

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg**

Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Frantz

**Wirkung einer Gemcitabin-basierten Chemotherapie beim
Nebennierenrindenzarzinom und Untersuchung möglicher prädiktiver und
prognostischer Marker**

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

**vorgelegt von
Judith Esther Kristin Henning
aus Hannover**

Würzburg, Dezember 2019



Referent: Prof. Dr. med. Martin Fassnacht-Capeller

Koreferent: Prof. Dr. med. Nicolas Schlegel

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 10.09.2020

Die Promovendin ist Ärztin

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	0
1 Einleitung	1
1.1 <i>Nebennierenrindenzarzinom</i>	1
1.1.1 Übersicht, Pathogenese und klinisches Erscheinungsbild	1
1.1.2 Diagnostik und Einteilung	2
1.1.3 Prognostische Faktoren	6
1.1.4 Therapie	7
1.2 <i>Gemcitabin</i>	11
1.2.1 Überblick	11
1.2.2 Transport und Stoffwechsel	11
1.2.3 Wirksamkeit und Toxizität von Gemcitabin im ACC	14
1.2.4 Prädiktive Marker für die Wirkung von Gemcitabin	15
1.3 <i>human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 (hENT1)</i>	15
1.3.1 Aufbau und Funktion	15
1.3.2 Regulierung	16
1.3.3 hENT1 als prognostischer Marker	17
1.3.4 hENT1 als prädiktiver Marker bei Gemcitabin-Therapie	17
1.4 <i>Ribonukleotidreduktase M1 (RRM1)</i>	20
1.4.1 Aufbau und Funktion	20
1.4.2 RRM1 als prognostischer Faktor	21
1.4.3 RRM1 als prädiktiver Marker bei Gemcitabin-Therapie	22
1.5 <i>hENT1 und RRM1 in Kombination</i>	23
1.6 <i>Ziele der Studie</i>	24
2 Material und Methoden	25
2.1 <i>Patienten und Gewebe</i>	25
2.2 <i>Verbrauchsmaterial</i>	30
2.2.1 Reagenzien, Verbrauchsmaterial und Kits	30
2.3 <i>Methoden</i>	31
2.3.1 RNA-Isolation	31
2.3.2 cDNA-Umschreibung	31

2.3.3	qRT-PCR	32
2.3.4	Immunhistochemie	34
2.3.5	Statistische Analyse	37
3	Ergebnisse	38
3.1	<i>Wirksamkeit der Gemcitabin-basierten Therapie</i>	38
3.2	<i>Toxizität der Gemcitabin-basierten Therapie</i>	39
3.3	<i>hENT1 und RRM1 mRNA-Expression in adrenokortikalen Geweben und ihr Zusammenhang zu klinischen Ergebnissen</i>	41
3.4	<i>hENT1 und RRM1 Proteinexpression in unterschiedlichen Nebennierenrindengeweben</i>	42
3.4.1	Zytoplasmatische und membranöse hENT1-Färbung	43
3.4.2	RRM1-Färbung	44
3.5	<i>Korrelationen zwischen Proteinexpression von hENT1, RRM1 und klinischen Parametern</i>	45
3.6	<i>hENT1 und RRM1 Proteinexpression: Vorhersagewert für eine Gemcitabin-basierte Therapie</i>	46
4	Diskussion	49
4.1	<i>Gemcitabin beim fortgeschrittenen adrenokortikalen Karzinom</i>	49
4.1.1	Prädiktive Faktoren bei Gemcitabin-Therapie	54
4.2	<i>hENT1</i>	56
4.3	<i>RRM1</i>	59
4.4	<i>Schwächen und Stärken der Studie</i>	63
4.5	<i>Schlussfolgerungen und Ausblick</i>	65
5	Zusammenfassung	67
6	Abbildungsverzeichnis	69
7	Literaturverzeichnis	72
	Danksagung	i
	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
ACA	Adrenocortical Adenoma = Nebennierenrindenadenom
ACC	Adrenocortical Carcinoma = Nebennierenrindencarcinom
ACT	Adrenocortical Tumor = Nebennierenrindentumor
CDA	Cytidindesaminase
CNT	Concentrative Nucleoside Transporter
CR	complete response = komplette Remission
CT	Cycle Threshold = Schwellenwert bei qRT-PCR
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
DAB	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
dCK	Desoxycytidinkinase
dCTP	Desoxycytidin-Triphosphat
dFdC	2',2'-Difluoro-Desoxycytidin = Gemcitabine
dFdCMP	2',2'-Difluoro-Desoxycytidin-Monophosphat
dFdCDP	2',2'-Difluoro-Desoxycytidin-Diphosphat,
dFdCTP	2',2'-Difluoro-Desoxycytidin-Triphosphat,
dFdU	2',2'-Difluoro-Desoxyuridin,
dFdUMP	2',2'-Difluoro-Desoxyuridin-Monophosphat
DFS	Disease free survival
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNDP	Desoxyribonukleosid-Diphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
DZNeP	3-Deazaneplanocin A
EDP-M	Etoposid, Doxorubicin, Cisplatin und Mitotane
EGF	Epidermal Growth Factor
EMT	epidermal-mesenchymale Transition
ENT	Equilibrative Nucleoside Transporter

ENSAT	European Network for the Study of Adrenal Tumor
FIRM-ACT	First International Randomized Trial in Locally Advanced and Metastatic Adrenocortical Carcinoma Treatment
FFPE	Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes Gewebe
FFT	Fresh-Frozen-Tissue
Gem	Gemcitabin
hENT	human Equilibrative Nucleoside Transporter
hENT1c/m	zytoplasmatische/membranöse Immunfärbung von hENT1
hCNT	human Concentrative Nucleoside Transporter
HRP	Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase)
I3C	Indol-3-Carbinol
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
IGF-1R	Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor
IHC	Immunhistochemie
i.v.	intravenös
mENSAT	modifizierte Version der ENSAT-Tumorstadieneinteilung
mRNA	messenger-RNA
mTOR	mammalian target of rapamycin
NAG	normal adrenal gland = normale Nebenniere
NBMPR	Nitrobenzylthioinosine
NDP(s)	Nukleosid-Diphosphat(e)
nNN	normale Nebenniere
ns	nicht statistisch signifikant
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
OP(s)	Operation(en)
OR	objective response = partielle oder komplette Remission
OS	Overall Survival = Gesamtüberleben
Pat(s)	Patient(en)
PBS	Phosphat buffered saline

PD	progressive disease = Progress einer Tumorerkrankung
PDGFR-R	Platelet-derived growth factor receptor
PFS	progression-free survival
PKA/PKC	Proteinkinase A/C
PR	partial response = partielle Remission
qRT-PCR	quantitative Real-Time-Polymerase chain reaction, quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
R0-Resektion	Tumorentfernung im Gesunden mit mikroskopisch tumorfreen Rändern
RNA	ribonucleic acid, Ribonucleinsäure
rNDP	Ribonukleosid-Diphosphat
RR	Ribonukleotidreduktase
RRM1	Ribonukleotidreduktase Untereinheit M1
RRM2	Ribonukleotidreduktase Untereinheit M2
S-1	Kombinationsmedikament aus Tegafur, einem 5-FU-Prodrug mit 2 Modulatoren: 5-chloro-2,4-dihydroxypyridine und Kalium-Oxonate
SD	stable disease
Strepto(-M)	Streptozotocin (plus Mitotane)
TK	Tyrosinkinase
TS	Thymidylat-Synthase
UE	unerwünschtes Ereignis
VEGF(R)	Vascular Endothelial Growth Factor (Receptor)

1 Einleitung

1.1 Nebennierenrindenzarzinom

1.1.1 Übersicht, Pathogenese und klinisches Erscheinungsbild

Nebennierenrindentumore (Adrenocortical tumors = ACTs) unterteilen sich in häufige „gutartige“ Adenome (Adrenocortical Adenomas = ACAs) und seltene „bösartige“ Karzinome (Adrenocortical Carcinomas = ACCs). Im Folgenden wird es vor allem um maligne Tumore, also ACCs gehen.

Das ACC ist eine sehr seltene Erkrankung mit einer Inzidenz von 0,7 Neuerkrankungen pro eine Million Einwohner pro Jahr. Es kann in jedem Lebensalter auftreten, zeigt jedoch ein Erkrankungsgipfel im 5. Lebensjahrzehnt. Frauen sind mit rund 55% etwas häufiger betroffen als Männer (Golden et al. 2009; Kebebew et al. 2006; Kerkhofs et al. 2013).

Die 5-Jahres-Überlebensrate ist abhängig von dem Krebsstadium bei Diagnosestellung (siehe Diagnostik und Einteilung, Kapitel 1.1.2) und variiert zwischen 82% für das ENSAT-Stadium I und weniger als 15% für Stadium IV (Fassnacht et al. 2009).

Die genaue Tumorgenese des ACCs ist noch nicht zufriedenstellend geklärt (Fassnacht et al. 2013). In vielen Fällen spielen eine IGF2-Überexpression, TP-53 inaktivierende Mutationen und eine kontinuierliche Aktivierung des WNT/ β -catenin-Pathways eine wichtige Rolle (Ragazzon et al. 2010; Ribeiro und Latronico 2012; Simon und Hammer 2012). Mithilfe multizentrischer Studien wurden in den letzten Jahren weitere molekulare Alterationen gefunden, die mit der Pathogenese des ACCs verbunden werden, beispielsweise eine ZNFR3 Mutation oder Deletion (Assié et al. 2014).

Das klinische Erscheinungsbild des ACCs hängt unter anderem davon ab, ob und welche Hormone von ihm produziert werden. In bis zu 80% liegt eine aktive Hormonsekretion vor. Eine autonome Glukokortikoid-Produktion kann klinisch unauffällig sein oder sich in Form eines Cushing-Syndroms manifestieren. Sexualsteroid-Überproduktion kann unter anderem Virilisierung oder Gynäkomastie verursachen oder inapparent verlaufen.

Letzteres geschieht vor allem dann, wenn es sich um Östrogene bei der Frau bzw. Androgene beim Mann handelt. Die seltene Aldosteronproduktion präsentiert sich durch Hypokaliämie und Hypertonie. Hormonell inaktive ACCs können unspezifische Symptome wie Übelkeit, Schmerzen oder Obstipation verursachen, die durch die intraabdominelle Raumforderung hervorgerufen werden (Else et al. 2014; Fassnacht et al. 2013).

1.1.2 Diagnostik und Einteilung

Bei Raumforderungen im Bereich der Nebennierenloge ist differentialdiagnostisch neben ACTs auch an Tumore des Nebennierenmarks zu denken. Wird eine Raumforderung zufällig in einer Bildgebung entdeckt und hat noch keine Symptome verursacht, wird sie auch Inzidentalom genannt. Meist handelt es sich dabei um Adenome (80%), in 7% um Phäochromozytome oder in 5% um Nebennierenmetastasen beispielsweise von Bronchialkarzinomen. Nur 8% der Inzidentalome der Nebennieren sind ACCs (Fassnacht et al. 2016).

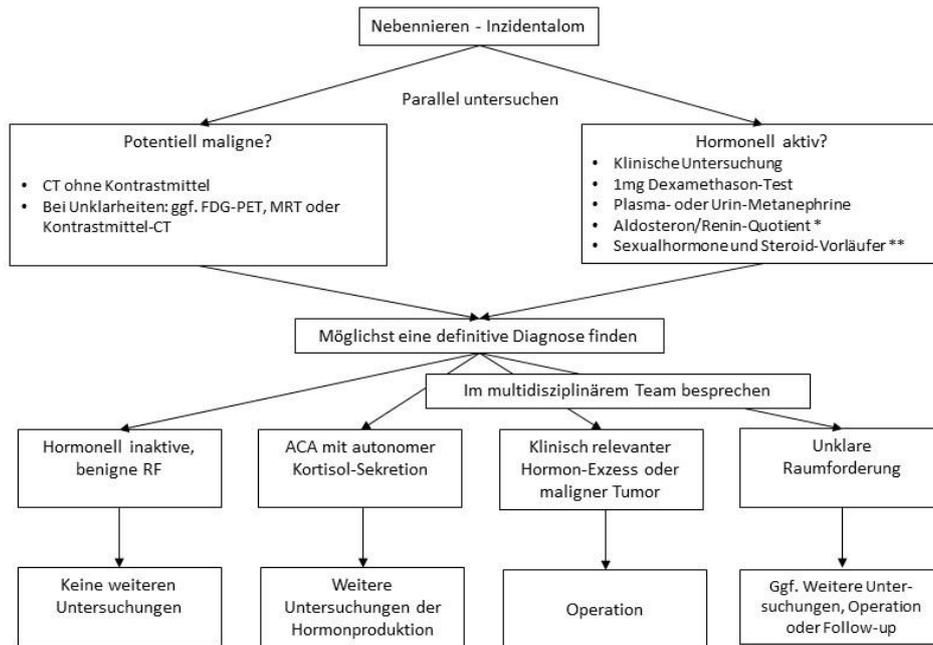
1.1.2.1 Diagnostische Abklärung

Die Diagnostik umfasst vor allem die Bildgebung und die Hormondiagnostik. Ein beispielhaftes Vorgehen im Falle eines Inzidentaloms bietet **Abbildung 1**.

Für eine möglichst genaue Darstellung der Raumforderung sollte eine Computertomographie (CT) des Abdomens ohne Kontrastmittel durchgeführt werden. Dabei liefern die gemessenen Hounsfield-Einheiten (HU) Anhalte auf mögliche Malignität (Grenzwert für benigne Raumforderungen ≤ 10 HU). Alternativ kann eine Magnetresonanztomographie (MRT) oder eine ^{18}F -Fluor-2-desoxy-D-glucose-Positronen-Emissions-Tomographie (FDG-PET) zur Unterscheidung zwischen malignen und benignen Raumforderungen behilflich sein (Fassnacht et al. 2016). Zusätzlich sollte eine CT des Thorax durchgeführt werden (Fassnacht et al. 2018). Die Tumorgroße kann einen

Anhalt auf mögliche Malignität geben (Rubin et al. 2016), da große Raumforderungen ab 6,5-11cm karzinomverdächtig sind (Aubert et al. 2002; Fassnacht et al. 2013).

Weitere bildgebende Verfahren sollten nur bei klinisch Metastasen-verdächtigen Läsionen angewandt werden (Fassnacht et al. 2018).



* Nur bei Patienten mit Hypertonie und/oder Hypokaliämie
 ** Nur bei Patienten mit klinischen oder aus der Bildgebung stammenden Hinweisen auf ein ACC

Abbildung 1: Diagnostisches Vorgehen bei einer Raumforderung im Bereich der Nebennierenloge für Patienten ohne Vorgeschichte eines extraadrenalen Malignoms. Abkürzungen: ACA: adrenokortikales Adenom, ACC: adrenokortikales Karzinom; Quelle: (nach Fassnacht et al. 2016)

Das European Network for the Study of Adrenal Tumors (ENSAT) empfiehlt neben der klinischen Untersuchung mit besonderem Augenmerk auf Zeichen für Steroid-Überexpression auch die Messung verschiedener Hormone und Metabolite (Dazu gehören der basale Kortisolwert, ACTH, Dihydro-Epi-Androstendion-Sulfat, 17-Hydroxyprogesteron, Androstendion, Testosteron, Östrogen und das freie Kortison im Urin sowie die Durchführung eines Dexamethason-Hemmtests. Im Falle von

Hypertension oder Hypokaliämie sollte außerdem der Aldosteron-Renin-Quotient bestimmt werden.) (Fassnacht et al. 2013; Fassnacht et al. 2016; Fassnacht et al. 2018). Neben der Identifizierung autonomer Hormon-Produktion muss auch ein Phäochromozytom ausgeschlossen werden (Fassnacht et al. 2018).

Eine Tumorbiopsie hat nur eine geringe diagnostische Sensitivität und kann in Einzelfällen komplikativ verlaufen, sodass sie nur in Ausnahmefällen durchgeführt wird (Fassnacht et al. 2018; Suman et al. 2017; Williams et al. 2014), beispielsweise wenn ein metastasiertes Stadium vorliegt, das nicht operiert werden soll oder ein histopathologischer Nachweis das Therapieregime verändern würde (Fassnacht et al. 2018).

Die Diagnose sollte in jedem Fall histopathologisch bestätigt werden (Fassnacht et al. 2018).

1.1.2.2 Differentialdiagnostik ACC versus ACA

Die Differenzierung zwischen ACC, ACA oder anderen Raumforderungen der Nebenniere sollte möglichst zum Zeitpunkt der Diagnose erfolgen (Fassnacht et al. 2016). Bei Inzidentalomen sollte initial eine Bildgebung und Hormondiagnostik (siehe Diagnostische Abklärung, Kapitel 1.1.2.1) erfolgen. Im Falle einer möglichen Malignität sollte ein multidisziplinäres Team entscheiden, ob der Tumor beobachtet oder operativ entfernt und histopathologisch untersucht werden muss (Fassnacht et al. 2016). Die histopathologische Bestimmung der Malignität von ACTs bleibt teilweise schwierig, weil es derzeit keinen validierten molekularen diagnostischen Marker gibt (Berruti et al. 2012a). Alle unklaren Fälle oder der Verdacht auf ein ACC sollte von einem Referenzpathologen mit Schwerpunkt Nebennieren begutachtet werden (Fassnacht et al. 2018). Das Standard-Scoring-System für die Unterscheidung von ACCs und ACAs ist der Weiss-Score bzw. der modifizierte Weiss-Score (Aubert et al. 2002; Fassnacht et al. 2018; Lau und Weiss 2009; Mihai 2015; Weiss 1984), der histopathologische Charakteristiken wie beispielsweise die Mitoserate bewertet. Der Schwellenwert für Malignität liegt bei 3 von 9 bzw. 7 Punkten (Aubert et al. 2002; Lau und Weiss 2009).

Einige Proteine sind in ACCs und ACAs unterschiedlich stark exprimiert und könnten einen Hinweis auf Malignität geben. Häufig wurde eine Überexpression des Insulin-like growth factors 2 (IGF-2) in ACCs im Vergleich zu ACAs beobachtet (Giordano et al. 2003; Kjellin et al. 2014).

Ein Beispiel für einen vielversprechenden Marker für Malignität ist die Untereinheit 2 der Ribonucleotid Reduktase (RRM2). Grolmusz et al. konnten bei 154 untersuchten ACTs eine signifikant höhere Proteinexpression von RRM2 bei ACCs (n=67) als bei ACAs (n=87) feststellen. Außerdem korrelierte sie mit dem Proliferationsmarker Ki67 (siehe Prognostische Faktoren, Kapitel 1.1.3) (Grolmusz et al. 2016).

1.1.2.3 Stadieneinteilung

Die Tumor-Stadieneinteilung für ACCs erfolgt seit 2009 nach der ENSAT-Klassifikation (European Network for the Study of Adrenal Tumor Classification 2008, **Tabelle 1**) und ersetzt seitdem die Einteilung nach UICC (Fassnacht et al. 2009; Fassnacht et al. 2018). Demnach werden Tumoren bis zu 5 cm Durchmesser dem Stadium I zugeordnet und über 5 cm dem Stadium II. Stadium III kann jede Tumorgöße enthalten, wenn einer der folgenden Punkte erfüllt ist: Tumorinvasion in umgebenes Gewebe (T3), angrenzende Organe oder Tumorthromben in der Vena cava inferior bzw. Vena renalis oder positive Lymphknoten. Beim Vorhandensein von Fernmetastasen liegt Stadium IV vor (Fassnacht et al. 2009). 45% der Patienten sind bei Diagnosestellung in den fortgeschrittenen Tumorstadien III und IV (Hoff und Berruti 2016).

Libé et al. schlugen 2015 eine modifizierte ENSAT-Klassifikation (mENSAT) vor, bei der Stadium III als T3-4N0M0 definiert ist und Stadium IV anhand der Anzahl von Metastasen betroffener Organe in IVa, IVb und IVc (2,3 und >3 betroffene Organe, wobei der Primarius auch als Organ gezählt wird) aufgeteilt wird (Libé et al. 2015) (vereinfacht in **Tabelle 1**).

Tabelle 1: Tumorstadieneinteilung des adrenokortikalen Karzinoms

Stadium	ENSAT 2008 (Fassnacht et al. 2009)	mENSAT (nach Libé et al. 2015))
I	T1, N0, M0	T1, N0, M0
II	T2, N0, M0	T2, N0, M0
III	T1-T2, N1, M0 T3-T4, N0-N1, M0	T3-T4, N0, M0
IV	T1-T4, N0-N1, M1	T1-T4, N1, M0-1 Oder T1-T4, N0, M1
Entwicklung der Einteilung des adrenokortikalen Karzinoms in Stadien Abkürzungen: T1: Tumoren ≤ 5cm, T2: Tumoren >5 cm, T3: Tumorerinfiltration in umgebendes Gewebe, T4: Tumorerinfiltration in angrenzende Organe oder Tumorthrombus in der Vena cava oder Vena renalis, N0: keine positiven Lymphknoten, N1: positive(r) Lymphknoten, M0: keine Fernmetastasen, M1: Vorhandensein von Fernmetastasen		

1.1.3 Prognostische Faktoren

Die wichtigsten klinischen prognostischen Marker sind das ENSAT-Tumorstadium und der Resektionsstatus (Erdogan et al. 2013; Fassnacht et al. 2010). Darüber hinaus sind vor allem der Ki67-Index, eine autonome Kortisol-Sekretion und der Allgemeinzustand des Patienten als prognostische Faktoren zu werten (Fassnacht et al. 2018).

Bei R0-resizierten Tumoren (Tumorentfernung im Gesunden mit mikroskopisch tumorfreien Rändern) hat das initiale ENSAT-Stadium jedoch nur eine limitierte Relevanz als prognostischer Marker (Beuschlein et al. 2015).

Der wichtigste molekulare prognostische Faktor beim ACC ist der Proliferationsmarker Ki67 (Beuschlein et al. 2015; Fassnacht et al. 2013). Beuschlein et al. schlugen daher eine Einteilung der ACCs nach Ki67 vor: Grad 1 bei Ki67 < 10%, Grad 2 bei Ki67 zwischen 10 und 19% und Grad 3 bei Ki67 ≥20% (Beuschlein et al. 2015). Ki67 sollte bei jedem ACT bestimmt werden (Fassnacht et al. 2018).

Bei fortgeschrittenen ACCs zeigten Libé et al. bei einer großen Kohorte (n = 444) zusätzlich zu dem Tumorstadium (in einer modifizierten Form, siehe Stadieneinteilung, Kapitel 1.1.2.3) und dem Resektionsstatus auch eine Korrelation zwischen dem Gesamtüberleben und dem Alter (>50 Jahre), dem Grading (Ki67 >20% und/oder Weiss >6) sowie dem Vorhandensein tumorinduzierter Symptome (inkl. symptomatischer Hormonüberexpression) (Libé et al. 2015).

Als negative Prognosefaktoren wurden eine positive Zellkern-Färbung von β -Catenin und die Kortisol-Überexpression beschrieben (Abiven et al. 2006; Berruti et al. 2014; Gaujoux et al. 2011).

1.1.4 Therapie

1.1.4.1 Chirurgie

Die komplette Tumoresektion ist der einzige kurative Ansatz in der Behandlung des ACCs (Hoff und Berruti 2016; Mihai 2015). Sie sollte möglichst durch Chirurgen mit Erfahrung in onkologischen und Nebennierenoperationen durchgeführt werden (Fassnacht et al. 2018). Die Rezidiv-Rate nach makroskopischer Tumorfreiheit liegt jedoch bei 30-70% (Fassnacht et al. 2010). Die Rezidive treten im Median nach elf Monaten auf (Erdogan et al. 2013). Intraabdominelle Metastasen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sollten reseziert werden, wenn eine komplette Entfernung möglich erscheint (Fassnacht et al. 2018). Bei einzelnen extraabdominellen Metastasen wird eine Entfernung des Nebennierentumors zusammen mit einer wachstumskontrollierenden Therapie empfohlen (Fassnacht et al. 2018).

Im Falle einer fortgeschrittenen Krankheit mit weit verbreiteten Metastasen bei Erstdiagnose sollte keine Nebennieren-Operation durchgeführt werden (Fassnacht et al. 2018).

1.1.4.2 Adjuvante Therapiemöglichkeiten

Mögliche adjuvante Therapieoptionen bei *in sano* resezierten ACC Patienten bestehen aus Mitotane (siehe Mitotane, Kapitel 1.1.4.4.1), Bestrahlung des Tumorbetts oder in ausgewählten Fällen zytotoxischen Mitteln bzw. einer Kombination aus Bestrahlung und zytotoxischen Mitteln (Fassnacht et al. 2013; Hoff und Berruti 2016).

1.1.4.3 Fortgeschrittenes Tumorleiden

Die systemischen Therapien in fortgeschrittenen ACC-Tumorstadien sind sehr limitiert. Das einzige zugelassene Medikament ist Mitotane (siehe Mitotane, Kapitel 1.1.4.4.1), welches allein oder in Kombination mit Standard-Chemotherapien genutzt werden kann (Fassnacht et al. 2012; Mihai 2015; Varghese und Habra 2017). Einen Überblick über verwendete Chemotherapeutika bietet **Tabelle 2** (Kapitel 1.1.4.4.3, Zweitlinientherapie). Symptomatische Metastasen können lokal palliativ bestrahlt werden (Fassnacht et al. 2018; Varghese und Habra 2017).

1.1.4.4 Systemische medikamentöse Therapie

1.1.4.4.1 Mitotane

Mitotane (o,p'-DDD (1-(o-chlorophenyl)-2, 2-dichloroethane) wirkt zytotoxisch auf die Nebennierenrinde und wird beim ACC sowohl in der adjuvanten Behandlung als auch bei fortgeschrittenem Tumorleiden empfohlen (Fassnacht et al. 2013; Kroiss et al. 2011). Es hemmt die Steroidproduktion und steigert die periphere Glukokortikoid-Clearance (Fassnacht et al. 2013; Mihai 2015; Terzolo et al. 2014b; Varghese und Habra 2017). Die Herabregulation der Steroidproduktion und die nebennierenspezifische Zytotoxizität von Mitotane erfolgt über die Hemmung der Sterol-O-Acyl-Transferase 1 (Sbiera et al. 2015). Mitotane ist ein CYP3A4-Induktor, was zu zahlreichen Wechselwirkungen mit gleichzeitig verabreichten Medikamenten führen kann (Kroiss et al. 2011; Takeshita et al. 2013; Terzolo et al. 2014b).

Mitotane wird beim fortgeschrittenen ACC bei Diagnosestellung ohne lokale Behandlungsmöglichkeit entweder als Monotherapie oder in Kombination mit EDP (siehe EDP-M, Kapitel 1.1.4.4.2) empfohlen (Fassnacht et al. 2018).

Da für eine effektive Wirksamkeit eine Plasmakonzentration von mindestens 14 mg/l und maximal 20 mg/l erreicht werden soll, ist ein regelmäßiges Drug-Monitoring erforderlich (Fassnacht et al. 2013; Mihai 2015; Takeshita et al. 2013; Terzolo et al. 2013). Bei ausgewählten Patienten wurde in einer aktuellen retrospektiven

Untersuchung eine objektive Ansprechrate von 20,5% beschrieben (Megerle et al. 2018).

1.1.4.4.2 EDP-M

Die Erstlinien-Chemotherapie beim fortgeschrittenen ACC besteht derzeit aus dem EDP-M-Schema, bestehend aus Etoposid, Doxorubicin und Cisplatin in Kombination mit Mitotane (Berruti et al. 2012a; Fassnacht et al. 2012; Hoff und Berruti 2016; Mihai 2015). Diese Kombination bewirkte in der FIRM-ACT-Studie (First International Randomized Trial in Locally Advanced and Metastatic Adrenocortical Carcinoma Treatment) eine Tumorresponse (hier definiert als Partial Response (partielle Remission, PR) oder Complete Response (komplette Remission, CR)) von 23,2% der Fälle und ein medianes progressionsfreies Überleben von 5,6 Monaten (Fassnacht et al. 2012).

Allerdings führte EDP-M als Erstlinientherapie in dieser Studie nicht zu einer Verbesserung des Gesamtüberlebens (Overall Survival, OS) im Vergleich zu Streptozotocin plus Mitotane (Strepto-M) als Erstlinientherapie. Im Studiendesign von FIRM-ACT wurden zwei Gruppen miteinander verglichen: 151 Patienten mit ACC, die EDP-M als Erstlinientherapie bekommen haben und 153 Patienten mit ACC, die Strepto-M als Erstlinientherapie bekommen haben. Bei Krankheitsprogress wurde auf das jeweils andere Regime gewechselt. EDP-M war Strepto-M sowohl als Erst- als auch als Zweitlinientherapie überlegen. Diese gute Wirkung als Zweitlinientherapie übertraf vermutlich den Einfluss der Erstlinientherapie, sodass sich das Gesamtüberleben in den beiden Behandlungsarmen nicht unterschied (Fassnacht et al. 2012).

1.1.4.4.3 Zweitlinientherapie

Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es keine gut untersuchte und/oder wirksame Zweitlinientherapie (auch Salvage-Therapie: Therapieansatz nach Versagen der Erstlinientherapie) nach EDP-M für Patienten mit fortgeschrittenem ACC.

Strepto-M als Zweitlinientherapie, ebenfalls in der FIRM-ACT Studie untersucht, erbrachte zum Beispiel nur bei 15% der Patienten eine SD (Stable Disease) des Tumors über mehr als sechs Monate (Fassnacht et al. 2013). Aufgrund einer vielversprechenden Tumorresponse von Gemcitabin (Gem) in Kombination mit Capecitabin bei fortgeschrittenem ACC wird es aktuell als eine mögliche Zweitlinientherapie empfohlen (Fassnacht et al. 2013; Hoff und Berruti 2016; Sperone et al. 2010; Terzolo et al. 2014a) (siehe Wirksamkeit und Toxizität von Gem im ACC, Kapitel 1.2.3).

