

Aus der Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Schwerpunkt Endokrinologie und Diabetologie
Direktor: Professor Dr. med. S. Frantz

**Evaluation von ERCC1 als prädiktiver Biomarker bei mit platinbasierter
Chemotherapie behandeltem Nebennierenrindenzarzinom**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Valeria Laufs
aus
Kiedrich

Würzburg, September 2018

Referent:

Prof. Dr. med. Martin Fassnacht

Korreferent:

Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald

Dekan:

Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

08. April 2019

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Nebennierenrindenzkarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie und Pathogenese	1
1.1.2	Klinik	2
1.1.3	Diagnosestellung	2
1.1.3.1	Bildgebung.....	2
1.1.3.2	Hormondiagnostik.....	3
1.1.3.3	Histologische Diagnosestellung.....	4
1.1.4	Staging	4
1.1.5	Prognose	5
1.2	Therapiekonzepte	6
1.2.1	Chirurgie	6
1.2.2	Mitotane	7
1.2.3	Chemotherapie	8
1.2.3.1	Platinverbindungen	8
1.2.3.2	Platinbasierte Chemotherapie beim ACC und die FIRMACT-Studie	9
1.2.3.3	Weitere Chemotherapien.....	10
1.2.4	Radiotherapie und ablative Verfahren	11
1.2.5	Molekulare Therapieansätze/Targeted Therapies	11
1.3	Platinverbindungen und das Nucleotid-Excision-Repair-System	12
1.3.1	ERCC1	15
1.3.2	ERCC1 und Nebennierenkarzinom.....	20
1.3.3	ERCC1 und RRM1	23
1.3.4	Die Anti-ERCC1-Antikörper	24
1.3.4.1	Anti-ERCC1-Antikörper Klon 8F1	24

1.3.4.2	Neuer Anti-ERCC1-Antikörper Klon 4F9.....	25
1.4	Fragestellung der Arbeit	27
2	Material und Methoden	29
2.1	Patientenkohorte.....	29
2.1.1	Erhebung der klinischen Daten.....	29
2.1.2	Charakteristika der Patientenkohorte.....	30
2.2	Evaluation der Wirksamkeit der platinbasierten Chemotherapie	34
2.3	Tumormaterial.....	35
2.4	Immunhistochemie.....	37
2.4.1	Chemikalien.....	37
2.4.2	Puffer und Lösungen	38
2.4.3	Durchführung der Immunhistochemie.....	38
2.5	Mikroskopische Analyse	40
2.6	Statistische Analyse.....	41
2.7	Zusätzliche Analyse der Koexpression von RRM1 und ERCC1	42
3	Ergebnisse	42
3.1	Expression von ERCC1 in den Tumorgeweben	43
3.2	Korrelation von ERCC1-Expression, Klinik und Prognose.....	44
3.2.1	ERCC1-Färbeintensität und klinische Daten	44
3.2.2	Wirksamkeit platinbasierter Chemotherapie	44
3.2.3	ERCC1 Färbeintensität und Ansprechen auf platinbasierte Chemotherapie	46
3.3	Zusammenhang von RRM1-Expression mit ERCC1-Expression, Ansprechen auf Platintherapie, progressionsfreiem Überleben und OS	49
3.4	Vergleich der beiden Anti-ERCC1-Antikörper 8F1 und 4F9.....	57
4	Diskussion	62

4.1	Platinbasierte Chemotherapie ist wirksam bei der Behandlung des Nebennierenrindenzinoms	62
4.2	Die Mehrheit der untersuchten ACCs zeigt eine hohe Expression von ERCC1	63
4.3	Die ERCC1-Färbintensität korreliert weder mit dem Ansprechen auf die platinbasierte Chemotherapie, noch mit der Länge des PFS oder OS	64
4.4	Die RRM1-Expression eignet sich nicht als prognostischer Marker hinsichtlich des Ansprechens auf platinbasierte Chemotherapie, des PFS oder des OS	66
4.5	Die erhältlichen Anti-ERCC1-Antikörper unterscheiden sich maßgeblich in ihrem Färbverhalten	67
4.6	ERCC1 ist aus verschiedenen Gründen nicht zur klinischen Therapieentscheidung heranzuziehen	68
4.7	Diskussion von Stärken und limitierenden Faktoren	72
5	Zusammenfassung	74
6	Literaturverzeichnis	Fehler! Textmarke nicht definiert.
7	Tabellen und Abbildungen	76
8	Abkürzungsverzeichnis	78
9	Danksagung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
10	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Einleitung

1.1 Das Nebennierenrindenzarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Pathogenese

Das Nebennierenrindenzarzinom (adrenocortical carcinoma, ACC) entsteht aus den Zellen der Nebennierenrinde und ist eine seltene, aber generell aggressive Krebserkrankung. Pro Jahr erkranken 0,5-2 Millionen Menschen (Kerkhofs, et al. 2013b), Frauen sind häufiger betroffen (55-60%) (Fassnacht, et al. 2013), (Libe 2015). Es werden zwei Krankheitsgipfel beobachtet, in der ersten und vierten Lebensdekade (Wajchenberg, et al. 2000). Erkrankungen bei Kindern werden vor allem in Brasilien beobachtet (10-15 Mal höhere Inzidenz als weltweit), was auf eine hohe Prävalenz einer TP53 Keimbahnmutation zurückzuführen ist (Ribeiro, et al. 2001).

Das ACC kommt außerdem bei einer Reihe von sehr seltenen erblichen Tumorsyndromen vor. Bei der genauen Untersuchung dieser familiären Krebsdispositionssyndrome konnten teilweise Mechanismen der Krebsentstehung beschrieben werden, die auch bei den sporadischen ACCs vorliegen. Einige Beispiele sind z.B. somatische Mutationen des Tumorsuppressorgens TP53 (Assie, et al. 2014; Zheng, et al. 2016) (als Keimbahnmutation beim Li-Fraumeni-Syndrom (Li, et al. 1988) (Varley, et al. 1999)), Überexpression des Insulin-like Growth Factors 2 (IGF-2) (Barlaskar and Hammer 2007; Soon, et al. 2009), (genetische oder epigenetische Deregulierung von Imprinting-Genen in der 11p15.5-Region beim Beckwith-Wiedemann-Syndrom (Henry, et al. 1989), (Libe 2015)) und aktivierende Mutationen im Gen CTNNB, welches β -Catenin kodiert (Assie et al. 2014; Zheng et al. 2016), (Berthon, et al. 2012) (auch bei der familiären adenomatösen Polyposis coli (FAP) Aktivierung des β -Catenin Signalwegs).

Sporadischen ACCs können auch verschiedene weitere Mutationen zu Grunde liegen. Bekannte Mutationen oder Änderungen in der Anzahl der DNA-Kopien

(copy number alterations) finden sich zum Beispiel bei Subgruppen von ACCs in den Genen *ZNFR3*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *DAXX*, *NF1*, *MEN1*, *CDK4*, *TERT* (De Martino, et al. 2013), (Assie et al. 2014; Zheng et al. 2016). Teilweise lassen sich dabei Zusammenhänge zwischen verschiedenen Mutationsmustern und der Prognose der Erkrankten feststellen (Assie et al. 2014).

Eine Entwicklung aus einer Adenom-Karzinom-Sequenz, wie sie beispielsweise beim Kolon-Karzinom vorliegt, wurde zwar in Einzelfällen beschrieben (Bernard, et al. 2003), hat sich aber in diversen Studien nicht bestätigt (Barzon, et al. 2003), (Cawood, et al. 2009).

1.1.2 Klinik

Es wird zwischen steroidproduzierenden (etwa 60-80% der Karzinome (Fassnacht et al. 2013), (Arlt, et al. 2011)) und hormoninaktiven Tumoren (20-40%) unterschieden. Tumore, die vor allem Glukokortikosteroide und/oder Androgene produzieren, fallen meist durch ein Cushing Syndrom und/oder eine Virilisierung auf. Selten (<5% der Patienten) ist auch ein Überschuss an Mineralkortikoiden, Östrogenen und anderen Steroiden feststellbar. Das hin und wieder beobachtete Fehlen klinischer Symptome trotz Hormonüberproduktion lässt sich durch das Überwiegen von Hormonvorstufen erklären (Arlt et al. 2011). Hormoninaktive Karzinome können sich durch eine Umfangsvermehrung des Bauches sowie durch den Druck der Tumormasse entstehende Bauch- und Rückenschmerzen bemerkbar machen (Koschker, et al. 2006). Zunehmend häufiger fällt das ACC als Zufallsbefund bei einer anderen Bildgebung auf (Kerkhofs, et al. 2015). Klassische B-Symptomatik, wie Nachtschweiß und Kachexie, sind eher selten (Allolio 2006).

1.1.3 Diagnosestellung

1.1.3.1 Bildgebung

In der Bildgebung sind CT- (oder MRT-Untersuchungen) bei der Diagnose, beim Staging sowie bei Folgeuntersuchungen das Mittel der Wahl (Bharwani, et al. 2011). Dabei ist es nicht immer einfach zwischen Adenomen und bösartigen

Neubildungen zu unterscheiden. Zur Klassifizierung dienen verschiedene Kriterien, unter anderem die Tumorgöße (Adenome sind dabei meist deutlich kleiner als Karzinome (Fassnacht, et al. 2016; Fassnacht et al. 2013)) oder die Dichte gemessen in Hounsfield Units (Dichte von 10 HU deutet auf eine lipidreiche, gutartige Raumforderung hin (Fassnacht et al. 2016)). Bei unklaren Fällen kann eine kontrastmittelgestützte CT-Untersuchung weiterhelfen, da Karzinome ein langsames Auswaschen des Kontrastmittels als Adenome zeigen (Fassnacht et al. 2016). Ebenso kann ein FDG-PET mit ^{18}F -2-Fluor-2-deoxy-D-glucose bei unklaren Fällen oder zur Hilfe des Stagings herangezogen werden (Deandreis, et al. 2011), (Boland, et al. 2011). Dieses ist allerdings teuer und nicht immer im jeweiligen Krankenhaus vorhanden.

Neben bösartigen oder gutartigen Raumforderungen die von der Nebenniere selbst ausgehen, kann die Nebenniere relativ häufig auch von Metastasen anderer Tumore befallen werden. Experimentelle Bildgebungsverfahren, die unter anderem Metomidat, einen Inhibitor der 11β -Hydroxylase und der Aldosteronsynthese, nutzen, konnten in kleinen Patientenkohorten zwischen Nebennierenrindentumoren und Tumoren anderen Ursprungs unterscheiden (Hahner, et al. 2008).

1.1.3.2 Hormondiagnostik

Eine präoperative Hormondiagnostik wird vom „European Network for the Study of Adrenal Tumours“ (ENSAT) empfohlen (www.ensat.org/). Es werden das basale Kortisol, Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS), ACTH, 17-Hydroxyprogesteron (17OHP), Androstendion, Testosteron und Estradiol untersucht sowie ein Dexamethason-Hemmtest und eine Bestimmung des Kortisols im 24h-Urin durchgeführt. Damit soll zum einen bewiesen werden, dass der Tumor tatsächlich von der Nebenniere stammt, zum anderen kann so zwischen Adenomen und Karzinomen der Nebenniere unterschieden werden. Weiterhin ist es wichtig, präoperativ einen Hyperkortisolismus auszuschließen, da dieser sonst postoperativ mit Glukokortikoiden behandelt werden müsste, um eine Nebennierenunterfunktion zu verhindern (Fassnacht et al. 2013).

Eine besondere Herausforderung stellt die Unterscheidung zwischen hormonproduzierenden Adenomen und hormonaktiven Karzinomen dar. Laut Arlt et al. finden sich bei rund 2% der Bevölkerung Nebennierenraumforderungen. Bei 2-11% der akzidentiell entdeckten Raumforderungen der Nebenniere handelt es sich um ACCs (Arlt et al. 2011). Ist eine Einteilung der Dignität der Raumforderung per Bildgebung oder „normaler“ Hormondiagnostik nicht möglich, kann eine Unterscheidung mit Hilfe einer massenspektrometrisch gestützten Untersuchung der für das ACC typischen Steroidvorläufer aus einem 24h-Sammelurin des Patienten erfolgen (Arlt et al. 2011).

1.1.3.3 Histologische Diagnosestellung

Die definitive Diagnose eines bösartigen Nebennierentumors wird in der Regel durch den histologischen Befund gestellt. Hier wird der sogenannte Weiss-Score als Standardmethode benutzt. Dieser berücksichtigt bei der Beurteilung der Tumorgewebe neun verschiedene Kriterien: Kernatypien, Mitoserate >5 in 50 Hauptgesichtsfeldern (high-power-field, HPF), atypische Mitosefiguren, Eosinophilie des Tumorzellzytoplasmas bei mehr als 75% der Tumorzellen, diffuse Architektur in mehr als 33% des Tumors, Nekrose, venöse Invasion, Sinuseinbruch und Kapselinfiltration. Als maligne gilt ein Tumor, wenn er einen Weiss-Score von ≥ 3 erreicht (Weiss 1984). Darüber hinaus haben Patienten, deren Tumor einen Weiss-Score von >6 zeigt, eine signifikant schlechtere Prognose als bei niedrigerem Weiss-Score (Libe, et al. 2015). Um zwischen einem Tumor des Nebennierenrindengewebes und einer Metastase eines anderen Tumors zu unterscheiden, wird zusätzlich SF1 (steroidogenic factor 1) als Marker herangezogen (Sbiera, et al. 2010).

1.1.4 Staging

Im Jahr 2003 schlug die UICC ein Schema zur TNM-Klassifikation des Nebennierenrindenzarzinoms vor. Da sich diese Klassifikation im klinischen Alltag als prognostisch zu wenig aussagekräftig herausstellte, wurde von dem „European Network for the Study of Adrenal Tumours“ (ENSAT) 2009 eine neue Einteilung entwickelt und empfohlen. Zur genaueren Einteilung der

Nebennierenrindenzinome nach dem ENSAT-Stagingsystem siehe Abbildung 1.

Abbildung 1: ENSAT-Stagingsystem

I	T1, N0, M0 Tumorgröße <5cm, Organgrenzen nicht überschritten, Lymphknoten nicht betroffen, keine Fernmetastasen
II	T2, N0, M0 Tumorgröße >5cm, Organgrenzen nicht überschritten, Lymphknoten nicht betroffen, keine Fernmetastasen
III	T3 oder T4, N0, M0 umgebendes Fettgewebe infiltriert (T3) oder umliegende Gewebe infiltriert (T4), Lymphknoten nicht betroffen, keine Fernmetastasen Oder: alle T, N1, M0 unabhängig von der Größe und Infiltration der Nachbargewebe, ein Lymphknoten betroffen
IV	Alle T, alle N, M1 Fernmetastasen

Aktuelle Tumorstadieneinteilung. Für weitere Informationen siehe (Fassnacht, et al. 2009).

1.1.5 Prognose

Obwohl in den vergangenen Jahren immense Anstrengungen unternommen wurden, um die Therapie des Nebennierenrindenzinoms zu verbessern, ist die Prognose noch immer generell ungünstig. Je nach initialem ENSAT-Tumorstadium liegt das 5-Jahresüberleben zwischen 81% (ENSAT-Stadium 1) und 13% (Stadium 4). Dem Resektionsstatus kommt ebenfalls eine entscheidende prognostische Rolle zu, denn eine komplette Resektion (R0) korreliert mit einer besseren Prognose (Bilimoria, et al. 2008). Als weiterer klinischer prognostischer Parameter hat sich der Proliferationsindex Ki67% etabliert: Teilt man die Patienten in Gruppen mit einem Ki67% Index von <10%, 10-19% und ≥20% ein, so zeigt sich ein signifikant längeres RFS (rezidivfreies Überleben) nach R0-Resektion und auch ein signifikant längeres Gesamtüberleben bei Patienten mit niedrigem Proliferationsindex (Beuschlein, et al. 2015).

Des Weiteren haben die Anzahl der Mitosen pro HPF bei der histologischen Untersuchung des Tumormaterials prognostische Aussagekraft gezeigt (>20 Mitosen/50HPF definieren ein „high grade ACC“ mit der schlechtesten Prognose im Vergleich zum „low grade ACC“ mit nur ≤20 Mitosen/50HPF) (Miller, et al. 2010).

Darüber hinaus zeigte eine Studie von Berutti et al., dass bei Patienten mit R0 reseziertem Tumor das Vorhandensein einer klinisch relevanten Kortisolproduktion ein prognostischer Marker sowohl für ein kürzeres RFS, als auch für ein kürzeres Gesamtüberleben ist (Berutti, et al. 2014).

1.2 Therapiekonzepte

1.2.1 Chirurgie

Für die meisten ACC-Patienten stellt die Operation die Therapie der ersten Wahl da. Sie kommt vor allem bei Patienten in Betracht, deren Tumorleiden noch nicht weit fortgeschritten ist, bei Tumorrezidiven, wenn mehr als 12 Monate seit der OP bis zum Auftreten des Rezidivs vergangen sind und eine R0-Resektion möglich erscheint oder in Fällen, bei denen eine präoperative (neoadjuvante) systemische Therapie den Tumor deutlich verkleinern konnte (Erdogan, et al. 2013).

Bei lokalen oder nur lokal fortgeschrittenen Tumorstadien kann eine Operation in kurativer Intention durchgeführt werden (Grubbs, et al. 2010) (Schteingart, et al. 2005). Doch selbst bei Patienten bei denen eine radikale Tumoresektion erfolgt kommt es in 30-50% zu Rezidiven (Ronchi, et al. 2014), (Fassnacht, et al. 2010).

Die Lymphknoten sind bei etwa 20% der Patienten befallen, was möglicherweise einen prognostischen Faktor darstellt. Eine lokoregionale Lymphknotendissektion scheint zu einer besseren Prognose für die Patienten zu führen (Reibetanz, et al. 2012). Auch bei klinisch relevantem Hormonexzess lassen sich positive Effekte durch eine Operation erzielen (Ronchi et al. 2014).

Obwohl eine ganze Reihe von Veröffentlichungen sich mit der Frage beschäftigen, ob und in welchen Tumorstadien eine minimalinvasive Herangehensweise Vorteile bietet, hat sich noch keine einheitliche Antwort auf diese Frage finden lassen (Ronchi et al. 2014). Ebenso wird ein Reduzieren der Tumormasse bei weit fortgeschrittener Erkrankung (Tumoredebuling), von dem man sich ein besseres Ansprechen auf pharmakologische Therapien erhofft, diskutiert.

Leider wird ein Großteil der Patienten in Krankenhäusern operiert, in denen es auf Grund geringer Fallzahlen an Erfahrung bei dem Eingriff mangelt (Park, et al. 2009). Eine Behandlung durch ein multidisziplinäres Team in einem spezialisierten Zentrum verbessert jedoch das Überleben der Patienten (Lombardi, et al. 2012), (Kerkhofs, et al. 2013a).

1.2.2 Mitotane

Mitotane, *o,p'-DDD*, Handelsname Lysodren®, ist die einzige Substanz, die als palliative Therapie zur Behandlung des fortgeschrittenen Nebennierenrindenzinoms zugelassen ist (Hahner and Fassnacht 2005).

Mitotane hat sowohl antihormonelle, als auch antiproliferative Wirkung (Hescot, et al. 2013). Obwohl es seit vielen Jahren als palliative Therapie bei fortgeschrittenen oder metastasierten Tumorstadien verwendet wird, wurde der genaue Wirkmechanismus erst in den letzten Jahren besser verstanden. Es ist bekannt, dass Mitotane die mitochondriale Atmungskette stört (Hescot et al. 2013). Neue Erkenntnisse zeigen nun, dass zudem die Sterol-O-Acyltransferase 1 (SOAT1) durch Mitotane inhibiert wird. Die Akkumulation toxischer Lipide führt zu endoplasmatischem Stress und Apoptose. Die SOAT1-Expression variiert in verschiedenen ACCs und korreliert mit dem Ansprechen auf eine Mitotanetherapie, wobei Patienten, die eine hohe Expression von SOAT1 zeigen, häufiger auf die Mitotanetherapie ansprechen und eine längere progressionsfreie Zeit aufweisen (Sbiera, et al. 2015).

Beim Einsatz von Mitotane als palliative Therapie bei nicht komplett resezierbarem oder metastasiertem ACC sowie bei einem Tumorrezidiv, zeigen sich Ansprechraten von etwa 30% (Venkatesh, et al. 1989), (Baudin, et al. 2001), (Gonzalez, et al. 2007). Allerdings mangelt es an großen, aktuellen Studien; alle genannten Studien erfolgten retrospektiv und unkontrolliert, weshalb eine mögliche Verzerrung der Ansprechraten durch Patientengruppen, deren Tumor sich auch ohne Mitotane nur langsam entwickelt hätte, nicht ausgeschlossen werden kann (Else, et al. 2014).

Eine Studie mit zwei unabhängigen Kontrollgruppen (eine italienische und eine deutsche Patientenkohorte) verdeutlichte, dass Mitotane als adjuvante Therapie nach radikaler Tumoresektion signifikant das rezidivfreie Überleben verlängert (42 Monate in der Mitotanegruppe vs. 12 bzw. 25 Monate in den Kontrollgruppen) sowie zu einem längeren Gesamtüberleben führt (110 vs. 52 bzw. 67 Monate) (Terzolo, et al. 2007). Um einen Effekt auf das Gesamtüberleben zu haben, müssen bei einer Therapie mit Mitotane allerdings Plasmaspiegel von >14mg/l erreicht werden, was eine konsequente Überwachung der Mitotanespiegel erforderlich macht (Hermsen, et al. 2011). Gerade bei höheren Mitotanedosen treten häufig Nebenwirkungen wie Nebenniereninsuffizienz, Übelkeit, Durchfall und Schwindel auf, wodurch häufig die Compliance und die Lebensqualität der Patienten beeinträchtigt wird (Sbiera et al. 2015). In der Studie von Terzolo et al. wurde eine Dosisanpassung oder –reduktion wegen Nebenwirkungen bei 13% der Patienten nötig (Terzolo et al. 2007). Auch aus diesen Gründen ist noch immer unklar, ob Mitotane als adjuvante Langzeittherapie für alle Patienten geeignet ist. Diese Frage stellt sich vor allem bei Patienten, die nur ein geringes Rezidivrisiko aufweisen, zum Beispiel, weil der Tumor R0 reseziert werden konnte, der Ki67% bei $\leq 10\%$ liegt oder keine Fernmetastasen vorliegen (Berruti, et al. 2010). Die neue ADIUVO Studie, welche die Mitotanetherapie mit einer Strategie des „watchfull waitings“ vergleicht, soll in der näheren Zukunft neue Antworten liefern (<https://www.epiclin.it/adiuvo>).

1.2.3 Chemotherapie

Es ist noch nicht eindeutig geklärt, ob eine adjuvante Chemotherapie beim Nebennierenrindenzinom Vorteile bringt (Varghese and Habra 2017). Bislang wird die Chemotherapie deshalb vor allem in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung eingesetzt.

1.2.3.1 Platinverbindungen

Bei der Therapie des fortgeschrittenen Nebennierenrindenzinoms kommen unter anderem Platinderivate (Cisplatin, Carboplatin) zum Einsatz, die aktuell als effektivste Zytostatika beim ACC gelten. Sie sind auch bei der Behandlung

anderer Tumorentitäten, wie Ovar-, Hoden-, Endometrium-, Blasen-, Hals- & Nackentumoren sowie des nicht-kleinzelligen Lungen-Karzinoms (NSCLC), etabliert (Go and Adjei 1999).

Cisplatin [cis-diammine-dichloroplatinum (II)] ist dabei eine der meist genutzten Chemotherapien (Go and Adjei 1999). Es wirkt alkylierend und schädigt die DNA, vor allem durch Bildung von DNA-Cisplatinaddukten und Inter- bzw. Intrastrang-Querverbindungen. Solche Addukte verhindern die DNA-Replikation und führen zum Tod der Zelle (Arora, et al. 2010). Carboplatin ist ein Cisplatinanalogon und formt die gleichen DNA-Platinverbindungen (Bowden 2014).

Manche Krebspatienten profitieren sehr von einer platinbasierten Therapie, andere leiden allerdings ausschließlich unter den Nebenwirkungen der Therapie, ohne einen Nutzen zu haben. Dabei weisen platinbasierte Therapien generell eine hohe Toxizität auf (Reed 2006). Als teilweise dosislimitierende Nebenwirkungen treten vor allem Nephrotoxizität (bei einem Drittel der Patienten) (Filipski, et al. 2009) sowie periphere Neuropathie, Ototoxizität und, im Hochdosisbereich, auch hämatotoxische Effekte auf (Planting, et al. 1993).

1.2.3.2 Platinbasierte Chemotherapie beim ACC und die FIRM-ACT-Studie

Die platinbasierte Chemotherapie wurde 1974 zum ersten Mal bei der Behandlung von Hodenkrebs eingesetzt (Donohue, et al. 1978). Nachdem sie dort gute Erfolge erzielen konnte und andere Substanzen als Monotherapie in den 1970er und 1980er Jahren beim Nebennierenrindenzarzinom nur enttäuschende Ergebnisse hervorgebracht hatten (Else et al. 2014), ist Platin heutzutage die wirkungsvollste zytotoxische Therapie beim fortgeschrittenen Nebennierenrindenzarzinom. Platin wird dabei meist mit anderen Substanzen, wie zum Beispiel Etoposid, Doxorubicin und Mitotane, im EDP-M-Regime verabreicht (Berruti, et al. 2005).

Die erste internationale randomisierte Studie zum Thema der Chemotherapiebehandlung bei fortgeschrittenem ACC ist die FIRM-ACT-Studie (First International Randomised trial in locally advanced and Metastatic

Adrenocortical Carcinoma). Hier wurden 304 Patienten mit fortgeschrittenem Nebennierenrindenzinom randomisiert aufgeteilt in zwei Studienarme. Die Patienten des einen Studienarms erhielten Streptozotocin und Mitotane (Sz-M), die Patienten des anderen Arms wurden mit einem EDP-M-Regime behandelt. Bei Progress der Erkrankung wechselten die Patienten in den jeweils anderen Behandlungsarm. Als primärer Endpunkt wurde das Gesamtüberleben festgelegt. Es zeigte sich ein signifikant besseres Ansprechen auf die Therapie mit EDP-M (23,2% vs. 9,2%, $p < 0,001$) sowie ein längeres progressionsfreies Überleben bei dieser Patientengruppe (5,0 Monate vs. 2,1 Monate, $p < 0,001$). Auch als Zweitlinientherapie zeigte sich für die EDP-M Kombination ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben (5,6 Monate vs. 2,0 Monate). Jedoch ließ sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf das OS (Gesamtüberleben) erzielen (14,8 Monate und 12,0 Monate, $p = 0,07$) (Fassnacht, et al. 2012).

Seit den Ergebnissen der FIRM-ACT-Studie wird in der klinischen Tätigkeit die Chemotherapie mit EDP-M als Erstlinientherapie für Patienten mit fortgeschrittenen ACC eingesetzt.

1.2.3.3 Weitere Chemotherapien

Bis heute gibt es keine andere Chemotherapie, die dem EDP-M-Regime bei der Behandlung des ACCs überlegen ist (Ronchi et al. 2014).

Patienten mit fortgeschrittenem ACC, die nicht oder nicht mehr auf das EDP-M-Regime ansprechen, kann eine systemische Gemcitabin-basierte Chemotherapie als Zweitlinientherapie angeboten werden. Diese Therapie erzielte bei einer Studie mit 145 Patienten eine Stabilisierung (25%) oder ein partielles Ansprechen (4,9%) für im Median 26,8 Wochen (Henning, et al. 2017). Alternativ oder als Drittlinientherapie können die Patienten mit Sz-M behandelt werden (Fassnacht et al. 2012).

Drittlinientherapien mit Trofosamid konnten nur in wenigen Fällen eine Stabilisierung der Erkrankung erreichen (Kroiss, et al. 2016). Andere getestete Reagenzien wie Paclitaxel (Berruti, et al. 2012), Docetaxel in Kombination mit

Cisplatin (Urup, et al. 2013) und Irinotecan (Baudin, et al. 2002) führten ebenfalls nur zu enttäuschenden Ergebnissen.

1.2.4 Radiotherapie und ablativ Verfahren

Die Wirksamkeit der Strahlentherapie bei der Behandlung des Nebennierenrindenzinoms ist umstritten. Nur wenige Studien untersuchen die adjuvante Radiotherapie als ein Mittel, um ein lokales Tumorzidiv zu verhindern. In einem Teil der Studien zeigte sich die Radiotherapie als wirksam um die Wahrscheinlichkeit für ein Lokalrezidiv zu senken, allerdings zeigte sich in keiner der Studien ein positiver Effekt auf das Gesamtüberleben (Fassnacht, et al. 2006; Habra, et al. 2013; Sabolch, et al. 2011).

Einen hohen Stellenwert hat die Radiotherapie in der palliativen Behandlung, vor allem bei schmerzenden Skelettmetastasen, bei Hirnmetastasen oder bei Tumorthromben in der Vena Cava (Ho, et al. 2013; Polat, et al. 2009).

Lokale Verfahren wie die Radiofrequenzablation (RFA) oder die transarterielle Chemoembolisation (TACE) sind bisher nicht ausreichend in klinischen Studien untersucht worden. Beide Methoden können jedoch zur lokalen Tumorkontrolle eine Alternative darstellen, wenn eine Operation nicht gewünscht oder nicht möglich ist. Als palliative Therapie konnte die RFA in einer Studie von Ripley et al. gleichgute Ergebnisse in Bezug auf das Gesamtüberleben bei der Behandlung von Lebermetastasen erzielen wie eine Resektion der Metastasen (Ripley, et al. 2011). In einer Studie mit sehr geringer Fallzahl zeigte sich die TACE als effektiv gegen Lebermetastasen (Soga, et al. 2009).

