

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus der Inneren Klinik (Tumorforschung)

Molekulare Charakterisierung von  
Cholangiokarzinomen mit Fokus auf DNA  
Schadensreparaturgene in einem onkologischen  
Spitzenzentrum

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin

durch die Medizinische Fakultät

der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von

Ilektra-Antonia Mavroëidi

aus Amarousio Attikis

2023

# DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT  
DUISBURG  
ESSEN

*Offen im Denken*

ub | universitäts  
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

**DOI:** 10.17185/duepublico/81561

**URN:** urn:nbn:de:hbz:465-20240307-095911-1

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Herr. Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter/in: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Siveke
2. Gutachter/in: Herr Univ.-Prof. Dr. phil. nat. G. E. Iliakis

Tag der mündlichen Prüfung: 26 Januar 2024

Aus den Inhalten dieser Arbeit entstanden folgende Präsentationen und publizierte Abstracts:

1. `Molekulare Charakterisierung von Cholangiokarzinomen mit Fokus auf DNA Schadensreparaturgenen in einem onkologischen Spitzenzentrum`, Vortrag auf dem Kongress Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie, Hamburg, 2023
2. `DNA damage repair in biliary tract cancer: a new target for precision medicine`, Posterpräsentation auf dem ESMO 2023 Kongress, Madrid, 2023
3. `DNA Schadenreparaturgene in Cholangiokarzinomen: Retrospektive Analyse im Westdeutschen Tumorzentrum`, Posterpräsentation auf dem 35. Deutschen Krebskongress 2022, Berlin
4. `Focusing on the DDR gene pathway: molecular characterization of biliary tract cancer at a single comprehensive cancer center`, Posterpräsentation auf dem Internistischen Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM) 2023, Wiesbaden
5. `DNA repair mechanisms in tumorigenesis: their study in cholangiocarcinoma`, Vortrag auf dem Kongress `16th Oncologic Congress: Oncology meets other specialties`, 2022, Athen

# INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	6
1.1.Epidemiologie	6
1.2 Pathogenese	8
1.3. Histologie	9
1.4. Diagnosestellung	10
1.5. Klassifikation	10
1.6. Therapie	14
1.7. Molekulare Pathogenese	17
1.8. DNA Schadesreparaturmechanismen	24
2. Fragestellungen	33
3. Material und Methoden	34
4. Ergebnisse	41
4.1. Patientenkohorte	41
4.2. Molekulare Subgruppen	46
4.3. Vergleichende Kohortenanalyse mittels cBioPortal Daten	53
4.4. Therapieregime	57
4.5. Time on Treatment und gesamtes Überleben	61
5. Diskussion	63
6. Schlussfolgerungen	69
7. Zusammenfassung	70
Abstract	71
8. Literatur	72
9. Anhang	85
9.1 Abbildungsverzeichnis	85
9.2 Tabellenverzeichnis	87

9.3. Abkürzungsverzeichnis	88
Lebenslauf	90

## **1. EINLEITUNG**

Biliäre Karzinome oder Cholangiokarzinome (CCC) entstehen durch maligne Transformation des Epithels der Gallengänge. Sie werden nach ihrer Lokalisation in intrahepatische (ICC), extrahepatische (ECC), perihiläre (PCC, Klatskin-Tumoren) Karzinome der Gallengänge und Karzinome der Gallenblase (GBC) unterteilt. Cholangiokarzinome machen 3% aller Tumorneuerkrankungen aus, deshalb sind sie eine seltene Tumorentität (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021). Aufgrund ihrer komplizierten Lokalisation, die den diagnostischen Verfahren schwer zugänglich ist, blieb ihre Zuordnung lange uneinheitlich. Daher zeigen CCC Unterschiede in ihrer Pathogenese und Prognose. Im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten ist die molekulare Pathogenese der CCC zudem weniger gründlich erforscht, weshalb zielgerichtete Therapien nicht standardmäßig zum Einsatz kommen. Dies trägt zusammen mit anderen Faktoren zu einer ungünstigen Prognose bei.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Analyse der molekulargenetischen Charakteristika einer monozentrischen Kohorte von 113 Patient\*innen mit CCC in fortgeschrittenem oder palliativem Stadium und die Korrelation mit klinischen und histopathologischen Eigenschaften, dem Gesamtüberleben und dem klinischen Verlauf.

### **1.1. Epidemiologie**

Die Entität der CCC macht 15% aller primären Lebertumore und 3% aller gastrointestinalen Tumore aus (Banales et al., 2020). In Deutschland treten jährlich ungefähr 8.000 biliäre Karzinome auf (Robert-Koch Institut, 2021) (Abb. 1). In westlichen Ländern zeigte sich in den letzten Jahrzehnten eine zunehmende Inzidenz der intrahepatischen biliären Karzinome; dies steht im Gegensatz zu extrahepatischen Tumoren, deren Inzidenz unverändert bleibt. In asiatischen Ländern blieb die Inzidenz im Wesentlichen unverändert (Robert-Koch Institut, 2021). Die geographische Variabilität korreliert mit der Ätiologie und

Pathophysiologie; in westlichen Ländern treten CCC mit einer Inzidenz von 0.3-3.5/100.000 Einwohnern seltener auf als in asiatischen Ländern, in denen sie in Zusammenhang mit infektiösen Agenzien stehen. Zudem ist die Inzidenz in Ländern mit häufigen Trematoden-Leberinfektionen erhöht (Rizvi et al., 2013).

Inzidenz	2017		2018		Prognose für 2022	
	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer
Neuerkrankungen	2.830	2.480	2.700	2.380	2.500	2.600
rohe Neuerkrankungsrate <sup>1</sup>	6,8	6,1	6,4	5,8	5,9	6,3
standardisierte Neuerkrankungsrate <sup>1,2</sup>	3,2	3,6	3,0	3,5	2,7	3,6
mittleres Erkrankungsalter <sup>3</sup>	77	75	77	74		
Mortalität	2017		2018		2019	
	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer
Sterbefälle	2.072	1.727	2.017	1.706	2.031	1.691
rohe Sterberate <sup>1</sup>	4,9	4,2	4,8	4,2	4,8	4,1
standardisierte Sterberate <sup>1,2</sup>	2,1	2,5	2,1	2,4	2,1	2,3
mittleres Sterbealter <sup>3</sup>	79	76	79	76	79	76
Prävalenz und Überlebensraten	5 Jahre		10 Jahre		25 Jahre	
	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer
Prävalenz	3.600	3.800	5.800	5.500	9.800	8.300
absolute Überlebensrate (2017–2018) <sup>4</sup>	14 (9–16)	17 (15–19)	11 (7–12)	11 (10–15)		
relative Überlebensrate (2017–2018) <sup>4</sup>	17 (11–20)	20 (18–24)	17 (11–20)	17 (15–24)		

**Abbildung 1:** Zusammenstellung der wichtigsten epidemiologischen Daten für Deutschland nach dem letzten veröffentlichten Bericht des Robert Koch Instituts 2019, 1: je 100.000 Personen, 2: altersstandardisiert, 3: Median, 4: Prozentual

Die Analyse der Altersverteilung zeigt über die vorangegangenen Jahre einen Anstieg des Manifestationsalters und der Inzidenz für intrahepatische CCC. Mögliche Gründe hierfür sind verbesserte diagnostische Methoden und die Alterung der Bevölkerung. Das mediane Erkrankungsalter liegt mit 72 Jahren für Männer und 78 Jahren für Frauen fast ein Jahrzehnt später als bei anderen Tumorentitäten. Im Gegensatz dazu ist die Mortalität bei Gallenblasenkarzinomen sinkend. Frauen sind nahezu gleich häufig betroffen wie Männer, es gelingt keine Identifikation von geschlechtsspezifischen Prognosefaktoren (Sinn et al., 2021). CCC haben mit einer absoluten 5-Jahres-Überlebensrate zwischen 10% und 17%

eine ungünstige Prognose. Aufgrund der steigenden Überlebenserwartung ist ein weiterer Anstieg der Inzidenz zukünftig noch zu erwarten (Sinn et al., 2021).

## 1.2.Pathogenese

Die Pathogenese von biliären Karzinomen ist komplex und unterscheidet sich je nach der Tumorlokalisation (ICC, ECC, PCC, GBC). Faktoren wie proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren, infektiöse Agentien, Gallensäure sowie genetische Aberrationen deregulieren die intrazellulären Signalübertragungswege und wirken als prädisponierende Faktoren (Blechalz et al., 2017)

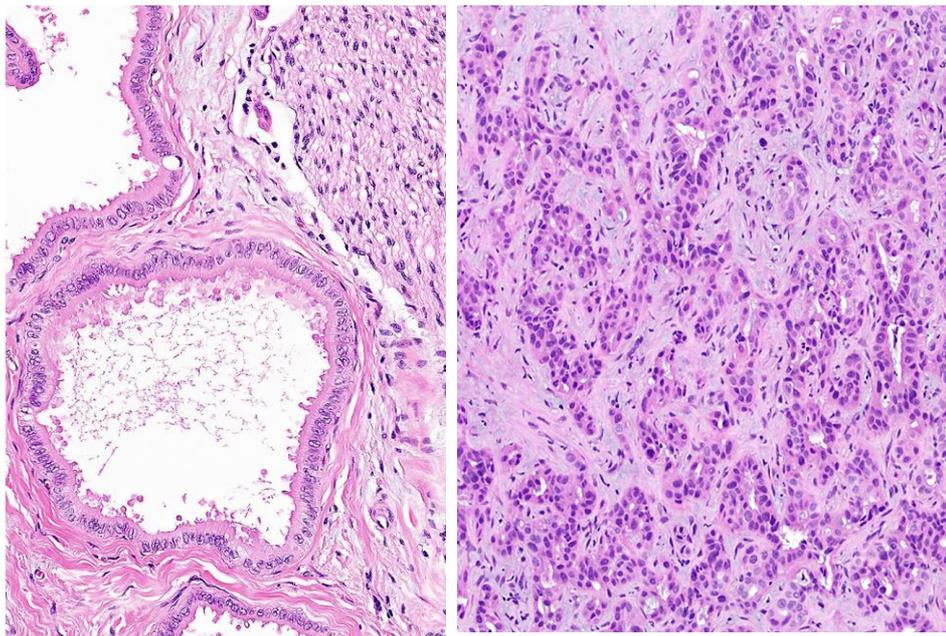
Ein höheres Lebensalter ist einheitlich der Hauptrisikofaktor bei allen Subtypen. Bei ICC zeigt sich ein Zusammenhang des Auftretens mit Lebererkrankungen, wie zum Beispiel Leberzirrhose, Hepatitis B- oder C-Infektionen, sowie mit Risikofaktoren wie Alkohol- und Nikotinkonsum, Steatosis hepatis und Diabetes mellitus. Zudem kann eine Cholezystolithiasis (ab einer Steingröße von >3 cm, bei cholesterinhaltigen Steinen gegebenenfalls schon ab >1.5 cm) präkanzerös wirken. Die Ätiologie unterscheidet sich für ICC zudem nach dem Typ der Vorläuferzellen des Gallengangepithels (small und large duct ICC), da die large duct Typ ICC in ihren Risikofaktoren den ECC ähneln (Ghoury et al., 2015). Zu den prädisponierenden Faktoren für die Entstehung von ECC zählen chronische Entzündungen der Gallengänge, insbesondere die primär sklerosierende Cholangitis, Strikturen der Gallenwege (Gallenwegszysten, Caroli-Syndrom, Malformationen der Gallenwege wie das Mirizzi-Syndrom) sowie parasitäre Infektionen (*Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis*) (Ghoury et al., 2015)

Präkanzerosen für Gallenblasenkarzinome sind die Porzellangallenblase sowie Polypen der Gallenblase (ab  $\geq 1$  cm). Zudem ist eine vormalige Applikation des Röntgenkontrastmittels Thorotrast ein Risikofaktor (Ghoury et al., 2015)

### 1.3.Histologie

Histologisch treten am häufigsten Adenokarzinome mit biliärer Differenzierung, duktal-tubulärem Wachsmuster und erheblicher Stromadesmoplasie auf. Immunhistologisch exprimieren diese Tumoren in der Regel MUC1 (EMA), CK7, CK19 und CA19-9 (Ghouri et al., 2015). Nach ihrer morphologischen Nähe zu normalen cholangiolen Zellen und Gallengängen werden die biliären Karzinome als gut, moderat oder schlecht differenziert (G1-3) klassifiziert. Seltener sind adenosquamöse Karzinome, gemischte neuroendokrine-nicht neuroendokrine Tumoren (MiNEN), Plattenepithelkarzinome und undifferenzierte, spindelzellige oder sarkomatoide Varianten.

Die ICC vom small duct Typ manifestieren sich an den kleinen Gallengängen und bilden eine kohärente Tumormasse aus; im Gegensatz dazu bilden sich die ICC vom large duct Typ sowie die ECC hilusnah und zeigen ein großglanduläres, duktal-tubuläres Wachsmuster und ein periduktales Infiltrationsmuster (Ghouri et al., 2015) (Abb. 2).



**Abbildung 2:** Histologische Bilder vom ICC vom large und small duct Typ (Vazzano et al., 2021)

## 1.4 Diagnosestellung

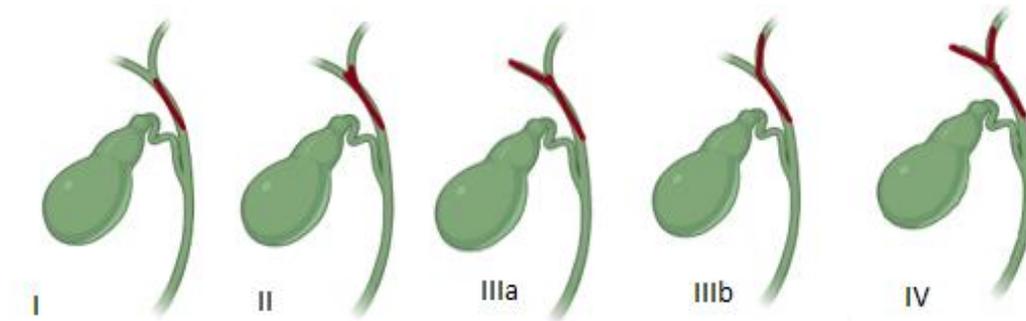
Die ungünstige Prognose der CCC liegt in der verspäteten klinischen Manifestation der Tumore, der aggressiven Tumorbilogie und Herausforderungen in der Diagnostik und lokal-ablativen Therapie. Erst bei lokal fortgeschrittener Krankheit treten Symptomen wie Ikterus, Cholangitis, Erbrechen und Oberbauchschmerzen auf. Seltener lässt sich eine Raumforderung im rechten Oberbauch abtasten (Courvoisier Zeichen) oder Aszites feststellen. Die ECC sind zwar seltener, lösen aber frühzeitig eine Galleabflussstörung aus, welche zu einer früheren Diagnose führen kann.

Die kontrastmittelgestützte Schnittbilddiagnostik (MRT und/oder CT) ist die Methode der ersten Wahl zur Diagnosestellung und gegebenenfalls Ausbreitungsdiagnostik. Eine invasive Diagnostik mittels Endoskopisch Retrograder Cholangiopankreatikographie (ERCP) oder Endosonografie (EUS) mit Feinnadelaspirationszytologie wird bei unklaren Fällen durchgeführt.

Die Resektabilität der CCC ist bildmorphologisch häufig schwer evaluierbar und bei multilokalem Befall ist die Biopsie unter Umständen nicht wegweisend. Aus diesen Gründen stellt sich häufig die Indikation für eine explorative Laparotomie, auch in diagnostischer Intention.

## 1.5 Klassifikation

Anhand der Tumorlokalisation werden ICC, ECC, PCC und GBC unterschieden. Die ICC entstehen im Leberparenchym, wohingegen die ECC unterhalb der Hepatikusgabel liegen. Die perihilären Karzinome zeigen eine komplizierte Anatomie und unterliegen einer eigenen Unterteilung; der modifizierten Bismuth-Corlette-Klassifikation. Gemäß dieser Klassifikation werden perihiläre Karzinome anhand der Beteiligung des Ductus hepaticus in Typen I-IV unterteilt. Früher wurden diese auch als Klatskin Tumore benannt. Die aktuell Bismuth-Corlette Klassifikation ist in Abb. 3 dargestellt.



**Abbildung 3:** Typ I: Tumor liegt knapp unterhalb der Hepatikushauptgabel, Typ II: der Tumor bezieht die Hepatikushauptgabel gerade mit ein. Typ IIIa und IIIb: der Tumor betrifft den rechten bzw. linken Hepatikushauptast, der jeweils andere Ast ist frei. Typ IV: der Tumor betrifft beide Hepatikushauptäste (Bismuth-Corlette Klassifikation). Erstellt in Biorender.com

Da eine Einteilung der Cholangiokarzinome vormals uneinheitlich war, war eine genaue Charakterisierung der CCC schwer durchführbar. Zu den ECC wurden zum Beispiel oftmals auch die Gallenblasenkarzinome gezählt und Klatskin Tumore fälschlicherweise gelegentlich ICC oder ECC zugeordnet. Die Klassifikation der Ausdehnung der CCC erfolgt auf Basis der *Union for International Cancer Control (UICC)/American Joint Committee on Cancer (AJCC)* nach TNM Kriterien (*Tumor, Lymph nodes, Metastases*) (Sinn et al., Onkopedia, 2021) (Tab. 1-4).

Als regionäre Lymphknoten werden auch nach der Lokalisation der Primärtumoren verschiedene Lymphknotenstationen gewertet. Für die ICC werden als regionäre Lymphknoten definiert:

i) für die rechte Leberseite: hiläre Lymphknoten entlang des Ductus choledochus, der A. hepatica communis, der V. portae und des Ductus cysticus, periduodenale und peripankreatische Lymphknoten

ii) für die linke Leberseite: hiläre und gastrohepatische Lymphknoten

Lymphknoten-Metastasen zöliakal und/oder paraaortal und paracaval gelten als Fernmetastasen.

Nach UICC klinische Stadieneinteilung der ICC			
Stadium	T	N	M
I	T1	N0	M0
Ia	T1a	N0	M0
Ib	T1b	N0	M0
II	T2	N0	M0
IIIa	T3	N0	M0
IIIb	T4	N0	M0
	jedes T	N1	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1

**Tabelle 1:** Stadieneinteilung der intrahepatischen Cholangiokarzinome.

Als regionäre Lymphknoten für die GBC gelten hiläre Lymphknoten entlang des Ductus choledochus, des Ductus cysticus, der A. hepatica, der V. portae, zöliakale Lymphknoten und Lymphknoten entlang der A. mesenterica superior

Nach UICC klinische Stadieneinteilung der GBC			
Stadium	T	N	M
Ia	T1a	N0	M0
Ib	T1b	N0	M0
Iia	T2a	N0	M0
Iib	T2b	N0	M0
IIIa	T3	N0	M0
IIIb	T1, T2, T3	N1	M0
Iva	T4	N0, N1	M0
IVB	Jedes T	N2	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

**Tabelle 2:** Stadieneinteilung der Gallenblasenkarzinome.

Perihiläre Karzinome der Gallengänge sind in den extrahepatischen Gallengängen bis zur Einmündung des Ductus cysticus lokalisiert. Als regionäre Lymphknoten für sie gelten hiläre Lymphknoten und pericholedochale Lymphknoten im Ligamentum hepatoduodenale.

Nach UICC klinische Stadieneinteilung der perihilären CCC			
Stadium	T	N	M
I	T1a	N0	M0
II	T2a, T2b	N0	M0
IIIa	T3	N0	M0
IIIb	T4	N0	M0
IIIc	Jedes T	N1	M0
Iva	Jedes T	N2	M0
IVB	Jedes T	Jedes N	M1

**Tabelle 3:** Stadieneinteilung der perihilären Cholangiokarzinome.

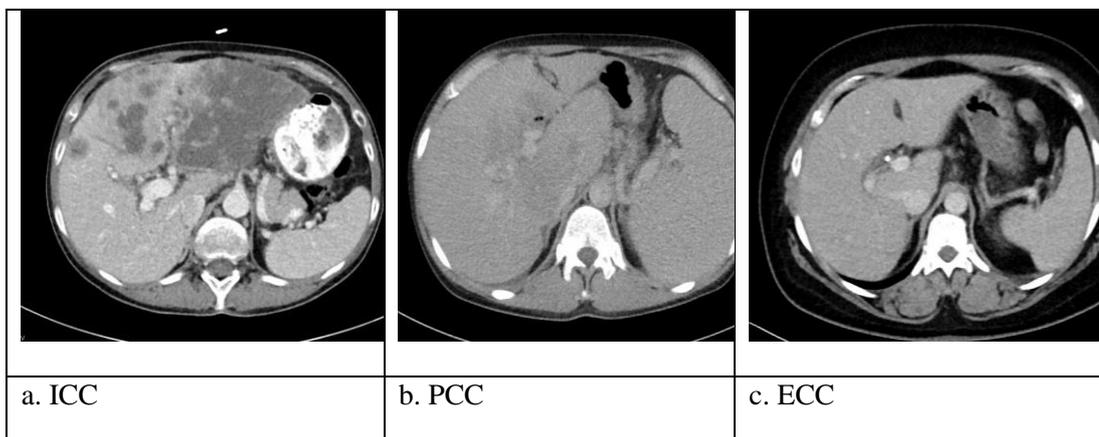
Bei ECC zählen als regionäre Lymphknotenregionen die Lymphknoten entlang des Ductus choledochus und der A. hepatica, alle in Richtung des Truncus coeliacus gelegene Lymphknoten, anteriore und posteriore pankreaticoduodenale Lymphknoten sowie Lymphknoten entlang der V. und A. mesenterica superior.

Nach UICC klinische Stadieneinteilung der ECC			
Stadium	T	N	M
Ia	T1	N0	M0
IIa	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIb	T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
IIIa	T1, T2, T3	N2	M0

Nach UICC klinische Stadieneinteilung der ECC			
Stadium	T	N	M
IIIb	T4	Jedes N	M0
IV	Jedes T	Jedes N	

**Tabelle 4:** Stadieneinteilung der extrahepatischen Cholangiokarzinome.

In Abb. 4 sehen wir CT-Bilder von Patienten der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kohorte mit ICC (a), PCC (b) und ECC (c)



**Abbildung 4:** CT Bilder von Patient\*innen unserer Kohorte mit CCC an unterschiedlichen anatomischen Lokalisationen.

## 1.6 Therapie

Die chirurgische R0 Resektion stellt den einzigen kurativen Therapieansatz dar und sollte nach Ausschluss von klaren Kontraindikationen erwogen werden. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt nach R0 Resektion zwischen 20% und 50% (Sinn et al., 2021). Kontraindikationen für eine operative Resektion entstehen durch eine bilaterale oder multifokale Manifestation sowie Komorbiditäten. Wegen der ungünstigen Prognose und der Schwierigkeit, bildmorphologisch die Resektabilität einzuschätzen, sollte nichtsdestotrotz großzügig die Indikation für eine Operation gestellt werden.

Bei ICC ist eine Leberteileresektion durch Segmentresektion, eine Hemihepatektomie oder erweiterte Hemihepatektomie die Methode der Wahl. Bei ausgedehnten Tumoren, deren Resektion zu einer deutlichen Reduktion des verbleibenden Lebervolumens führt, kann eine ipsilaterale präoperative Pfortaderembolisation zur Augmentation des verbleibenden Lebergewebes erforderlich sein. Bei perihilären Karzinomen kommen ähnliche Prozeduren in Betracht. Bei ECC ist eine pyloruserhaltende Pankreatikoduodenektomie (PPPD) oder eine konventionelle Pankreaskopfresektion nach Kausch-Whipple möglich, letztere ist für diesen Fall das Standardtherapieverfahren. Bei inzidentellen Gallenblasenkarzinomen nach Cholezystektomie ist ab einem Stadium  $\geq$  T1b innerhalb der nächsten 45 Tage eine onkologische Nachresektion durchzuführen. Als relevante Risikofaktoren für das Auftreten eines Rezidivs gelten Lymphknotenmetastasen, R1-Status (postoperativ mikroskopischer Residualtumor) und ein niedriger Differenzierungsgrad (G3). Patient\*innen mit erhöhtem Rezidivrisiko könnten von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren (Jarnagin et al., 2001)

Die BILCAP Studie hat die adjuvante Chemotherapie mit Capecitabin über 6 Monate bei Patient\*innen nach kompletter kurativ intendierter Resektion (R0/1) eines biliären Karzinoms etabliert (Primrose et al., 2019). Demgegenüber zeigte sich in anderen Studien (PRODIGE-12-ACCORD, 18-UNICANCER GI, BCAT) kein Überlebensvorteil durch den Einsatz einer adjuvanten Chemotherapie mit Gemcitabin-haltigen Chemotherapie-Schemata im Vergleich zur alleinigen Nachbeobachtung (Edeline et al., 2019). Nicht eindeutig geklärt ist die Rolle einer adjuvanten Strahlentherapie, die sich vor allem für Patient\*innen mit Lymphknotenfiliae und nach R1-Resektion eignen kann.