Tabelle 2: Auswertung verschiedener systemischer Therapieansätze beim ACC

Medikament	Substanzklasse/ Wirkmechanismus	n Pat.	SD: n Pat (%)	PR oder CR: n Pat (%)	Quelle
Axitinib	Inhibition von VEGFR	13	SD: 8 nach 12 Wochen (62%) medianes PFS: 5,5 Monate	0	(O'Sullivan et al. 2014)
Bevacizumab + Capecitabin	Anti-VEGF-Antikörper und 5-FU-Prodrug	10	0	0	(Wortmann et al. 2010)
Cixutumumab + Temozolomid	Anti-IGF-1R-Antikörper + mTOR-Inhibitor	26	SD: 11 nach ≥6 Monaten (42%) medianes PFS: 9 Monate	0	(Naing et al. 2013)
EDP-M [~]	Topoisomerasehemmer, Anthracyclin, Platinkomplexverbindung, Mitotane	151	SD: 53 nach 8 Wochen (35%) medianes PFS: 5,0 Monate	CR: 2 (1%) PR: 29 (19%)	(Fassnacht et al. 2012)
Figitumumab	anti-IGF-1R-Antikörper	14	SD: 6 nach 12 Wochen (43%)	0	(Haluska et al. 2010)
Gemcitabine + Erlotinib	Nukleosidanalogen und TK- Inhibitor	10	0	CR: 0 PR: 1 (10%)	(Quinkler et al. 2008)
Gemcitabine + Capecitabin	Nukleosidanalogen + 5-FU- Prodrug	28	SD: 11 nach 16 Wochen (39%)	CR: 1 (4%) PR: 1 (4%)	(Sperone et al. 2010)
Imatinib	Inhibition verschiedener TKs und PDGFR-R	4	0	0	(Gross et al. 2006)
Linsitinib	Inhibition von IGF-1R und dem Insulinrezeptor	90	SD: 14 nach 12 Wochen (16%) *	CR: 0 PR: 3 (3%)	(Fassnacht et al. 2015)
Paclitaxel + Sorafenib	Inhibition von Mitose und verschiedenener TKs, u.a. VEGFR2 und 3	9	0	0	(Berruti et al. 2012b)
Streptozocin- M [~]	Glucosamin-Nitrosoharnstoff- Derivat	153	SD: 34 nach 8 Wochen (22%) medianes PFS: 2,1 Monate	CR: 1 (1%) PR: 11 (7%)	(Fassnacht et al. 2012)
Sunitinib	Inhibition verschiedener TKs an Tumorzellen und -gefäßen (u.a. VEGFR1 und 2)	35	SD: 5 nach 12 Wochen (14%)	0	(Kroiss et al. 2012)
Trofosamide	DNA-Alkylanz	21	SD: 3 nach 56-79 (14%)	0	(Kroiss et al. 2016)

Studien über systemische Therapien beim ACC. Abkürzungen: 5-FU = 5-Fluorouracil, CR=complete response, IGF-1R = Insulin-like Growth Factor 1 Receptor, mTOR = mammalian target of rapamycin, n = Anzahl, Pat. = Patienten, PDGFR = Platelet-derived growth factor receptor, PFS = Progression free survival, PR = partial response, SD = stable disease, TK = Tyrosinkinase, VEGF(R) = Vascular Endothelial Growth Factor (Receptor)
[~]als Erstlinientherapie eingesetzt *Bei der mit Linsitinib behandelten Gruppe konnte in einer Phase-III-Studie kein verlängertes Gesamtüberleben im Vergleich zu der Placebo-behandelten Gruppe gefunden werden.

Zurzeit sind keine effektiven gezielten Therapien für fortgeschrittene ACCs verfügbar. Ohne objektive Tumorresponse (PR oder CR) blieben in Studien verschiedene Therapieansätze, zum Beispiel direkte und indirekte Tyrosinkinase-Inhibitoren wie

Imatinib, Sunitinib, Sorafenib, Axitinib und Bevacizumab oder IGF-1R-Inhibitoren (IGF-1R =Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor) wie Figitumumab, Cixutumumab und Linsitinib allein oder in Kombination mit anderen Medikamenten (**siehe Tabelle 2**) (Berruti et al. 2012b; Fassnacht et al. 2015; Gross et al. 2006; Haluska et al. 2010; Kroiss et al. 2012; Naing et al. 2013; O'Sullivan et al. 2014; Wortmann et al. 2010). Ohne relevante Tumorresponse blieb auch die Therapie mit dem Tyrosinkinase (TK)-Inhibitor Erlotinib in Kombination mit Gem bei zehn Patienten (Quinkler et al. 2008).

1.2 Gemcitabin

1.2.1 Überblick

Gem (2',2'-Difluoro-Desoxycytidin, dFdC) ist ein Desoxycytidin-Analogon, das intravenös (i.v.) verabreicht wird. Nach Transport in die Zelle wird Gem zu Di- und Triphosphaten umgewandelt. Die Triphosphate werden als fehlerhafte Basen in die Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid, DNA) eingebaut und führen zur Hemmung der DNA-Synthese. Die Diphosphate hemmen die Ribonukleotidreduktase (RR).

Die zytotoxische Wirkung von Gem ist seit Jahrzehnten bekannt. Gem findet seitdem Anwendung bei verschiedenen Malignomen (Abbruzzese et al. 1991; Hertel et al. 1990). Aktuell wird es unter anderem als Erstlinientherapie des Pankreaskarzinoms oder in bestimmten Fällen bei der Behandlung des Lungenkarzinoms empfohlen (Goekenjan et al. 2011; S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (Leitlinienprogramm Onkologie) 2013).

1.2.2 Transport und Stoffwechsel

Einen Überblick über den Transport und Stoffwechsel von Gem bietet **Abbildung 2**.

1.2.2.1 *Transport in die Zelle und Einteilung der Transporter*

Gem wirkt innerhalb der Zelle. Als hydrophiles Nukleosidanalogen hat es nur eine sehr eingeschränkte Diffusionsfähigkeit über eine Membran und benötigt einen Nukleosid-Membrantransporter, um in die Zelle zu gelangen (Griffith und Jarvis 1996; Mackey et

al. 1999). Von diesen Transportern gibt es zwei Typen: die ausgleichenden (Equilibrative Nucleoside Transporters, ENTs; beim Menschen human ENTs (hENTs)) mit vier Subtypen (ENT1-4) und die konzentrierenden (concentrative nucleoside transporters, CNTs, beim Menschen human CNTs (hCNTs)) mit drei Subtypen (CNT1-3) (Baldwin et al. 2004). Bei ENTs ist der Fluss der Nucleoside bidirektional möglich und durch ihr Konzentrationsgefälle gesteuert. CNTs koppeln den Transport der Nucleoside an einen Natrium-Ion-Transport entlang des Natrium-Konzentrationsgradienten und können Nucleoside so auch gegen ihr Konzentrationsgefälle transportieren (Baldwin et al. 1999).

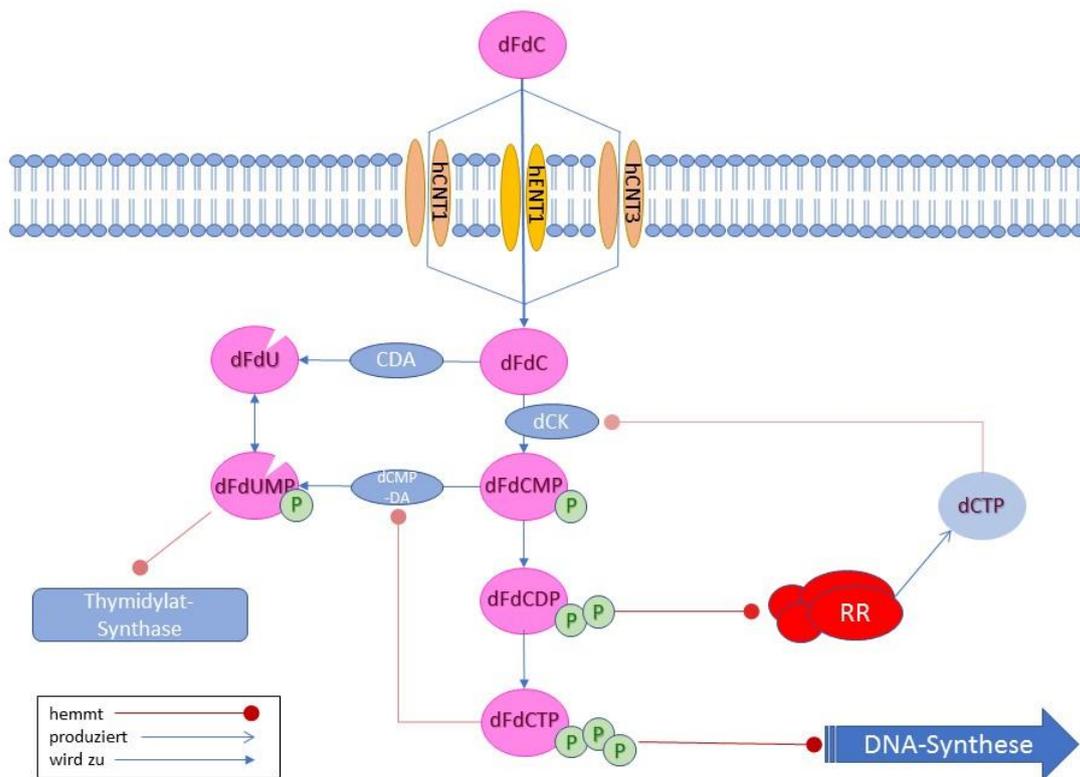


Abbildung 2: Stoffwechsel von Gem

Abkürzungen: **dFdC** = Difluoro-Desoxycytidin = Gem, **dFdCMP** = Difluoro-Desoxycytidin-Monophosphat, **dFdCDP** = Difluoro-Desoxycytidin-Diphosphat, **dFdTPC** = Difluoro-Desoxycytidin-Triphosphat, **dFdU** = Difluoro-Desoxyuridin, **dFdUMP** = Difluoro-Desoxyuridin-Monophosphat, **hENT1** = human Equilibrative Nucleoside Transporter 1, **hCNT 1,3** = human Concentrative Nucleoside Transporter 1,3, **CDA** = Cytidin-Desaminase, **dCCK-DA** = dCCK-Desaminase, **dCK** = Desoxycytidinkinase, **RR** = Ribonukleotidreduktase, Quelle: (auf Grundlage von Bergman et al. 2002)

Der Transport von Gem in die Zelle wird vor allem durch hENT1, aber auch hENT2, hCNT1 und hCNT3 ermöglicht (Garcia-Manteiga et al. 2003; Mackey et al. 1998) (zu hENT1, siehe human Equilibrative Nucleoside Transporter 1, Kapitel 1.3).

1.2.2.2 Umwandlung zu aktiven und inaktiven Metaboliten

In der Zelle muss Gem aktiviert werden. Dazu wird es zunächst in einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt durch die Desoxycytidinkinase (dCK) zu 2',2'-Difluoro-Desoxycytidin-Monophosphat (dFdCMP) und später durch Nukleotid-Kinasen weiter zu 2',2'-Difluoro-Desoxycytidin-Di- und -Triphosphat (dFdCDP und dFdCTP) phosphoryliert. Diese sind die aktiven Gem-Metabolite (Andersson et al. 2009; Bergman et al. 2002; Bouffard et al. 1993; Heinemann et al. 1988).

Die Inaktivierung von dFdC erfolgt durch die Desaminierung von dFdC zu 2',2'-Difluoro-Desoxy-Uridin (dFdU) durch die Cytidindesaminase (CDA) (Bouffard et al. 1993). dFdCMP wird durch die dCMP-Desaminase in 2',2'-Difluoro-Desoxyuridin-Monophosphat (dFdUMP) desaminiert und zu dem inaktiven dFdU umgewandelt (Bergman et al. 2002; Heinemann et al. 1992).

1.2.2.3 Wirkvermittlung

Die Wirksamkeit von Gem erfolgt vor allem durch eine Störung der DNA-Synthese durch Einbau als „falscher“ Baustein sowie durch Hemmung der RR.

Die DNA-Synthese wird durch Inkorporation von dFdCTP behindert, auch in die RNA (ribonucleic acid, Ribonukleinsäure) werden Gem-Metabolite eingebaut (Shewach et al. 1994; van Ruiz Haperen et al. 1993). Die RR wird durch dFdCDP gehemmt. Dadurch sinkt die Konzentration des „richtigen“ DNA-Bausteins dCTP (Desoxycytidin-Triphosphat), der für die DNA-Synthese benötigt wird (Heinemann et al. 1990; Wang et al. 2007).

Ein weiterer Angriffspunkt von Gem ist die Thymidylat-Synthase (TS). Sie ist an der de-novo-Synthese des DNA-Bausteins Desoxythymidin-Triphosphat (dTTP) beteiligt. Der Metabolit dFdUMP von Gem hemmt die TS. Dadurch entsteht ein Thymidin-Mangel, was

wiederum dazu führt, dass ein strukturähnliches Molekül (2'Deoxyuridin) in die DNA eingebaut wird und sie dadurch indirekt schädigt (Honeywell et al. 2015).

1.2.2.4 Eigene Wirkverstärkung

Gem hemmt die RR, wodurch die dCTP-Konzentration sinkt (Heinemann et al. 1990; Wang et al. 2007). dCTP hemmt die dCK, welche den ersten Schritt der Gem-Aktivierung katalysiert (Bouffard et al. 1993). Durch die Hemmung der RR ist die dCK also aktiver. Es wird mehr von dem Gem-Metaboliten dFdCTP hergestellt und in die DNA eingebaut (Andersson et al. 2009).

Zusätzlich hemmt dFdCTP die dCMP-Desaminase, welche die Gem-Metabolite inaktiviert. Es kommt zu einem verminderten Abbau von dFdCMP, was zu einer weiteren Wirkverstärkung von Gem führt (Andersson et al. 2009; Heinemann et al. 1992).

1.2.3 Wirksamkeit und Toxizität von Gemcitabin im ACC

Die Wirkung einer Gem-basierten Chemotherapie bei Patienten mit ACC wurde in zwei Studien untersucht. Quinkler et al. beobachteten zehn Patienten, die mit Gem plus Erlotinib behandelt wurden. Nur bei einem Patienten gab es eine SD von acht Monaten, alle anderen hatten bei der ersten Follow-up-Untersuchung einen Progress (Quinkler et al. 2008). Damaraju et al. fanden später jedoch heraus, dass eine Vorbehandlung von Zelllinien mit TK-Inhibitoren (u.a. Erlotinib) vor Gem bzw. die gleichzeitige Gabe mit Gem zu einem Wirkverlust führt (Damaraju et al. 2014), weswegen diese Studie von Quinkler et al. keinen guten Anhalt für die Beurteilung der Gem-Wirksamkeit bietet.

Sperone et al. untersuchten die Wirkung von Gem plus Capecitabin in einer klinischen Phase-II-Studie an 28 Patienten mit fortgeschrittenem ACC (Sperone et al. 2010). Hier zeigte sich eine gute Tumorresponse mit einer SD bei elf Patienten (39,3%) nach vier Monaten, sowie einer PR und einer CR bei je einem Patienten (je 3,6%). Insgesamt wurde Gem gut toleriert, allerdings gab es bei acht Patienten (29%) WHO-Grad III-IV Nebenwirkungen (sechs Leukopenien, eine Mukositis und eine Thrombopenie) und bei

acht Patienten musste die Dosis wegen der Nebenwirkungen reduziert oder eine Gabe verspätet verabreicht werden.

Wegen der guten Ansprechraten in dieser Studie wird eine Gem-basierte Therapie aktuell als mögliche Zweitlinientherapie empfohlen (Fassnacht et al. 2013; Hoff und Berruti 2016; Terzolo et al. 2014a).

1.2.4 Prädiktive Marker für die Wirkung von Gemcitabin

Verschiedene Proteine, die in der Verstoffwechslung von Gem beteiligt sind, wurden in Studien an unterschiedlichen Tumoren (*in vitro* und *in vivo*) auf ihren prädiktiven Wert untersucht. Das Ziel war, einen Marker oder Konstellation an Markern zu finden, der bzw. die ein gutes Ansprechen der Therapie mit Gem auf die Karzinome vermittelt bzw. vermitteln. Die vielversprechendsten Ergebnisse zeigen sich bei hENT1 und RRM1 (Ribonukleotidreduktase Untereinheit M1), welche in den folgenden Kapiteln behandelt werden. Bis jetzt wurden keine entsprechenden Studien am ACC durchgeführt.

1.3 human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 (hENT1)

1.3.1 Aufbau und Funktion

hENT1 gehört zu der Familie der ausgleichenden, bidirektionalen Nucleosid-Transporter ENT. Zusammen mit der Gruppe der konzentrierenden Nucleosid-Transporter sind sie unter anderem bei der zellulären Aufnahme von zytotoxischen Nucleosid-Analoga wie Gem involviert (Young et al. 2013; Young et al. 2008) (siehe Transport in die Zelle und Einteilung der Transporter, Kapitel 1.2.2.1 und **Abbildung 2**).

ENTs können weiter in zwei Subtypen unterteilt werden, dem es-Typ und dem ei-Typ. Der es-Typ kann durch Nitrobenzylthioinosine (NBMPR) inhibiert werden (er ist sensitiv), der ei-Typ nicht (er ist insensitiv) (Baldwin et al. 1999).

Gem wird hauptsächlich durch hENT1 transportiert (Garcia-Manteiga et al. 2003). hENT1 gehört zu den es-Typen und wird durch das Gen *SLC29A1* kodiert (Baldwin et al. 2004; Mackey et al. 1999). Es besteht aus 11 Transmembrandomänen mit einem

intrazellulären N-Terminus und einem extrazellulärem C-Terminus (Sundaram et al. 2001) und wird ubiquitär in unterschiedlichen Geweben exprimiert (Handa et al. 2001; Mackey et al. 1998).

hENT1 wird als Membrantransporter vor allem in die Zellmembran exprimiert, aber auch eine leichte zytoplasmatische Lokalisierung kann gefunden werden (Farrell et al. 2009; Murata et al. 2013; Santini et al. 2010; Santini et al. 2011; Shimakata et al. 2016). Dies erklärt sich dadurch, dass hENT1 nach Transport zur Zellmembran teilweise internalisiert wird und später wieder auf der Zelloberfläche erscheint (Nivillac et al. 2011), was beispielsweise durch Aktivierung der Proteinkinase C und die darauffolgende Phosphorylierung von hENT1 induziert wird (Hughes et al. 2015).

1.3.2 Regulierung

Die Expression von hENT1 erfolgt zellzyklus-abhängig und bei Bedarf an Desoxyribonukleotiden. Sie ist während der S-Phase bis in die G2-Phase erhöht (Pressacco et al. 1995).

Äußere Einflüsse können die hENT1-Expression beeinflussen (siehe **Abbildung 3**): Eine vermehrte Expression kann *in vitro* durch 5-Fluorouracil (5-FU, getestet an Blasenkarzinomzelllinien) (Pressacco et al. 1995), Indol-3-Carbinol (I3C) (Pankreaskarzinomzelllinien) (Wang et al. 2011) oder dem enhancer of Zeste homolog-2-Inhibitor 3-deazaneplanocin A (DZNeP) (ebenfalls Pankreaskarzinomzelllinien) (Avan et al. 2012) erreicht werden. Auch im Xenograft-Modell von Pankreaskarzinomen zeigt sich eine erhöhte hENT1-Expression nach Behandlung mit dem Kombinationsmedikament S-1, welches das 5-FU-Prodrug Tegafur enthält (Nakahira et al. 2008).

Die Behandlung verschiedener Zelllinien mit Gem-Mono führt hingegen nicht zu einer veränderten Expression von hENT1 (Oguri et al. 2007; Wang et al. 2011).

Die Tyrosinkinase-Inhibitoren Erlotinib, Vandetanib und Gefitinib verringern die Menge von hENT1 auf der Zelloberfläche (Damaraju et al. 2014).

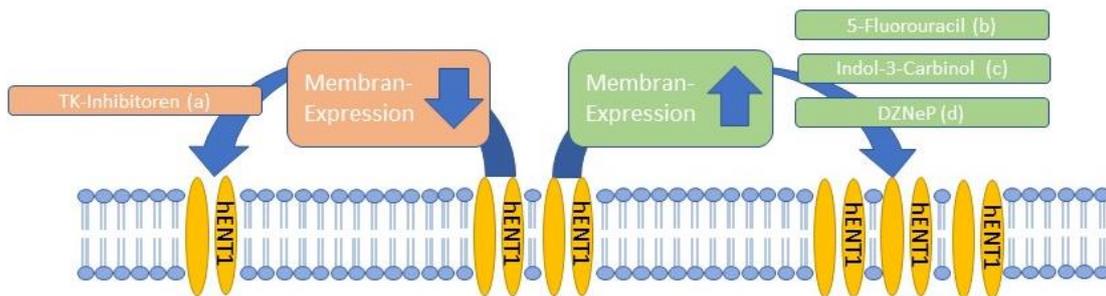


Abbildung 3: Äußere Einflüsse auf die Membran-Expression von hENT1; Abkürzungen: TK = Tyrosinkinase, DZNeP = enhancer of Zeste homolog-2-Inhibitor 3-deazaneplanocin A

Quellen: a (Damaraju et al. 2014), b (Pressacco et al. 1995), c (Wang et al. 2011), d (Avan et al. 2012), eigene Abbildung

1.3.3 hENT1 als prognostischer Marker

Ob hENT1 eine potentielle Rolle als prognostischer Marker (unabhängig von der Therapie) spielt, ist zurzeit nicht eindeutig geklärt. Die meisten Studien über Gallengangs- und Pankreaskarzinome finden keinen Zusammenhang zwischen hENT1 und dem OS (Elebro et al. 2016; Farrell et al. 2009; Fujita et al. 2010; Greenhalf et al. 2014; Sasaki et al. 2014; Sinn et al. 2015). Es wird jedoch auch berichtet, dass eine erhöhte Expression von hENT1 in Pankreas- und Gallengangstrakt-Karzinomen zu einem verlängerten OS führt* (Fisher et al. 2013; Kim et al. 2011b).

* Bei Kim et al. 2011 gilt allerdings folgende Einschränkung: 23% der Patienten erhielten eine Therapie mit Gem und wurden in die Überlebensanalyse miteingeschlossen (Kim et al. 2011b).

Die Expression von hENT1 und dessen Auswirkungen auf das Gesamtüberleben wurden beim ACC noch nicht untersucht.

1.3.4 hENT1 als prädiktiver Marker bei Gemcitabin-Therapie

Die Aufnahme von Gem in die Zelle wird unter anderem durch den Transport über hENT1 ermöglicht (siehe Transport in die Zelle und Einteilung der Transporter, Kapitel

1.2.2.1), was die Rolle von hENT1 als einen möglichen prädiktiven Marker für die Wirkung von Gem suggeriert (Nordh et al. 2014) (**Abbildung 4**).

Verschiedene *in vitro*- und *in vivo*-Studien unterstützen diese Vermutung:

In vitro bewirkt zum Beispiel eine Blockierung oder verminderte Expression von hENT1 eine schwächere Wirkung von Gem (Damaraju et al. 2014; Mackey et al. 1998; Mori et al. 2007; Oguri et al. 2007; Toffalorio et al. 2010).

Eine niedrige hENT1-Expression führte in ähnlicher Weise in Zelllinien oder Xenograft-Modellen mit Pankreaskarzinomzellen zu einer schlechteren Wirkung von Gem (Avan et al. 2012; Nakahira et al. 2008; Perez-Torras et al. 2008; Wang et al. 2011).

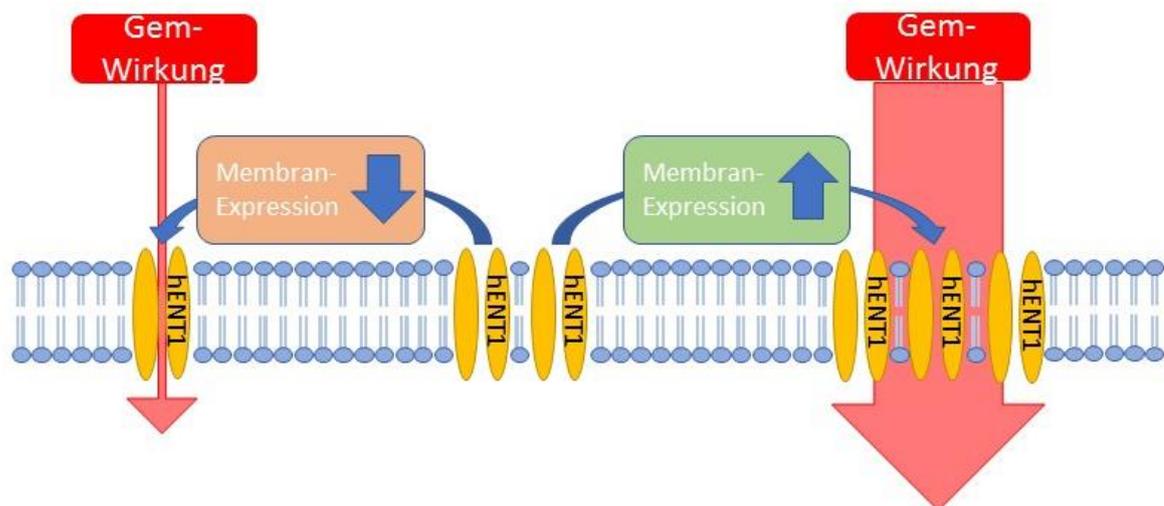


Abbildung 4: Modell von hENT1 als prädiktiven Marker für Gem: Wirkung von Gem in Abhängigkeit von der hENT1-Expression; eigene Abbildung

Unterschiedliche Studien konnten bei einer erhöhten Expression von hENT1 (auf mRNA- oder Protein-Ebene, mRNA = messenger-RNA) auch ein besseres Ansprechen auf die Therapie mit Gem in unterschiedlichen soliden Tumoren zeigen, beispielsweise im Pankreaskarzinom (Farrell et al. 2009; Fujita et al. 2010; Greenhalf et al. 2014; Nakagawa et al. 2013; Sierzega et al. 2017; Spratlin et al. 2004; Yamada et al. 2016), NSCLC (Non-Small Cell Lung Cancer, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom) (Oguri et al. 2007),

Blasenkarzinom (in der Studie nicht weiter differenziert) (Matsumura et al. 2011) oder in Karzinomen des Gallentrakts (Borbath et al. 2012; Deng et al. 2014; Murata et al. 2013; Santini et al. 2011; Sasaki et al. 2014) (siehe **Tabelle 3**).

Diese Daten unterstützen die Vermutung, dass hENT1 ein prädiktiver molekularer Marker für die Wirkung von Gem sein kann. Dieser Zusammenhang wurde für das ACC noch nicht untersucht.

Tabelle 3: Übersicht über Studien, die einen Zusammenhang zwischen Gem-Wirksamkeit und hENT1-Expression zeigen

Tumor	Quelle	Anzahl Patienten *	PFS bei hoher hENT1-Expression	OS bei hoher hENT1-Expression	Tumorresponse bei hoher hENT1-Expression	Was wurde untersucht
Pankreaskarzinom	(Farrell et al. 2009)	91	+	+		Protein
	(Fujita et al. 2010)	40	+ (ns)	+		mRNA
	(Greenhalf et al. 2014)	176	+	+		Protein
	(Nakagawa et al. 2013)	109	+	+		Protein
	(Sierzega et al. 2017)	100		+		mRNA
	(Spratlin et al. 2004)	21		+**		Protein
	(Yamada et al. 2016)	51		+		Protein
NSCLC	(Oguri et al. 2007)	21			+	Protein
Blasenkarzinom	(Matsumura et al. 2011)	40	+	+	+	Protein
Gallentrakt-Karzinom	(Borbath et al. 2012)	26	+	+		Protein
	(Deng et al. 2014)	40	+	+ (ns)	+	Protein
	(Murata et al. 2013)	28	+	+		Protein
	(Santini et al. 2011)	31	+	+ (ns)	0	Protein
	(Sasaki et al. 2014)	68	+	+***		Protein

Übersicht über Studien, die ein verbessertes Ansprechen von Gem bei hoher hENT1-Expression gefunden haben
 * Patienten, die Gem erhalten haben und deren Gewebe in die Auswertung eingeflossen ist, ** Vergleich zwischen homogen-positiver und inhomogener, teilweise fehlender hENT1-Färbung; *** nur in der univariaten und nicht in der multivariaten Analyse

Abkürzungen: PFS: Progression Free Survival; OS: Overall Survival; ns: nicht statistisch signifikant

1.4 Ribonukleotidreduktase M1 (RRM1)

1.4.1 Aufbau und Funktion

Die humane Ribonukleotidreduktase gehört zu der Ribonukleotidreduktase-Klasse Ia (Shao et al. 2006). Sie setzt sich aus der großen Untereinheit M1 (RRM1) und entweder RRM2 oder p53R2 zusammen (Besse et al. 2013; Guittet et al. 2001).

Die RR ist zuständig für die *de novo* Synthese von Desoxyribonukleotiden, in dem sie Ribonukleosid-Diphosphate in Desoxyribonukleosid-Diphosphate umwandelt (Besse et al. 2013) (siehe **Abbildung 5**).

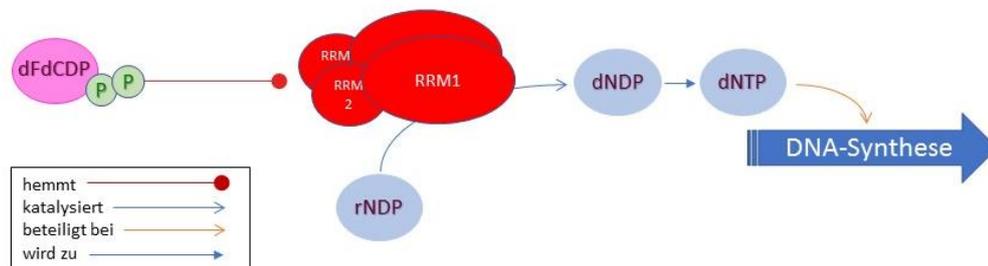


Abbildung 5: Funktion der Ribonukleotidreduktase (RR): Die RR katalysiert die Umwandlung von Ribonukleosid-Diphosphaten (rNDP) in Desoxyribonukleosid-Diphosphate (dNDP). Diese können in Form von Triphosphaten (dNTP) in die DNA eingebaut werden. Weitere Abkürzungen: RRM1= große Untereinheit M1, RRM2 = kleine Untereinheit 2, dFdcDP = 2',2'-Difluoro-Desoxycytidin-Diphosphat (Gem-Metabolit), eigene Abbildung

Die Regulierung der RR ist sehr komplex und dient der optimalen Einstellung der dNTP-Level (dNTP = Desoxyribonukleosid-Triphosphat(e)) während des Zellzyklus. Dies ist besonders wichtig, da schon kleine Veränderungen die Mutationsrate bei der DNA-Synthese verändern können (Ahluwalia und Schaaper 2013).