1.2.5 Molekulare Therapieansätze/Targeted Therapies

Verschiedene molekulare Therapieansätze wurden in kleinen Patientenkohorten getestet, allerdings ohne nennenswerten Erfolg. So wurden unter anderem der EGF-Rezeptor (Quinkler, et al. 2008), der PDGFR-Rezeptor und der Stammzellfaktor (Gross, et al. 2006), der VEGF (Wortmann, et al. 2010) und der mTOR-Signalweg (Fraenkel, et al. 2013) als mögliche Angriffspunkte für Zieltherapien erforscht. Außerdem wurde in zwei Phase-II-Studien die Wirksamkeit

der Multityrosinkinaseinhibitoren Sorafenib und Sunitinib bei therapierefraktärem ACC getestet. Es zeigte sich ein mäßiger Erfolg (Kroiss, et al. 2012) (Berruti et al. 2012).

Da IGF-2 das am meisten hochregulierte Gen beim ACC ist, testete eine Phase II-Studie IMCA12 (Cixutumumab), einen humanisierten IGF-2-Antikörper, allerdings enttäuschten die Ergebnisse (Lerario, et al. 2014). In Kombination mit Temsirolimus (Inhibitor des mammalian target of IGF-1R) konnte jedoch eine Stabilisierung der Erkrankung bei 42% der Patienten erzielt werden (Naing, et al. 2013). Die Substanz Linsitinib (OSI-906), ein Inhibitor von sowohl IGF-1R als auch des Insulinrezeptors, wurde kürzlich in einer internationalen, Placebo-kontrollierten, doppelt-verblindeten Phase-III-Studie, bei 138 Patienten, deren Tumorleiden sich in einem fortgeschrittenen Stadium befand, auf seine Antitumoreigenschaften getestet (Fassnacht, et al. 2015). Allerdings ließ sich hier kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben feststellen.

Als Radionuklidtherapie wurde [¹³¹I]IMTO an 11 Patienten mit fortgeschrittenem ACC getestet, dabei konnte zumindest bei einem Patienten eine Verkleinerung der Tumormasse festgestellt werden und fünf Patienten zeigten eine Stabilisierung der Erkrankung (Hahner, et al. 2012).

Bei Betrachtung dieser meist enttäuschenden Ergebnisse muss bedacht werden, dass die Studienpatienten in der Regel sowohl mit anderen Chemotherapeutika, als auch mit Mitotane mehrfach vortherapiert waren, wodurch es zu Wechselwirkungen und Resistenzen der Tumorzellen gekommen sein kann. Ebenfalls zu beachten sind die geringen Fallzahlen bei einem Großteil der Studien.

1.3 Platinverbindungen und das Nucleotid-Excision-Repair-System

Wie bereits beschrieben, stellen Platinverbindungen eine der meistgenutzten Chemotherapien dar und werden auch bei der Behandlung des Nebennierenrindenzellkarzinoms eingesetzt. Die entstehenden DNA-Cisplatinaddukte

und Inter- bzw. Intrastrang-Querverbindungen, die zum Zelltod der Tumorzelle führen sollen, können allerdings durch bestimmte DNA-Reparaturmechanismen entfernt werden.

Ein wichtiger solcher Mechanismus ist das Nukleotid-Excision-Repair-System (NER). Es wurde besonders im Zusammenhang mit der Erkrankung „Xeroderma pigmentosum“ bekannt. Bei dieser Erkrankung liegt ein Defekt im NER-System vor, was zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber UV-Licht und zum Auftreten multipler Hautkrebe führt (Kraemer, et al. 1984). *In vitro* Daten zeigen außerdem schon seit langem, dass das NER-System für die Reparatur der von Cisplatin verursachten DNA-Schäden verantwortlich ist (Reed 1998).

Die genaueren Aufgaben des NER-Systems können zusammengefasst werden in a) Erkennen von Schäden der DNA, b) Entwinden der DNA, c) Schneiden der DNA und d) Resynthese an Hand des gegenläufigen Strangs (Sancar and Tang 1993) (siehe Abbildung 2). Dabei spielen bis zu 30 verschiedene Proteine eine Rolle (de Boer and Hoeijmakers 2000).

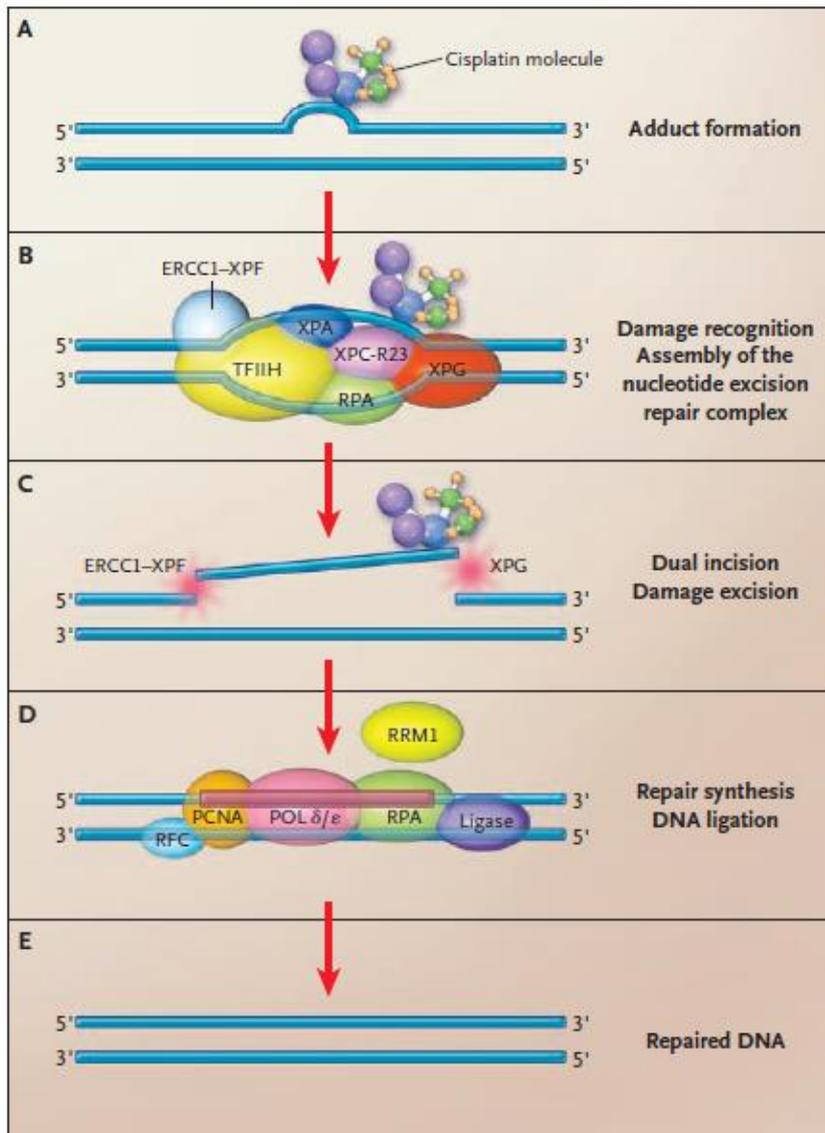


Abbildung 2: Entfernung eines Platinaddukts durch Nucleotid-Excision-Repair, Quelle: (Gazdar 2007)

Platin bindet an die DNA und bildet eine sperrige Struktur, welche die Helix der DNA-Stränge stört (A). In der Regel führt dies zur Apoptose der Zelle. In Zellen, die über eine hohe Aktivität des NER-Systems verfügen, können die Addukte allerdings entfernt und die DNA repariert werden. Dazu wird das Addukt zunächst als solches erkannt und die notwendigen Proteine des NER-Komplexes sammeln sich an der Adduktstelle (B). Die DNA wird entwunden. Endonukleasen schneiden die DNA rechts und links der beschädigten Stelle ein (C). Es wird ein Segment von etwa 22-32 Nucleotiden mitsamt dem Addukt entfernt. Durch Polymerasen und zusätzliche Replikationsproteine, wie PCNA, RPA und RFC, wird der herausgeschnittene Teil an Hand des gegenläufigen Stranges repliziert und repariert (D). Die DNA-Ligase verbindet den neuen Abschnitt mit dem Rest des Stranges. Die Biosynthese der erforderlichen Desoxyribonucleotide wird von der Ribonucleotid-Reduktase M1 (RRM1) katalysiert. In Abschnitt (E) ist zu sehen, dass die DNA wieder in intaktem Zustand vorliegt. ERCC1=Excision Repair Cross-Complementing 1, PCNA=Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen, POL=Polymerase, RFC=Replication Factor C, RPA=Replication Protein A, TFIIH=Transcription Factor IIH, XP=Xeroderma Pigmentosum (Gazdar 2007), (Friedberg 2001).

Das NER-System ist zum einen beim Globale Genome Repair (GGR) aktiv. Dort werden Schäden im Genom repariert, damit Mutationen nicht an die nächste Generation weiter gegeben werden. Zum anderen ist das NER-System beim Transcription-Coupled Repair beteiligt. Hier ist es dafür verantwortlich, dass die Transkription der Gene korrekt erfolgt (de Boer and Hoeijmakers 2000).

1.3.1 ERCC1

Alterationen im NER-System können also zu einer Resistenz der Tumorzellen gegenüber Cisplatin führen (Chu 1994). Als geschwindigkeitslimitierender Schritt spielt ERCC1 dabei im NER-Signalweg eine wichtige Rolle.

ERCC1 ist eine der Isoformen des „Excision Repair Cross-Complementing“ und formt ein Heterodimer mit XPF (Xeroderma Pigmentosum complementation group F), auch bekannt als ERCC4 (Bessho, et al. 1997), (Bowden 2014). Gemeinsam mit XPF ist ERCC1 in mindestens vier DNA-Reparaturmechanismen involviert: Neben der Aufgabe im erwähnten Nukleotide-Excision-Repair-Pathway repariert der ERCC1/XPF-Komplex zum Beispiel beim Interstrand Cross-Link-Reparaturmechanismus (ICL-R) ins Stocken geratene DNA-Replikationsgabeln. Außerdem ist er beim ROS-induzierten Single-Strand-Break-Repair (SSB-R) und bei zwei Pfaden des Double-Strand-Break-Repairs beteiligt (Besse, et al. 2013) (siehe Abbildung 3).

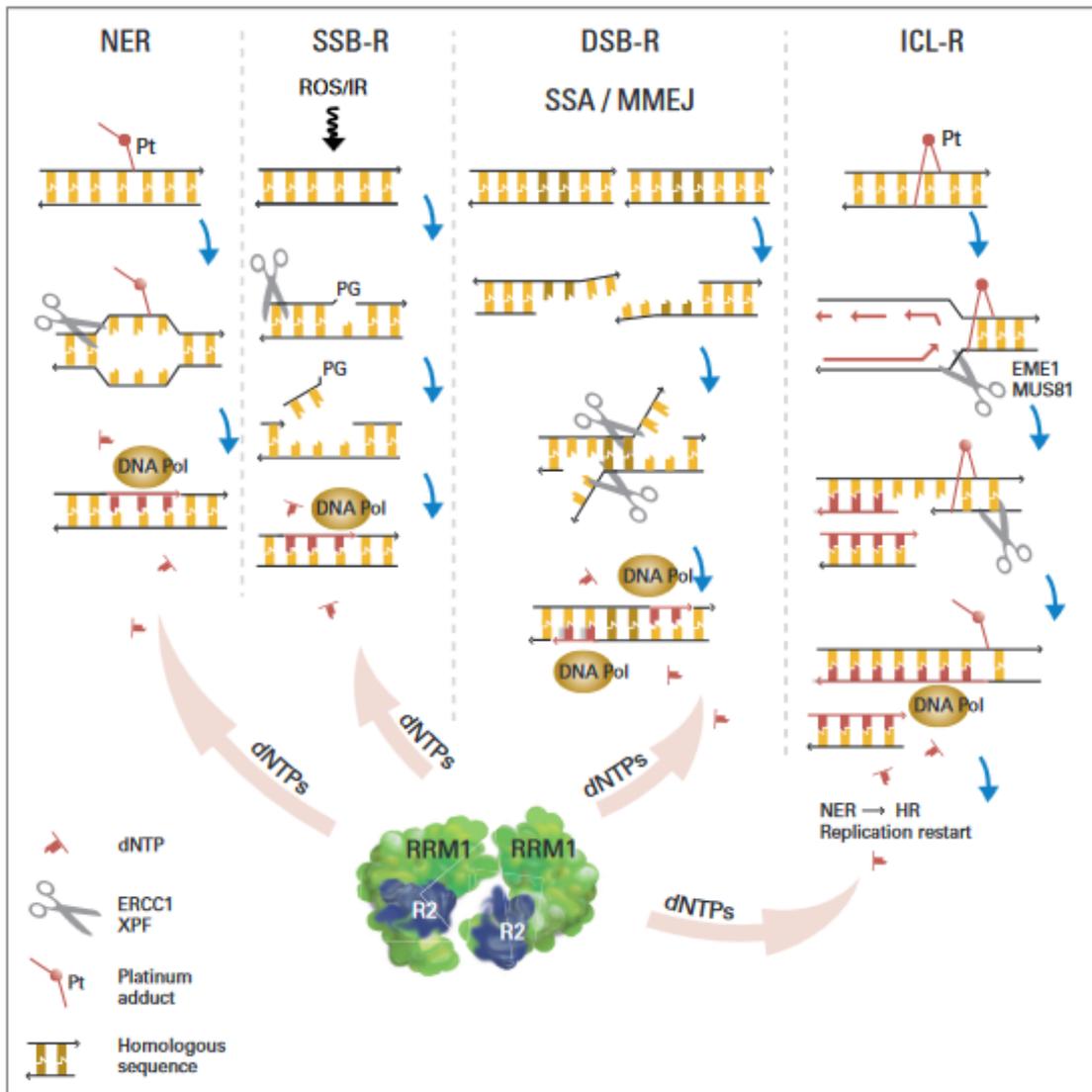


Abbildung 3: Die Rolle von ERCC1 bei verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen, Quelle: (Besse et al. 2013)

ERCC1 formt als Heterodimer mit XPF eine Endonuklease. ERCC1/XPF ist in mindestens vier verschiedenen DNA-Reparaturpfaden involviert: beim Nukleotide-Excision-Repair-Pathway, beim Interstrand Cross-Link-Reparaturmechanismus (ICL-R), beim ROS-induzierten Single-Strand-Break-Repair (SSB-R) und bei zwei Pfaden des Double-Strand-Break-Repairs. Die Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), die die DNA-Polymerase dabei nutzt, um die DNA neu zu synthetisieren, werden von der Ribonukleotidreduktase (RRM1) produziert. HR=Homologe Rekombination, IR=ionisierende Strahlung, Pt=Platin

Dabei besitzt nur XPF die Nukleasedomäne des Komplexes, jedoch benötigt es ERCC1, da dieses für das Binden an die DNA verantwortlich ist und das korrekte Positionieren der XPF-Endonuklease an die Stelle des DNA-Schadens steuert. Zudem ist ERCC1 für die Interaktion mit anderen NER-Proteinen wie XPA unerlässlich (Tripsianes, et al. 2005).

ERCC1 und XPF scheinen nur als Komplex stabil zu sein (Gaillard and Wood 2001), zumindest zeigen sich *in vitro* XPF-Proteinlevel reduziert, wenn ERCC1 herunterreguliert wird (Arora et al. 2010). Dabei ist die Expression von ERCC1 durch komplexe Faktoren, wie Polymorphismen und alternatives Splicen, bestimmt (Gazdar 2007), wobei vier Isoformen von ERCC1 gebildet werden, nämlich 201, 202, 203 und 204 (Friboulet, et al. 2013a).

Wie bereits erwähnt, spielt ERCC1 insbesondere eine wichtige Rolle bei der Entfernung durch Platinverbindungen entstandener DNA-Schäden (Damia, et al. 1996), (Lee, et al. 1993) (siehe Abbildung 3). Dies verdeutlichen unter anderem *in vitro* Studien mit Zelllinien des Ovarialkarzinoms (Ferry, et al. 2000), (Selvakumaran, et al. 2003), (Lee et al. 1993), des Kolonkarzinoms (Arnould, et al. 2003), des Hodenkrebs (Welsh, et al. 2004), mit NSCLC-Zellen sowie mit anderen Krebszelllinien (Altaha, et al. 2004).

Eine der ersten großen Studien, die einen direkten Vergleich zwischen der ERCC1-Expression im Tumorgewebe und dem Ansprechen auf eine platinbasierte Chemotherapie anstellte, war die 2006 veröffentlichte klinische Studie von Olausen et al. (Olausen, et al. 2006). In dieser Studie untersuchten die Autoren mittels Immunhistochemie Gewebeproben aus 761 NSCLC-Tumoren und fanden ein signifikant längeres OS nach adjuvanter Chemotherapie bei Patienten mit ERCC1-negativen Tumoren.

Nach diesen vielversprechenden Ergebnissen beschäftigten sich viele weitere Gruppen bei unterschiedlichsten Tumorentitäten (u.a. NSCLC, Kolon-Ca, Ovarial-Ca, Pankreas-Ca, Hoden-Ca, Magen-Ca) und variablen Patientenkohorten (in den folgenden zwei Tabellen Auswahl an Studien mit Kohorten von 17 bis 247 Patienten) mit der Erforschung der ERCC1-Expression und dem Zusammenhang mit Platinresistenz (Bellmunt, et al. 2007), (Wang, et al. 2008), (Ahlman, et al. 2001), (Ronchi, et al. 2009), (Mendoza, et al. 2013), (De Dosso, et al. 2013), (Ulker, et al. 2015), (Huang, et al. 2016), (Strippoli, et al. 2016), (Malandrino, et al. 2010), (Tantraworasin, et al. 2013). Die Arbeitsgruppen verwendeten unterschiedliche Herangehensweisen, um die ERCC1-Expression zu bestimmen (Proteinexpression oder Bestimmung der mRNA). Außerdem kamen verschiedene

Anti-ERCC1-Antikörper (Klon 8F1, SF1, 4F9, etc.) für die Immunhistochemie in unterschiedlichen Verdünnungen (1:80, 1:100, 1:200, 1:300) zum Einsatz.

Diese heterogenen Studien kamen dann, nicht überraschend, zu widersprüchlichen Ergebnissen.

Eine Auswahl an Studien, die den Zusammenhang zwischen der individuellen ERCC1-Expression und dem Ansprechen bzw. Nichtansprechen der Patienten auf platinbasierte Chemotherapie untersuchten, findet sich in Tabelle 1 (ERCC1 als prognostischer Marker) und Tabelle 2 (ERCC1 ohne prognostische Aussagekraft).

Tabelle 1: Klinische Studien mit platinbasierter Therapie, in denen ERCC1 als Marker eine prädiktive Aussagekraft zeigte

Autor	Tumorentität	Anzahl	Protein/ mRNA	Antikörper	Aussage	Quantifizierung
(Olaussen et al. 2006)	NSCLC	761	Protein	8F1, 1:300 Neomarkers [£]	OS ↑ wenn ERCC1 ↓	HR=0,65; 95%CI=0,50-0,86; p=0,002*
(Bellmunt et al. 2007)	Blasen-Ca	57	mRNA	-	OS ↓ wenn ERCC1 [†] ↑	HR=3,72; 95%CI=1,33–10,40; p=0,012
(Wang et al. 2008)	NSCLC Magen-Ca gynäkologische Malignome	46	mRNA	-	Neg. Korrelation von ERCC1 und Platinsensitivität beim NSCLC [‡]	p=0,001
(Matsubara, et al. 2008)	Magen-Ca	43	mRNA	-	Ansprechraten [*] und OS ↓ wenn ERCC1 ↑	HR=2,38; 95%CI=1,55-3,67; p=0,008
(Ronchi et al. 2009)	ACC	45	Protein	8F1, 1:100, Neomarkers	OS ↓ wenn ERCC1 ↑	HR=2,95; 95%CI=1,4-6,2; p=0,004
(Mendoza et al. 2013)	Keimzelltumore Hoden	108	Protein	8F1, 1:300, Neomarkers	Ansprechraten ↓ wenn ERCC1 ↑	OR [*] >2,95; 95%CI=0,97–8,97; p=0,05
(De Dosso et al. 2013)	Magen-Ca	68	Protein	8F1, 1:50, Thermo- Scientific	OS ↑ wenn ERCC1↓	p=0,04
(Ulker et al. 2015)	NSCLC Ovarial-Ca [†]	NSCLC: 45 Ovarial-Ca: 27	Protein	#M 3684, 1:80, Spring/ Bioscience	Ansprechraten ↑ wenn ERCC1 ↓	NSCLC p=0,028; Ovarial-Ca p=0,044
(Huang et al. 2016)	NSCLC	84	Protein	4F9, 1:150, OriGene Technologies	PFS ↑ wenn ERCC1↓	HR=2,166; 95%CI=1,049-4,474; p=0,037
(Strippoli et al. 2016)	Pankreas-Ca	71	mRNA	-	PFS und OS ↑ wenn ERCC1 [†] ↓	PFS: HR=0,26; 95%CI=0,14-0,50; p<0,0001, OS: HR=0,23; 95%CI=0,12-0,46; p<0,0001

[£]2006 erhältliche Version, ↑länger/besser, ↓niedrig/negativ, *Verglichen Patienten mit ERCC1-neg. Tumoren und Chemotherapie zu Patienten mit ERCC1-neg. Tumoren ohne Chemotherapie, bei selben Vergleich unter Patienten mit ERCC1-pos. Tumoren kein Unterschied, [‡]Therapie mit Gemcitabin/Cisplatin bzw. Gemcitabin/Cisplatin/Paclitaxel, [†]Zellen aus malignen Ergüssen getestet auf Sensitivität für Cisplatin und/oder Docetaxel mittels ATP-TCA-Assay, ^{*}Platin als Erstlinientherapie (kombiniert mit S-1 oder Irinotecan), [†]bei Lungen-Ca (Platin Monotherapie bei 44% der Patienten, Platin+Gemcitabin bei 56%) und Ovarial-Ca (100% Platinmonotherapie), ^{*}Overall Risk für Nichtansprechen, [†]Therapie mit FOLFIRINOX, NSCLC= nicht-kleinzelliges Lungen-Karzinom, OS=Gesamtüberleben, ACC=Nebennierenrindenzarzinom, PFS=progressionsfreies Überleben. Nicht in allen Studien wurde eine HR (Hazard Ratio) angegeben.

Tabelle 2: Klinische Studien mit platinbasierter Therapie, in denen ERCC1 als Marker keine prädiktive Aussagekraft zeigte

Autor	Tumorentität	Anzahl	Protein/ mRNA	Antikörper	Aussage
(Malandrino et al. 2010)	ACC	33	Protein	8F1, 1:100, Neomarker	Keine Unterschiede bei Ansprechraten oder OS
(Tantraworasin et al. 2013)	NSCLC	247	Protein	SF1, 1:200, Thermo Fisher Scientific	Keine Unterschiede bei OS oder Rezidivraten"
(Ulker et al. 2015)	Pankreas-Ca Ovarial-Ca	Pankreas-Ca: 17 Ovarial-Ca: 27	Protein	#M 3684, 1:80, Spring/ Bioscience	Keine Unterschiede bei Ansprechraten bei Pankreas-Ca [‡] oder OS bei Ovarial-Ca

"bei Pat. mit komplett reseziertem NSCLS, unabhängig davon, ob die Patienten platinbasierte Chemotherapie erhielten oder nicht, [‡]Gemcitabin mono bei 28%, Gemcitabin+Platin bei 72%, ACC=Nebennierenrindenzinom, OS=Gesamtüberleben, NSCLC=nicht-kleinzelliges Lungen-Karzinom

1.3.2 ERCC1 und Nebennierenkarzinom

Nachdem bei verschiedenen Tumorentitäten teilweise vielversprechende Ergebnisse in Bezug auf die Expression von ERCC1 und die Korrelation mit dem Ansprechen auf platinbasierte Chemotherapie erzielt werden konnten, untersuchten Ronchi et al. mittels Immunhistochemie (Anti-ERCC1-AK 8F1) verschiedene Nebennierentumore hinsichtlich der ERCC1-Expression (Ronchi et al. 2009). Dabei zeigte sich unter anderem, dass die Mehrheit der ACCs (54%) eine niedrige Expression von ERCC1 aufwies (H-Score 0 und 1). Im Gegensatz dazu zeigten alle gesunden Nebennieren eine hohe ERCC1-Färbeintensität und auch die Adenome wiesen fast durchweg (93%) eine hohe Expression von ERCC1 (H-Score 2 und 3) auf (siehe Abbildung 4).

ERCC1 expression H-score	n	Low expression ^a		High expression ^a		P*
		0	1 n (%)	2	3 n (%)	
Normal adrenal glands	8	0	0	4 (50%)	4 (50%)	
Adrenocortical adenomas	15	0	1 (7%)	12 (80%)	2 (13%)	1.00
Aldosterone-producing adenoma	5	0	0	5	0	
Cortisol-producing adenoma	5	0	0	5	0	
Inactive adenoma	5	0	1	2	2	
Adrenocortical carcinomas	163	12 (7%)	76 (47%)	61 (37%)	14 (9%)	0.0007[†]
Primary tumor	132	9	65	46	12	0.006[‡]
Local recurrence	17	2	8	6	1	
Distant metastases	14	1	3	9	1	

Abbildung 4: ERCC1-Expression mittels IHC in 186 Gewebeproben adrenaler Tumore, Quelle: (Ronchi et al. 2009)

*p-Wert ermittelt mittels exaktem Fisher-Test zwischen hoher und niedriger ERCC1-Expression, [†]p-Wert vs. normale Nebenniere, [‡]p-Wert vs. gutartige Nebennierentumore. Fettgedruckte p-Werte signalisieren p<0,05. Niedrige und hohe ERCC1-Expression wurde definiert als H-Score ≤1 bzw. >1 (siehe (Ronchi et al. 2009)).

Es fand sich kein Zusammenhang zwischen der ERCC1-Expression und dem Gesamtüberleben bei ACC-Patienten, die keine platinhaltige Chemotherapie erhielten. Bei der Untersuchung des Tumormaterials von 45 Patienten, die wegen eines fortgeschrittenen ACCs mit einer Chemotherapie mit Platinverbindungen behandelt wurden, zeigte sich allerdings eine höhere Ansprechrate auf die Therapie bei Patienten, deren Tumore eine niedrige ERCC1-Expression aufwiesen (29% vs. 14%). Darüber hinaus stellte sich in dieser Gruppe eine signifikante Korrelation der ERCC1-Expression mit dem Gesamtüberleben heraus (medianes Gesamtüberleben bei Patienten mit hoher ERCC1-Expression 8 Monate versus 24 Monate bei Patienten mit niedriger ERCC1-Expression, p=0,004) (siehe Abbildung 5).

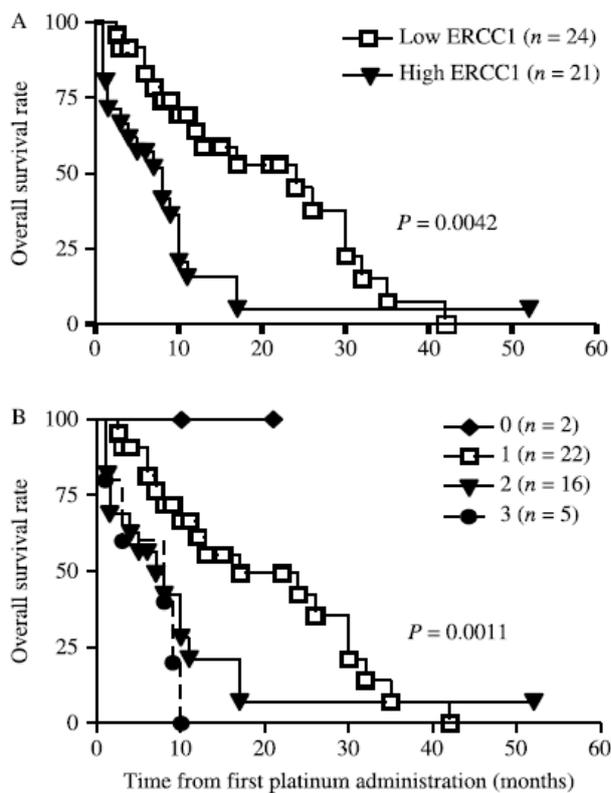


Abbildung 5: Korrelation des Gesamtüberlebens mit der ERCC1-Expression bei 45 mit platinbasierter Chemotherapie behandelten ACC-Patienten, Quelle: (Ronchi et al. 2009)

Als Überlebenszeit galt die Zeit zwischen dem Tag der ersten Platingabe bis zum Todestag oder bis zur letzten Folgeuntersuchung. (A) Die Patienten wurden aufgeteilt in Patienten mit niedriger ERCC1-Expression (H-Score ≤ 1) oder hoher ERCC1-Expression (H-Score > 1). (B) Patienten aufgeteilt in Untergruppen mit verschiedener ERCC1-Expression (H-Score 0=keine, 1=geringe, 2=moderate, 3=starke ERCC1-Expression).

