
					HSF5	ZNF626		
					MTMR4	ZNF85		
						Sep 04		
					C17orf47	ZNF714		
					TEX14	ZNF431		
					LOC645545	ZNF708		
					RAD51C	ZNF493		
					PPM1E	ZNF429		
					TRIM37	ZNF100		
					FAM33A	ZNF43		
					PRR11	ZNF257		
					C17orf71	ZNF98		
						ZNF492		

Anhang Tabelle 4. Signalwege in N1 Primärtumoren und der LKM. Die einzigartigen Alterationen der N1 Primärtumore und der LKM mit repräsentativen Genen die wichtige Rollen in Krebs-assoziierten Signalwegen spielen.

Krebs-assoziierte Signalwege der N1 Primärtumore	
Gen Symbol	Gen Name
CASP3	caspace 3, apoptosis-related cysteine peptidase
FGF10	fibroblast growth factor 10
COL4A2	collagen, type IV, alpha 2
FOXO1	forkhead box O1
RAF1	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
EGF	epidermal growth factor
TP53	tumor protein p53
RASSF1	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1
MLH1	mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)
FGF5	fibroblast growth factor 5
FLT3	fms-related tyrosine kinase 3
PDGFRA	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide
TGFB2	transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)
WNT5A	wingless-type MMTV integration site family, member 5A
BMP2	bone morphogenetic protein 2
RB1	retinoblastoma 1
CTNNA1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa
PIK3R5	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 5
NFKB1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
MITF	microphthalmia-associated transcription factor
LAMB2	laminin, beta 2 (laminin S)
COL4A1	collagen, type IV, alpha 1
KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
FGF11	fibroblast growth factor 11
DVL2	dishevelled, dsh homolog 2 (Drosophila)
VEGFC	vascular endothelial growth factor C
RARB	retinoic acid receptor, beta
FGF9	fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor)
RHOA	ras homolog family member A
FGF2	fibroblast growth factor 2 (basic)
PPARG	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
VHL	von Hippel-Lindau tumor suppressor, E3 ubiquitin protein ligase
WNT7A	wingless-type MMTV integration site family, member 7A
SKP2	S-phase kinase-associated protein 2, E3 ubiquitin protein ligase
APPL1	adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1
HHIP	hedgehog interacting protein
LEF1	lymphoid enhancer-binding factor 1
FGF14	fibroblast growth factor 14
BRCA2	breast cancer 2, early onset
CRK	v-crck sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)
IL8	interleukin 8
CCNA1	cyclin A1
MAPK10	mitogen-activated protein kinase 10
Chemokine-signaling Signalwege der LKM	
Gen Symbol	Gen Name
VAV3	vav 3 guanine nucleotide exchange factor
CCL24	chemokine (C-C motif) ligand 24
CCL26	chemokine (C-C motif) ligand 26
NRAS	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
RAP1A	RAP1A, member of RAS oncogene family

ADCY4	adenylate cyclase 4
GNG3	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 3
RAC1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)
ADCY3	adenylate cyclase 3
GNAI3	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 3

Anhang Tabelle 5. Signalwege der Gene in Clustergruppe B. Diese Tabelle gibt einen Überblick über die Gene der signifikanten CNAs der Clustergruppe B, welche in Krebs-assoziierte Signalwege involviert sind.