Während der S-Phase muss eine höhere Konzentration an dNTPs vorliegen als während anderer Phasen oder in nicht-proliferierenden Zellen (Guarino et al. 2014; Koc et al. 2004). Die zellzyklusabhängige Aktivitätsregulierung der RR erfolgt u.a. durch variierende Mengen von RRM2 (Chabes und Thelander 2000).

An RRM1 befinden sich außerdem zwei allosterische Bindungszentren, die „activity site“ und die „specificity site“ (siehe **Abbildung 6**). Durch die Bindung von ATP oder ADP an der „activity site“ kann das Enzym aktiviert oder deaktiviert werden (Aye et al. 2015; Guarino et al. 2014; Reichard 2010). Durch Bindung verschiedener dNTPs an der „specificity site“ wird die Reduktion von der Klasse der Nukleosid-Diphosphate (NDPs) bestimmt (Reichard 2010). Die RR kann durch Hydroxyurea gehemmt werden. Dies führt durch die verminderte dNTP-Konzentration zu einem Aufhalten der DNA-Synthese (Alvino et al. 2007; Koc et al. 2004). Auch Gem bzw. der aktive Metabolit dFdCDP hemmt die RR (Heinemann et al. 1990; Wang et al. 2007).

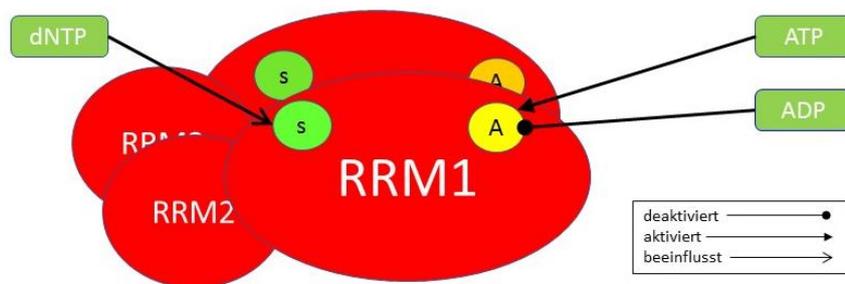


Abbildung 6: Modell einer Ribonukleotidreduktase mit je zwei allosterischen Bindungszentren pro RRM1-Protein: einer "activity site" und einer "specificity site", eigene Abbildung

Zusätzlich triggert RRM1 *in vitro* und *in vivo* einen G2-Zellzyklus-Checkpoint, der zu DNA-Reparatur, vermehrter Apoptose und verminderter Karzinogenese führt (Gautam und Beppler 2006).

1.4.2 RRM1 als prognostischer Faktor

Sich schnell teilende Zellen, zum Beispiel in Malignomen, synthetisieren viel neue DNA. RRM1 ist an der Bereitstellung der dNTPs für die DNA-Synthese beteiligt und triggert einen G2-Zellzyklus-Checkpoint (siehe RRM1 Aufbau und Funktion, Kapitel 1.4.1). Dies legt die Vermutung nahe, dass eine Fehlregulation der RRM1 mit verminderter

Expression bei Karzinomen vorliegt (Fan et al. 1997). Diese Vermutung und der Zusammenhang mit Überlebensdaten wurde an verschiedenen Tumoren untersucht:

Eine geringere oder fehlende Expression in malignen oder schlechter differenzierten Geweben wurde in folgenden Fällen untersucht: Im NSCLC wird weniger RRM1 exprimiert als im normalen Lungengewebe (Pesta et al. 2012; Toffalorio et al. 2010). Schlecht differenzierte Cholangiokarzinome exprimieren vergleichsweise wenig RRM1 (Sasaki et al. 2014). Undifferenzierte Schilddrüsenkarzinome zeigten bei Fang et al. sogar in der Hälfte der Fälle eine negative RRM1-Expression (Fang et al. 2016).

Bei Untersuchungen von Überlebenszeiten im Zusammenhang mit RRM1 Expression unabhängig von der Therapie zeigen Studien dazu passend ein kürzeres OS oder eine kürzere Zeit bis zu einem Tumorprogress (Progression-Free Survival, PFS) bei einer niedrigeren RRM1-Expression für das NSCLC (Pesta et al. 2012; Zheng et al. 2007) und für das Pankreaskarzinom (Xie et al. 2013). Dies macht RRM1 zu einem möglichen molekularen prognostischen Faktor für diese Tumore.

1.4.3 RRM1 als prädiktiver Marker bei Gemcitabin-Therapie

Der aktive Metabolit dFdCDP von Gem hemmt die große Untereinheit RRM1 der RR, wenn diese als Holoenzym (zusammen mit RRM2 bzw. p53R2 (siehe RRM1, Aufbau und Funktion, Kapitel 1.4.1)) vorliegt (Aye et al. 2015). Ein Zusammenhang zwischen der Wirkung von Gem und der Menge bzw. dem Vorhandensein von RRM1 ist daher möglich.

In vitro wird ein Trend zu einer positiven Korrelation zwischen RRM1-Expression und der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) von Gem auf Gallengangskarzinom-Zelllinien gefunden (Nakamura et al. 2010; Ohtaka et al. 2008). Eine vermehrte Expression von RRM1 führt tendenziell zu einer Resistenz (Yoneyama et al. 2015). Eine Hemmung von RRM1 durch siRNA führt zu einer stärkeren Zytotoxizität von Gem (Toffalorio et al. 2010; Wonganan et al. 2012).

Verschiedene Studien zeigen ein besseres Ansprechen bzw. verlängertes OS oder PFS bei der Therapie mit Gem und geringer RRM1-Expression, beispielsweise in NSCLCs (Ceppi et al. 2006; Dong et al. 2014; Qiu und Zhao 2014), in Pankreaskarzinomen (Akita et al. 2009; Fujita et al. 2010; Nakagawa et al. 2013; Sierzega et al. 2017; Xie et al. 2013), in nasopharyngealen Karzinomen (Zhao et al. 2012), im Blasenkrebs (Matsumura et al. 2017) oder in Gallentrakt-Karzinomen (Deng et al. 2014; Nakamura et al. 2010; Sasaki et al. 2014), siehe **Tabelle 4**.

Tabelle 4: Übersicht über Studien, die einen Zusammenhang zwischen Gem-Wirksamkeit und RRM1-Expression zeigen

Tumor RRM1	Quelle	Anzahl Patienten *	PFS bei hoher RRM1-Expression	OS bei hoher RRM1-Expression	Tumorresponse bei hoher RRM1-Expression	Was wurde untersucht
NSCLC	(Ceppi et al. 2006)	61		-	-	mRNA
	(Dong et al. 2014)	81	-		-	Protein
	(Qiu und Zhao 2014)	34		-	-	Protein
Pankreaskarzinome	(Akita et al. 2009)	28		- **	-	Protein
	(Fujita et al. 2010)	40	- (ns)	-		mRNA
	(Nakagawa et al. 2013)	109	-	-		Protein
	(Sierzega et al. 2017)	100		-		mRNA
	(Xie et al. 2013)	44	- (ns)	-		RNA
Gallentraktkarzinome	(Deng et al. 2014)	40	- (ns)	- (ns)	-	Proteine
	(Nakamura et al. 2010)	10	-			Protein
	(Sasaki et al. 2014)	68	-	-		Protein
Nasopharyngeale Karzinome	(Zhao et al. 2012)	48	-	0	0	Protein
Blasenkrebs	(Matsumura et al. 2017)	51	-	-		Protein

* Patienten, die Gem erhalten haben und deren Gewebe in die Auswertung eingeflossen ist; ** nach Beginn der Gem-Therapie
Abkürzungen: PFS: Progression-Free Survival; OS: Overall Survival; ns: nicht statistisch signifikant

1.5 hENT1 und RRM1 in Kombination

Deng et al. fanden eine bessere Tumorresponse auf eine Gem-basierte Therapie bei der Kombination aus erhöhtem hENT1 und niedrigem RRM1 bei Patienten mit fortgeschrittenen Gallentrakt-Karzinomen (Deng et al. 2014). Sasaki et al. fanden bei Patienten mit dem gleichen Tumorleiden ein verlängertes Überleben bei Patienten mit hohem hENT1 und niedrigem RRM1 unter Gem-basierter Therapie, die Expression hatte jedoch keine Auswirkung auf das OS oder PFS ohne Gem-basierte-Therapie (Sasaki et al.

2014). Auch im fortgeschrittenen Pankreaskarzinom konnten ähnliche Korrelationen gefunden werden (Nakagawa et al. 2013).

1.6 Ziele der Studie

Eine Gem-basierte Chemotherapie wird aktuell als Zweitlinientherapie beim fortgeschrittenen ACC empfohlen (Fassnacht et al. 2013; Hoff und Berruti 2016; Terzolo et al. 2014a). Diese Empfehlung basiert auf den guten Behandlungsergebnissen von 28 untersuchten Patienten in einer klinischen Phase-II-Studie (siehe Wirksamkeit und Toxizität von Gemcitabin im ACC, Kapitel 1.2.3) (Sperone et al. 2010). Bis jetzt wurde die Wirkung von Gem auf das ACC in keiner größeren Studie bestätigt.

hENT1 und RRM1 haben sich wie oben beschrieben als mögliche prädiktive Marker für die Wirkung von Gem in verschiedenen Tumoren, vor allem dem Pankreaskarzinom und dem NSCLC, gezeigt. Im ACC sind diese beiden Proteine mit und ohne Bezug zu Gem nach unserem Kenntnisstand bisher nicht untersucht worden.

Die Ziele dieser Studie waren die Untersuchungen von:

- i) der Wirkung und Toxizität von Gem-basierter Chemotherapie zur Behandlung des fortgeschrittenen ACCs in einer großen Serie,
- ii) der Expression von hENT1 und RRM1 in Nebennierenrindentumoren und
- iii) der Korrelation der hENT1- und RRM1-Expression mit dem klinischen Outcome von Patienten mit ACC (potentielle Rolle als prognostische Faktoren) und dem Ansprechen der Gem-basierten-Therapie (potentielle Rolle als prädiktive Faktoren).

2 Material und Methoden

2.1 Patienten und Gewebe

Die Sammlung der klinischen Daten und des Biomaterials von Patienten mit ACC wurde vom Ethikkomitee der Universität Würzburg in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki genehmigt (Nr. 93/02 und 88/11). Von allen Patienten lag eine schriftliche Einverständniserklärung zur Gewinnung und Nutzung der Daten und des Gewebes vor.

Die klinischen Daten wie Geschlecht, Alter bei Diagnose, initiale Tumorgröße und biochemische Auswertungen wurden aus den Patientenakten übernommen. Für ACCs wurden zusätzliche Daten wie ENSAT-Tumorstadium, Weiss-Score, Ki67-Proliferationsmarker, Anzahl von Fernmetastasen und die autonome Hormon-Sekretion im ENSAT-Register erhoben und gesammelt. Ebenfalls wurden die Daten der Follow-Up-Untersuchungen wie krankheitsspezifisches Überleben und progressionsfreies Überleben für alle ACC Patienten aus dem Register und/oder aus den Akten erhoben.

2.1.1.1 Gemcitabin-Patienten

In diesem Teil der Studie wurden Patienten mit fortgeschrittenem ACC eingeschlossen, die eine Gem-basierte Therapie erhalten haben. Insbesondere wurden folgende Kriterien angewandt: 18 Jahre oder älter, histologisch bestätigtes ACC, ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) - Performance Status von zwei oder weniger, adäquate Nieren- und Leberfunktion sowie adäquate Werte für Leukozytenzahlen und Hämoglobin. Insgesamt wurden an unserem Zentrum 124 Patienten zwischen 2004 und 2016 gefunden, die wenigstens eine Gabe Gem erhalten haben. Zehn davon hatten unvollständige Follow-up-Daten und wurden aus weiteren Analysen ausgeschlossen (definitive Kohorte n=114). Das Standard-Behandlungsprotokoll umfasste 800mg/m² intravenöses Gem als Infusion über 30 Minuten an Tag 1 und 8 in Zyklen mit 21 Tagen Abstand (Sperone et al. 2010). Im Fall von schweren Nebenwirkungen, Ablehnung durch die Patienten oder Krankheitsprogress wurden die Gaben beendet. Alle Patienten nahmen regelmäßig an Follow-up-Untersuchungen teil, bei denen in der Regel alle 12

Wochen klinische, biochemische und radiologische Kontrollen (Schnittbildgebung von Abdomen und Thorax, meist als Kontrastmittel-CT) durchgeführt und evaluiert wurden.

Einen Überblick über die Grundcharakteristika der Gem-Population liefert **Tabelle 5**.

Tabelle 5: Klinische Charakteristika der Gesamt-Gem-Population (n=114)

Alter [Jahre] – Median (Range)	44,0 (20-79)
Geschlecht (w/m)	69/45
Initiale Hormonsekretion:	
Glukokortikoide – n [%]	28 (24,6)
Androgene – n [%]	7 (6,1)
Glukokortikoide + Androgene – n [%]	23 (20,2)
Hormonell inaktiv – n [%]	11 (9,6)
Unbekannt – n [%]	45 (39,5)
Tumorgröße [cm] – Median (Range)	13 (1,8-26,0)
Initiales ENSAT-Stadium:	
I-II – n [%]	47 (41,2)
III – n [%]	23 (20,2)
IV – n [%]	40 (35,1)
Unbekannt – n [%]	4 (3,5)
Resektionsstatus:	
R0 – n [%]	55 (48,2)
RX – n [%]	12 (10,5)
R1/R2 – n [%]	29 (25,4)
unbekannt – n [%]	14 (12,3)
Keine Operation – n [%]	4 (3,5)
Histopathologische Marker	
Proliferationsindex (ki67) [%] – Median (Range)	20 (1-80)
Weiss score – Median (Range)	6 (2-9)
Lokale Behandlungsansätze:	
Eine weitere Operation – n	23
Mehrere weitere Operationen – n	33
Bestrahlung (Tumorbett oder Metastasen) – n	43
Weitere lokaltherapeutische Therapien* – n	17
Art der Gem-Behandlung:	
Erstlinientherapie – n [%]	11 (9,6)
Zweitlinientherapie – n [%]	57 (50)
Dritt- bis Fünftlinientherapie – n [%]	46 (40,4)
Zusammen mit Capecitabin – n [%]	102 (89,5)
Zusammen mit Mitotane – n [%]	77 (67,5)
* Indometomidat oder Radiofrequenzablation	
Abkürzungen: n = Anzahl, w = weiblich, m = männlich, R0 = vollständige Tumorentfernung, R1 = mikroskopische Tumorreste am Resektionsrand, R2 = makroskopisch unvollständige Tumorentfernung, Rx = unklare Tumorentfernung	

Zusammen mit Gem wurden bei 102 Patienten orales Capecitabin (1500mg/Tag) (Sperone et al. 2010), bei sieben Erlotinib (100mg/Tag) (Quinkler et al. 2008) und bei drei weitere Zytostatika (Navelbine, Carmustin und 5-Fluorouracil) verabreicht. Außerdem erhielten 77 Patienten zusätzlich Mitotane. Ein Patient erhielt Gem als Monotherapie und einer neben Gem ausschließlich Mitotane.

Bei elf Patienten wurde die Gem-basierte Therapie als Erstlinientherapie gegeben, bei 57 als Zweitlinientherapie (nach Progress unter Platin-basierter Chemotherapie (n=55) oder Streptozotocin (n=2)). Die verbleibenden 46 Patienten wurden nach Scheitern der Therapie mit Platin-basierter Chemotherapie, Streptozotocin, Sunitinib, Linsitinib oder Trofosamid mit Gem als Dritt- bis Fünftlinientherapie behandelt.

2.1.1.2 Beurteilung der Wirksamkeit und Toxizität von Gemcitabin

Die Wirksamkeit von Gem wurde retrospektiv anhand der Zeit bis zum Progress unter der Behandlung (PFS) und der Tumorresponse untersucht. Dafür wurden die Schnittbilder von unseren lokalen Radiologen begutachtet und zusammen im multidisziplinären Tumor-Board besprochen. Dabei wurde eine Einigung darüber getroffen, ob es sich um einen Progress (progressive disease, PD), ein objektives Ansprechen (Objective Response (OR) = partielle oder komplette Remission (PR oder CR)) des Tumors auf die Therapie oder eine gleichbleibende Situation (SD) handelte.

Wir definierten einen klinischen Vorteil (im Folgenden clinical benefit) für die Patienten unter Gem-basierter Therapie als OR oder SD von mindestens vier Monaten.

Die Nebenwirkungen wurden retrospektiv aus den Patientenakten übernommen und nach den CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events) Version 4.03 eingeteilt.

2.1.1.3 Fresh-Frozen-Tissue für die RNA-Untersuchung

Für die Untersuchung der Genexpression von hENT1 und RRM1 mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR, quantitative Real-Time- Polymerase chain

reaction) wurden schockgefrorene Gewebeproben (FFT, Fresh-Frozen-Tissue) benutzt. Insgesamt standen 30 ACC-, 20 ACA- und 21 nNN-Proben (nNN = normale Nebennieren) zur Verfügung. Die klinischen Grundcharakteristika der Patienten mit ACTs sind in **Tabelle 6** aufgeführt.

Tabelle 6: Demographie, klinische und histopathologische Charakteristika von Patienten mit Nebennierenrindentumor-Geweben für die mRNA-Untersuchung

Kohorte für mRNA-Analyse (Nebennierenrindentumore)			
	ACA	ACC	p-Wert
Proben – n	20	30	
Alter [Jahre] – Median (Range)	49,5 (25-69)	50 (24-80)	ns
Geschlecht (w/m)	13/7	16/14	ns
Hormonsekretion			
Steroide – n [%]	14 (70%)	11 (36,7%)	ns
Hormonell inaktiv – n [%]	6 (30%)	12 (40%)	
Gemischt – n [%]	0 (0%)	3 (10%)	
Unbekannt – n [%]	0 (0%)	4 (13,3%)	
Tumorgröße [cm] – Median (Range)	3,3 (0,9-6,5)	8 (2,5-24)	< 0,05
ENSAT-Tumorstadium			
I-II – n [%]		13 (43,3%)	-
III – n [%]	-	11 (36,7%)	
IV – n [%]		5 (16,7%)	
Unbekannt – n [%]		1 (3,3%)	
Proliferationsindex (ki67) [%] – Median (Range)	-	20 (2-90)	-
Weiss-Score – Median (Range)	-	7 (2-9)	-
Abkürzungen: ACA = Adrenokortikales Adenom, ACC = Adrenokortikales Karzinom, n = Anzahl, w = weiblich, m = männlich, ns = nicht statistisch signifikant			

2.1.1.4 Gewebe für die Protein-Untersuchung

2.1.1.4.1 Gesamtpopulation

Für die Immunhistochemie mit hENT1 standen 369 in Formalin fixierte und Paraffin eingebettete (FFPE) Nebennierengewebe zur Verfügung (15 nNN, 3 Nebennierenhyperplasien (im Folgenden als Teil der nNN gewertet), 51 ACAs, 303 ACCs). Dabei waren 42 Proben neben der IHC (Immunhistochemie) auch für die qRT-PCR verfügbar (18 ACA und 24 ACC).

Von den 303 ACC-Proben (52 in Standardschnitten und 251 in insgesamt sieben Tissue Microarrays zusammengefasst) wurden 240 aus Erst-OPs, 33 von Lokalrezidiven und 30 von Fernmetastasen gewonnen. Sie stammen von insgesamt 262 Patienten, wobei 41

Proben aus verschiedenen Operationen derselben Patienten stammten (z.B. primären Tumoren, lokalen Rezidiven und/oder Metastasen).

Für die Untersuchung von RRM1 standen insgesamt etwas weniger Schnitte zur Verfügung: 12nNN, 45 ACAs und 279 ACCs. Die 279 ACC-Gewebeschnitte stammen von 238 Patienten (218 aus Erst-OPs, 32 von Lokalrezidiven und 29 von Fernmetastasen). Die klinischen Grundcharakteristika der RRM1-Population unterschieden sich nicht von der hENT1-Population.

2.1.1.4.2 Subgruppe der Patienten mit Gemcitabin-basierter Therapie

Bei 72 Gem-Patienten standen FFPE-Gewebe für die Untersuchung der hENT1-Expression zur Verfügung. Zwei Patienten waren während der Gem-Gaben lost-at-follow-up und wurden nicht in weitere Untersuchungen einbezogen, sodass das definitive Kollektiv aus 70 Patienten bestand. Bei elf der Patienten gab es zusätzliche 17 Gewebeproben aus weiteren Operationen (OPs), sodass insgesamt 87 FFPE untersucht wurden (65 aus Erst-OPs, 9 von lokalen Rezidiven und 13 von Fernmetastasen).

Die grundlegenden klinischen Daten dieser Untergruppe (Mittleres Alter: 43 Jahre, mediane Tumgröße 12,5cm, medianer Weiss-Score: 6, medianer Proliferationsindex ki67: 20%) unterschied sich nicht von den Patienten ohne FFPE der Gesamt-Gem-Population.

Für RRM1 standen bei 69 Gem-Patienten FFPE-Gewebe zur Verfügung. Ein Patient wurde wegen unvollständiger Follow-Up-Daten nicht weiter in die Untersuchungen mit einbezogen. Bei elf Patienten gab es zusätzlich 18 Gewebe aus weiteren Operationen, sodass insgesamt 86 Gewebe untersucht wurden (62 aus Erst-OPs, 9 von Lokalrezidiven und 15 aus Metastasen-OPs). Auch hier unterscheiden sich die klinischen Grundcharakteristiken nicht von der hENT1- oder der Gesamt-Gem-Population.

2.2 Verbrauchsmaterial

2.2.1 Reagenzien, Verbrauchsmaterial und Kits

Firma	Reagentien, Verbrauchsmaterial, Kits
Applied Biosystems, Darmstadt, Germany	TaqMan Gene Expression Master Mix, Part No. 4369016
Bio Rad, United Kingdom	Microseal 'B' seal Seals, Cat. No. MSB1001 Multiplate PCR Plates 96-well, clear, Cat. No. MLL9601
Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Germany	Biosphere Filter Tips, Ref 70.1130.210, 70.762.211, 70.760.212 Biosphere SafeSeal Tubes, Ref 72.706.201
Biozym, Wien, Österreich	PCR Soft Tubes, 0,2ml, farblos, Art.-Nr. 711080
Dako, Glostrup, Denmark	EnVision Advance HRP Link und Enzym, Ref K4069
Dako North America, Carpinterica, CA, USA	Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, Ref K3468 N-Universal Negative Control Rabbit, Ref N1699
Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany	Ampuva Spüllösung, Ref. 1080181
Merck, Darmstadt, Germany	Citronensäure-Monohydrat zur Analyse, 1.00244.1000 Microscopy Entellan, 1.07960.0500 Natronlauge 1mol/l, 1.09137.1000 Natronlauge 5mol/l 1.09913.0001 TitriPUR Sodium Hydroxid Solution, 1.09137.1000 Wasserstoffperoxid 30%, 1.08597.1000
Qiagen, Alameda, CA, USA	QIAzol Lysis Reagent, Lot No. 436172409 QuantiTect Reverse Transcription Kit, Cat. No. 205313 Rneasy Lipid Tissue Mini Kit, Cat. No. 74804
Roth, Karlsruhe, Germany	Hämalaunlösung sauer nach Mayer, Art.-Nr. T865.1 Trichlormethan/Chloroform, Art.-Nr. 3313.1 Salzsäure 1mol/l -1N Lösung, Maßlösung, Art.-Nr. K025.1
Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Ethanol, 32205 Methanol, 32213 Sodium hydroxide, 30620 Xylenes, 16446
Sigma Life Science, St. Luis, Missori, USA	Human serum type AB (male), H4522 Phosphat buffered saline tablet, Herstellung des Puffers nach Herstellerangaben, P4417 Water for molecular biology, DEPC-treated and sterile filtered, 95284
Vector Laboratories, Burmingham, CA, USA	ImmEdge Pen, Cat. No. H-4000

2.3 Methoden

2.3.1 RNA-Isolation

Für die Quantifizierung der exprimierten RNA musste diese aus dem Gewebe isoliert werden, anschließend in cDNA umgewandelt und letztendlich mit der qRT-PCR analysiert werden.

Die RNA-Extraktion erfolgte aus Fresh Frozen Tissue. Die Proben wurden unmittelbar nach der operativen Entfernung makroskopisch von zusätzlichem Gewebe wie z.B. Fett befreit und in kleine, ca. 0,5 x 0,5 x 0,5 mm große Stücke geteilt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

Um den Abbau der RNA durch RNAsen zu verhindern, wurde ausschließlich mit RNase-freiem Wasser gearbeitet und die Proben während der Bearbeitung auf Eis gekühlt. Es wurde auf höchste Sauberkeit geachtet. Die RNA-Extraktion erfolgte nach Herstellerangaben mit dem RNeasy Lipid Tissue Mini Kit von Qiagen (Cat. No. 74804). Als Vorbereitung wurden die autoklavierten Glashomogenisatoren für 10 Minuten in UV-Licht gelegt. Anschließend folgte die Homogenisierung von 20-40mg des zu untersuchenden Gewebes mit 1ml QIAzol. Das QIAzol denaturiert Proteine, wodurch RNAsen aus dem Gewebe deaktiviert werden. Gleichzeitig enthält es Phenol, in dem die RNA sich löst. Die RNA wurde anschließend mit Isopropanolol und Ethanol gefällt und in RNase-freiem Wasser gelöst.

2.3.2 cDNA-Umschreibung

Für die quantitative Analyse des RNA-Gehalts mithilfe der PCR muss die RNA zunächst in ihr Transkript, die cDNA, umgeschrieben werden. Dazu wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen (Cat. No. 205313) genutzt und nach Herstellerangaben vorgegangen.

Um eine konstante Menge RNA von 1000ng pro Ansatz zu analysieren, wurde sie je nach Konzentration mit einer entsprechenden Menge Wasser verdünnt (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific). Die anschließende Zugabe von gDNA wirkte einer Störung der

Ergebnisse durch eventuell vorhandene genomische DNA entgegen. Es folgte eine Inkubation der Mischung für 5 Minuten bei 42°C und eine Abkühlung auf 4°C. Nach Zugabe eines Primer-Mixes, des RT-Puffers, der auch die dNTPs enthält, und der reversen Transkriptase wurden die Proben 15 Minuten bei 42°C inkubiert. Während dieser Zeit fand die Transkription statt. Das Ende der Reaktion wurde durch ein 3-minütiges Erhitzen auf 95°C herbeigeführt. Es folgte die Lagerung der cDNA bei -20°C oder die direkte Weiterverarbeitung.

2.3.3 qRT-PCR

Die qRT-PCR gibt neben dem Amplifizieren DNA mit Hilfe von Fluoreszenz-Messung auch eine Echtzeit-Auskunft über die Menge der vorhandenen DNA. Je mehr PCR-Produkte es gibt, desto mehr Fluoreszenz wird gemessen.

2.3.3.1 Ablauf

Eine Polymerase-Kettenreaktion verläuft in 3 Schritten: dem Denaturierungsschritt, dem Annealingschritt und dem Elongationsschritt.

Bei der Denaturierung wird die Probe auf 95°C erhitzt, wodurch sich die doppelsträngigen DNA-Stränge voneinander trennen. Durch Abkühlen können die Oligonucleotidprimer an die richtige Stelle der DNA binden (Annealing). Die Temperatur richtet sich nach den verwendeten Primern, in unserem Fall waren es 60°C. Anschließend wird die Probe erneut auf 72°C erhitzt, der optimalen Arbeitstemperatur der Taq-Polymerase. Die Polymerase verlängert die Primer entlang der komplementären DNA, sodass wieder eine doppelsträngige DNA entsteht (Elongation). Pro Zyklus wird damit die DNA idealerweise verdoppelt, sodass insgesamt eine etwa exponentielle Vermehrung stattfindet.

2.3.3.2 Quantifizierung

Die Quantifizierung erfolgt nicht als absoluter Wert, sondern als relative Expressionsrate R bezogen auf ein Referenzgen nach der ΔCT -Methode (Pfaffl 2001). Das Referenzgen (auch Haushaltsgen) ist ein Gen, welches zellzyklusunabhängig und konstant exprimiert wird. In unserem Fall wurde β -Aktin verwendet.

Bei der qRT-PCR wird bei der Herstellung der doppelsträngigen DNA ein Fluoreszenz-Farbstoff abgegeben. Für jede untersuchte cDNA wird ein Schwellenwert (CT, cycle threshold) ermittelt. Er entspricht dem Zyklus, an dem die Fluoreszenz über die Grundfluoreszenz steigt. Je mehr PCR-Produkte es gibt, desto schneller wird dieser Schwellenwert erreicht. Die relative Expressionsrate wird dann mit folgender Formel errechnet:

$$R = 2^{CT_{Referenzgen} - CT_{target}}$$

Relatives Expressionsverhältnis ΔCT ; CT = Cycle Threshold,
Referenzgen = β -Aktin, target = hENT1 bzw. RRM1

2.3.3.3 Durchführung

Für die qRT-PCR wurden alle Werte doppelt erhoben und gemittelt. Jeder Ansatz enthielt 40ng cDNA zusammen mit 12,5 μ l TaqMan Gene Expression Master Mix, 1,25 μ l der entsprechenden Sonde (*SLC-29A1*: Hs 01085706_m1, *RRM1*: Hs 01040698_m1, β -*Actin*: Hs 9999903_m1, Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) und 12,5 μ l destilliertes Wasser. Zusätzlich enthielt jeder Durchlauf eine Negativkontrolle mit destilliertem Wasser anstelle der cDNA. Nach Durchmischen der einzelnen Proben und Zentrifugation wurden die Transkriptionslevel in dem CFX real-time thermocycler (Biorad, Hercules, CA, USA) und der Bio-Rad CFX Manager 2.0 Software bestimmt. Die genauen Zyklus-Konditionen bestanden aus einer initialen Erwärmung auf 95°C für 3 Minuten gefolgt von 40 Zyklen mit je 95°C für 30 Sekunden, 60°C für 30 Sekunden und 72°C für 30 Sekunden.