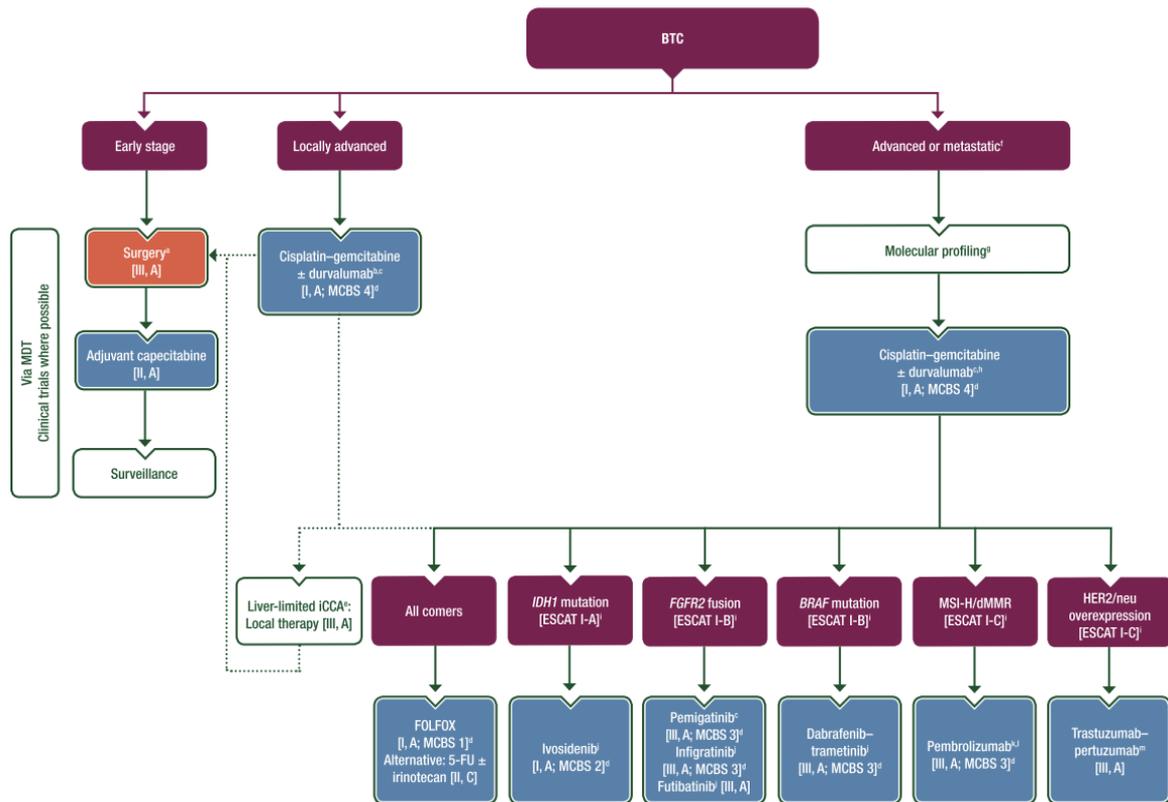
Neoadjuvante Therapiestrategien sind aktuell im Rahmen von Studien evaluiert und kommen klinisch bei grenzwertig irresektablen Fällen zum Einsatz (Konversionstherapie) (Wang et al., 2019)

Bei lokal fortgeschrittenen inoperablen CCC können auch lokale Therapieverfahren eingesetzt werden. Die wichtigsten umfassen die direkte Ablation, Radiofrequenzablation (RFA), Mikrowellenablation (MWA), CT-

gesteuerte Hochdosis-Brachytherapie (CT-HDRBT), transarterielle Ablation, transarterielle Chemoembolisation (TACE), Selektive Interne Radiotherapie (SIRT), intraarterielle Chemotherapie (HAI) und Chemosaturation (Labib et al., 2017)

Bei irresektabler oder metastasierter Krankheit ist die Therapieintention palliativ. Die Therapie richtet sich nach dem Allgemeinzustand (ECOG Status) und der Symptomatik; erste Wahl ist eine systemische Therapie, welche seit 2022 basierend auf den Ergebnissen der TOPAZ Studie die Kombination von Cisplatin, Gemcitabin und Durvalumab verwendet (Do-Youn et al, 2022) (Abb.5). Bei Patient\*innen in einem reduzierten Allgemeinzustand (ECOG  $\geq 2$ ) kann alternativ eine Kombination von Oxaliplatin mit Gemcitabin oder eine Gemcitabin Monotherapie erfolgen.

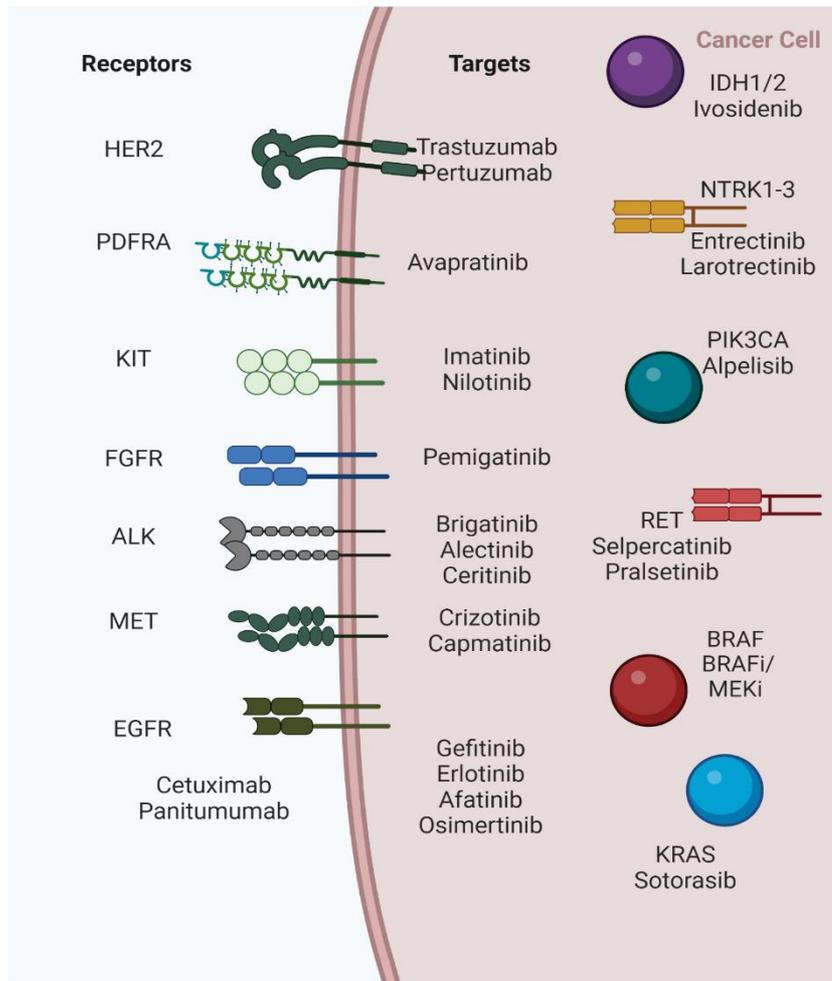
Bei ausbleibender Wirkung oder Progress kann eine Therapie mit einer zweiten Chemotherapielinie erwogen werden, wofür die aktuellen Leitlinien keine offizielle Empfehlung aussprechen. Zuletzt ergab die ABC-06 Studie Hinweise auf positive Effekte für eine Kombinationstherapie mit Oxaliplatin und 5-Fluorouracil/Folinsäure (Neuzillet et al., 2019). Alternativ können eine Monotherapie (5-FU/Capecitabin oder Irinotecan) oder Kombinationstherapien aus 5-FU/ Capecitabin in Kombination mit Irinotecan/ Oxaliplatin zum Einsatz kommen. In einer Metaanalyse von Lamarca *et al.* zeigte sich ein moderater Nutzen für eine Zweitlinientherapie mit einem medianen Gesamtüberleben von 7 Monaten (Lamarca et al, 2017). Finale Ergebnisse von aktuellen Studien, die Kombinationen von nanoliposomalem Irinotecan mit 5-FU/FS beziehungsweise von Gemcitabin, Oxaliplatin und 5-Fluorouracil untersuchen, stehen aktuell noch aus.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung des Therapiealgorithmus für Cholangiokarzinome (Vogel et al., 2023)

## 1.7 Molekulare Pathogenese

Heutzutage bieten molekulargenetische Untersuchungen die Grundlage dafür, gezielte Therapieansätze in Erwägung zu ziehen (Abb. 6). Für die molekularpathologische Diagnostik sind die Entnahme eines repräsentativen Tumorgewebes und eine anschließende Untersuchung der DNA, in der Regel mittels *Next Generation Sequencing* (NGS), erforderlich. Bei CCC werden die molekulargenetischen Untersuchungen wegen der ungünstigen Prognose und der schnellen Entwicklung von Resistenzmechanismen empfohlen. Hierbei sollte die entsprechende Diagnostik spätestens parallel zur Erstlinientherapie erfolgen, um die Möglichkeit einer zielgerichteten Therapie bei Progress zu prüfen. In prospektiven Studien wie der MOSCATO-01 Studie konnten bei bis zu 40% der Patient\*innen genetische Alterationen nachgewiesen werden, für die potentielle zielgerichtete Therapien erwogen werden könnten (Verlingue et al., 2017)



**Abbildung 6:** Gewebespezifische und agnostische Angriffsziele für Arzneimittel, die für einen Einsatz als gezielte Therapien in Frage kommen. Erstellt in Biorender.com.

Die Einführung der NGS ermöglicht die Klassifizierung von CCC in molekulare Untergruppen mit unterschiedlichen genomischen Profilen, die adressierbar sein könnten. Dazu trägt die Erfahrung aus anderen Tumorentitäten bei, bei denen viele Mutationen bereits als therapeutische Ziele etabliert sind und eine Wirksamkeit in der therapierefraktären Situation zeigten (Abb. 6).

Charakteristisch für intrahepatische Cholangiokarzinome sind Mutationen von **IDH1/2**, **BAP1**, **ARID1A**, **PBRM1** sowie Genumlagerungen oder -Fusionen von **FGFR2**. **KRAS** Mutationen und der Verlust von **CDKN2A** wurden bei

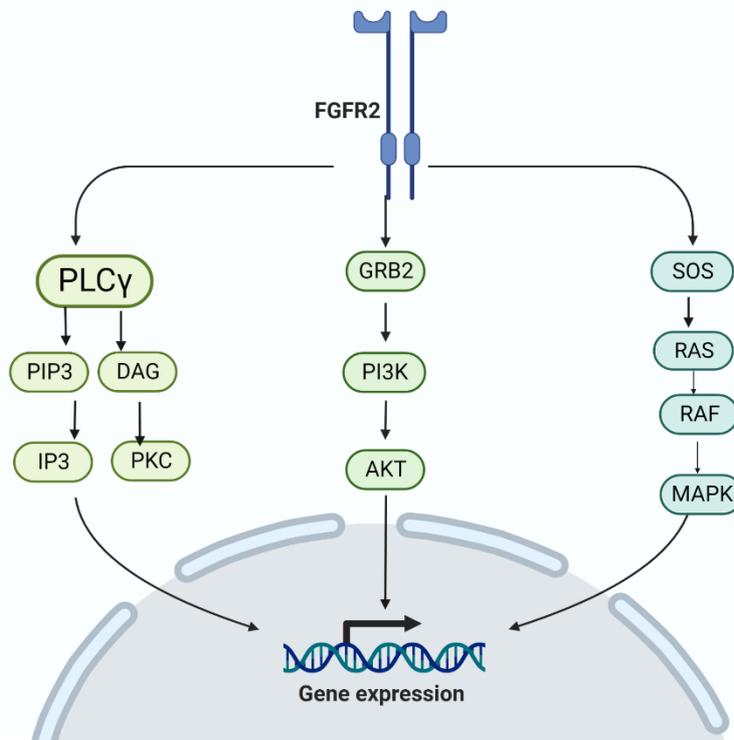
extrahepatischen Cholangiokarzinomen am häufigsten beschrieben. Die GBC zeigen eine erhöhte Inzidenz einer **Her2/neu** Expression und insgesamt ein geringeres Maß an Mutationen im Vergleich zu anderen Subtypen. **TP53** und **SMAD4** Änderungen manifestieren sich mit erhöhter Frequenz bei GBC und ECC. Es werden hier keine prozentualen Häufigkeitsangaben der oben genannten Mutationen angegeben, da eine eindeutige Diskrepanz unter den Studien besteht; ursächlich hierfür sind die pathogenetischen Unterschiede je nach der untersuchten Bevölkerungsgruppe, die unterschiedlichen angewandten molekularen und analytischen Methoden und der Mangel an etablierter Molekulardiagnostik für CCC. Zum Beispiel treten IDH1/2 Mutationen aufgrund einer überwiegend entzündlichen Pathogenese nur bei 4-5% der Patient\*innen in asiatischen Populationen auf, wohingegen ihr Anteil bis zum 18% in westlichen Populationen beträgt (Valle et al., 2017). Mutationen von TP53 oder RAS-Genen treten hingegen häufig auf und sind nicht lokalisationspezifisch (National Cancer Institute, 2021). Seltener sind NTRK-Fusionen, Mikrosatelliten-Instabilität (MSI-H/dMMR) oder HER2-Überexpression und -Amplifikationen.

Die häufigsten und adressierbaren Mutationen werden nachfolgend ausführlicher beschrieben:

#### a. **FGFR**

Ca. 15% der intrahepatischen biliären Karzinome weisen Alterationen des Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptors (FGFR) auf, die zur Aktivierung verschiedener tumorimmanenter Signalwege wie RAS/RAF/MEK, PIK3/AKT/MTOR und JAK/STAT führen (Javle et al., 2016) (Abb. 7). Die Gruppe der FGF Rezeptoren besteht aus vier Transmembran-Tyrosinkinase Rezeptoren (FGFR 1-4) und 22 FGFs. In der einarmigen **FIGHT 2** Studie konnte für Patient\*innen mit FGFR2 Fusionen oder Umlagerungen (*Rearrangement*) nach mindestens einer Vortherapie, für **Pemigatinib**, einen FGFR2 Inhibitor, eine objektive Ansprechrate von 35.5% gezeigt werden (38/146 Patient\*innen). Als Konsequenz wurde Pemigatinib für nicht kurativ behandelte Cholangiokarzinome mit FGFR2 Fusion oder *Rearrangement* zugelassen (Abou-Alfa et al., 2020).

Andere Inhibitoren, die sich in klinischen Studien auszeichnen, sind: **Infigratinib** (CBGJ398X2204, ORR 23%) (Pritisch et al., 2020), **Derazantinib** (ORR 21 %) (Mazzafero et al., 2019), **Futibatinib** (TAS-120) (FOENIX-101 rekrutiert) (Goyal et al., 2019). Ein weiterer von der FDA zugelassener Inhibitor für die Therapie des metastasierten Harnblasenkarzinoms mit FGFR2/3 Mutationen ist **Erdafitinib**, welcher unter 87 Patient\*innen eine ORR von 32% zeigte (Loriot et al., 2019).

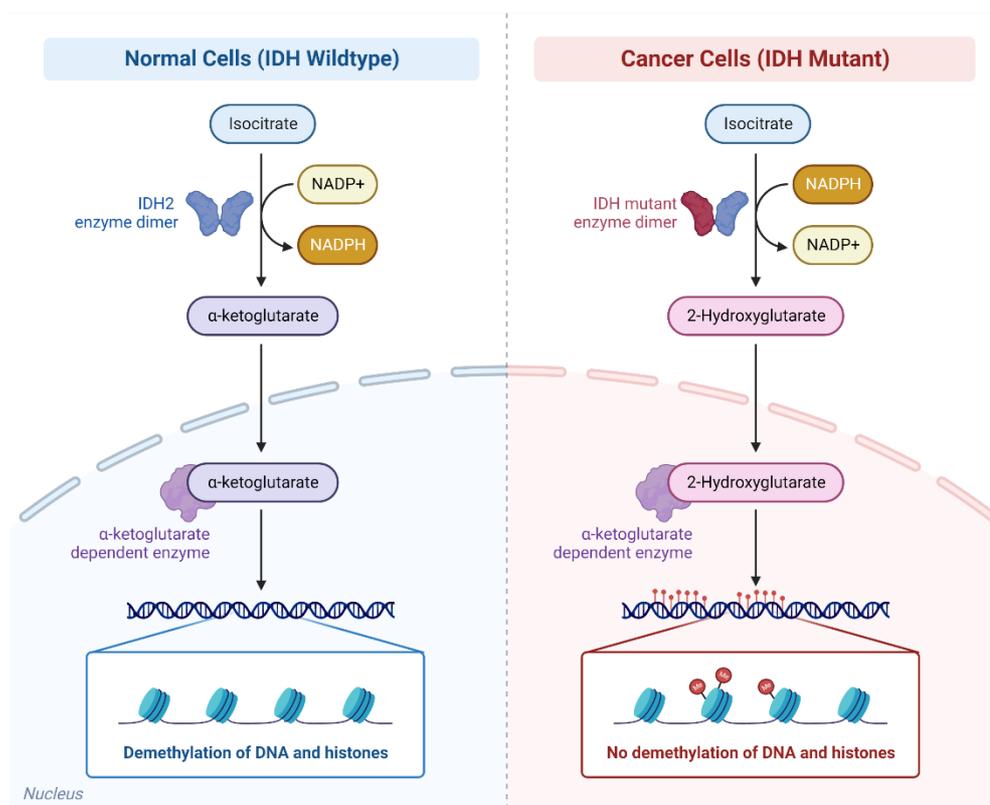


**Abbildung 7:** Schematische Darstellung des FGFR Signalwegs. Erstellt in Biorender.com.

## b. IDH1/2

Isocitratdehydrogenase 1 und 2 (IDH1/2) sind Enzyme, die den Stoffwechsel, die DNA-Reparatur und die epigenetische Modulation regulieren (Abou-AlfaGK., 2020). IDH1/2 katalysiert normalerweise die Umwandlung von Isocitrat in  $\alpha$ -Ketoglutarat. Allerdings führen IDH1/2 Mutationen zu einer erhöhten Produktion von 2-Hydroxyglutarat (2HG) (Abb. 8). Infolgedessen werden eine abnorme DNA- und Histon-Methylierung sowie epigenetische Veränderungen ausgelöst. Mutationen von IDH1/2 liegen bei ca. 15-25% aller intrahepatischen biliären Karzinome in westlichen Ländern vor. In der **ClarIDHy** Studie, einer randomisierten doppelblinden Phase III Studie, ließ sich für den selektiven oralen

IHD-1 Inhibitor Ivosidenib (AG-120) eine signifikante Verbesserung des progressionsfreien Überlebens zeigen (HR 0.37; Median 2.7 versus 1.4 Monate,  $p < 0.0001$ ). Die Gesamtüberlebensrate wurde ebenfalls verlängert (HR 0.69; Median 10.8 vs 9.7 Monate;  $p = 0.06$ ). In einer weiteren präklinischen Studie wurde nachgewiesen, dass 2-HG, welches infolge von IDH1/2-Mutationen gebildet wird, die homologe Rekombination unterdrückt und eine Empfindlichkeit gegenüber PARP-Inhibitoren (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) hervorruft (Leslie et al., 2017). Eine aktuelle Phase-II-Studie rekrutiert Patient\*innen mit rezidivierten/refraktären fortgeschrittenen soliden Tumoren mit IDH1/2-Mutationen für eine Therapie mit Olaparib und Durvalumab (NCT03991832).

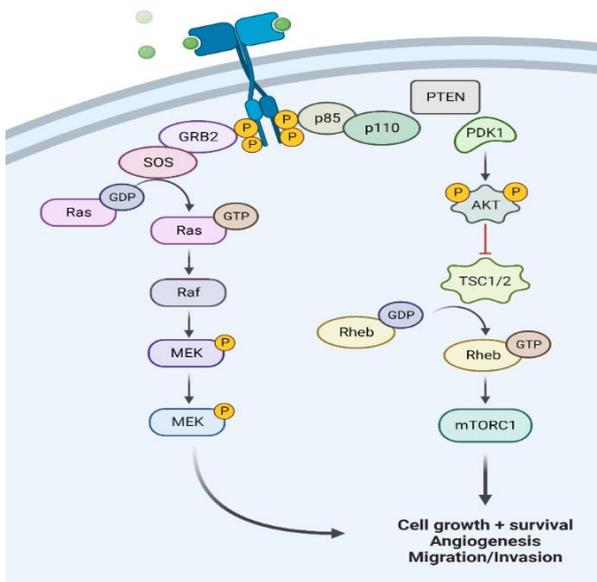


**Abbildung 8:** Schematische Darstellung des IDH Signalwegs. Erstellt in Biorender.com.

### c. Ras/Raf/MAPK Signalweg

Der Ras/Raf/MAPK Signalweg ist eine Signaltransduktionskaskade, die durch das G-Protein Ras sukzessiv die Proteine Raf, MEK und daraufhin die MAP Kinase aktiviert, die durch verschiedene Transkriptionsfaktoren den Zellzyklus antreibt. Die häufigsten Mutationen in diesem Signalweg betreffen die KRAS und BRAF

Gene und sind bekannte Treiber für das Tumorwachstum. Bei Patient\*innen mit einer BRAF-V600E-Mutation (5% der CCC und überwiegend in ICC) zeigte die Kombination aus dem MEK-Inhibitor **Trametinib** und dem BRAF-Inhibitor **Dabrafenib** in einer kleinen Kohorte 43 vorbehandelter Patient\*innen (überwiegend ICC) eine klinisch relevante Effektivität mit einer Gesamtansprechrage von circa 50 % (22/43 Patient\*innen) (ROAR Studie) (Subbiah et al. 2016). Offiziell besteht noch keine Zulassung. 131 erwachsene Patient\*innen aus den offenen, kohortenübergreifenden Studien **BRF117019** (NCT02034110) und **NCI-MATCH** (NCT02465060) wurden ebenfalls mit dieser Kombination behandelt. Die ORR lag für CCC bei 46% (95% CI: 31% - 61%). Im gleichen Signalweg sind auch andere Moleküle wie die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) und die extrazelluläre signalregulierte Kinase (ERK) vorhanden, die ebenfalls Ziel von spezifischen Therapien sein können. Selumetinib, ein MEK-Inhibitor, wurde in Kombination mit Cisplatin/Gemcitabin in einer Phase-Ib-Studie sowie in einer Phase II Studie untersucht; es ergaben sich keine Hinweise auf bessere ORR oder ein besseres PFS (Subbiah, 2020) (Abb. 9).



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung des MAPK/ERK Signalwegs, Erstellt in Biorender.com.

#### d. MSI

Die Mikrosatellitenstabilität (MSI) gehört zu den DNA-Schadenreparaturmechanismen der Zellen, die im Folgenden separat vorgestellt werden, da ihre Funktionsweise ausführlicher untersucht und bekannter ist. Sollte eine Mikrosatelliteninstabilität (defiziente Mismatch Reparatur=dMMR) vorliegen (1%), sollte bei Patient\*innen mit CCC **Pembrolizumab** zum Einsatz kommen (Eso, 2020).

In prospektiven Studien kleiner Kohorten wurden zudem Immuntherapien beim fortgeschrittenen biliären Karzinom untersucht. Hierbei zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse. Einerseits zeigte Nivolumab in einer Kohorte von 34 Patient\*innen und mit  $\geq 2$  Vortherapien eine ORR von 17% (5/29) und ein PFS von 3,5 Monaten (Klein et al., 2020). Andererseits zeigte Pembrolizumab in einer ähnlichen Kohorte von 104 Patient\*innen eine ORR von 5,8% (ClinicalTrials.gov).

In der **Keynote** Studie wurde der Mismatch-Repair (MMR)/MSI-Status bestimmt (Finn et al., 2020). 22 Patient\*innen wurden als MSI gewertet und nach einer Therapie mit Pembrolizumab betragen die ORR in dieser Gruppe 40.9%, das PFS 4,2 Monate und das OS 24.3 Monate (Durham et al., 2017)

#### e. Andere adressierbare Genveränderungen

Der HER-Signalweg besteht aus vier Rezeptoren (HER1/EGFR, HER2, HER3, HER4), die als Homo- oder Hetero-Dimere auftreten. Dies führt zu einer nachgeschalteten Aktivierung mehrerer Signalwege, darunter die MAPK- und PI3K/AKT-Signalwege. 10-27% der extrahepatischen Gallengangs- und Gallenblasenkarzinome zeigen eine Überexpression von HER2/neu, so dass eine HER2-Blockade als potentiell effektiver Therapieansatz in Einsatz kommt (Jeong et al., 2017). Im Rahmen von **MyPathway** wurden Patient\*innen mit vorbehandelten, HER2 amplifizierenden und/oder überexprimierenden, biliären Karzinomen mit einer dualen Rezeptorblockade aus Trastuzumab und Pertuzumab behandelt. Es wurde eine ORR von 23% (Javle et al., 2021).

Genfusionen unter Beteiligung der NTRK-Gene (NTRK1, NTRK2, NTRK3) zählen zu einer seltenen Subgruppe, die mehrere Signalwege steuert, die in

Zellproliferation, Invasion und Angiogenese beteiligt sind (Ricciuti et al., 2017). Für diese Signalwege werden **Larotrectinib und Entrectinib** in Rahmen von Basket Studien überprüft und etablieren sich als erste agnostische Tumorbehandlung (die unabhängig von der Tumorentität auf die molekulare Pathogenese wirken) (Drilon et al., 2018)

Der **PI3K/AKT/mTOR** Signalweg reguliert die Progression des Zellzyklus, die Proliferation und die Angiogenese und interagiert mit dem RAS/RAF/MEK-Signalweg durch mTOR. Alterationen in diesem Signalweg treten häufig bei extrahepatischen biliären Karzinomen auf. **Everolimus**, ein mTOR-Inhibitor, hat in einer Phase-II-Studie eine bescheidene Wirksamkeit gezeigt, PFS betrug 3.2 Monate und mOS 7.7 Monate (Lau et al., 2018).

Die VEGF-Signalübertragung führt über die Neovaskularisierung und Zellproliferation zur Tumorentstehung und ist mit einer erhöhten Manifestation von intrahepatischen Metastasen bei ICC assoziiert. Therapien mit Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Cediranib, Cabozantinib, Sunitinib, Vandetanib, Sorafenib und Regorafenib haben bis dato keine vielversprechenden Ergebnisse ergeben (Rizvi, 2018)). Zuletzt zeigen Studien mit Kombinationstherapien aus **Lenvatinib und Pembrolizumab** (Cherry-Bohannon et al., 2012) oder **Atezolizumab und Cobimetinib** Hinweise auf ein besseres Ansprechen (Dummer et al., 2022).