Verlust		Verlust		Verlust		Loss		Zugewinn		Verlust		Zugewinn				
2q11-2q35	4q12-4q35	5q11-5q35	9p24-9p13	9q33-9q34	10q11-10q23	11p11	11q12-11q13	12q13	17q11-17q25	19p13-19p12	20q11-20q12					
IL1R1 CXCR4 ACVR1 BMPR2 EDAR INHBB IL18RAP IL1R2 ACVR2A IL1A IL1B IL18R1 GLI2 WNT6 FN1 PAX8 RALB WNT10A ITGA6 STAT1 ITGAV FZD5 CASP8 FZD7	CXCL9 CXCL10 TLR2 SPP1 CXCL11 TLR3 IL8 NFKB1 MAPK10 CXCL9 CXCL5 CXCL13 CXCL3 CXCL6 CXCL2 PF4 PPBP	IL3 IL6ST TSLP PIK3R1 IL13 IL4 IL9 SPRY4 CSF2 IL5 IL12B	IFNE IFNA8 IFNA2 IL11RA IFNB1 IFNK CNTFR IFNW1 JAK2	LAMC3 TRAF1 TRAF2 RXRA	MAPK8 NCOA4 RET NCOA4	DDB2 CD82	POLA2 POLD3 RNASEH2 POLD4 FEN1 BAD CCND1 FGF4 WNT11 RELA GSTP1 FADD FGF3 VEGFB MAP4K2 MAP3K11 ARRB1 RPS6KA4 RASGRP2 CCND1 LRP5 WNT11 PPP2R5B FOSL1 PLCB3	WNT1 DHH WNT10B GLI1 AMHR2 INHBC INHBE SP1	CCL7 CCR10 CCL16 CCL15 CCL23 CCR7 STAT5B CCL5 GRB2 CCL8 GNGT2 CCL14 CCL13 CCL3 STAT3 CCL18 CCL11 MAP3K3 CACNG4 CACNA1G NF1 TAOK1 NLK PRKCA RAC3 DUSP14 GRB2 CACNG5 CACNB1	PIAS4 IL12RB1 EPOR JAK3 TYK2 PIK3R2 MAP2K7 CACNA1A GADD45B ECSIT MKNK2 PRKACA MAP2K2 JUND VAV1 PRKACA SHC2 GNG7 PIK3R2 CCL25	GDF5 ID1 RBL1 BCL2L1 E2F1					

Anhang Tabelle 6. Potentielle therapeutische Ziele der N1 Primärtumore. Diese Tabelle zeigt Gene der isolierten Alterationen der N1 Primärtumore auf, welche in Krebs-assoziierte Signalwege involviert sind und zusätzlich eine mögliche therapeutische Zielstruktur darstellen.

Cytoband	Gene symbol	Drug name	Drug status	Drug type	Indication
3p14	WNT5A	Box-5	Investigative	Antibody	Melanoma
3p21	RHOA	ES-285	Phase 1	Inhibitor	Solid tumors
3p22	MLH1	HG-1068	Investigative	Antibody	Cancer
3p24	TGFBR2	TGF-BR2 mAb	Phase 1	Antibody	Cancer
3p25	VHL	STF-62247	Investigative	Antibody	Renal cell carcinoma
3p25	PPARG	IDR-105	Approved	Modulator	Diabetes mellitus
3p25	PPARG	FARGLITAZAR (+5 Inhibitors)	Phase 3	Inhibitor	Diabetes mellitus
3p25	WNT7A	FT-301	Investigative	Inhibitor	Muscle wasting disease
4q21	FGF5	AS-902330	Phase 2	Modulator	Arthropathy
4q24	NFKB1	P54	Phase 2	Modulator	Cancer
4q34	VEGFC	VGX-100	Phase 1	Modulator	Solid tumors
5p12	FGF10	Repifermin	Phase 2	Modulator	Oral mucositis
5p13	LIFR	Emfilermin	Phase 1/2	Inhibitor	Infertility
5p13	GHR	Sermorelin (+1 Binder)	Approved	(Binder)	Growth hormone deficiency
13q12	FLT3	Ponatinib (+1 Modulator)	Approved	Modulator	ALL
13q12	FLT3	PLX-3397 (+ 2 Inhibitors)	Phase 3	Inhibitor	Hematological malignancies
13q12	FLT3	BMS-690514 (+ 5 Inhibitors)	Phase 2	Inhibitor	Cancer
13q12	FLT3	4SC-203 (+3 Inhibitors)	Phase 1	Inhibitor	Solid tumors
13q14	FOXO1	AS-1708727	Investigative	Modulator	Hypertriglyceridemia
13q33	FGF14	Immunotoxin conjugate	Investigative	Inhibitor	Solid tumors
13q12	FLT1	VATALANIB	Phase 2	Inhibitor	Pancreatic cancer
17p13	CRK	ARRY-614	Phase 1	Modulator	Myelodysplastic syndromes
17p13	TP53	Cenersen	Phase 2	Antisense	ALL
20p12	BMP2	DWP-431	Phase 3	Modulator	Bone development disorder

Anhang Tabelle 7. Gene der isolierten LKM-Zugewinne im Abgleich mit der *Therapeutic Targets Database*. Die Gene die auf den chromosomalen Zugewinnen der LKM liegen, stellen teilweise therapeutische Zielstrukturen dar.