Demgegenüber steht eine kurz darauf veröffentlichte Studie von Malandrino et al. (Malandrino et al. 2010). Dieser untersuchte ebenfalls per Immunhistochemie (Anti-ERCC1-AK 8F1) Tumormaterialien von 33 ACC-Patienten, die nach der Operation eine platinbasierte Chemotherapie erhielten. Auch diese Studie fand eine höhere Ansprechrate auf die Therapie bei Patienten, die eine niedrige Expression von ERCC1 zeigten (26,7 vs. 16,7%), allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant.

Bei diesen widersprüchlichen Ergebnissen ist zu beachten, dass es sich jeweils um sehr kleine Patientenkohorten ($n=45$ und $n=33$) handelte. Zudem waren verschiedene Platinderivate und verschiedenste Therapieregime angewandt worden.

1.3.3 ERCC1 und RRM1

Zahlreiche Studien untersuchen nicht nur den Biomarker ERCC1 alleine, sondern die Kombination aus ERCC1-Expression und RRM1-Expression. RRM1, die regulatorische Untereinheit der Ribonukleotidreduktase, produziert Desoxyribonukleotiddiphosphate aus Ribonukleotiddiphosphaten. Diese werden anschließend weiterverarbeitet zu Desoxyribonukleosidtriphosphaten, welche für die Neusynthese der DNA sowie für die DNA-Reparatur, z.B. durch das NER-System, benötigt werden (Besse et al. 2013). Vermutlich vermittelt über den Zusammenhang zwischen der RRM1-Expression und der Fähigkeit der Zelle, Schäden an der DNA zu reparieren, zeigten zum Beispiel Mäuse mit Lungentumoren ein längeres Überleben bei hoher RRM1-Expression (Gautam and Bepler 2006). Auch in klinischen Studien bei Patienten mit NSCLC zeigte sich eine hohe RRM1-Expression als prädiktiv für ein längeres OS und ein längeres krankheitsfreies Überleben nach der Operation (Bepler, et al. 2004). Zudem scheint RRM1 eine Rolle bei der Unterdrückung der Invasivität und der Metastasierung von Tumoren zu spielen (Fan, et al. 1997; Gautam, et al. 2003).

Dabei ist es interessant, in welchem Verhältnis zueinander RRM1 und ERCC1 im Tumor exprimiert werden. So korrelierte zum Beispiel bei einer Studie an 187 Patienten mit frühen Stadien eines NSCLC die mittels IHC untersuchte RRM1-Expression mit der Expression von ERCC1 (Zheng, et al. 2007). Dies hat klinische Relevanz, da dasjenige Drittel der Patienten ein längeres Gesamtüberleben zeigte, welches eine hohe Expression von RMM1 und gleichzeitig eine hohe Expression von ERCC1 aufwies (Zheng et al. 2007).

Bei Patienten, die mit einer Chemotherapie behandelt wurden, wurde die RRM1-Expression vor allem hinsichtlich des Ansprechens auf eine Chemotherapie mit Gemcitabin untersucht (Jordheim, et al. 2011), da dieses Chemotherapeutikum als Nukelosidanalogen über eine Blockade der Ribonukleotidreduktase wirkt (Wang, et al. 2007). Doch auch bei Patienten, deren Tumor (zusätzlich) mit einer platinhaltigen Chemotherapie behandelt wurde, korrelierte die Expression der beiden Marker RRM1 und ERCC1 mit dem Ansprechen auf die Therapie: So war eine niedrige Expression beider Marker bei Patienten, die mit Gemcitabin und/oder

Cisplatin behandelt wurden, prädiktiv für ein längeres Überleben (Ceppi, et al. 2006), (Ulker et al. 2015), (Rosell, et al. 2004) oder zumindest prädiktiv für ein besseres Ansprechen auf die Chemotherapie mit Gemcitabin +/- Carboplatin (Reynolds, et al. 2009). Auch bei einer prospektiven Phase-II-Studie bei lokal fortgeschrittenem NSCLC und einer Therapie mit Gemcitabin und Carboplatin zeigte sich die RRM1-Expression, gemessen mittels quantitativer RT-PCR, invers mit dem Ansprechen auf die Therapie korreliert. Die Expression von ERCC1 zeigte einen vergleichbaren Trend (Bepler, et al. 2006). Bei dem mit Gemcitabin +/- Platin therapierten Pankreas-Ca war ebenfalls eine niedrige RRM1-Expression mit einem besseren Ansprechen auf die Chemotherapie verknüpft (Ulker et al. 2015).

In der Regel ist also eine niedrige Expression von RRM1 und/oder ERCC1 mit einem besseren Ansprechen auf platinhaltige Chemotherapie verbunden. Allerdings gibt es auch widersprüchliche Studien. Dazu zählen zum Beispiel die Ergebnisse von Huang et al., die bei 84 Patienten mit NSCLC keinen Zusammenhang zwischen der RRM1-Expression und dem DFS (krankheitsfreien Überleben) herstellen konnten (Huang et al. 2016). Auch Tantraworasin et al., die 247 Patienten mit komplett reseziertem NSCLC untersuchten, konnten keine prognostische Aussagekraft von ERCC1 und RRM1 finden. Dies war unabhängig davon, ob die Patienten platinbasierte Chemotherapie erhalten hatten, oder nicht (Tantraworasin et al. 2013).

1.3.4 Die Anti-ERCC1-Antikörper

1.3.4.1 Anti-ERCC1-Antikörper Klon 8F1

In Bezug auf den Zusammenhang zwischen ERCC1-Expression und dem Ansprechen der Tumore auf platinbasierte Chemotherapien wurde für die Immunhistochemie zunächst der Antikörper 8F1 verwendet (Olaussen et al. 2006). Zweifel an der Spezifität des Antikörpers kamen aber auf, als Niedernhofer und Kollegen aus der Universität Pittsburgh ERCC1-positive Fibroblastenzellen und ERCC1-negative Zellen mittels Immunoblotting untersuchten. Es zeigte sich nicht

nur eine Bande für ERCC1, sondern auch eine Bande, die ein unbekanntes Protein anzeigt. Dieses war sowohl in ERCC1-positiven, als auch in ERCC1-negativen Zelllysaten zu finden (Niedernhofer, et al. 2007).

Im Jahr 2013 veröffentlichten dann Friboulet et al. eine Studie, in der sie bekanntgaben, dass sie, entgegen ihrer Veröffentlichung des Jahres 2006 (Olaussen et al. 2006), keinen signifikanten prädiktiven Effekt der ERCC1-Färbeintensität mehr feststellen konnten (Friboulet et al. 2013a). Sie hatten eine andere Charge des Antikörpers 8F1 verwenden müssen als in ihrer vorangegangenen Studie, da die frühere Charge nicht mehr erhältlich war. Nun fiel auf, dass mit dieser neuen, 2011 erhältlichen Charge des Antikörpers 8F1, bei erneutem Färben derselben Gruppe von Tumorblöcken der 2006 veröffentlichten IALT Studie, 77% der Tumorproben ERCC1-positiv erschienen. Im Jahr 2006 hatten 44% der Tumorblöcke eine positive Färbung aufgewiesen. Als Ursache wurde eine Veränderung des Antikörpers angenommen.

Dieselbe Gruppe testete auch 16 verschiedene monoklonale Antikörper und fand dabei heraus, dass keiner dieser Antikörper spezifisch für eine einzige ERCC1-Isoform war, sondern mindestens drei Isoformen detektierte. Dabei scheint nur die Isoform ERCC1-202 für die Effektivität der DNA-Reparatur verantwortlich zu sein (Friboulet et al. 2013a).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der nun erhältliche Klon des Antikörpers 8F1 auch ein nicht mit ERCC1-zusammenhängendes Protein der Zellkernmembran, das Protein PCYT1A bindet (Ma, et al. 2012; Vaezi, et al. 2014) (siehe 4.5).

1.3.4.2 Neuer Anti-ERCC1-Antikörper Klon 4F9

Schon 2012 als Alternative zum Klon 8F1 vorgeschlagen (Bauman, et al. 2013; Ma et al. 2012), erfolgte 2014 die Validierung des Klons 4F9 als Antikörper mit einer höheren Spezifität für ERCC1 (Smith, et al. 2014).

Sowohl beim Verwenden von Protein-Microarrays, als auch bei der Anfertigung von IHC von NSCLC-Tumoren, zeigte sich der Antikörper als spezifisch für

ERCC1 (Ma et al. 2012). Weiter konnte die Spezifität des Antikörpers durch Smith et al. bewiesen werden, da sich im Western Blot nur eine einzelne starke Bande, dem Molekulargewicht von ERCC1 entsprechend, in ERCC1-positiven Colo-205-Zelllysaten zeigte. In XP2YO-Zellen (nur sehr geringer ERCC1-Anteil) zeigte sich hingegen nur eine sehr schwache Bande. Bei der IHC färbten sich die Zellkerne der Colo-205 Linie stark an, wohingegen Zellen mit nur geringer ERCC1-Expression allenfalls eine leichte zytoplasmatische Färbung und nur vereinzelt eine schwache Kernfärbung aufwiesen. In der zusätzlich durchgeführten Immunfluoreszenz war in mit Oxaliplatin behandelten Zellen zu beobachten, dass der Antikörper 4F9 korrekt ERCC1 anzeigte, welches sich an Stellen mit Doppelstrang-DNA-Brüchen angesammelt hatte (Smith et al. 2014) (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Probleme mit dem ERCC1-Antikörper

Autor	Tumorentität	Anzahl	Antikörper	Aussage
(Niedernhofer et al. 2007)	Zellen [‡]	-	8F1, FL-297	Antikörper 8F1 nicht spezifisch
(Bhagwat, et al. 2009)	Zellen [∞]	-	D10, 8F1,3H11,FL297, RW018, RW017	Klon 8F1 nicht spezifisch; FL297 für IHC empfohlen
(Olaussen and Soria 2010)	Zellen ⁺	-	8F1, FL297	Klon 8F1 spezifisch, FL297 nicht empfohlen
(Ma et al. 2012)	Protein-Microarray ⁻	-	8F1, 2E12, FL297, 4F9	Kreuzreaktion von 8F1 mit PCYT1A. 4F9 und 2E12 für IHC empfohlen
(Friboulet et al. 2013a)	NSCLC	494	8F1 ^x und 15 weitere	Erste Ergebnisse mit 8F1 nicht reproduzierbar, kein AK unterscheidet zwischen den vier ERCC1-Isoformen
(Bauman et al. 2013)	HNSCC	90	8F1, 4F9, FL297	4F9 und FL297 prädiktiv für PFS, Klon 8F1 nicht prädiktiv
(Smith et al. 2014)	Kolorektaler Tumor [©]	120	4F9	Validierung des Klons 4F9 ⁰
(Vaezi et al. 2014)	NSCLC HNSCC	187 60	8F1	CCT- α ist zweites von 8F1 detektiertes Antigen
(Wislez, et al. 2014)	NSCLC	150	8F1	Klon 8F1 von 2011 nicht identisch mit Klon von 2006

[‡]ERCC1-positive normale menschliche Fibroblasten und Zellen von Patienten mit geerbten Mutationen von ERCC1 (Patient 165TOR) und XPF (Patient XP2YO), getestet mittels Immunoblotting, [∞]C5RO-, HeLa-, XP42RO-, XP51RO-, 165TOR- und XP2YO-Zellen getestet mittels Immunoblotting, Immunpräzipitation, Immunfluoreszenz und IHC, ⁺Fibroblasten (HEL299, IMR90), Lungen-Ca-Zellen (A549, H1299, H1563, H1650, H1651, H1793, H1975, H2228, H2342, BEN, HCC827), andere Epithel-Ca-Zellen (HeLa, SKBR3, MCF7, HCT116), ⁻HEK293T-Zellen transfiziert mit TrueORF cDNA-Plasmid, ^x2011 erhältlich, [©]Zellreihe Colo-205, ⁰getestet durch IHC, Immunoblotting und Immunfluoreszenz, IHC=Immunhistochemie, NSCLC=nicht-kleinzelliges Lungen-Karzinom, HNSCC=Kopf-Hals-Karzinom, CCT- α =Cholinphosphatcytidyltransferase- α

1.4 Fragestellung der Arbeit

Unterschiedliche Studien sind in Bezug auf die Vorhersagbarkeit von Platinsensitivität durch Bestimmung der ERCC1-Expression bei verschiedenen Tumorentitäten zu widersprüchlichen Ergebnissen gekommen. Auch die Studien, welche die ERCC1-Expression und das Ansprechen auf platinbasierte Chemotherapie beim Nebennierenrindenzarzinom untersuchten, kamen zum Teil zu vielversprechenden, zum Teil aber auch zu enttäuschenden Ergebnissen. Dabei waren die untersuchten Patientenkohorten sehr klein, zudem nutzten die

meisten Studien den, wie inzwischen bekannt, nicht spezifischen ERCC1-Antikörper Klon 8F1.

Das Ziel dieser Studie war also die Klärung folgender Fragen:

1. Kann die ERCC1-Färbung als Prognosemarker für die Sensitivität gegenüber platinbasierten Chemotherapien wie dem EDP-M-Regime bei der Behandlung des fortgeschrittenen Nebennierenrindenzinoms herangezogen werden?
2. In welchem Zusammenhang steht die Expression von RRM1 mit der von ERCC1? Gibt es mögliche Zusammenhänge der (Ko-) Expression mit dem Ansprechen auf platinbasierte Chemotherapie, dem progressionsfreien Überleben sowie dem Gesamtüberleben?

Zur Klärung dieser Fragen erfolgte die Untersuchung einer großen Anzahl von Tumorgewebe mit Hilfe des hochspezifischen neuen Antikörpers 4F9.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkohorte

Als Einschlusskriterien wurden ein histologisch gesichertes ACC, vorhandenes formalinfixiertes Tumormaterial, ein Alter über 18 Jahre und die Behandlung mit einer platinbasierten Chemotherapie festgelegt. Von den 179 Patienten, von denen bekannt war, dass sie zwischen 2004 und 2015 in Würzburg oder einem anderen deutschen Krankenhaus, welches an der FIRM-ACT-Studie beteiligt gewesen war (Fassnacht et al. 2012), mit einer solchen Therapie behandelt worden waren, hatten sieben Patienten nur einen Zyklus der Chemotherapie erhalten und wurden deshalb ausgeschlossen. Bei zusätzlichen 13 Patienten mangelte es an ausreichendem Tumormaterial und weitere 13 Patienten konnten aus verschiedenen Gründen (unzureichende klinische Daten (8 Patienten), fehlende Einverständniserklärung (2 Patienten) oder Platin als adjuvante Therapie (2 Patienten)) nicht eingeschlossen werden. Schließlich fanden sich bei 146 Patienten (Näheres siehe „Charakteristika der Patientenkohorte“ und Tabelle 4) alle Voraussetzungen, um das Tumormaterial bezüglich der ERCC1-Expression, dem Ansprechen auf die Chemotherapie, dem progressionsfreien- und dem Gesamtüberleben retrospektiv weiter zu untersuchen. Keiner der Patienten war zuvor schon in der vorherigen Studie unserer Arbeitsgruppe (Ronchi et al. 2009) untersucht worden, 49 Patienten waren hingegen bereits Teil der FIRM-ACT-Studie gewesen (Fassnacht et al. 2012).

Das Zusammenstellen der klinischen Daten und des Tumormaterials erfolgte mit Zustimmung des Ethikkomitees der Universität Würzburg (Nr. 93/02 und 88/11). Die Patienten hatten zuvor der Verwendung von Tumorgewebe und klinischen Daten zu wissenschaftlichen Zwecken schriftlich zugestimmt.

2.1.1 Erhebung der klinischen Daten

Die Erhebung der klinischen Daten erfolgte mit Hilfe von Arztbriefen, Pathologieberichten, Tumorboardprotokollen, Radiologieberichten und den

Dokumentationsbögen der Folgeuntersuchungen der Patienten in Würzburg oder konnten dem ENSAT-Register entnommen werden (www.ens@t.org).

Insgesamt wurden also zum einen klinische Daten wie Geschlecht, Alter bei Diagnosestellung, initialer ENSAT-Tumorstatus, Operationsdatum, Resektionsstatus sowie das Vorhandensein und die Lokalisierung von Fernmetastasen betrachtet. Zum anderen wurden auch histopathologische Daten wie der Weiss-Score und der Ki67%-Proliferationsindex dokumentiert und analysiert. Bezüglich der Therapie wurden Daten zu etwaigen Vortherapien, dem Chemotherapieprotokoll, der Anzahl applizierter Zyklen und möglicher Co-Therapie mit Mitotane erhoben.

2.1.2 Charakteristika der Patientenkohorte

In der Gruppe von insgesamt 146 Patienten mit ACC (90 Frauen, 56 Männer, medianes Alter bei Diagnosestellung 48 Jahre), die mehr als einen Zyklus platinhaltiger Chemotherapie erhalten hatten, befand sich die Mehrheit der Patienten schon zum Diagnosezeitpunkt in einem fortgeschrittenen Tumorstadium (mindestens 56,2% ENSAT-Stadium 3 oder 4, bei 17 Patienten initiales Tumorstadium nicht dokumentiert). Bei mindestens 57 Patienten konnte der Tumor im Gesunden (R0) entfernt werden (39%). Zwischen der ersten Operation und der ersten Platingabe kam es bei der Mehrheit der operierten Patienten (76 Patienten) zu einem Lokalrezidiv (52,1%).

Der Referenzpathologe der deutschen Studiengruppe Nebennieren-CA, Herr Professor W. Saeger (Praxis für Pathologie, Marienkrankenhaus, Hamburg), nahm, soweit möglich, eine erneute histologische Untersuchung des Tumormaterials vor. Alle untersuchten Tumorgewebe waren mit Hilfe des Weiss-Scores als ACC klassifiziert worden. In vielen Fällen stützte zudem eine Untersuchung von SF1 die Diagnose. Der Weiss-Score der Tumore betrug im Median 7 (Spanne 3-9) und der Ki67%-Index wurde im Median mit 20 (Spanne 1-80) beschrieben.

Bezogen auf die von Metastasen betroffenen Organe zeigte sich, dass vor allem die Lunge (34 Patienten, 23,3%) und die Leber (27 Patienten, 18,5%) zum

Zeitpunkt der Diagnosestellung betroffen waren. Im Verlauf der Erkrankung (Zeit der Beobachtung im Median 24 Monate mit einer Spanne von 3-231 Monaten) ließen sich bei vielen weiteren Patienten Fernmetastasen feststellen; lag die Anzahl der von Metastasen betroffenen Organe bei Diagnosestellung im Median bei 0,5 (1-3), so stieg diese im Verlauf auf einen Median von 3 (1-6) von Fernmetastasen betroffener Organe an.

Alle klinischen und histopathologischen Charakteristika der Patientenkohorte sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Charakteristika der Patientenkohorte

	gesamt	niedrige ERCC1-Expression	hohe ERCC1-Expression	p
	n=146	n=50 (34,25%)	n=96 (65,75%)	
Alter - Median (Spanne)	48 (19-78)	43 (22-70)	49 (19-78)	<0,05
Geschlecht- n (%)				
weiblich	90 (61,6%)	27 (54%)	63 (65,6%)	NS
männlich	56 (38,4%)	23 (46%)	33 (34,4%)	
Tumorstadium (ENSAT)- n (%)				
1-2	48 (37,2%)	14 (28,6%)	34 (42,5%)	NS
3	29 (22,5%)	13 (26,5%)	16 (20%)	
4	52 (40,3%)	22 (44,9%)	30 (37,5%)	
n.v.	17	1	16	
Resektionsstatus- n (%)				
R0	57 (53,3%)	17 (47,2%)	40 (56,3%)	NS
R1	17 (15,9%)	6 (16,7%)	11 (15,5%)	
R2	22 (20,6%)	11 (30,6%)	11 (15,5%)	
RX	11 (10,3%)	2 (5,6%)	9 (12,7%)	
n.v.x	39	14	25	
Proliferationsindex (Ki67%)	20 (1-80)	20 (1-80)	20 (2-80)	NS
Median (Spanne)				
Weiss-Score	7 (3-9)	7 (4-9)	7 (3-9)	NS
Median (Spanne)				
Metastasen bei Diagnosestellung- n (%)	48 (32,9%)	19 (38%)	29 (30,2%)	NS
von Metastasen betroffene Organe bei Diagnosestellung- n (%)				
Leber	27 (18,5%)	11 (22%)	16 (16,6%)	NS
Lunge	34 (23,3%)	16 (32%)	18 (18,7%)	
Knochen	8 (5,5%)	5 (10%)	3 (6%)	
Median (Spanne)	0,5 (1-3)	0 (0-3)	1 (0-3)	
Lokalrezidiv vor platinbasierter Chemotherapie- n (%)	76 (52,1%)	24 (48%)	42 (43,8%)	NS
Organe mit Fernmetastasen im Verlauf ⁱ - n (%)				
Leber	102 (69,9%)	35 (70%)	67 (69,8%)	NS
Lunge	114 (78,1%)	43 (86%)	71 (74%)	
Knochen	32 (21,9%)	14 (28%)	18 (18,8%)	
Lymphknoten ⁺	77 (52,7%)	18 (36%)	49 (51%)	
andere	78 (53,4%)	25 (50%)	53 (55,2%)	
Anzahl der Fernmetastasen im Verlauf ⁱ - n (Spanne)	3 (1-6)	2,5 (1-5)	3 (1-6)	NS
eine Fernmetastase	15	2	13	
≥ 1 Fernmetastase	130	48	82	
Gesamtüberleben ⁱ , Monate	24 (3-231)	24 (4,59-231)	25 (3-167)	NS
Median (Spanne)				

p-Wert mit exaktem Fisher-Test zwischen Patienten mit niedriger ERCC1-Expression und hoher ERCC1-Expression, *Material von Biopsien (n=4, Patienten inoperabel), Rezidiv- (n=6) oder Metastasen-OPs (n=9), nicht angegeben (n=20), ⁱvom Tag der ersten Operation bis zum Versterben der Patienten bzw. bis zur letzten Folgeuntersuchung, ⁺LK nur gezählt, wenn nicht schon bei Diagnose betroffen, wenn mehrerer LKs nach Diagnosestellung betroffen, als eine Metastase gezählt, NS=nicht signifikant

Die lokalen und/oder pharmakologischen Therapien, die die Patienten vor der platinhaltigen Chemotherapie erhalten hatten, sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Bei 96,6% der Patienten hatte vor Applikation der Chemotherapie zunächst eine OP des Primarius stattgefunden, lediglich fünf Patienten waren vor der Chemotherapie nicht operiert worden. Bei 32% der Patienten war mehr als eine OP vor der Chemotherapie erfolgt. Eine Bestrahlung des Tumorbetts hatte bei 11

Patienten (9,4%) stattgefunden und eine Bestrahlung von Metastasen war bei 17 Patienten (14,5%) erfolgt. Rund 22% der Patienten hatten vor der platinhaltigen Chemotherapie bereits eine Chemotherapie mit anderen Substanzen erhalten. Dabei handelte es sich bei 17,1% der Patienten um Streptozotocin, 4,8% der Patienten waren mit einer Kombination aus Streptozotocin und anderen Chemotherapeutika oder mit gänzlich anderen Substanzen (z.B. Vincristin oder Capecitabin/Gemcitabin) behandelt worden (Sperone, et al. 2010). Somit erhielten 114 Patienten Platin als Erstlinientherapie (78%), für 29 Patienten (19,9%) war Platin die Zweitlinientherapie und für 3 Patienten (2,1%) handelte es sich bei Platin um die Drittlinientherapie (Tabelle 6).

Tabelle 5: Therapien vor platinhaltiger Chemotherapie

	gesamt	niedrige ERCC1-Expression	hohe ERCC1-Expression	p
	n=146	n=50 (34,25%)	n=96 (65,75%)	
OP des Primarius- n (%)				
Ja	141 (96,6%)	47 (94%)	94 (97,9%)	NS
Nein	5 (3,4%)	3 (6%)	2 (2,1%)	
weitere OP– n (%)	47 (32%)	20 (40%)	27 (28,1%)	NS
Bestrahlung- n (%)				
Tumorbett	11 (9,4%)	5 (13,5%)	6 (7,5%)	NS
Metastasen	17 (14,5%)	4 (10,8%)	13 (16,3%)	
keine	89 (76,1%)	28 (75,7%)	61 (76,3%)	
n.v.	29	13	16	
Chemotherapie– n (%)	32 (21,9%)	14 (28%)	18 (18,8%)	NS
Streptozotocin	26 (17,8%)	12 (24%)	14 (14,6%)	
und/oder andere ⁱ	7 (4,8%)	2 (4%)	5 (5,2%)	

p-Wert mit exaktem Fisher-Test zwischen Patienten mit niedriger ERCC1-Expression und hoher ERCC1-Expression, ⁱ1x Carboplatin+Taxol+Etoposid, 1x Vincristin und unbekanntes Protokoll, 3x Capecitabin+Gemcitabin, 1x Carboplatin und Vepezid, 1x Streptozotocin und Capecitabin+Gemcitabin, NS=nicht signifikant

Die platinbasierte Chemotherapie erfolgte bei 89,1% der Patienten im Rahmen eines klassischen oder leicht modifizierten EDP-Regimes. Dabei erhielten 89,7% der Patienten Cisplatin und 10,3% der Patienten Carboplatin. In der Gruppe der Patienten mit hoher ERCC1-Expression erhielten mehr Patienten Carboplatin als in der Gruppe mit niedriger ERCC1-Expression (13,5% im Vergleich zu 4%, p=0,08). Die meisten Patienten nahmen zusätzlich Mitotane ein (89,7%).

Im Median wurden 6 Zyklen platinbasierter Chemotherapie appliziert, mit einem Minimum von 2 Zyklen und einem Maximum von 15 Zyklen (Tabelle 6). Die Behandlung wurde abgebrochen, wenn nicht akzeptable Nebenwirkungen auftraten, der Patient eine weitere Behandlung mit dieser Chemotherapie ablehnte oder es zu einem Progress der Erkrankung kam.

Tabelle 6: Platintherapie

	gesamt	niedrige ERCC1-Expression	hohe ERCC1-Expression	p
	n=146	n=50 (34,25%)	n=96 (65,75%)	
Platin- n (%)				
Cisplatin	131 (89,7%)	48 (96%)	83 (86,5%)	0,08
Carboplatin	15 (10,3%)	2 (4%)	13 (13,5%)	
Reihenfolge Chemotherapie- n (%)				
Platin als Erstlinientherapie	114 (78%)	36 (72%)	78 (81,3%)	NS
Platin als Zweitlinientherapie	29 (19,9%)	13 (26%)	16 (16,7%)	
Platin als Drittlinientherapie	3 (2,1%)	1 (2%)	2 (2,1%)	
Kombination- n (%)				
EDP	130 (89,1%)	45 (90%)	85 (88,5%)	NS
andere	16 (11%)	5 (10%)	11 (11,5%)	
Mitotane- n (%)				
Ja	131 (89,7%)	44 (88%)	87 (90,6%)	NS
Nein	15 (10,3%)	6 (12%)	9 (9,4%)	
Anzahl der Zyklen - Median (Spanne)	6 (2-15)	6 (3-13)	6 (2-15)	NS

p-Wert mit exaktem Fisher-Test zwischen Patienten mit niedriger ERCC1-Expression und hoher ERCC1-Expression, NS=nicht signifikant

2.2 Evaluation der Wirksamkeit der platinbasierten Chemotherapie

Während der Chemotherapie wurden die Patienten alle 8 bis 12 Wochen einer standardisierten klinischen, biochemischen und radiologischen Untersuchung durch abdominelle und thorakale CT-Untersuchungen mit Kontrastmittel unterzogen. Die Effektivität der Chemotherapie wurde anschließend anhand des besten objektiven Ansprechens auf die Therapie sowie durch die Länge des progressionsfreien Überlebens bewertet.

Entsprechend den sogenannten RECIST-Kriterien verschwinden bei einer kompletten Remission (CR) alle Zielläsionen durch die Therapie, bei einer

partiellen Remission (PR) ist die Summe aller längsten Durchmesser der Zielläsionen um mindestens 30% gesunken. Eine stabile Erkrankung (SD) liegt vor, wenn weder die Kriterien für eine PR noch für einen Progress zutreffen. Bei einem Progress steigt die Summe der längsten Durchmesser der Läsionen um mehr als 20%, oder es bilden sich neue Läsionen (Therasse, et al. 2006) (Eisenhauer, et al. 2009). Zur Bewertung des Ansprechens auf die Chemotherapie und zur Planung des weiteren Vorgehens wurden die Krankheitsverläufe der Patienten einem multidisziplinären Team inkl. erfahrenen Radiologen in der regelmäßigen Tumorkonferenz unseres Zentrums vorgestellt.

Da die Toxizität der platinbasierten Chemotherapie nicht das Thema der vorliegenden Arbeit ist, wurden dazu keine genauen Aufzeichnungen und Auswertungen vorgenommen. Generell lassen sich die aufgetretenen Nebenwirkungen aber mit den in der FIRM-ACT-Studie beschriebenen vergleichen (Fassnacht et al. 2012).

2.3 Tumormaterial

Es wurden formalinfixierte, in Paraffin eingebettete (FFPE) Tumorgewebe verwendet. Von 66 Patienten befand sich bereits FFPE-Tumormaterial im Haus, 80 weitere Tumorblöcke sowie fehlende klinische Daten zu den Fällen wurden von den lokalen deutschen Pathologien angefordert und zur Verfügung gestellt.