Das Protein **p53** ist ein Tumorsuppressor und die TP53 Mutationen treten bei 60% aller Tumorerkrankungen auf und sind mit einer schlechteren Prognose verbunden, deshalb sind sie ein Schwerpunkt der onkologischen Forschung. Bei mutiertem p53 können die Zellen ihre Entartung nicht reparieren und daraufhin entwickelt sich die Malignität. Aktuell bleiben die p53 Mutationen jedoch noch schwerer adressierbar. (Rizvi et al., 2018)

## 1.8 DNA-Schadensreparaturmechanismen

Humane Zellen verfügen über mehrere Reparaturmechanismen, um DNA Schäden beseitigen zu können. Diese umfassen die folgenden Mechanismen: (1) Basenfehlpaarungsreparatur (Mismatch-Reparatur=MMR), (2) Basen-Exzisions-

Reparatur (BER), (3) Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER), (4) Homologe Rekombinations-Reparatur (HRR), (5) Nicht-homologe End-Ligation (NHEJ), (6) Checkpoint-Faktor (CPF), (7) FANC-kodierende Reparatursysteme (FA) und (8) variable DNA-Synthese (TLS). Im Zuge der Zellzykluskontrolle können Kontrollproteine die Zellen, deren DNA als defekt erkannt wird, in Zyklusarrest setzen (G<sub>0</sub>-Phase) oder ihren programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten (Clancy et al., 2018). Die Hauptreparaturmechanismen werden nachfolgend erläutert und in der Abb.12 grafisch dargestellt.

### **a) Einzelstrang-Schadensreparatur**

#### **Basenexzisionsreparatur (BER):**

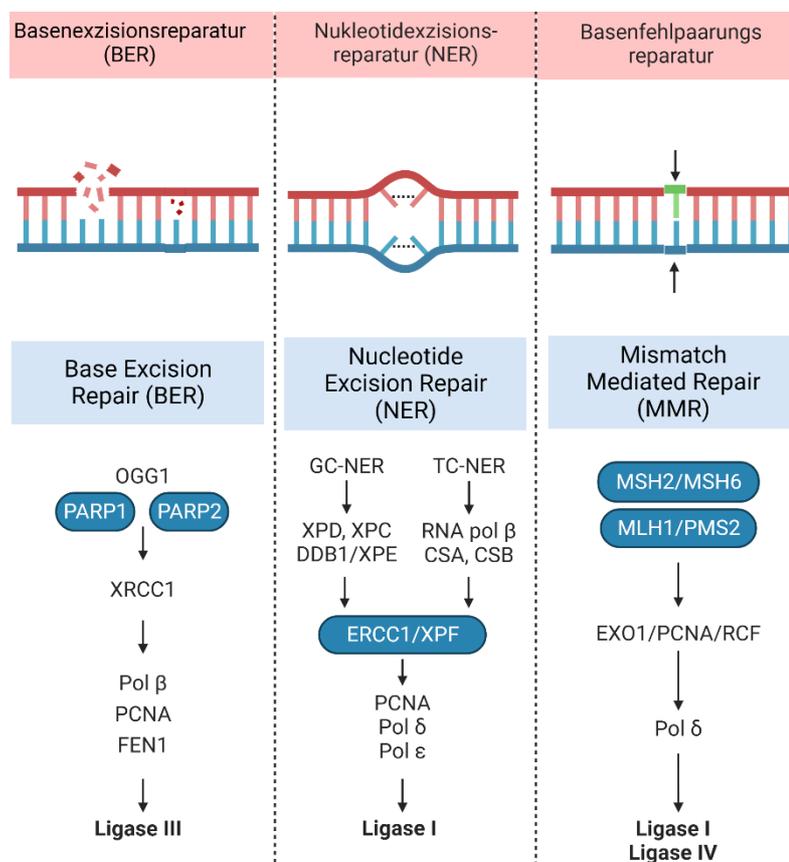
Bei der Basenexzisionsreparatur werden Fehler in Form oxidierter, alkylierter oder desaminierter einzelner Basen behoben. In diesem Mechanismus spielen die Poly(ADPribose)-Polymerase 1 (PARP1) sowie verschiedene Glykosylasen eine wichtige Rolle. Diese prüfen einzelne Basen, indem sie diese herausschwenken und durch Bindung eine Beschädigung feststellen. Der exakte Mechanismus der Identifizierung der einzelnen Modifikationen ist bislang nicht endgültig geklärt (Griffiths A., 2005) (Abb. 10).

#### **Nukleotidexzisionsreparatur (NER):**

Dieser Mechanismus dient der DNA-Reparatur von „bulky lesions“, welche Pyrimidindimere und 6-4 Photoprodukte bezeichnen, die durch UV-Strahlung erzeugt werden und die Helixstruktur stören. Die Nukleotidexzisionsreparatur gliedert sich in die Schadenserkenkung, das Einschneiden der DNA, das Herausschneiden eines 25-30 Basen langen DNA-Abschnittes durch XPG und XPF-ERCC1, die Neusynthese dieses Abschnittes und die anschließende Ligation. Durch diese Mechanismen erfolgt die Reparatur von Platin-Intrastrang-Querverbindungen und Einzel-Nukleotid-Schäden an Guanin (Kelley, 2018), (Abb. 10).

### Korrekturlesen durch DNA-Polymerase (Basenfehlpaarungsreparatur):

Bei der Replikation werden die beiden Einzelstränge eines DANN-Doppelstrangs getrennt und jeweils durch Basenpaarung komplementär ergänzt. Die DNA-Polymerase katalysiert nicht nur die Synthese des neuen DNA-Strangs, sondern erkennt auch eine Fehlpaarung und fügt an deren Stelle stattdessen die korrekt gepaarten Desoxyribonukleotide an (*proofreading*). Dazu tragen die DNA-Mismatch-Reparaturproteine bei, die anhand des Methylierungsstatus fehlerhaft entstandene Tochterstränge, die von der Elternstrangmatrize abweichen, erkennen und korrigieren (Abb.10).



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung der wichtigsten Reparaturmechanismen der DNA Einzelstränge: Basenexzisionsreparatur (BER), Nukleotidexzisionsreparatur (NER), Basenfehlpaarungsreparatur (MMR). Erstellt in Biorender.com.

## b) Reparatur von Doppelstrangbrüchen

Die Reparatur eines Doppelstrangbruchs kann generell über homologe Reparaturmechanismen (HRR) oder durch eine nicht-homologe Reparatur erfolgen. Die nicht-homologe Reparatur ist dabei fehleranfälliger und führt häufiger zu Veränderungen der Ursprungssequenz in Form von Deletionen oder kleineren Insertionen (indels). Homologe Reparaturmechanismen sind insbesondere während der frühen S- und G2-Zellphase aktiv. Das Schwester-Chromatid befindet sich dann häufig nahe der Bruchstelle und kann als *Template* zur Reparatur dienen. In der G1- bis frühen S-Phase ist die nicht-homologe Reparatur aktiver. Die wichtigsten Mechanismen werden in Abb. 11 dargestellt.

### Homologe Reparatur:

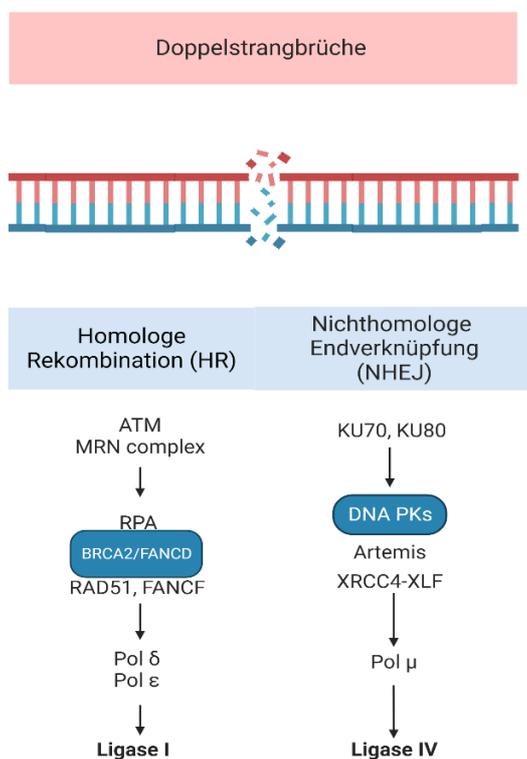
Die homologe Reparatur beginnt mit der Resektion der 5'-Enden eines offenen DNA-Doppelstrang Bruches durch den MRX-Komplex (bestehend aus MRE11, Rad50 und XRCC1 (NBS1)). Mit Hilfe unter anderem der Proteine Rad51, Rad54 bindet das einzelsträngige 3'-Ende des Bruchs in einem zur Reparaturstelle homologen Bereich des Schwester-Chromatids. Findet die Bindung des offenen Endes des Doppelstrangbruchs in einem nicht zur Reparaturstelle homologen Bereich statt, spricht man von *Synthesis dependant strand-annealing* (SDSA). Bei einem Bruch innerhalb sich wiederholender Bereiche (Repeats) kann die homologe Paarung an verschiedenen Stellen dieser Bereiche erfolgen. Die nachfolgende Reparatur kann daher zu einer Deletion des Bereiches zwischen zwei Repeats führen (Single strand annealing).

### Nicht-homologe Reparatur:

Nicht-homologe Reparatur erfolgt ohne Verwendung einer homologen Vorlage. NHEJ startet durch Bindung des Ku-Komplexes (Ku70 und Ku80) an die offenen Enden des Doppelstrangbruchs. Dadurch sind die offenen Enden vor weiterem Abbau durch Exonukleasen geschützt. Anschließend erfolgt die Bindung des MRX-MRN-Komplexes, welcher die offenen Enden prozessiert, sodass sie durch den XRCC4-DNA-LigaseIV-Komplex repariert werden können.

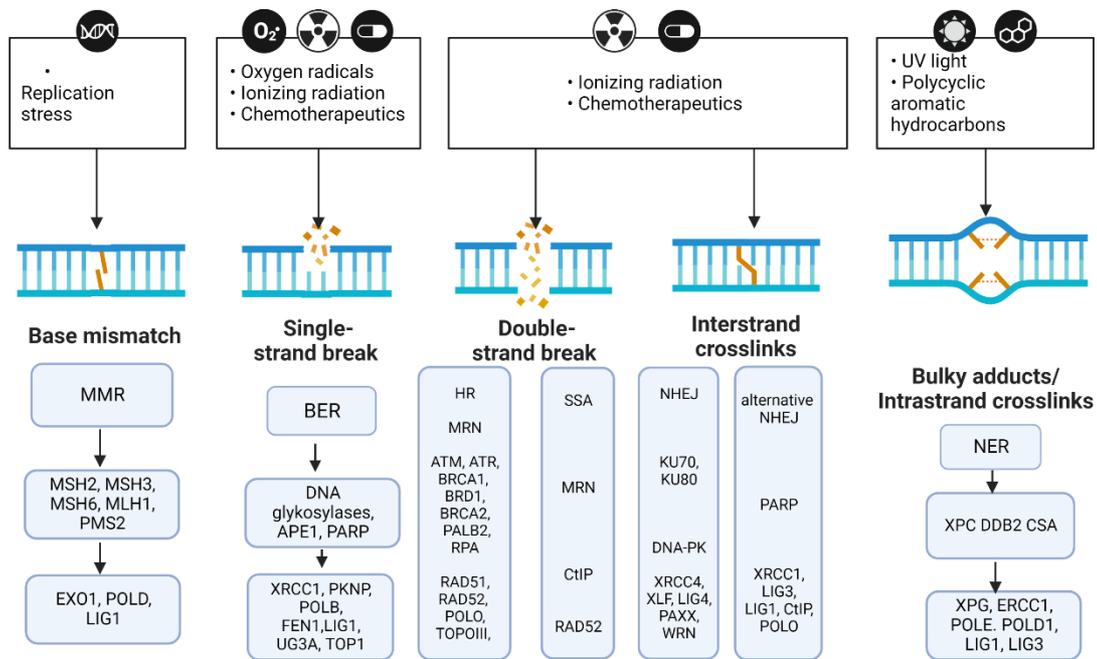
### ***Microhomology-mediated endjoining (MMEJ):***

Im Gegensatz zu NHEJ bindet der MRN-Komplex im Rahmen des MMEJ-Mechanismus an die Bruchstellen. Zusammen mit der Exonuklease EXO1 werden die Stränge bis zur Freilegung von kurzen homologen Sequenzen (5-25 bp) zurückgeschnitten. Dabei werden bestimmte Mikrohomologien bevorzugt, welche auch weit vom ursprünglichen Bruch entfernt sein können. Nach dem Annealing der homologen Sequenzen müssen noch die überstehenden Einzelstränge ("*flaps*") entfernt werden, bevor die Bruchstücke ligiert werden. Dies geschieht durch die Nukleasefunktion des ERCC1-XPF-Komplexes. Die verbleibende Lücke wird durch die Ligase I und die Ligase IV geschlossen. Da hierbei sehr große Deletionen entstehen können, besitzt der Mechanismus ein sehr großes Mutationspotential.



**Abbildung 11:**

Schematische Darstellung der wichtigsten Reparaturmechanismen der DNA Doppelstrangbrüche: Homologe Rekombination (HR) und nichthomologe Endverknüpfung (NHEJ). Erstellt in Biorender.com.



**Abbildung 12:** Zusammenfassende Darstellung der wichtigsten Verursacher von DNA-Schäden und zellulären Reparaturmechanismen. Erstellt in Biorender.com.

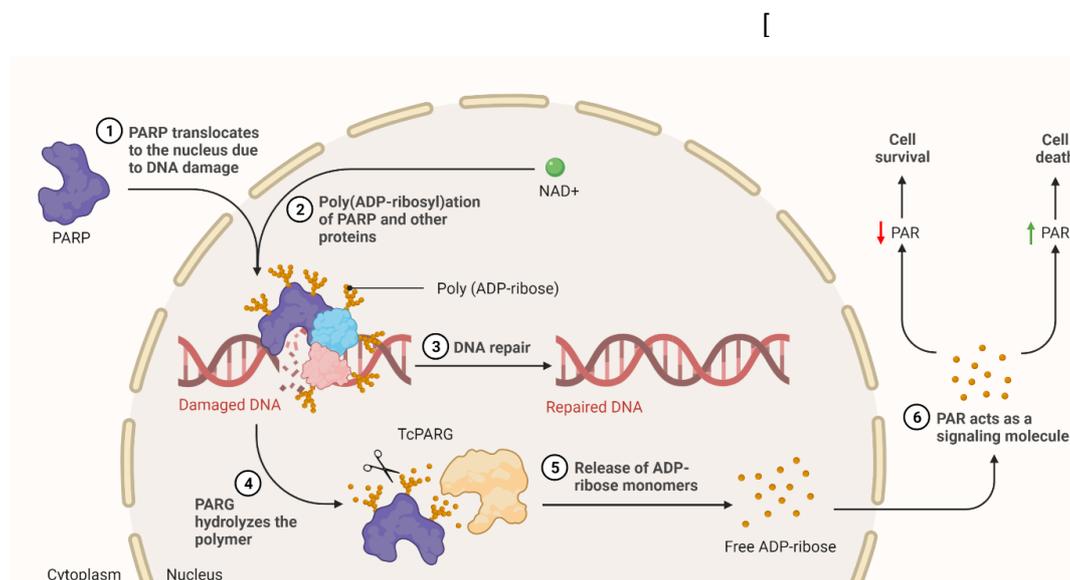
Bei der defizienten homologen Rekombination (*homologous recombination deficiency = HRD*) handelt es sich um einen Defekt der homologen Reparatur oder des MMEJ-Reparaturmechanismus. Der Nachweis der HRD erfolgt indirekt durch die Sequenzierung von Genen, die für die DNA-Reparatur relevant sind (zum Beispiel BRCA) und der Bestimmung der genomischen Instabilität (Takaya et al., 2020). Explizit kann zudem der HRD Score anhand von charakteristischen genomischen Merkmalen berechnet werden (Takaya et al., 2020). Bis kürzlich waren die Gene BRCA1 und BRCA2 die bekanntesten und einzigen erforschten Gene in Korrelation mit der HRD.

"*BRCAness*" ist ein Begriff, der das phänotypische Merkmal von Tumoren beschreibt, die keine Funktionsverlustmutationen in BRCA1 oder BRCA2 zeigen, sondern ähnliche molekulare Merkmale und darüber hinaus HRD aufweisen (Ashworth et al., 2016). Zu den für *BRCAness* verfügbaren Biomarkern gehören das Vorhandensein genetischer oder epigenetischer Veränderungen in HRR beteiligten Genen, mit HRR-Gen-Defekten assoziierte transkriptomische

Signaturen, Mutationssignaturen der BRCA1- oder BRCA2-mutierten Tumorentitäten sowie funktionelle Tests der HRR-Funktion, wie zum Beispiel der Nachweis von RAD51-Kernfoci nach DNA-Schäden (Ashworth, 2016).

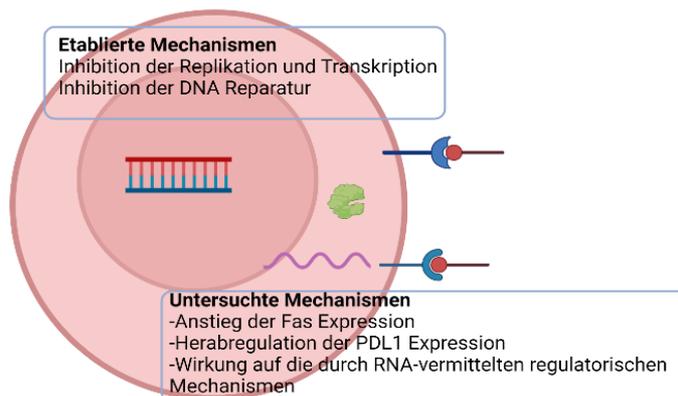
Die Schwierigkeit der Definition von HRD sowie BRCAness besteht darin, dass bislang keine offiziellen und standardisierten Kriterien zu ihrer Erkennung und Quantifizierung formuliert wurden. Stattdessen werden überwiegend im Rahmen von einzelnen klinischen Studien tumorspezifische verschiedene Merkmale entdeckt, validiert und verwendet. Die ersten etablierten Methoden bestehen bereits für Ovarial-, Mamma- und nachfolgend Pankreaskarzinome, für die diese Merkmale auch schon als Ziel spezifischer Therapieoptionen angestrebt werden (Byrum et al., 2019)

**Poly(ADP-Ribose) -Polymerase (PARP) Inhibitoren** und **Platinsalze** sind die wichtigsten therapeutischen Substanzen, die auf eine defekte HRR abzielen. Jüngste präklinische und klinische Daten liegen vermehrt vor und weisen auf die günstige Wirkung dieser Therapien bei HRD-Tumoren hin (Byrum, 2019). Eine bessere Identifizierung der Tumore mit HRD oder BRCAness könnte der gezielten therapeutischen Anwendung verfügbarer antitumoröser Therapien dienen.



**Abbildung 13:** Schematische Darstellung des Wirkmechanismus der PARP. Erstellt in Biorender.com.

An diesem Punkt sollen die Wirkmechanismen der PARP-Inhibitoren (PARPi) und der platinhaltigen Therapien kurz beschrieben werden (Abb.13). Die PARP Familie umfasst 17 Mitglieder. Hierbei wirkt die Aktivität des PARP1-Enzyms für die BER, HR und NHEJ entscheidend (Ricci et al., 2020). Das PARP1-Enzym überträgt die erste ADP-Ribose von (NAD<sup>+</sup>) auf die Proteinreste und erzeugt eine ADP-Ribose-Einkette (PAR). Dieser Prozess der "PARylierung" findet kovalent an Zielproteinen (transPARylierung) und am PARP-Enzym selbst (autoPARylierung) statt. Die Anwesenheit von PAR-Ketten an den Bruchstellen der DNA begünstigt die nicht-kovalente Rekrutierung von DNA-Reparaturproteinen wie XRCC1, DNA-Ligase, DNA-Polymerase  $\beta$  und MRE11-Rad50-NBS1 (MRN)-Komplex für die DNA-Resektion und die Bildung von Einzelsträngen, was wiederum die Einleitung der HR ermöglicht. PARPi sind schon als fortgeschrittene Therapielinie oder Erhaltungstherapie der BRCA- und zuletzt HRR-mutierten Ovarial-, Mamma-, Pankreas- und zuletzt auch Prostatakarzinome zugelassen (Herbel et al., 20221).



**Abbildung 14:** Darstellung der etablierten sowie aktuell untersuchten Wirkmechanismen von Platin-Chemotherapie. Erstellt in Biorender.com.

Platinsalzen hingegen entfalten ihre Wirkung durch Querverknüpfungen von DNA-Strängen (Abb. 14). Hierdurch entstehen Verknüpfungen innerhalb eines DNA-Stranges (Intrastrang-Quervernetzung) und zwischen benachbarten DNA-Strängen (Interstrang-Quervernetzungen). Ein weiteres wichtiges Wirkungsprinzip betrifft

die Auslösung von Punktmutationen, welche die DNA-Reparatur und die Telomerase Aktivität hemmen, sodass darauffolgend die Apoptose initiiert wird. Die Kombination von Platinsalzen mit PARP-Inhibitoren ist eine vielversprechende potenzielle Therapiekombination (Setton et al., 2021). Die gemeinsame Anwendung beider Therapien stützt sich auf dem Prinzip der **synthetischen Letalität**, welches die Kombination mehrerer kumulativ zum Zelltod führender Gen-Defizite bezeichnet.

Gemäß jüngsten Daten kann ein defektes DDR-Netzwerk die Antitumor-Immunantwort auf verschiedene Weise verstärken. Unter anderem führt eine fehlerhafte DNA-Schadensreparatur zu einer Anhäufung von Mutationen und darauffolgend zu erhöhter Tumormutationslast und höherer Konzentration von Neoantigenen für den Haupt-Histokompatibilitätskomplex. Dies wird von T-Zellen erkannt. Auf Grund dieser Daten wird zunehmend auch die Mutationslast der CCC untersucht, um zu unterscheiden, welche Tumorsubtypen dieser heterogenen Gruppe von der Anwendung von Immuntherapie profitieren könnten (Raimundo et al., 2021). Zusammengenommen stützen diese Daten die Hypothese, dass Tumore mit zugrundeliegenden DNA-Reparaturdefekten besser auf Immun-Checkpoint-Inhibitoren ansprechen können und dass das gezielte Angreifen von DDR eine relevante Strategie zur Verstärkung der Wirksamkeit von Immun-Checkpoint-Inhibitoren darstellen kann.

## **2. FRAGESTELLUNGEN**

Die vorliegende Arbeit untersucht detailliert eine Kohorte von 113 Patient\*innen mit histologisch gesicherter Diagnose eines Cholangiokarzinoms in lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Stadium, die sich von 2016 bis 2022 im Universitätsklinikum Essen in Behandlung befanden. Es wurde eine Datenbank etabliert, um die spezifischen klinischen, epidemiologischen und molekularpathologischen Eigenschaften des Kollektivs ausführlich zu analysieren. Das übergeordnete Ziel ist die Untersuchung der molekularen Pathogenese und bestimmt pathogener Varianten der DDR. Als erstes Sub-Ziel werden klinische Charakteristika der Patient\*innen, wie das Alter, das Geschlecht, das initiale Tumorstadium, die applizierten Chemotherapie-Schemata, die Dauer der Behandlung sowie der Metastasierungsstatus mit untersucht und die Parameter ToT und OS wurden berechnet. Darauf aufbauend betrifft das zweite Subziel die Subkohorte der Patient\*innen mit DDR pathogenen Varianten und korreliert die mit dem Krankheitsverlauf, ToT, OS. Zudem wird die hier untersuchte Kohorte zur Validierung der Ergebnisse mit einer Kohorte von CCC Patient\*innen aus der Datenbank cBioPortal verglichen.