2.3.4 Immunhistochemie

2.3.4.1 Theorie

Mit Hilfe der Immunhistochemie wird die Menge eines bestimmten Proteins, bei uns hENT1 und RRM1, in einem Gewebe untersucht. Die Färbung beruht auf einer Antikörper-Antigen-Reaktion. Ein Erstantikörper bindet spezifisch gegen das zu untersuchende Antigen. Als Detektionssystem diente das EnVision Advance HRP-System. Bei diesem System wird ein sogenannter Link und anschließend eine Peroxidase (Horseradish peroxidase, HRP) hinzugegeben, die ihrerseits an den Link bindet. Das zugegebene Chromogen Diamino-benzidintetrahydrochlorid (DAB) wird durch die Peroxidase oxidiert, bindet an umgebende Proteine und wird in eine farbige Substanz umgewandelt. Bei vielen vorhandenen Epitopen ergibt sich eine dunklere Färbung, die in der späteren Auswertung quantifiziert wird.

2.3.4.2 Durchführung

Das Gewebe für die immunhistochemische Untersuchung lag in Formalin-fixierter und in Paraffin-eingebetteter (FFPE) Form vor. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss.

Die FFPE-Gewebe wurden in 2µm dicken Schichten geschnitten (Mikrotom Hn40, Jung, Heidelberg) und auf Objektträger aufgebracht. Nach ausreichender Trocknung wurden die Schnitte zwei mal zwölf Minuten in Xylol entparaffiniert, mit einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (100%, 90%, 80%, 70% Ethanol) und mit destilliertem Wasser gewaschen.

Zur Demaskierung der Epitope erfolgte ein 13-minütiges Kochen der Schnitte in einem 10 mM Citronensäuremonohydrat-Puffer (pH 6,5, pH-Meter: inoLab ph 720) im Dampfdrucktopf und anschließendes Erkalten über 20 Minuten. Es schloss sich ein weiterer Waschschrift in destilliertem Wasser an.

Für die Hemmung der endogenen Peroxidase wurde das Gewebe zunächst mit einem Fettstift (ImmEdge (TM) Pen) umkreist und anschließend für zehn Minuten mit einer

3%igen Wasserstoffperoxid-in-Methanol-Lösung eingedeckt. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit destilliertem Wasser. Der Proteinblock zur Vermeidung unspezifischer Färbung wurde durch einstündige Inkubation mit 20% humanen AB-Serum in PBS (Phosphat buffered saline) durchgeführt.

Im Anschluss folgte eine einstündige Inkubation mit dem Primäantikörper gegen hENT1 (Sigma Life Science, HPA012383-100UL Anti-SLC29A1 rabbit polyclonal antibody, Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, Epitop: PrEST; Verdünnung 1:30, (Fisher et al. 2013)) bzw. eine Inkubation über Nacht bei 4°C mit dem Antikörper gegen RRM1 (Abcam, Anti-RRM1 antibody ab81085, rabbit polyclonal antibody, Abcam, Cambridge, UK, Epitop: C-Term, Verdünnung 1:100, (Kunos et al. 2012; Nakagawa et al. 2013)). Bei beiden Antikörpern handelt es sich um Kaninchen-Antikörper. Daher wurde bei jedem Durchlauf eine Negativ-Kontrolle mit N-Universal Negative Control Anti-Rabbit (Dako North America, Ref N1699) durchgeführt, die separat gewaschen aber sonst wie alle Proben behandelt wurde.

Nach einem Waschschrift in PBS erfolgte nun die Detektion mittels des HRP-Systems von Dako. Die Schnitte wurden 20 Minuten mit HRP Link inkubiert, anschließend dreimal fünf Minuten in PBS gewaschen und weitere 20 Minuten mit HRP Enzym inkubiert und wieder dreimal fünf Minuten gewaschen. Von diesem Stadium an erfolgten alle Arbeitsschritte in Dunkelheit.

Zunächst fand eine zehnminütige Inkubation mit verdünntem DAB (DAB Substrate Kit, Dako, Herstellung nach Herstellerangaben) statt. Nach dem Waschen mit Leitungswasser folgte eine zweiminütige Gegenfärbung der Schnitte in Hämalalaun und eine fünfminütige Bläuung in fließendem Leitungswasser. Zum Trocknen wurden die Schnitte kurz in 100%iges Ethanol getaucht und 20 Minuten bei 56°C in einem Ofen erwärmt. Den Schluss bildete das Eindecken der Schnitte mit Entellan und das Versehen mit Deckgläschen.

Mit Ausnahme des Primäantikörpers RRM1 erfolgten alle Inkubationsschritte bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer, RRM1 wurde über Nacht bei 4°C, ebenfalls in einer feuchten Kammer, inkubiert.

2.3.4.3 Auswertung

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte erfolgte von zwei Begutachtern unabhängig voneinander (J. E. K. Henning und C. L. Ronchi). Die primäre Übereinstimmung zwischen den Personen lag nach Pearsons Korrelationskoeffizienten bei 0,66 (95% CI 0,59 – 0,71) für hENT1 und 0,62 (95% CI 0,56 – 0,68) für RRM1. Bei Nichtübereinstimmen haben beide die Schnitte erneut bewertet. Im Falle einer weiterhin bestehenden Nichtübereinstimmung wurden die Schnitte anhand von Referenzbildern gemeinsam einer Kategorie zugeordnet.

Für hENT1 wurden Zytoplasma- und Membranfärbung ausgewertet (siehe hENT1, Vorkommen in der Zelle). RRM1 befindet sich zellzyklus-unabhängig immer im Zytoplasma (Pontarin et al. 2008; Mann et al. 1988), daher wurde nur die Zytoplasma-Färbung untersucht.

Als Positivkontrolle für hENT1 dienten Gewebe von Kolon und Hodenkrebs, für RRM1 von hepatozellulären und Prostatakarzinomen.

Für das Scoring-System erfolgte zunächst die Einteilung der Intensität der Gewebefärbung im Zytoplasma für RRM1 und hENT1 in Zahlenwerte: 0 für negativ (= nur blaue Hämalaun-Färbung), 1 für leicht positiv, 2 für positiv und 3 für stark positiv. Zu jedem Punktwert wurde die Prozentzahl angegeben, in der diese Intensität vorlag. Aus Färbung und Prozent wurde ein semiquantitativer h-Score (in Anlehnung an Al-Haddad et al. 1999) wie folgt berechnet: Die höchste vorhandene Intensität wurde bei Vorhandensein in 50-100% mit dem Faktor 1 multipliziert, bei 20-49% mit dem Faktor 0,5 und bei 1-19% mit dem Faktor 0,3. Daraus ergab sich eine Spanne von h-Score 0 bis maximal 3.

Die Membranfärbung wurde in eine positive und negative Färbung eingeteilt. Das Gewebe erhielt den Wert, der in mehr als 50% des Schnitts zu sehen war.

2.3.5 Statistische Analyse

Dichotome Variablen wurden mit dem Exakten Fischer-Test oder dem Chi-Quadrat-Test ausgewertet. Bei kontinuierlichen, normalverteilten Variablen wurde der zweiseitige T-Test oder der einseitige ANOVA angewandt (parametrische Tests). Gruppen nicht-normalverteilter Variablen wurden mit dem Mann-Whitney oder Kruskal-Wallis-Test (nicht-parametrische Tests) miteinander verglichen. Anschließend fand ein Post-Hoc-Test Verwendung. Korrelationen und 95%-Konfidenzintervalle wurden mittels linearer Regressionsanalyse ermittelt.

Das erkrankungsspezifische Überleben (OS) wurde als Zeit zwischen Diagnosestellung bzw. Erst-OP bis zum krankheitsvermittelten Tod oder letzter Follow-Up Untersuchung definiert, das progressionsfreie Überleben (PFS) als Zeit zwischen primärer R0-Tumorresektion oder Beginn der Gem-Therapie bis zu einem Tumorprogress oder Tod.

Für alle Überlebenskurven wurde eine Kaplan-Meier-Schätzung angewandt. Unterschiede zwischen Überlebenszeiten wurden mit dem Log-Rank-Test ermittelt. Für das Errechnen des Hazard Ratio erfolgte eine Einteilung zweier ACC-Gruppen nach hoher und geringer Expression (beispielsweise hohe Expression ab einem h-Score von 2 für die zytoplasmatische Färbung). Um Faktoren auszumachen, die das Überleben unabhängig von anderen beeinflussen, wurde mit einer Cox-Regression eine multivariate Regressionsanalyse durchgeführt. Als Software fanden GraphPad Prism (Version 6.0, La Jolla, CA, USA) und SPSS (PASW Version 21.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) Anwendung. p-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Wirksamkeit der Gemcitabin-basierten Therapie

Die grundlegenden klinischen Daten der 114 mit Gem behandelten Patienten sind in **Tabelle 5** (Kapitel 2.1.1.1) aufgelistet. Bezogen auf alle Gem-behandelten Patienten lag das mediane PFS während der Therapie bei drei Monaten (90 Tagen) mit einer Range von 0,2 bis 17 Monaten (7-509 Tagen). Das mediane erkrankungsspezifische Überleben nach Gem-Therapie lag bei zehn Monaten (Range 0,2-70), **Abbildung 7**.

Ein Patient starb krankheitsbedingt (nicht durch die Therapie verursacht) nach 7 Tagen innerhalb des ersten Zyklus. Alle weiteren Patienten erhielten mindestens zwei Zyklen Gem.

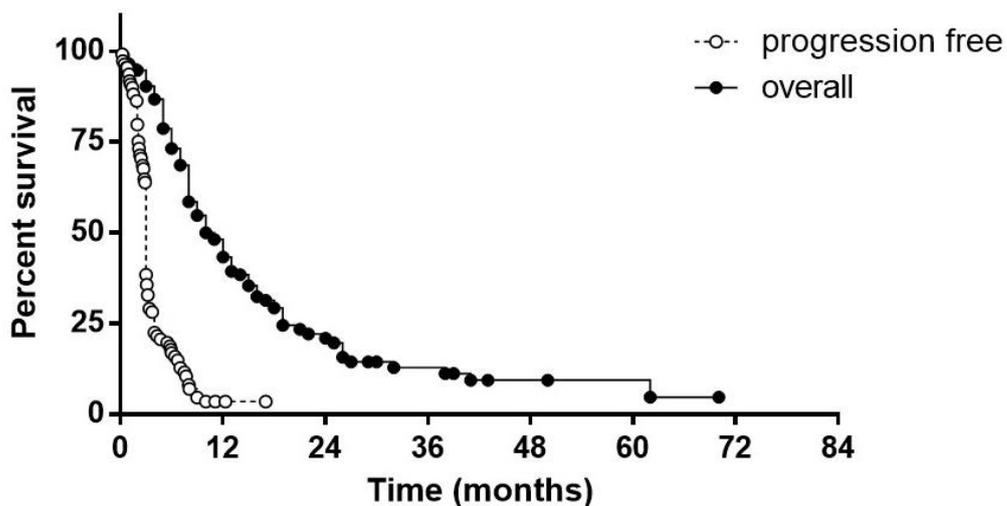


Abbildung 7: Wirksamkeit der Gem-basierten Therapie bei 114 Patienten mit adrenokortikalem Karzinom, progressionsfreies Überleben und erkrankungsspezifisches Überleben in Kaplan-Meier Kurven

Insgesamt hatten 28 Patienten (25%) bei der ersten Follow-up-Untersuchung eine SD mit einem medianen PFS von 6,3 Monaten (Range 0,7-17 Monate). Bei den restlichen 86 Patienten (75%) wurde ein Progress festgestellt.

21 Patienten (18%) hatten einen clinical benefit von der Gem-basierten-Behandlung (Definition: SD oder PR von ≥ 4 Monaten, siehe Beurteilung der Wirksamkeit und Toxizität von Gem, Kapitel 2.1.1.2) mit einer mittleren Dauer von sieben Monaten (Range 4-17 Monate),

Abbildung 8.

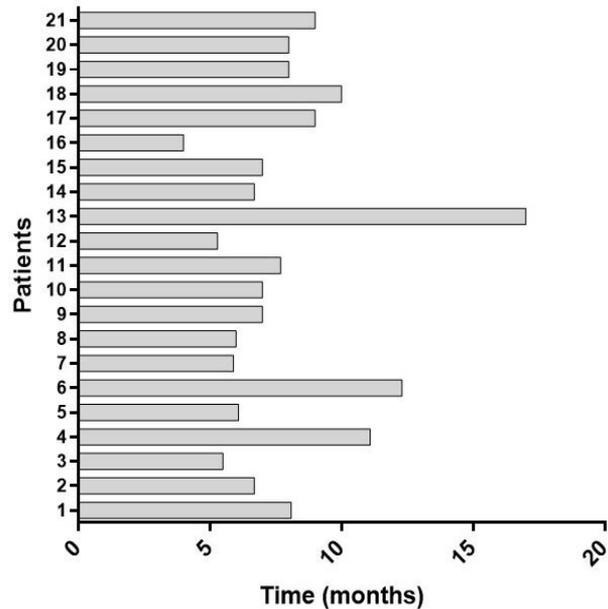


Abbildung 8: Dauer des Clinical Benefits (stable disease oder partial response über mindestens vier Monate) bei 21 Patienten unter Gemcitabin-basierter Therapie

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten beobachtet werden, die Gem als Erst- oder Zweitlinientherapie oder später erhalten haben. Ebenso gab es keine Unterschiede im PFS oder erkrankungsspezifischen Überleben zwischen einer zusätzlichen Behandlung mit Mitotane und ohne ($p = 0,27$, HR = 1,26, 95%CI = 0,83-2,15). Die 102 Patienten mit der gleichzeitigen Behandlung mit Capecitabin hatten ein längeres PFS während der Behandlung, jedoch erreichte dieser Unterschied keine statistische Signifikanz ($p = 0,07$, HR 0,61, 95%CI = 0,23-0,99).

3.2 Toxizität der Gemcitabin-basierten Therapie

Informationen über unerwünschte Ereignisse (UE) während der Gem-Behandlung konnten bei 79 der 114 Patienten erhoben werden, eine Übersicht liefert **Tabelle 7**. Gem wurde insgesamt gut toleriert.

Tabelle 7: Behandlungsbedingte unerwünschte Ereignisse entsprechend den „Common Criteria for Adverse Events“ Version 4.03 bei 79 Patienten mit Angaben unerwünschter Ereignisse unter Gem-Behandlung

Unerwünschtes Ereignisse	Grad I-II n (%)	Grad III n (%)	Grad IV n (%)	Unbekannter Grad n (%)
Hämatologisch				
Anämie – n (%)	21 (26,6)	2 (2,5)	0	0
Thrombopenie – n (%)	9 (11,4)	2 (2,5)	1 (1,3)	2 (2,5)
Neutropenie – n (%)	4 (5,1)	2 (2,5)	1 (1,3)	1 (1,3)
Nicht-hämatologisch				
Schwäche – n (%)	16 (20,3)	0	0	0
Übelkeit/Erbrechen – n (%)	11 (13,9)	1 (1,3)	0	0
Ödeme – n (%)	9 (11,4)	0	0	0
Fieber – n (%)	6 (7,6)	0	0	0
Thorakale oder generalisierte Schmerzen – n (%)	6 (7,6)	1 (1,3)	0	0
Dyspnoe – n (%)	6 (7,6)	0	0	0
Parästhesien/Taubheitsgefühl – n (%)	5 (6,3)	0	0	0
Diarrhoe – n (%)	4 (5,1)	0	0	0
Mukositis – n (%)	2 (2,5)	0	0	0
Appetitlosigkeit – n (%)	2 (2,5)	0	0	0
Hand-Fuß-Syndrom – n (%)	1 (1,3)	1 (1,3)	0	0
Obstipation – n (%)	1 (1,3)	0	0	0
Kopfschmerzen – n (%)	1 (1,3)	0	0	0
Polyneuropathie – n (%)	1 (1,3)	0	0	0
<i>Es gab keine unerwünschten Ereignisse des 5. Grades. Bei einem Patienten musste aufgrund einer schwerwiegenden Neutropenie die Behandlung mit Gem nach dem zweiten Zyklus abgebrochen werden.</i>				
<i>Die Prozentangaben beziehen sich auf die 79 Patienten, bei denen Angaben zu UEs gefunden wurden.</i>				

Die häufigsten UE waren eine allgemeine Körperschwäche (20,2% der Fälle), Übelkeit und Erbrechen (13,9%), Ödeme (11,4%), Fieber, thorakale oder generalisierte Schmerzen und Dyspnoe (je 7,6%), Taubheitsgefühle (6,3%) und Diarrhoe (5,1%). Seltene UE waren Mukositis und Appetitlosigkeit (je 2,5%), Hand-Fuß-Syndrom und Kopfschmerzen (je 1,3%). Hämatologische UE waren vorübergehende Neutropenien (17,7%), Anämien (29,1%) und Thrombopenien (10,2%). Schwerwiegende unerwünschte Ereignisse (CTC Grad III-IV) wurden in 11 Fällen (13,9%) bei insgesamt 9

Patienten beobachtet. Bei einem Patienten musste die Gem-Therapie aufgrund der UE (schwerwiegende Leukopenie) nach dem zweiten Zyklus abgebrochen werden. Es konnten keine Unterschiede in Bezug auf die Toxizität zwischen Patienten mit und ohne gleichzeitige Mitotane-Gaben gefunden werden.

3.3 hENT1 und RRM1 mRNA-Expression in adrenokortikalen Geweben und ihr Zusammenhang zu klinischen Ergebnissen

Die relative Expression von *hENT1* mRNA war in ACCs geringer (Mittelwert \pm Standardabweichung $0,30 \pm 0,50$) als in ACAs ($0,54 \pm 0,65$) und nNN ($0,43 \pm 0,26$, $p = 0,0039$ im Kruskal-Wallis und Post-Hoc-Test, siehe **Abbildung 9**).

Die relative *RRM1* mRNA Expression war hingegen in ACC, ACA und nNN sehr ähnlich ($0,18 \pm 0,16$ vs. $0,18 \pm 0,13$ vs. $0,19 \pm 0,16$, $p = 0,94$).

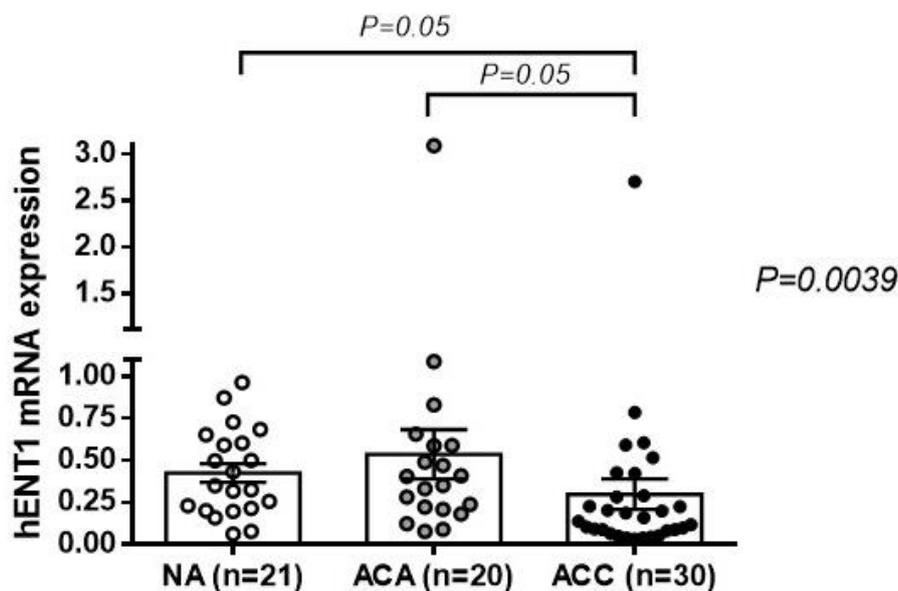


Abbildung 9: Relative *hENT1* mRNA-Expression in normalen Nebennieren (NA), adrenokortikalen Adenomen (ACA) und adrenokortikalen Karzinomen (ACC). Statistische Analyse mit dem Kruskal-Wallis- und Post-Hoc-Test

Bei Betrachtung der ACC-Patienten konnte keine Korrelation zwischen *hENT1* oder *RRM1* mRNA-Expression und sämtlichen untersuchten histopathologischen und

klinischen Parametern zum Zeitpunkt der Erstdiagnose gefunden werden (Tumorgroße, Hormonexpression, ENSAT-Tumorstadium, Weiss-Score, Ki67, Anzahl der Fernmetastasen).

In Beziehung zu klinischen Ereignissen zeigte sich allein bei geringer *hENT1* mRNA-Expression ein Trend zum kürzeren PFS ($p=0,14$, HR=1,87).

3.4 *hENT1* und *RRM1* Proteinexpression in unterschiedlichen Nebennierenrindengeweben

Repräsentative Beispiele für *hENT1*- und *RRM1*-Immunfärbung von normalen und neoplastischen adrenokortikalen FFPE-Proben werden in **Abbildung 10** gezeigt.

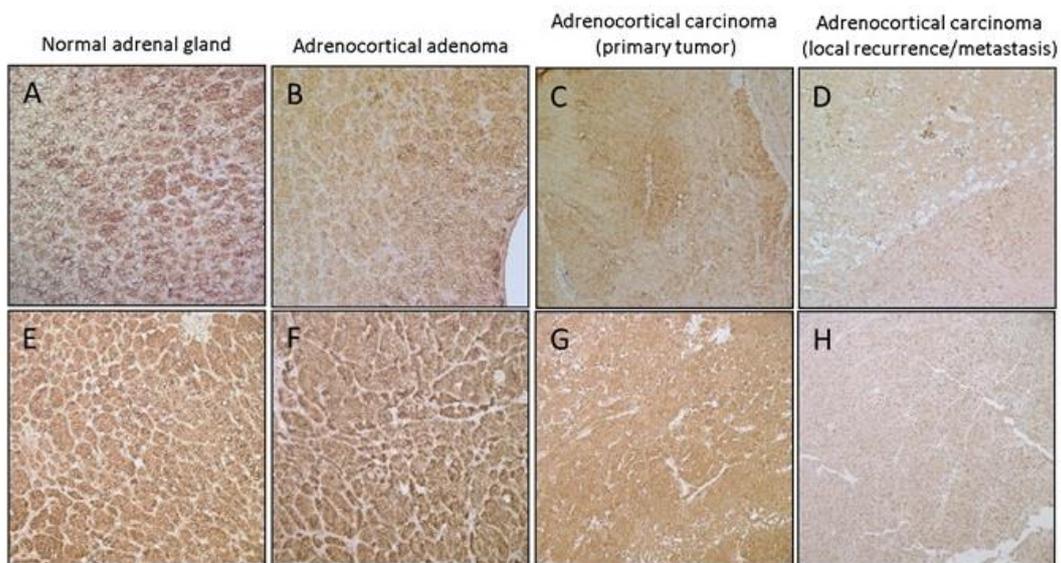


Abbildung 10: Beispiele für *hENT1*-Immunfärbung (A-D). A: normale Nebenniere (zytoplasmatische Färbung h -Score= 2, Membranfärbung: stark positiv); B: Nebennierenrindenadenom (zytoplasmatische Färbung h -Score= 2, Membranfärbung positiv); C: Nebennierenrindenkarzinom, Primärtumor (zytoplasmatische Färbung h -Score= 2, Membranfärbung negativ); D: Nebennierenrindenkarzinom, Metastase (zytoplasmatische Färbung h -Score= 1, Membranfärbung negativ) Beispiele für *RRM1*-Immunfärbung (E-F). E: normale Nebenniere (zytoplasmatische Färbung h -Score= 2); F: Nebennierenrindenadenom (zytoplasmatische Färbung h -Score= 2); G: Nebennierenrindenkarzinom, Primärtumor (zytoplasmatische Färbung h -Score= 2); H: Nebennierenrindenkarzinom, Lokalrezidiv (zytoplasmatische Färbung h -Score= 1)

3.4.1 Zytoplasmatische und membranöse hENT1-Färbung

Die zytoplasmatische Färbung von hENT1 (hENT1c) war mit >50% positiven Zellen in 86% aller Proben sehr homogen (Median 75%, Range 20%-100%). Es zeigte sich eine starke Färbung (h-Score ≥ 2) in 42% der ACCs (127/303), 37% der ACAs (19/51) und in 50% der nNN (9/18; $p=0,63$ mit dem Chi-Quadrat-Test mit absoluten Zahlen). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Färbeintensität von Primärtumoren, Lokalrezidiven und Metastasen (starke Färbung in 98/240, 14/33 und 14/28, $p = 0,65$ mit dem Chi-Quadrat-Test).

Die hENT1-Membranfärbung (hENT1m) wurde in positiv und negativ unterteilt. Ein positives hENT1m wurde in signifikant weniger ACCs (92/303, 30%) als ACAs (36/51, 71%) oder nNN (11/18, 61%; $p < 0,005$ mit dem Chi-Quadrat-Test mit absoluten Zahlen) gefunden (**Abbildung 11**).

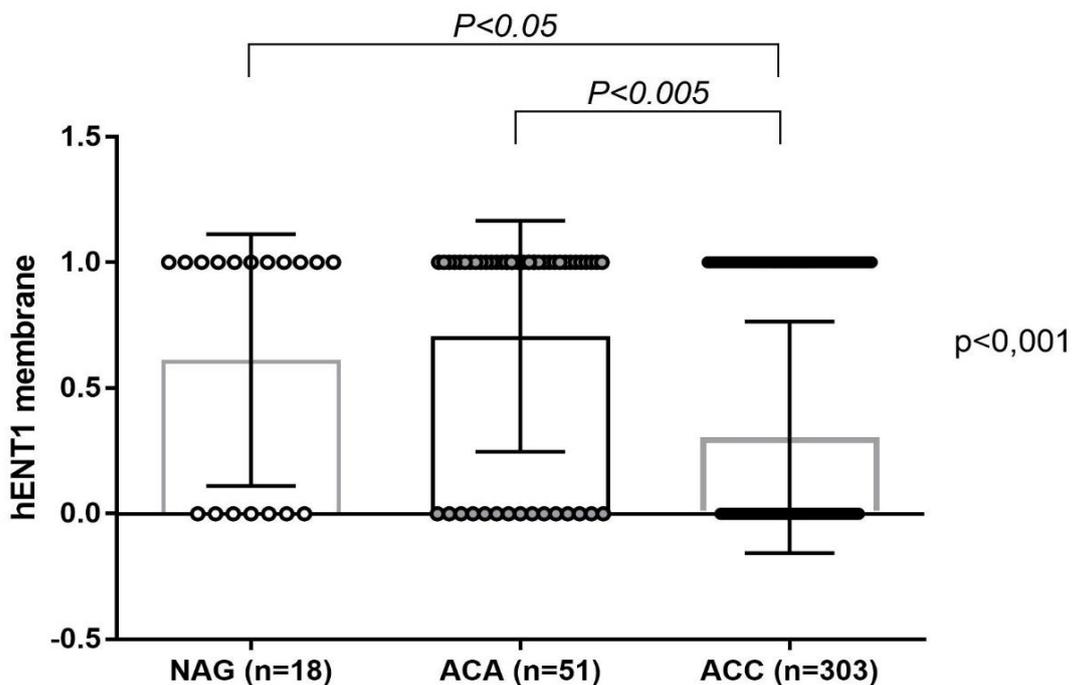


Abbildung 11: Auswertung der hENT1-Membranfärbung in normalen Nebennieren (NAG), Nebennierenrindenadenom (ACA) und Nebennierenrindencarcinom (ACC) ($p < 0,001$ im Kruskal-Wallis-Test per Trend)

In Bezug auf die 303 ACC-Proben wurde eine positive hENT1m-Färbung in tendenziell weniger Metastasen (3/28, 11%) in Vergleich zu Primärtumoren (79/240, 33%) und Lokalrezidiven gefunden (10/33, 30%) ($p = 0,054$ mit dem Chi-Quadrat-Test auf absolute Zahlenwerte, **Abbildung 12**). Ähnliche Ergebnisse konnten bei den 41 zusätzlichen FFPE-Proben von verschiedenen Operationen der gleichen Patienten beobachtet werden.

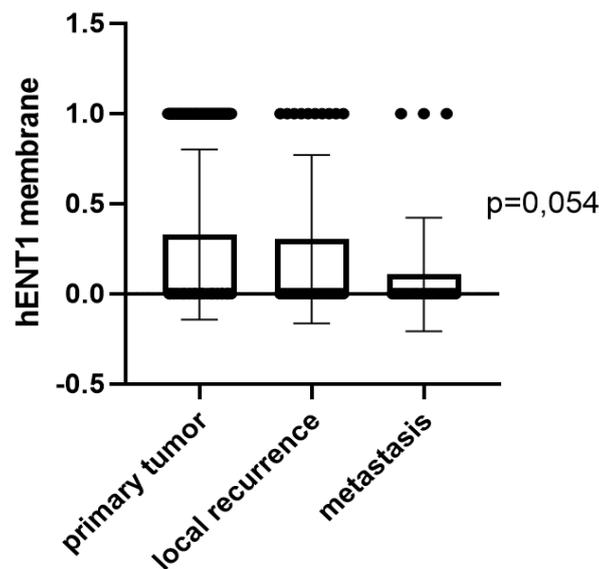


Abbildung 12: Auswertung der hENT1-Membranfärbung Erstoperationen, Lokalrezidiven und Metastasen ($p = 0,054$ im Kruskal-Wallis-Test per Trend)

3.4.2 RRM1-Färbung

Auch RRM1 zeigte mit >50% positiven Zellen in 76% aller Proben eine homogene zytoplasmatische Färbung (Median 70%, Range 15-100%). Sowohl nNN als auch ACTs wiesen eine starke zytoplasmatische Färbung (h-Score ≥ 2) auf (67% der nNN, 71% der ACAs und 70% der ACCs). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Färbung von Primärtumoren, Lokalrezidiven oder Fernmetastasen unter Berücksichtigung der 279 ACC-Gewebeproben für RRM1 gefunden ($p = 0,81$ mit dem Chi-Quadrat-Test).