Von den untersuchten Tumorblöcken stammten 87% (127) der Blöcke von der ersten Operation der Patienten. Lediglich 6 Tumorblöcke beinhalteten Material einer Rezidiv-Operation, 4 Proben entstammten einer Biopsie des Tumors und 9 der 146 Tumorblöcke enthielten Material aus einer Metastasen-Operation (Tabelle 7).

Tabelle 7: Tumormaterial

	gesamt	niedrige ERCC1-Expression	hohe ERCC1-Expression	p
	n=146	n=50 (34,25%)	n=96 (65,75%)	
Art der Materialgewinnung- n (%)				NS
erste OP	127 (87%)	42 (84%)	85 (88,5%)	
Rezidiv-OP	6 (4,1%)	2 (4%)	4 (4,2%)	
Biopsie	4 (2,7%)	2 (4%)	1 (1%)	
Metastasen-OP	9 (6,2%)	4 (8%)	6 (6,3%)	

p-Wert mit exaktem Fisher-Test zwischen Patienten mit niedriger ERCC1-Expression und hoher ERCC1-Expression, NS=nicht signifikant

Die FFPE Tumorgewebe wurden unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gelagert. Später wurden 2µm dünne Schnitte erstellt und auf Objektträgern fixiert, um sie anschließend mittels Immunhistochemie zu färben.

2.4 Immunhistochemie

2.4.1 Chemikalien

Die für die Immunhistochemie verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 8 gelistet.

Tabelle 8: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Firma (Ort)
Xylol	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ethanol	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Destilliertes Wasser, Ampuwa 1000ml Plastipur	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., Deutschland
Citronensäuremonohydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxidplätzchen	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natronlauge 1 mol/l	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Humanes Ab Serum H4522	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Anti-Maus AK	Dako North America Inc., Carpinteria, USA
Antikörper 4F9 UM500008 mouse Ab 1mg/dl	OriGene Technologies, Inc, Rockville, USA
Antikörper 8F1 MA5-13912	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HRP-link	Dako North America Inc., Carpinteria, USA
HRP Enzym	Dako North America Inc., Carpinteria, USA
Liquid DAB + substrate chromogen system	Dako North America Inc., Carpinteria, USA
Hämalaunlösung sauer nach Meyer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Enthelan	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

2.4.2 Puffer und Lösungen

Die für die Immunhistochemie verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 9 gelistet.

Tabelle 9: Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Firma (Ort)
Citronensäurepuffer	840mg Citronensäuremonohydrat + 400ml destilliertes Wasser, mit Natriumhydroxidplättchen und Natronlauge auf pH-Wert von 6,5 eingestellt (Chemikalien siehe Tabelle 8)
PBS	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

2.4.3 Durchführung der Immunhistochemie

Die Objektträger mit den 2µm dicken Schnitten wurden zweimal zwölf Minuten in 100%igem Xylol entparaffiniert und anschließend fünf Minuten in je 100%igem, 90%igem, 80%igem und schließlich in 70%igem Ethanol-Wassergemisch rehydriert. Verbleibendes Ethanol wurde durch fünfmaliges Waschen mit destilliertem Wasser entfernt.

Zur Vorbehandlung der Schnitte wurden in einem Schnellkochtopf 250ml Wasser zum Kochen gebracht. Ein Citronensäurepuffer, frisch angesetzt aus 840mg Citronensäuremonohydrat und 400ml destilliertem Wasser, der mit Natriumhydroxidplättchen und Zugabe von Natronlauge auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt worden war, wurde in einem Wasserkocher ebenfalls auf 100°C erhitzt. Die Schnitte wurden nun in einer Metallschale, die auf einem Metallgestell im Schnellkochtopf stand, bei geschlossenem Deckel dreizehn Minuten lang gekocht. Nachdem sie 20 Minuten außerhalb des Kochtopfs abgekühlt waren, wurden sie erneut fünfmal mit destilliertem Wasser gespült.

Die Hemmung der endogenen Peroxidase erfolgte, indem die Schnitte zunächst mit einem Fettstift umkreist wurden und anschließend pro Schnitt 200µl einer Lösung aus Wasserstoffperoxid und Methanol aufpipetiert wurden. Pro Schnitt wurden dafür 20µl Wasserstoffperoxid und 180µl Methanol verwendet. Nach

zehnminütiger Inkubationszeit erfolgte erneut ein fünfmaliges Spülen mit destilliertem Wasser.

Im nächsten Schritt wurde der Proteinblock durchgeführt. Humanes AB Serum wurde 1:5 mit PBS verdünnt. Der zehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur folgte ein Entfernen des Proteinblocks durch fünfmaliges Spülen der Schnitte mit destilliertem Wasser.

Als Negativkontrolle des Antikörpers wurde der Dako Anti-Maus-Antikörper verwendet. Von diesem wurden 150µl auf einen als Negativkontrolle gekennzeichneten Schnitt aufgebracht. Auf die restlichen Schnitte wurden je 150µl des 1:100 in PBS verdünnten monoklonalen **Anti-ERCC1-Antikörpers 4F9** (UM500008, OriGene Technologies, Inc, Rockville, USA) bzw. des **Anti-ERCC1-Antikörpers 8F1** (MA5-13912, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gegeben, danach wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Objektträger mit den Schnitten fünfmal in PBS gewaschen, bevor sie für 20 Minuten mit dem HRP-link des HRP-Systems von Dako bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach dreimaligem je fünf Minuten langem Waschen in PBS wurde nun das HRP Enzym von Dako aufpipettiert, dieses Mal im Dunkeln. Auch das dreimalige, je fünf Minuten lange Waschen der Schnitte erfolgte im Dunkeln.

Für die folgende zehnminütige Inkubation mit DAB wurden pro Schnitt 200µl Substrat und 4µl DAB verwendet. Danach wurde die Mischung vorsichtig in einen Spezialabfall abgekippt und die Schnitte dreimal mit Leitungswasser gespült.

Zur Kernfärbung wurden die Schnitte zwei Minuten lang in ein Hämalaunbad gestellt und anschließend fünf Minuten lang in einer Wanne, in die fließendes Leitungswasser lief, gebläut. Nach einem kurzen Abspülen der Schnitte mit 100%igem Ethanol wurden die Schnitte im Trockenofen bei 56°C für 20 Minuten getrocknet, bevor die Proben mit Enthelan eingedeckelt und beschriftet wurden.

Als Positivkontrollen dienten Schnitte von Kolon-Adeno-Karzinomen, Hepatozellulärem-Karzinom, Nierenzell-Karzinom, Mamma-Karzinom und Tonsille.

Als Negativkontrolle fungierten Fibroblasten aus dem Bindegewebe, das den Tumor umgab.

2.5 Mikroskopische Analyse

Die mikroskopische Analyse der Schnitte erfolgte anonymisiert mit dem Scope A1 Mikroskop von Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland. Fotografien der Schnitte wurden mit der Axiocam 503 color, ebenfalls von Carl Zeiss, aufgenommen. Die Schnitte wurden dabei von mindestens zwei unabhängigen Operatoren (Sonja Steinhauer und Valeria Laufs), die keine Kenntnis des klinischen Verlaufs der Patienten hatten, analysiert. Die Bewertung der Intensität der Kernfärbung erfolgte auf einer Skala von 0 bis 3, wobei eine hohe Zahl eine hohe Färbeintensität bedeutete. Ein Beispiel für die verschiedenen Intensitäten ist in Abbildung 6 gezeigt. Aus dem prozentualen Anteil der positiv gefärbten Kerne wurde ein Score berechnet (0 für 0% positive Zellkerne, 0,1 für 1-9% positive Kerne, 0,5 für 10-49% und 1,0 für $\geq 50\%$). Dieser Score wurde dann mit den jeweiligen Färbeintensitäten verrechnet, um einen definitiven **semiquantitativen H-Score** zu erhalten ($\text{H-Score} = \text{Intensität der Färbung} \times \text{Prozent positiver Kerne}$) (Olaussen et al. 2006; Ronchi et al. 2009).

Bei in Einzelfällen vorkommenden Abweichungen der Bewertung durch die zwei Operatoren wurden die Schnitte noch einmal gemeinsam mikroskopiert und eine Einigung gesucht. Wo diese nicht möglich war, wurde ein dritter Untersucher hinzugezogen. Die Übereinstimmung in der Bewertung war sehr groß mit einem Korrelationskoeffizient von 0,72 (95%CI=0,63-0,79).

Die dokumentierenden Photographien der Schnitte wurden mit einer 20-fachen Vergrößerung aufgenommen.

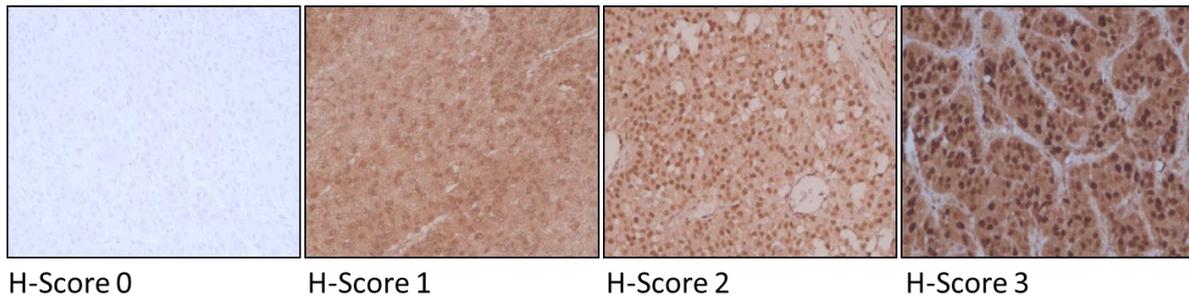


Abbildung 6: Immunhistochemische ERCC1-Färbungen der Kerne in den Intensitäten 0,1,2 und 3

Beispiele für die ERCC1-Expression mittels IHC bei in Formalin fixiertem, in Paraffin gebettetem Nebennierenrindencarcinom. H-Score 0=Fehlen von ERCC1, H-Score 1=geringe Expression, H-Score 2=mittelstarke Expression, H-Score 3=starke Expression von ERCC1. Verwendet wurde der Antikörper 4F9 von OriGene Technologies, Inc, Rockville, USA. 20-fache Vergrößerung.

2.6 Statistische Analyse

Die statistischen Berechnungen kontinuierlicher Variablen erfolgten mittels ungepaartem t-Test oder einem nicht-parametrischen Test wie dem Mann-Whitney-U-Test. Dichotomische Variablen wurden mittels Chi-Quadrat-Test oder exaktem Fisher-Test verglichen. Die Darstellung der Überlebenskurven erfolgte als Kaplan-Meier-Kurven und die Unterschiede im Rahmen der Überlebenskurven wurden mittels Log-Rank-Test (Mantel-Cox-Test) untersucht. Ein nicht-parametrischer Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom Dunn's Test, wurde zum Vergleich verschiedener Gruppen in Bezug auf nicht-normal verteilte Variablen genutzt. Korrelationen und 95%-Konfidenzintervalle zwischen unterschiedlichen Parametern wurden mittels linearer Regressionsanalyse bestimmt. Zur Kalkulation des Risikoquotienten (Hazard Ratio (HR)) wurden zwei ACC-Patientengruppen mit niedriger oder hoher ERCC1-Expression betrachtet (hohe ERCC1-Expression definiert als H-Score ≥ 1). Außerdem wurde eine multivariate Regressionsanalyse mittels Cox-proportionalen Hazard-Modells durchgeführt, um unabhängige Faktoren zu bestimmen, die das Überleben beeinflussen könnten.

Als Gesamtüberleben wurde die Zeit von der ersten Operation oder vom Tag der Administration des ersten Zyklus platinhaltiger Chemotherapie bis zur letzten Folgeuntersuchung oder bis zum Versterben des Patienten definiert, je nachdem, wie angegeben. Das progressionsfreie Überleben beschreibt die Zeit vom Tag der Administration des ersten Zyklus platinhaltiger Chemotherapie bis zum ersten

radiologischen Nachweis einer Krankheitsprogression oder dem Versterben des Patienten. Zeigte sich keine Krankheitsprogression, galt als Endpunkt der Tag, der genau einen Monat nach Applikation des letzten Chemotherapiezyklus lag.

Die Berechnung der multivariaten Statistik erfolgte dann nach Cox-Regression. Werte unter 0,05 ($p < 0,05$) wurden als signifikant gewertet. Dargestellt werden die errechneten Daten als Kaplan-Meier-Kurven, als Säulendiagramme oder tabellarisch. Die statistische Auswertung und die Darstellung der statistischen Analysen wurde mit den Programmen Excel (Microsoft, USA), GraphPad Prism (Version 6.0, La Jolla, CA, USA) und SPSS (PASW Version 21.0, SPSS Inc. Chicago, IL, USA) durchgeführt.

2.7 Zusätzliche Analyse der Koexpression von RRM1 und ERCC1

Um mögliche Zusammenhänge zwischen der ERCC1- Expression und der RRM1- Expression mit dem Ansprechen auf platinbasierte Chemotherapie zu analysieren, wurden die Ergebnisse einer schon zuvor durchgeführten Studie der Arbeitsgruppe integriert (Henning et al. 2017). Henning et al. hatten unter anderem an Tumormaterial von Patienten mit Nebennierenrindenzinom, die mit Gemcitabin behandelt worden waren, die Expression von RRM1 analysiert. Da 47 dieser Patienten auch mehr als einen Zyklus platinhaltiger Chemotherapie erhalten hatten, konnten diese Analysen mit den Ergebnissen der neuen Studie verbunden werden. Auch Henning et al. hatten eine immunhistochemische Färbung durchgeführt wie hier in Kapitel 2.4.3 beschrieben. Dabei nutzten sie den polyklonalen Anti-RRM1-Antikörper Cat# ab81085 von AbCam in einer Verdünnung von 1:100. Anschließend berechneten auch Henning et al. einen semiquantitativen H-Score, um die Färbintensität, in diesem Fall des Zytoplasmas, zu beschreiben (Ronchi et al. 2009). Alle Schnitte waren von zwei unabhängigen Operatoren (J.E.K.H und C.L.R.), die gegenüber den klinischen Verläufen verblindet waren, bewertet worden.

3 Ergebnisse

Das Patientenkollektiv wurde, abhängig von der ERCC1-Expression, in zwei Gruppen eingeteilt. Patienten, deren Tumor eine niedrige ERCC1-Expression zeigte, also einen H-Score von ≤ 1 aufwies, bildeten die eine Gruppe und Patienten, deren Tumor eine hohe ERCC1-Expression aufwies, d.h. mit einem H-Score von 2 oder 3 beschrieben wurde, die andere Gruppe (siehe Tabelle 4) .

Die zwei Gruppen unterschieden sich signifikant hinsichtlich des Alters der Patienten zum Diagnosezeitpunkt, mit einem medianen Alter von 43 Jahren (22-70) in der Gruppe mit niedriger ERCC1-Färbeintensität und einem medianen Alter von 49 Jahren (19-78) in der Gruppe mit hoher ERCC1-Färbeintensität ($p < 0,05$) (Tabelle 4). Hinsichtlich der Geschlechterverteilung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Bei etwa der Hälfte der Patienten konnte in beiden Gruppen der Tumor R0 reseziert werden (bei 47,2% der Patienten, bei denen sich eine niedrige ERCC1-Expression zeigte und bei 56,3% der Patienten mit hoher ERCC1-Expression).

3.1 Expression von ERCC1 in den Tumorgeweben

Bei der ERCC1-Färbung der Kerne zeigten die ACC-Schnitte eine hohe Homogenität, mit einem Median von 80% positiver Zellen (mehr als 50% positive Zellen bei 135 von 146 Tumorschnitten, d.h. bei 92,5%).

Von den insgesamt 146 gefärbten Tumoren zeigten 50 Fälle eine niedrige ERCC1-Färbeintensität (34,2%), d.h. einen H-Score von 0 oder 1, mit 10 Tumoren mit der Intensität 0 bzw. < 1 (6,8%) und 40 Tumoren mit der Intensität 1 (27,4%) (Tabelle 10). Die übrigen 96 Tumore fielen in die Kategorie einer hohen ERCC1-Expression (65,7%), mit H-Scores von 2 oder 3 (58 Tumore mit H-Score 2, 38 Tumore mit H-Score 3).

Tabelle 10: Expression von ERCC1 in den Tumorgeweben

H-Score	n (%)
<1	10 (6,8%)
1	40 (27,4%)
2	58 (39,7%)
3	38 (26,0%)

Ein H-Score von ≤ 1 bezeichnet eine sehr geringe bis gar keine Expression von ERCC1, ein H-Score von 2 zeigt eine mittelstarke ERCC1-Expression an, ein H-Score von 3 verdeutlicht eine starke ERCC1-Expression. Die meisten Gewebeproben (96 Tumore) zeigten eine hohe Expression von ERCC1 (H-Score von ≥ 2).

3.2 Korrelation von ERCC1-Expression, Klinik und Prognose

3.2.1 ERCC1-Färbeintensität und klinische Daten

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der ERCC1-Expression in Tumormaterial des Primärtumors (n=127) oder Tumormaterial von Rezidiven (n=6), Metastasen (n=9) oder in durch Biopsie gewonnenem Tumormaterial (n=4) (Tabelle 7). Die Mehrheit der Patienten befand sich bei Diagnosestellung in einem fortgeschrittenen ENSAT-Tumorstadium (56,2% ENSAT-Stadium 3 oder 4). Dabei ließ sich kein Zusammenhang feststellen zwischen dem ENSAT-Stadium und der ERCC1-Expression (71,4% der Patienten mit niedriger ERCC1-Expression vs. 58,8% der Patienten mit hoher ERCC1-Expression mit ENSAT-Stadium 3 oder 4 bei Diagnosestellung). Auch hinsichtlich des Proliferationsindex Ki67% oder des Weiss-Scores zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Tumormaterialien mit niedriger oder hoher ERCC1-Expression.

Bei Betrachtung des Gesamtüberlebens, also der Zeit vom Tag der ersten Operation bis zum Versterben der Patienten bzw. bis zur letzten Folgeuntersuchung, zeigte sich auch hier kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der unterschiedlichen ERCC1-Expressionen.

3.2.2 Wirksamkeit platinbasierter Chemotherapie

Die wesentlichen Daten über das Ansprechen der Tumore auf die platinhaltige Chemotherapie sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Hinsichtlich des besten Ansprechens während der platinbasierten Chemotherapie zeigte sich bei 42 Patienten eine partielle Remission (28,8%) und eine einzige Patientin (0,7%) erreichte eine komplette Remission nach 6 Zyklen. Eine Stabilisierung der Tumorerkrankung wurde bei 49 Patienten beobachtet (33,6%), bei 8 Patienten (5,5%) zeigte sich ein gemischtes Ansprechen der Tumorabsiedlungen. Bei den restlichen 46 Patienten war die Erkrankung bereits bei der ersten Bildgebung progressiv (31,5%). Insgesamt konnte bei 84 Patienten (57,5%) ein klinischer Nutzen der Chemotherapie, also eine komplette oder partielle Remission, eine Stabilisierung der Erkrankung oder ein gemischtes Ansprechen der Tumorabsiedlungen für jeweils mindestens vier Monate, beobachtet werden.

Betrachtet man das progressionsfreie Überleben, das heißt, die Zeit von der Applikation des ersten Zyklus der Chemotherapie bis zu einem Progress des ACCs, liegt dieses im Median bei 6 Monaten (Spanne 1-18 Monate). Das Gesamtüberleben, also die Zeit zwischen dem Tag der ersten Administration einer platinhaltigen Chemotherapie und dem Versterben der Patienten bzw. der letzten Folgeuntersuchung, lag im Median bei 17 Monaten (1,5-127 Monate). Sowohl das progressionsfreie, als auch das Gesamtüberleben nach Erhalt einer Platintherapie war bei den Patienten, die Platin als Zweit- oder Drittlinientherapie erhielten, jeweils signifikant kürzer, als bei den Patienten, für die Platin die Erstlinientherapie darstellte (PFS im Median 4,5 vs. 6 Monate ($p=0,057$, $HR=1,50$, $95\%CI=1,03-2,86$) und OS im Median 13,5 vs. 19 Monate ($p=0,013$, $HR=1,67$, $95\%CI=1,15-3,10$)). Die Effektivität der platinbasierten Chemotherapie wurde nicht durch das Auftreten eines Lokalrezidivs ($n=76$) beeinflusst, auch gab es keine Unterschiede bei den Ansprechraten zwischen Patientengruppen mit nur einer Fernmetastase ($n=15$) oder Patientengruppen mit mehreren Fernmetastasen ($n=130$).

Bei genauer Analyse der Fernmetastasen in unterschiedlichen Organen zeigte sich, dass Patienten mit Lebermetastasen ($n=102$) interessanter Weise ein schlechteres Ansprechen auf die platinbasierte Chemotherapie zeigten als die anderen Patienten (medianes PFS 5 vs. 10,5 Monate, $p=0,004$, $HR=1,91$, $95\%CI=1,29-3,05$; medianes OS 15,5 vs. 25 Monate, $p=0,048$, $HR=1,50$,

95%CI=1,01-2,16). Ein solcher Unterschied konnte zwischen Patienten mit Lungen-, Knochen- oder Lymphknotenmetastasen im Vergleich zu Patienten, deren Organe nicht von solchen Metastasen betroffen waren, indes nicht beobachtet werden. Diese Beobachtung sollte in zukünftigen Studien weiter Beachtung finden und tiefer analysiert werden.

Tabelle 11: Ansprechen auf platinbasierte Chemotherapie

	gesamt	niedrige ERCC1-Expression	hohe ERCC1-Expression	p
	n=146	n=50 (34,25%)	n=96 (65,75%)	
Art des Ansprechens-n (%)				NS
komplette Remission	1 (0,7%)	0 (0%)	1 (1%)	
partiell es Ansprechen	42 (28,8%)	13 (26%)	29 (30,5%)	
Stabilisierung	49 (33,6%)	17 (34%)	32 (33,7%)	
Progress	46 (31,5%)	17 (34%)	29 (30,2%)	
Gemischte Ansprechen	8 (5,5%)	3 (6%)	5 (5,3%)	
klinischer Nutzen*- n (%)				NS
Ja	84 (57,5%)	26 (52%)	58(60,4%)	
Nein	62 (42,5%)	24 (48%)	38(39,6%)	
progressionsfreies Überleben nach Chemotherapie ⁱ , Monate Median (Spanne)	6 (1-18)	6 (1-15)	6,5 (1,5-18)	NS
Gesamtüberleben ⁺ , Monate Median (Spanne)	17 (1,5-127)	16,5 (3,5-114)	17 (1,5-127)	NS

p-Wert mit exaktem Fisher-Test zwischen Patienten mit niedriger ERCC1-Expression und hoher ERCC1-Expression, *komplette oder partielle Remission, Stabilisierung oder gemischtes Ansprechen für jeweils mindestens 4 Monate, ⁱvom Tag der Administration des ersten Chemotherapiezyklus bis zum Progress der Erkrankung, ⁺vom Tag der Administration des ersten Chemotherapiezyklus bis zum Versterben des Patienten oder bis zur letzten Folgeuntersuchung, NS=nicht signifikant

3.2.3 ERCC1 Färbeintensität und Ansprechen auf platinbasierte Chemotherapie

Bei dem objektiven Ansprechen auf die Therapie zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe mit hoher ERCC1-Expression (H-Score 2-3, n=50) und den Patienten mit niedriger Expression von ERCC1 (H-Score 0-1, n=96) (p=NS, siehe dazu Tabelle 11 und Abbildung 7).

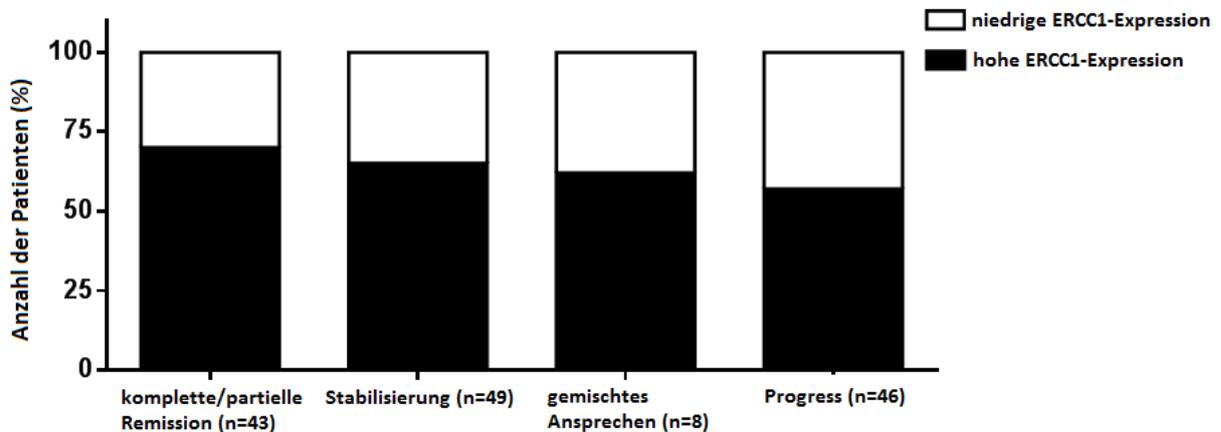


Abbildung 7: ERCC1-Expression und Ansprechen auf platinbasierte Chemotherapie

p-Wert mit Chi Quadrat-Test zwischen Patienten mit niedriger ERCC1-Expression und hoher ERCC1-Expression. Eine komplette Remission (CR) beschreibt dabei, dass alle Zielläsionen durch die Therapie verschwunden sind, eine partielle Remission (PR) beschreibt, dass die Summe aller längsten Durchmesser der Zielläsionen um mindestens 30% gesunken ist. Eine Stabilisierung (SD) liegt vor, wenn weder die Kriterien für eine PR noch für einen Progress zutreffen. Bei einem Progress steigt die Summe der längsten Durchmesser der Läsionen um mehr als 20%, oder es bilden sich neue Läsionen (Therasse et al. 2006). Die Patienten wurden unterteilt nach niedriger (H-Score von ≤ 1) und hoher ERCC1-Expression (H-Score ≥ 2) im Tumormaterial.

Auch das mediane PFS nach Applikation des ersten Zyklus platinhaltiger Chemotherapie war in den zwei Gruppen vergleichbar und lag bei 6 Monaten in der Gruppe der Patienten mit niedriger ERCC1-Expression und bei 6,5 Monaten in der Patientengruppe, die eine hohe Expression von ERCC1 zeigte (p=0,33, HR=1,23, 95% CI=0,82-2,0) (Abbildung 8).

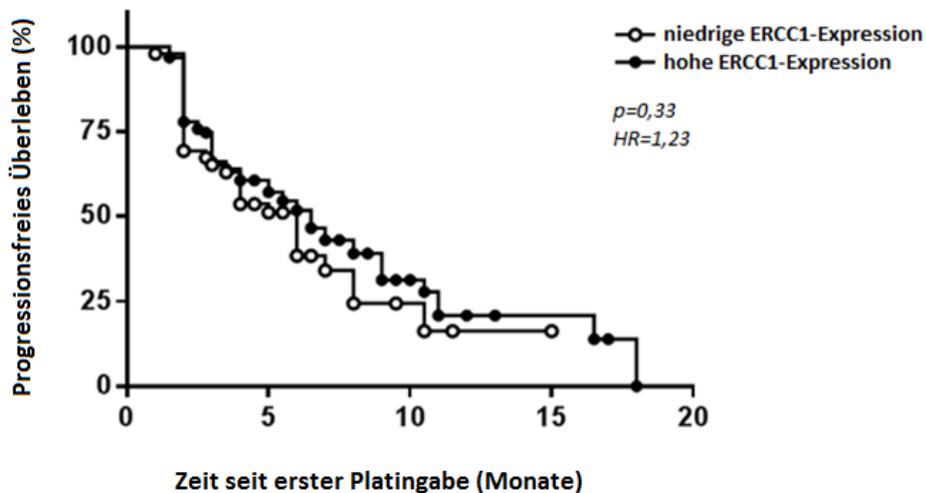


Abbildung 8: ERCC1-Expression und progressionsfreies Überleben nach Administration platinhaltiger Chemotherapie

Darstellung mittels Kaplan-Meier-Kurven, statistische Berechnung erfolgte mit Log-Rank-Test. Das progressionsfreie Überleben wurde bestimmt als die Zeit zwischen der Administration des ersten Zyklus platinhaltiger Chemotherapie und dem Feststellen eines Krankheitsprogresses. Die Patienten wurden unterteilt nach niedriger (H-Score von ≤ 1) und hoher ERCC1-Expression (H-Score ≥ 2) im Tumormaterial.

Ebenso verhält es sich bezüglich des Gesamtüberlebens, also der Zeit zwischen dem Tag der Administration des ersten Chemotherapiezyklus bis zum Versterben des Patienten, bzw. bis zur letzten Folgeuntersuchung: Die mediane Überlebenszeit lag bei 16,5 Monaten in der Gruppe der Patienten mit niedriger ERCC1-Expression (3,5-114 Monate) sowie bei 17 Monaten (1,5-127 Monate) in der Patientengruppe, die eine hohe Expression von ERCC1 zeigte ($p=0,87$, $HR=1,03$, $95\%CI=0,70-1,53$).