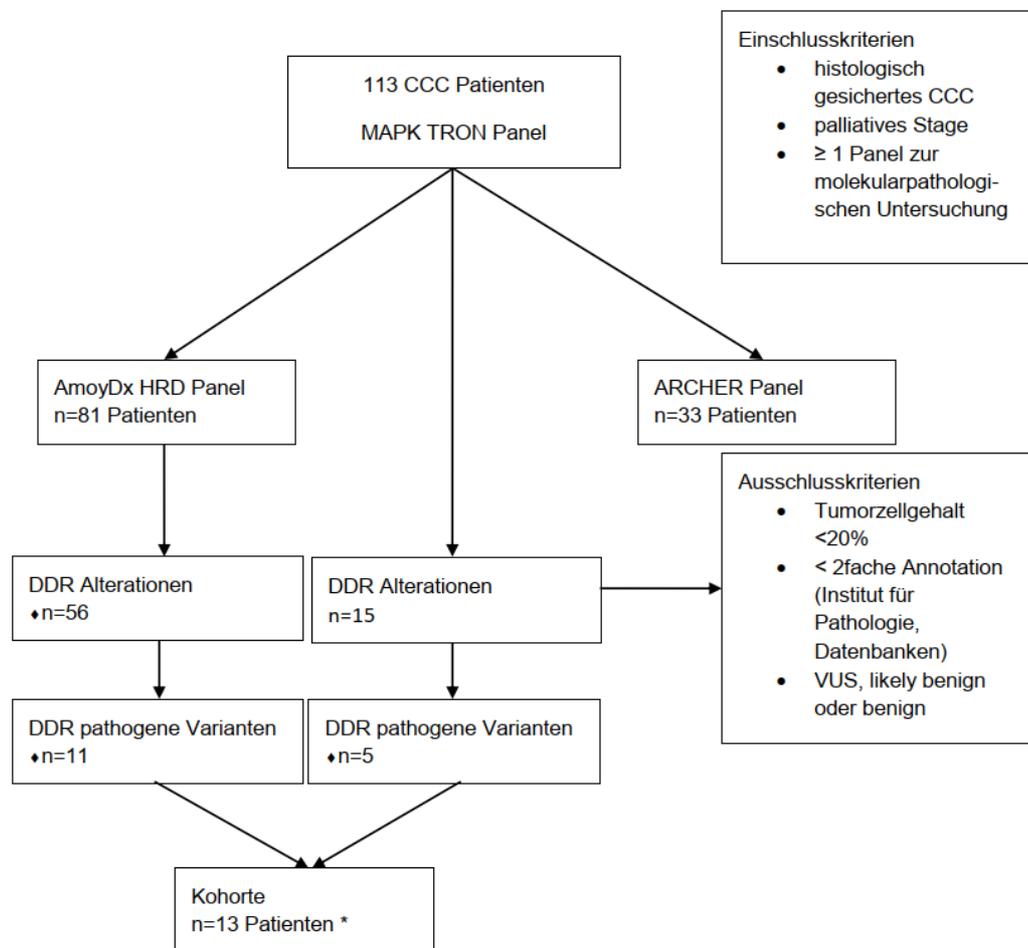
### **3. MATERIAL UND METHODEN**

#### **Kohorte und klinische Daten**

Zuerst erfolgte die Erfassung und retrospektive Analyse eines Kollektivs von 113 Patient\*innen mit histologisch gesichertem lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem CCC, die im Westdeutschen Tumorzentrum des Universitätsklinikums Essen behandelt wurden. Die Erstdiagnose der Erkrankung erfolgte vom 2011 bis 2020, während die Behandlung im Westdeutschen Tumorzentrum von 2016 bis 2022 datiert. Als Datenbankschluss wurde der 30. April 2022 gewählt. Ein zustimmendes Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen für die anonymisierte Ausarbeitung der verfügbaren Daten und molekularpathologischen Ergebnisse liegt vor (21-10239-BO). Die Datenerhebung erfolgte durch Einsicht der elektronischen Patientenakten im Krankenhausinformationssystem Medico. Die erfassten Daten betrafen das Alter, das Geschlecht, das Datum der Erstdiagnose und der Feststellung der Metastasierung, das TNM Stadium, die Histologie, die applizierten Therapien, die Laborwerte sowie den aktuellen Stand der Krankheit der Patient\*innen anhand des klinischen Status, der pathologischen und radiologischen Befunde und der Chemotherapiepläne. Die Beurteilung der Therapieeffektivität wurde für jede Therapielinie mit Hilfe klinischer Kriterien und bildgebender Verfahren bewertet. Komplette Remission entstand, wenn sich alle Zielläsionen ohne Residuen komplett zurückbildeten, die partielle Remission war definiert als bildmorphologisch festgestellte Größenabnahme der Läsionen im Vergleich zur Voruntersuchung und die Progression als Größenzunahme der Läsionen oder durch das Auftreten neuer Läsionen im Vergleich zur Voruntersuchung oder aggravierende klinische tumorrelevante Symptomatik. Bei stabiler Krankheit zeigten die Läsionen keine radiologisch erkennbare Größenregression oder Progression. Im Consort Diagramm der Abb.15 werden grafisch die Teilnehmerauswahl und der Fluss der vorliegenden Arbeit dargestellt.

## Sequenzierung und Analysen

Der Mutationsstatus wurde mit zwei zielgerichteten DNA-basierten Assays (MAPK-TRON customized NGS Panel, 47 Gene; AmoyDx HRD Focus Panel, 32 Gene) und einem RNA-Fusionstest (FusionPlex CTL Panel [Archer]) untersucht. Der Status der Mikrosatelliteninstabilität (MSI)/DNA-Mismatch-Reparatur (MMR) wurde durch Immunhistochemie und DNA-Sequenzierung ermittelt. Bei 17 Patient\*innen wurde explizit der PD1/PDL1 Status erhoben.



**Abbildung 15:** Konsort Diagramm des Projekts zur Untersuchung der DDR-mutierten Subkohorte. \*: In n=3 Patient\*innen wurden pathogene DDR Mutationen durch eine überlappende Detektion mittels des AmoyDx und des MAPK TRON Panels detektiert.

Alle Patienten\*innen wurden mit dem klinisch indizierten MAPK-TRON Panel untersucht. Bei dem MAPK Panel handelt es sich um eine Mutationsanalyse mittels des Next Generation Sequencing (NGS) von Multiplex PCR Amplikons der in der Tabelle 5 dargestellten Gene.

<b>Panel</b>	<b>Untersuchte Gene</b>
MAPK-TRON	BRAF (Ex 11, 15), EGFR(Ex 18-21), ERBB2 (Ex 2, 3, 12, 17, 20, 26), GNAQ (Ex 2-7), IDH 1 (Ex 4), IDH2(Ex 4), KIT (Ex 9-11,13,17,18), KRAS (Ex 2-4), MET (Ex 3, 8, 11, 14, 19), NRAS (Ex 2-4), PDFGRa (Ex 12, 14, 18), PIK3CA (3, 5, 10, 16, 21), SF3B1 (Ex 14-16), alle Exons von AKT1, AKT2, ARID1A, ARID1B, ATM, BAP1, BCLAF1, BRCA1, BRCA2, GNA11, GNAS, KDM6A, MAP2K1, MAP2K2, MAPK1, MAPK3, MDM2, MLH1, MSH2, NF1, PALB2, PBRM1, PTEN, RAF1, RNF43, RPA1, SMAD4, SMARC2, SMARCA4, SMARCB1, STK11, TSC1, TSC2, TP53
AmoyDx	AR, ATM, ATR, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CDK12, CHEK1, CHEK2, ESR1, FANCA, FANCL; HDAC2, HOXB13, MRE11, NBN, PALB2, PPP2R2A, PTEN, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAD54L, STK11, TP53, BRAF, ERBB2, KRAS, NRAS, und PIK3CA.
Archer CTL	ALK (Exon 2, 4, 6, 10, 16-23, Intron 19), AXL (Ex 18-20), BRAF (Ex 7-11), CCND1 (Ex 1-4),

	FGFR1 (Ex 2, 8-10,17), FGFR2 (Ex 2, 5, 7, 8-10, 17), FGFR3 (Ex 3, 5, 8-10, 17, Intron 17), MET (Ex 2, 4-6, 13-17, 21), NRG1 (Ex 1-3, 6), NTRK1 (Ex 2, 4, 6, 8, 10-13), NTRK2 (Ex 5, 7, 9, 11-17), NTRK3 (Ex 4, 7, 10, 13, 16), PPARG (Ex 1-3, 5), RAF1 (Ex 4-7, 9-12), RET (Ex 2, 4, 6, 8-14), ROS1 (Ex 2, 4, 7, 31-37) und THADA (Ex 24-30, 36, 37).
--	---

**Tabelle 5:** Zusammenfassung der in den 3 untersuchten Panels eingeschlossenen Genen.

Zur Isolierung der Nukleinsäure aus FFPE wurde das Promega Maxwell System verwendet, während die Generierung der Multiplex Amplikons mit einem GeneRead DNASeq Targeted Panel V2 (Qiagen) erfolgte. Für die anschließende Library Erstellung ist das NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit für Illumina (NEB) zum Einsatz gekommen. Die Sequenzierung wurde auf dem MiSeq Illumina durchgeführt.

Bei 81 (71.7%) Patient\*innen wurde zusätzlich das AmoyDx Panel untersucht, in dem die untersuchten Gene in Tabelle 5 aufgeführt werden. Der NGS-basierende in-vitro-Test untersuchte den HRD-Status durch den Nachweis von SNVs (single nucleotide variants) und InDels (insertions/deletions) in allen kodierenden Regionen und Intron/Exon-Grenzen der Gene, die im Zusammenhang mit dem HRR stehen.

33 (29.2%) Patient\*innen haben das Archer CTL Panel erhalten, wobei es sich um eine Genfusionsanalyse durch Parallelsequenzierung NGS von Multiplex PCR Amplikons der Gene handelt. Umfasst stehen die untersuchten Gene in der Tabelle 5. Die Generierung von cDNA und der Multiplex Amplikons erfolgte aus dem FusionPlex CTL Panel Archer. Zusätzlich wurden bei 59 (52.2%) Patient\*innen und 17 (15%) Patient\*innen der MSI beziehungsweise PDL1 Status erhoben.

Die Endpunkte der Arbeit umfassten die nach radiologischer Bewertung objektiven Ansprechraten, die Zeit in erstem palliativem Regime bis zum Krankheitsprogress oder Tod (ToT) und das Gesamtüberleben (OS). Das Gesamtüberleben wurde als der Zeitraum von der Erstdiagnose bis zum Tod oder bis zum Datenbankschluss definiert. Die Patient\*innen, die zum Zeitpunkt des Datenbankschlusses noch lebten, wurden zensiert. Konnte das Todesdatum anhand der Patientenakte nicht bestimmt werden, wurde das Datum des letzten Kontaktes durch die ärztliche Dokumentation gewählt und die Patient\*innen wurden dementsprechend zensiert.

Die oben genannten klinischen Parameter wurden mit den vorab bestimmten Endpunkten korreliert. Der Fokus wurde anschließend auf die molekularen Alterationen der Tumore gerichtet. Das Kollektiv wurde nach den zurzeit wichtigsten pathologischen Mutationen (Voraussetzung entweder adressierbar oder in der Literatur am häufigsten auftretend) in 7 Subgruppen unterteilt, um prognostische Rückschlüsse ziehen zu können. Die ausgewählten Gruppen sind die KRAS, TP53, IDH1/2, FGFR2, DDR, BRAF und PIK3CA mutierten Gruppen. Ausführlicher wurden die DDR mutierten Cholangiokarzinome untersucht, für die alle Genalterationen untersucht und eingeschlossen wurden. Anschließend wurden sie annotiert. Für die restlichen Subgruppen im Rahmen der NGS Analyse wurden bekannte relevante Genveränderungen eingeschlossen und eine zusätzliche Annotation war nicht erforderlich. In Bezug auf die DDR Varianten wurden die Mutationen vorab durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Essen annotiert und die klinische Relevanz wurde zusätzlich durch ihre Abfrage in Datenbanken verifiziert. Es wurden folgende Datenbanken als Grundlage verwendet: ClinVar, *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (COSMIC) und TAG.

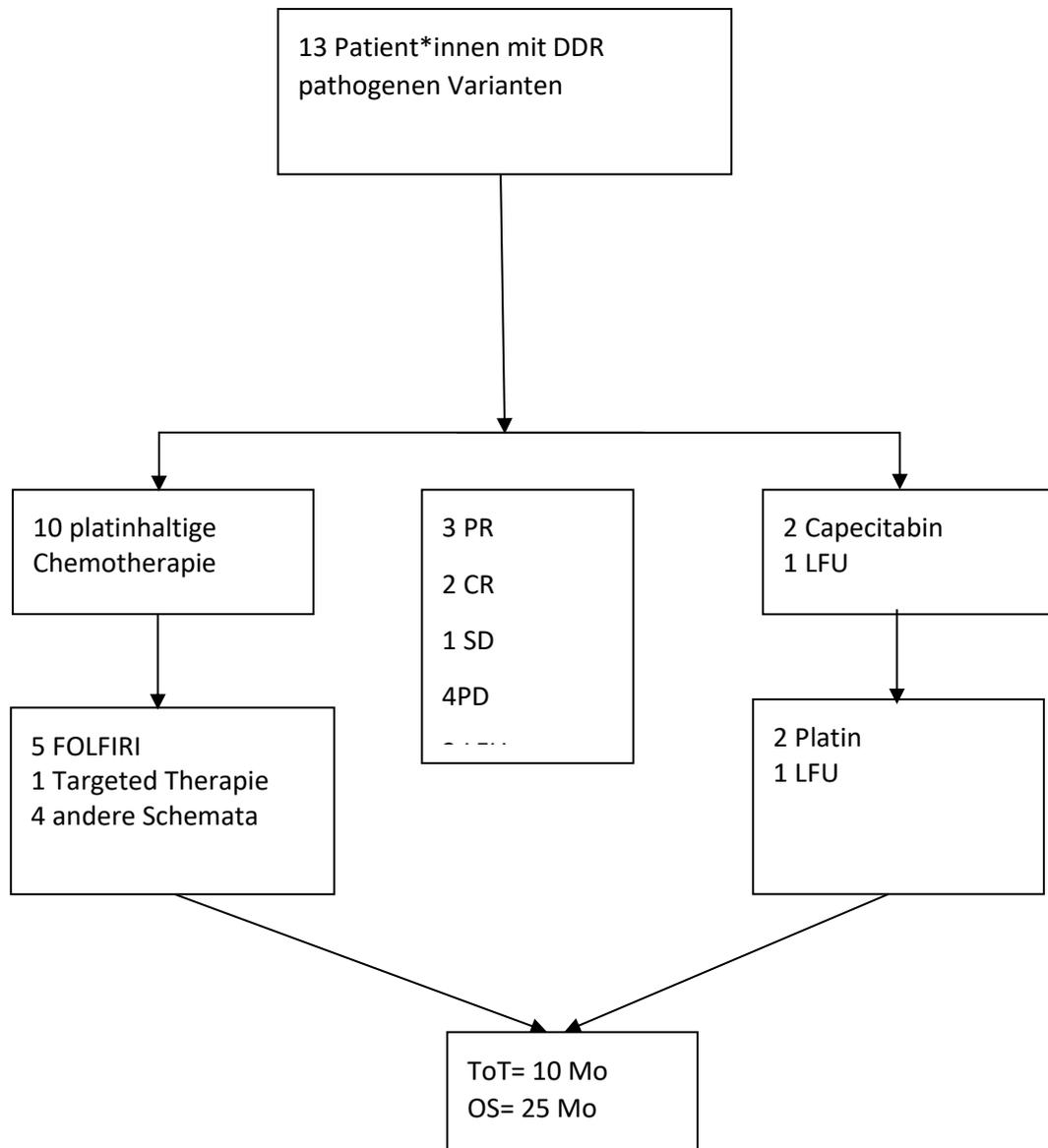
Lediglich Proben mit einem geschätzten Tumorzellgehalt von  $\geq 20$  % wurden bei der histopathologischen und molekulargenetischen Beurteilung berücksichtigt. Die Annotation der Genveränderungen durch das hiesige Institut für Pathologie erfolgte anhand der Wirkung der Genveränderungen auf die Funktion der daraus exprimierenden Proteine, einschließlich Nonsense-, Frameshift-, Start/Stop-Codon-Veränderungen und Spleißstellenmutationen. Zugleich wurden diese Mutationen in Datenbanken, wie oben erwähnt, abgefragt. Auf diese Weise war das

Filtern der nicht pathologischen oder spärlich vertretenen Varianten möglich. Darin liegt ein wesentlicher Unterschied dieser Arbeit im Vergleich zu der vorliegenden Literatur, wo Genvarianten oft ohne Beweis ihrer Pathogenität eingeschlossen werden.

### **Statistische Analyse**

Die Ausarbeitung und statistische Auswertung erfolgte mittels der Software R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, [www.R-project.org](http://www.R-project.org)) in Version 4.0.1. Potenzielle Korrelationen wurden für die metrischen Parameter mittels des Mann-Whitney Tests für 2 unabhängige Subgruppen, des Kruskal-Wallis Test für mehrere unabhängige Subgruppen und des Spearman Korrelationskoeffizienten definiert. Für kategorische Parameter wurden der Fischer Test und der Kendall'sche Konkordanzkoeffizient verwendet. Hierbei galten Ergebnisse mit einem p-Wert  $<0.05$  als statistisch signifikant. Der Einfluss verschiedener Parameter auf das OS erfolgte mithilfe der univariaten und Cox Regressionsanalyse und der Bestimmung des Hazard Ratios (HR). Zur Überprüfung einer Unabhängigkeit der prognostischen prädiktiven Marker wurde zusätzlich eine multivariate Cox Regressionsanalyse mit Berechnung der HR und des 95% Konfidenzintervalls durchgeführt. Überlebenskurven wurden als Kaplan Meier Kurven dargestellt und mittels Logrank Tests überprüft. Letzteres ermöglichte auch die Berücksichtigung zensierter Daten. ToT und OS wurden als Median mit Interquartilabständen angegeben.

Im Rahmen der Recherche werden die Daten dieser Kohorte mit der Datenbank cBioPortal verglichen. In der Diskussion werden die Ergebnisse mit Daten aus den Literaturdatenbanken PubMed und MEDLINE korreliert. Die ausgesuchten Studien wurden in den letzten 10 Jahren (2012-2022) eingegrenzt.



**Abbildung 16:** Therapieverlauf der Patienten mit DDR pathogenen Varianten bis zur 2. Linie. LFU: lost follow-up.

## 4. ERGEBNISSE

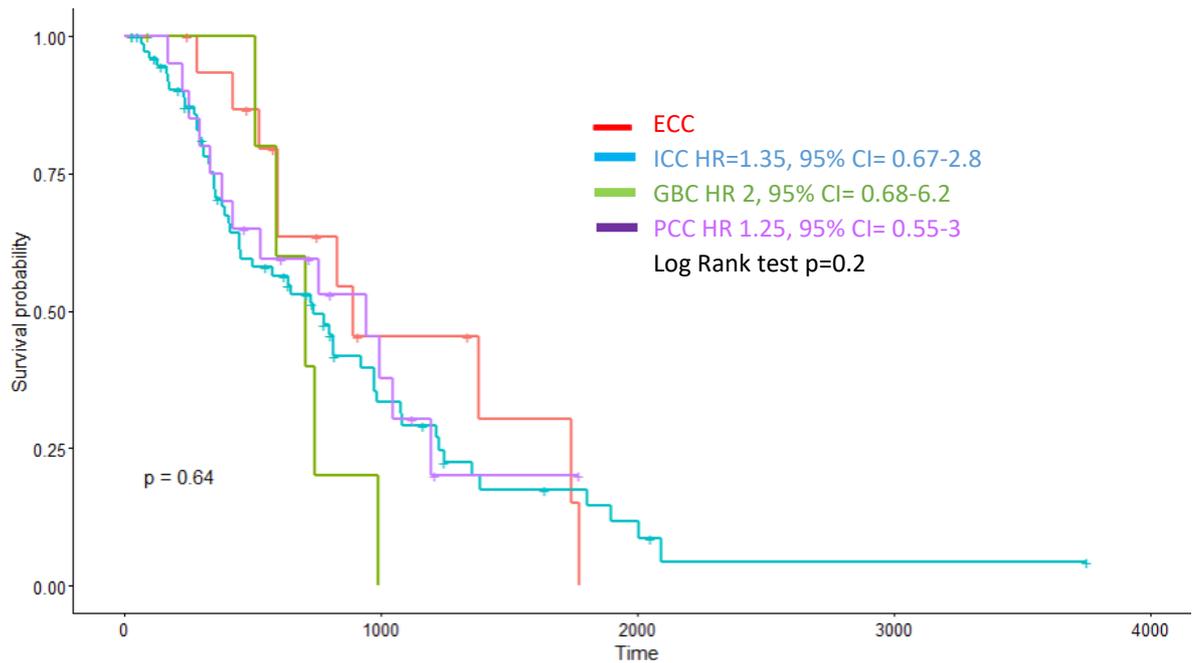
### 4.1 Patientenkohorte

Die analysierte Kohorte zeigte eine Gleichverteilung zwischen beiden Geschlechtern mit 60 Frauen und 53 Männern. Das mediane Alter betrug 60 Jahre (Minimum 26 Jahre, Maximum 82 Jahre), welches einer jüngeren Kohorte im Vergleich zum medianen Erkrankungsalter entsprach (75 Jahre). Am letzten Beobachtungszeitpunkt (30.04.2022) waren 80 Patient\*innen verstorben und folglich in der Auswertung zensiert.

Der ECOG Status (Eastern Cooperative Oncology Group) objektiviert den Allgemeinzustand der Patient\*innen und darüber hinaus ihre Chemotherapiefähigkeit. Bei Patient\*innen in ECOG 2 zeigte sich ein statistisch signifikanter prognostischer Nachteil im Vergleich zu Patient\*innen in ECOG 0 (HR 4.37,  $p=0.01$ , 95% CI=1.6-17.5).

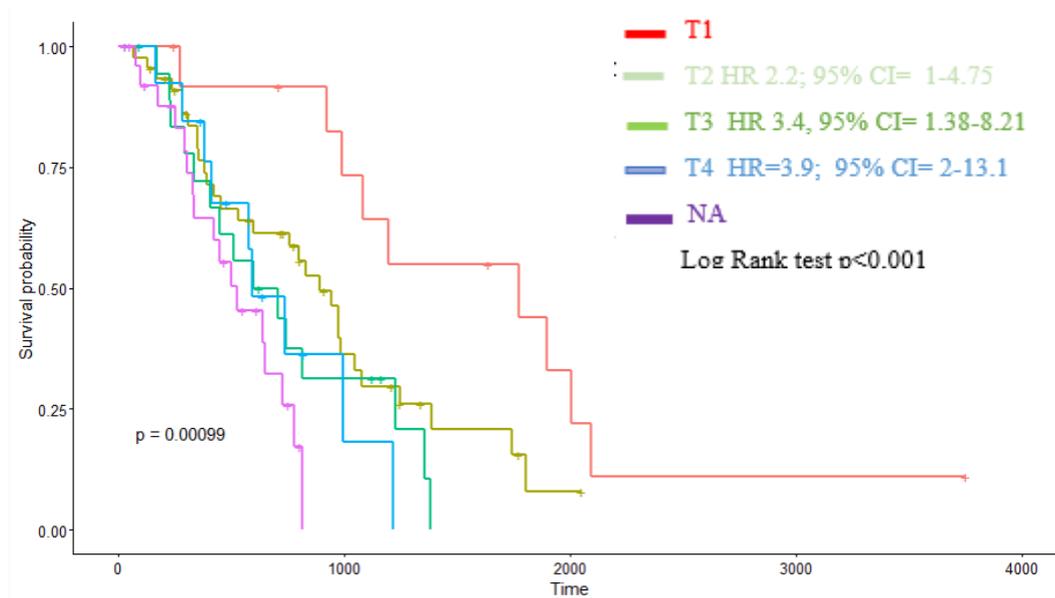
Ein klinisch relevanter Faktor ist die Lokalisation der CCC. 81.4% unseres Kollektivs hatten einen intrahepatischen (73/113=64.6%) oder perihilären (19/113=16.8%) Tumor, während 21 (18.5%) Patient\*innen einen extrahepatischen CCC (14/113= 12.4%) oder Gallenblasenkarzinom (7/113= 6.2%) aufwiesen (Abb.17). Es konnte keinen Unterschied im OS in Bezug auf die Tumorlokalisation in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden (Abb.17). Einer der wichtigsten prognostischen Parameter bei der Diagnosestellung der Tumore ist die Resektabilität. In Bezug auf das OS zeigte eine vollständige Resektion R0 einen statistisch signifikanten Vorteil im Vergleich zu R1 (HR= 2.5, 95% CI= 1.5-3.95,  $p<0.001$ ).

Hinsichtlich des Differenzierungsgrades waren die CCC unseres Kollektivs überwiegend G2 (mäßig differenziert) (55/113=48.7%) oder G3 (gering differenziert) Tumore (43/113=38%), nur 4 Patient\*innen hatten G1 Tumore und bei 11 Patient\*innen waren die entsprechenden Daten nicht vorhanden.



**Abbildung 17:** Kaplan Meier Kurve für OS (in Tagen) aufgeteilt nach der Histologie. Die Kohorte besteht aus intrahepatischen (ICC), extrahepatischen (ECC), perihilären (PCC) Cholangiokarzinomen und Gallenblasenkarzinomen (GBC).

Die Selektion von Patient\*innen umfasste 58 (51.3%) Patient\*innen im Stadium IV nach UICC und 45 (40%) Patient\*innen in Stadien II und III. Fast 40% der Patient\*innen (44/113=39%) hatten bei erster Manifestation einen T2 Tumor, gefolgt von 19 Patienten mit einem T3 Tumor (19/113=16.8%), T1 (13/113=11.5%) und T4 Tumor (12/113=10.4%) und bei 25 Patient\*innen fehlten die entsprechenden Daten. Die T Klassifikation war ein statistisch signifikanter prognostischer Parameter mit Überlebensvorteil für die T1 Tumore (HR= 2.2 bei T2, p= 0.04, 95% CI= 1-4.75) (HR= 3.4 bei T3, p= 0.007, 95% CI =1.38-8.21) (HR= 3.9 bei T4, p= 0.007, 95% CI= 2.06-13.1) (Abb.18).



**Abbildung 18:** Kaplan Meier Kurve für OS (in Tagen) stratifiziert nach dem T-Stadium. Die NA repräsentieren die Patient\*innen ohne T Stadieneinteilung.

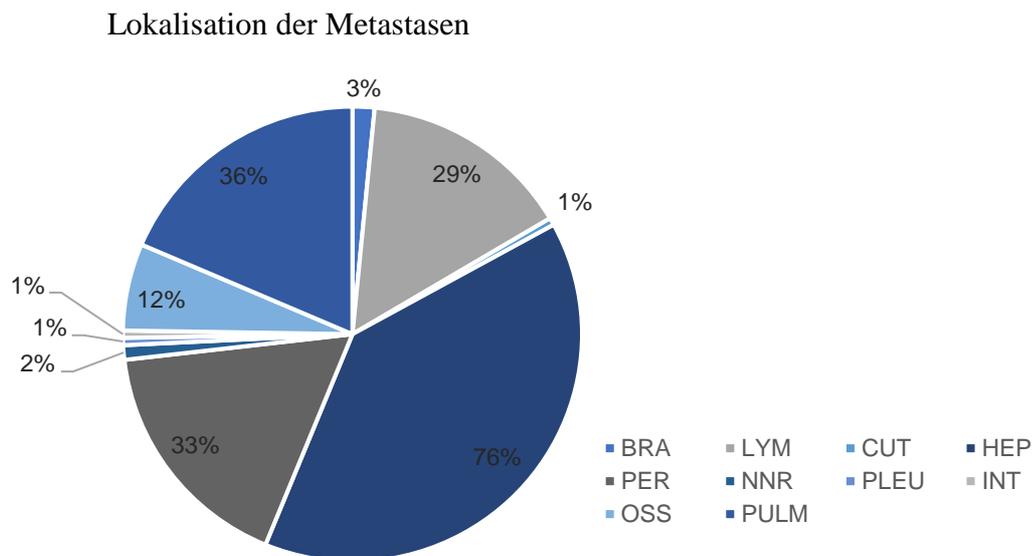
Die große Anzahl der Tumore gehörte zum Stadium N 0-1 hin (33 bzw. 38 Patient\*innen). Nur 5 Patient\*innen unterteilten sich in höheren Stadien (N2: 2 Patient\*innen; N3: 3 Patient\*innen). Das N Stadium zeigte keine statistisch signifikante Korrelation mit der gesamten Überlebenszeit ( $p=0.1$ ).