3.5 Korrelationen zwischen Proteinexpression von hENT1, RRM1 und klinischen Parametern

Es bestanden keine signifikanten Korrelationen zwischen hENT1- oder RRM1-Färbung und den ausgewerteten histopathologischen und klinischen Parametern, die zum Zeitpunkt der Diagnose erhoben wurden.

Für die Korrelationsanalysen zwischen Färbeintensitäten und klinischen Outcome wurden nur ACC-Patienten mit Gewebe aus Erstoperationen am Primärtumor (für hENT1 240 und für RRM1 218) einbezogen. Patienten mit negativer hENT1m Färbung hatten ein signifikant kürzeres krankheitsspezifisches Überleben und PFS unabhängig von der Therapie als Patienten mit positiver hENT1m Färbung (medianes krankheitsspezifisches Überleben 30 vs. 89 Monate, $p = 0,0033$, HR für spezifischen Tod = 1,71, 95%CI = 1,23-2,85; medianes PFS 8 vs. 13 Monate, $p = 0,0172$, HR für Progress = 1,44, 95%CI = 1,08-1,94) (**Abbildung 13 A und B**). Der Einfluss von hENT1m auf das krankheitsspezifische Überleben blieb in der multivariaten Analyse erhalten, die das ENSAT-Tumorstadium, den Resektionsstatus und den Proliferationsmarker Ki67 beinhaltete ($p = 0,009$, HR für Tod = 0,53, 95%CI = 0,33-0,85).

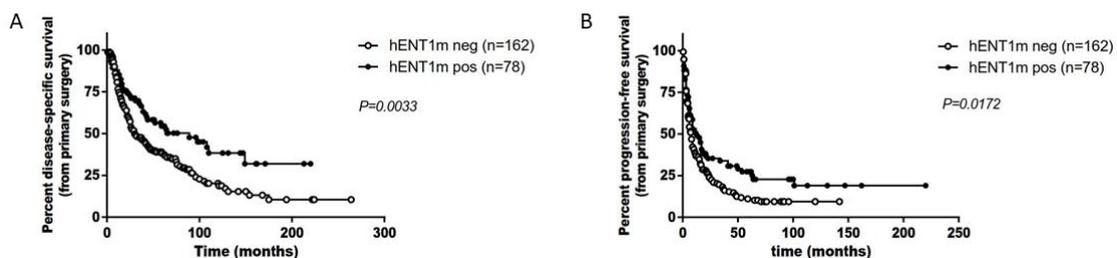


Abbildung 13: Einfluss der membranösen hENT1-Expression auf die Überlebenszeiten: A: Krankheitsspezifisches Überleben und B: Progressionsfreies Überleben ab Zeitpunkt der Erstoperation bei positiver und negativer hENT1m-Expression (Kaplan-Meier Kurven und Log-Rank-Test)

Zwischen der zytoplasmatischen Färbung von RRM1 und hENT1c und dem krankheitsspezifischen Überleben oder PFS wurde kein Zusammenhang gefunden

(krankheitsspezifisches Überleben RRM1: $p = 0,35$, $HR = 1,18$, $95\%CI = 0,83-1,72$; PFS RRM1: $p = 0,67$, $HR = 1,07$, $95\%CI = 0,78-1,48$, krankheitsspezifisches Überleben hENT1c: $p = 0,61$, $HR = 0,922$, $95\%CI = 0,67-1,27$, PFS hENT1c: $p = 0,58$, $HR = 0,922$, $95\%CI = 0,69-1,24$).

3.6 hENT1 und RRM1 Proteinexpression: Vorhersagewert für eine Gemcitabin-basierte Therapie

Von den 114 Patienten, die mit Gem behandelt wurden, stand von 70 Patienten FFPE-Gewebe zur Verfügung. Diese Untergruppe zeigte keine Unterschiede in den Behandlungsregimen und im PFS während der Gem-basierten Therapie (Median 3 Monate bzw. 88 Tage) zur Hauptgruppe. Es wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen hENT1m-Färbung und der PFS unter Therapie gefunden ($p = 0,97$ mit dem Log-Rank-Test, HR für Progression = $0,99$, $95\%CI = 0,57-1,70$, siehe **Abbildung 14**).

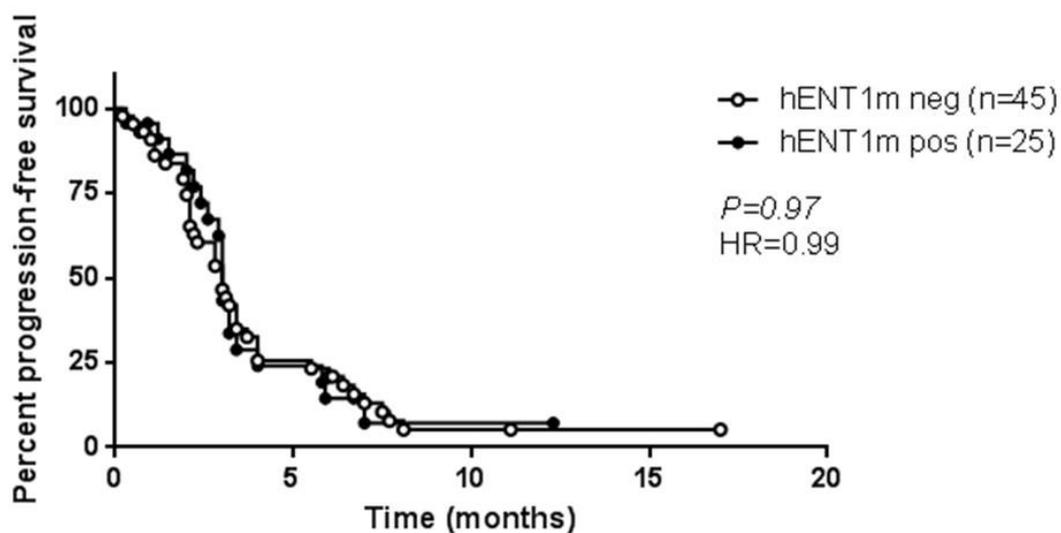


Abbildung 14: Zusammenhang zwischen membranöser hENT1 Färbung und Wirkung der Gem-basierten Therapie bei 70 Patienten mit fortgeschrittenen Nebennierenrindenzinomen (Kaplan-Meier Kurven und Log-Rank-Test)

Es gab keine Korrelation der Therapieresponse von ACC-Patienten mit positiver bzw. negativer Membranfärbung (Progress bei 33/45 bzw. 16/25 Patienten, $p = 0,67$ mit dem Chi-Quadrat-Test).

Auch RRM1 und hENT1c hatten keinen signifikanten Einfluss auf das PFS während der Behandlung (RRM1: $p = 0,52$ mit dem Log-Rank-Test, HR = 0,84, 95%CI = 0,46-1,46; hENT1c: $p = 0,42$ mit dem Log-Rank-Test, HR = 0,83, 95%CI = 0,51-1,34, **Abbildung 15 A und B**) oder auf die Tumorresponse unter Gem-basierter Therapie ($p=0,43$ für RRM1 und $p=0,41$ für hENT1c mit dem Chi-Quadrat-Test).

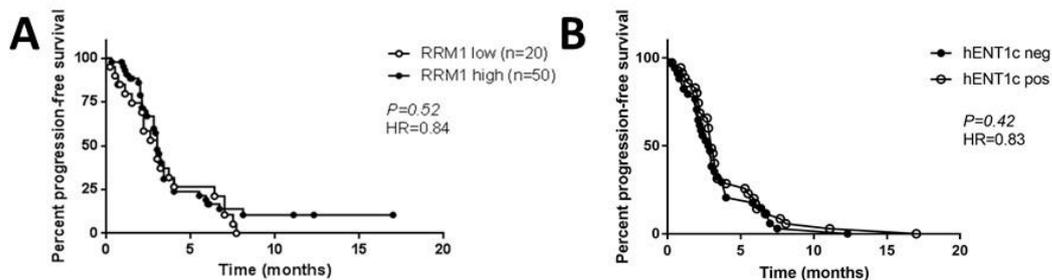


Abbildung 15: Zusammenhang zwischen möglichen prädiktiven Faktoren und Wirkung der Gem-basierten Therapie. Untersuchung von 70 Patienten mit fortgeschrittenen Nebennierenrindenzinomen, dargestellt mithilfe des progressionsfreien Überlebens unter Gem-basierter Therapie (Kaplan-Meyer Kurven und Log-Rank-Test). A) RRM1-Färbung und B) zytoplasmatische hENT1-Färbung

Wegen der möglichen Internalisierung von hENT1 (Nivillac et al. 2011) teilten wir die hENT1-Färbung von Membranen und Zytoplasma in Gruppen ein (Gruppe 1: hENT1c und hENT1m positiv, Gruppe 2: hENT1c positiv und hENT1m negativ, Gruppe 3: hENT1c negativ und hENT1m positiv, Gruppe 4: beides negativ) und untersuchten einen Zusammenhang zur Wirksamkeit von Gem. Auch hier fanden sich keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,12$ bei Log-rank Mantel-Cox Test).

Es fand sich auch keine signifikante Korrelation zwischen der Kombination aus hENT1m und RRM1 und dem PFS während der Gem- basierten Therapie ($p = 0,99$ mit dem Mantel-Cox-Test, **Abbildung 16**).

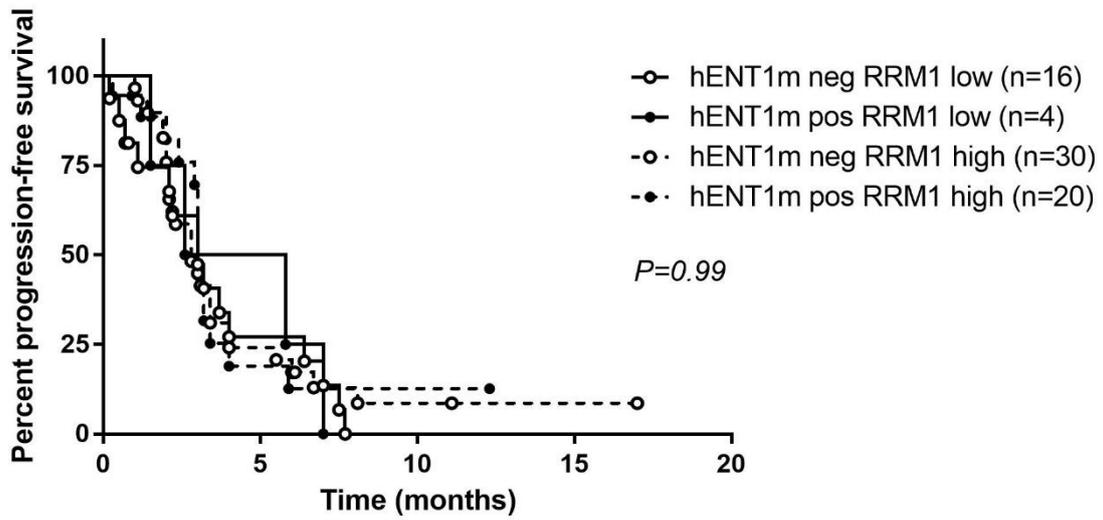


Abbildung 16: Zusammenhang zwischen der Kombination aus hENT1m- und RRM1-Färbung und Wirkung von der Gemcitabin-Therapie bei 70 Patienten mit fortgeschrittenen Nebennierenrindenzinomen (Kaplan-Meyer Kurven und Mantel-Cox-Test)

4 Diskussion

4.1 Gemcitabin beim fortgeschrittenen adrenokortikalen Karzinom

Patienten mit fortgeschrittenem ACC haben eine sehr schlechte Prognose: die Fünf-Jahres-Überlebensrate im metastasierten Stadium liegt bei unter 15% (Fassnacht et al. 2009). Die Erstlinien-Chemotherapie für fortgeschrittene ACCs besteht derzeit aus dem EDP-M-Schema (Berruti et al. 2012a; Fassnacht et al. 2012; Fassnacht et al. 2018; Hoff und Berruti 2016; Mihai 2015). Eine Gem-basierte Therapie wurde als wirksame Therapieoption bei Patienten mit fortgeschrittenem ACC beschrieben und daraufhin als Zweitlinientherapie nach Therapieversagen von EDP-M empfohlen (Fassnacht et al. 2013; Hoff und Berruti 2016; Sperone et al. 2010; Terzolo et al. 2014a). Diese Empfehlung stützt sich auf eine multizentrische Phase-II-Studie an 28 Patienten, bei der 46% der behandelten Patienten einen clinical benefit hatten (Sperone et al. 2010). Die Wirkung von Gem auf das ACC wurde bis jetzt noch nicht durch weitere Studien bestätigt. Die vorliegende Arbeit untersucht die Wirkung einer Gem-basierten Therapie bei Patienten mit fortgeschrittenem ACC an einem sehr großen Patientenkollektiv (n=114). Für die endgültige Publikation wurden die in dieser Arbeit untersuchten Patienten mit einem italienischen Kollektiv zu einer multizentrischen Studie zusammengefasst (Henning et al. 2017). Dies führte zur Untersuchung von 155 Patienten, von denen 10 wegen unvollständigen Folgeuntersuchungen nicht mit in die Studie einbezogen wurden. Mit den 145 Patienten ist die Studie die zweitgrößte Studie über Chemotherapien beim ACC (Fassnacht et al. 2013).

Im fortgeschrittenen und vorbehandelten Tumorstadium ist schon eine Stabilisierung des Tumors über einen längeren Zeitraum bedeutungsvoll (Sperone et al. 2010). Deswegen wurde ein „clinical benefit“ als eine SD oder besseres Ansprechen für mindestens vier Monate als ein Endpunkt unserer Studie definiert. Die aktuelle Untersuchung zeigte einen clinical benefit bei nur 18% der Patienten unter Gem-basierter Behandlung. Dies liegt deutlich unterhalb der zuvor beschriebenen 46% (Sperone et al. 2010) (zum Vergleich der Studien siehe **Tabelle 8**).

Bei Sperone et al. erhielten alle Patienten neben Gem auch Mitotane und ein Fluoropyrimidin, also Capecitabin oder 5-FU. Im nun untersuchten Kollektiv erhielten 102 Patienten zeitgleich Capecitabin und 77 Mitotane. Gem und Capecitabin wurden in beiden Studien identisch dosiert. Während aktuell kein Unterschied im Überleben zwischen Patienten mit und ohne Mitotane gefunden werden konnten, konnte in der multizentrischen Studie ein längeres PFS erreicht werden, wenn die Plasmakonzentration von Mitotane bei >14mg/L und damit im therapeutischen Zielbereich lag (Henning et al. 2017). Das bessere PFS und OS bei Erreichen der Ziel-Plasmakonzentration wird auch bei Mitotane-Monotherapie beobachtet (Megerle et al. 2018).

Patienten mit gleichzeitiger Behandlung mit Capecitabin hatten in der vorliegenden Arbeit einen Trend zum längeren PFS unter Therapie, im größeren Kollektiv war der Vorteil sogar statistisch signifikant (Henning et al. 2017). Diese Beobachtung passt zu den Ergebnissen aus der Pankreaskarzinom-Forschung, in der sich die Kombination aus Gem und Capecitabin effektiver als die Gem-Monotherapie zeigte (Lee et al. 2017; Lim et al. 2015; Neoptolemos et al. 2017). Auch beim Brustkrebs wird diese Kombination als effektive Therapieoption mit wenig Toxizität beschrieben (Lim et al. 2015; Yao et al. 2016). Gem sollten bei weiterer Verwendung bei Patienten mit fortgeschrittenem ACC also in Kombination mit Capecitabin verabreicht werden.

Doch selbst bei ausschließlicher Betrachtung der 102 Patienten, die Gem und Capecitabin in der vorliegenden Untersuchung zusammen erhielten, hatten nur 21% - und damit ebenfalls weit weniger als die vorbeschriebenen 46% - einen clinical benefit.

Die Patienten von Sperone et al. erhielten Gem als Zweit- oder Drittlinientherapie, während in der aktuellen Studie die Patienten Gem als Erst- bis Fünftlinientherapie erhielten. Allerdings wurde hier kein Unterschied der Wirksamkeit zwischen den verschiedenen Behandlungspositionen gefunden. Weitere klinische Grundcharakteristika sind in den Kollektiven sehr ähnlich (bekannte Hormonsekretion bei 51% im aktuellen Kollektiv vs. 50% bei Sperone et al. vs. 50% bei Henning et al., medianes Alter 44 vs. 45 Jahre vs 44, Anteil Frauen/Männer 61%/39% vs. 57%/43% vs

49%/41%)). Die unterschiedlichen Ergebnisse scheinen demnach durch die Anzahl der Patienten begründet zu sein. Das wiederum erlaubt die Aussage, dass die Wirkung einer Gem-basierten Therapie bei Patienten mit ACC entsprechend der vorliegenden Untersuchungen moderat ist.

Tabelle 8: Vergleich der Patientenkollektive von Sperone et al. 2010 und der aktuellen Studie

	Sperone et al. 2010	Aktuelle Studie	Erweiterung Multizentrisch *
Anzahl Patienten	28	114	145
Medianes Alter [Jahre]	45	44	44
Anteil Frauen/Männer [%]	57/43	61/39	59/41
Bekannte Hormonsekretion [%]	50	51	50
Gleichzeitige Behandlung mit Mitotane [%]	100	68	79
Gleichzeitige Behandlung mit Capecitabin [%]	100	89	91
Position von Gem in der Behandlung	2.-3.	1.-5.	1.-5.
Patienten mit clinical benefit [%]	46	18	21
Patienten mit schweren UEs [%]	29	11	11
* (Henning et al. 2017)			

In der aktuellen Studie zeigte Gem eine gute Verträglichkeit. Insgesamt gab es bei neun der 79 Patienten (11%) mit dokumentierten UEs insgesamt elf schwere UEs (CTCAE Grad 3-4). Im Kollektiv von Sperone et al. erlebten acht Patienten (29%) schwere UEs, bei Henning et al. waren es 16 Patienten (11%), im Allgemeinen wurde die Gem-basierte Therapie aber gut toleriert (Henning et al. 2017; Sperone et al. 2010).

Eine SD bzw. einen clinical benefit bei mehr als 18% der Patienten und damit potentiell Gem-überlegen erbrachten neben EDP+M und Strepto+M drei weitere Therapien in Studien: Cixutumumab mit Teme-sirolimus, Axitinib und Figitumumab (Haluska et al. 2010; Naing et al. 2013; O'Sullivan et al. 2014) (siehe **Tabelle 9**, vergleiche **Tabelle 2**, Zweitlinientherapie, Kapitel 1.1.4.4.3).

Tabelle 9: Systemische Therapien mit Gem-überlegener oder -ähnlicher Wirksamkeit in Studien

Medikament	Pat.	Pat. mit clinical benefit	Schwere UEs bei % der Pat.	Quelle
EDP-M ~	131*	67% (8 Wochen)	36% (Ges: 66%*)	(Fassnacht et al. 2012)
Streptozocin-M~	136*	35% (8 Wochen)	27% (Ges: 46%*)	(Fassnacht et al. 2012)
Gemcitabin + Capecitabin	28	46% (4 Monate)	29%	(Sperone et al. 2010)
Gemcitabin-basiert	114	18% (4 Monate)	11% (Ges: 14%*)	Aktuelle Studie
Gemcitabin-basiert	145	21% (4 Monate)	11%	(Henning et al. 2017)
Figitumumab	14	43% (3 Monate)	64%	(Haluska et al. 2010)
Cixutumumab + Temozolomid	26	42% (6 Monate)	42%	(Naing et al. 2013)
Linsitinib	90	16% (12 Wochen)	19%	(Fassnacht et al. 2015)
Axitinib	13	62% (3 Monate)	77%	(O'Sullivan et al. 2014)
Vergleich wirksamer Therapien beim ACC. Abkürzungen: Ges: gesamt (Anzahl der gesamten schwerwiegenden UEs bezogen auf Patientenanzahl), Pat. = Patienten, UEs = Unerwünschte Ereignisse, ~ als Erstlinientherapie eingesetzt, * Patienten, die die Therapie erhalten und deren Response evaluiert werden konnte, *Anzahl aller UEs bezogen auf die Patientenanzahl				

Figitumumab, ein Anti-IGF-1R-Antikörper, wurde an 14 Patienten mit ACC getestet, von denen sechs (43%) eine SD nach drei Monaten erlebten (Haluska et al. 2010). Diese Therapie hat mit neun schwerwiegenden UE (64%) eine deutlich schlechtere Verträglichkeit als Gem. Cixutumumab und Temozolomid, ein weiterer Anti-IGF-1R-Antikörper und ein mTor-Inhibitor (mammalian target of rapamycin), wurden bei 26 Patienten angewandt (Naing et al. 2013). 42% (n=11) zeigten eine SD von über sechs Monaten, allerdings gab es auch hier mit elf Fällen (42%) von schwerwiegenden UEs eine höhere Nebenwirkungsrate als bei Gem.

Die Wirkung von Axitinib, einem VEGFR-Inhibitor (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor), wurde bei 13 Patienten untersucht (O'Sullivan et al. 2014). Acht (62%) Patienten hatten eine SD von mehr als drei Monaten, jedoch trat bei zehn Patienten je mindestens ein schwerwiegendes UE auf (77%). Da bei verschiedenen Therapieversuchen mit VEGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren bei ACCs insgesamt keine OR

gefunden wurde, beurteilten O'Sullivan et al. VEGFR als schlechten Therapieangriffspunkt für das ACC (Berruti et al. 2012b; Kroiss et al. 2012; O'Sullivan et al. 2014).

Alle drei Therapieansätze zeigten in der Untersuchung der kleinen Patientenkollektive ein besseres Ansprechen auf die Therapie, jedoch auch eine deutlich höhere Rate an schweren UEs als Gem. Sie wurden nicht an größeren Populationen an ACC-Patienten getestet.

Linsitinib (OSI-906) wirkt über die Inhibition von IGF-1R und dem Insulinrezeptor. Es zeigte in einer dosis-bestimmenden Phase-I-Studie ein gutes Ansprechen: Zwei von 15 Patienten (13%)

mit ACC zeigten eine partielle Remission (Jones et al. 2015). Linsitinib wurde daraufhin in einer doppelblinden Phase-III-Studie an 90 Patienten mit fortgeschrittenem ACC gegen 49 Patienten getestet, die mit einem Placebo behandelt wurden (Fassnacht et al. 2015). Nach zwölf Wochen hatten 15,6% der Linsitinib-behandelten Patienten einen clinical benefit und nur 19% schwere UEs. Damit liegt die Wirkung leicht unterhalb und die UEs nur leicht oberhalb der der aktuellen Ergebnisse der Gem-basierten Therapie. Allerdings konnte kein Unterschied der Überlebenszeiten der Linsitinib-Gruppe gegenüber der Placebo-Gruppe gefunden werden und die Arbeitsgruppe um Gary D. Hammer sprach keine generelle Empfehlung für die Verwendung von Linsitinib im fortgeschrittenen ACC aus (Fassnacht et al. 2015). Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob Gem gegenüber einem Placebo-behandelten Patientenkollektiv einen Vorteil bieten würde, was in weiteren Studien zu untersuchen wäre.

Weitere Salvage-Therapien wie Trofosfamide (Kroiss et al. 2016) oder Sunitinib (Kroiss et al. 2012) zeigten eine geringere Wirksamkeit als Gem.

Als weitere Alternative für eine Zweitlinientherapie kann eine Therapie mit einer Kombination aus einem Platin-Derivat und Gem erwogen werden:

Eine gepoolte Auswertung zweier Studien an Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom untersuchte insgesamt 503 Patienten, die Gem in Kombination mit

einem Platinderivat oder Gem als Monotherapie erhalten haben. Patienten mit der Kombinationstherapie hatten ein längeres PFS und OS (Heinemann et al. 2007). Eine Gem-Monotherapie wurde bei Patienten, die keine Cisplatin-Standardtherapie bekommen konnten, gegen eine kombinierte Gem-Platin-Therapie untersucht (Zwitter et al. 2010). Hierbei wurde wegen eines schlechten Performance-Status der Patienten die Infusionsdauer von Gem verlängert und die Dosis des Platinderivats im Vergleich zum Standardprotokoll verringert. Dennoch erbrachte die Kombinationstherapie ein längeres PFS und OS als die Monotherapie mit Gem.

Ob diese Kombination der Therapie mit einem Platinderivat ohne Gem überlegen ist oder eventuell sogar EDP-M+Gem eine mögliche Erstlinientherapie sein kann, muss noch untersucht werden.

4.1.1 Prädiktive Faktoren bei Gemcitabin-Therapie

Verschiedene Studien versuchten bereits an anderen Karzinomen, prädiktive Marker für die Wirkung von Gem zu finden. Die große Untereinheit der Ribonukleotidreduktase RRM1 und der Gem-Membrantransporter hENT1 zeigten sich als vielversprechende Kandidaten (siehe hENT1 bzw. RRM1 als prädiktiver Marker bei Gemcitabin-basierter Therapie, Kapitel 1.3.4 bzw. 1.4.3). Im ACC ließ sich für keinen der beiden einen Zusammenhang zur Gem-Wirkung finden. Spezifische mögliche Gründe dafür werden in den Kapiteln hENT1 und RRM1 der Diskussion genannt (Kapitel 4.2 bzw. 4.3).

Allgemein kann es dadurch erklärt werden, dass es weitere mögliche prädiktive Marker gibt; beispielsweise die dCK, die CDA, die Thymidylat-Synthase (TS) und die RRM2. Diese bzw. Kombinationen aus ihnen haben beim ACC möglicherweise einen größeren Einfluss auf die Wirkung von Gem. Einen Einfluss auf andere Malignome untersuchten verschiedene Studien:

Eine vermehrte Expression von dCK bei Pankreaskarzinomen ging bei verschiedenen Studien mit einem verlängerten OS oder einer besseren Ansprechrate auf die Gem-basierte Therapie einher (Ashida et al. 2009; Fujita et al. 2010; Sierzega et al. 2017; Xiong et al. 2016), andere zeigten jedoch keinen Zusammenhang (Farrell et al. 2016).

In vitro besteht eine verminderte Zytotoxizität von Gem bei vermehrter CDA-Expression (Yoshida et al. 2010). Die Übertragbarkeit auf die Wirkung *in vivo* ist noch nicht geklärt. Tibaldi et al. fanden für das fortgeschrittene nicht-kleinzellige Lungenkarzinom ein verlängertes OS und PFS bei niedriger CDA-Aktivität unter Gem plus Platin Therapie (Tibaldi et al. 2012), während Ashida et al. im Pankreaskarzinom keinen Unterschied im Ansprechen von Gem bei unterschiedlicher CDA-Expression ausmachen konnten (Ashida et al. 2009).

Komori et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen der Expression von TS und der Gem-Wirksamkeit. In Pankreaskarzinom-Zelllinien führt eine niedrige Expression zu einer besseren Gem-Wirkung. Pankreaskarzinom-Patienten mit einer verminderten Expression hatten unter einer Gem-Therapie ein verlängertes PFS (Komori et al. 2010).

RRM2 ist die kleine Untereinheit der Ribonucleotid-Reduktase (siehe Ribonukleotidreduktase M1, Aufbau und Funktion, Kapitel 1.4.1). Beim Pankreaskarzinom unter Gem-Therapie konnte bei niedriger RRM2-Expression ein verlängertes PFS beobachtet werden (Farrell et al. 2016; Fujita et al. 2010), andere Studien bestätigen diesen Zusammenhang jedoch nicht (Xie et al. 2012).

Ein Nachteil der hier vorliegenden Studie - bezogen auf die Evaluation der prädiktiven Marker - ist, dass kein Gewebe zur Verfügung stand, welches unmittelbar vor der Gem-Gabe entnommen wurde. Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit und (im Falle eines positiven Ergebnisses) Übertragbarkeit in den späteren klinischen Alltag zu gewährleisten, wurde das frühestmögliche Material verwendet, was von den Patienten zu erhalten war. Von den 70 hENT1- bzw. 68 RRM1-untersuchten Patienten gab es bei 65 bzw. 62 Gewebe aus der ersten Operation am Primarius. Bei drei bzw. zwei Patienten stand als früheste Probe Gewebe eines Rezidivs zur Verfügung und bei zwei bzw. vier Gewebe einer Metastase. Obwohl die Färbungen zwischen Primarius, Rezidiven und Metastasen keinen signifikanten Unterschied aufwiesen, zeigte sich bei hENT1m eine Tendenz zu einer geringeren Färbung. Man kann also nicht ausschließen, dass sich die Tumorgewebe in Bezug auf die Expressionsmuster unterscheiden bzw. bei Fortschreiten der Erkrankung ändern.

Insgesamt konnte kein Unterschied zwischen der Wirkung von Gem und der Position der Gem-basierten Behandlung als Erst- bis Fünftlinientherapie gefunden werden. Es kann also davon ausgegangen werden, dass selbst im Falle einer sich verändernder hENT1- oder RRM1-Expression beim Fortschreiten der Tumorerkrankung kein Unterschied bezogen auf den prädiktiven Wert bestehen würde.

Dieses und die Tatsache, dass Gem nur eine moderate Wirksamkeit im ACC hat, erbringt auch für die Zukunft keine Indikation einer Probenentnahme vor der Gem-Therapie, um mögliche prädiktive Marker zu bestimmen.

4.2 hENT1

Die Aufnahme von Gem in die Zelle wird über verschiedene Transporter gewährleistet (Griffith und Jarvis 1996). hENT1 ist ein ubiquitär vorkommender Membrantransporter, der die wichtigste Rolle im Gem-Transport spielt (Garcia-Manteiga et al. 2003; Handa et al. 2001; Mackey et al. 1998; Mackey et al. 1999). Daher wird seine Expression als möglicher prädiktiver Marker für die Gem-Wirksamkeit gesehen (Nordh et al. 2014).