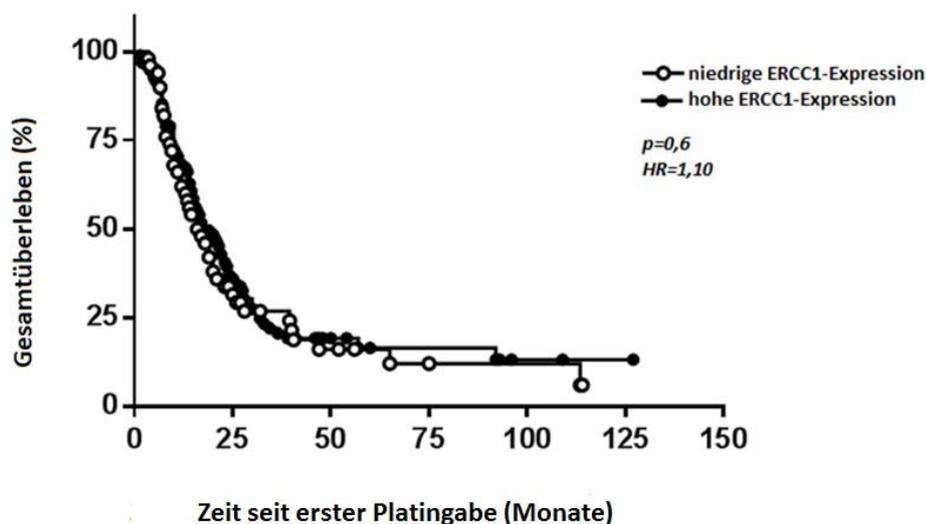


Abbildung 9: ERCC1-Expression und Gesamtüberleben

Darstellung mittels Kaplan-Meier-Kurven, statistische Berechnung erfolgte mit Log-Rank-Test. Das Gesamtüberleben wurde bestimmt als die Zeit zwischen der Administration des ersten Zyklus platinhaltiger Chemotherapie und dem Versterben des Patienten bzw. bis zur letzten Folgeuntersuchung. Die Patienten wurden unterteilt nach niedriger (H-Score ≤ 1) und hoher ERCC1-Expression (H-Score ≥ 2).

3.3 Zusammenhang von RRM1-Expression mit ERCC1-Expression, Ansprechen auf Platintherapie, progressionsfreiem Überleben und OS

Um mögliche Zusammenhänge zwischen der ERCC1- Expression und der RRM1- Expression mit dem Ansprechen auf platinbasierte Chemotherapie zu analysieren, wurden die Ergebnisse einer schon zuvor durchgeführten Studie der Arbeitsgruppe (Henning et al. 2017) integriert (siehe 2.7). Die RRM1-Färbeintensitäten der 47 mittels Immunhistochemie untersuchten Tumormaterialien sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Expression von RRM1 in 47 Nebennierenrindencarzinomen

H-Score RRM1	n (%)
<1	1 (2%)
1	10 (21,3%)
2	32 (68,1%)
3	4 (8,5%)

Ein H-Score von ≤ 1 bezeichnet eine sehr geringe bis gar keine Expression von RRM1, ein H-Score von 2 zeigt eine mittelstarke RRM1-Expression an, ein H-Score von 3 verdeutlicht eine starke RRM1-Expression.

Die Patienten wurden, je nach RRM1-Expression, in zwei Gruppen eingeteilt. Die eine Gruppe wurde gebildet aus Patienten, deren Tumormaterial eine niedrige RRM1-Expression (H-Score ≤ 1) aufwies, die andere Gruppe wurde aus den Patienten gebildet, deren Tumormaterial eine hohe RRM1-Expression (H-Score von ≥ 2) zeigte. Die Mehrheit der Tumorgewebe, nämlich 36 der 47 Gewebeproben, zeigte dabei eine hohe RRM1-Expression (76,6%).

Die Charakteristika der Patientengruppe, bei denen die RRM1-Expression im Tumormaterial untersucht wurde, sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Das mediane Alter der Patienten betrug 45 Jahre mit einer Spanne von 22 bis 75 Jahren. Auch in dieser Subgruppe waren mehr Frauen von einem ACC betroffen als Männer (26 W vs. 21 M). Dabei bestanden weder das mediane Alter, noch die Geschlechterverteilung betreffend signifikante Unterschiede zwischen den Patientengruppen mit niedriger oder hoher RRM1-Expression. Auch in dieser Subgruppe befand sich die Mehrheit der Patienten (57,4%) bei Diagnosestellung in einem fortgeschrittenen Tumorstadium (ENSAT-Stadium 3 oder 4).

Tabelle 13: Charakteristika der 47 hinsichtlich RRM1-Expression analysierten Patienten

	gesamt	niedrige RRM1-Expression	hohe RRM1-Expression	p
	n=47	n=11 (23,4%)	n=36 (76,6%)	
Alter- Median (Spanne)	45 (22-75)	45 (29-67)	45 (22-75)	NS
Geschlecht- n (%)				NS
weiblich	26 (55,3%)	5 (45,5%)	21 (58,3%)	
männlich	21 (44,7%)	6 (54,5%)	15 (41,7%)	
Tumorstadium (ENSAT)- n (%)				NS
1-2	17 (38,6%)	4 (44,4%)	13 (37,1%)	
3	10 (22,7%)	1 (11,1%)	9 (25%)	
4	17 (38,6%)	4 (44,4%)	13 (37,1%)	
n.v.	3	2	1	

p-Wert mit exaktem Fisher-Test zwischen Patienten mit niedriger RRM1-Expression und hoher RRM1-Expression, NS= nicht signifikant

Die Daten über das Ansprechen auf die platinhaltige Chemotherapie bei den Patienten mit niedriger RRM1-Expression und denen mit hoher RRM1-Expression sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Keiner der in dieser Gruppe untersuchten Patienten erreichte eine komplette Remission durch die platinhaltige Chemotherapie. Ein partielles Ansprechen wurde jedoch bei 21,3% der Patienten beobachtet, eine Stabilisierung der Erkrankung fand bei 36,2% der Patienten statt und ein gemischtes Ansprechen der Tumorabsiedelungen zeigte sich bei 8,5% der Patienten. Dabei hielt bei 23 Patienten (48,9%) der positive Effekt der Chemotherapie mindestens vier Monate an, sodass man von einem klinischen Nutzen sprechen kann. Bei 16 Patienten (34%) lag bei der ersten Bildgebung ein Krankheitsprogress vor.

Tabelle 14: Ansprechen auf platinbasierte Chemotherapie bei 47 hinsichtlich RRM1-Expression analysierten Patienten

	gesamt	niedrige RRM1-Expression	hohe RRM1-Expression	p
	n=47	n=11(23,4%)	n=36 (76,6%)	
Art des Ansprechens- n (%)				
komplette Remission	-	-	-	NS
partiell es Ansprechen	10 (21,3%)	4 (36,4%)	6 (16,7%)	
Stabilisierung	17 (36,2%)	3 (27,3%)	14 (38,9%)	
Progress	16 (34%)	4 (36,4%)	12 (33,3%)	
X ‡	4 (8,5%)	-	4 (11,1%)	
klinischer Nutzen* n (%)				
Ja	23 (48,9%)	6 (54,5%)	17 (47,2%)	NS
Nein	24 (51,1%)	5 (45,5%)	19 (52,8%)	
progressionsfreies Überleben nach Chemotherapie ⁱ , Monate Median (Spanne)	2 (1-18)	2 (2-17)	3 (1-18)	NS
Gesamtüberleben ⁺ , Monate Median (Spanne)	20 (1,5-113)	20 (6-60)	19 (1,5-113,5)	NS

p-Wert mit exaktem Fisher-Test zwischen Patienten mit niedriger RRM1-Expression und hoher RRM1-Expression, ‡gemischtes Ansprechen, *Ansprechen, gemischtes Ansprechen oder Stabilisierung für jeweils mindestens 4 Monate, ⁱvom Tag der Administration des ersten Chemotherapiezyklus bis zum Progress der Erkrankung, ⁺vom Tag der Administration des ersten Chemotherapiezyklus bis zum Versterben des Patienten oder bis zur letzten Folgeuntersuchung, NS=nicht signifikant

Das progressionsfreie Überleben, also die Zeit zwischen dem Tag der ersten Gabe platinhaltiger Chemotherapie und dem Feststellen eines Krankheitsprogresses, betrug im Median zwei Monate (1-18 Monate). Das Gesamtüberleben, also die Zeit zwischen der ersten Gabe platinhaltiger Chemotherapie und dem Versterben des Patienten bzw. bis zur letzten Folgeuntersuchung, betrug im Median 20 Monate, mit einer Spanne von 1,5 Monaten bis 113 Monaten (Tabelle 14). Korreliert man die RRM1-Expression mit der Wirksamkeit der platinhaltigen Chemotherapie, lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten, deren Tumor eine niedrige RRM1-Expression aufwies und solchen mit einer hohen RRM1-Expression feststellen. So zeigten sich weder signifikante Unterschiede in Bezug auf das progressionsfreie Überleben seit Erhalt des ersten Zyklus platinhaltiger Chemotherapie (Abbildung

11), noch in Bezug auf das Gesamtüberleben seit dem ersten Tag der platinhaltigen Chemotherapie (Abbildung 10).

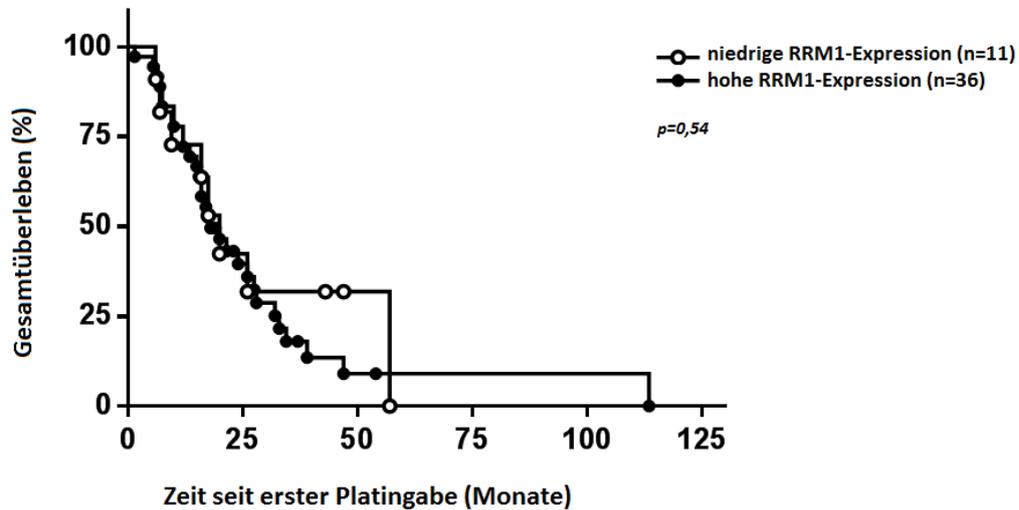


Abbildung 10: RRM1-Expression und Gesamtüberleben nach Erhalt einer platinhaltigen Chemotherapie bei 47 Patienten

Darstellung mittels Kaplan-Meier-Kurven, statistische Berechnung erfolgte mit Log-Rank-Test. Das Gesamtüberleben wurde bestimmt als die Zeit zwischen der Administration des ersten Zyklus platinhaltiger Chemotherapie und dem Versterben des Patienten bzw. bis zur letzten Folgeuntersuchung. Die Patienten wurden unterteilt nach niedriger (H-Score ≤ 1) und hoher RRM1-Expression (H-Score ≥ 2).

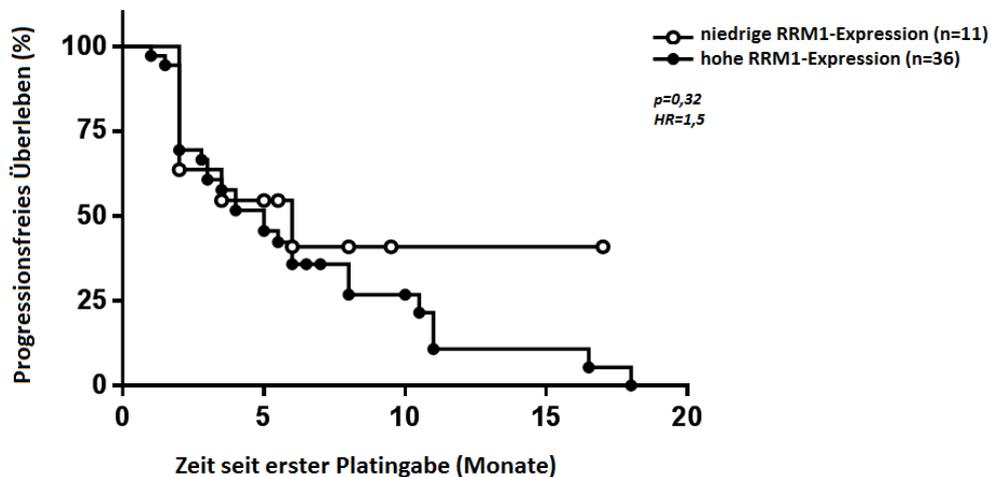


Abbildung 11: RRM1-Expression und progressionsfreies Überleben nach Erhalt einer platinhaltigen Chemotherapie bei 47 Patienten

Darstellung mittels Kaplan-Meier-Kurven, statistische Berechnung erfolgte mit Log-Rank-Test. Das progressionsfreie Überleben wurde bestimmt als die Zeit zwischen der Administration des ersten Zyklus platinhaltiger Chemotherapie und dem Feststellen eines Krankheitsprogresses. Die Patienten wurden unterteilt nach niedriger RRM1-Expression (H-Score ≤ 1) und hoher RRM1-Expression (H-Score ≥ 2).

Bei der gleichzeitigen Analyse der Tumoren hinsichtlich der Expression von RRM1 und ERCC1 (Abbildung 12) schien es, als ob eine niedrige Expressierung von RRM1 mit einer hohen Expressierung von ERCC1 einhergeht und umgekehrt, diese Korrelation ist jedoch nicht signifikant ($p=0,07$).

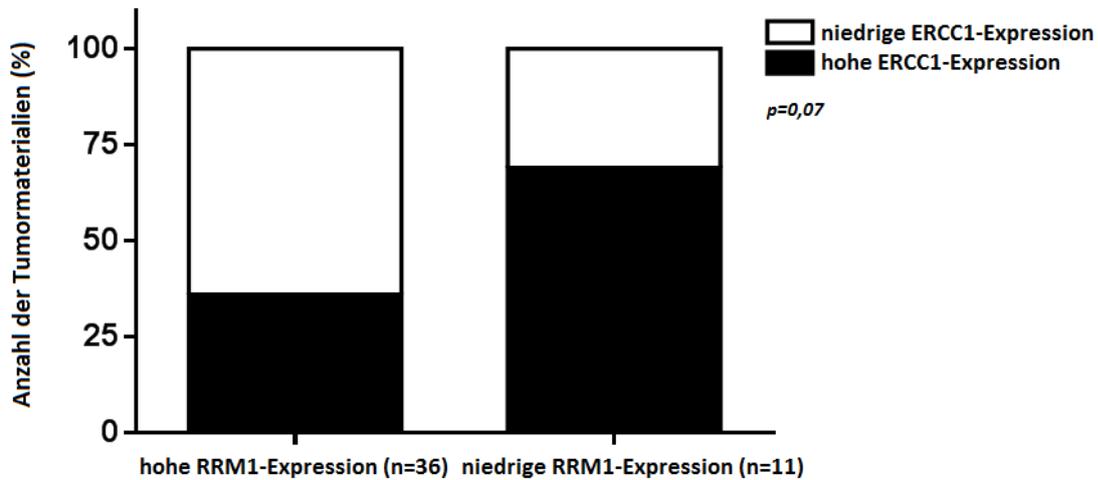


Abbildung 12: Expression von RRM1 verglichen mit der Expression von ERCC1 in 47 Tumoren

Statistische Berechnung erfolgte mit exaktem Fisher-Test. Die Patienten wurden unterteilt nach niedriger (H-Score ≤ 1) und hoher ERCC1-Expression (H-Score ≥ 2) bzw. nach niedriger RRM1-Expression (H-Score ≤ 1) und hoher RRM1-Expression (H-Score ≥ 2).

Zudem wurde die Koexpression von RRM1 und ERCC1 in verschiedenen Konstellationen, also niedrige RRM1-Expression/niedrige ERCC1-Expression, niedrige RRM1-Expression/hohe ERCC1-Expression sowie hohe RRM1-Expression/hohe ERCC1-Expression und hohe RRM1-Expression/niedrige ERCC1-Expression hinsichtlich der Auswirkung auf das Gesamtüberleben und auf das progressionsfreien Überleben nach Erhalt des ersten Zyklus platinhaltiger Chemotherapie analysiert.

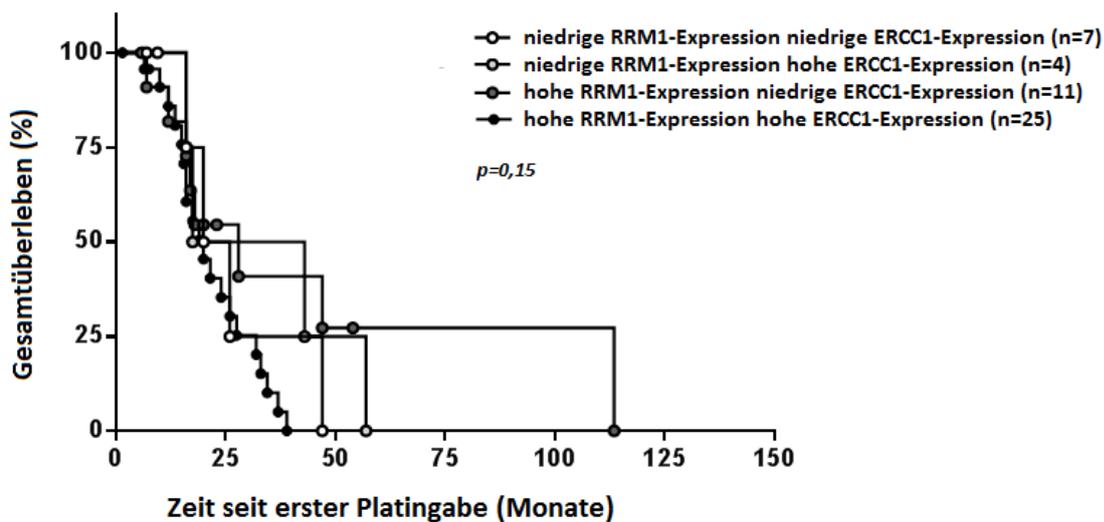


Abbildung 13: Zusammenhang von RRM1-Expression und ERCC1-Expression in Bezug auf das Gesamtüberleben nach Platintherapie

Darstellung mittels Kaplan-Meier-Kurven, statistische Berechnung erfolgte mit Log-Rank-Test. Das Gesamtüberleben wurde bestimmt als die Zeit zwischen der Administration des ersten Zyklus platinhaltiger Chemotherapie und dem Versterben des Patienten bzw. bis zur letzten Folgeuntersuchung. Die Patienten wurden unterteilt nach niedriger (H-Score ≤ 1) und hoher RRM1-Expression (H-Score ≥ 2) bzw. nach niedriger ERCC1-Expression (H-Score ≤ 1) und hoher ERCC1-Expression (H-Score ≥ 2).

Dabei wurde deutlich, dass es keine Kombination der Expression von RRM1 und ERCC1 gab, die für einen signifikanten Vorteil beim Gesamtüberleben nach der Chemotherapie prognostisch war.

Der Eindruck, dass eine gleichzeitig hohe Expression von RRM1 und ERCC1 zu einem kürzeren Gesamtüberleben führt, war bei der kleinen Fallzahl von 47 Patienten nicht signifikant.

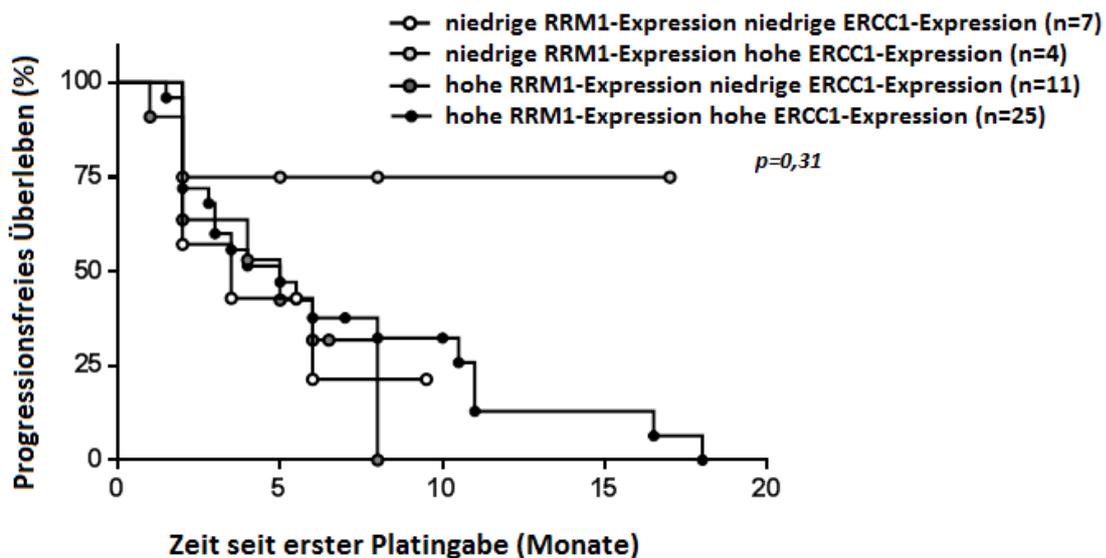


Abbildung 14: Zusammenhang zwischen RRM1-Expression und ERCC1-Expression in Bezug auf das progressionsfreie Überleben nach Platintherapie

Darstellung mittels Kaplan-Meier-Kurven, statistische Berechnung erfolgte mit Log-Rank-Test. Das progressionsfreie Überleben wurde bestimmt als die Zeit zwischen der Administration des ersten Zyklus platinhaltiger Chemotherapie und dem Feststellen eines Krankheitsprogresses. Die Patienten wurden unterteilt nach niedriger (H-Score ≤ 1) und hoher RRM1-Expression (H-Score ≥ 2) bzw. nach niedriger ERCC1-Expression (H-Score ≤ 1) und hoher ERCC1-Expression (H-Score ≥ 2).

Auch bei der Betrachtung der RRM1-Expression und der ERCC1-Expression in Relation zueinander und hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens nach Erhalt des ersten Zyklus platinhaltiger Chemotherapie, ließen sich keine (Sub-) Gruppen mit längerem progressionsfreiem Überleben definieren.

3.4 Vergleich der beiden Anti-ERCC1-Antikörper 8F1 und 4F9

Bei den immunhistochemischen Färbungen von 45 ACCs hinsichtlich der ERCC1-Expression zeigte sich in der 2009 durch Ronchi et al. veröffentlichten Studie ein signifikant längeres Überleben nach platinhaltiger Chemotherapie bei Patienten mit niedriger Expression von ERCC1 (medianes Überleben von acht Monaten bei Patienten mit hoher ERCC1-Expression des Tumorgewebes im Vergleich zu 24 Monaten bei Patienten mit niedriger ERCC1-Expression im Tumorgewebe, HR 2,95, 95%CI=1,4-6,2, $p=0,004$) (Ronchi et al. 2009) (Abbildung 5).

Die damaligen Untersuchungen wurden mit dem Anti-ERCC1-Antikörper 8F1 durchgeführt (Neomarkers, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA). Da sich dieser Antikörper zum einen als nicht spezifisch für ERCC1 herausstellte (Bhagwat et al.

2009; Niedernhofer et al. 2007) (siehe auch S.24) und zum anderen deutlich wurde, dass sich die nun erhältliche Version des Antikörpers 8F1 vom damals verwendeten Antikörper 8F1 zu unterscheiden scheint (Friboulet et al. 2013a), führten wir eine Reihe weiterer Untersuchungen durch. Zunächst aktualisierten wir die klinischen Daten wie progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben der damaligen Patientenkohorte auf den Stand des Jahres 2016 (Abbildung 15). Hierbei zeigte sich, dass bei den damals untersuchten Patienten auch im weiteren Verlauf bis zum Jahr 2016 ein signifikant längeres Gesamtüberleben nach platinhaltiger Chemotherapie in der Gruppe der Patienten mit niedriger Expression von ERCC1 im Tumorgewebe zu verzeichnen war (HR=2,48, p=0,02).

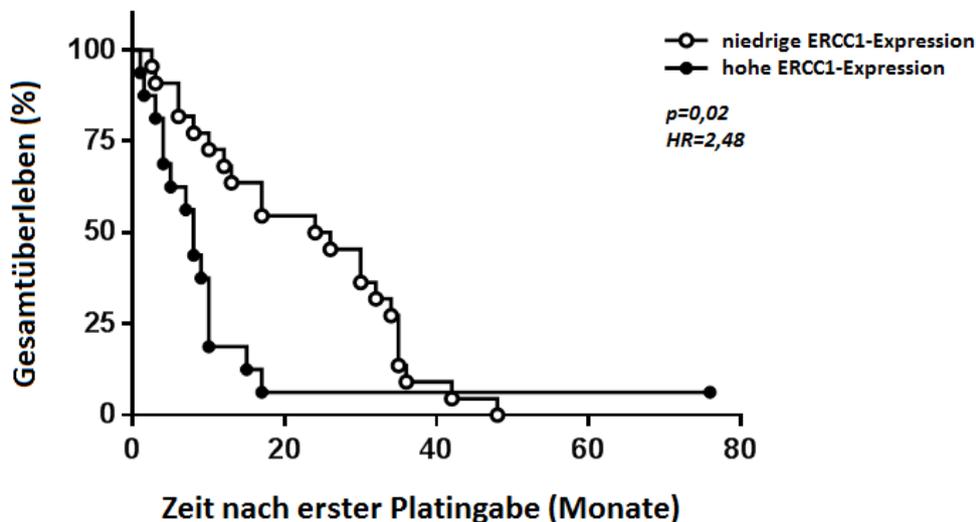


Abbildung 15: Gesamtüberleben nach platinhaltiger Chemotherapie, Anti-ERCC1-AK 8F1

Darstellung mittels Kaplan-Meier-Kurven, statistische Berechnung erfolgte mit Log-Rank-Test. Das Gesamtüberleben wurde bestimmt als die Zeit zwischen der Administration des ersten Zyklus platinhaltiger Chemotherapie und dem Versterben des Patienten bzw. bis zur letzten Folgeuntersuchung. Die Patienten wurden unterteilt nach niedriger (H-Score ≤ 1) und hoher ERCC1-Expression (H-Score ≥ 2). Untersucht wurden die 45 von Ronchi et al. 2009 gefärbten Tumormaterialien in Kombination mit auf das Jahr 2016 aktualisierten klinischen Daten.

Von den 45 damals untersuchten ACCs war es zudem möglich, asserviertes Tumormaterial von 38 Patienten erneut zu färben, diesmal mit dem hochspezifischen neuen monoklonalen Anti-ERCC1-Antikörper 4F9. Wie in Abbildung 16 zu erkennen ist, war nun kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben zwischen Patienten mit schwacher ERCC1-Expression des

Tumormaterials und solchen mit starker ERCC1-Expression mehr erkennbar ($p=0,95$, $HR=1,02$, $95\%CI=0,53-1,95$).

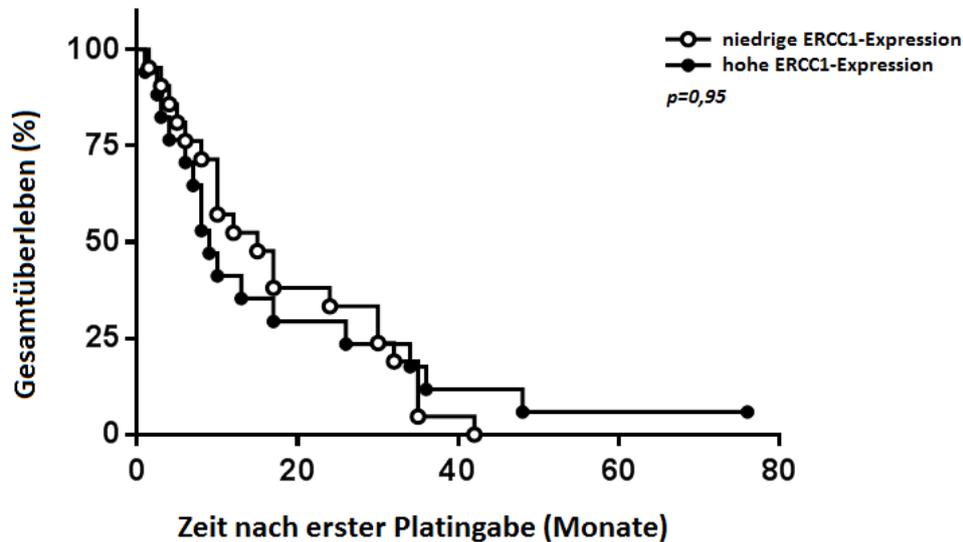


Abbildung 16: Gesamtüberleben nach Chemotherapie, Färbung mit Klon 4F9

Darstellung mittels Kaplan-Meier-Kurven, statistische Berechnung erfolgte mit Log-Rank-Test. Mittels IHC und dem neuen Anti-ERCC1-Antikörper 4F9 wurden 38 der 45 damals von Ronchi et al. mit dem Anti-ERCC1-Antikörper 8F1 untersuchten Tumorproben neu gefärbt. Das Gesamtüberleben wurde bestimmt als die Zeit zwischen der Administration des ersten Zyklus platinhaltiger Chemotherapie und dem Versterben des Patienten bzw. bis zur letzten Folgeuntersuchung. Die Patienten wurden unterteilt nach niedriger (H-Score ≤ 1) und hoher ERCC1-Expression (H-Score ≥ 2).