Was die M Klassifikation angeht, zeigten 46 Patient\*innen (40%) bei Erstdiagnose Fernmetastasen, welche statistisch signifikant das Überleben verschlechterten ( $HR=1.9$ ,  $p=0.01$ ; 95% CI=1.13-3.14). Zudem bedeutend war auch die Manifestationszeit der Fernmetastasen, denn die synchron metastasierten CCC (49/113=43.4%) verliefen schlechter im Vergleich zu denen, die nach 2 Jahren (metachron) metastasierten (42/113= 37%) ( $HR=1.87$  für die synchron metastasierten, 95% CI=1.14-3,  $p=0.04$ ).

Ausführlicher das Metastasenmuster betrachtend, folgen die Inzidenz der Metastasen je nach Lokalisation sowie die HR und p-Wert für die mutierte im Vergleich zu nicht-mutierter Subgruppe: 37% der Patient\*innen hatten (42/113) bei Erstdiagnose hepatische ( $HR=1.9$ ,  $p=0.02$ ), 5/113 (4.4%) ossäre ( $HR=0.8$ ,  $p=0.75$ ), 13.6% (16/113) peritoneale ( $HR=2.96$ ,  $p=0.006$ ) und 10.6% (12/113) pulmonale

Metastasen (HR= 5.7, p=0.0003). Metachron hepatische Metastasen traten bei 30 (26.5%) Patient\*innen auf: ossäre bei 6 (5%), peritoneale bei 16 (14%) und pulmonale bei 21 (18.6%) Patient\*innen. In der Abbildung 19 ist die Verteilung der Metastasen in anderen Lokalisationen dargestellt (BRA= Gehirn, LYM= Fernlymphknoten, CUT=Haut, NNR= Nebennieren, PLEU= Pleura, INT=Darm, OSS=Knochen, HEP=Leber, PULM= Lungen, PER= Peritoneum).

In der Tabelle 6 werden die wichtigsten klinischen Charakteristika der Patient\*innen zusammengefasst.



**Abbildung 19:** Pie Chart Darstellung der Verteilung der Metastasen nach Lokalisation. BRA: cerebral, LYM: lymphonodulär, CUT: kutan, HEP: hepatisch, PER: peritoneal, NNR: adrenal, PLEU: pleural, INT: intestinal, OSS: ossär, PULM: pulmonal

Patenten	Charakteristika
Alter (Median (Spannweite), Jahre)	60 (26-82)
Geschlecht, n (%)	
männlich	53 (47%)
weiblich	60 (53%)

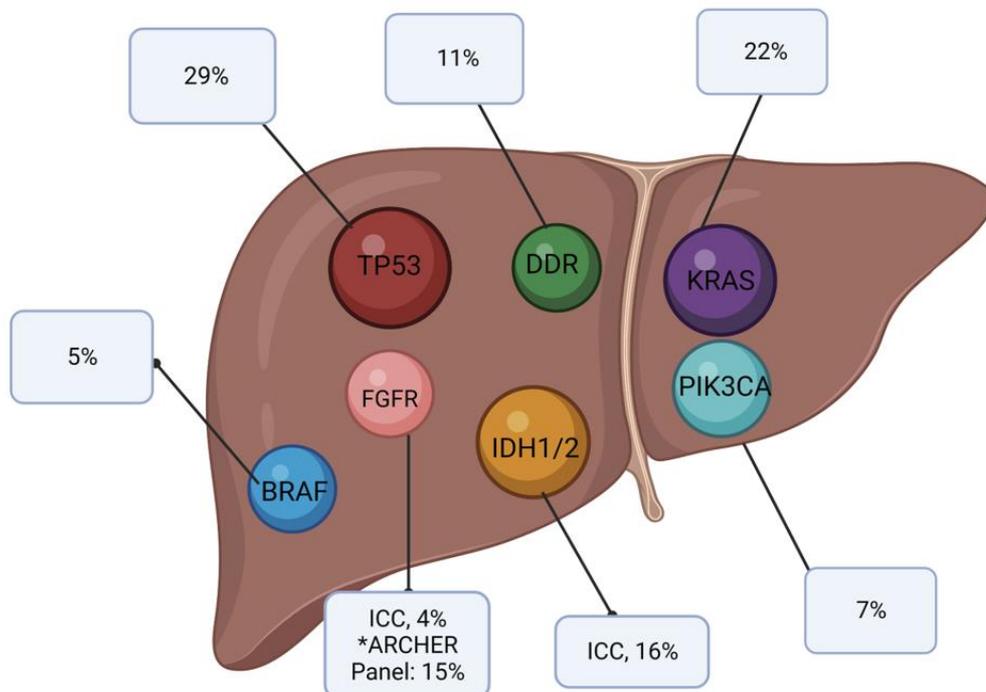
Histologie, n (%)	
ICC	73 (64.6%)
PCC	19 (16.8%)
ECC	14 (12.4%)
GBC	7 (6.2%)
UICC, n (%)	
A	6 (5%)
B	26 (23%)
C	19 (17%)
D	58 (51.3%)
T, n (%)	
1	13 (11.5%)
2	44 (39%)
3	19 (16.8%)
4	12 (10.4%)
N, n (%)	
0	33 (29.2%)
1	38 (33.4%)
2	2 (0.2%)
3	3 (0.3%)
M, n (%)	
0	59 (52%)
1	49 (43.4%)
• Synchron	
• Metachron	42 (37%)
G grading, n (%)	
1	4 (4%)
2	55 (48.7%)
3	43 (38%)

**Tabelle 6:** Klinische Charakteristika der eingeschlossenen Patient\*innen.

## 4.2. Molekulare Subgruppen

In der vorliegenden Arbeit wurde die molekularen Veränderungen im CCC mit Fokus auf Alterationen in Genen der DNA Schadenreparaturmechanismen untersucht.

Die Kohorte unterteilte sich in 7 molekularen Subgruppen je nach der Präsenz der folgenden Änderungen (Abb. 20): DDR, IDH1/2, KRAS, TP53, BRAF, PIK3CA Mutationen und FGFR2 Fusionen. Die häufigsten Mutationen traten in den folgenden Genen auf: TP53 (33/113=29.2%), KRAS (25/113=22.1%), IDH1/2 (18/113=16%) und ATM (13/113=11.5%). Außer der o.g. Subgruppen oft pathogen geändert waren die Gene ARID1A (11/113=9.7%) und BCLAF1 (9/113=8%). In der Abbildung 20 folgt eine Darstellung der Häufigkeit der in dieser Arbeit untersuchten molekularen Subgruppen.



**Abbildung 20:** Schematische Darstellung der Häufigkeit und Lokalisation der in dieser Arbeit untersuchten molekularen Subgruppen.

\*Die FGFR2 Fusionen wurden durch das ARCHER Panel detektiert und betreffen 5/33=15% Patienten, in der Gesamtkohorte 5/113=4%

Alle molekularen Subgruppen wurden auf das Vorhandensein pathogener Mutationen untersucht und mit den Patient\*innen ohne Genveränderungen verglichen. Des Weiteren wurden das Hazard Ratio und die primären Endpunkte, nämlich die Zeit in erstem palliativem Regime bis zum Krankheitsprogress oder Tod (ToT) und das Gesamtüberleben (OS) berechnet. Im Kapitel 4.5 werden diese Daten ausführlicher dargelegt und erläutert.

TP53 Mutationen lagen in der untersuchten Kohorte am häufigsten vor (33/113, 29.2%), wobei sich kein Unterschied im Gesamtüberleben (OS) zur Wildtyp-Gruppe zeigte (HR=1, 95% CI 0.65-1.78, p=0.78). Das ToT betrug 5.9 Mo und das OS betrug 19.1 Mo. Die TP53 Mutationen koexistierten am häufigsten mit KRAS (10/33) und mit DDR (6/33) Mutationen.

KRAS Mutationen waren ebenfalls gehäuft in der Kohorte nachweisbar. Sie tauchten in 22% (25/118) Patient\*innen auf und zeigten eine schlechtere, allerdings statistisch nicht signifikant, Prognose sowohl im Hinblick auf das ToT als auch das OS (ToT 7.4 Mo, OS 12.8 Mo, HR=1.5, p=0.2, 95% CI=0.83-2.74). Bemerkenswert war das eindeutige Komutationsmuster für KRAS und TP53 (10/25=40%) und die Inzidenz der KRAS Mutationen bei PCC (7/ 19=37%).

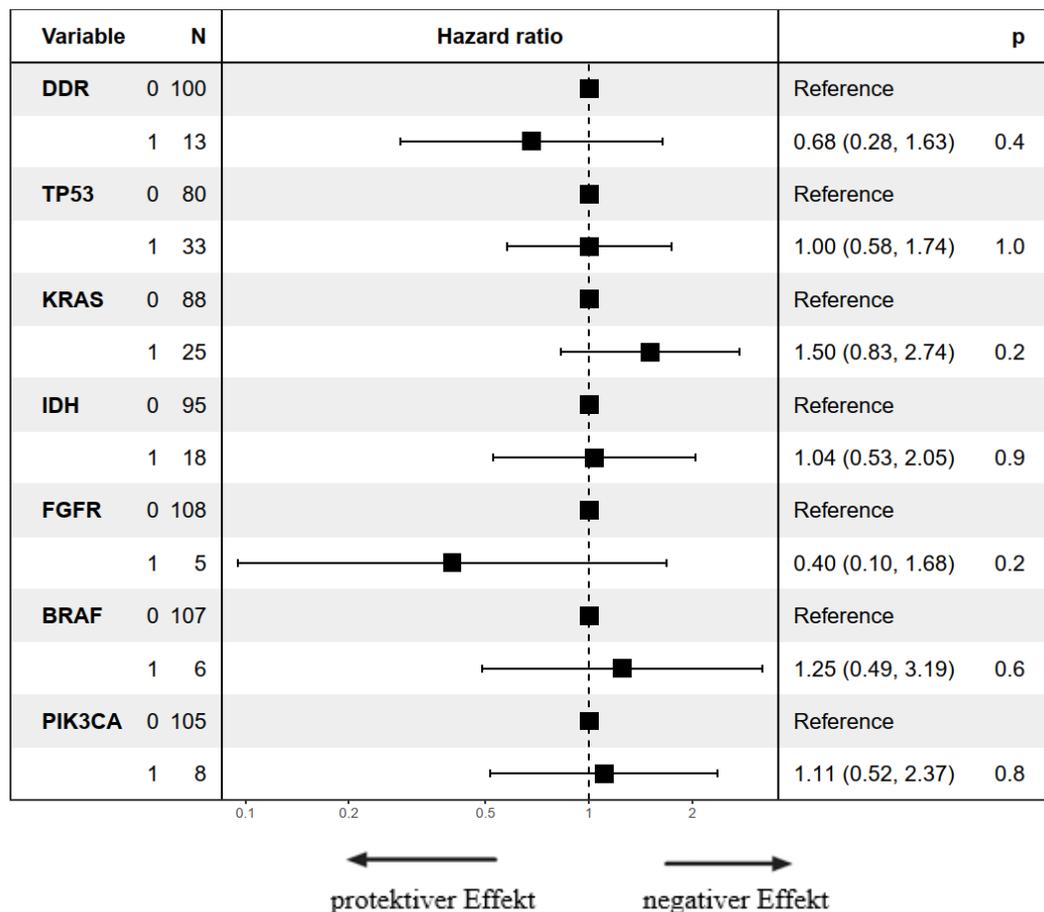
IDH 1,2 Gene treten gehäuft in CCC mutiert auf (15-25%) (Modesir et al., 2016). In unserem Kollektiv wiesen 8 Patient\*innen IDH1 pathologische Änderungen (überwiegend P132) und 10 Patient\*innen IDH2 Änderungen auf (insgesamt 18/113= 16%) mit einem ToT von 13 Mo und OS von 18.9 Mo (HR=1.04, p= 0.9, 95% CI= 0.53-2.05). 5 Patient\*innen erhielten eine zielgerichtete Therapie mit Ivosidenib, LTT462 und BAY 1436032.

Die FGFR2 Fusionen waren bei 5 Patient\*innen nachweisbar (ToT 5.5 Mo, OS 41.5 Mo, HR=0.4, p=0.2, 95% CI=0.1-1.68). 3 Patient\*innen erhielten eine gegen FGFR

gerichtete Therapie in der zweiten und dritten Linie (Pemigatinib, Erdafitinib, TPU-TAS 120).

Eine weitere molekulare Subgruppe betrifft das Proto-Onkogen B-Raf. Während bei 6 Patient\*innen (6/113= 5%) BRAF Mutationen detektiert wurden, wurde bei 3 die bekannteste V600E Mutation identifiziert. 2 Patient\*innen erhielten eine zielgerichtete Therapie mit Vemurafenib und Dabrafenib. Für die BRAF-mutierten Fälle betragen ToT und OS 9.3Mo bzw. 24.2 Mo (HR=1.25, p=0.6, 95% CI=0.49-3.19).

PIK3CA Mutationen traten bei 8 Patient\*innen (8/113= 7%) des Kollektivs mit einem ToT von 6.7 Mo und OS von 29.8 Mo (HR=1.11, p=0.8, 95% CI= 0.52-2.37) auf.



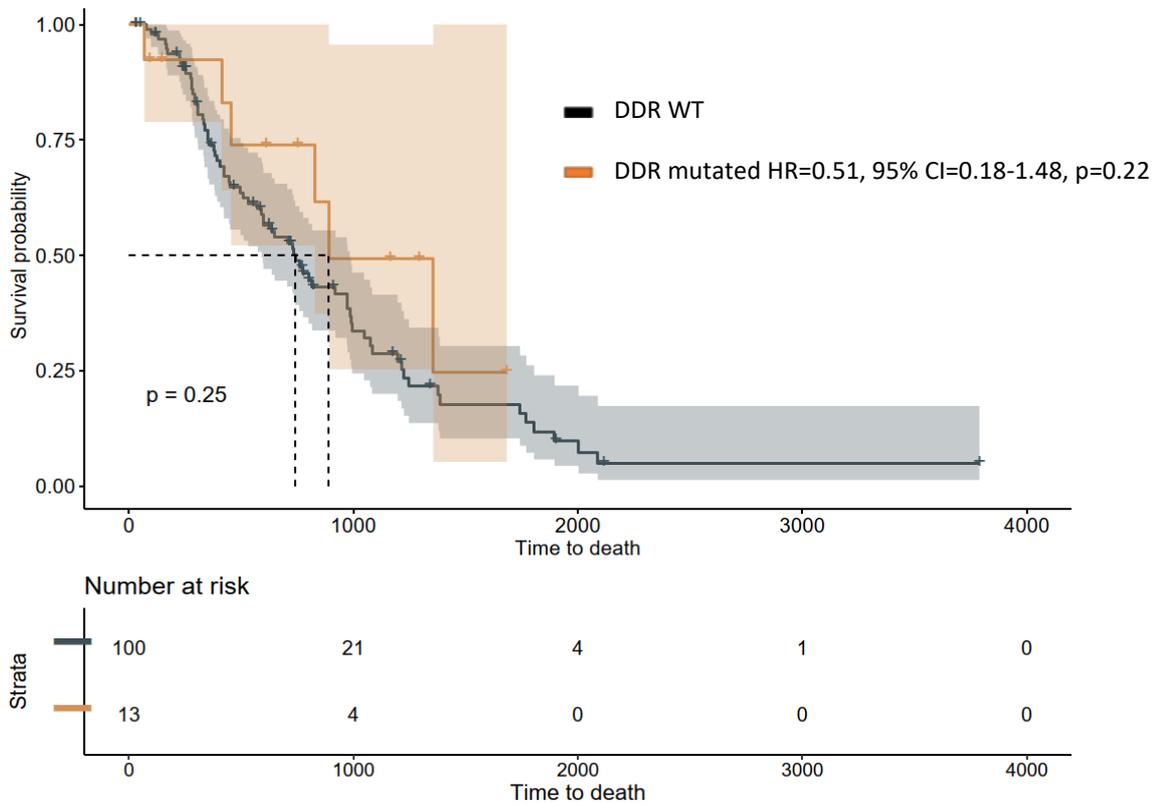
**Abbildung 21:** Forest Plot für das OS aufgetrennt nach molekularer Subgruppe. In der rechten Spalte werden Hazard Ratio (HR), 95% CI und p-Wert angegeben.

Die Abbildung 21 zeigt einen Forest Plot, wo das OS aller molekularen Subgruppen im Vergleich zur Wildtyp (WT) Gruppe (Referenz) verglichen wurde. Die DDR und FGFR Gruppen zeigten einen möglichen, allerdings bei limitierter Fallzahl statistisch nicht signifikanten Überlebensvorteil.

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag an der Analyse der DDR molekularen Subgruppe. Bei 81 Patient\*innen wurde im Rahmen eines Etablierungsansatzes das Amoy Panel verwendet, welches sich auf die DDR Gene fokussierte und die folgenden umfasste: ATM, ATR, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDK12, CHEK1, CHEK2, ESR, FANCA, FANCL; HDAC2, HOXB13, MRE11, NBN, PALB2, PPP2R2A, PTEN, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAD54L, und STK11. Die Auswahl der DDR Gene basierte auf der Übereinstimmung etablierter Panels und die auf die Literatur gestützte Wahl der Gene mit klinischer Relevanz in der Tumorgenese, um Gene mit der größten prognostischen Signifikanz zu untersuchen (Knijnenburg et al., 2018)

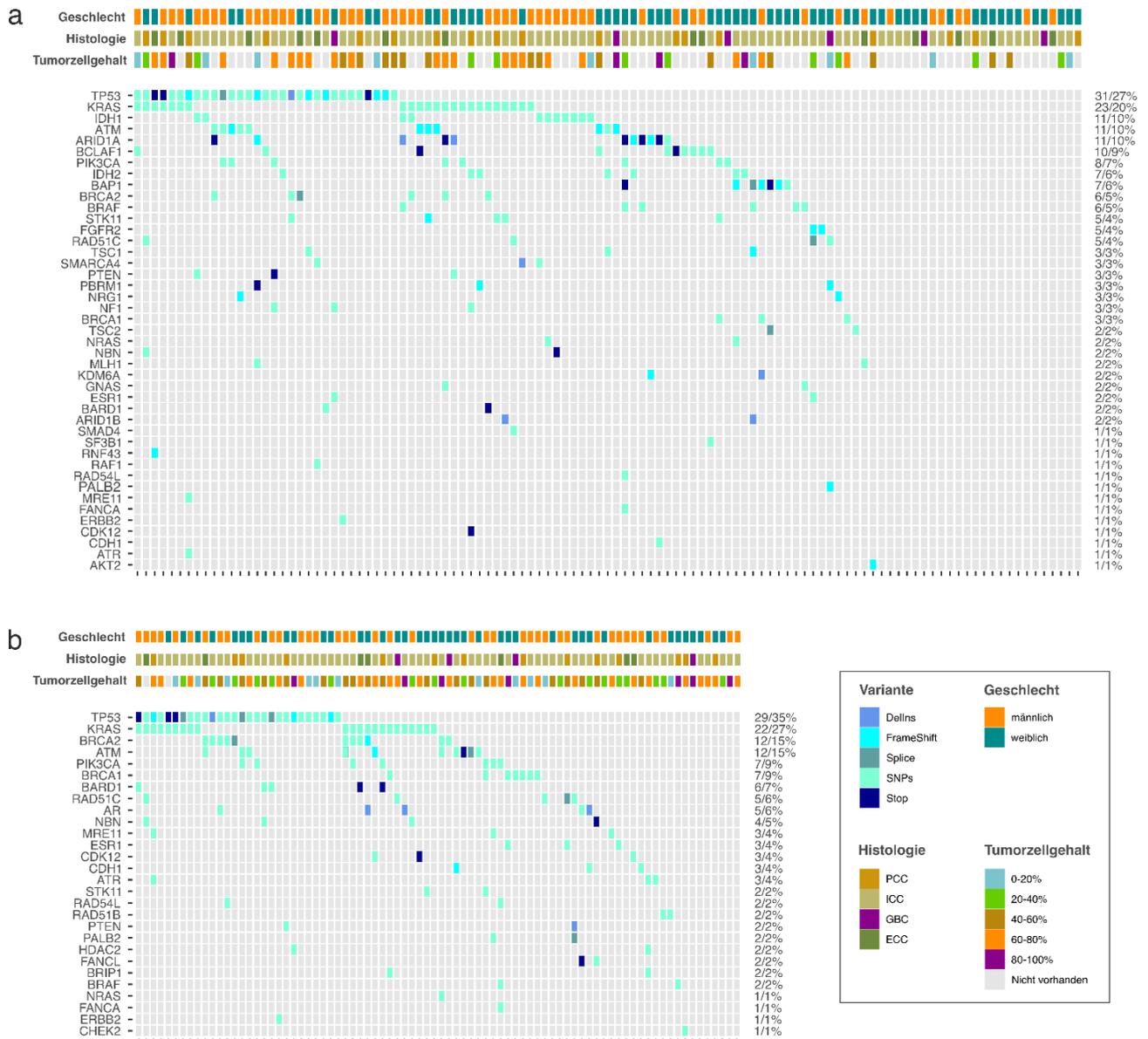
Nachfolgend werden die HRD mutierten Genen aufgeführt, zusammen mit der Anzahl der Patient\*innen mit pathologischen Mutationen: ATM (8 /13), BRCA2 (1/13), RAD51C (1/13), PALB2 (1/13), NBN (1/13) und BRIP1 (1/13). Interessant war in unserem Kollektiv der gehäufte Nachweis von ATM Mutationen, welche in 8/13 Patient\*innen pathogen waren.

Die DDR-mutierte Subgruppe zeigte ein ToT 10.1 von Mo und ein OS von 25 Mo (HR=0.51, p=0.22, 95% CI= 0.18-1.48) (Abb.22). Insgesamt war lediglich die DDR-mutierte Subgruppe, die einen Vorteil in Bezug auf allen primären Endpunkten zeigte.



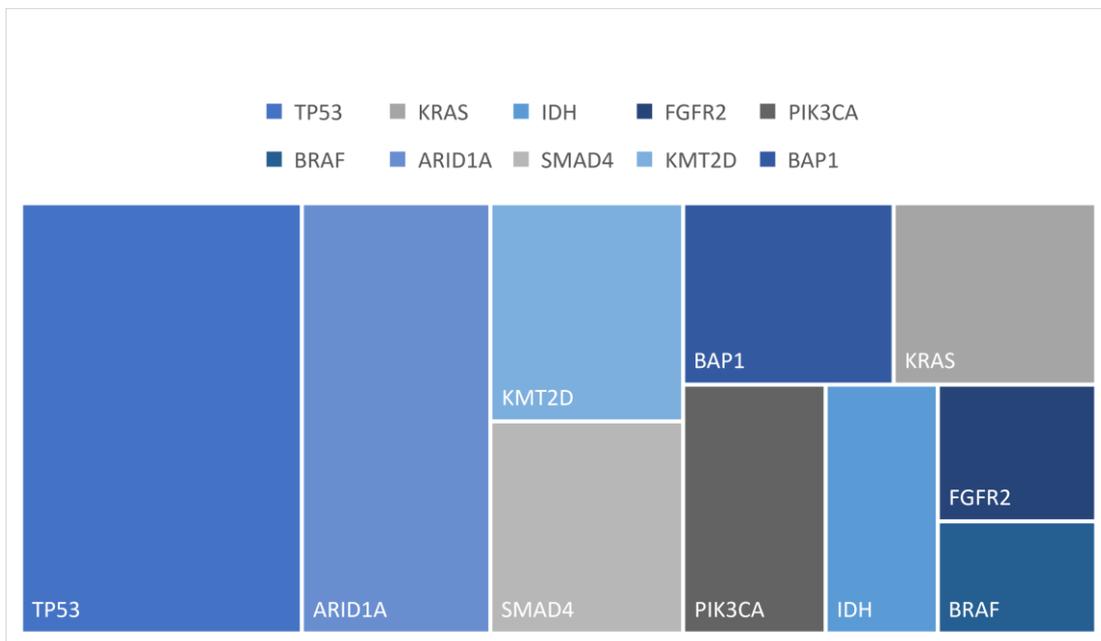
**Abbildung 22:** Kaplan Meier Kurve für OS (in Tagen) stratifiziert nach DDR Mutationsstaus.

In Abbildungen 23a und 23b werden zwei Oncoplots präsentiert, die die verschiedenen Varianten in den in MAPK-TRON und AmoyDX-Panel eingeschlossenen Genen, das Geschlecht, die Histologie und den Tumorzellgehalt darstellen. Auf der x-Achse werden die Patient\*innen mit Punkten anonymisiert dargestellt, auf der y-Achse alle pathogen mutierten Gene und durch verschiedene Farben werden die verschiedenen Subgruppen symbolisiert.