Studien an Pankreas-, Gallentrakt- oder Blasenkarzinomen sowie dem NSCLC fanden einen Zusammenhang zwischen positiver hENT1-Expression und Gem-Ansprechen (Borbath et al. 2012; Deng et al. 2014; Eto et al. 2013; Farrell et al. 2009; Fujita et al. 2010; Greenhalf et al. 2014; Matsumura et al. 2011; Murata et al. 2013; Nakagawa et al. 2013; Oguri et al. 2007; Santini et al. 2011; Sierzega et al. 2017; Spratlin et al. 2004; Yamada et al. 2016) (siehe auch hENT1 als prädiktiver Marker bei Gemcitabin-basierter Therapie, Kapitel 1.3.4). In der vorliegenden Studie wurden 70 Patienten mit fortgeschrittenem ACC auf die hENT1-Protein-Expression untersucht, die eine Gem-basierte Chemotherapie erhalten haben. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der PFS der Patienten mit hoher vs. geringer hENT1-Expression.

Dieser fehlende Zusammenhang zwischen hENT1-Expression und Gem-Wirksamkeit wird auch in anderen Karzinomen beschrieben (Ashida et al. 2009; Elebro et al. 2016; Ormanns et al. 2014; Poplin et al. 2013; Sinn et al. 2015).

Diese unterschiedlichen Ergebnisse können durch die Einschränkungen der Immunhistochemie (bzw. qRT-PCR bei Untersuchung der mRNA-Expression) begründet sein (siehe Schwächen und Stärken der Studie Kapitel 4.4). Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass auch andere Transporter Gem in die Zelle transportieren können. Garcia-Manteiga et al. zeigten, dass eine relative hCNT1-Überexpression *in vitro* zu einer gesteigerten Gem-Sensitivität von Pankreaskarzinomzelllinien führt (Garcia-Manteiga et al. 2003). Bhutia et al. zeigten ebenfalls an Pankreaskarzinomzelllinien, dass ein Transport von Gem über hCNT1 nur in Gem-sensitiven Zellen und nicht in Gem-resistenten Zellen beobachtet werden konnte (Bhutia et al. 2011).

Ein möglicher Zusammenhang zwischen hCNT1 und Gem-Wirkung im ACC wurde noch nicht untersucht. Es ist jedoch denkbar, dass beide gleichermaßen an dem Gem-Transport beteiligt sind oder hCNT1 sogar einen höheren Anteil im ACC transportiert.

Zu bedenken ist außerdem, dass hENT1 auch unabhängig von der Expression reguliert werden kann (siehe auch Regulierung, Kapitel 1.3.2). Wachstumsfaktoren wie der Epidermal Growth Factor (EGF) erhöhen beispielsweise die hENT1-vermittelte Aufnahme von Substraten in die Zelle (Aymerich et al. 2004).

Die Proteinkinasen C und A (PKC und PKA) können hENT1 phosphorylieren (Reyes et al. 2011). Nach Stimulation der Proteinkinase C kommt es zu einer vermehrten Nukleotid-Aufnahme über hENT1 (Coe et al. 2002; Hughes et al. 2015). hENT1 wird, nachdem es an die Plasmamembran transportiert wurde, teilweise wieder internalisiert (Nivillac et al. 2011). Hughes et al. fanden 2015 heraus, dass nach Aktivierung der PKC die Plasmamembran-Lokalisierung zunimmt und auch die Nukleotid-Aufnahme ansteigt (Hughes et al. 2015). Sie schlussfolgerten aus ihren Beobachtungen, dass die PKC sowohl die Funktion als auch den subzellulären Transport von hENT1 beeinflusst. Eine andere Deutungsmöglichkeit ist, dass nur membranständiges hENT1 funktionsfähig ist und sich die Nukleotid-Aufnahme als Konsequenz aus dem subzellulären Transport steigert.

Ausgehend von dieser Annahme haben wir versucht, das gesamte potentiell mobilisierbare hENT1 der Zellen mit der Gem-Wirkung zu korrelieren. Dafür wurden die membranösen und zytoplasmatischen Färbeintensitäten für hENT1 in Gruppen

zusammengefasst (beide positiv, jeweils eine negativ oder beide negativ). Jedoch ergab auch dieser Kombinations-Score keinen signifikanten Einfluss auf das PFS unter Gem-basierter Therapie.

Eine direkte Regulation der Aktivität von hENT1 erfolgt über intrazelluläres Kalzium, welches die Nukleosid- und Nukleosidanalogen-Aufnahme in einer Kalmodulin-abhängigen Interaktion mit hENT1 moduliert (Bicket et al. 2016). Durch die Auswahl der in der aktuellen Studie verwendeten Verfahren lässt sich nur eine Aussage über die Expression, nicht jedoch über die Aktivität der Proteine treffen.

Schlussfolgernd eignet sich die hENT1-Protein-Expression nicht als prädiktiver Marker für die Gem-Wirksamkeit beim adrenokortikalen Karzinom.

hENT1 wurde in dieser Studie auch auf seinen prognostischen Wert unabhängig von der Therapie untersucht. Dafür wurden Gewebeproben von 240 ACC-Primärtumoren auf die Expression von hENT1-Protein untersucht. Patienten mit einer negativen hENT1m-Färbung wiesen ein signifikant kürzeres krankheitsbezogenes Überleben und PFS nach der Erstoperation auf. Die gleiche Tendenz zeigte sich auch bei der mRNA-Untersuchung. Diese Beobachtung zeigte sich auch in Studien an anderen Karzinomen (Fisher et al. 2013; Kim et al. 2011b), andere Arbeitsgruppen fanden hingegen keinen Zusammenhang zwischen hENT1-Expression und Überlebensdaten (Elebro et al. 2016; Fujita et al. 2010; Greenhalf et al. 2014; Santini et al. 2010; Sasaki et al. 2014; Sinn et al. 2015).

Zusätzlich verglich diese Studie die Expression von hENT1-RNA und -Proteinen in verschiedenen Nebennierenrindengeweben untereinander. Dabei zeigte sich, dass in ACCs signifikant weniger hENT1m und *hENT1*-RNA exprimiert wird als in ACAs oder nNN. Bei Betrachtung der ACC-Proben fand sich tendenziell weniger hENT1m in Metastasen als in Primärtumoren oder Lokalrezidiven ($p=0,054$).

Diese Beobachtung widerspricht jener aus NSCLC und Magenkarzinomen, in denen die hENT1 in Tumorgewebe höher exprimiert war als in normalem Gewebe (Shimakata et al. 2016; Toffalorio et al. 2010). Plotnik et al. fanden außerdem in einer Zelllinie eines Lungen-Adenokarzinoms, dass proliferierende Zellen mehr hENT1 exprimieren (Plotnik

et al. 2012). Auch dieser Zusammenhang konnte in der aktuellen Studie nicht gefunden werden (keine Korrelation zwischen hENT1m und Ki67, $p = 0,85$).

Diese Unterschiede zum ACC werden unter Berücksichtigung folgender Tatsache besonders interessant: eine Herabregulation von hENT1 führt beispielsweise in Pankreaskarzinomzellen zu einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) (Guillen-Gomez et al. 2012; Lee et al. 2014). Bei der EMT verringert sich die Expression von E-Cadherin, während sich die von N-Cadherin steigert. Dies führt zu einer erhöhten Zellmotilität und einem höheren metastatischen Potential (Lee et al. 2014). Es ist daher denkbar, dass ähnliche Mechanismen im ACC bestehen und hENT1 eine Rolle in der Karzinogenese spielt.

Insgesamt ist hENT1m ein vielversprechender prognostischer Biomarker für das ACC und sollte bei der weiteren Erforschung der Tumorgenese in Betracht gezogen werden.

4.3 RRM1

Die RRM1 ist die große Untereinheit der RR, die zusammen mit RRM2 oder p53R2 ein aktives Enzym, die RR, bildet (Besse et al. 2013; Guittet et al. 2001).

Die RR ist zuständig für die de novo Synthese von Desoxyribonukleotiden, indem sie Ribonukleosid-Diphosphate in Desoxyribonukleosid-Diphosphate umwandelt (Besse et al. 2013). Desoxyribonukleotide werden für die DNA-Synthese benötigt. Die RR ist einer der Angriffspunkte von Gem, da sie von dem aktiven Metaboliten dFdCDP gehemmt wird (Heinemann et al. 1990; Wang et al. 2007).

RRM1 wurde in verschiedenen Karzinomen auf eine mögliche Funktion als prädiktiver Marker für die Wirkung von Gem untersucht. Einige Studien zeigen bessere Wirkung Gem-basierter Therapie bei geringer RRM1-Expression (Akita et al. 2009; Ceppi et al. 2006; Dong et al. 2014; Fujita et al. 2010; Matsumura et al. 2017; Nakamura et al. 2010; Qiu und Zhao 2014; Sasaki et al. 2014; Zhao et al. 2012). Bezogen auf einen Zusammenhang zwischen Überlebenszeiten unabhängig von Therapien und der RRM1-

Expression wurden bei positiver RRM1-Expression längere Überlebenszeiten beschrieben (Pesta et al. 2012; Xie et al. 2013; Zheng et al. 2007).

Die vorliegende Studie befasst sich mit der prognostischen und in Bezug auf Gem-basierter Behandlung prädiktiven Funktionen von RRM1 im ACC.

Für die Bestimmung des präventiven Wertes wurden FFPE-Gewebe von 68 Patienten mit ACC, die eine Gem-basierte Therapie erhielten, auf die Expression von RRM1-Protein untersucht. Dabei fand sich kein Zusammenhang zu der Gem-Wirksamkeit. Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen an anderen Tumoren überein (Dong et al. 2010; Eto et al. 2013; Murata et al. 2013; Tantraworasin et al. 2013).

Für die Ermittlung eines Zusammenhangs zwischen RRM1- Expression und Überlebenszeiten und damit der prognostischen Funktion wurde die Protein- bzw. RNA-Expression aus FFPE-Gewebe von 170 und FFT-Gewebe von 30 ACC-Patienten bestimmt und mit dem krankheitsspezifischen Überleben und PFS unabhängig von der Therapie korreliert. Auch hier ließen sich keine signifikanten Ergebnisse beobachten. Viele weitere Studien stellten ebenfalls keinen Zusammenhang fest (Dong et al. 2014; Fisher et al. 2013; Fujita et al. 2010; Harshman et al. 2010; Jakobsen et al. 2013; Kim et al. 2011b; Kim et al. 2011a; Sasaki et al. 2014; Tantraworasin et al. 2013; Wang et al. 2013).

Eine wichtige Frage ist, ob RRM1 allein einen ausreichend großen Einfluss auf Gem-Wirkung und Prognose hat, oder ob die Funktion der RR der entscheidende Parameter ist.

Insgesamt gibt es in der Literatur sehr unterschiedliche Aussagen über die Rolle von RRM1 in Karzinomen, die jeweils eine Funktion unabhängig von der RR suggerieren (siehe **Abbildung 17**).

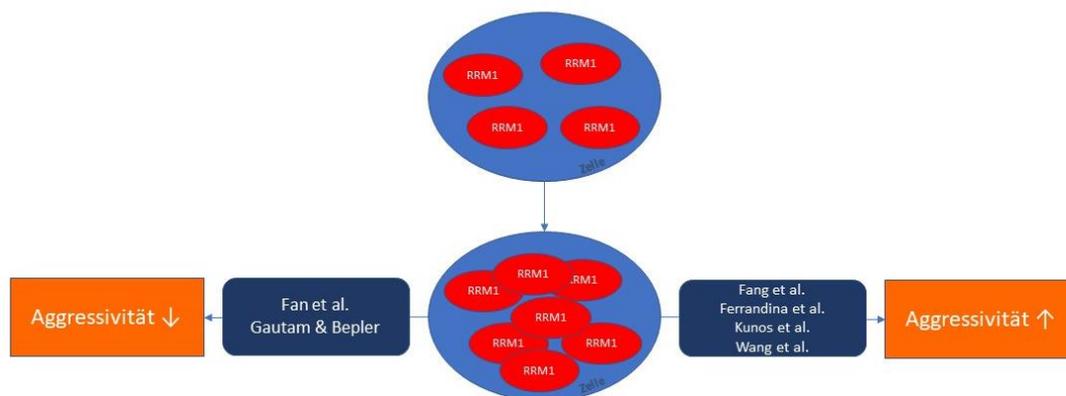


Abbildung 17: Vereinfachte Übersicht über verschiedene Literatur-Aussagen bezüglich der Rolle der RRM1-Expression in der Bildung bzw. Aggressivität von Tumoren, Quellen: (Fan et al. 1997; Fang et al. 2016; Ferrandina et al. 2010; Gautam und Bepler 2006; Kunos et al. 2012; Wang et al. 2013), eigene Abbildung

RRM1 triggert einen G2-Zellzyklus-Checkpoint und führt dadurch zu DNA-Reparatur, Apoptose und verminderter Karzinogenese (Fan et al. 1997; Gautam und Bepler 2006). Gleichzeitig findet sich jedoch eine erhöhte RRM1-Expression in malignen Geweben im Vergleich zum normalen Gewebe beim papillären Schilddrüsenkarzinom und dem Cervixkarzinom (Fang et al. 2016; Kunos et al. 2012) genau wie in aggressiveren Varianten des Ovarialzellkarzinoms im Vergleich zu weniger aggressiven (Ferrandina et al. 2010). Dazu passend beschrieben Fang et al. eine positive Korrelation zwischen RRM1-Expression und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen im papillären Schilddrüsenkarzinom. Fan et al. beobachteten wiederum eine verminderte Fähigkeit zur Bildung von Metastasen bei RRM1 Überexpression (Fan et al. 1997). Wang et al. fanden eine höhere RRM1-Expression in höheren TNM-Stadien des Magenkarzinoms (Wang et al. 2013).

Zur Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs mit der Karzinogenese des ACCs wurden in der aktuellen Studie die Expression von RRM1-Protein und -mRNA in verschiedenen Nebennierenrindengewebe ermittelt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der RRM1-Expression der normalen Nebennieren im Vergleich zu ACCs oder ACAs oder zwischen Primärtumoren, Lokalrezidiven und Metastasen.

Die RRM1-Expression hat im ACC also weder prognostisches noch prädiktives Potential auf die Wirksamkeit Gem-basierter Therapie, noch scheint es eine entscheidende Rolle für die Karzinogenese zu spielen.

RRM1 allein besitzt keine enzymatischen Funktion, sondern nur in Kombination mit RRM2 oder p53R2 (Besse et al. 2013; Guittet et al. 2001). Gem hemmt die RR über RRM1, allerdings nur dann, wenn sie als Holoenzym (also zusammen mit RRM2 oder p53R2) vorliegt (Aye et al. 2015). RRM2 und p53R2 sind im Gegensatz zu RRM1 nicht während des ganzen Zellzyklus in der Zelle vorhanden. Während der S-Phase steigt die Menge an RRM2-Proteinen und nach DNA-Schäden die von p53R2 und dadurch die RR-Aktivität (Engstrom et al. 1985; Håkansson et al. 2006; Mann et al. 1988; Yamaguchi et al. 2001). Während der Mitosephase wird RRM2 degradiert (Chabes und Thelander 2000). Dadurch reguliert die RRM2-Menge die Aktivität der RR während des Zellzyklus und p53R2 nach DNA-Schäden (Chabes und Thelander 2000; Engstrom et al. 1985; Håkansson et al. 2006).

Eine Steigerung der RRM1-Menge bringt keine Aktivitätsänderungen der RR (Engstrom et al. 1985). RRM1 scheint die Funktion der RR nicht zu begrenzen, auch wenn sie nur schwach exprimiert wird. Alle der in der vorliegenden Studie untersuchten Proben zeigten eine positive, also mindestens schwach vorhandene RRM1-Expression. Um eine Aussage über einen möglichen Zusammenhang zwischen Gem-Wirksamkeit oder Karzinogenese und der Funktion der Ribonukleotidreduktase treffen zu können, müsste also die RRM2 und p53R2-Expression untersucht werden.

Grolmusz et al. zeigten bereits, dass es im ACC eine starke Korrelation zwischen RRM2-Expression und dem Proliferationsindex Ki67 gibt (Grolmusz et al. 2016). Die Studie erfolgte jedoch nur an 12 ACC-Proben und beinhaltet keine Korrelation zwischen RRM2-Expression und Überlebenszeiten von Patienten mit ACC mit oder ohne Gem-Behandlung.

4.4 Schwächen und Stärken der Studie

Viele Einschränkungen der vorliegenden Studie erklären sich durch das retrospektive Studiendesign. Beispielsweise ließen sich nur bei 79 der 114 Gem-Patienten Informationen über UEs finden. Die Vergleichbarkeit der Wirkung wird außerdem durch die unterschiedlichen Therapieregimen beeinträchtigt: Die Patienten erhielten unterschiedliche Begleittherapien, bei den mit Mitotane-behandelten Patienten lagen unterschiedliche Plasmakonzentrationen vor und die Therapiereihenfolge war unterschiedlich.

Die Staging-Intervalle waren nicht standardisiert und das Staging selbst wurde nicht einheitlich nach der Recist-Auswertung vorgenommen (Eisenhauer et al. 2009), sondern wurde durch ein interdisziplinäres Team bewertet.

Als Stärke ist die große Fallzahl der Studie bezogen auf die Seltenheit des ACCs hervorzuheben. Zusätzlich ist durch die Wahl des Studiendesigns ein unselektioniertes Kollektiv in die Studie aufgenommen worden und es wurden keine Patienten aufgrund von strengen Einschlusskriterien ausgeschlossen.

Es ergeben sich Einschränkungen durch die gewählten Verfahren der Bestimmung der mRNA- und Protein-Expression. Diese gelten jedoch für alle ähnlichen Studien und sind dennoch die standardmäßig genutzten Verfahren bei vergleichbaren Fragestellungen.

Die Untersuchung der mRNA-Expression erfolgte mit Gewebe, welches makroskopisch frei von Fremdgewebe - wie zum Beispiel Fett - war. Trotzdem ist davon auszugehen, dass auch Nicht-Tumorzellen mitanalysiert wurden. Allgemein erlaubt eine qRT-PCR nur eine gemittelte Aussage über die Expression in inhomogenem Gewebe (Besse et al. 2013).

Der Vorteil der Immunhistochemie ist, dass sich die Färbeintensität und der Prozentsatz, in dem sie vorkommt, evaluieren lassen (Besse et al. 2013). Trotzdem liegt nur eine eingeschränkte Beurteilbarkeit vor. RRM1 ist beispielsweise in verschiedenen Phasen des Zellzyklus unterschiedlich stark exprimiert: Sie ist immer vorhanden, die Proteinmenge steigt allerdings in der S-Phase deutlich an (Håkansson et al. 2006).

Die Reaktivität der verwendeten Antikörper kann durch Produktionsvorgehen, die Aufbereitung und die Titration verändert werden. Unter Umständen kann es daher selbst bei Verwendung des gleichen Antikörpers zu großen Unterschieden der Ergebnisse kommen (Besse et al. 2013). Zusätzlich gibt es unterschiedliche Antikörper für das gleiche Antigen. Die verschiedenen Antikörper gegen hENT1 beispielsweise unterschieden sich in ihrem Vorhersagewert auf die Gem-Wirkung (Sinn et al. 2015; Svrcek et al. 2015). Der monoklonale Maus-Antikörper 10D7G2 führte im Gegensatz zu dem monoklonalen Kaninchen-Antikörper SP120 (Ventana Medical Systems, Tuscon, United States of America) zu signifikanten Korrelationen mit dem OS beim Pankreaskarzinom, ist aber nicht kommerziell erhältlich (Farrell et al. 2009; Greenhalf et al. 2014; Sinn et al. 2015; Svrcek et al. 2015). Der für diese Studie verwendete polyklonale Kaninchen-Antikörper wurde noch nicht an den gleichen Geweben mit einem anderen Antikörper gegen hENT1 bezüglich der Gem-Wirksamkeit verglichen.

Auch die Wahl der ausgewerteten Zellbestandteile ist nicht standardisiert (Kern, Membran oder Zytoplasma). Nicht allen Studien definierten, in welcher Gewichtung sie die Bestandteile in die Auswertungen einbezogen. In dieser Studie wurde für die Untersuchung von hENT1 sowohl die zytoplasmatische als auch membranöse Färbeintensitäten untersucht, für RRM1 nur die zytoplasmatische. In keinem Fall zeigte sich ein Einfluss auf die Gem-Wirkung. Allgemein gibt es für die Auswertung verschiedene, sehr unterschiedliche Scoring-Systeme (Besse et al. 2013; Sinn et al. 2015). Die vorliegende Studie nutzt einen Score, der sowohl die Intensität der Färbung als auch den Anteil der entsprechenden Färbung einbezieht. Dieser semiquantitative h-Score findet in leicht geänderter Form auch in anderen Studien Verwendung (He et al. 2015; Olaussen et al. 2006; Ronchi et al. 2009). Eine Alternative, um sowohl Intensität der Färbung als auch Prozentanteile anzugeben, ist eine einfache Multiplikation aus beiden (Elebro et al. 2016). Viele Studien teilen die Schnitte auch danach ein, ob ein bestimmter Prozentteil der Färbung positiv oder negativ ist (Borbath et al. 2012; Kim et al. 2011a; Murata et al. 2013; Qiu und Zhao 2014). Beispielsweise nahmen Farrell et al. eine Einteilung zwischen „high“ und „no“ vor, je nachdem, ob eine starke Intensität oder eine fehlende Färbung in mehr als 50% der Zellen vorlag (Farrell et al. 2009).

Das Einbeziehen von genauen Prozentzahlen macht den endgültigen Score genauer, allerdings auch störanfälliger, wenn man nur einen kleinen Teil inhomogenen Gewebes untersuchen kann. Das kommt vor allem bei Tissue Micro Arrays vor. Deswegen wurden in dieser Studie erst Standardgewebeschnitte gefärbt und eine sehr homogene Färbung von hENT1 und RRM1 gefunden. Das ermöglichte die weitere Auswertung von Tissue Micro Arrays. Eine Schwäche des verwendeten Scoring-Systems ist, dass kleine Anteile mit geringer Färbung keinen Einfluss auf den h-Score haben. Es ist aber denkbar, dass kleine Tumoranteile mit geringem hENT1-Färbung unter Gem-Therapie einen Selektionsvorteil haben, der zu einem Wachstum eben dieser Anteile führt (vergleiche Spratlin et al. 2004). Dieser denkbare Einfluss kann mit dem aktuell verwendeten Score nicht untersucht werden. Spratlin et al. nutzten daher einen anderen Ansatz: Sie teilten ihre Studienpopulation in zwei Gruppen ein. Eine Gruppe hatte eine homogen-positive hENT1-Färbung, die andere Gruppe hatte Anteile von 10-100% negativer Färbung. Obwohl sie nur 21 Patienten mit Pankreaskarzinomen untersuchten, fanden sie ein signifikant kürzeres Überleben bei Patienten mit Anteilen negativer Färbung unter Gem-Therapie (Spratlin et al. 2004).

4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Gem hat bei einem sehr guten Nebenwirkungsprofil eine moderate Wirksamkeit im fortgeschrittenen ACC. Besser wirksame Alternativen mit annehmbaren Raten an schweren Nebenwirkungen sind bis jetzt noch nicht bekannt. Deswegen wird eine Gem-basierte Therapie als mögliche Zweit- oder Drittlinientherapie in den aktuellen Leitlinien empfohlen (Fassnacht et al. 2018). Empfehlenswert ist eine Kombination mit Capecitabin, da sich hier ein Trend zu einer besseren Wirkung zeigte. Alternativ ist ein neuer Therapieansatz mit Gem und einem Platinderivat oder eventuell sogar EDP-M+Gem zu erwägen.

Um die prädiktiven Marker für Gem beim ACC genauer zu bestimmen, sollten in der Zukunft weitere Gem-korrelierte Proteine bestimmt werden, z.B. neben der Expression von hENT1 auch die von hCNT1. Daraus kann ein kombinierter Score gebildet werden,

dessen Aussagekraft über die potentielle Gem-Wirkung hENT1 allein überlegen sein könnte.

In der aktuellen Studie ließ sich kein Einfluss von der RRM1-Expression auf die Gem-Wirkung feststellen und es war im ACC immer exprimiert. Eine Steigerung der RRM1-Menge veränderte in anderen Untersuchungen die Aktivität der RR nicht (siehe RRM1, Kapitel 4.3). Daher ist zu erwägen, statt RRM1 RRM2 und p53M2 zu bestimmen, um einen Zusammenhang zwischen der Funktion der Ribonukleotidreduktase und der Wirkung von Gem aufzuzeigen.

hENT1 ist ein vielversprechender prognostischer Marker unabhängig von der Gem-Therapie für das ACC. Es gibt Hinweise darauf, dass hENT1 an der Tumorgenese beteiligt sein könnte. Dieses ist in weiteren Studien zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Das Nebennierenrindenzarzinom (Adrenocortical Carcinoma, ACC) ist eine seltene Erkrankung mit sehr schlechter Prognose vor allem in fortgeschrittenen Stadien. Therapeutisch werden systemische Chemotherapien angewandt, wobei nach Therapieversagen der Standardtherapie mit Etoposid, Doxorubicin und Cisplatin in Kombination mit Mitotane keine Therapie bei einer größeren Fallzahl von Patienten positiv evaluiert ist. Aktuell wird eine Gemcitabin (Gem) -basierte Zweitlinientherapie empfohlen, nachdem sie in einer Phase-II-Studie mit 28 Patienten mit fortgeschrittenem ACC eine gute Wirksamkeit bei Patienten zeigte. Die aktuelle Studie untersuchte die Wirkung von Gem an ACC-Patienten an einem sehr großen Kollektiv (n=114 bzw. n=145 im multizentrischen Kollektiv der veröffentlichten Studie, davon erhielten 102 bzw. 132 Patienten eine Kombination mit Capecitabin) und ist damit nach der FIRM-ACT Studie, die die o.g. Standardtherapie etablierte, die größte Studie zur Untersuchung der Wirkung von Chemotherapeutika beim ACC. Trotz des retrospektiven Studiendesigns der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, sehr detaillierte klinische Daten zu akquirieren.

Insgesamt zeigte sich eine moderate Wirkung von Gem. 18% der Patienten hatten eine progressionsfreie Zeit (PFS) von vier oder mehr Monaten nach Beginn der Gem-basierten Therapie, aber es gab keinen Fall objektiven Ansprechens. Gem wies eine tendenziell bessere Wirkung bei der Kombination mit Capecitabin auf ($p = 0,07$). Die Therapie war insgesamt gut verträglich. Von den Patienten mit dokumentierten Nebenwirkungen wurden nur bei 11% schwerwiegende unerwünschte Ereignisse beobachtet. Damit ist die Toxizität deutlich geringer als in den alternativen Therapiemöglichkeiten.

Ein weiteres Ziel der Studie war die Erfassung möglicher prädiktiver molekularer Marker für die Wirkung von Gem sowie prognostischer Marker für Überlebenszeiten im ACC auf mRNA und Proteinebene mithilfe der qRT-PCR und Immunhistochemie. Der human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) gilt als wichtigster Transporter für die Aufnahme von Gem in die Zelle und möglicher prädiktiver Marker für Gem. Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen Proteinexpression sowohl im Zytoplasma (hENT1c) als

auch auf der Membran (hENT1m) und der PFS unter Gem-basierter Therapie finden. Es fand sich signifikant weniger *hENT1*-mRNA und hENT1m in ACCs als in Adenomen und normalen Nebennierengewebe (*hENT1*-mRNA: $p=0,0039$, hENT1m: $p<0,005$) und tendenziell weniger hENT1m in Metastasen im Vergleich zu Primärtumoren und Rezidiven ($p=0,054$). Patienten mit niedrigem hENT1m hatten ein kürzeres krankheitsspezifisches Überleben und PFS unabhängig von der Therapie (medianes krankheitsspezifisches Überleben 30 vs. 89 Monate, $p = 0,0033$; medianes PFS 8 vs. 13 Monate, $p = 0,0172$).