Als zusätzliche Untersuchung verglichen wir die Färbeintensitäten verschiedener Anti-ERCC1-Antikörper. Dazu verglichen wir die neuen Färbeintensitäten der 38 mit dem 4F9-AK erneut gefärbten Schnitte mit der Färbeintensität des **damals** vorhandenen Antikörpers Klon 8F1. Dabei wurde eine Übereinstimmung von nur 49% deutlich.

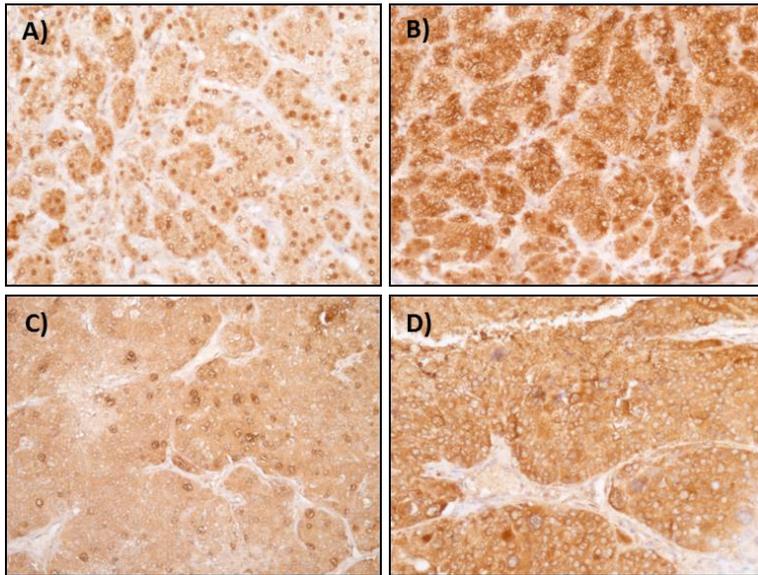


Abbildung 17: Direkter Vergleich der beiden Anti-ERCC1-AK 4F9 (A und C) und 8F1 (aktuell erhältlich Version, B und D)

A) und B) normale Nebenniere, C) und D) Nebennierenrindenkarzinom. Vergrößerung 1x20.

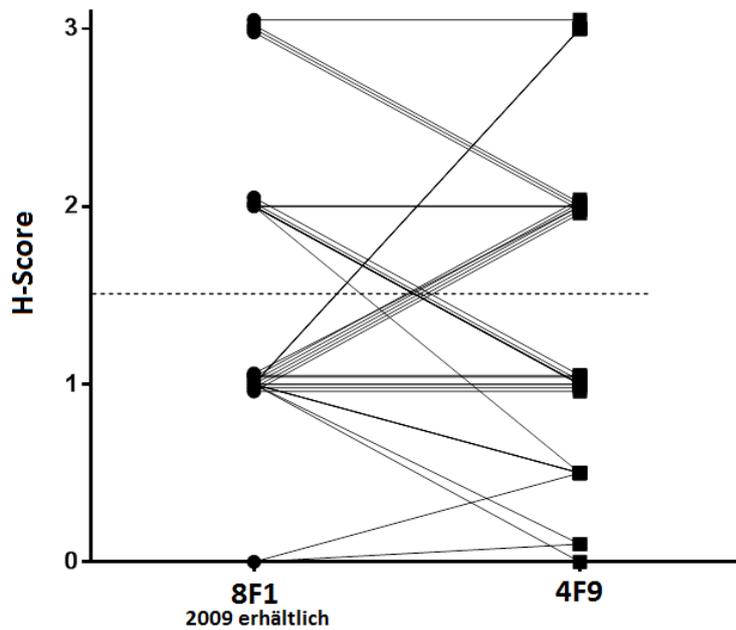


Abbildung 18: Vergleich der Färbeintensität des alten Klons 8F1 und des Klons 4F9 an 38 Tumoren der alten Studie

Färbeintensitäten von 38 der damals 45 gefärbten ACCs mit dem neuen hochspezifischen monoklonalen Antikörper 4F9 vs. den Färbeintensitäten des **vorherigen** Antikörpers Klon 8F1. Übereinstimmung von 49%.

Als weitere Untersuchung verglichen wir die Färbeintensität des neuen hochspezifischen monoklonalen Antikörper 4F9 und die Färbeintensität des **aktuell** erhältlichen Anti-ERCC1-Antikörpers Klon 8F1.

Hierzu wurde eine immunhistochemische Färbung des Tumormaterials von 21 Patienten der neuen Studie vorgenommen. Zusätzlich zur Färbung mit dem Klon 4F9 führten wir die IHC auch mit der aktuell erhältlichen Version des Anti-ERCC1-Antikörpers Klon 8F1 durch. Wie in Abbildung 19 zu sehen ist, stimmten die beiden Antikörper in ihrer Färbeintensität in 81% der Tumorschnitte überein.

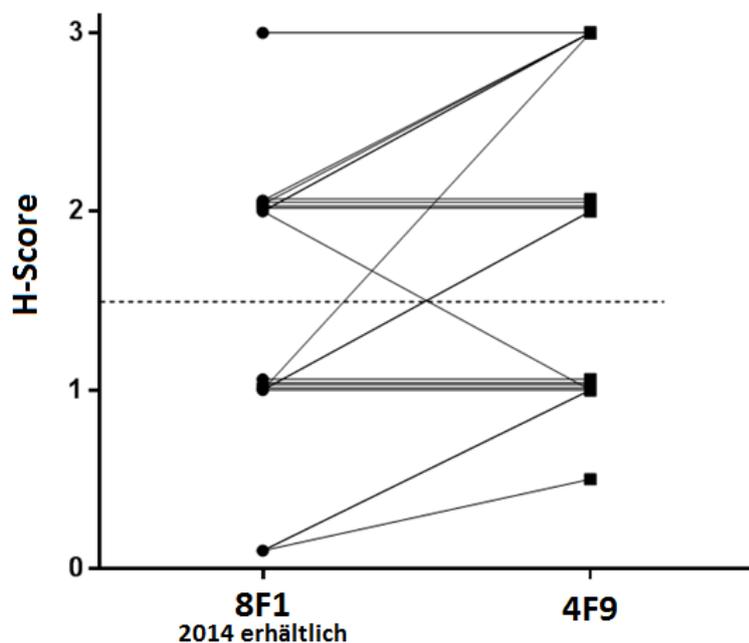


Abbildung 19: Vergleich der Färbeintensitäten des neuen Klons 8F1 (2014 erhältlich) und des Klons 4F9 an 21 Tumoren der neuen Studienkohorte

Färbeintensitäten des Tumormaterials von 21 Patienten der neuen Studienkohorte, gegenübergestellt in Bezug auf die Färbeintensität des neuen hochspezifischen monoklonalen Antikörpers 4F9 und den Färbeintensitäten des aktuell erhältlichen Antikörpers Klon 8F1. Übereinstimmung von 81%.

Der aktuell (bzw. 2014) erhältliche Klon des Anti-ERCC1-Antikörpers 8F1 scheint dem hoch spezifischen Anti-ERCC1-Antikörper 4F9 also ähnlicher zu sein als der 2009 verwendete Anti-ERCC1-Antikörper 8F1 (Übereinstimmung von 81% vs. 49%). Dabei spielt sicher das zusätzliche Detektieren von CCT α durch den alten Antikörper 8F1 eine Rolle.

4 Diskussion

4.1 Platinbasierte Chemotherapie ist wirksam bei der Behandlung des Nebennierenrindenzarzinoms

Bei der Behandlung des fortgeschrittenen Nebennierenrindenzarzinoms ist Platin aktuell die wirkungsvollste zytotoxische Therapie. Seit der FIRM-ACT-Studie (Fassnacht et al. 2012) findet es meist im EDP-M-Regime Anwendung. In der von uns untersuchten Kohorte lagen die Ansprechraten höher als in vergleichbaren Studien, zudem zeigte sich ein etwas längeres medianes progressionsfreies Überleben sowie ein längeres Gesamtüberleben.

Die platinhaltige Chemotherapie führte in der von uns untersuchten Patientengruppe zu Ansprechraten von 68,6%. Insbesondere wurde eine komplette Remission bei einem Patienten (0,7%), ein partielles Ansprechen bei 28,8% der Patienten, eine Stabilisierung der Tumorerkrankung bei 33,6% der Patienten und ein gemischtes Ansprechen bei 5,5% der Patienten beobachtet. Das Ansprechen des Tumors hielt bei 57,5% der behandelten Patienten für mindestens vier Monate an. Der Vergleich mit den Ergebnissen anderer Studien wird in diesem Punkt dadurch erschwert, dass der Begriff „Ansprechen“ unterschiedlich definiert wird. Doch selbst, wenn man den Begriff so fasst, dass „Ansprechen“ nur eine partielle oder komplette Remission über mindestens drei Monate bedeutet und eine Stabilisierung nicht eingeschlossen ist, zeigen in der untersuchten Patientengruppe 43 Patienten (29,5%) ein Ansprechen des Tumors. Diese Ansprechraten sind etwas höher als bei den Patienten der FIRM-ACT-Studie, bei der nur 23,2% der 304 Patienten ein objektives Ansprechen des Tumors auf die platinbasierte Chemotherapie zeigten, und sind vergleichbar mit den Ergebnissen in der Studienkohorte von Malandrino et al.. Diese Studie untersuchte ebenfalls 33 Patienten mit Nebennierenrindenzarzinom die platinhaltige Chemotherapie erhielten und zeigte bei 27,3% der Patienten ein objektives Ansprechen des Tumors (3 Patienten mit CR, 12 Patienten mit PR).

Eine Stabilisierung der Erkrankung wurde dort bei zehn Patienten (18,2%) beobachtet (Malandrino et al. 2010).

Hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens unter Therapie zeigte sich in unserer Analyse ein medianes progressionsfreies Überleben von 6 Monaten (Spanne: 1-18 Monate). Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen der FIRM-ACT-Studie, hier betrug das mediane progressionsfreie Überleben bei Patienten, die nach dem EDP-M-Schema behandelt wurden, 5 Monate.

Das Gesamtüberleben betrug in der vorliegenden Arbeit im Median 17 Monate (Spanne: 1,5-127 Monate), in der FIRM-ACT-Studie 14,8 Monate. Obwohl sich diese Werte nicht genau miteinander vergleichen lassen, da bei der FIRM-ACT-Studie das Gesamtüberleben vom Tag der Randomisierung in die verschiedenen Therapiearme an bestimmt wurde, in der vorliegenden Arbeit allerdings vom ersten Tag der platinhaltigen Chemotherapie an gezählt wurde, scheint das Gesamtüberleben in der von uns untersuchten Patientenkohorte länger zu sein. Gleiche Endpunkte, aber ebenfalls ein kürzeres Gesamtüberleben, zeigte auch die Studie von Malandrino et al., mit einem medianen Gesamtüberleben von 12 Monaten nach Beginn der platinbasierten Chemotherapie (Malandrino et al. 2010).

Auffallend war, dass Patienten, die Lebermetastasen aufwiesen (n=102), schlechter auf die platinbasierte Chemotherapie ansprachen als andere Patienten. Möglicherweise unterscheiden sich die Tumorzellen, die sich in der Leber ansiedeln, von den Zellen, die sich in anderen Organen absiedeln, durch z.B. eine andere Ausstattung an Transportern oder Reparaturproteinen. Eine genaue Evaluation dieser molekularbiologischen Unterschiede könnte neue Ansatzpunkte für die Entwicklung prädiktiver Marker bieten.

4.2 ACCs zeigen eine hohe Expression von ERCC1

Wie auch in anderen Studien zuvor beschrieben, zeigten die ACCs eine hohe Expression von ERCC1 (Ronchi et al. 2009), (Malandrino et al. 2010). Vergleicht man die Studien von Ronchi et al., Malandrino et al. und unsere Ergebnisse, so zeigen sich bei der immunhistochemischen Färbung von ERCC1 in den Nebennierenkarzinomen viele Gemeinsamkeiten. Als hohe ERCC1-Expression

wurde in allen Studien ein semiquantitativer H-Score von >1 festgelegt. Etwa die Hälfte der Gewebeproben zeigte eine hohe ERCC1-Expression (47% bei Ronchi et al, 53% bei Malandrino et al., 65,8% in der vorliegenden Studie).

4.3 Die ERCC1-Färbeintensität korreliert nicht mit dem Ansprechen auf platinbasierte Chemotherapie

In der von uns untersuchten Patientenkohorte korrelierte die ERCC1-Färbeintensität weder mit dem Ansprechen auf die platinbasierte Chemotherapie, noch mit dem progressionsfreien Überleben oder dem Gesamtüberleben.

Nachdem bei verschiedenen Tumorentitäten teilweise vielversprechende Ergebnisse in Bezug auf die Expression von ERCC1 und die Korrelation mit dem Ansprechen auf platinbasierte Chemotherapie erzielt werden konnten, waren Ronchi et al. und Malandrino et al. hinsichtlich der Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf das Nebennierenrindenzellkarzinom zu widersprüchlichen Ergebnissen gekommen.

Bei der Untersuchung des Tumormaterials von 45 Patienten, die wegen eines fortgeschrittenen ACCs eine platinhaltige Chemotherapie erhielten, zeigte sich damals in der Studie von Ronchi et al. eine höhere Ansprechrate bei Patienten, deren Tumore eine niedrige ERCC1-Expression aufwiesen (29% vs. 14%). Darüber hinaus stellte sich eine signifikante Korrelation der ERCC1-Expression mit dem Gesamtüberleben dar (medianes Gesamtüberleben bei Patienten mit hoher ERCC1-Expression 8 Monate versus 24 Monate bei Patienten mit niedriger ERCC1-Expression, $p=0,004$) (Ronchi et al. 2009).

Demgegenüber standen die von Malandrino et al. durchgeführten Untersuchungen an Tumormaterialien von 33 ACC-Patienten, die nach der Operation eine Chemotherapie nach dem EDP-M-Regime erhalten hatten. Auch Malandrino et al. fanden eine höhere Ansprechrate auf die Therapie bei Patienten, deren Tumore eine niedrige Expression von ERCC1 zeigten (26,7% vs. 16,7%). Allerdings zeigte sich in dieser Kohorte kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit hoher

oder niedriger ERCC1-Expression im Gesamtüberleben nach Platintherapie (Malandrino et al. 2010).

Beide erwähnten Studien verwendeten den inzwischen als unspezifisch erkannten Anti-ERCC1-Antikörper Klon 8F1 und untersuchten eine kleine Patientenkohorte. In der vorliegenden Studie untersuchten wir deshalb das Tumormaterial einer sehr großen Gruppe von 146 Tumorpatienten und verwendeten den neuen, spezifischen Anti-ERCC1-Antikörper Klon 4F9 (siehe Abschnitt 4.5). In dieser aussagekräftigen Studie fanden wir weder einen signifikanten Unterschied im Ansprechen auf die Therapie in Bezug auf die ERCC1-Expression, noch fanden sich signifikante Unterschiede im progressionsfreien Überleben (medianes PFS bei 6 Monaten in der Gruppe der Patienten mit niedriger ERCC1-Expression und bei 6,5 Monaten bei der Patientengruppe, die eine hohe Expression von ERCC1 zeigte ($p=0,33$)). Auch bezüglich des Gesamtüberlebens zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (medianes Gesamtüberleben bei 16,5 Monaten in der Gruppe der Patienten mit niedriger ERCC1-Expression (3,5-114 Monate) sowie bei 17 Monaten (1,5-127 Monate) in der Patientengruppe, die eine hohe Expression von ERCC1 zeigte ($p=0,87$)).

Dass die ERCC1-Expression nicht mit dem Ansprechen auf platinhaltige Chemotherapie korreliert, zeigt auch eine erste Phase-III-Studie, die randomisiert und prospektiv den Einfluss von ERCC1 auf das Therapieansprechen bei Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC untersuchen sollte (Lee, et al. 2017). Zunächst wurde mittels IHC (Anti-ERCC1-AK 8F1) die ERCC1-Expression des Tumors bestimmt. Anschließend wurden die Patienten randomisiert verschiedenen Therapiearmen mit oder ohne Platinderivate zugeteilt. Nachdem 648 Patienten rekrutiert worden waren, wurde die Studie vorzeitig abgebrochen, da sich zeigte, dass die Patienten, welche eine Therapie ohne Platin erhielten, ein signifikant kürzeres Überleben zeigten, als die Patienten, die mit platinhaltiger Chemotherapie behandelt wurden. Dabei zeigte sich keinerlei signifikante Korrelation zwischen der ERCC1- bzw. der XPF-Expression und dem Ansprechen auf die jeweilige Therapie. Ebenso erlaubte die ERCC1- bzw. XPF-Expression

keine prognostische Aussage bezüglich des Gesamtüberlebens oder des progressionsfreien Überlebens.

4.4 Die RRM1-Expression eignet sich nicht als prognostischer Marker hinsichtlich des Ansprechens auf platinbasierte Chemotherapie

Zusätzlich zur Analyse der ERCC1-Expression analysierten wir die RRM1-Expression und die Koexpression von ERCC1 und RRM1 als prognostische Marker für das Ansprechen auf platinbasierte Chemotherapie. Dazu integrierten wir die Ergebnisse einer zuvor durchgeführten Studie der Arbeitsgruppe. Es kristallisierte sich heraus, dass auch RRM1 nicht als prognostischer Marker für das Ansprechen auf platinbasierte Chemotherapie geeignet ist.

Bei der Analyse von 47 Tumorproben zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge in der Koexpression der beiden Marker. Es entstand lediglich der Eindruck, dass bei schwacher RRM1-Expression ERCC1 eher hoch exprimiert wird und umgekehrt ($p=0,07$, nicht signifikant).

Darüber hinaus ließen sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität auf platinbasierte Chemotherapie zwischen Patienten, deren Tumor eine niedrige RRM1-Expression auswies und solchen, deren Tumor eine hohe RRM1-Expression zeigte, feststellen. Es zeigten sich weder signifikante Unterschiede in Bezug auf das progressionsfreie Überleben, noch in Bezug auf das Gesamtüberleben seit dem ersten Tag der platinhaltigen Chemotherapie.

Zwischen verschiedenen Koexpressionsmustern (z.B. hohe RRM1-Expression/hohe ERCC1-Expression vs. niedrige RRM1-Expression/niedrige ERCC1-Expression) und der Korrelation mit dem progressionsfreien Überleben und mit dem Gesamtüberleben ließen sich ebenfalls keine (Sub-)Gruppen mit längerem PFS oder längerem Gesamtüberleben nach platinhaltiger Chemotherapie definieren.

4.5 Die erhältlichen Anti-ERCC1-Antikörper unterscheiden sich maßgeblich in ihrem Färbeverhalten

Wir konnten zeigen, dass sich die erhältlichen Anti-ERCC1-Antikörper maßgeblich in ihrem Färbeverhalten unterscheiden.

Die vorherigen immunhistochemischen ERCC1-Färbungen von Nebennierenkarzinomen ((Ronchi et al. 2009), (Malandrino et al. 2010)) wurden mit dem Anti-ERCC1-Antikörper Klon 8F1 durchgeführt (Neomarkers, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA), da dieser zuvor u.a. in einer großen Studie zur Platintherapie bei Patienten mit NSCLC zur Evaluation der ERCC1-Expression eingesetzt worden war (Olaussen et al. 2006). Dieser Antikörper stellte sich allerdings als nicht spezifisch für ERCC1 heraus (Bhagwat et al. 2009; Niedernhofer et al. 2007). Es konnte nämlich gezeigt werden, dass der Antikörper Klon 8F1 auch ein nicht mit ERCC1-zusammenhängendes Protein der Zellkernmembran, das Protein PCYT1A bindet (Ma et al. 2012; Vaezi et al. 2014). Auch bekannt als CCT α (Cholinphosphat Cytidyltransferase Alpha), ist PCYT1A ein wichtiges Enzym bei der Synthese von Phosphatidylcholin (Tronchere, et al. 1994), einem Schlüsselenzym in Signalkaskaden von Tumorzellen (Linkous, et al. 2010). Außerdem ist es bei der Bildung der Phospholipidwand des Zellkerns (Northwood, et al. 1999) und der Bildung des Endoplasmatischen Retikulums beteiligt (Lagace and Ridgway 2005b). CCT α ist unerlässlich für das Überleben von Embryos (Wang, et al. 2005) und ist ein Schlüsselenzym bei der Bildung von Surfactant (Tian, et al. 2007). Des Weiteren spielt CCT α eine Rolle beim Abwenden von Apoptose (Lagace and Ridgway 2005a) und bei der Zellproliferation (Fagone, et al. 2009), (Vaezi et al. 2014).

Eine hohe Expression von CCT α zeigte sich zudem als prognostisch für ein längeres Überleben bei Patienten mit NSCLC, deren Therapie in einer Operation bestand, und bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs (HNSCC) (Vaezi et al. 2014). Eine Beteiligung von CCT α bei der Resistenz gegen platinbasierte Chemotherapeutika ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt allerdings nicht bekannt.

Ein weiteres Problem bei der Anwendung der Antikörper bestand darin, dass sich die nun (im Jahr 2011) erhältliche Version des Antikörpers Klon 8F1 vom vormals (im Jahr 2006) verwendeten Antikörper Klon 8F1 zu unterscheiden schien (Friboulet et al. 2013a). Aus diesen Gründen führten wir eine Reihe weiterer Untersuchungen durch.

Dazu färbten wir 38 der 45 im Jahr 2009 untersuchten ACCs erneut mittels IHC, allerdings unter Verwendung des hochspezifischen neuen monoklonalen Anti-ERCC1-Antikörpers Klon 4F9. Mit dieser spezifischen Färbung von ERCC1 wurde beim Vergleich der Färbeintensitäten eine Übereinstimmung von nur 49% zwischen den zwei Antikörperklonen deutlich. Damit war kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben zwischen Patienten mit schwacher ERCC1-Expression des Tumormaterials und solchen mit starker ERCC1-Expression mehr erkennbar. Des Weiteren verglichen wir die Färbeintensität des neuen hochspezifischen monoklonalen Antikörpers Klon 4F9 und die Färbeintensität des aktuell erhältlichen Anti-ERCC1-Antikörpers Klon 8F1. Dazu färbten wir das Tumormaterial von 21 Patienten der neuen Studie mit dem Klon 4F9 sowie mit der nun erhältlichen Version des Anti-ERCC1-Antikörpers Klon 8F1. Die beiden Antikörper stimmten in ihrem Färbeverhalten in 81% der Tumorschnitte überein.

Der aktuell (bzw. 2014) erhältliche Klon des Anti-ERCC1-Antikörpers 8F1 scheint dem hoch spezifischen Anti-ERCC1-Antikörper Klon 4F9 also ähnlicher zu sein, als der 2009 verwendete Anti-ERCC1-Antikörper Klon 8F1 (Übereinstimmung von 81% vs. 49%). Dies kann teilweise durch das zusätzliche Detektieren von CCT α durch den alten Antikörper 8F1 erklärt werden. Dennoch bleibt die Frage bestehen, worin die 19% der Unterschiede im Färbeverhalten zwischen den aktuell erhältlichen Antikörpern 8F1 und 4F9 begründet liegen.

4.6 ERCC1 ist nicht zur klinischen Therapieentscheidung heranzuziehen

Aus verschiedenen Gründen ist der Hoffnungsträger ERCC1 weder als prognostischer, noch als prädiktiver Marker nutzbar, geschweige denn für den klinischen Einsatz zur Therapieentscheidung geeignet.

Unabhängig von der Tumorentität zeigt bei einer Therapie mit Platinderivaten, bzw. generell bei einer Therapie mit Chemotherapeutika, stets nur ein Teil der Patienten ein Ansprechen des Tumors. Der andere Teil der Patienten leidet aber zum einen an den Nebenwirkungen der Therapie, zum anderen wird unter Umständen mit einer unwirksamen Therapie Zeit verloren, bevor eine individuell wirksamere Therapie verabreicht werden kann. Die so entstehenden Kosten und vor allem das so entstehende Leid der Patienten sind nur einige Gründe, warum Biomarker zur Vorhersagbarkeit des Therapieansprechens so dringend benötigt werden.

Bevor ein solcher Biomarker allerdings als zuverlässiger Marker genutzt werden kann, müssten zunächst verschiedene Studien seine Einsetzbarkeit validieren. Es existieren zwar viele Veröffentlichungen, die sich mit ERCC1 als prädiktivem Biomarker in verschiedenen Tumorarten beschäftigen, allerdings kommen diese zu einander widersprechenden Ergebnissen. Bei der Suche nach dem Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse besteht das Hauptproblem, neben der Verwendung unterschiedlicher Antikörperklone und der Veränderung derselben, darin, dass die Studien auch im Hinblick auf andere Aspekte nicht direkt miteinander verglichen werden können. Dies wird in Metaanalysen, wie zum Beispiel von Barsanti-Innes et al. (28 Studien verglichen) (Barsanti-Innes, et al. 2017) oder von Malottki et al. (33 Studien verglichen) (Malottki, et al. 2016), die sich mit der Aussagekraft der ERCC1-Expression hinsichtlich des Therapieansprechens beschäftigt haben, deutlich. Bei der meist retrospektiven Analyse der Korrelation von ERCC1-Expression und dem Ansprechen auf platinbasierte Chemotherapie wurden viele verschiedene Methoden (wie zum Beispiel IHC oder RT-qPCR) zur Ermittlung der ERCC1-Expression verwendet. Diese Methoden waren meist nicht standardisiert, wurden nicht wiederholt oder waren nicht validiert (Barsanti-Innes et al. 2017). Zudem scheint es teilweise keine Korrelation zu geben zwischen den Ergebnissen hinsichtlich der ERCC1-Expression ermittelt mittels IHC und denen, die durch Messung der mRNA-Expression ermittelt wurden (Zheng et al. 2007). Des Weiteren wurden häufig unterschiedliche Cut-off-Punkte zur Abgrenzung zwischen niedriger und hoher ERCC1-Expression verwendet: Barsanti-Innes et al. schreiben, dass 75% der von

ihnen untersuchten Studien den medianen Wert der ERCC1-Expression als Cut-off-Punkt genutzt haben, was den Vergleich zwischen den Studien hinsichtlich der Gruppen mit „hoher“ oder „niedriger“ ERCC1-Expression erschwert. Dabei wurde teilweise ein H-Score berechnet, teilweise wurden aber auch andere Scoringsysteme verwendet (Malottki et al. 2016). Gerade das Vorgehen bei der Immunhistochemie ist ebenfalls zwischen den Zentren nicht standardisiert und bildet so eine mögliche Fehlerquelle bei der Bewertung der ERCC1-Expression (Besse et al. 2013).

Des Weiteren kommen generelle Problemen beim Einsatz eines Biomarkers, wie zum Beispiel der räumlichen sowie zeitlichen Heterogenität innerhalb eines Tumors (Olaussen and Postel-Vinay 2016), zum Tragen. Viele Studien untersuchten Material, das durch eine Biopsie gewonnen worden war (Malottki et al. 2016) und somit möglicherweise nur die ERCC1-Expression in einem kleinen Teil des Tumors darstellen konnte. Dass sich die Ergebnisse der ERCC1 Evaluation zwischen Biopsien und resezierten Tumoren unterscheiden, zeigt zum Beispiel eine kleinen Studie bei Lungentumoren (Taillade, et al. 2007). Und nicht nur die Heterogenität innerhalb eines Tumors stellt ein Problem dar: Diverse Studien beim NSCLC zeigten, dass es zusätzlich einen Unterschied zwischen der ERCC1-Expression (ermittelt mittels IHC) im Primarius und der in Metastasen gibt (Kang, et al. 2009), (Gomez-Roca, et al. 2009). Das Untersuchen einer Metastase hinsichtlich der ERCC1-Expression kann also unter Umständen keine Aussage zur ERCC1-Expression im Primärtumor zulassen. Verfolgt man diesen Gedanken weiter, muss man sich die Frage stellen, ob, falls ERCC1 tatsächlich beim Ansprechen auf eine platinhaltige Therapie eine Rolle spielt, eine Bestimmung der ERCC1-Expression aus Material des Primärtumors beim Vorliegen von Metastasen nicht zu einer Therapieentscheidung führen würde, die zwar für den Primarius angebracht, für die Behandlung der Metastasen aber ungeeignet ist und umgekehrt.

Darüber hinaus wurden häufig sehr heterogene Gruppen mit Patienten, die unterschiedliche Therapieregime mit meist mehreren Chemotherapien gleichzeitig erhalten hatten (z.B. Etoposid, Doxorubicin und Mitotane) oder mit anderen

Therapien vorbehandelt waren, untersucht (Olaussen and Postel-Vinay 2016), (Ronchi et al. 2009), (Barsanti-Innes et al. 2017). Dies erschwert das Herausarbeiten des Zusammenhangs zwischen der Expression eines einzelnen Biomarkers und der Wirksamkeit einer einzelnen, in Kombination applizierten, Substanz. Die Expression verschiedener anderer Biomarker, wie z.B. der Topoisomerase II alpha (TOP2A) und der Thymidylat-Synthase (TS) hat z.B. ebenfalls einen Einfluss auf das Ansprechen auf das EDP-M-Regime (Roca, et al. 2017). Dabei spielen aber statt Platin wohl vor allem die Wirkung des Topoisomerase-Inhibitors Etoposid sowie die Wirkung des Anthracyclins Doxorubicin eine Rolle (Roca et al. 2017).