Cytoband	Gene symbol	Drug Name	Drug status	Drug Type	Indication
1p13	SARS	Indinavir	Approved	Inhibitor	HIV Infection
1p13	CSF1	Filgrastim	Approved	Modulator	Neutropenia
1p13	CSF1	GTP-14564	Investigative	Inhibitor	Discovery Agent
1p13	CHIA	Ecopipam (+ 82 Inhibitors)	Approved	Inhibitor	Parkinson's Disease
1p13	CHIA	Odapipam (+ 11 Antagonists)	Approved	Antagonist	Parkinson's Disease
1p13	KCND3	CDE-5498	Investigative	Antagonist	Heart arrhythmia
1p13	TSPAN2	BI-836826 (+ 1 Antibody)	Phase 1	Antibody	CLL, Cancer
1p13	TSPAN2	Anti-CD9 mAb	Investigative	Antibody	Gastric cancer
1p13	NGF	Lestaurtinib	Approved	Inhibitor	Leukemia
1p13	NGF	PF-4383119	Phase 3	Antagonist	HCC
1p13	NGF	MEDI-578	Phase 1	Antibody	Pain
1p13	NGF	NT-3	Phase 2	Modulator	Constipation
1p13	CD58	PDL-241	Investigative	Antibody	Immune disorder
1p13	NOTCH2	Tarextumab	Phase 2	Antibody	Pancreatic cancer
2p23	POMC	(Dihydromorphine)	Investigative	<i>(Agonist)</i>	Discovery Agent
2p23	OTOF	SAR228810	Phase 1	Antibody	Alzheimer's disease
2p23	KHK	JNJ-28165722	Investigative	Inhibitor	Diabetes mellitus
2p23	PREB	Daporinad	Phase 2	Inhibitor	Leukemia
2p23	CAD	N-(Phosphonacetyl)-L-Aspartic	Investigative	Inhibitor	Discovery Agent

		Acid			
7p22	PDGFA	CNVN-202	Phase 1/2	Suppressor	Non-small cell lung cancer
7p22	GPER	G15 (+1 Antagonist)	Investigative	Antagonist	Discovery Agent
7p22	SDK1	4-	Phase 2	Inhibitor	Discovery Agent
7p22	SDK1	KAI-9803	Phase 1/2	Inhibitor	Acute myocardial infarction
7p22	PMS2	HG-1077	Investigative	Inhibitor	Cancer
7p22	RAC1	EHT-1864	Investigative	Inhibitor	Alzheimer's disease
7p22	RAC1	Selective Rac1/1b GTPase nucleotide binding inhibitors	Investigative	Inhibitor	Cancer
7q11	HIP1	(AQX-1125)	Phase 2	(Agonist)	COPD
7q11	POR	Encapsulated cells	Phase 2	Modulator	Breast cancer
7q11	POR	DuP-630	Investigative	Modulator	Dermatitis
7q11	POR	DuP-983	Investigative	Modulator	Pruritus
7q11	HSPB1	SB-242235	Phase 2	Inhibitor	Arthritic
7q11	HSPB1	OGX-427	Phase 2	Antisense	Breast cancer
11q12	CNTF	NT-501 CNTF	Phase 1/2	Modulator	Ovarian cancer
11q12	GIF	ISO-1	Phase 1	Inhibitor	Discovery Agent
11q12	GIF	Anti-MIF antibodies	Phase 4	Inhibitor	Autoimmune disease
11q12	GIF	ISIS 112690 (+ 17 Inhibitors)	Investigative	Inhibitor	Discovery Agent
11q12	CD6	Itolizumab	Phase 3	Antibody	Diabetes mellitus type 1