**Abbildung 23:** Oncoplots aller Genalterationen in Form von Insertionen-Deletionen, *Frameshift* Alterationen, *Splice site* Alterationen, *Single Nucleotide* Polymorphismen (SNPs) und Stop Mutationen. Jede Spalte steht für die Patient\*innen und jede Zeile für ein Gen. a. Oncoplot generiert durch das MAPK-TRON Panel. b. Oncoplot generiert durch das HRD Panel.

In Zusammenschau der Oncoplots taucht eine Tendenz auf, was die Mutationen, die mit DDR Veränderungen koexistieren, angeht. Die DDR-mutierte Subkohorte wies bei 40,2% der Patienten zusätzlich TP53 Mutationen auf, 27,2% ARID1A, 14% KMT2D und SMAD4 jeweils, 12,7% BAP1, 11,8% PIK3XA und 9,3% mit ISH1/2, und 7.2.% FGFFR und 5,9% BRAF (Abb.24)



**Abbildung 24:** Häufigkeitsverteilung der Komutationen in der cBioPortal DDR Subgruppe.

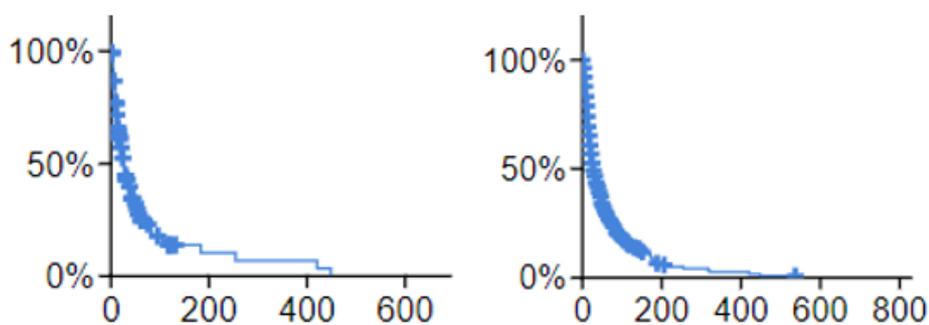
### 4.3. Vergleichende Kohortenanalyse mittels cBioPortal Daten

Zusätzlich zu dem eigenen Patient\*innen-kollektiv erfolgte eine Analyse der Genmutationen mittels der cBioPortal Datenbank. cBioportal ist eine translationale Open-Source Forschungsplattform, die die Analyse von Daten durch den Einsatz einer Vielzahl von Analysewerkzeugen erleichtert. Die in der Datenbank vorhandenen Daten für Cholangiokarzinome nach Ausschluss von Überschneidungen und Tumoren ohne gesicherte Histologie umfasst 1725 Patient\*innen über 10 Studien (Abruf vom 28.09.2022) (Tabelle 7). Ausgeschlossen wurden 25 squamöse Tumore, 5 kleinzellige und 5 geringdifferenziert neuroendokrine Tumore. Die folgenden Datensätze wurden evaluiert:

<i>Studienzentrum, Jahr der Publikation</i>	<i>Anzahl der Patient*inne n</i>	<i>Sequenzierung/ Panel</i>
Johns Hopkins University , 2013	40	Exome Sequencing
Shanghai, Nat. Genet. 2014	103	Whole Exome Sequencing
ICGC Cancer Discovery 2017	489	Whole Genome, targeted und Exome Sequencing,
Memorial Sloan Kettering (MSK), Cancer 2019	195	MSK-IMPACT panel (341/410-gene-panel)
MSK Hepatology 2021	412	MSK IMPACT panel (468-gene-panel)
MSK, 2022, Clin. Cancer Res. 2022	222	MSK-IMPACT, (505-gene-panel)
TCGA, Pancancer Atlas	36	Targeted Sequencing

**Tabelle 7:** Zusammenfassung der wichtigsten Studien, die in die Vergleichende Kohortenanalyse eingeschlossen wurden. Die Studien wurden aus dem cBioPortal abgerufen.

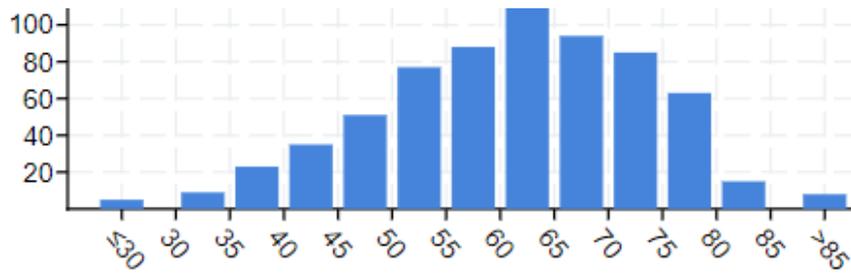
In Analogie zu den molekularen Subgruppen unserer Arbeit fanden sich in cBioPortal 531 (30.8%) Patient\*innen mit TP53 Mutationen, 190 (11%) mit KRAS Mutationen, 200 (11.6%) mit IDH1 (193) /IDH 2 (37) Mutationen, 102 (6%) mit PIK3CA, 95 (5.5%) mit FGFR2 Fusionen und 67 (3.9%) mit BRAF Mutationen.



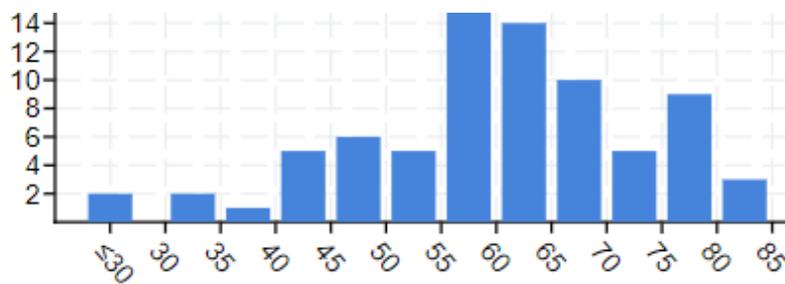
**Abbildung 25:** Kaplan Meier Kurve für das OS der gesamten (a) und der DDR Kohorte (b) nach cBioPortal.

In dieser Kohorte waren bei 248 Patient\*innen Alterationen in DDR Genen (14.3%). Interessant war die Bestätigung des jüngeren Alters der Patient\*innen (Abb.25, 26, 27).

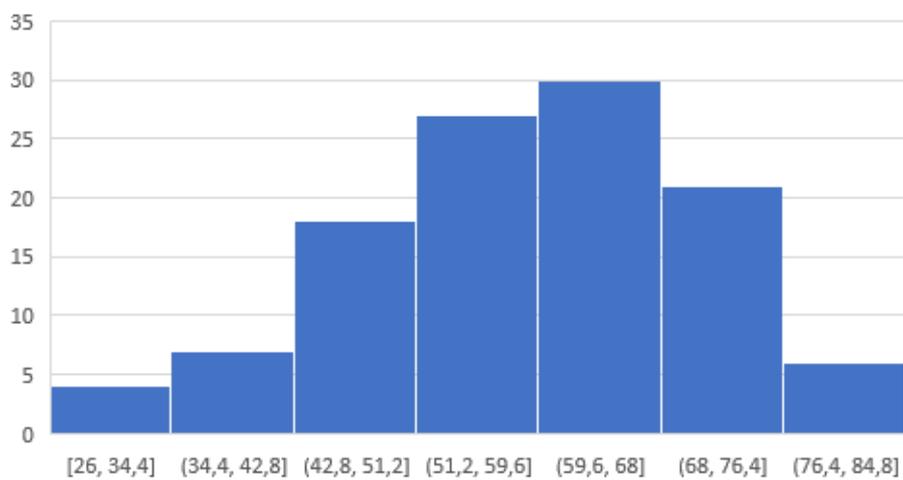
Die Inzidenz der DDR Mutationen wird in der Abb.29 dargestellt, ATM zeigte sich auch hier häufiger mutiert, die BRCA2 und ATR Mutationen folgen. Aufgrund der Unvollständigkeit der klinischen und histopathologischen Charakteristika verzichteten wir auf weitere Analysen und Korrelationen der molekularen Subgruppen mit klinischen Charakteristika und dem Therapieverlauf.



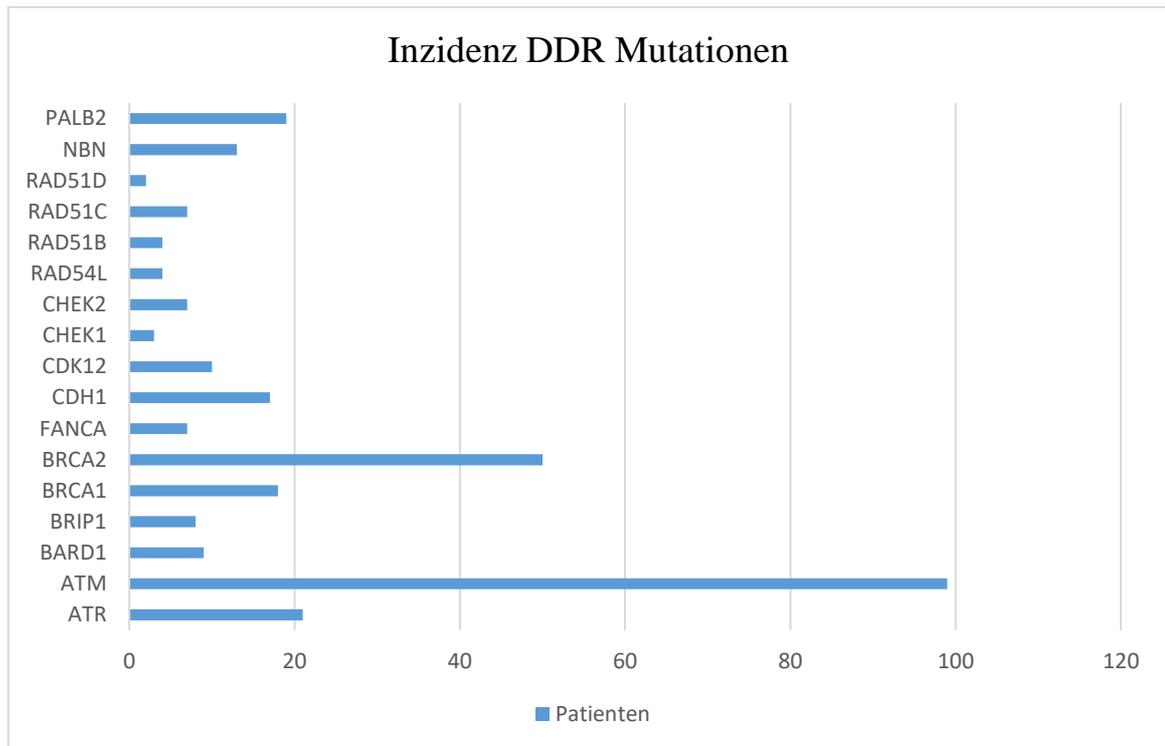
**Abbildung 26:** Altersverteilung der cBioPortal Patientenkohorte (Gesamtkohorte) bei Diagnosestellung.



**Abbildung 27:** Altersverteilung der cBioPortal DDR Subkohorte bei Diagnosestellung.

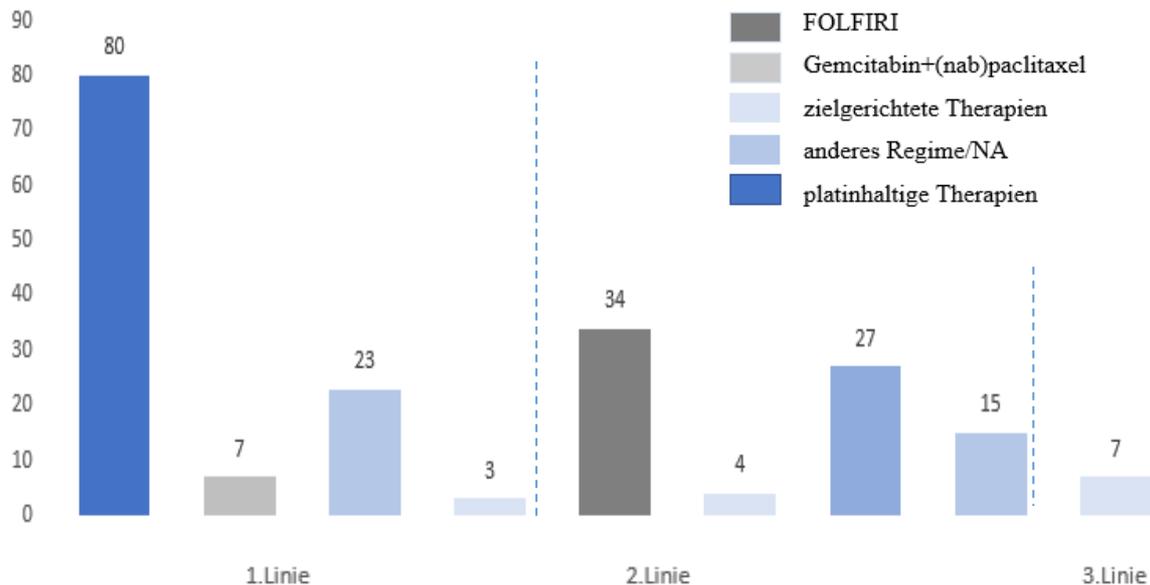


**Abbildung 28:** Altersverteilung der Patienten unserer Kohorte.



**Abbildung 29:** Balkendiagramm für die Verteilung der Patient\*innen (cBioPortal) gemäß der unterschiedlichen Mutation der DDR Gene.

## 4.4 Therapieregime



**Abbildung 30:** Reihenfolge der applizierten Chemotherapieschemata bis zur 3.Linie mit Fokus auf den Verlauf der Patient\*innen mit platinhaltiger Erstlinientherapie.

Die erste Chemotherapielinie dauerte durchschnittlich 4,6 Monate. Die Mehrheit der Patient\*innen wurden in palliativer Intention behandelt ( $82/113 = 73\%$ ). 18,6% ( $21/113$ ) der Patient\*innen erhielten ein palliatives Regime bei lokal fortgeschrittener oder inoperabler Krankheit. Die applizierten Therapieschemata nach Behandlungslinie werden in der Abb. 30 grafisch dargestellt

70% ( $80/113$ ) der Patient\*innen wurden gemäß aktuellen Leitlinien zuerst mit einem platinhaltigen Chemotherapie-Schema – überwiegend ( $53/113=47\%$ ) Cisplatin und Gemcitabin – behandelt. Patient\*innen ohne platinhaltiges Schema erhielten entweder die Kombination von Gemcitabin und nab-Paclitaxel ( $7/113=6\%$ ) oder ein 5-Fluorouracil (5-FU) -haltiges Schema ( $6/113=5\%$ ). Erwähnenswert ist, dass 3 Patient\*innen eine zielgerichtete Therapie (BAY18239, Derazantinib) und Immuntherapie bei Nachweis einer IDH2 beziehungsweise MSI Mutation erhielten.

In der untersuchten Kohorte zeigte sich kein Unterschied bezüglich des Gesamtüberlebens für das Regime der 1. Chemotherapie (HR=1.07 für Anwendung eines nicht-platinhaltigen Schemas, 95% CI=0.57-1.86, p=0.8). Die platinhaltige 1.Linie Therapie wurde folgend in Bezug auf die molekulare Subgruppen untersucht: da zeigte sich eine Tendenz für ein besseres OS, obwohl statistisch nicht signifikant, für die DDR (HR=0.43, 95% CI= 0.16-1.2, p=0.1) und PIK3CA Subgruppen (HR=0.86, 95% CI= 0.36-2, p=0.73).

Nach der ersten Chemotherapielinie wurde ein Ansprechen im Sinne einer kompletten Remission (CR) (n=4 Patient\*innen), partiellen Remission (PR) (n=20 Patient\*innen) oder stabilen Erkrankung (SD) (n=23 Patient\*innen) bei 41% der Patient\*innen (ORR=47/118=41.6%) erreicht, während 40 Patient\*innen (35.4%) darunter einen Progress zeigten. Die ToT vom Start der Chemotherapie bis zum Progress oder Tod beträgt durchschnittlich 8,7 Monate ( $Q_{0,25}=4.8$ ,  $Q_{0,75}=11.4$  Mo)

Bei den fortgeschrittenen Therapielinien befanden sich alle Patient\*innen in Palliation mit immer kürzeren Zeitintervallen bis zum Progress und geringerer Wahrscheinlichkeit eines Ansprechens. Die 2. Chemotherapielinie dauerte in unserem Kollektiv 2,8 Monate. Im Vergleich zur ersten Linie, wo die Kombination von Cisplatin und Gemcitabin zur Untersuchungszeit die empfohlene Modalität war, wurden in der 2. Linie mehrere Schemata verwendet, da die Therapieentscheidung größtenteils individuell blieb. Insgesamt erhielten 36/113 Patient\*innen eine Therapie mittels FOLFIRI in der 2. Linie und 22 Patient\*innen eine platinhaltige Chemotherapie (Cisplatin und Gemcitabin, falls nicht in der ersten Linie verwendet, oder FOLFOX) (Tab. 8). Unter den Therapieregimen ließ sich kein Unterschied nachweisen (HR= 1, 95% CI=0.55-1.87, p=0.86) zwischen einer 5-FU-haltigen und einer platinhaltigen Chemotherapie und imponiert nur ein geringes Ansprechen auf eine 2. Chemotherapielinie (12 Patient\*innen mit PR, SD) (Tabelle 8).

<b>Therapieregime&amp; Ansprechen</b>	<b>Patient*innen, n (%)</b>
Regime 1. CTX	
Platin	80 (70%)
Non-platin	20 (18%)
NA	13 (12%)
Ansprechen auf 1.CTX	
CR+PR	24 (21%)
SD	23 (20%)
PD	40 (35%)
Regime 2. CTX	
Platin	22 (19.4%)
FU	36 (32%)
Targeted	4 (3.5%)
Andere	9 (8%)
Ansprechen auf 2.CTX	
CR+PR	1 (0.8%)
SD	11 (9.7%)
PD	46 (40%)
Regime 3. CTX	
Platin	17 (15%)
FOLFIRI	9 (8%)
Targeted	7 (6%)
Andere	9 (8%)
Ansprechen auf 3.CTX	
CR+PR	2 (1.8%)
SD	4 (3.3%)
PD	33 (30%)

**Tabelle 8:** Therapieregime und Ansprechen bis zur dritten Therapielinie.

In der ersten Linie aber auch im weiteren Verlauf wurden zielgerichtete Therapien bei adressierbar mutierten CCC erwogen. 13 Patient\*innen haben eine zielgerichtete Therapie erhalten, bei Mutationen die nach Onco-KB als Stufe 1-2 annotiert sind (Chakravarty et al., 2017) oder im Rahmen von im Westdeutschen Tumorzentrum angebotenen Studien. Genauer haben 5 Patient\*innen mit IDH1/2 Mutationen Ivosidenib (Stufe 1 nach Onco-KB) und BAY 1436032 im Rahmen von rekrutierenden Studien erhalten, 3 Patient\*innen mit FGFR2 Fusionen Pemigatinib (Stufe 1 nach Onco-KB), Erdafitinib und TPU-TAS120 innerhalb von Studien, 1 Patient mit BRAF V600E Mutation Dabrafenib-Trametinib (Stufe 1 nach Onco-KB), 1 Patient mit KRAS Mutation AMG510 als Studientherapie und 2 Patient\*innen mit EGFR Aktivierungsmutation Afatinib, (Stufe 2B).

## 4.5 Time on Treatment und gesamtes Überleben

Unsere untersuchten Endpunkte schließen ToT und OS ein. Alle Werte wurden als Median mit der ersten  $Q1=Q_{0,25}$  und der dritten  $Q3=Q_{0,75}$  Quartilen in Klammern angegeben (Tab. 9). Wie oben erwähnt betragen das ToT 8,8 Mo (4.8; 11.6 Mo) und das OS 19,9 Mo (10; 32.5 Mo) in der Gesamtkohorte. In der Tabelle 9 werden die ToT und OS nach molekularer Subgruppe unterteilt und zusammengefasst. Die molekularen Subgruppen mit DDR, BRAF und PIK3CA Mutationen zeigten im Trend einen Vorteil im Punkto ToT und OS. Die Tabelle 10 stellt das OS nach molekularer Subgruppe für die Patient\*innen der Datensätze von cBioPortal im Vergleich dar.

<b>Molekulare Subgruppe</b>	<b>ToT (Mo)</b>	<b>OS (Mo)</b>
<b>DDR</b>	<b>10.1 (6.6; 13.5)</b>	<b>25 (13.7; 38.8)</b>
<b>IDH1/2</b>	<b>13 (11.1; 18.6)</b>	18.9 (11.2; 26.9)
<b>FGFR2</b>	5.5 (3.7; 8.4)	<b>41.5 (20.7; 43.1)</b>
<b>KRAS</b>	7.4 (2.8; 9.7)	12.8 (10.2; 20.3)
<b>BRAF</b>	<b>9.3 (6.8; 11.2)</b>	<b>24.2 (11.9; 27.2)</b>
<b>TP53</b>	5.9 (2.8; 8.7)	19.1 (8; 27.3)
<b>PIK3CA</b>	6.7 (6.1; 7.9)	<b>29.8 (12.9; 39.1)</b>
<b>Gesamte Kohorte</b>	<b>8.8 (4.8; 11.6)</b>	<b>19.9 (10; 32,5)</b>

**Tabelle 9:** Zeit in Erstlinientherapie (ToT) und gesamtes Überleben (OS) aller molekularer Subgruppen und der gesamten Kohorte. In Klammern werden die Q1, Q3 Quartile angegeben.

Molekulare Subgruppe	OS (Mo)
DDR	19.1 (9.1; 40.6)
IDH1/2	<b>27.4 (13.7; 47)</b>
FGFR2	<b>24.7 (12.7; 46.5)</b>
KRAS	15.7 (7; 29.7)
BRAF	21.3 (8.1; 39.6)
TP53	15.6 (8.8; 30.8)
PIK3CA	16.3 (10.4; 26.7)
<b>Gesamte Kohorte</b>	<b>22.3 (11; 44.4)</b>

**Tabelle 10:** OS aufgetrennt nach molekularer Subgruppe gemäß cBioPortal

Zusammenfassend lassen sich folgende Beobachtungen zu der DDR-mutierten Subgruppe ableiten:

- Es handelt sich um eine jüngere Subkohorte mit medianem Alter von 55 Jahren und ohne geschlechtsspezifische Unterschiede.
- Die Patient\*innen unterteilen sich histologisch wie folgt: 9/13 ICC, 3/13 (30%) und 1 GBC.
- Alle Tumore waren G2-G3 CCC.
- 6/13 (46%) Patient\*innen hatten bei Erstdiagnose des Tumors synchrone hepatische Metastasen.
- Diese Subgruppe war die einzige molekulare Subgruppe, die einen schwachen aber kohärenten Vorteil in allen primären Endpunkten (OS, ToT, OS nach Platintherapie) ergeben hat.

## 5. DISKUSSION

Die DNA Schadensreparaturmechanismen umfassen ein Netz von Proteinen, die als DNA-Schadenssensoren, Signalvermittler oder Effektorproteine wirken und die DNA-Reparatur durchführen. Die Rolle der DNA-Schadensreparaturmechanismen und insbesondere der Reparatur durch homologe Rekombination ist ein neu in den Fokus gerücktes Gebiet der Molekularbiologie und Präzisionsonkologie, welches in unterschiedlichem und noch unklarem Maß verschiedenste Tumorentitäten betrifft. Einerseits führen die nicht reparierten DNA-Defekte zu einer Anhäufung von Mutationen und bei Proliferation der Zellen zu genomischer Instabilität, die stark zur Tumorentstehung beitragen. Andererseits können diese DDR-Defekte zu Zielstrukturen führen, die therapeutisch angegriffen werden könnten. Tatsächlich sind DDR-defiziente Zellen häufig mit einer Vulnerabilität gegenüber DNA-schädigenden therapeutischen Substanzen verbunden (Kelley et al. 2008). Die homologe Rekombination sticht explizit aus den verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen heraus, weil zuletzt ein Ansprechen auf platinhaltige und gezielt an diesem Reparaturmechanismus angreifende Therapien (zum Beispiel PARP Inhibitoren) gezeigt wurde (Murfuni, Rass, 2016). Die bis dato am besten etablierten Biomarker der HRD sind Mutationen der BRCA1 und BRCA2 Gene, die gehäuft in Mamma-, Ovarial-, Pankreas und Prostatakarzinomen auftreten (Mersch et al., 2015). Die Keimbahnmutationen dieser Gene in Mammakarzinomen waren die ersten therapeutisch durch PARP Inhibitoren adressierbaren Veränderungen. Zudem erweitert sich das Anwendungsspektrum dieser Therapien durch ihre Zulassung für Ovarial- und Prostatakarzinome mit somatischen BRCA Mutationen (European Medicine Agency, 2023). Eine Kombination von Olaparib und Bevacizumab wird als Erhaltungstherapie für das hochgradige Ovarialkarzinom mit HRD-Positivität (PAOLA-1-Studie) angewendet (Ray-Coquard et al., 2021) und Olaparib ist auch für das metastasierte kastrationsresistente Prostatakarzinom mit BRCA1-, BRCA2-, ATM-Mutationen oder Mutationen in einem von noch 12 HR-bezogenen Genen zugelassen (PROfound-Studie) (de Johann et al., 2020). Dies zeigt die aktuelle Tendenz, den

Fokus von Forschungsanstrengungen auf zwei Wegweisende Punkte zu richten: a) Die Etablierung neuer und besserer Biomarker für das Ansprechen auf diese Therapien und b) die Suche nach weiteren geeigneten therapeutischen Optionen.