Neben der Tatsache, dass ein Biomarker nicht die Aktivität eines Reparaturenzyms bestimmen kann, sondern nur die Quantität (Besse et al. 2013), gibt es einen weiteren, nicht zu vernachlässigenden Grund, warum die momentane Aussagekraft von ERCC1 als Biomarker differenziert betrachtet werden muss: Bei genauer Analyse von ERCC1 wurde festgestellt, dass ERCC1 in vier Isoformen vorliegen kann (201-204). Nur eine dieser Isoformen, nämlich Isoform 202, spielt beim Entfernen von Platinaddukten in der DNA eine Rolle. Nur sie formt im NER-System ein Heterodimer mit XPF (Xeroderma Pigmentosum complementation group F), auch bekannt als ERCC4, und nur als ERCC1-XPF-Komplex ist ERCC1 als Endonuklease in DNA-Reparaturmechanismen involviert (Bessho et al. 1997), (Bowden 2014), (Friboulet et al. 2013a), (Friboulet, et al. 2013b). Dabei ist keiner der von Friboulet, Olaussen et al., getesteten 16 Anti-ERCC1-Antikörper in der Lage, zwischen den vier ERCC1-Isoformen zu unterscheiden (Friboulet et al. 2013a) und auch der Versuch, durch gleichzeitige Bestimmung von XPF eine prognostische Aussage treffen zu können, schlug fehl (Lee et al. 2017). Soll die ERCC1-Bestimmung zur Therapieentscheidung herangezogen werden, könnte es also zu einer falschen Zuordnung bei vermeintlich hoher ERCC1-Expression kommen und zu Nachteilen für den Patienten führen. Auch bei der Bestimmung der ERCC1-mRNA-Expression ergibt sich das Problem, dass die Primer nicht isoformspezifisch sind (Besse et al. 2013).

Obwohl allein die genannten Gründe davon abhalten sollten, ERCC1 als prognostischen Marker im klinischen Alltag einzusetzen, ist eine Reihe von Kits zur Bestimmung von ERCC1 in Tumorgeweben kommerziell erhältlich. Eine Studie von Schneider et al., die diese verschiedenen Kits vergleicht, zeigte erwartungsgemäß maßgebliche Unterschiede zwischen den Kits bei der Auswertung identischen Tumormaterials (Schneider, et al. 2014).

Um die bestehenden technischen Schwierigkeiten bei der Bestimmung der ERCC1-Expression zu umgehen, könnte in Zukunft der Einsatz anderer Techniken, wie z.B. die Analyse der vollständigen Genomsequenz (whole-genome-sequencing), die Sequenzierung von RNA oder die Untersuchung des Proteoms von Formalin-fixiertem Tumormaterial mittels Massenspektrometrie eine Rolle spielen (Postel-Vinay and Soria 2017).

Letztendlich ist die DNA-Reparatur durch ERCC1 nicht der einzige Grund für die Entwicklung einer Resistenz gegen Platin. Die Wirksamkeit von Platin hängt unter anderem auch vom CTR1 Transporter, dem GSTM1 Detoxikations-Enzym und dem MSH2 Protein ab. Außerdem spielen das anti-apoptotische Protein BCL-2 und SMARCA4 eine Rolle (Olaussen and Postel-Vinay 2016). Eine niedrige Expression von SMARCA4 (einem Mitglied des ATP-abhängigen Chromatin-Remodelling-Komplexes SNF/SWI) zeigte sich kürzlich beim NSCLC als assoziiert mit einer insgesamt schlechteren Prognose, jedoch auch mit einem besseren Ansprechen auf eine platinbasierte adjuvante Chemotherapie (Bell, et al. 2016).

4.7 Diskussion von Stärken und limitierenden Faktoren

Die Studie weist trotz gewisser Limitationen bemerkenswerte Stärken auf.

Als Kritikpunkt der vorliegenden Arbeit könnte man die im Vergleich zu anderen Tumorentitäten geringe Fallzahl anmerken. Ruft man sich jedoch die Seltenheit der Erkrankung ins Gedächtnis (pro Jahr treten nur 0,5-2 Neuerkrankungen pro 1 Millionen Menschen auf (Kerkhofs et al. 2013b)), so ist die Fallzahl von 146 Patienten keinesfalls als Limitation, sondern, im Gegenteil, als Stärke zu bewerten.

Ein anderer Kritikpunkt ist die retrospektive Erfassung der Daten. Da allerdings nur Patienten, von denen ausreichende Mengen an Tumormaterial und ausführliche klinische Daten vorhanden waren, in die Studie einbezogen wurden, kann das Risiko eines relevanten Bias als gering eingestuft werden. Zudem wies die untersuchte Studienkohorte eine große Homogenität hinsichtlich der Chemotherapieprotokolle auf.

Es kann angemerkt werden, dass das Bewerten der histologischen Schnitte und der Färbeintensitäten, insbesondere auch das Einschätzen der Anzahl positiv gefärbter Zellen, untersucherabhängig und subjektiv ist. Die beiden Operatoren waren allerdings gegenüber den klinischen Daten der Patienten und den jeweiligen Ergebnissen des anderen Operators verblindet und kamen dennoch zu überwiegend übereinstimmenden Ergebnissen (Korrelationskoeffizient 0,72, 95%CI=0,63-0,79).

Die vorliegende Arbeit ist die Erste, die bei einer solch großen Patientengruppe die ERCC1-Expression und den Zusammenhang mit dem Ansprechen auf platinbasierte Chemotherapie untersucht. Zudem wurde, soweit bewusst, erstmals der neue monoklonale hochspezifische Anti-ERCC1-Antikörper Klon 4F9 bei der Untersuchung des Nebennierenrindenzinoms verwendet.

5 Zusammenfassung

Das Nebennierenrindenzarzinom ist ein sehr seltener Tumor mit einer ungünstigen Prognose. Die einzige Möglichkeit, die Erkrankung zu heilen, besteht in der radikalen Operation, diese ist allerdings oft nicht möglich. Patienten in fortgeschrittenen Stadien werden in den meisten Fällen mit einer platinhaltigen Chemotherapie behandelt, die nur bei einem Teil der Patienten erfolgreich ist und mit relevanter Toxizität einhergeht. Da ERCC1 als Teil des Nukleotide-Excision-Repair-Systems mit für die Entfernung der durch Platin verursachten DNA-Schäden verantwortlich ist, hatten verschiedenen Studien ERCC1 bei diversen Tumorentitäten als möglichen Biomarker zur Vorhersage der Platinsensitivität untersucht. Dabei hatten sich teilweise vielversprechende Ergebnisse gezeigt. Auch beim Nebennierenrindenzarzinom lag eine positive Studie vor, die auf Grund der geringen Fallgröße allerdings nur limitierte Aussagekraft besaß.

Die vorliegende Arbeit untersucht deshalb die potentielle Rolle von ERCC1 als prädiktiven Biomarker für das Ansprechen auf platinbasierte Chemotherapie in der größten bis dahin zu diesem Thema untersuchten Kohorte von Patienten mit Nebennierenrindenzarzinom (n=146). Dabei wurde der neue hoch spezifische Anti-ERCC1-Antikörper Klon 4F9 verwendet. Die Mehrheit der Tumore (65.8%) zeigte eine hohe ERCC1-Expression, mit H-Scores von 2 oder 3. Wir konnten eindeutig zeigen, dass die ERCC1-Expression keine prädiktive Aussage für das Ansprechen auf platinbasierte Chemotherapie bei Patienten mit ACC zulässt (klinischer Nutzen der Therapie bei 52% der Patienten mit niedriger ERCC1-Expression im Tumor vs. 60,4% der Patienten mit hoher ERCC1-Expression, p=NS). Auch zeigte sich keinerlei Korrelation zwischen der ERCC1-Färbeintensität und dem progressionsfreien Überleben (medianes PFS bei 6 Monaten in der Gruppe der Patienten mit niedriger ERCC1-Expression und bei 6,5 Monaten bei der Patientengruppe, die eine hohe Expression von ERCC1 zeigte (p=0,33) oder dem Gesamtüberleben (medianes Gesamtüberleben bei 16,5 Monaten in der Gruppe der Patienten mit niedriger ERCC1-Expression (3,5-114 Monate) sowie bei 17 Monaten (1,5-127 Monate) in der Patientengruppe, die eine hohe

Expression von ERCC1 zeigte ($p=0,87$). Diese Ergebnisse stimmen mit neueren Forschungsergebnissen bei anderen Krebsentitäten überein. Daraus kann Folgendes gefolgert werden: Gerade wegen der schlechten Vergleichbarkeit der vorhandenen Studien zum Thema der ERCC1-Expression und diverser Probleme mit den Antikörpern ist ERCC1 alleine betrachtet als Biomarker nicht geeignet, Platinsensitivität vorherzusagen und ist nicht für den klinischen Einsatz zur Therapieentscheidung heranzuziehen. Auch in Kombination mit der Bestimmung der RRM1-Expression ließen sich keine prognostischen Aussagen bezüglich des progressionsfreien Überlebens oder des Gesamtüberlebens treffen. Da Biomarker zur Vorhersagbarkeit der Effektivität einer platinbasierten Chemotherapie beim Nebennierenrindenzinom dringend benötigt werden, wäre zur besseren Vergleichbarkeit der Studien verschiedener Zentren zukünftig ein Protokoll zum standardisierten Vorgehen bei der Bestimmung der ERCC1-Expression nötig. Zudem sollte in Zukunft eine Evaluation möglicher Kombinationen aus ERCC1 mit anderen Biomarkern erfolgen, oder es sollte sich ganz auf neue vielversprechende Marker, wie z.B. SMARCA4, konzentriert werden.

6 Tabellen und Abbildungen

Abbildung 1:	ENSAT-Stagingsystem.....	5
Abbildung 2:	Entfernung eines Platinaddukts durch Nukleotid-Excision-Repair, Quelle: (Gazdar 2007)	14
Abbildung 3:	Die Rolle von ERCC1 bei verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen, Quelle: (Besse et al. 2013)	16
Abbildung 4:	ERCC1-Expression mittels IHC in 186 Gewebeproben adrenaler Tumore, Quelle: (Ronchi et al. 2009).....	21
Abbildung 5:	Korrelation des Gesamtüberlebens mit der ERCC1-Expression bei 45 mit platinbasierter Chemotherapie behandelten ACC-Patienten, Quelle: (Ronchi et al. 2009)	22
Abbildung 6:	Immunhistochemische ERCC1-Färbungen der Kerne in den Intensitäten 0,1,2 und 3	41
Abbildung 7:	ERCC1-Expression und Ansprechen auf platinbasierte Chemotherapie	47
Abbildung 8:	ERCC1-Expression und progressionsfreies Überleben nach Administration platinhaltiger Chemotherapie	48
Abbildung 9:	ERCC1-Expression und Gesamtüberleben	49
Abbildung 10:	RRM1-Expression und Gesamtüberleben nach Erhalt einer platinhaltigen Chemotherapie bei 47 Patienten	53
Abbildung 11:	RRM1-Expression und progressionsfreies Überleben nach Erhalt einer platinhaltigen Chemotherapie bei 47 Patienten	54
Abbildung 12:	Expression von RRM1 verglichen mit der Expression von ERCC1 in 47 Tumoren	55
Abbildung 13:	Zusammenhang von RRM1-Expression und ERCC1-Expression in Bezug auf das Gesamtüberleben nach Platintherapie	56
Abbildung 14:	Zusammenhang zwischen RRM1-Expression und ERCC1-Expression in Bezug auf das progressionsfreie Überleben nach Platintherapie... ..	57
Abbildung 15:	Gesamtüberleben nach platinhaltiger Chemotherapie, Anti-ERCC1-AK 8F1	58
Abbildung 16:	Gesamtüberleben nach Chemotherapie, Färbung mit Klon 4F959	

Abbildung 17: Direkter Vergleich der beiden Anti-ERCC1-AK 4F9 (A und C) und 8F1 (aktuell erhältlich Version, B und D)	60
Abbildung 18: Vergleich der Färbeintensität des alten Klons 8F1 und des Klons 4F9 an 38 Tumoren der alten Studie	60
Abbildung 19: Vergleich der Färbeintensitäten des neuen Klons 8F1 (2014 erhältlich) und des Klons 4F9 an 21 Tumoren der neuen Studienkohorte	61
Tabelle 1: Klinische Studien mit platinbasierter Therapie, in denen ERCC1 als Marker eine prädiktive Aussagekraft zeigte	19
Tabelle 2: Klinische Studien mit platinbasierter Therapie, in denen ERCC1 als Marker keine prädiktive Aussagekraft zeigte	20
Tabelle 3: Probleme mit dem ERCC1-Antikörper	27
Tabelle 4: Charakteristika der Patientenkohorte	32
Tabelle 5: Therapien vor platinhaltiger Chemotherapie	33
Tabelle 6: Platintherapie	34
Tabelle 7: Tumormaterial	36
Tabelle 8: Verwendete Chemikalien	37
Tabelle 9: Verwendete Puffer und Lösungen	38
Tabelle 10: Expression von ERCC1 in den Tumorgeweben	44
Tabelle 11: Ansprechen auf platinbasierte Chemotherapie	46
Tabelle 12: Expression von RRM1 in 47 Nebennierenrindenkarzinomen	50
Tabelle 13: Charakteristika der 47 hinsichtlich RRM1 analysierten Patienten	51
Tabelle 14: Ansprechen auf platinbasierte Chemotherapie bei 47 hinsichtlich RRM1-Expression analysierten Patienten	52

7 Abkürzungsverzeichnis

<i>o,p'</i> -DDD	(RS)-1,1-Dichlor-2-(2-chlorphenyl)-2-(4-chlorphenyl)ethan
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
17OHP	17-Hydroxyprogesteron
95%CI	95% Konfidenzintervall
ACC	Adrenokortikales Karzinom, Nebennierenrindenzarzinom
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ADIUVIO	Studie, die die Mitotanetherapie mit einer Strategie des „watchfull waitings“ vergleicht
AK	Antikörper
ATP-TCA-Assay	Adenosintriphosphat-Trichloressigsäure-Assay
BCL-2	B-Zell Lymphom 2
bzw.	beziehungsweise
Ca	Carcinoma, Karzinom
CCTα	Cholinphosphat Cytidyltransferase Alpha
CDK4	Cyklinabhängige Kinase 4
CDKN2A	CDK-Inhibitor 2A
CDKN2B	CDK-Inhibitor 2B

cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CR	komplette Remission
CT	Computertomographie
CTNNB1	Catenin Beta 1
CTR1	High Affinity Copper Uptake Protein 1
d.h.	das heißt
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAXX	Death Associated Protein 6
DFS	krankheitsfreies Überleben
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDP-M	Etoposid+Doxorubicin+Platin+Mitotane
EGF	Epidermal Growth Factor
ENSAT	European Network for the Study of Adrenal Tumours
et al.	et alii/et aliae/et alia, und andere
ERCC1	Excision Repair Cross-Complementing 1
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis Coli
FDG-PET	Fluordesoxyglukose-Positronenemissionstomographie
FFPE	Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Tumorgewebe
FIRM-ACT-Studie	First International Randomised trial in locally advanced and Metastatic Adrenocortical Carcinoma

FOLFIRINOX	Leucovorin Calcium+Fluorouracil+Irinotecan Hydrochlorid+Oxaliplatin
GGR	Globale Genome Repair
GSTM1	Glutathion S-Transferase M1
h	Stunde(n)
HNSCC	Kopf-Hals-Karzinom
HR	Homologe Rekombination
HR	Hazard Ratio
HRP	Horseradish Peroxidase
HU	Hounsfield Unit
ICL-R	Interstrand Cross-Link- Reparaturmechanismus
IGF-1R	Rezeptor für Insulin-like Growth Factor 1
IGF-2	Insulin-like Growth Factor 2
IHC	Immunhistochemie
IMCA12	Humaner monoklonaler IgG1 Antikörper für den Insulin-like Growth Factor I Rezeptor, Cixutumumab
IMTO	[¹²³ I]Iodmetomidat
IR	Ionisierende Strahlung
Ki67	Protein Ki 67
LK	Lymphknoten
M	männlich
MEN1	Multiple Endokrine Neoplasie 1
mg/dl	Milligramm pro Deziliter

mg/l	Milligramm pro Liter
ml	Milliliter
mol/l	Mol pro Liter
mono	allein
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MSH2	DNA Mismatch Repair Protein 2
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
n	Anzahl
n.v.	nicht verfügbar
NER	Nukleotid-Excision-Repair-System
NF1	Neurofibromin 1
Nr.	Nummer
NS	nicht signifikant
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
OP	Operation
OS	Gesamtüberleben
OSI-906	Linsitinib, IGF-1R Inhibitor
p	p-Wert
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PCYT1A	CCT α , Cholinphosphat Cytidyltransferase Alpha

PDGFR-Rezeptor	Platelet Derived Growth Factor-Rezeptor
POL	Polymerase
PR	partielle Remission
Pt	Platin
R0	Resektionsrand tumorfrei/ Resektion im Gesunden
RFA	Radiofrequenzablation
RFC	Replication Factor C
RFS	rezidivfreies Überleben
RPA	Replication Protein A
RRM1	regulatorische Untereinheit der Ribonukleotidreduktase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SD	stabile Erkrankung
SF1	Steroidogenetic Factor 1
SMARCA4	ATP-abhängige Helikase SMARCA4
SNF/SWI	ATP-abhängiger Chromatin-Remodelling-Komplex
SOAT1	Sterol-O-Acyltransferase 1
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SSB-R	ROS-induzierter Single-Strand-Break-Repair
Sz-M	Streptozotocin+Mitotane
TACE	transarterielle Chemoembolisation
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase

TFIIH	Transcription Factor IIH
TNM	Klassifikation nach Tumorgröße, Lymphknotenbefall, Metastasen
TOP2A	Topoisomerase II alpha
TP53	Tumorprotein p53
TS	Thymidylat-Synthase
UICC	The Union for International Cancer Control
UV	ultraviolet
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vs.	versus, gegen(übergestellt)
W	weiblich
X	gemischtes Ansprechen
XP	Xeroderma Pigmentosum
XPA	Xeroderma Pigmentosum complementation group A
XPF	Xeroderma Pigmentosum complementation group F, ERCC4
ZNFR3	Zinkfingerprotein3

8 Literaturverzeichnis

Ahlman H, Khorram-Manesh A, Jansson S, Wangberg B, Nilsson O, Jacobsson CE & Lindstedt S 2001 Cytotoxic treatment of adrenocortical carcinoma. *World J Surg* **25** 927-933.

Allolio B 2006 Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update. *J Clin Endocrinol Metab* **91** 2027-2037.

Altaha R, Liang X, Yu JJ & Reed E 2004 Excision repair cross complementing-group 1: gene expression and platinum resistance. *Int J Mol Med* **14** 959-970.

Arlt W, Biehl M, Taylor AE, Hahner S, Libe R, Hughes BA, Schneider P, Smith DJ, Stiekema H, Krone N, et al. 2011 Urine steroid metabolomics as a biomarker tool for detecting malignancy in adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **96** 3775-3784.

Arnould S, Hennebelle I, Canal P, Bugat R & Guichard S 2003 Cellular determinants of oxaliplatin sensitivity in colon cancer cell lines. *Eur J Cancer* **39** 112-119.

Arora S, Kothandapani A, Tillison K, Kalman-Maltese V & Patrick SM 2010 Downregulation of XPF-ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells. *DNA Repair (Amst)* **9** 745-753.

Assie G, Letouze E, Fassnacht M, Jouinot A, Luscap W, Barreau O, Omeiri H, Rodriguez S, Perlemoine K, Rene-Corail F, et al. 2014 Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat Genet* **46** 607-612.

Barlaskar FM & Hammer GD 2007 The molecular genetics of adrenocortical carcinoma. *Rev Endocr Metab Disord* **8** 343-348.

Barsanti-Innes B, Hey SP & Kimmelman J 2017 The Challenges of Validating in Precision Medicine: The Case of Excision Repair Cross-Complement Group 1 Diagnostic Testing. *Oncologist* **22** 89-96.

Barzon L, Sonino N, Fallo F, Palu G & Boscaro M 2003 Prevalence and natural history of adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol* **149** 273-285.

Baudin E, Docao C, Gicquel C, Vassal G, Bachelot A, Penfornis A & Schlumberger M 2002 Use of a topoisomerase I inhibitor (irinotecan, CPT-11) in metastatic adrenocortical carcinoma. *Ann Oncol* **13** 1806-1809.

Baudin E, Pellegriti G, Bonnay M, Penfornis A, Laplanche A, Vassal G & Schlumberger M 2001 Impact of monitoring plasma 1,1-dichlorodiphenildichloroethane (o,p'DDD) levels on the treatment of patients with adrenocortical carcinoma. *Cancer* **92** 1385-1392.

Bauman JE, Austin MC, Schmidt R, Kurland BF, Vaezi A, Hayes DN, Mendez E, Parvathaneni U, Chai X, Sampath S, et al. 2013 ERCC1 is a prognostic biomarker in locally advanced head and neck cancer: results from a randomised, phase II trial. *Br J Cancer* **109** 2096-2105.

Bell EH, Chakraborty AR, Mo X, Liu Z, Shilo K, Kirste S, Stegmaier P, McNulty M, Karachaliou N, Rosell R, et al. 2016 SMARCA4/BRG1 Is a Novel Prognostic Biomarker Predictive of Cisplatin-Based Chemotherapy Outcomes in Resected Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* **22** 2396-2404.

Bellmunt J, Paz-Ares L, Cuello M, Cecere FL, Albiol S, Guillem V, Gallardo E, Carles J, Mendez P, de la Cruz JJ, et al. 2007 Gene expression of ERCC1 as a novel prognostic marker in advanced bladder cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Ann Oncol* **18** 522-528.

Bepler G, Kusmartseva I, Sharma S, Gautam A, Cantor A, Sharma A & Simon G 2006 RRM1 modulated in vitro and in vivo efficacy of gemcitabine and platinum in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **24** 4731-4737.

Bepler G, Sharma S, Cantor A, Gautam A, Haura E, Simon G, Sharma A, Sommers E & Robinson L 2004 RRM1 and PTEN as prognostic parameters for overall and disease-free survival in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **22** 1878-1885.

Bernard MH, Sidhu S, Berger N, Peix JL, Marsh DJ, Robinson BG, Gaston V, Le Bouc Y & Gicquel C 2003 A case report in favor of a multistep adrenocortical tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab* **88** 998-1001.

Berruti A, Fassnacht M, Baudin E, Hammer G, Haak H, Leboulleux S, Skogseid B, Allolio B & Terzolo M 2010 Adjuvant therapy in patients with adrenocortical carcinoma: a position of an international panel. *J Clin Oncol* **28** e401-402; author reply e403.

Berruti A, Fassnacht M, Haak H, Else T, Baudin E, Sperone P, Kroiss M, Kerkhofs T, Williams AR, Ardito A, et al. 2014 Prognostic role of overt hypercortisolism in completely operated patients with adrenocortical cancer. *Eur Urol* **65** 832-838.

Berruti A, Sperone P, Ferrero A, Germano A, Ardito A, Priola AM, De Francia S, Volante M, Daffara F, Generali D, et al. 2012 Phase II study of weekly paclitaxel and sorafenib as second/third-line therapy in patients with adrenocortical carcinoma. *Eur J Endocrinol* **166** 451-458.

Berruti A, Terzolo M, Sperone P, Pia A, Della Casa S, Gross DJ, Carnaghi C, Casali P, Porpiglia F, Mantero F, et al. 2005 Etoposide, doxorubicin and cisplatin plus mitotane in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma: a large prospective phase II trial. *Endocr Relat Cancer* **12** 657-666.

Berthon A, Martinez A, Bertherat J & Val P 2012 Wnt/beta-catenin signalling in adrenal physiology and tumour development. *Mol Cell Endocrinol* **351** 87-95.

Besse B, Olausson KA & Soria JC 2013 ERCC1 and RRM1: ready for prime time? *J Clin Oncol* **31** 1050-1060.

Bessho T, Sancar A, Thompson LH & Thelen MP 1997 Reconstitution of human excision nuclease with recombinant XPF-ERCC1 complex. *J Biol Chem* **272** 3833-3837.

Beuschlein F, Weigel J, Saeger W, Kroiss M, Wild V, Daffara F, Libe R, Ardito A, Al Ghuzlan A, Quinkler M, et al. 2015 Major prognostic role of Ki67 in localized adrenocortical carcinoma after complete resection. *J Clin Endocrinol Metab* **100** 841-849.

Bhagwat NR, Roginskaya VY, Acquafondata MB, Dhir R, Wood RD & Niedernhofer LJ 2009 Immunodetection of DNA repair endonuclease ERCC1-XPF in human tissue. *Cancer Res* **69** 6831-6838.

Bharwani N, Rockall AG, Sahdev A, Gueorguiev M, Drake W, Grossman AB & Reznick RH 2011 Adrenocortical carcinoma: the range of appearances on CT and MRI. *AJR Am J Roentgenol* **196** W706-714.

Bilimoria KY, Shen WT, Elaraj D, Bentrem DJ, Winchester DJ, Kebebew E & Sturgeon C 2008 Adrenocortical carcinoma in the United States: treatment utilization and prognostic factors. *Cancer* **113** 3130-3136.

Boland GW, Dwamena BA, Jagtiani Sangwaiya M, Goehler AG, Blake MA, Hahn PF, Scott JA & Kalra MK 2011 Characterization of adrenal masses by using FDG PET: a systematic review and meta-analysis of diagnostic test performance. *Radiology* **259** 117-126.

Bowden NA 2014 Nucleotide excision repair: why is it not used to predict response to platinum-based chemotherapy? *Cancer Lett* **346** 163-171.

- Cawood TJ, Hunt PJ, O'Shea D, Cole D & Soule S 2009 Recommended evaluation of adrenal incidentalomas is costly, has high false-positive rates and confers a risk of fatal cancer that is similar to the risk of the adrenal lesion becoming malignant; time for a rethink? *Eur J Endocrinol* **161** 513-527.
- Ceppi P, Volante M, Novello S, Rapa I, Danenberg KD, Danenberg PV, Cambieri A, Selvaggi G, Saviozzi S, Calogero R, et al. 2006 ERCC1 and RRM1 gene expressions but not EGFR are predictive of shorter survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin and gemcitabine. *Ann Oncol* **17** 1818-1825.
- Chu G 1994 Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *J Biol Chem* **269** 787-790.
- Damia G, Imperatori L, Stefanini M & D'Incalci M 1996 Sensitivity of CHO mutant cell lines with specific defects in nucleotide excision repair to different anti-cancer agents. *Int J Cancer* **66** 779-783.
- de Boer J & Hoeijmakers JH 2000 Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* **21** 453-460.
- De Dosso S, Zanellato E, Nucifora M, Boldorini R, Sonzogni A, Biffi R, Fazio N, Bucci E, Beretta O, Crippa S, et al. 2013 ERCC1 predicts outcome in patients with gastric cancer treated with adjuvant cisplatin-based chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* **72** 159-165.
- De Martino MC, Al Ghuzlan A, Aubert S, Assie G, Scoazec JY, Leboulleux S, Do Cao C, Libe R, Nozieres C, Lombes M, et al. 2013 Molecular screening for a personalized treatment approach in advanced adrenocortical cancer. *J Clin Endocrinol Metab* **98** 4080-4088.
- Deandreis D, Leboulleux S, Caramella C, Schlumberger M & Baudin E 2011 FDG PET in the management of patients with adrenal masses and adrenocortical carcinoma. *Horm Cancer* **2** 354-362.
- Donohue JP, Einhorn LH & Perez JM 1978 Improved management of nonseminomatous testis tumors. *Cancer* **42** 2903-2908.
- Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, et al. 2009 New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* **45** 228-247.
- Else T, Kim AC, Sabolch A, Raymond VM, Kandathil A, Caoili EM, Jolly S, Miller BS, Giordano TJ & Hammer GD 2014 Adrenocortical carcinoma. *Endocr Rev* **35** 282-326.
- Erdogan I, Deutschbein T, Jurowich C, Kroiss M, Ronchi C, Quinkler M, Waldmann J, Willenberg HS, Beuschlein F, Fottner C, et al. 2013 The role of surgery in the management of recurrent adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **98** 181-191.
- Fagone P, Gunter C, Sage CR, Gunn KE, Brewer JW & Jackowski S 2009 CTP:phosphocholine cytidyltransferase alpha is required for B-cell proliferation and class switch recombination. *J Biol Chem* **284** 6847-6854.
- Fan H, Huang A, Villegas C & Wright JA 1997 The R1 component of mammalian ribonucleotide reductase has malignancy-suppressing activity as demonstrated by gene transfer experiments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** 13181-13186.
- Fassnacht M, Arlt W, Bancos I, Dralle H, Newell-Price J, Sahdev A, Tabarin A, Terzolo M, Tsagarakis S & Dekkers OM 2016 Management of adrenal incidentalomas: European Society of

Endocrinology Clinical Practice Guideline in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur J Endocrinol* **175** G1-G34.

Fassnacht M, Berruti A, Baudin E, Demeure MJ, Gilbert J, Haak H, Kroiss M, Quinn DI, Hesseltine E, Ronchi CL, et al. 2015 Linsitinib (OSI-906) versus placebo for patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: a double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol* **16** 426-435.