11q12	CD5	MAT-304	Investigative	Antibody	Autoimmune disease
11q12	SCGB1D2	HG-1182	Investigative	Inhibitor	Cancer
11q12	ASRGL1	GRASPA	Phase 2/3	Modulator	Leukemia
11q12	ASRGL1	Calaspargase pegol	Phase 3	Modulator	Leukemia
11q12	SLC3A2	IGN523	Phase 1	Antibody	Leukemia
11q12	CHRM1	(AM-831)	Phase 1	(<i>Agonist</i>)	Schizophrenia
11q12	SLC22A6	Probenecid	Approved	Blocker	Hyperuricemia ; Gout
11q12	SLC22A6	FLUORESCEN	Approved	Inhibitor	Ocular disease
11q12	SLC22A6	Bupropion+zonisamide	Phase 2	Blocker	Obesity
11q12	SLC22A6	ADIPATE (+ 4 Inhibitors)	Investigative	Inhibitor	Discovery Agent
12q14	CDK4	Capridine-beta	Approved	Inhibitor	Psoriasis
12q14	CDK4	LEE011	Phase 3	Inhibitor	Cancer
12q14	CDK4	LY2835219	Phase 3	Modulator	Cancer
12q14	CDK4	Palbociclib	Phase 3	Regulator	Cancer
12q14	CDK4	BAY 10-00394 (+ 4 Inhibitors)	Phase 2	Inhibitor	Cancer
12q14	CDK4	AG-024322 (+ 5 Inhibitors)	Phase 1	Inhibitor	Cancer
12q14	CDK4	R547 (+ 1 Inhibitor)	Phase 1	Inhibitor	Solid tumors
12q14	MDM2	CGM097 (+ 2 Inhibitors)	Phase 1	Inhibitor	Solid tumors
12q14	MDM2	JNJ-26854165 (+ 7 Modulators)	Phase 1	Modulator	NSCLC + Prostate cancer
12q14	MDM2	AMG 232 (+ 1 Modulator)	Phase 1/2	Modulator	Cancer
12q14	MDM2	NU-8231 (+ 3 Inhibitors)	Investigative	Inhibitor	Discovery Agent
13q13	POSTN	FT-201	Investigative	Inhibitor	Insulin

					dependent diabetes
14q12	NEDD8	MLN4924	Phase 1	Inhibitor	Advance malignancies
14q12	CTSG	Aloxistatin	Phase 3	Inhibitor	Neurological disease
14q12	CTSG	compound 1 (+ 2 Inhibitors)	Investigative	Inhibitor	Discovery Agent
14q12	CTSG	CEP-18770	Phase 1/2	Inhibitor	Discovery Agent
14q12	CTSG	Dermolastin (+1 Inhibitor)	Phase 2	Inhibitor	Atopic Dermatitis

Anhang Tabelle 8. Potentielle therapeutische Ziele der Clustergruppe B. Die Tabelle zeigt die Ergebnisse des Abgleichs der Krebs-assoziierten Gene der Clustergruppe B.