Die große Untereinheit M1 (RRM1) der Ribonukleotidreduktase (RR) wird in anderen Tumoren wiederholt mit der Gem-Wirkung assoziiert. Die RR ist an der de-novo-Synthese von Desoxyribonukleosid-Triphosphaten beteiligt und wird durch Gem gehemmt. Zusätzlich beschreiben einige Studien einen Unterschied der RRM1-Expression zwischen normalem und malignem Gewebe. In unserer Studie unterschied sich die RRM1-Expression nicht zwischen den Nebennierenrindengeweben und hatte keinen Einfluss auf Überlebenszeiten von Patienten mit fortgeschrittenem ACC sowohl mit Gem-basierter Therapie als auch unabhängig von der Therapie.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Gem-basierte Therapie eine moderate Wirkung bei Patienten mit fortgeschrittenem ACC zeigte und deshalb wegen der geringen Nebenwirkungsrate und fehlender Alternativen auch in den aktuellen Leitlinien als sehr plausible Zweitlinientherapie in Betracht gezogen wird. Weder hENT1 noch RRM1 zeigten Potential als prädiktive molekulare Marker für die Wirkung von Gem im ACC. hENT1 wies jedoch eine prognostische Rolle auf und seine Expression unterschied sich in unterschiedlichen Nebennierenrindengeweben. Es sollte demnach auch in Hinblick auf die Tumorgenese des ACCs weiter erforscht werden.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Diagnostisches Vorgehen bei einer Raumforderung im Bereich der Nebennierenloge für Patienten ohne Vorgeschichte eines extraadrenalen Malignoms. Abkürzungen: ACA: adrenokortikales Adenom, ACC: adrenokortikales Karzinom; Quelle: (nach Fassnacht et al. 2016)	3
Abbildung 2: Stoffwechsel von Gem	12
Abbildung 3: Äußere Einflüsse auf die Membran-Expression von hENT1; Abkürzungen: TK = Tyrosinkinase, DZNeP = enhancer of Zeste homolog-2-Inhibitor 3-deazaneplanocin A	17
Abbildung 4: Modell von hENT1 als prädiktiven Marker für Gem: Wirkung von Gem in Abhängigkeit von der hENT1-Expression; eigene Abbildung	18
Abbildung 5: Funktion der Ribonukleotidreduktase (RR): Die RR katalysiert die Umwandlung von Ribonukleosid-Diphosphaten (rNDP) in Desoxyribonukleosid-Diphosphate (dNDP). Diese können in Form von Triphosphaten (dNTP) in die DNA eingebaut werden. Weitere Abkürzungen: RRM1= große Untereinheit M1, RRM2 = kleine Untereinheit 2, dFdCDP = 2',2'-Difluoro-Desoxycytidin-Diphosphat (Gem-Metabolit), eigene Abbildung	20
Abbildung 6: Modell einer Ribonukleotidreduktase mit je zwei allosterischen Bindungszentren pro RRM1-Protein: einer "activity site" und einer "specificity site", eigene Abbildung	21
Abbildung 7: Wirksamkeit der Gem-basierten Therapie bei 114 Patienten mit adrenokortikalem Karzinom, progressionsfreies Überleben und erkrankungsspezifisches Überleben in Kaplan-Meyer Kurven	38
Abbildung 8: Dauer des Clinical Benefits (stable disease oder partial response über mindestens vier Monate) bei 21 Patienten unter Gemcitabin-basierter Therapie	39
Abbildung 9: Relative hENT1 mRNA-Expression in normalen Nebennieren (NA), adrenokortikalen Adenomen (ACA) und adrenokortikalen Karzinomen (ACC). Statistische Analyse mit dem Kruskal-Wallis- und Post-Hoc-Test	41

Abbildung 10: Beispiele für **hENT1-Immunfärbung** (A-D). A: normale Nebenniere (zytoplasmatische Färbung h-Score= 2, Membranfärbung: stark positiv); B: Nebennierenrindenadenom (zytoplasmatische Färbung h-Score= 2, Membranfärbung positiv); C: Nebennierenrindenzinom, Primärtumor (zytoplasmatische Färbung h-Score= 2, Membranfärbung negativ); D: Nebennierenrindenzinom, Metastase (zytoplasmatische Färbung h-Score= 1, Membranfärbung negativ) Beispiele für **RRM1-Immunfärbung** (E-F). E: normale Nebenniere (zytoplasmatische Färbung h-Score= 2); F: Nebennierenrindenadenom (zytoplasmatische Färbung h-Score= 2); G: Nebennierenrindenzinom, Primärtumor (zytoplasmatische Färbung h-Score= 2); H: Nebennierenrindenzinom, Lokalrezidiv (zytoplasmatische Färbung h-Score= 1) __ 42

Abbildung 11: Auswertung der hENT1-Membranfärbung in normalen Nebennieren (NAG), Nebennierenrindenadenom (ACA) und Nebennierenrindenzinom (ACC) ($p < 0,001$ im Kruskal-Wallis-Test per Trend) _____ 43

Abbildung 12: Auswertung der hENT1-Membranfärbung Erstoperationen, Lokalrezidiven und Metastasen ($p = 0,054$ im Kruskal-Wallis-Test per Trend) _____ 44

Abbildung 13: Einfluss der membranösen hENT1-Expression auf die Überlebenszeiten: A: Krankheitsspezifisches Überleben und B: Progressionsfreies Überleben ab Zeitpunkt der Erstoperation bei positiver und negativer hENT1m-Expression (Kaplan-Meyer Kurven und Log-Rank-Test) _____ 45

Abbildung 14: Zusammenhang zwischen membranöser hENT1 Färbung und Wirkung der Gem-basierten Therapie bei 70 Patienten mit fortgeschrittenen Nebennierenrindenzinomen (Kaplan-Meyer Kurven und Log-Rank-Test)_____ 46

Abbildung 15: Zusammenhang zwischen möglichen prädiktiven Faktoren und Wirkung der Gem-basierten Therapie. Untersuchung von 70 Patienten mit fortgeschrittenen Nebennierenrindenzinomen, dargestellt mithilfe des progressionsfreien Überlebens unter Gem-basierter Therapie (Kaplan-Meyer Kurven und Log-Rank-Test). A) RRM1-Färbung und B) zytoplasmatische hENT1-Färbung _____ 47

Abbildung 16: Zusammenhang zwischen der Kombination aus hENT1m- und RRM1-Färbung und Wirkung von der Gemcitabin-Therapie bei 70 Patienten mit

fortgeschrittenen Nebennierenrindencarcinomen (Kaplan-Meyer Kurven und Mantel-Cox-Test) _____ 48

Abbildung 17: Vereinfachte Übersicht über verschiedene Literatur-Aussagen bezüglich der Rolle der RRM1-Expression in der Bildung bzw. Aggressivität von Tumoren, Quellen: (Fan et al. 1997; Fang et al. 2016; Ferrandina et al. 2010; Gautam und Bepler 2006; Kunos et al. 2012; Wang et al. 2013), eigene Abbildung _____ 61

7 Literaturverzeichnis

- Abbruzzese, J. L.; Grunewald, R.; Weeks, E. A.; Gravel, D.; Adams, T.; Nowak, B. et al. (1991): A phase I clinical, plasma, and cellular pharmacology study of gemcitabine. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 9 (3), S. 491–498. DOI: 10.1200/JCO.1991.9.3.491.
- Abiven, Gwenaëlle; Coste, Joel; Groussin, Lionel; Anract, Philippe; Tissier, Frederique; Legmann, Paul et al. (2006): Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer. Poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91 (7), S. 2650–2655. DOI: 10.1210/jc.2005-2730.
- Ahluwalia, Deepti; Schaaper, Roel M. (2013): Hypermutability and error catastrophe due to defects in ribonucleotide reductase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (46), S. 18596–18601. DOI: 10.1073/pnas.1310849110.
- Akita, H.; Zheng, Z.; Takeda, Y.; Kim, C.; Kittaka, N.; Kobayashi, S. et al. (2009): Significance of RRM1 and ERCC1 expression in resectable pancreatic adenocarcinoma. In: *Oncogene* 28 (32), S. 2903–2909. DOI: 10.1038/onc.2009.158.
- Al-Haddad, Sahar; Zhang, Zi; Leygue, Etienne; Snell, Linda; Huang, Aihua; Niu, Yulian et al. (1999): Psoriasin (S100A7) Expression and Invasive Breast Cancer. In: *The American Journal of Pathology* 155 (6), S. 2057–2066. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65524-1.
- Alvino, Gina M.; Collingwood, David; Murphy, John M.; Delrow, Jeffrey; Brewer, Bonita J.; Raghuraman, M. K. (2007): Replication in hydroxyurea. It's a matter of time. In: *Molecular and cellular biology* 27 (18), S. 6396–6406. DOI: 10.1128/MCB.00719-07.
- Andersson, R.; Aho, U.; Nilsson, B. I.; Peters, G. J.; Pastor-Anglada, M.; Rasch, W.; Sandvold, M. L. (2009): Gemcitabine chemoresistance in pancreatic cancer: Molecular mechanisms and potential solutions. In: *Scandinavian journal of gastroenterology* 44 (7), S. 782–786. DOI: 10.1080/00365520902745039.
- Ashida, Reiko; Nakata, Bunzo; Shigekawa, Minoru; Mizuno, Nobumasa; Sawaki, Akira; Hirakawa, Kosei et al. (2009): Gemcitabine sensitivity-related mRNA expression in

- endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy of unresectable pancreatic cancer. In: *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 28, S. 83. DOI: 10.1186/1756-9966-28-83.
- Assié, Guillaume; Letouze, Eric; Fassnacht, Martin; Jouinot, Anne; Luscap, Windy; Barreau, Olivia et al. (2014): Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. In: *Nature genetics* 46 (6), S. 607–612. DOI: 10.1038/ng.2953.
- Aubert, Sebastien; Wacrenier, Agnes; Leroy, Xavier; Devos, Patrick; Carnaille, Bruno; Proye, Charles et al. (2002): Weiss system revisited: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 49 adrenocortical tumors. In: *The American journal of surgical pathology* 26 (12), S. 1612–1619.
- Avan, Amir; Crea, Francesco; Paolicchi, Elisa; Funel, Niccola; Galvani, Elena; Marquez, Victor E. et al. (2012): Molecular mechanisms involved in the synergistic interaction of the EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A with gemcitabine in pancreatic cancer cells. In: *Molecular cancer therapeutics* 11 (8), S. 1735–1746. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0037.
- Aye, Y.; Li, M.; Long, M. J. C.; Weiss, R. S. (2015): Ribonucleotide reductase and cancer. Biological mechanisms and targeted therapies. In: *Oncogene* 34 (16), S. 2011–2021. DOI: 10.1038/onc.2014.155.
- Aymerich, Ivette; Pastor-Anglada, Marcal; Casado, F. Javier (2004): Long term endocrine regulation of nucleoside transporters in rat intestinal epithelial cells. In: *The Journal of general physiology* 124 (5), S. 505–512. DOI: 10.1085/jgp.200409086.
- Baldwin, Stephen A.; Beal, P. R.; Yao, S. Y.; King, A. E.; Cass, C. E.; Young, J. D. (2004): The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 447 (5), S. 735–743. DOI: 10.1007/s00424-003-1103-2.
- Baldwin, Stephen A.; Mackey, John R.; Cass, Carol E.; Young, James D. (1999): Nucleoside transporters. Molecular biology and implications for therapeutic development. In: *Molecular Medicine Today* 5 (5), S. 216–224. DOI: 10.1016/S1357-4310(99)01459-8.
- Bergman, Andries M.; Pinedo, Herbert M.; Peters, Godefridus J. (2002): Determinants of resistance to 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine). In: *Drug Resistance Updates* 5 (1), S. 19–33. DOI: 10.1016/S1368-7646(02)00002-X.

- Berruti, A.; Baudin, Eric; Gelderblom, H.; Haak, H. R.; Porpiglia, F.; Fassnacht, Martin; Pentheroudakis, G. (2012a): Adrenal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. In: *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 23 Suppl 7, vii131-8. DOI: 10.1093/annonc/mds231.
- Berruti, Alfredo; Fassnacht, Martin; Haak, Harm; Else, Tobias; Baudin, Eric; Sperone, Paola et al. (2014): Prognostic role of overt hypercortisolism in completely operated patients with adrenocortical cancer. In: *European urology* 65 (4), S. 832–838. DOI: 10.1016/j.eururo.2013.11.006.
- Berruti, Alfredo; Sperone, Paola; Ferrero, Anna; Germano, Antonina; Ardito, Arianna; Priola, Adriano Massimiliano et al. (2012b): Phase II study of weekly paclitaxel and sorafenib as second/third-line therapy in patients with adrenocortical carcinoma. In: *European journal of endocrinology* 166 (3), S. 451–458. DOI: 10.1530/EJE-11-0918.
- Besse, B.; Olaussen, K. A.; Soria, J. C. (2013): ERCC1 and RRM1: Ready for Prime Time? In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (8), S. 1050–1060. DOI: 10.1200/JCO.2012.43.0900.
- Beuschlein, Felix; Weigel, Jens; Saeger, Wolfgang; Kroiss, Matthias; Wild, Vanessa; Daffara, Fulvia et al. (2015): Major prognostic role of Ki67 in localized adrenocortical carcinoma after complete resection. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 100 (3), S. 841–849. DOI: 10.1210/jc.2014-3182.
- Bhutia, Yangzom D.; Hung, Sau Wai; Patel, Bhavi; Lovin, Dylan; Govindarajan, Rajgopal (2011): CNT1 expression influences proliferation and chemosensitivity in drug-resistant pancreatic cancer cells. In: *Cancer research* 71 (5), S. 1825–1835. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2736.
- Bicket, Alex; Mehrabi, Pedram; Naydenova, Zlatina; Wong, Victoria; Donaldson, Logan; Stagljar, Igor; Coe, Imogen R. (2016): Novel regulation of equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) by receptor-stimulated Ca²⁺-dependent calmodulin binding. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 310 (10), C808-20. DOI: 10.1152/ajpcell.00243.2015.

- Borbath, I.; Verbrugge, L.; Lai, R.; Gigot, J. F.; Humblet, Y.; Piessevaux, H.; Sempoux, C. (2012): Human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) expression is a potential predictive tool for response to gemcitabine in patients with advanced cholangiocarcinoma. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 48 (7), S. 990–996. DOI: 10.1016/j.ejca.2011.11.006.
- Bouffard, David Y.; Laliberté, Josée; Momparler, Richard L. (1993): Kinetic studies on 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) with purified human deoxycytidine kinase and cytidine deaminase. In: *Biochemical pharmacology* 45 (9), S. 1857–1861. DOI: 10.1016/0006-2952(93)90444-2.
- Ceppi, P.; Volante, M.; Novello, S.; Rapa, I.; Danenberg, K. D.; Danenberg, P. V. 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. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 17 (12), S. 1818–1825. DOI: 10.1093/annonc/mdl300.
- Chabes, A.; Thelander, L. (2000): Controlled protein degradation regulates ribonucleotide reductase activity in proliferating mammalian cells during the normal cell cycle and in response to DNA damage and replication blocks. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (23), S. 17747–17753. DOI: 10.1074/jbc.M000799200.
- Coe, Imogen; Zhang, Ying; McKenzie, Tamara; Naydenova, Zlatina (2002): PKC regulation of the human equilibrative nucleoside transporter, hENT1. In: *FEBS letters* 517 (1-3), S. 201–205.
- Damaraju, Vijaya L.; Scriver, Tara; Mowles, Delores; Kuzma, Michelle; Ryan, Anderson J.; Cass, Carol E.; Sawyer, Michael B. (2014): Erlotinib, gefitinib, and vandetanib inhibit human nucleoside transporters and protect cancer cells from gemcitabine cytotoxicity. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 20 (1), S. 176–186. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2293.
- Deng, T.; Pan, H.; Han, R.; Huang, D.; Li, H.; Zhou, L. et al. (2014): Gemcitabine sensitivity factors, hENT1 and RRM1 as potential prognostic biomarker for advanced biliary

- tract cancer. In: *International journal of clinical and experimental medicine* 7 (12), S. 5041–5049.
- Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (Leitlinienprogramm Onkologie) (2013): S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 1.0 (AWMF Registernummer: 032-0100L). Online verfügbar unter <http://leitlinienprogrammmonkologie.de/Leitlinien.7.0.html>, zuletzt geprüft am 14.06.2017.
- Dong, S.; Guo, A. L.; Chen, Z. H.; Wang, Z.; Zhang, X. C.; Huang, Y. et al. (2010): RRM1 single nucleotide polymorphism -37C-->A correlates with progression-free survival in NSCLC patients after gemcitabine-based chemotherapy. In: *Journal of hematology & oncology* 3, S. 10. DOI: 10.1186/1756-8722-3-10.
- Dong, X.; Hao, Y.; Wei, Y.; Yin, Q.; Du, J.; Zhao, X. (2014): Response to first-line chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer according to RRM1 expression. In: *PloS one* 9 (3), e92320. DOI: 10.1371/journal.pone.0092320.
- Eisenhauer, E. A.; Therasse, P.; Bogaerts, J.; Schwartz, L. H.; Sargent, D.; Ford, R. et al. (2009): New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 45 (2), S. 228–247. DOI: 10.1016/j.ejca.2008.10.026.
- Elebro, Jacob; Ben Dror, Liv; Heby, Margareta; Nodin, Bjorn; Jirstrom, Karin; Eberhard, Jakob (2016): Prognostic effect of hENT1, dCK and HuR expression by morphological type in periampullary adenocarcinoma, including pancreatic cancer. In: *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 55 (3), S. 286–296. DOI: 10.3109/0284186X.2015.1075663.
- Else, Tobias; Kim, Alex C.; Sabolch, Aaron; Raymond, Victoria M.; Kandathil, Asha; Caoili, Elaine M. et al. (2014): Adrenocortical carcinoma. In: *Endocrine reviews* 35 (2), S. 282–326. DOI: 10.1210/er.2013-1029.
- Engstrom, Y.; Eriksson, S.; Jildevik, I.; Skog, S.; Thelander, L.; Tribukait, B. (1985): Cell cycle-dependent expression of mammalian ribonucleotide reductase. Differential regulation of the two subunits. In: *The Journal of biological chemistry* 260 (16), S. 9114–9116.

- Erdogan, Ilknur; Deutschbein, Timo; Jurowich, Christian; Kroiss, Matthias; Ronchi, Cristina L.; Quinkler, Marcus et al. (2013): The role of surgery in the management of recurrent adrenocortical carcinoma. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 98 (1), S. 181–191. DOI: 10.1210/jc.2012-2559.
- Eto, K.; Kawakami, H.; Kuwatani, M.; Kudo, T.; Abe, Y.; Kawahata, S. et al. (2013): Human equilibrative nucleoside transporter 1 and Notch3 can predict gemcitabine effects in patients with unresectable pancreatic cancer. In: *British journal of cancer* 108 (7), S. 1488–1494. DOI: 10.1038/bjc.2013.108.
- Fan, H.; Huang, A.; Villegas, C.; Wright, J. A. (1997): The R1 component of mammalian ribonucleotide reductase has malignancy-suppressing activity as demonstrated by gene transfer experiments. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (24), S. 13181–13186.
- Fang, Zejun; Song, Rui; Gong, Chaoju; Zhang, Xiaomin; Ren, Guoping; Li, Jinfan et al. (2016): Ribonucleotide reductase large subunit M1 plays a different role in the invasion and metastasis of papillary thyroid carcinoma and undifferentiated thyroid carcinoma. In: *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37 (3), S. 3515–3526. DOI: 10.1007/s13277-015-4175-7.
- Farrell, J. J.; Elsaleh, H.; Garcia, M.; Lai, R.; Ammar, A.; Regine, W. F. et al. (2009): Human equilibrative nucleoside transporter 1 levels predict response to gemcitabine in patients with pancreatic cancer. In: *Gastroenterology* 136 (1), S. 187–195. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.09.067.
- Farrell, James J.; Moughan, Jennifer; Wong, Jonathan L.; Regine, William F.; Schaefer, Paul; Benson, Al B. 3rd et al. (2016): Precision Medicine and Pancreatic Cancer: A Gemcitabine Pathway Approach. In: *Pancreas* 45 (10), S. 1485–1493. DOI: 10.1097/MPA.0000000000000710.
- Fassnacht, Martin; Arlt, Wiebke; Bancos, Irina; Dralle, Henning; Newell-Price, John; Sahdev, Anju et al. (2016): Management of adrenal incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in collaboration with the

- European Network for the Study of Adrenal Tumors. In: *European journal of endocrinology* 175 (2), G1-G34. DOI: 10.1530/EJE-16-0467.
- Fassnacht, Martin; Berruti, Alfredo; Baudin, Eric; Demeure, Michael J.; Gilbert, Jill; Haak, Harm et al. (2015): Linsitinib (OSI-906) versus placebo for patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: a double-blind, randomised, phase 3 study. In: *The Lancet. Oncology* 16 (4), S. 426–435. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)70081-1.
- Fassnacht, Martin; Dekkers, Olaf; Else, Tobias; Baudin, Eric; Berruti, Alfredo; Krijger, Ronald R. de et al. (2018): European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines on the Management of Adrenocortical Carcinoma in Adults, in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. In: *European journal of endocrinology*. DOI: 10.1530/EJE-18-0608.
- Fassnacht, Martin; Johanssen, S.; Fenske, W.; Weismann, D.; Agha, A.; Beuschlein, Felix et al. (2010): Improved survival in patients with stage II adrenocortical carcinoma followed up prospectively by specialized centers. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 95 (11), S. 4925–4932. DOI: 10.1210/jc.2010-0803.
- Fassnacht, Martin; Johanssen, Sarah; Quinkler, Marcus; Bucsky, Peter; Willenberg, Holger S.; Beuschlein, Felix et al. (2009): Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma: proposal for a Revised TNM Classification. In: *Cancer* 115 (2), S. 243–250. DOI: 10.1002/cncr.24030.
- Fassnacht, Martin; Kroiss, M.; Allolio, Bruno (2013): Update in adrenocortical carcinoma. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 98 (12), S. 4551–4564. DOI: 10.1210/jc.2013-3020.
- Fassnacht, Martin; Terzolo, M.; Allolio, Bruno; Baudin, Eric; Haak, H.; Berruti, A. et al. (2012): Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma. In: *The New England journal of medicine* 366 (23), S. 2189–2197. DOI: 10.1056/NEJMoa1200966.
- Ferrandina, Gabriella; Mey, Valentina; Nannizzi, Sara; Ricciardi, Simona; Petrillo, Marco; Ferlini, Cristiano et al. (2010): Expression of nucleoside transporters, deoxycytidine

- kinase, ribonucleotide reductase regulatory subunits, and gemcitabine catabolic enzymes in primary ovarian cancer. In: *Cancer chemotherapy and pharmacology* 65 (4), S. 679–686. DOI: 10.1007/s00280-009-1073-y.
- Fisher, S. B.; Fisher, K. E.; Patel, S. H.; Lim, M. G.; Kooby, D. A.; El-Rayes, B. F. et al. (2013): Excision repair cross-complementing gene-1, ribonucleotide reductase subunit M1, ribonucleotide reductase subunit M2, and human equilibrative nucleoside transporter-1 expression and prognostic value in biliary tract malignancy. In: *Cancer* 119 (2), S. 454–462. DOI: 10.1002/cncr.27739.
- Fujita, H.; Ohuchida, K.; Mizumoto, K.; Itaba, S.; Ito, T.; Nakata, K. et al. (2010): Gene expression levels as predictive markers of outcome in pancreatic cancer after gemcitabine-based adjuvant chemotherapy. In: *Neoplasia (New York, N.Y.)* 12 (10), S. 807–817.
- Garcia-Manteiga, J.; Molina-Arcas, M.; Casado, F. J.; Mazo, A.; Pastor-Anglada, M. (2003): Nucleoside transporter profiles in human pancreatic cancer cells. role of hCNT1 in 2',2'-difluorodeoxycytidine- induced cytotoxicity. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9 (13), S. 5000–5008.
- Gaujoux, Sebastien; Grabar, Sophie; Fassnacht, Martin; Ragazzon, Bruno; Launay, Pierre; Libe, Rossella et al. (2011): beta-catenin activation is associated with specific clinical and pathologic characteristics and a poor outcome in adrenocortical carcinoma. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17 (2), S. 328–336. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2006.
- Gautam, Ashish; Bepler, Gerold (2006): Suppression of lung tumor formation by the regulatory subunit of ribonucleotide reductase. In: *Cancer research* 66 (13), S. 6497–6502. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4462.
- Giordano, Thomas J.; Thomas, Dafydd G.; Kuick, Rork; Lizyness, Michelle; Misek, David E.; Smith, Angela L. et al. (2003): Distinct Transcriptional Profiles of Adrenocortical Tumors Uncovered by DNA Microarray Analysis. In: *The American Journal of Pathology* 162 (2), S. 521–531. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63846-1.

- Goeckenjan, G.; Sitter, H.; Thomas, M.; Branscheid, D.; Flentje, M.; Griesinger, F. et al. (2011): Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. Interdisziplinäre S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Krebsgesellschaft--Kurzfassung. In: *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 65 (8), e51-75. DOI: 10.1055/s-0030-1256562.
- Golden, Sherita H.; Robinson, Karen A.; Saldanha, Ian; Anton, Blair; Ladenson, Paul W. (2009): Clinical review: Prevalence and incidence of endocrine and metabolic disorders in the United States: a comprehensive review. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 94 (6), S. 1853–1878. DOI: 10.1210/jc.2008-2291.
- Greenhalf, W.; Ghaneh, P.; Neoptolemos, J. P.; Palmer, D. H.; Cox, T. F.; Lamb, R. F. et al. (2014): Pancreatic cancer hENT1 expression and survival from gemcitabine in patients from the ESPAC-3 trial. In: *Journal of the National Cancer Institute* 106 (1), djt347. DOI: 10.1093/jnci/djt347.
- Griffith, Douglas A.; Jarvis, Simon M. (1996): Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1286 (3), S. 153–181. DOI: 10.1016/S0304-4157(96)00008-1.
- Grolmusz, Vince Kornel; Karaszi, Katalin; Micsik, Tamas; Toth, Eszter Angela; Meszaros, Katalin; Karvaly, Gellert et al. (2016): Cell cycle dependent RRM2 may serve as proliferation marker and pharmaceutical target in adrenocortical cancer. In: *American journal of cancer research* 6 (9), S. 2041–2053.
- Gross, David J.; Munter, Gabriel; Bitan, Menachem; Siegal, Tali; Gabizon, Alberto; Weitzen, Ronny et al. (2006): The role of imatinib mesylate (Glivec) for treatment of patients with malignant endocrine tumors positive for c-kit or PDGF-R. In: *Endocrine-related cancer* 13 (2), S. 535–540. DOI: 10.1677/erc.1.01124.
- Guarino, E.; Salguero, I.; Kearsey, S. E. (2014): Cellular regulation of ribonucleotide reductase in eukaryotes. In: *Seminars in cell & developmental biology* 30, S. 97–103. DOI: 10.1016/j.semcdb.2014.03.030.
- Guillen-Gomez, Elena; Pinilla-Macua, Itziar; Perez-Torras, Sandra; Choi, Doo-Sup; Arce, Yolanda; Ballarin, Jose A. et al. (2012): New role of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) in epithelial-to-mesenchymal transition in renal

- tubular cells. In: *Journal of cellular physiology* 227 (4), S. 1521–1528. DOI: 10.1002/jcp.22869.
- Guittet, O.; Hakansson, P.; Voevodskaya, N.; Fridd, S.; Graslund, A.; Arakawa, H. et al. (2001): Mammalian p53R2 protein forms an active ribonucleotide reductase in vitro with the R1 protein, which is expressed both in resting cells in response to DNA damage and in proliferating cells. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (44), S. 40647–40651. DOI: 10.1074/jbc.M106088200.
- Håkansson, Pelle; Hofer, Anders; Thelander, Lars (2006): Regulation of mammalian ribonucleotide reduction and dNTP pools after DNA damage and in resting cells. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (12), S. 7834–7841. DOI: 10.1074/jbc.M512894200.
- Haluska, Paul; Worden, Frank; Olmos, David; Yin, Donghua; Schteingart, David; Batzel, Gretchen N. et al. (2010): Safety, tolerability, and pharmacokinetics of the anti-IGF-1R monoclonal antibody figitumumab in patients with refractory adrenocortical carcinoma. In: *Cancer chemotherapy and pharmacology* 65 (4), S. 765–773. DOI: 10.1007/s00280-009-1083-9.
- Handa, M.; Choi, D. S.; Caldeiro, R. M.; Messing, R. O.; Gordon, A. S.; Diamond, I. (2001): Cloning of a novel isoform of the mouse NBMPR-sensitive equilibrative nucleoside transporter (ENT1) lacking a putative phosphorylation site. In: *Gene* 262 (1-2), S. 301–307.
- Harshman, Lauren C.; Bepler, Gerold; Zheng, Zhong; Higgins, John P.; Allen, Genevera I.; Srinivas, Sandy (2010): Ribonucleotide reductase subunit M1 expression in resectable, muscle-invasive urothelial cancer correlates with survival in younger patients. In: *BJU international* 106 (11), S. 1805–1811. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2010.09327.x.
- He, Yu-Wen; Zhao, Mei-Ling; Yang, Xin-Yun; Zeng, Jun; Deng, Qiu-Hua; He, Jian-Xing (2015): Prognostic value of ERCC1, RRM1, and TS proteins in patients with resected non-small cell lung cancer. In: *Cancer chemotherapy and pharmacology* 75 (4), S. 861–867. DOI: 10.1007/s00280-015-2714-y.