Es wurden verschiedene kommerziell verfügbare molekularbiologische Assays entwickelt, um Tumoren mit HRD zu identifizieren. Die bislang verfügbaren Optionen basieren auf eine *Next-Generation Sequenzierung* (NGS) (Telli et al., 2016)

Die Prävalenz von DDR-mutierten CCC variiert in bislang durchgeführten Studien zwischen 28,9 % und 63,5 % (Heeke et al., 2018), (Park et al., 2020). Ein Grund für die Variation sind uneinheitliche diagnostische Kriterien. Teils werden lediglich einige ausgewählte HRD Merkmale bewertet, teils werden mehrere Genveränderungen einbezogen, die oft von unklarer Signifikanz und Pathogenität sind. Daher wurden in dieser Arbeit nur die pathogenen Varianten von Genen mit bewiesener Rolle in der DNA Reparatur ausgesucht und daraus ergab sich eine Häufigkeit von 11.5%.

Die ersten genomischen Analysen der CCC wurden von *Javle et al.* (Javle, 2016), und *Nakamura et al.* (Nakamura, 2015) durchgeführt. *Nakamura et al.* untersuchten 239 CCC, wovon 38.9 % potenziell adressierbare genetische Veränderungen aufwiesen (Nakamura, 2015). FGFR2 Fusionen (4.2%) und IDH 1/2 (3.3%) waren die häufigsten veränderten Gene in ICC, ERBB2 (8.4%) und PTEN (1.7%) in GBC und verschiedene Fusionen von PRKCA/B (9.6%) in ECC. TP53 (26%), KRAS (16.7%), ARID1A (11.3%), SMAD4 (8.4%), PIK3CA (6.7%) und BRCA1,2 (5.9%) traten gehäuft in allen Subentitäten der CCC auf. In der vorliegenden Arbeit präsentierte sich ein ähnliches Mutationsmuster mit der folgenden Häufigkeit der wichtigsten Mutationen (TP53 29.2%, KRAS 22.1%, IDH1/2 16%, PIK3CA 7%, BRAF 5.3%, FGFR2 15%).

In einer im Jahr 2017 veröffentlichten Arbeit untersuchten *Golan et al.* eine kleine Kohorte von 18 Patient\*innen mit BRCA1/2-Mutationen, die sowohl Keimbahn- als auch somatische Mutationen umfassten (Golan et al., 2017). Die Patient\*innen im Tumorstadium III-IV hatten ein OS von 25 Monaten. Dies steht im Einklang mit dem OS von 25 Monaten in der vorliegenden Arbeit. Interessanterweise erhielten

bei Golan *et al.* 4 Patient\*innen eine PARP-Inhibitor Therapie und zeigten ein verlängertes OS von 64.7 Mo im Vergleich zu einem OS 42.6 Mo der gesamten Kohorte (Tumorstadium I-IV). Dieser Befund war der erste Hinweis auf eine potentielle Erweiterung der Anwendung von PARP Inhibitoren auf BRCA1/2 mutierte CCC.

Eine weitere Studie von Chae *et al.* untersuchte die häufigsten Mutationen in einer Kohorte von 124 CCC Patient\*innen; 54.8 % der Patient\*innen hatten eine adressierbare Mutation und 7.6% erhielten eine zielgerichtete Therapie (Chae *et al.*, 2019). Das Überleben der Patient\*innen mit DDR Mutationen wurde nach platinhaltiger Chemotherapie berechnet und es zeigte sich ein statistisch signifikanter Vorteil in Bezug auf das PFS (progressionsfreies Überleben) (6.9 vs. 5.7 Monate,  $p = 0.013$ ) und das OS (21.0 vs. 13.3 Monate,  $p = 0.009$ ). In unserer Studie imponierte eine ähnliche Tendenz nach platinhaltiger Therapie, jedoch ohne statistische Signifikanz. Erwähnenswert ist auch die ähnliche Häufigkeit und die Hauptrolle der ATM pathogenen Varianten

Heeke *et al.* haben ebenfalls 343 CCC Patient\*innen untersucht und hierbei HRD-Veränderungen in 29% detektiert (Heeke *et al.*, 2018). Ähnliche Ergebnisse zeigten auch die Arbeiten von Lin *et al.* (Lin *et al.*, 2021) und Spizzo *et al.* (Spizzo *et al.*, 2020). Genauer betrachtet traten in der Studie von Spizzo *et al.* BRCA-Mutationen bei 3.6 % der Kohorte auf. In der untersuchten Kohorte dieser Arbeit wurden in durchschnittlich 13.5% der Patient\*innen pathologische DDR Varianten festgestellt und in 1% pathologische BRCA1/2 Mutationen. Diese Diskrepanz ist teilweise auf die unterschiedlichen angewendeten methodologischen Verfahren und Einschlusskriterien zurückzuführen (Annotation der Mutationen, unterschiedliche Panels).

Lamarca *et al.* haben in ihrem Kollektiv in 40.2 % Patient\*innen (39 ICC; 6 ECC) genetische Alterationen untersucht (Lamarca *et al.*, 2020). Die häufigsten Mutationen waren IDH1/2 (19.1 %) und FGFR2 Veränderungen (10.1 %); 16.6 % zeigten DDR-Veränderungen und nach platinhaltiger Chemotherapie eine höhere Rate an Ansprechen in der radiologischen Bildgebung (64.3 % gegenüber 36.2 %;  $p=0.071$ ) und ein längeres Überleben (medianes Überleben 20.4 Mo gegenüber

13.3 Mo; HR 0.79, p=0.53). Diese Arbeit bot zum zweiten Mal Beweise für den Vorteil einer platinhaltigen Therapie in DDR-mutierten CCC, wenn auch ohne statistische Signifikanz der Ergebnisse. Das geht mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit einher, in denen die DDR mutierten Patient\*innen auch einen schwachen Vorteil nach platinhaltiger Therapie gezeigt haben (HR= 0.47, 95% CI 0.17;1.37, p=0.2).

<i>Studie</i>	<i>Patientenkohorte</i>	<i>Endpunkt der Studie</i>	<i>Assay</i>	<i>Ergebnisse</i>
<i>Golan (2017)</i>	18 CCC -BRCA mut. -St.IV	OS mit vs ohne PARPi	NGS Germline mutations	-OS 25 Mo für DDR mut.  -OS 64.7 Mo mit PARPI vs 42.6 Mo ohne PARPi
<i>Heeke (2018)</i>	343 CCC	Molekulare Charakterisierung	NGS600 (n = 592 genes), hotspot Illumina MiSeq platform testing (n = 47 genes).	Inzidenz HRD 29%
<i>Chae (2019)</i>	124 CCC	PFS, OS bei DDR mut. vs Gesamtkohorte	Targeted exome sequencing	(DDR vs Gesamtkohorte): PFS: 6,9 vs 5,7 Mo  OS: 21 vs 13,3 Mo
<i>Spizzo (2020)</i>	746 ICC 189 ECC, 353 GBC	Molekulare Charakterisierung, -Fokus auf BRCA1/2	NGS	Inzidenz BRCA-Mutationen  3,6 % (n=46)
<i>Lamarca (2020)</i>	104 CCC	OS, PFS, Ansprechen bei DDR mut. vs Gesamtkohorte	FoundationOne CDx/ Oncomine platforms) und ctDNA (FoundationOne Liquid Platform)	16,6 % Inzidenz DDR Veränderungen.- radiologische Vorteile für DDR-mutiert vs Gesamtkohorte  -64,3 % vs 36,2 %; besseres OS

**Tabelle 11:** Zusammenfassung der Hauptbefunde der verglichenen Arbeiten aus der Literaturrecherche.

Die Tabelle 11 fasst die wichtigsten Ergebnisse der Literaturrecherche zu den wichtigsten Studien der letzten Jahrzehnte auf diesem Gebiet zusammen. Im Vergleich hierzu waren die Schwerpunkte dieser Arbeit die molekulare Charakterisierung der CCC Kohorte durch bis zu vier verschiedene genomische Panels und das strenge Filtern der eingeschlossenen Mutationen, um lediglich solche mit bewiesener pathogener Rolle in der DNA-Reparatur einzubeziehen. Wie oben geschildert stehen die Ergebnisse unserer Arbeit mit der vorliegenden Literatur im Einklang, sowohl im Hinblick auf die Häufigkeit der diversen pathogenen Genalterationen als auch der pathogenen DDR Varianten, worauf sich diese Arbeit fokussiert. Dies unterscheidet die vorliegende Arbeit von anderen Publikationen, die entweder mehrere verschiedene Tumorentitäten und Histologien oder alle Genveränderungen unklarer Pathogenität und Signifikanz untersuchen. So wurde in der vorliegenden Arbeit eine klar definierte Patientenkohorte gebildet und im Hinblick auf ihre Molekularpathologie untersucht, um Rückschlüsse auf die Zusammenhänge mit den primären Endpunkten wie dem Gesamtüberleben und der Zeit unter der 1. Therapielinie zu ziehen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die DDR mutierten Cholangiokarzinome als eine separate Subgruppe mit Hinweisen auf ein besseres Ansprechen auf platinhaltige Chemotherapien und einen Vorteil in Bezug auf das Überleben in der ersten Therapielinie und das gesamte Überleben. Zudem korrelieren die Ergebnisse dieser Arbeit mit einer Auswertung der veröffentlichten Daten aus dem cBioPortal. Ein zusätzlicher gemeinsamer Punkt der vorliegenden Arbeit mit der oben zitierten Literatur ist das Ausbleiben wesentlicher Unterschiede in Bezug auf die klinischen Charakteristika dieser Subgruppe der Patient\*innen (Manifestationsalter, Lokalisation des Tumors, Metastasierungsmuster).

Diese Auswertung ist vom besonderen Interesse um die therapeutischen Möglichkeiten von CCC Patient\*innen in palliativem Setting zu erweitern. Hierbei nimmt die Anzahl an Studien zu, die die DDR-Signalwege als therapeutisches Ziel anstreben. Zum Beispiel rekrutiert die Phase II NCT 04042831 Studie Patient\*innen

mit metastasiertem CCC, um eine Erstlinientherapie mit Olaparib anzubieten. Nach Abschluss der Erstlinientherapie wird die Kombinationstherapie von Rucaparib und Nivolumab mit Olaparib in IDH1/2-mutierten Karzinomen untersucht (NCT 03212274, NCT 03207347). Vor diesem Hintergrund ist zu erwarten, dass die Bedeutung der molekularen Charakterisierung des DDR-Status weiter zunimmt. Die hier vorgestellte Arbeit kann zur Etablierung der Mituntersuchung der DDR Gene in CCC dank eines klar definierten Patientenkollektivs und ihrer selektiven Einschlusskriterien beitragen.

Die Hauptlimitation dieser Arbeit liegt in ihrem retrospektiven Charakter und der mäßigen Anzahl an eingeschlossenen Patient\*innen. Hierdurch ist insbesondere auch die Größe der DDR-mutierten Subgruppe limitiert. Zudem handelt es sich um eine monozentrische Kohorte, obgleich alle verfügbaren Daten eines onkologischen Maximalversorgers eingeschlossen sind. Diese Faktoren können zur institutionellen Verzerrung in Bezug auf die Therapie und Prognose beitragen. Da diese Limitation die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf größere Kohorten einschränken kann, betont dies den zunehmenden Bedarf größerer und multizentrischer prospektiver Studien von CCC, die sich auf die DNA-Reparaturmechanismen fokussieren. Dies ist vor dem Hintergrund der Rolle dieser Mutationen als Ziel spezifischer und schon vorhandener Therapien bei einer Krankheit mit insgesamt ungünstiger Prognose von wesentlichem klinischem Interesse.

Insgesamt zeigt unser vorgestellter Ansatz, dass molekular basierte Behandlungsentscheidungen in der klinischen Versorgung im Anschluss an etablierte Behandlungslinien umgesetzt werden sollten, um die therapeutischen Optionen für CCC Patient\*innen zu erweitern.

Ein nächster Untersuchungsschritt in zukünftigen Forschungsprojekten könnte auch zusätzlich die unmittelbar beteiligten epigenetischen Mechanismen der DNA-Reparatur untersuchen. So könnte die Korrelation der DDR-Mutationen mit diesen Mechanismen als diagnostischer und prädiktiver Biomarker für das Ansprechen auf gezielte Therapien überprüft werden.

## 6. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die Fortschritte bei der Erstellung von Genomprofilen tragen dazu bei, die molekulare Heterogenität von CCC zu entschlüsseln, was zu zunehmender Anwendung von Präzisionsmedizin führt. Die klinische Erfahrung sowie Studien, die zielgerichtete Therapien einsetzen, haben bereits erste positive Ergebnisse in einem chemotherapierefraktären Umfeld erzielt. Folglich ist es angeraten, dass allen Patient\*innen mit fortgeschrittenem CCC zum Zeitpunkt der Diagnose Zugang zu molekulargenetischen Untersuchungen und Tumorboards geboten wird.

Die erhebliche genomische Heterogenität der CCC erschwert die Auswahl verwendbarer molekularer Ziele. Daher ist es nicht überraschend, dass die zielgerichteten Therapien gegen CCC bisher keine durchgreifenden Vorteile hervorgebracht haben. Alle Patient\*innen, die mit zielgerichteten Therapien behandelt werden, entwickeln schließlich eine Behandlungsresistenz; infolgedessen könnte eine erneute genomische Profilerstellung zum Zeitpunkt des Fortschreitens der Erkrankung von Nutzen sein. Die serielle Bewertung von genomischen Tumorprofilen könnte dazu beitragen, die Resistenzmechanismen abzuklären und zusätzliche Angriffspunkte zu identifizieren. Weitere DDR Analysen in größeren Kollektiven sind nötig, um die prognostische Wertigkeit zu untersuchen.

Es häufen sich Studien, die die DDR Mechanismen analysieren und das Ansprechen der DDR-mutierten Tumore auf Therapieregime, wie Platin, PARP Inhibitoren sowie andere Kombinationstherapien untersuchen (Rizzo et al., 2020). Ebenfalls entstehen andere Forschungsgebiete in Bezug auf die DDR Gene, welche die epigenetischen Änderungen sowie das Tumormikroenvironment betreffen. Das Tumormikromilieu beinhaltet die endothelialen Zellen zur Neovaskularisierung, die Tumor-assoziierten Fibroblasten (CAFs), die Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs) sowie mehrere andere Zellen des Immunsystems und des Bindegewebes. Immunmodulatorische Ansätze und Stromadepletionsstrategien sind in fortgeschrittener klinischer Prüfung und rücken immer mehr als Angriffspunkte in den Fokus.

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

**Hintergrund:** Ziel der vorliegenden Arbeit ist die molekulare Charakterisierung einer Kohorte von Cholangiokarzinomen (CCC) mit Schwerpunkt auf genomische Veränderungen der DNA-Schadensreparaturgene (DNA Damage Repair = DDR).

**Methoden:** Es handelt sich um eine retrospektive Analyse des klinischen Verlaufs und Mutationsstatus von Patient\*innen mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem CCC des Westdeutschen Tumorzentrum des Universitätsklinikums Essen. Alle Informationen wurden aus dem Krankenhausinformationssystem des Klinikums entnommen. Der Status der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) / DNA-Mismatch-Reparatur (MMR) wurde durch Immunhistochemie und DNA-Sequenzierung ermittelt. Genvarianten wurden mit zwei zielgerichteten DNA-basierten Assays (MAPK-TRON customized NGS Panel, 47 Gene; AmoyDx HRD Focus Panel, 32 Gene) und einem RNA-Fusionstest (FusionPlex CTL Panel [Archer]) untersucht. Die Zeit im ersten palliativen Regime bis zur Progression der Krankheit (Time on Treatment=ToT), das Gesamtüberleben (Overall Survival=OS) und weitere sekundäre klinische Endpunkte wurden statistisch und mit Hilfe des Long-Rank-Test mit dem Mutationsstatus und den Behandlungsdaten korreliert.

**Ergebnisse:** Die Kohorte der vorliegenden Arbeit umfasst 113 Patient\*innen. Davon erhielten alle Patient\*innen das MAPK-TRON NGS (Next generation sequencing) - Panel, 81 zusätzlich das HRD (homologe Rekombinationsdefizienz) Focus Panel (71.7%). Bei 59 Patient\*innen wurde der MMR-Status (Mismatch Repair, 52.2%) untersucht. 33 Proben wurden mit dem RNA-Fusionsassay analysiert (29.2%). Es wurden TP53 (33/113, 29.2%), KRAS (25/113, 22.1%), IDH1/2 (18/113, 16%), PIK3CA (8/113, 7%) und BRAF (6/113, 5.3%) als die am häufigsten mutierten Gene identifiziert. Pathogene Veränderungen in DDR-Genen wurden bei 13 Patient\*innen (13/113, 11.5%) nachgewiesen. Die Patient\*innen mit DDR Mutationen zeigten einen schwachen aber kohärenten Vorteil in allen primären Endpunkten (OS, ToT, OS nach Platintherapie).

Schlussfolgerungen: DDR-defiziente CCC-Patient\*innen wiesen einen möglichen Vorteil im OS und ToT auf und stellen eine mögliche Subgruppe dar, die von platinhaltigen Behandlungsstrategien profitieren könnte.

## ABSTRACT

**Background:** Aim of this work was the molecular characterisation of a cohort of cholangiocarcinomas (CCC) with a focus on genomic alterations of DNA damage repair (DDR) genes.

**Methods:** This work presents a retrospective analysis of the clinical course and mutation status of patients with locally advanced or metastatic CCC treated at the West German Tumour Centre of Essen University Hospital. All information was retrieved from the hospital information system of the clinic. Microsatellite instability (MSI)/DNA mismatch repair (MMR) status was determined by immunohistochemistry and DNA sequencing. Gene variants were assessed using two targeted DNA-based assays (MAPK-TRON customized NGS panel, 47 genes; AmoyDx HRD Focus panel, 32 genes) and an RNA fusion assay (FusionPlex CTL panel [Archer]). Time in first palliative regime till disease progression (Time on Treatment=ToT), overall survival (OS) and other secondary clinical endpoints were analysed statistically and using the long-rank test with mutation status and treatment data.

**Results:** The cohort of the present study comprises 113 patients. All patients received the MAPK-TRON NGS (next generation sequencing) panel, 81 additionally the HRD (homologous recombination deficiency) focus panel (71.7%). In 59 patients, the MMR status (mismatch repair, 52.2 %) was examined. 33 samples were analysed with the RNA fusion assay (29.2 %). TP53 (33/113, 29.2%), KRAS (25/113, 22.1%), IDH1/2 (18/113, 16%), PIK3CA (8/113, 7%) and BRAF (6/113, 5.3%) were identified as the most frequently mutated genes. DDR-mutations were detected in 13 patients (13/113, 11.5%). The patients with DDR mutations showed a weak but coherent benefit in all primary endpoints (OS, ToT, OS after platinum therapy).

**Conclusions:** DDR-deficient CCC patients showed a potential advantage in OS and ToT and represent a potential subgroup that benefits from platinum-containing treatment strategies.

## 8. LITERATUR

1. Abou-Alfa, G. K., Macarulla, T., Javle, M. M., Kelley, R. K., Lubner, S. J., Adeva, J., Cleary, J. M., Catenacci, D. V., Borad, M. J., Bridgewater, J., Harris, W. P., Murphy, A. G., Oh, D. Y., Whisenant, J., Lowery, M. A., Goyal, L., Shroff, R. T., El-Khoueiry, A. B., Fan, B., Wu, B., Zhu, A. X. (2020). Ivosidenib in IDH1-mutant, chemotherapy-refractory cholangiocarcinoma (ClarIDHy): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *The Lancet. Oncology*, 21(6), 796–807, [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30157-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30157-1)
2. Abou-Alfa G., Macarulla T. Javle M., Kelley, Lubner S., Adeva J., Cleary J., Catenacci, Borad M., Bridgewater J., Harris W., Murphy A., Do-Youn, Whisenant, Lowery M., Goyal L., Shroff R., El-Khoueiry, Fan B., Wu B., Chamberlain C., Jiang L. Gliser, Pandya, Valle, Zhu A., May 2020, [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30157-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30157-1)
3. Aleksakhina, S. N., & Imyanitov, E. N. (2021). Cancer Therapy Guided by Mutation Tests: Current Status and Perspectives. *International journal of molecular sciences*, 22(20), 10931. <https://doi.org/10.3390/ijms222010931>
4. Azoury SC, Reddy S, Shukla V, Deng CX. Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2) Mutation Related Syndromic Craniosynostosis. *Int J Biol Sci*. 2017;13(12):1479-1488. Published 2017 Nov 2. doi:10.7150/ijbs.22373
5. Bahleda, R., Italiano, A., Hierro, C., Mita, A., Cervantes, A., Chan, N., Awad, M., Calvo, E., Moreno, V., Govindan, R., Spira, A., Gonzalez, M., Zhong, B., Santiago-Walker, A., Poggesi, I., Parekh, T., Xie, H., Infante, J., & Taberner, J. (2019). Multicenter Phase I Study of Erdafitinib (JNJ-42756493), Oral Pan-Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibitor, in Patients with Advanced or Refractory Solid Tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 25(16), 4888–4897. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3334>
6. Banales, J. M., Marin, J. J. G., Lamarca, A., Rodrigues, P. M., Khan, S. A., Roberts, L. R., Cardinale, V., Carpino, G., Andersen, J. B., Braconi, C., Calvisi, D. F., Perugorria, M. J., Fabris, L., Boulter, L., Macias, R. I. R., Gaudio, E., Alvaro,

- D., Gradilone, S. A., Strazzabosco, M., Marzioni, M., Gores, G. J. (2020). Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 17(9), 557–588. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0310-z>
7. Blechacz B. (2017). Cholangiocarcinoma: Current Knowledge and New Developments. *Gut and liver*, 11(1), 13–26. <https://doi.org/10.5009/gnl15568>
8. de Bono, J., Mateo, J., Fizazi, K., Saad, F., Shore, N., Sandhu, S., Chi, K. N., Sartor, O., Agarwal, N., Olmos, D., Thiery-Vuillemin, A., Twardowski, P., Mehra, N., Goessl, C., Kang, J., Burgents, J., Wu, W., Kohlmann, A., Adelman, C. A., & Hussain, M. (2020). Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *The New England journal of medicine*, 382(22), 2091–2102. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1911440>
9. Byrum, A. K., Vindigni, A., & Mosammaparast, N. (2019). Defining and Modulating 'BRCAness'. *Trends in cell biology*, 29(9), 740–751. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.06.005>
10. Cai, C., Wang, X., Fu, Q., & Chen, A. (2022). The VEGF expression associated with prognosis in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *World journal of surgical oncology*, 20(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s12957-022-02511-7>
11. Cao, J., Hu, J., Liu, S., Meric-Bernstam, F., Abdel-Wahab, R., Xu, J., Li, Q., Yan, M., Feng, Y., Lin, J., Zhao, S., Wang, J., Kwong, L. N., Hu, J., Carapeto, F., Borad, M. J., Wang, K., Javle, M., & Zhao, H. (2020). Intrahepatic Cholangiocarcinoma: Genomic Heterogeneity Between Eastern and Western Patients. *JCO precision oncology*, 4, PO.18.00414. <https://doi.org/10.1200/PO.18.00414>
12. Chae, H., Kim, D., Yoo, C., Kim, K. P., Jeong, J. H., Chang, H. M., Lee, S. S., Park, D. H., Song, T. J., Hwang, S., Kim, K. H., Song, G. W., Ahn, C. S., Lee, J. H., Hwang, D. W., Kim, S. C., Jang, S. J., Hong, S. M., Kim, T. W., & Ryoo, B. Y. (2019). Therapeutic relevance of targeted sequencing in management of patients with advanced biliary tract cancer: DNA damage repair gene mutations as a

predictive biomarker. *European journal of cancer* (Oxford, England : 1990), 120, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2019.07.022>

13. Chakravarty, D., Gao, J., Phillips, S. M., Kundra, R., Zhang, H., Wang, J., Rudolph, J. E., Yaeger, R., Soumerai, T., Nissan, M. H., Chang, M. T., Chandarlapaty, S., Traina, T. A., Paik, P. K., Ho, A. L., Hantash, F. M., Grupe, A., Baxi, S. S., Callahan, M. K., Snyder, A., Schultz, N. (2017). OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO precision oncology*, 2017, PO.17.00011. <https://doi.org/10.1200/PO.17.00011>

14. Cherry-Bohannon J, K.Baker, H. Francis, (2012). VEGF and cholangiocarcinoma: Feeding the tumor, *Transl Gastrointest Cancer* 2012;1:95-102., DOI: 10.3978/j.issn.2224-4778.2011.12.06.

15. Clancy, S. (2008). DNA damage & repair: mechanisms for maintaining DNA integrity. *Nature Education* 1(1):103

16. Do-Youn Oh, Aiwu Ruth He, Shukui Qin, Li-Tzong Chen, Takuji Okusaka, Arndt Vogel, Jin Won Kim, Thatthan Suksombooncharoen, Myung Ah Lee, Masayuki Kitano, Howard Burris, Mohamed Bouattour, Suebpong Tanasanvimon, Mairéad G. McNamara, Renata Zaucha, Antonio Avallone, Benjamin Tan, Juan Cundom, Choong-kun Lee, Hidenori Takahashi, Masafumi Ikeda, Jen-Shi Chen, Julie Wang, Mallory Makowsky, Pharm.D., Nana Rokutanda, Philip He, John F. Kurland, Gordon Cohen, and Juan W. Valle, Durvalumab plus Gemcitabine and Cisplatin in Advanced Biliary Tract Cancer. *NEJM Evidence* 2022 Vol. 1 Issue 8 Pages EVIDoa2200015, 362(14):1273–81 (DOI:10.1056/NEJMoa0908721), DOI: doi:10.1056/EVIDoa2200015.