Cytoband	Gene symbol	Drug name	Drug status	Drug type	Indication
2q11-2q35	CXCR4	SURADISTA (+6 Modulators)	Investigative	Modulator	Cancer
2q11-2q35	FN1	AS1409	Phase 1	Binder	Melanoma
2q11-2q35	CASP8	Glionitrin A	Investigative	Modulator	Cancer
4q12-4q35	TLR3	HspE7 (TLR3 agonist adjuvant)	Phase1/2	Agonist	Anal intraepithelial neoplasia
4q12-4q35	CXCL2	Laquinamod	Phase 3	Modulator	Multiple Sclerosis
4q12-4q35	IL4	PRX-321	Phase 2	Agonist	Brain Cancer, Kidney Cancer, Lung Cancer
9p24-9p13	IL11RA	Oprelvekin	Approved	Binder	Severe thrombocytopenia
9p24-9p13	CNTFR	PegCNTF	Phase 1	Agonist	Obesity
9p24-9p13	CNTFR	CNTF	Phase 3	Agonist	Obesity
9q33-9q34	RXRA	(5BETA)-PREGNANE-3,20-DIONE (+3 Inhibitors)	Experimental	Inhibitor	-
17q11-17q25	STAT3	Acitretin	Approved	Inhibitor	Psoriasis
17q11-17q25	STAT3	Atiprimod (+3 Inhibitors)	Phase 2	Inhibitor	Multiple myeloma, Cancer, Solid Tumors
17q11-17q25	ERBB2	Trastuzumab (+4 Antibodys)	Approved (rest Phase 2)	Antibody	Breast Cancer
17q11-17q25	ERBB2	Lapatinib (+ 18 Inhibitors)	Approved (rest Phase 2)	Inhibitor	Breast Cancer
19p13-	JAK3	Tofacitinib (+3	Approved	Inhibitor	Rheumatoid Arthritis

19p12		Inhibitors)	(rest Phase 2)		
19p13- 19p12	TYK2	BI-853520	Phase 1	Inhibitor	Solid Tumors
20q11- 20q12	E2F1	ARQ 761	Phase 1	Modulator	Solid Tumors

Danksagung

Meiner Doktormutter PD Dr. med. Anja Lachenmayer bin ich für die Bereitstellung des interessanten Themas, der hervorragenden Betreuung und die vielen interessanten und unterstützenden Gespräche sehr dankbar. Insbesondere hervorheben möchte ich Ihr außerordentliches Engagement, welches die reine Betreuung dieses Promotionsprojektes überstieg und mir die Gelegenheit ermöglichte einen Forschungsaufenthalt im Mount Sinai Hospital New York wahrzunehmen, so wie eine Förderung dieser Promotion durch ein Stipendium der Düsseldorf School of Oncology zu erlangen. Die Möglichkeit meine Ergebnisse auf nationalen und internationalen Kongressen vorzustellen verdanke ich ebenfalls PD Dr. med. Anja Lachenmayer. Bei Herrn Prof. Nikolas Stoecklein möchte ich mich ebenfalls für die Betreuung dieses Projektes, der Möglichkeit die Forschungsarbeiten in seinem Institut und Labors durchführen zu dürfen, so wie der unverzichtbaren und wichtigen fachlichen Anmerkungen bedanken. Auch Ihm gebührt mein Dank zur Erlangung eines Stipendiums für dieses Promotionsprojekt. Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Birte Moehlendick! Ihre täglichen Hilfestellungen im Labor, die vielen geduldigen Stunden die Sie aufgebracht hat, um mir die experimentellen Methoden im Labor beizubringen, die Hilfe bei der Auswertung der Daten und ebenso die vielen unvergesslichen Erlebnisse außerhalb der Institutsräume waren für mich unverzichtbar zur Erstellung dieser Dissertation. Ohne Sie hätte diese Dissertation mit Sicherheit nicht in dieser Form erstellt werden können. Neben Ihr möchte ich mich auch bei den vielen netten Mitarbeitern des chirurgischen Forschungslabors des UKD Düsseldorf bedanken. Sie habe steht's dafür gesorgt, dass ich mich wohl Gefühlt habe und viel Spaß im Labor hatte. Ein weiterer Dank geht an Dr. Tsaba Toth, der ebenso wie die Mitarbeiter des Instituts für Pathologie und Cytopathologie des UKD Düsseldorfs verantwortlich für die Bereitstellung der ICC-Gewebeproben war. Herrn Bartenhagen danke ich für die Hilfestellung im Bereich der Bioinformatik, wodurch die Ergebnisse der Genanalysen überhaupt erst in ein verständliches Format gebracht wurden.

Der allergrößte Dank gilt Viola, meiner Schwester und meinen Eltern. Hier habe ich steht's Rückhalt und Motivation erfahren, welche für mich sehr wichtig zur Fertigstellung dieser Doktorarbeit gewesen sind.