Fassnacht M, Hahner S, Polat B, Koschker AC, Kenn W, Flentje M & Allolio B 2006 Efficacy of adjuvant radiotherapy of the tumor bed on local recurrence of adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **91** 4501-4504.

Fassnacht M, Johanssen S, Fenske W, Weismann D, Agha A, Beuschlein F, Fuhrer D, Jurowich C, Quinkler M, Petersenn S, et al. 2010 Improved survival in patients with stage II adrenocortical carcinoma followed up prospectively by specialized centers. *J Clin Endocrinol Metab* **95** 4925-4932.

Fassnacht M, Johanssen S, Quinkler M, Bucsky P, Willenberg HS, Beuschlein F, Terzolo M, Mueller HH, Hahner S, Allolio B, et al. 2009 Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma: proposal for a Revised TNM Classification. *Cancer* **115** 243-250.

Fassnacht M, Kroiss M & Allolio B 2013 Update in adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **98** 4551-4564.

Fassnacht M, Terzolo M, Allolio B, Baudin E, Haak H, Berruti A, Welin S, Schade-Brittinger C, Lacroix A, Jarzab B, et al. 2012 Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma. *N Engl J Med* **366** 2189-2197.

Ferry KV, Hamilton TC & Johnson SW 2000 Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: role of ERCC1-XPF. *Biochem Pharmacol* **60** 1305-1313.

Filipski KK, Mathijssen RH, Mikkelsen TS, Schinkel AH & Sparreboom A 2009 Contribution of organic cation transporter 2 (OCT2) to cisplatin-induced nephrotoxicity. *Clin Pharmacol Ther* **86** 396-402.

Fraenkel M, Gueorguiev M, Barak D, Salmon A, Grossman AB & Gross DJ 2013 Everolimus therapy for progressive adrenocortical cancer. *Endocrine* **44** 187-192.

Friboulet L, Olausson KA, Pignon JP, Shepherd FA, Tsao MS, Graziano S, Kratzke R, Douillard JY, Seymour L, Pirker R, et al. 2013a ERCC1 isoform expression and DNA repair in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **368** 1101-1110.

Friboulet L, Postel-Vinay S, Sourisseau T, Adam J, Stoclin A, Ponsonnailles F, Dorvault N, Commo F, Saulnier P, Salome-Desmoulez S, et al. 2013b ERCC1 function in nuclear excision and interstrand crosslink repair pathways is mediated exclusively by the ERCC1-202 isoform. *Cell Cycle* **12** 3298-3306.

Friedberg EC 2001 How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer* **1** 22-33.

Gaillard PH & Wood RD 2001 Activity of individual ERCC1 and XPF subunits in DNA nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res* **29** 872-879.

Gautam A & Bepler G 2006 Suppression of lung tumor formation by the regulatory subunit of ribonucleotide reductase. *Cancer Res* **66** 6497-6502.

Gautam A, Li ZR & Bepko G 2003 RRM1-induced metastasis suppression through PTEN-regulated pathways. *Oncogene* **22** 2135-2142.

Gazdar AF 2007 DNA repair and survival in lung cancer--the two faces of Janus. *N Engl J Med* **356** 771-773.

Go RS & Adjei AA 1999 Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J Clin Oncol* **17** 409-422.

Gomez-Roca C, Raynaud CM, Penault-Llorca F, Mercier O, Commo F, Morat L, Sabatier L, Dartevelle P, Taranchon E, Besse B, et al. 2009 Differential expression of biomarkers in primary non-small cell lung cancer and metastatic sites. *J Thorac Oncol* **4** 1212-1220.

Gonzalez RJ, Tamm EP, Ng C, Phan AT, Vassilopoulou-Sellin R, Perrier ND, Evans DB & Lee JE 2007 Response to mitotane predicts outcome in patients with recurrent adrenal cortical carcinoma. *Surgery* **142** 867-875; discussion 867-875.

Gross DJ, Munter G, Bitan M, Siegal T, Gabizon A, Weitzen R, Merimsky O, Ackerstein A, Salmon A, Sella A, et al. 2006 The role of imatinib mesylate (Glivec) for treatment of patients with malignant endocrine tumors positive for c-kit or PDGF-R. *Endocr Relat Cancer* **13** 535-540.

Grubbs EG, Callender GG, Xing Y, Perrier ND, Evans DB, Phan AT & Lee JE 2010 Recurrence of adrenal cortical carcinoma following resection: surgery alone can achieve results equal to surgery plus mitotane. *Ann Surg Oncol* **17** 263-270.

Habra MA, Ejaz S, Feng L, Das P, Deniz F, Grubbs EG, Phan A, Waguespack SG, Ayala-Ramirez M, Jimenez C, et al. 2013 A retrospective cohort analysis of the efficacy of adjuvant radiotherapy after primary surgical resection in patients with adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **98** 192-197.

Hahner S & Fassnacht M 2005 Mitotane for adrenocortical carcinoma treatment. *Curr Opin Investig Drugs* **6** 386-394.

Hahner S, Kreissl MC, Fassnacht M, Haenscheid H, Knoedler P, Lang K, Buck AK, Reiners C, Allolio B & Schirbel A 2012 [131I]iodometomidate for targeted radionuclide therapy of advanced adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **97** 914-922.

Hahner S, Stuermer A, Kreissl M, Reiners C, Fassnacht M, Haenscheid H, Beuschlein F, Zink M, Lang K, Allolio B, et al. 2008 [123 I]iodometomidate for molecular imaging of adrenocortical cytochrome P450 family 11B enzymes. *J Clin Endocrinol Metab* **93** 2358-2365.

Henning JEK, Deutschbein T, Altieri B, Steinhauer S, Kircher S, Sbiera S, Wild V, Schlotelburg W, Kroiss M, Perotti P, et al. 2017 Gemcitabine-Based Chemotherapy in Adrenocortical Carcinoma: A Multicenter Study of Efficacy and Predictive Factors. *J Clin Endocrinol Metab* **102** 4323-4332.

Henry I, Jeanpierre M, Couillin P, Barichard F, Serre JL, Journel H, Lamouroux A, Turleau C, de Grouchy J & Junien C 1989 Molecular definition of the 11p15.5 region involved in Beckwith-Wiedemann syndrome and probably in predisposition to adrenocortical carcinoma. *Hum Genet* **81** 273-277.

Hermesen IG, Fassnacht M, Terzolo M, Houterman S, den Hartigh J, Leboulleux S, Daffara F, Berruti A, Chadarevian R, Schlumberger M, et al. 2011 Plasma concentrations of o,p'DDD, o,p'DDA, and o,p'DDE as predictors of tumor response to mitotane in adrenocortical carcinoma: results of a retrospective ENS@T multicenter study. *J Clin Endocrinol Metab* **96** 1844-1851.

Hescot S, Slama A, Lombes A, Paci A, Remy H, Leboulleux S, Chadarevian R, Trabado S, Amazit L, Young J, et al. 2013 Mitotane alters mitochondrial respiratory chain activity by inducing cytochrome c oxidase defect in human adrenocortical cells. *Endocr Relat Cancer* **20** 371-381.

Ho J, Turkbey B, Edgerly M, Alimchandani M, Quezado M, Camphausen K, Fojo T & Kaushal A 2013 Role of radiotherapy in adrenocortical carcinoma. *Cancer J* **19** 288-294.

Huang ZL, Cao X, Luo RZ, Chen YF, Zhu LC & Wen Z 2016 Analysis of ERCC1, BRCA1, RRM1 and TUBB3 as predictors of prognosis in patients with non-small cell lung cancer who received cisplatin-based adjuvant chemotherapy: A prospective study. *Oncol Lett* **11** 299-305.

Jordheim LP, Seve P, Tredan O & Dumontet C 2011 The ribonucleotide reductase large subunit (RRM1) as a predictive factor in patients with cancer. *Lancet Oncol* **12** 693-702.

Kang CH, Jang BG, Kim DW, Chung DH, Kim YT, Jheon S, Sung SW & Kim JH 2009 Differences in the expression profiles of excision repair crosscomplementation group 1, x-ray repair crosscomplementation group 1, and betaIII-tubulin between primary non-small cell lung cancer and metastatic lymph nodes and the significance in mid-term survival. *J Thorac Oncol* **4** 1307-1312.

Kerkhofs TM, Ettaieb MH, Hermesen IG & Haak HR 2015 Developing treatment for adrenocortical carcinoma. *Endocr Relat Cancer*.

Kerkhofs TM, Verhoeven RH, Bonjer HJ, van Dijkum EJ, Vriens MR, De Vries J, Van Eijck CH, Bonsing BA, Van de Poll-Franse LV, Haak HR, et al. 2013a Surgery for adrenocortical carcinoma in The Netherlands: analysis of the national cancer registry data. *Eur J Endocrinol* **169** 83-89.

Kerkhofs TM, Verhoeven RH, Van der Zwan JM, Dieleman J, Kerstens MN, Links TP, Van de Poll-Franse LV & Haak HR 2013b Adrenocortical carcinoma: a population-based study on incidence and survival in the Netherlands since 1993. *Eur J Cancer* **49** 2579-2586.

Koschker AC, Fassnacht M, Hahner S, Weismann D & Allolio B 2006 Adrenocortical carcinoma -- improving patient care by establishing new structures. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **114** 45-51.

Kraemer KH, Lee MM & Scotto J 1984 DNA repair protects against cutaneous and internal neoplasia: evidence from xeroderma pigmentosum. *Carcinogenesis* **5** 511-514.

Kroiss M, Deutschbein T, Schlotelburg W, Ronchi CL, Neu B, Muller HH, Quinkler M, Hahner S, Heidemeier A, Fassnacht M, et al. 2016 Salvage Treatment of Adrenocortical Carcinoma with Trofosfamide. *Horm Cancer* **7** 211-218.

Kroiss M, Quinkler M, Johanssen S, van Erp NP, Lankheet N, Pollinger A, Laubner K, Strasburger CJ, Hahner S, Muller HH, et al. 2012 Sunitinib in refractory adrenocortical carcinoma: a phase II, single-arm, open-label trial. *J Clin Endocrinol Metab* **97** 3495-3503.

Lagace TA & Ridgway ND 2005a Induction of apoptosis by lipophilic activators of CTP:phosphocholine cytidyltransferase alpha (CCTalpha). *Biochem J* **392** 449-456.

Lagace TA & Ridgway ND 2005b The rate-limiting enzyme in phosphatidylcholine synthesis regulates proliferation of the nucleoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **16** 1120-1130.

Lee KB, Parker RJ, Bohr V, Cornelison T & Reed E 1993 Cisplatin sensitivity/resistance in UV repair-deficient Chinese hamster ovary cells of complementation groups 1 and 3. *Carcinogenesis* **14** 2177-2180.

Lee SM, Falzon M, Blackhall F, Spicer J, Nicolson M, Chaudhuri A, Middleton G, Ahmed S, Hicks J, Crosse B, et al. 2017 Randomized Prospective Biomarker Trial of ERCC1 for Comparing Platinum

and Nonplatinum Therapy in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: ERCC1 Trial (ET). *J Clin Oncol* **35** 402-411.

Lerario AM, Worden FP, Ramm CA, Hesseltine EA, Stadler WM, Else T, Shah MH, Agamah E, Rao K & Hammer GD 2014 The combination of insulin-like growth factor receptor 1 (IGF1R) antibody cixutumumab and mitotane as a first-line therapy for patients with recurrent/metastatic adrenocortical carcinoma: a multi-institutional NCI-sponsored trial. *Horm Cancer* **5** 232-239.

Li FP, Fraumeni JF, Jr., Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA & Miller RW 1988 A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res* **48** 5358-5362.

Libe R 2015 Adrenocortical carcinoma (ACC): diagnosis, prognosis, and treatment. *Front Cell Dev Biol* **3** 45.

Libe R, Borget I, Ronchi CL, Zaggia B, Kroiss M, Kerkhofs T, Bertherat J, Volante M, Quinkler M, Chabre O, et al. 2015 Prognostic factors in stage III-IV adrenocortical carcinomas (ACC): an European Network for the Study of Adrenal Tumor (ENSAT) study. *Ann Oncol* **26** 2119-2125.

Linkous AG, Yazlovitskaya EM & Hallahan DE 2010 Cytosolic phospholipase A2 and lysophospholipids in tumor angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* **102** 1398-1412.

Lombardi CP, Raffaelli M, De Crea C, Boniardi M, De Toma G, Marzano LA, Miccoli P, Minni F, Morino M, Pelizzo MR, et al. 2012 Open versus endoscopic adrenalectomy in the treatment of localized (stage I/II) adrenocortical carcinoma: results of a multiinstitutional Italian survey. *Surgery* **152** 1158-1164.

Ma D, Baruch D, Shu Y, Yuan K, Sun Z, Ma K, Hoang T, Fu W, Min L, Lan ZS, et al. 2012 Using protein microarray technology to screen anti-ERCC1 monoclonal antibodies for specificity and applications in pathology. *BMC Biotechnol* **12** 88.

Malandrino P, Al Ghuzlan A, Castaing M, Young J, Caillou B, Travagli JP, Elias D, de Baere T, Dromain C, Paci A, et al. 2010 Prognostic markers of survival after combined mitotane- and platinum-based chemotherapy in metastatic adrenocortical carcinoma. *Endocr Relat Cancer* **17** 797-807.

Malotki K, Popat S, Deeks JJ, Riley RD, Nicholson AG & Billingham L 2016 Problems of variable biomarker evaluation in stratified medicine research--A case study of ERCC1 in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* **92** 1-7.

Matsubara J, Nishina T, Yamada Y, Moriwaki T, Shimoda T, Kajiwarra T, Nakajima TE, Kato K, Hamaguchi T, Shimada Y, et al. 2008 Impacts of excision repair cross-complementing gene 1 (ERCC1), dihydropyrimidine dehydrogenase, and epidermal growth factor receptor on the outcomes of patients with advanced gastric cancer. *Br J Cancer* **98** 832-839.

Mendoza J, Martinez J, Hernandez C, Perez-Montiel D, Castro C, Fabian-Morales E, Santibanez M, Gonzalez-Barrios R, Diaz-Chavez J, Andonegui MA, et al. 2013 Association between ERCC1 and XPA expression and polymorphisms and the response to cisplatin in testicular germ cell tumours. *Br J Cancer* **109** 68-75.

Miller BS, Gauger PG, Hammer GD, Giordano TJ & Doherty GM 2010 Proposal for modification of the ENSAT staging system for adrenocortical carcinoma using tumor grade. *Langenbecks Arch Surg* **395** 955-961.

Naing A, Lorusso P, Fu S, Hong D, Chen HX, Doyle LA, Phan AT, Habra MA & Kurzrock R 2013 Insulin growth factor receptor (IGF-1R) antibody cixutumumab combined with the mTOR inhibitor temsirolimus in patients with metastatic adrenocortical carcinoma. *Br J Cancer* **108** 826-830.

Niedernhofer LJ, Bhagwat N & Wood RD 2007 ERCC1 and non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **356** 2538-2540; author reply 2540-2531.

Northwood IC, Tong AH, Crawford B, Drobnies AE & Cornell RB 1999 Shuttling of CTP:Phosphocholine cytidyltransferase between the nucleus and endoplasmic reticulum accompanies the wave of phosphatidylcholine synthesis during the G(0) --> G(1) transition. *J Biol Chem* **274** 26240-26248.

Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, Andre F, Haddad V, Taranchon E, Filipits M, Pirker R, Popper HH, et al. 2006 DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* **355** 983-991.

Olaussen KA & Postel-Vinay S 2016 Predictors of chemotherapy efficacy in non-small-cell lung cancer: a challenging landscape. *Ann Oncol* **27** 2004-2016.

Olaussen KA & Soria JC 2010 Validation of ERCC1-XPF immunodetection--letter. *Cancer Res* **70** 3851-3852; author reply 3852.

Park HS, Roman SA & Sosa JA 2009 Outcomes from 3144 adrenalectomies in the United States: which matters more, surgeon volume or specialty? *Arch Surg* **144** 1060-1067.

Planting AS, van der Burg ME, de Boer-Dennert M, Stoter G & Verweij J 1993 Phase I/II study of a short course of weekly cisplatin in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer* **68** 789-792.

Polat B, Fassnacht M, Pfreundner L, Guckenberger M, Bratengeier K, Johanssen S, Kenn W, Hahner S, Allolio B & Flentje M 2009 Radiotherapy in adrenocortical carcinoma. *Cancer* **115** 2816-2823.

Postel-Vinay S & Soria JC 2017 ERCC1 as Predictor of Platinum Benefit in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* **35** 384-386.

Quinkler M, Hahner S, Wortmann S, Johanssen S, Adam P, Ritter C, Strasburger C, Allolio B & Fassnacht M 2008 Treatment of advanced adrenocortical carcinoma with erlotinib plus gemcitabine. *J Clin Endocrinol Metab* **93** 2057-2062.

Reed E 1998 Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev* **24** 331-344.

Reed E 2006 ERCC1 measurements in clinical oncology. *N Engl J Med* **355** 1054-1055.

Reibetanz J, Jurowich C, Erdogan I, Nies C, Rayes N, Dralle H, Behrend M, Allolio B, Fassnacht M & German ACCsg 2012 Impact of lymphadenectomy on the oncologic outcome of patients with adrenocortical carcinoma. *Ann Surg* **255** 363-369.

Reynolds C, Obasaju C, Schell MJ, Li X, Zheng Z, Boulware D, Caton JR, Demarco LC, O'Rourke MA, Shaw Wright G, et al. 2009 Randomized phase III trial of gemcitabine-based chemotherapy with in situ RRM1 and ERCC1 protein levels for response prediction in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **27** 5808-5815.

Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, DeLacerda L, Rabin M, Cadwell C, Sampaio G, et al. 2001 An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** 9330-9335.

Ripley RT, Kemp CD, Davis JL, Langan RC, Royal RE, Libutti SK, Steinberg SM, Wood BJ, Kammula US, Fojo T, et al. 2011 Liver resection and ablation for metastatic adrenocortical carcinoma. *Ann Surg Oncol* **18** 1972-1979.

Roca E, Berruti A, Sbiera S, Rapa I, Oneda E, Sperone P, Ronchi CL, Ferrari L, Grisanti S, Germano A, et al. 2017 Topoisomerase 2alpha and thymidylate synthase expression in adrenocortical cancer. *Endocr Relat Cancer* **24** 299-307.

Ronchi CL, Kroiss M, Sbiera S, Deutschbein T & Fassnacht M 2014 EJE prize 2014: current and evolving treatment options in adrenocortical carcinoma: where do we stand and where do we want to go? *Eur J Endocrinol* **171** R1-R11.

Ronchi CL, Sbiera S, Kraus L, Wortmann S, Johanssen S, Adam P, Willenberg HS, Hahner S, Allolio B & Fassnacht M 2009 Expression of excision repair cross complementing group 1 and prognosis in adrenocortical carcinoma patients treated with platinum-based chemotherapy. *Endocr Relat Cancer* **16** 907-918.

Rosell R, Danenberg KD, Alberola V, Bepler G, Sanchez JJ, Camps C, Provencio M, Isla D, Taron M, Diz P, et al. 2004 Ribonucleotide reductase messenger RNA expression and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* **10** 1318-1325.

Sabolch A, Feng M, Griffith K, Hammer G, Doherty G & Ben-Josef E 2011 Adjuvant and definitive radiotherapy for adrenocortical carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **80** 1477-1484.

Sancar A & Tang MS 1993 Nucleotide excision repair. *Photochem Photobiol* **57** 905-921.

Sbiera S, Leich E, Liebisch G, Sbiera I, Schirbel A, Wiemer L, Matysik S, Eckhardt C, Gardill F, Gehl A, et al. 2015 Mitotane inhibits Sterol-O-Acyl Transferase 1 triggering lipid-mediated endoplasmic reticulum stress and apoptosis in adrenocortical carcinoma cells. *Endocrinology* en20151367.

Sbiera S, Schull S, Assie G, Voelker HU, Kraus L, Beyer M, Ragazzon B, Beuschlein F, Willenberg HS, Hahner S, et al. 2010 High diagnostic and prognostic value of steroidogenic factor-1 expression in adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **95** E161-171.

Schneider JG, Farhadfar N, Sivapiragasam A, Geller M, Islam S & Selbs E 2014 Commercial laboratory testing of excision repair cross-complementation group 1 expression in non-small cell lung cancer. *Oncologist* **19** 459-465.

Schteingart DE, Doherty GM, Gauger PG, Giordano TJ, Hammer GD, Korobkin M & Worden FP 2005 Management of patients with adrenal cancer: recommendations of an international consensus conference. *Endocr Relat Cancer* **12** 667-680.

Selvakumaran M, Pisarcik DA, Bao R, Yeung AT & Hamilton TC 2003 Enhanced cisplatin cytotoxicity by disturbing the nucleotide excision repair pathway in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* **63** 1311-1316.

Smith DH, Fiehn AM, Fogh L, Christensen IJ, Hansen TP, Stenvang J, Nielsen HJ, Nielsen KV, Hasselby JP, Brunner N, et al. 2014 Measuring ERCC1 protein expression in cancer specimens: validation of a novel antibody. *Sci Rep* **4** 4313.

Soga H, Takenaka A, Ooba T, Nakano Y, Miyake H, Takeda M, Tanaka K, Hara I & Fujisawa M 2009 A twelve-year experience with adrenal cortical carcinoma in a single institution: long-term survival after surgical treatment and transcatheter arterial embolization. *Urol Int* **82** 222-226.

Soon PS, Gill AJ, Benn DE, Clarkson A, Robinson BG, McDonald KL & Sidhu SB 2009 Microarray gene expression and immunohistochemistry analyses of adrenocortical tumors identify IGF2 and Ki-67 as useful in differentiating carcinomas from adenomas. *Endocr Relat Cancer* **16** 573-583.

Sperone P, Ferrero A, Daffara F, Priola A, Zaggia B, Volante M, Santini D, Vincenzi B, Badalamenti G, Intrivici C, et al. 2010 Gemcitabine plus metronomic 5-fluorouracil or capecitabine as a second-

/third-line chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma: a multicenter phase II study. *Endocr Relat Cancer* **17** 445-453.

Strippoli A, Rossi S, Martini M, Basso M, D'Argento E, Schinzari G, Barile R, Cassano A & Barone C 2016 ERCC1 expression affects outcome in metastatic pancreatic carcinoma treated with FOLFIRINOX: A single institution analysis. *Oncotarget*.

Taillade L, Penault-Llorca F, Boulet T, Fouret P, Michiels S, Taranchon E, Mountzios G, Validire P, Domont J, Girard P, et al. 2007 Immunohistochemical expression of biomarkers: a comparative study between diagnostic bronchial biopsies and surgical specimens of non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* **18** 1043-1050.

Tantraworasin A, Saeteng S, Lertprasertsuke N, Arayawudhikul N, Kasemsarn C & Patumanond J 2013 The prognostic value of ERCC1 and RRM1 gene expression in completely resected non-small cell lung cancer: tumor recurrence and overall survival. *Cancer Manag Res* **5** 327-336.

Terzolo M, Angeli A, Fassnacht M, Daffara F, Tauchmanova L, Conton PA, Rossetto R, Buci L, Sperone P, Grossrubatscher E, et al. 2007 Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma. *N Engl J Med* **356** 2372-2380.

Therasse P, Eisenhauer EA & Verweij J 2006 RECIST revisited: a review of validation studies on tumour assessment. *Eur J Cancer* **42** 1031-1039.

Tian Y, Zhou R, Rehg JE & Jackowski S 2007 Role of phosphocholine cytidyltransferase alpha in lung development. *Mol Cell Biol* **27** 975-982.

Tripsianes K, Folkers G, Ab E, Das D, Odijk H, Jaspers NG, Hoeijmakers JH, Kaptein R & Boelens R 2005 The structure of the human ERCC1/XPF interaction domains reveals a complementary role for the two proteins in nucleotide excision repair. *Structure* **13** 1849-1858.

Tronchere H, Record M, Terce F & Chap H 1994 Phosphatidylcholine cycle and regulation of phosphatidylcholine biosynthesis by enzyme translocation. *Biochim Biophys Acta* **1212** 137-151.

Ulker M, Duman BB, Sahin B & Gumurdulu D 2015 ERCC1 and RRM1 as a predictive parameter for non-small cell lung, ovarian or pancreas cancer treated with cisplatin and/or gemcitabine. *Contemp Oncol (Pozn)* **19** 207-213.

Urup T, Pawlak WZ, Petersen PM, Pappot H, Rorth M & Daugaard G 2013 Treatment with docetaxel and cisplatin in advanced adrenocortical carcinoma, a phase II study. *Br J Cancer* **108** 1994-1997.

Vaezi AE, Bepler G, Bhagwat NR, Malysa A, Rubatt JM, Chen W, Hood BL, Conrads TP, Wang L, Kemp CE, et al. 2014 Choline phosphate cytidyltransferase-alpha is a novel antigen detected by the anti-ERCC1 antibody 8F1 with biomarker value in patients with lung and head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer* **120** 1898-1907.

Varghese J & Habra MA 2017 Update on adrenocortical carcinoma management and future directions. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **24** 208-214.

Varley JM, McGown G, Thorncroft M, James LA, Margison GP, Forster G, Evans DG, Harris M, Kelsey AM & Birch JM 1999 Are there low-penetrance TP53 Alleles? evidence from childhood adrenocortical tumors. *Am J Hum Genet* **65** 995-1006.

Venkatesh S, Hickey RC, Sellin RV, Fernandez JF & Samaan NA 1989 Adrenal cortical carcinoma. *Cancer* **64** 765-769.

- Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB, Latronico AC, Campos Carneiro P, Alves VA, Zerbini MC, Liberman B, Carlos Gomes G & Kirschner MA 2000 Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. *Cancer* **88** 711-736.
- Wang J, Lohman GJ & Stubbe J 2007 Enhanced subunit interactions with gemcitabine-5'-diphosphate inhibit ribonucleotide reductases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** 14324-14329.
- Wang L, Magdaleno S, Tabas I & Jackowski S 2005 Early embryonic lethality in mice with targeted deletion of the CTP:phosphocholine cytidyltransferase alpha gene (Pcvt1a). *Mol Cell Biol* **25** 3357-3363.
- Wang L, Wei J, Qian X, Yin H, Zhao Y, Yu L, Wang T & Liu B 2008 ERCC1 and BRCA1 mRNA expression levels in metastatic malignant effusions is associated with chemosensitivity to cisplatin and/or docetaxel. *BMC Cancer* **8** 97.
- Weiss LM 1984 Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol* **8** 163-169.
- Welsh C, Day R, McGurk C, Masters JR, Wood RD & Koberle B 2004 Reduced levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA repair proteins in testis tumor cell lines. *Int J Cancer* **110** 352-361.
- Wislez M, Barlesi F, Besse B, Mazieres J, Merle P, Cadranel J, Audigier-Valette C, Moro-Sibilot D, Gautier-Felizot L, Goupil F, et al. 2014 Customized adjuvant phase II trial in patients with non-small-cell lung cancer: IFCT-0801 TASTE. *J Clin Oncol* **32** 1256-1261.
- Wortmann S, Quinkler M, Ritter C, Kroiss M, Johanssen S, Hahner S, Allolio B & Fassnacht M 2010 Bevacizumab plus capecitabine as a salvage therapy in advanced adrenocortical carcinoma. *Eur J Endocrinol* **162** 349-356.
- Zheng S, Cherniack AD, Dewal N, Moffitt RA, Danilova L, Murray BA, Lerario AM, Else T, Knijnenburg TA, Ciriello G, et al. 2016 Comprehensive Pan-Genomic Characterization of Adrenocortical Carcinoma. *Cancer Cell* **30** 363.
- Zheng Z, Chen T, Li X, Haura E, Sharma A & Bepler G 2007 DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer. *N Engl J Med* **356** 800-808.

Danksagung

Ich möchte mich bei einigen Personen, die besonders zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlich bedanken.

Mein größter Dank gebührt Priv.-Doz. Dr. med. Cristina L. Ronchi. Ich danke Dir für Deine wunderbare Betreuung. Fördernd und fordernd, motiviert, engagiert, zielstrebig, erfahren und kompetent hast Du mich in und durch die Welt der medizinischen Forschung geführt. Vielen Dank zudem für die Hilfe bei der statistischen Auswertung. Viele andere Studenten können sich eine solch gute Betreuung nur wünschen. Danke.

Bei Professor Dr. Martin Fassnacht für die Möglichkeit, diese Arbeit zu verfassen. Ihr bemerkenswerter Führungsstil hat eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre geschaffen.

Sonja Steinhauer möchte ich ganz herzlich danken für die Hilfe im Labor und ganz besonders für das Mitauswerten der Schnitte.

Danke an das Team der Endokrinologie für die nette Arbeitsatmosphäre. Besonders möchte ich mich herzlich bedanken bei Martina Zink für die technische Hilfe im Labor, bei Katja Marienfeld für die Einarbeitung und bei Michaela Haaf für die Koordination des ENSAT-Registers sowie die Hilfe bei der Bewältigung der klinischen Daten.

Herr Peter Wermke; Danke für die Hilfe bei Formatierungsfragen aller Art.

Danke Elena Laufs für die hilfreichen Korrekturen.

Bei meinen Eltern, Gertrud und Manfred Laufs, für die bedingungslose Unterstützung jeglicher Art während des Studiums und darüber hinaus.