17. Drilon, A., Laetsch, T. W., Kummar, S., DuBois, S. G., Lassen, U. N., Demetri, G. D., Nathanson, M., Doebele, R. C., Farago, A. F., Pappo, A. S., Turpin, B., Dowlati, A., Brose, M. S., Mascarenhas, L., Federman, N., Berlin, J., El-Deiry, W. S., Baik, C., Deeken, J., Boni, V., Hyman, D. M. (2018). Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children. *The New England journal of medicine*, 378(8), 731–739. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1714448>

18. Dummer, R., Queirolo, P., Abajo Guijarro, A. M., Hu, Y., Wang, D., de Azevedo, S. J., Robert, C., Ascierto, P. A., Chiarion-Sileni, V., Pronzato, P.,

Spagnolo, F., Mujika Eizmendi, K., Liskay, G., de la Cruz Merino, L., & Tawbi, H. (2022). Atezolizumab, vemurafenib, and cobimetinib in patients with melanoma with CNS metastases (TRICOTEL): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *The Lancet. Oncology*, 23(9), 1145–1155. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(22\)00452-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(22)00452-1) (Retraction published *Lancet Oncol.* 2023 Aug;24(8):832)

19. Edeline, J., Benabdelghani, M., Bertaut, A., Watelet, J., Hammel, P., Joly, J. P., Boudjema, K., Fartoux, L., Bouhier-Leporrier, K., Jouve, J. L., Faroux, R., Guerin-Meyer, V., Kurtz, J. E., Assénat, E., Seitz, J. F., Baumgaertner, I., Tougeron, D., de la Fouchardière, C., Lombard-Bohas, C., Boucher, E., Phelip, J. M. (2019). Gemcitabine and Oxaliplatin Chemotherapy or Surveillance in Resected Biliary Tract Cancer (PRODIGE 12-ACCORD 18-UNICANCER GI): A Randomized Phase III Study. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 37(8), 658–667, <https://doi.org/10.1200/JCO.18.00050>

20. Eisenhauer, E. A., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L. H., Sargent, D., Ford, R., Dancey, J., Arbuck, S., Gwyther, S., Mooney, M., Rubinstein, L., Shankar, L., Dodd, L., Kaplan, R., Lacombe, D., & Verweij, J. (2009). New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, 45(2), 228–247. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.10.026>

21. European Medicines Agency, (2023). <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/lynparza>.

22. Exploiting Defective DNA Repair in IDH-Mutant Cancers. (2017 Jun;7(6):544.). *Cancer Discov*(doi: 10.1158/2159-8290.CD-NB2017-057).

23. Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppalapati, A., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T. C., & Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & diseases*, 5(2), 77–106. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>

24. Ghouri, Y. A., Mian, I., & Blechacz, B. (2015). Cancer review: Cholangiocarcinoma. *Journal of carcinogenesis*, 14, 1, <https://doi.org/10.4103/1477-3163.151940>
25. Golan, T., Raitses-Gurevich, M., Kelley, R. K., Bocobo, A. G., Borgida, A., Shroff, R. T., Holter, S., Gallinger, S., Ahn, D. H., Aderka, D., Apurva, J., Bekaii-Saab, T., Friedman, E., & Javle, M. (2017). Overall Survival and Clinical Characteristics of BRCA-Associated Cholangiocarcinoma: A Multicenter Retrospective Study. *The oncologist*, 22(7), 804–810. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0415>
26. Gourdeau E. (2019). Derazantinib for intrahepatic cholangiocarcinoma. *The Lancet. Oncology*, 20(1), e11.
27. Gönül G., Anichini, G., Ulukaya, E., Marra, F., & Raggi, C. (2022). DNA Damage Response Inhibitors in Cholangiocarcinoma: Current Progress and Perspectives. *Cells*, 11(9), 1463, <https://doi.org/10.3390/cells11091463>
28. Goyal, L., Bahleda R., Furuse J., Valle J., Moehler M., Do-Youn Oh, Chang H.M., and Bridgewater J.A., (2019). FOENIX-101: A phase II trial of TAS-120 in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma harboring FGFR2 gene rearrangements. *Journal of Clinical Oncology* 37(4\_suppl):TPS468-TPS468, DOI: 10.1200/JCO.2019.37.4\_suppl.TPS468.
29. Heeke, A. L., Pishvaian, M. J., Lynce, F., Xiu, J., Brody, J. R., Chen, W. J., Baker, T. M., Marshall, J. L., & Isaacs, C. (2018). Prevalence of Homologous Recombination-Related Gene Mutations Across Multiple Cancer Types. *JCO precision oncology*, 2018, PO.17.00286. <https://doi.org/10.1200/PO.17.00286>
30. Iyer, P., Chen, M. H., Goyal, L., & Denlinger, C. S. (2020). Targets for therapy in biliary tract cancers: the new horizon of personalized medicine. *Chinese clinical oncology*, 9(1), 7. <https://doi.org/10.21037/cco.2019.12.11>
31. Jarnagin, W. R., Fong, Y., DeMatteo, R. P., Gonen, M., Burke, E. C., Bodniewicz BS, J., Youssef BA, M., Klimstra, D., & Blumgart, L. H. (2001). Staging, resectability, and outcome in 225 patients with hilar cholangiocarcinoma.

Annals of surgery, 234(4), 507–519. <https://doi.org/10.1097/00000658-200110000-00010>

32. Javle, M., Bekaii-Saab, T., Jain, A., Wang, Y., Kelley, R. K., Wang, K., Kang, H. C., Catenacci, D., Ali, S., Krishnan, S., Ahn, D., Bocobo, A. G., Zuo, M., Kaseb, A., Miller, V., Stephens, P. J., Meric-Bernstam, F., Shroff, R., & Ross, J. (2016). Biliary cancer: Utility of next-generation sequencing for clinical management. *Cancer*, 122(24), 3838–3847. <https://doi.org/10.1002/cncr.30254>

33. Javle, M., Borad, M. J., Azad, N. S., Kurzrock, R., Abou-Alfa, G. K., George, B., Hainsworth, J., Meric-Bernstam, F., Swanton, C., Sweeney, C. J., Friedman, C. F., Bose, R., Spigel, D. R., Wang, Y., Levy, J., Schulze, K., Cuchelkar, V., Patel, A., & Burris, H. (2021). Pertuzumab and trastuzumab for HER2-positive, metastatic biliary tract cancer (MyPathway): a multicentre, open-label, phase 2a, multiple basket study. *The Lancet. Oncology*, 22(9), 1290–1300. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00336-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00336-3)

34. Javle, M., Lowery, M., Shroff, R. T., Weiss, K. H., Springfield, C., Borad, M. J., Ramanathan, R. K., Goyal, L., Sadeghi, S., Macarulla, T., El-Khoueiry, A., Kelley, R. K., Borbath, I., Choo, S. P., Oh, D. Y., Philip, P. A., Chen, L. T., Reungwetwattana, T., Van Cutsem, E., Yeh, K. H., Bekaii-Saab, T. (2018). Phase II Study of BGJ398 in Patients With FGFR-Altered Advanced Cholangiocarcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 36(3), 276–282. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.75.5009>

35. Javle, M., Roychowdhury, S., Kelley, R. K., Sadeghi, S., Macarulla, T., Weiss, K. H., Waldschmidt, D. T., Goyal, L., Borbath, I., El-Khoueiry, A., Borad, M. J., Yong, W. P., Philip, P. A., Bitzer, M., Tanasanvimon, S., Li, A., Pande, A., Soifer, H. S., Shepherd, S. P., Moran, S., Abou-Alfa, G. K. (2021). Infigratinib (BGJ398) in previously treated patients with advanced or metastatic cholangiocarcinoma with FGFR2 fusions or rearrangements: mature results from a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *The lancet. Gastroenterology & hepatology*, 6(10), 803–815. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(21\)00196-5](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(21)00196-5)

36. Jeong, J., Kim, W., Kim, L. K., VanHouten, J., & Wysolmerski, J. J. (2017). HER2 signaling regulates HER2 localization and membrane retention. *PloS one*, 12(4), e0174849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174849>
37. Jusakul, A., Cutcutache, I., Yong, C. H., Lim, J. Q., Huang, M. N., Padmanabhan, N., Nellore, V., Kongpetch, S., Ng, A. W. T., Ng, L. M., Choo, S. P., Myint, S. S., Thanan, R., Nagarajan, S., Lim, W. K., Ng, C. C. Y., Boot, A., Liu, M., Ong, C. K., Rajasegaran, V., Tan, P. (2017). Whole-Genome and Epigenomic Landscapes of Etiologically Distinct Subtypes of Cholangiocarcinoma. *Cancer discovery*, 7(10), 1116–1135. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0368>
38. Kelley, R. K., Ueno, M., Yoo, C., Finn, R. S., Furuse, J., Ren, Z., Yau, T., Klumpen, H. J., Chan, S. L., Ozaka, M., Verslype, C., Bouattour, M., Park, J. O., Barajas, O., Pelzer, U., Valle, J. W., Yu, L., Malhotra, U., Siegel, A. B., Edeline, J., KEYNOTE-966 Investigators (2023). Pembrolizumab in combination with gemcitabine and cisplatin compared with gemcitabine and cisplatin alone for patients with advanced biliary tract cancer (KEYNOTE-966): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, 401(10391), 1853–1865. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)00727-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)00727-4)
39. Kelley, M. R., & Fishel, M. L. (2008). DNA repair proteins as molecular targets for cancer therapeutics. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 8(4), 417–425. <https://doi.org/10.2174/187152008784220294>
40. Kim, S. T., Lee, J., Park, S. H., Park, J. O., Park, Y. S., Kang, W. K., & Lim, H. Y. (2017). Prospective phase II trial of everolimus in PIK3CA amplification/mutation and/or PTEN loss patients with advanced solid tumors refractory to standard therapy. *BMC cancer*, 17(1), 211. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3196-6>
41. Klein, O., Kee, D., Nagrial, A., Markman, B., Underhill, C., Michael, M., Jakkatt, L., Lum, C., Behren, A., Palmer, J., Tebbutt, N. C., Carlino, M. S., & Cebon, J. (2020). Evaluation of Combination Nivolumab and Ipilimumab Immunotherapy in Patients With Advanced Biliary Tract Cancers: Subgroup Analysis of a Phase 2 Nonrandomized Clinical Trial. *JAMA oncology*, 6(9), 1405–1409. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.2814>

43. Knijnenburg, T. A., Wang, L., Zimmermann, M. T., Chambwe, N., Gao, G. F., Cherniack, A. D., Fan, H., Shen, H., Way, G. P., Greene, C. S., Liu, Y., Akbani, R., Feng, B., Donehower, L. A., Miller, C., Shen, Y., Karimi, M., Chen, H., Kim, P., Jia, P., Wang, C. (2018). Genomic and Molecular Landscape of DNA Damage Repair Deficiency across The Cancer Genome Atlas. *Cell reports*, 23(1), 239–254.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.076>
44. Lamarca, A., Hubner, R. A., David Ryder, W., & Valle, J. W. (2014). Second-line chemotherapy in advanced biliary cancer: a systematic review. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 25(12), 2328–2338. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu162>
45. Lamarca, A., Kapacee, Z., Breeze, M., Bell, C., Belcher, D., Staiger, H., Taylor, C., McNamara, M. G., Hubner, R. A., & Valle, J. W. (2020). Molecular Profiling in Daily Clinical Practice: Practicalities in Advanced Cholangiocarcinoma and Other Biliary Tract Cancers. *Journal of clinical medicine*, 9(9), 2854. <https://doi.org/10.3390/jcm9092854>
46. Le, D. T., Durham, J. N., Smith, K. N., Wang, H., Bartlett, B. R., Aulakh, L. K., Lu, S., Kemberling, H., Wilt, C., Lubner, B. S., Wong, F., Azad, N. S., Rucki, A. A., Laheru, D., Donehower, R., Zaheer, A., Fisher, G. A., Crocenzi, T. S., Lee, J. J., Greten, T. F., Diaz, L. A., Jr (2017). Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science (New York, N.Y.)*, 357(6349), 409–413. <https://doi.org/10.1126/science.aan6733>
47. Leslie, M. (2017). Exploiting Defective DNA Repair in IDH-Mutant. *Cancer Discov* (2017) 7 (6): 544.
48. Lowery, M. A., Ptashkin, R., Jordan, E., Berger, M. F., Zehir, A., Capanu, M., Kemeny, N. E., O'Reilly, E. M., El-Dika, I., Jarnagin, W. R., Harding, J. J., D'Angelica, M. I., Cercek, A., Hechtman, J. F., Solit, D. B., Schultz, N., Hyman, D. M., Klimstra, D. S., Saltz, L. B., & Abou-Alfa, G. K. (2018). Comprehensive Molecular Profiling of Intrahepatic and Extrahepatic Cholangiocarcinomas: Potential Targets for Intervention. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 24(17), 4154–4161. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0078>

49. Lin, J., Cao, Y., Yang, X., Li, G., Shi, Y., Wang, D., Long, J., Song, Y., Mao, J., Xie, F., Bai, Y., Zhang, L., Yang, X., Wan, X., Wang, A., Guan, M., Zhao, L., Hu, K., Pan, J., Huo, L., Zhao, H. (2021). Mutational spectrum and precision oncology for biliary tract carcinoma. *Theranostics*, 11(10), 4585–4598. <https://doi.org/10.7150/thno.56539>
50. Lord, C. J., & Ashworth, A. (2016). BRCAness revisited. *Nature reviews. Cancer*, 16(2), 110–120. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.21>
51. Mazzaferro, V., El-Rayes, B. F., Droz Dit Busset, M., Cotsoglou, C., Harris, W. P., Damjanov, N., Masi, G., Rimassa, L., Personeni, N., Braitheh, F., Zagonel, V., Papadopoulos, K. P., Hall, T., Wang, Y., Schwartz, B., Kazakin, J., Bhoori, S., de Braud, F., & Shaib, W. L. (2019). Derazantinib (ARQ 087) in advanced or inoperable FGFR2 gene fusion-positive intrahepatic cholangiocarcinoma. *British journal of cancer*, 120(2), 165–171. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0334-0>
52. Mehta, Kim W., Soares, Kim J, and Kim R. (2018). Phase II study of copanlisib (BAY 80-6946) in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced cholangiocarcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. [https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.4\\_suppl.TPS525](https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.4_suppl.TPS525)
53. Mersch, J., Jackson, M. A., Park, M., Nebgen, D., Peterson, S. K., Singletary, C., Arun, B. K., & Litton, J. K. (2015). Cancers associated with BRCA1 and BRCA2 mutations other than breast and ovarian. *Cancer*, 121(2), 269–275. <https://doi.org/10.1002/cncr.29041>
54. Mondesir, J., Willekens, C., Touat, M., & de Botton, S. (2016). IDH1 and IDH2 mutations as novel therapeutic targets: current perspectives. *Journal of blood medicine*, 7, 171–180. <https://doi.org/10.2147/JBM.S70716>
55. Nakamura, H., Arai, Y., Totoki, Y., Shirota, T., Elzawahry, A., Kato, M., Hama, N., Hosoda, F., Urushidate, T., Ohashi, S., Hiraoka, N., Ojima, H., Shimada, K., Okusaka, T., Kosuge, T., Miyagawa, S., & Shibata, T. (2015). Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nature genetics*, 47(9), <https://doi.org/10.1038/ng.3375>

56. Neuzillet, C., Casadei Gardini, A., Brireau, B., Vivaldi, C., Smolenschi, C., Brandi, G., Tougeron, D., Filippi, R., Vienot, A., Silvestris, N., Pointet, A. L., Lonardi, S., Rousseau, B., Scartozzi, M., Dahan, L., Aprile, G., Boussaha, T., Malka, D., Crusz, S. M., Le Sourd, S., Barts Cancer Institute Cohort (2019). Prediction of survival with second-line therapy in biliary tract cancer: Actualisation of the AGEO CT2BIL cohort and European multicentre validations. *European journal of cancer* (Oxford, England: 1990), 111, 94–106. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2019.01.019>
57. Oaknin, A., Friedman, C. F., Roman, L. D., D'Souza, A., Brana, I., Bidard, F. C., Goldman, J., Alvarez, E. A., Boni, V., ElNaggar, A. C., Passalacqua, R., Do, K. T. M., Santin, A. D., Keyvanjah, K., Xu, F., Eli, L. D., Lalani, A. S., Bryce, R. P., Hyman, D. M., Meric-Bernstam, F., Monk, B. J. (2020). Neratinib in patients with HER2-mutant, metastatic cervical cancer: Findings from the phase 2 SUMMIT
58. Primrose, J. N., Fox, R. P., Palmer, D. H., Malik, H. Z., Prasad, R., Mirza, D., Anthony, A., Corrie, P., Falk, S., Finch-Jones, M., Wasan, H., Ross, P., Wall, L., Wadsley, J., Evans, J. T. R., Stocken, D., Praseedom, R., Ma, Y. T., Davidson, B., Neoptolemos, J. P., BILCAP study group (2019). Capecitabine compared with observation in resected biliary tract cancer (BILCAP): a randomised, controlled, multicentre, phase 3 study. *The Lancet. Oncology*, 20(5), 663–673. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30915-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30915-X)
59. Raimundo, L., Calheiros, J., & Saraiva, L. (2021). Exploiting DNA Damage Repair in Precision Cancer Therapy: BRCA1 as a Prime Therapeutic Target. *Cancers*, 13(14), 3438. <https://doi.org/10.3390/cancers13143438>
60. Ray-Coquard, I., Pautier, P., Pignata, S., Pérol, D., González-Martín, A., Berger, R., Fujiwara, K., Vergote, I., Colombo, N., Mäenpää, J., Selle, F., Sehouli, J., Lorusso, D., Guerra Alía, E. M., Reinthaller, A., Nagao, S., Lefeuvre-Plesse, C., Canzler, U., Scambia, G., Lortholary, A., PAOLA-1 Investigators (2019). Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer. *The New England journal of medicine*, 381(25), 2416–2428. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1911361>

61. Ricci, A. D., Rizzo, A., Bonucci, C., Tober, N., Palloni, A., Mollica, V., Maggio, I., Deserti, M., Tavolari, S., & Brandi, G. (2020). PARP Inhibitors in Biliary Tract Cancer: A New Kid on the Block?. *Medicines (Basel, Switzerland)*, 7(9), 54. <https://doi.org/10.3390/medicines7090054>
62. Ricciuti, B., Brambilla, M., Metro, G., Baglivo, S., Matocci, R., Pirro, M., & Chiari, R. (2017). Targeting NTRK fusion in non-small cell lung cancer: rationale and clinical evidence. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 34(6), 105. <https://doi.org/10.1007/s12032-017-0967-5>
63. Rizvi, S., Khan, S. A., Hallemeier, C. L., Kelley, R. K., & Gores, G. J. (2018). Cholangiocarcinoma - evolving concepts and therapeutic strategies. *Nature reviews. Clinical oncology*, 15(2), 95–111. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.157>
64. Robert -Koch Institute. (2017). *Krebs in Deutschland 2013 - 2014*. 11. Auflage 2017; 40– 47.
65. Setton, J., Zinda, M., Riaz, N., Durocher, D., Zimmermann, M., Koehler, M., Reis-Filho, J. S., & Powell, S. N. (2021). Synthetic Lethality in Cancer Therapeutics: The Next Generation. *Cancer discovery*, 11(7), 1626–1635. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1503>
66. Bild von M. Skalski, R. (2021).
67. Spizzo, G., Puccini, A., Xiu, J., Goldberg, R. M., Grothey, A., Shields, A. F., Arora, S. P., Khushman, M., Salem, M. E., Battaglin, F., Baca, Y., El-Deiry, W. S., Philip, P. A., Nasseem, M., Hall, M., Marshall, J. L., Kocher, F., Amann, A., Wolf, D., Korn, W. M., Seeber, A. (2020). Molecular profile of BRCA-mutated biliary tract cancers. *ESMO open*, 5(3), e000682. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2020-000682>
68. Subbiah V., Bang Y., Lassen U., Wainberg A., Soria J., Wen P., Zenz T., Kreitman R., ROAR: a phase 2, open-label study in patients (pts) with BRAF V600E-mutated rare cancers to investigate the efficacy and safety of dabrafenib (D) and trametinib (T) combination therapy. *Journal of Clinical Oncology*.

69. Takaya, H., Nakai, H., Takamatsu, S., Mandai, M., & Matsumura, N. (2020). Homologous recombination deficiency status-based classification of high-grade serous ovarian carcinoma. *Scientific reports*, 10(1), 2757. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59671-3>
70. Theile D. (2017). Under-Reported Aspects of Platinum Drug Pharmacology. *Molecules* (Basel, Switzerland), 22(3), 382. <https://doi.org/10.3390/molecules22030382>
71. Valle, J. W., Lamarca, A., Goyal, L., Barriuso, J., & Zhu, A. X. (2017). New Horizons for Precision Medicine in Biliary Tract Cancers. *Cancer discovery*, 7(9), 943–962. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0245>
72. Bild von Vazzano J., (2021). <https://www.pathologyoutlines.com/topic/livertumorcholangiocarcinoma.htm>
73. Verlingue, L., Malka, D., Allorant, A., Massard, C., Ferté, C., Lacroix, L., Rouleau, E., Auger, N., Ngo, M., Nicotra, C., De Baere, T., Tselikas, L., Ba, B., Michiels, S., Scoazec, J. Y., Boige, V., Ducreux, M., Soria, J. C., & Hollebecque, A. (2017). Precision medicine for patients with advanced biliary tract cancers: An effective strategy within the prospective MOSCATO-01 trial. *European journal of cancer* (Oxford, England : 1990), 87, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.10.013>
74. Vogel, A., Bridgewater, J., Edeline, J., Kelley, R. K., Klumpen, H. J., Malka, D., Primrose, J. N., Rimassa, L., Stenzinger, A., Valle, J. W., Ducreux, M., & ESMO Guidelines Committee. Electronic address: [clinicalguidelines@esmo.org](mailto:clinicalguidelines@esmo.org) (2023). Biliary tract cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 34(2), 127–140. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.10.506>
75. Wang, M. L., Ke, Z. Y., Yin, S., Liu, C. H., & Huang, Q. (2019). The effect of adjuvant chemotherapy in resectable cholangiocarcinoma: A meta-analysis and systematic review. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT*, 18(2), 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.hbpd.2018.11.001>

76. Wungki Park, Ethan Sokol, Jiapeng Chen, Kenneth H. Yu, Danny Khalil, James J. Harding, Imane H. El Dika, Nadeem Riaz, Ghassan K. Abou-Alfa, David Paul Kelsen, Christine A Iacobuzio-Donahue, and Eileen Mary O'Reilly, Landscape of DNA-damage-repair/homologous recombination deficiency (DDR/HRD) in hepatopancreaticobiliary (HPB) cancers. Meeting Abstract | 2020 ASCO Annual Meeting I.
77. [http://www.amoydiagnostics.com/productDetail\\_39.html](http://www.amoydiagnostics.com/productDetail_39.html). (2023).
78. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01525719>. (2023).
79. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03201458>. (2023).
80. <https://neogenomics.com/test-menu/neotyper-hrd-profile>. (2023).
81. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04550624>. (2023).
82. <https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffgruppen/parp-inhibitoren>. (2023).
83. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/biliaere-karzinome> (2023)
84. National Cancer Institute, (2021).
85. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03991832>, 2023

# ANHANG

## 9.1. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	7
Abbildung 2	9
Abbildung 3	11
Abbildung 4	14
Abbildung 5	17
Abbildung 6	18
Abbildung 7	20
Abbildung 8	21
Abbildung 9	22
Abbildung 10	26
Abbildung 11	28
Abbildung 12	29
Abbildung 13	30
Abbildung 14	31
Abbildung 15	35
Abbildung 16	40
Abbildung 17	42
Abbildung 18	43
Abbildung 19	44
Abbildung 20	46
Abbildung 21	48

Abbildung 22	50
Abbildung 23	51
Abbildung 24	53
Abbildung 25	54
Abbildung 26	55
Abbildung 27	55
Abbildung 28	55
Abbildung 29	57
Abbildung 30	57

## 9.2. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	12
Tabelle 2	12
Tabelle 3	13
Tabelle 4	14
Tabelle 5	37
Tabelle 6	45
Tabelle 7	53
Tabelle 8	59
Tabelle 9	61
Tabelle 10	62
Tabelle 11	68

### 9.3. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CCC: Cholangiokarzinom

ICC: Intrahepatisches Cholangiokarzinom

ECC: Extrahepatisches Cholangiokarzinom

PCC: Perihiläres Cholangiokarzinom

GBC: Gallenblasenkarzinom

HR: Hazard Ratio

ToT: Zeit in erstem Regime bis zur Progression der Krankheit (Time on Treatment)

PFS: Progressionsfreies Überleben (progression-free survival)

OS: Gesamtüberleben (overall survival)

ORR: Gesamte Ansprechrate (overall response rate)

DDR: DNA Schadensreparatur (DNA Damage Repair)

HRD: Homologe Rekombinationsdefizienz (Homologous Recombination Deficiency)

5-FU/FS: 5-Fluorouracil/Folinsäure

PARP: Poly-ADP-Ribose-Polymerase

MMR: Mismatch-Reparatur

BER: Basen-Exzisions-Reparatur

NER: Nukleotid-Exzisions-Reparatur

HRR: Homologe Rekombinations-Reparatur

NHEJ: Nicht-homologe End-Ligation

CPF: Checkpoint-Faktor

FA: FANC-Kodierende Reparatursysteme

TLS: variable DNA-Synthese Reparatur

MSI: Mikrosatelliteninstabilität

SNV: Variation eines Nukleotids (single nucleotide variation)

InDels: Insertionen/Deletionen

CNV: Variation der Kopienzahl (copy number variation)

VEGF(R): Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (Rezeptor) (vascular endothelial growth factor (receptor))

EGF(R): Endothelialer Wachstumsfaktor (Rezeptor) (vascular growth factor (receptor))

MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase

PI3K: Phosphoinositid-3-Kinasen

FGFR: Fibroblasten Wachstumsfaktorrezeptor (fibroblast growth factor receptor)

IDH: Isocitrat-Dehydrogenase (isocitrate dehydrogenase)

NGS: Next-generation Sequencing

Q0,25 = unteres Quartil

Q0,75 = oberes Quartil

## **LEBENS LAUF**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.