- Heinemann, V.; Hertel, L. W.; Grindey, G. B.; Plunkett, W. (1988): Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2',2'-difluorodeoxycytidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. In: *Cancer research* 48 (14), S. 4024–4031.
- Heinemann, V.; Labianca, R.; Hinke, A.; Louvet, C. (2007): Increased survival using platinum analog combined with gemcitabine as compared to single-agent gemcitabine in advanced pancreatic cancer: pooled analysis of two randomized trials, the GERCOR/GISCAD intergroup study and a German multicenter study. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 18 (10), S. 1652–1659. DOI: 10.1093/annonc/mdm283.
- Heinemann, V.; Xu, Y. Z.; Chubb, S.; Sen, A.; Hertel, L. W.; Grindey, G. B.; Plunkett, W. (1990): Inhibition of ribonucleotide reduction in CCRF-CEM cells by 2',2'-difluorodeoxycytidine. In: *Molecular pharmacology* 38 (4), S. 567–572.
- Heinemann, V.; Xu, Y. Z.; Chubb, S.; Sen, A.; Hertel, L. W.; Grindey, G. B.; Plunkett, W. (1992): Cellular elimination of 2',2'-difluorodeoxycytidine 5'-triphosphate: a mechanism of self-potential. In: *Cancer research* 52 (3), S. 533–539.
- Henning, Judith E. K.; Deutschbein, Timo; Altieri, Barbara; Steinhauer, Sonja; Kircher, Stefan; Sbiera, Silviu et al. (2017): Gemcitabine-Based Chemotherapy in Adrenocortical Carcinoma: A Multicenter Study of Efficacy and Predictive Factors. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 102 (11), S. 4323–4332. DOI: 10.1210/jc.2017-01624.
- Hertel, L. W.; Boder, G. B.; Kroin, J. S.; Rinzel, S. M.; Poore, G. A.; Todd, G. C.; Grindey, G. B. (1990): Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine). In: *Cancer research* 50 (14), S. 4417–4422.
- Hoff, Ana O.; Berruti, Alfredo (2016): 5th International ACC Symposium: Future and Current Therapeutic Trials in Adrenocortical Carcinoma. In: *Hormones & cancer* 7 (1), S. 29–35. DOI: 10.1007/s12672-015-0241-2.
- Honeywell, Richard J.; van Ruiz Haperen, Veronique W. T.; Veerman, Gijsbert; Smid, Kees; Peters, Godefridus J. (2015): Inhibition of thymidylate synthase by 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine (Gemcitabine) and its metabolite 2',2'-difluoro-2'-

- deoxyuridine. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 60, S. 73–81. DOI: 10.1016/j.biocel.2014.12.010.
- Hughes, Scott J.; Cravetchi, Xenia; Vilas, Gonzalo; Hammond, James R. (2015): Adenosine A1 receptor activation modulates human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) activity via PKC-mediated phosphorylation of serine-281. In: *Cellular signalling* 27 (5), S. 1008–1018. DOI: 10.1016/j.cellsig.2015.02.023.
- Jakobsen, J. N.; Santoni-Rugiu, E.; Ravn, J.; Sorensen, J. B. (2013): Intratumour variation of biomarker expression by immunohistochemistry in resectable non-small cell lung cancer. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 49 (11), S. 2494–2503. DOI: 10.1016/j.ejca.2013.04.003.
- Jones, Robin L.; Kim, Edward S.; Nava-Parada, Pilar; Alam, Salma; Johnson, Faye M.; Stephens, Andrew W. et al. (2015): Phase I study of intermittent oral dosing of the insulin-like growth factor-1 and insulin receptors inhibitor OSI-906 in patients with advanced solid tumors. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21 (4), S. 693–700. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0265.
- Kebebew, Electron; Reiff, Emily; Duh, Quan-Yang; Clark, Orlo H.; McMillan, Alex (2006): Extent of Disease at Presentation and Outcome for Adrenocortical Carcinoma: Have We Made Progress? In: *World journal of surgery* 30 (5), S. 872–878. DOI: 10.1007/s00268-005-0329-x.
- Kerkhofs, T. M.; Baudin, Eric; Terzolo, M.; Allolio, Bruno; Chadarevian, R.; Mueller, H. H. et al. (2013): Comparison of two mitotane starting dose regimens in patients with advanced adrenocortical carcinoma. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 98 (12), S. 4759–4767. DOI: 10.1210/jc.2013-2281.
- Kim, D.; Jung, W.; Koo, J. S. (2011a): The expression of ERCC1, RRM1, and BRCA1 in breast cancer according to the immunohistochemical phenotypes. In: *Journal of Korean medical science* 26 (3), S. 352–359. DOI: 10.3346/jkms.2011.26.3.352.
- Kim, R.; Tan, A.; Lai, K. K.; Jiang, J.; Wang, Y.; Rybicki, L. A.; Liu, X. (2011b): Prognostic roles of human equilibrative transporter 1 (hENT-1) and ribonucleoside reductase

- subunit M1 (RRM1) in resected pancreatic cancer. In: *Cancer* 117 (14), S. 3126–3134. DOI: 10.1002/cncr.25883.
- Kjellin, Hanna; Johansson, Henrik; Hoog, Anders; Lehtio, Janne; Jakobsson, Per-Johan; Kjellman, Magnus (2014): Differentially expressed proteins in malignant and benign adrenocortical tumors. In: *PloS one* 9 (2), e87951. DOI: 10.1371/journal.pone.0087951.
- Koc, Ahmet; Wheeler, Linda J.; Mathews, Christopher K.; Merrill, Gary F. (2004): Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (1), S. 223–230. DOI: 10.1074/jbc.M303952200.
- Komori, Shuji; Osada, Shinji; Mori, Ryutaro; Matsui, Satoshi; Sanada, Yuichi; Tomita, Hiroyuki et al. (2010): Contribution of thymidylate synthase to gemcitabine therapy for advanced pancreatic cancer. In: *Pancreas* 39 (8), S. 1284–1292. DOI: 10.1097/MPA.0b013e3181dec17d.
- Kroiss, Matthias; Deutschbein, Timo; Schlotelburg, Wiebke; Ronchi, Cristina L.; Neu, Bruno; Muller, Hans-Helge et al. (2016): Salvage Treatment of Adrenocortical Carcinoma with Trofosfamide. In: *Hormones & cancer* 7 (3), S. 211–218. DOI: 10.1007/s12672-016-0260-7.
- Kroiss, Matthias; Quinkler, Marcus; Johanssen, Sarah; van Erp, Nielka P.; Lankheet, Nienke; Pollinger, Alexander et al. (2012): Sunitinib in refractory adrenocortical carcinoma: a phase II, single-arm, open-label trial. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97 (10), S. 3495–3503. DOI: 10.1210/jc.2012-1419.
- Kroiss, Matthias; Quinkler, Marcus; Lutz, Werner K.; Allolio, Bruno; Fassnacht, Martin (2011): Drug interactions with mitotane by induction of CYP3A4 metabolism in the clinical management of adrenocortical carcinoma. In: *Clinical endocrinology* 75 (5), S. 585–591. DOI: 10.1111/j.1365-2265.2011.04214.x.
- Kunos, C. A.; Radivoyevitch, T.; Kresak, A.; Dawson, D.; Jacobberger, J.; Yang, B.; Abdul-Karim, F. W. (2012): Elevated ribonucleotide reductase levels associate with suppressed radiochemotherapy response in human cervical cancers. In: *International journal of gynecological cancer : official journal of the International*

- Gynecological Cancer Society* 22 (9), S. 1463–1469. DOI: 10.1097/IGC.0b013e318270577f.
- Lau, Sean K.; Weiss, Lawrence M. (2009): The Weiss system for evaluating adrenocortical neoplasms: 25 years later. In: *Human pathology* 40 (6), S. 757–768. DOI: 10.1016/j.humpath.2009.03.010.
- Lee, Hee Seung; Chung, Moon Jae; Park, Jeong Youp; Bang, Seungmin; Park, Seung Woo; Kim, Ho Gak et al. (2017): A randomized, multicenter, phase III study of gemcitabine combined with capecitabine versus gemcitabine alone as first-line chemotherapy for advanced pancreatic cancer in South Korea. In: *Medicine* 96 (1), e5702. DOI: 10.1097/MD.0000000000005702.
- Lee, Y.; Koay, E. J.; Zhang, W.; Qin, L.; Kirui, D. K.; Hussain, F. et al. (2014): Human equilibrative nucleoside transporter-1 knockdown tunes cellular mechanics through epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. In: *PloS one* 9 (10), e107973. DOI: 10.1371/journal.pone.0107973.
- Libé, R.; Borget, I.; Ronchi, Cristina L.; Zaggia, B.; Kroiss, M.; Kerkhofs, T. et al. (2015): Prognostic factors in stage III-IV adrenocortical carcinomas (ACC): an European Network for the Study of Adrenal Tumor (ENSAT) study. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 26 (10), S. 2119–2125. DOI: 10.1093/annonc/mdv329.
- Lim, Jae Yun; Cho, Jang Ho; Lee, Se Joon; Lee, Dong Ki; Yoon, Dong Sup; Cho, Jae Yong (2015): Gemcitabine Combined with Capecitabine Compared to Gemcitabine with or without Erlotinib as First-Line Chemotherapy in Patients with Advanced Pancreatic Cancer. In: *Cancer research and treatment : official journal of Korean Cancer Association* 47 (2), S. 266–273. DOI: 10.4143/crt.2013.158.
- Mackey, J. R.; Mani, R. S.; Selner, M.; Mowles, D.; Young, J. D.; Belt, J. A. et al. (1998): Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. In: *Cancer research* 58 (19), S. 4349–4357.
- Mackey, J. R.; Yao, S. Y.; Smith, K. M.; Karpinski, E.; Baldwin, Stephen A.; Cass, C. E.; Young, J. D. (1999): Gemcitabine transport in xenopus oocytes expressing

- recombinant plasma membrane mammalian nucleoside transporters. In: *Journal of the National Cancer Institute* 91 (21), S. 1876–1881.
- Mann, G. J.; Musgrove, E. A.; Fox, R. M.; Thelander, L. (1988): Ribonucleotide reductase M1 subunit in cellular proliferation, quiescence, and differentiation. In: *Cancer research* 48 (18), S. 5151–5156.
- Matsumura, Nagahide; Nakamura, Yasushi; Kohjimoto, Yasuo; Inagaki, Takeshi; Nanpo, Yoshihito; Yasuoka, Hironao et al. (2011): The prognostic significance of human equilibrative nucleoside transporter 1 expression in patients with metastatic bladder cancer treated with gemcitabine-cisplatin-based combination chemotherapy. In: *BJU international* 108 (2 Pt 2), E110-6. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2010.09932.x.
- Matsumura, Nagahide; Nakamura, Yasushi; Kohjimoto, Yasuo; Nishizawa, Satoshi; Kikkawa, Kazuro; Iba, Akinori et al. (2017): Overexpression of ribonucleotide reductase subunit M1 protein predicts shorter survival in metastatic bladder cancer patients treated with gemcitabine-containing combination chemotherapy. In: *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association* 24 (3), S. 230–235. DOI: 10.1111/iju.13274.
- Megerle, Felix; Herrmann, Wiebke; Schloetelburg, Wiebke; Ronchi, Cristina L.; Pulzer, Alina; Quinkler, Marcus et al. (2018): Mitotane Monotherapy in Patients With Advanced Adrenocortical Carcinoma. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 103 (4), S. 1686–1695. DOI: 10.1210/jc.2017-02591.
- Mihai, R. (2015): Diagnosis, treatment and outcome of adrenocortical cancer. In: *The British journal of surgery* 102 (4), S. 291–306. DOI: 10.1002/bjs.9743.
- Mori, R.; Ishikawa, T.; Ichikawa, Y.; Taniguchi, K.; Matsuyama, R.; Ueda, M. et al. (2007): Human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with the chemosensitivity of gemcitabine in human pancreatic adenocarcinoma and biliary tract carcinoma cells. In: *Oncology reports* 17 (5), S. 1201–1205.
- Murata, A.; Amano, R.; Yamada, N.; Kimura, K.; Yashiro, M.; Nakata, B.; Hirakawa, K. (2013): Prognostic predictive values of gemcitabine sensitivity-related gene products for unresectable or recurrent biliary tract cancer treated with gemcitabine alone. In: *World journal of surgical oncology* 11, S. 117. DOI: 10.1186/1477-7819-11-117.

- Naing, A.; Lorusso, P.; Fu, S.; Hong, D.; Chen, H. X.; Doyle, L. A. et al. (2013): Insulin growth factor receptor (IGF-1R) antibody cixutumumab combined with the mTOR inhibitor temsirolimus in patients with metastatic adrenocortical carcinoma. In: *British journal of cancer* 108 (4), S. 826–830. DOI: 10.1038/bjc.2013.46.
- Nakagawa, N.; Murakami, Y.; Uemura, K.; Sudo, T.; Hashimoto, Y.; Kondo, N.; Sueda, T. (2013): Combined analysis of intratumoral human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) and ribonucleotide reductase regulatory subunit M1 (RRM1) expression is a powerful predictor of survival in patients with pancreatic carcinoma treated with adjuvant gemcitabine-based chemotherapy after operative resection. In: *Surgery* 153 (4), S. 565–575. DOI: 10.1016/j.surg.2012.10.010.
- Nakahira, Shin; Nakamori, Shoji; Tsujie, Masanori; Takeda, Setsuo; Sugimoto, Keishi; Takahashi, Yuji et al. (2008): Pretreatment with S-1, an oral derivative of 5-fluorouracil, enhances gemcitabine effects in pancreatic cancer xenografts. In: *Anticancer research* 28 (1A), S. 179–186.
- Nakamura, Jun; Kohya, Naohiko; Kai, Keita; Ohtaka, Kazuma; Hashiguchi, Kazuyoshi; Hiraki, Masatsugu et al. (2010): Ribonucleotide reductase subunit M1 assessed by quantitative double-fluorescence immunohistochemistry predicts the efficacy of gemcitabine in biliary tract carcinoma. In: *International Journal of Oncology* 37 (4), S. 845–852.
- Neoptolemos, John P.; Palmer, Daniel H.; Ghaneh, Paula; Psarelli, Eftychia E.; Valle, Juan W.; Halloran, Christopher M. et al. (2017): Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4). A multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. In: *The Lancet* 389 (10073), S. 1011–1024. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)32409-6.
- Nivillac, Nicole M. I.; Bacani, Joseph; Coe, Imogen R. (2011): The life cycle of human equilibrative nucleoside transporter 1. From ER export to degradation. In: *Experimental cell research* 317 (11), S. 1567–1579. DOI: 10.1016/j.yexcr.2011.03.008.

- Nordh, S.; Ansari, D.; Andersson, R. (2014): hENT1 expression is predictive of gemcitabine outcome in pancreatic cancer. a systematic review. In: *World journal of gastroenterology : WJG* 20 (26), S. 8482–8490. DOI: 10.3748/wjg.v20.i26.8482.
- Oguri, Tetsuya; Achiwa, Hiroyuki; Muramatsu, Hideki; Ozasa, Hiroaki; Sato, Shigeki; Shimizu, Shigeki et al. (2007): The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 expression predicts nonresponse to gemcitabine-containing chemotherapy in non-small cell lung cancer. In: *Cancer letters* 256 (1), S. 112–119. DOI: 10.1016/j.canlet.2007.06.012.
- Ohtaka, Kazuma; Kohya, Naohiko; Sato, Ken; Kitajima, Yoshihiko; Ide, Takao; Mitsuno, Mayumi; Miyazaki, Kohji (2008): Ribonucleotide reductase subunit M1 is a possible chemoresistance marker to gemcitabine in biliary tract carcinoma. In: *Oncol Rep* 20 (2), S. 279–286.
- Olaussen, Ken A.; Dunant, Ariane; Fouret, Pierre; Brambilla, Elisabeth; André, Fabrice; Haddad, Vincent et al. (2006): DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. In: *The New England journal of medicine* 355 (10), S. 983–991. DOI: 10.1056/NEJMoa060570.
- Ormanns, S.; Heinemann, V.; Raponi, M.; Isaacson, J.; Laubender, R. P.; Haas, M. et al. (2014): Human equilibrative nucleoside transporter 1 is not predictive for gemcitabine efficacy in advanced pancreatic cancer. translational results from the AIO-PK0104 phase III study with the clone SP120 rabbit antibody. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 50 (11), S. 1891–1899. DOI: 10.1016/j.ejca.2014.04.023.
- O'Sullivan, Ciara; Edgerly, Maureen; Velarde, Margarita; Wilkerson, Julia; Venkatesan, Aradhana M.; Pittaluga, Stefania et al. (2014): The VEGF inhibitor axitinib has limited effectiveness as a therapy for adrenocortical cancer. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 99 (4), S. 1291–1297. DOI: 10.1210/jc.2013-2298.
- Perez-Torras, S.; Garcia-Manteiga, J.; Mercade, E.; Casado, F. J.; Carbo, N.; Pastor-Anglada, M.; Mazo, A. (2008): Adenoviral-mediated overexpression of human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) enhances gemcitabine response in

- human pancreatic cancer. In: *Biochemical pharmacology* 76 (3), S. 322–329. DOI: 10.1016/j.bcp.2008.05.011.
- Pesta, Martin; Kulda, Vlastimil; Fiala, Ondrej; Safranek, Jarmil; Topolcan, Ondrej; Krakorova, Gabriela et al. (2012): Prognostic significance of ERCC1, RRM1 and BRCA1 in surgically-treated patients with non-small cell lung cancer. In: *Anticancer research* 32 (11), S. 5003–5010.
- Pfaffl, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In: *Nucleic acids research* 29 (9), e45.
- Plotnik, David A.; Asher, Camille; Chu, Stephanie K.; Miyaoka, Robert S.; Garwin, Gregory G.; Johnson, Brian W. et al. (2012): Levels of human equilibrative nucleoside transporter-1 are higher in proliferating regions of A549 tumor cells grown as tumor xenografts in vivo. In: *Nuclear medicine and biology* 39 (8), S. 1161–1166. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2012.07.007.
- Pontarin, Giovanna; Fijolek, Artur; Pizzo, Paola; Ferraro, Paola; Rampazzo, Chiara; Pozzan, Tullio et al. (2008): Ribonucleotide reduction is a cytosolic process in mammalian cells independently of DNA damage. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (46), S. 17801–17806. DOI: 10.1073/pnas.0808198105.
- Poplin, E.; Wasan, H.; Rolfe, L.; Raponi, M.; Ikdaahl, T.; Bondarenko, I. et al. (2013): Randomized, multicenter, phase II study of CO-101 versus gemcitabine in patients with metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. including a prospective evaluation of the role of hENT1 in gemcitabine or CO-101 sensitivity. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (35), S. 4453–4461. DOI: 10.1200/jco.2013.51.0826.
- Pressacco, J.; Wiley, J. S.; Jamieson, G. P.; Erlichman, C.; Hedley, D. W. (1995): Modulation of the equilibrative nucleoside transporter by inhibitors of DNA synthesis. In: *British journal of cancer* 72 (4), S. 939–942.
- Qiu, Zhen-Qin; Zhao, Kun (2014): Expression of ERCC1, RRM1 and LRP in non-small cell lung cancers and their influence on chemotherapeutic efficacy of gemcitabine

- concomitant with nedaplatin. In: *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 15 (17), S. 7303–7307.
- Quinkler, M.; Hahner, S.; Wortmann, S.; Johanssen, S.; Adam, P.; Ritter, C. et al. (2008): Treatment of advanced adrenocortical carcinoma with erlotinib plus gemcitabine. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 93 (6), S. 2057–2062. DOI: 10.1210/jc.2007-2564.
- Ragazzon, Bruno; Libé, Rossella; Gaujoux, Sébastien; Assié, Guillaume; Fratticci, Amato; Launay, Pierre et al. (2010): Transcriptome analysis reveals that p53 and {beta}-catenin alterations occur in a group of aggressive adrenocortical cancers. In: *Cancer research* 70 (21), S. 8276–8281. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2014.
- Reichard, Peter (2010): Ribonucleotide reductases: substrate specificity by allostery. In: *Biochemical and biophysical research communications* 396 (1), S. 19–23. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.02.108.
- Reyes, German; Nivillac, Nicole M. I.; Karim, Muhammad Zia; Desouza, Leroi; Siu, K. W. Michael; Coe, Imogen R. (2011): The Equilibrative Nucleoside Transporter (ENT1) can be phosphorylated at multiple sites by PKC and PKA. In: *Molecular membrane biology* 28 (6), S. 412–426. DOI: 10.3109/09687688.2011.604861.
- Ribeiro, Tamaya Castro; Latronico, Ana Claudia (2012): Insulin-like growth factor system on adrenocortical tumorigenesis. In: *Molecular and cellular endocrinology* 351 (1), S. 96–100. DOI: 10.1016/j.mce.2011.09.042.
- Ronchi, Cristina L.; Sbiera, Silviu; Kraus, Luitgard; Wortmann, Sebastian; Johanssen, Sarah; Adam, Patrick et al. (2009): Expression of excision repair cross complementing group 1 and prognosis in adrenocortical carcinoma patients treated with platinum-based chemotherapy. In: *Endocrine-related cancer* 16 (3), S. 907–918. DOI: 10.1677/ERC-08-0224.
- Rubin, Beatrice; Regazzo, Daniela; Redaelli, Marco; Mucignat, Carla; Citton, Marilisa; Iacobone, Maurizio et al. (2016): Investigation of N-cadherin/beta-catenin expression in adrenocortical tumors. In: *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37 (10), S. 13545–13555. DOI: 10.1007/s13277-016-5257-x.

- Santini, D.; Schiavon, G.; Vincenzi, B.; Cass, C. E.; Vasile, E.; Manazza, A. D. et al. (2011): Human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) levels predict response to gemcitabine in patients with biliary tract cancer (BTC). In: *Current cancer drug targets* 11 (1), S. 123–129.
- Santini, D.; Vincenzi, B.; Fratto, M. E.; Perrone, G.; Lai, R.; Catalano, V. et al. (2010): Prognostic role of human equilibrative transporter 1 (hENT1) in patients with resected gastric cancer. In: *Journal of cellular physiology* 223 (2), S. 384–388. DOI: 10.1002/jcp.22045.
- Sasaki, H.; Murakami, Y.; Uemura, K.; Sudo, T.; Hashimoto, Y.; Kondo, N.; Sueda, T. (2014): Concurrent analysis of human equilibrative nucleoside transporter 1 and ribonucleotide reductase subunit 1 expression increases predictive value for prognosis in cholangiocarcinoma patients treated with adjuvant gemcitabine-based chemotherapy. In: *British journal of cancer* 111 (7), S. 1275–1284. DOI: 10.1038/bjc.2014.399.
- Sbiera, Silviu; Leich, Ellen; Liebisch, Gerhard; Sbiera, Iuliu; Schirbel, Andreas; Wiemer, Laura et al. (2015): Mitotane Inhibits Sterol-O-Acyl Transferase 1 Triggering Lipid-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Adrenocortical Carcinoma Cells. In: *Endocrinology* 156 (11), S. 3895–3908. DOI: 10.1210/en.2015-1367.
- Shao, J.; Zhou, B.; Chu, Bernard; Yen, Y. (2006): Ribonucleotide reductase inhibitors and future drug design. In: *Current cancer drug targets* 6 (5), S. 409–431.
- Shewach, D. S.; Hahn, T. M.; Chang, E.; Hertel, L. W.; Lawrence, T. S. (1994): Metabolism of 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine and radiation sensitization of human colon carcinoma cells. In: *Cancer research* 54 (12), S. 3218–3223.
- Shimakata, Takaaki; Kamoshida, Shingo; Kawamura, Jumpei; Ogane, Naoki; Kameda, Yoichi; Yanagita, Emmy et al. (2016): Immunohistochemical expression profiles of solute carrier transporters in alpha-fetoprotein-producing gastric cancer. In: *Histopathology* 69 (5), S. 812–821. DOI: 10.1111/his.13004.
- Sierzega, Marek; Pach, Radoslaw; Kulig, Piotr; Legutko, Janusz; Kulig, Jan (2017): Prognostic Implications of Expression Profiling for Gemcitabine-Related Genes (hENT1, dCK, RRM1, RRM2) in Patients With Resectable Pancreatic Adenocarcinoma

Receiving Adjuvant Chemotherapy. In: *Pancreas*. DOI: 10.1097/MPA.0000000000000807.

Simon, Derek P.; Hammer, Gary D. (2012): Adrenocortical stem and progenitor cells. Implications for adrenocortical carcinoma. In: *Molecular and cellular endocrinology* 351 (1), S. 2–11. DOI: 10.1016/j.mce.2011.12.006.

Sinn, M.; Riess, H.; Sinn, B. V.; Stieler, J. M.; Pelzer, U.; Striefler, J. K. et al. (2015): Human equilibrative nucleoside transporter 1 expression analysed by the clone SP 120 rabbit antibody is not predictive in patients with pancreatic cancer treated with adjuvant gemcitabine - Results from the CONKO-001 trial. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 51 (12), S. 1546–1554. DOI: 10.1016/j.ejca.2015.05.005.

Sperone, P.; Ferrero, A.; Daffara, F.; Priola, A.; Zaggia, B.; Volante, M. 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. In: *Endocrine-related cancer* 17 (2), S. 445–453. DOI: 10.1677/ERC-09-0281.

Spratlin, J.; Sangha, R.; Glubrecht, D.; Dabbagh, L.; Young, J. D.; Dumontet, C. et al. (2004): The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with reduced survival in patients with gemcitabine-treated pancreas adenocarcinoma. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10 (20), S. 6956–6961. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-04-0224.

Suman, Paritosh; Calcaterra, Natalie; Wang, Chi-Hsiung; Moo-Young, Tricia A.; Winchester, David J.; Prinz, Richard A. (2017): Preoperative adrenal biopsy does not affect overall survival in adrenocortical carcinoma. In: *American journal of surgery*. DOI: 10.1016/j.amjsurg.2017.01.039.

Sundaram, M.; Yao, S. Y.; Ingram, J. C.; Berry, Z. A.; Abidi, F.; Cass, C. E. et al. (2001): Topology of a human equilibrative, nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive nucleoside transporter (hENT1) implicated in the cellular uptake of adenosine and anti-cancer drugs. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (48), S. 45270–45275. DOI: 10.1074/jbc.M107169200.

- Svrcek, Magali; Cros, Jerome; Marechal, Raphael; Bachet, Jean-Baptiste; Flejou, Jean-Francois; Demetter, Pieter (2015): Human equilibrative nucleoside transporter 1 testing in pancreatic ductal adenocarcinoma: a comparison between murine and rabbit antibodies. In: *Histopathology* 66 (3), S. 457–462. DOI: 10.1111/his.12577.
- Takehita, Akira; Igarashi-Migitaka, Junko; Koibuchi, Noriyuki; Takeuchi, Yasuhiro (2013): Mitotane induces CYP3A4 expression via activation of the steroid and xenobiotic receptor. In: *The Journal of endocrinology* 216 (3), S. 297–305. DOI: 10.1530/JOE-12-0297.
- 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. In: *Cancer management and research* 5, S. 327–336. DOI: 10.2147/CMAR.S52073.
- Terzolo, M.; Baudin, A. E.; Ardito, A.; Kroiss, M.; Leboulleux, S.; Daffara, F. et al. (2013): Mitotane levels predict the outcome of patients with adrenocortical carcinoma treated adjuvantly following radical resection. In: *European journal of endocrinology* 169 (3), S. 263–270. DOI: 10.1530/EJE-13-0242.
- Terzolo, M.; Daffara, F.; Ardito, A.; Zaggia, B.; Basile, V.; Ferrari, L.; Berruti, A. (2014a): Management of adrenal cancer: a 2013 update. In: *Journal of endocrinological investigation* 37 (3), S. 207–217. DOI: 10.1007/s40618-013-0049-2.
- Terzolo, Massimo; Zaggia, Barbara; Allasino, Barbara; Francia, Silvia de (2014b): Practical treatment using mitotane for adrenocortical carcinoma. In: *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 21 (3), S. 159–165. DOI: 10.1097/MED.0000000000000056.
- Tibaldi, C.; Giovannetti, E.; Tiseo, M.; Leon, L. G.; D'Incecco, A.; Loosekoot, N. et al. (2012): Correlation of cytidine deaminase polymorphisms and activity with clinical outcome in gemcitabine-/platinum-treated advanced non-small-cell lung cancer patients. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 23 (3), S. 670–677. DOI: 10.1093/annonc/mdr280.

- Toffalorio, F.; Giovannetti, E.; Pas, T. de; Radice, D.; Pelosi, G.; Manzotti, M. et al. (2010): Expression of gemcitabine- and cisplatin-related genes in non-small-cell lung cancer. In: *The pharmacogenomics journal* 10 (3), S. 180–190. DOI: 10.1038/tpj.2009.53.
- van Ruiz Haperen, Veronique W.T.; Veerman, Gijsbert; Vermorken, Jan B.; Peters, Godefridus J. (1993): 2',2'-Difluoro-deoxycytidine (gemcitabine) incorporation into RNA and DNA of tumour cell lines. In: *Biochemical pharmacology* 46 (4), S. 762–766. DOI: 10.1016/0006-2952(93)90566-F.
- Varghese, Jeena; Habra, Mouhammed Amir (2017): Update on adrenocortical carcinoma management and future directions. In: *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. DOI: 10.1097/MED.0000000000000332.
- Wang, Honggang; Word, Beverly R.; Lyn-Cook, Beverly D. (2011): Enhanced efficacy of gemcitabine by indole-3-carbinol in pancreatic cell lines: the role of human equilibrative nucleoside transporter 1. In: *Anticancer research* 31 (10), S. 3171–3180.
- Wang, Jun; Lohman, Gregory J. S.; Stubbe, JoAnne (2007): Enhanced subunit interactions with gemcitabine-5'-diphosphate inhibit ribonucleotide reductases. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (36), S. 14324–14329. DOI: 10.1073/pnas.0706803104.
- Wang, Q.; Liu, X.; Zhou, J.; Huang, Y.; Zhang, S.; Shen, J. et al. (2013): Ribonucleotide reductase large subunit M1 predicts poor survival due to modulation of proliferative and invasive ability of gastric cancer. In: *PloS one* 8 (7), e70191. DOI: 10.1371/journal.pone.0070191.
- Weiss, L. M. (1984): Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. In: *The American journal of surgical pathology* 8 (3), S. 163–169.
- Williams, Andrew R.; Hammer, Gary D.; Else, Tobias (2014): Transcutaneous biopsy of adrenocortical carcinoma is rarely helpful in diagnosis, potentially harmful, but does not affect patient outcome. In: *European journal of endocrinology* 170 (6), S. 829–835. DOI: 10.1530/EJE-13-1033.
- Wonganan, Piyanuch; Chung, Woon-Gye; Zhu, Saijie; Kiguchi, Kaoru; Digiovanni, John; Cui, Zhengrong (2012): Silencing of ribonucleotide reductase subunit M1 potentiates

- the antitumor activity of gemcitabine in resistant cancer cells. In: *Cancer biology & therapy* 13 (10), S. 908–914. DOI: 10.4161/cbt.20843.
- Wortmann, Sebastian; Quinkler, Marcus; Ritter, Christian; Kroiss, Matthias; Johanssen, Sarah; Hahner, Stefanie et al. (2010): Bevacizumab plus capecitabine as a salvage therapy in advanced adrenocortical carcinoma. In: *European journal of endocrinology* 162 (2), S. 349–356. DOI: 10.1530/EJE-09-0804.
- Xie, Hao; Jiang, Wei; Jiang, John; Wang, Yixin; Kim, Richard; Liu, Xiaobo; Liu, Xiuli (2013): Predictive and prognostic roles of ribonucleotide reductase M1 in resectable pancreatic adenocarcinoma. In: *Cancer* 119 (1), S. 173–181. DOI: 10.1002/cncr.27715.
- Xie, Hao; Lin, Jingmei; Thomas, Dafydd G.; Jiang, Wei; Liu, Xiuli (2012): Ribonucleotide reductase M2 does not predict survival in patients with resectable pancreatic adenocarcinoma. In: *International journal of clinical and experimental pathology* 5 (4), S. 347–355.
- Xiong, Junjie; Altaf, Kiran; Ke, Nengwen; Wang, Yichao; Tang, Jie; Tan, Chunlu et al. (2016): dCK Expression and Gene Polymorphism With Gemcitabine Chemosensitivity in Patients With Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. A Strobe-Compliant Observational Study. In: *Medicine* 95 (10), e2936. DOI: 10.1097/MD.0000000000002936.
- Yamada, Reiko; Mizuno, Shugo; Uchida, Katsunori; Yoneda, Misao; Kanayama, Kazuki; Inoue, Hiroyuki et al. (2016): Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 Expression in Endoscopic Ultrasonography-Guided Fine-Needle Aspiration Biopsy Samples Is a Strong Predictor of Clinical Response and Survival in the Patients With Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Undergoing Gemcitabine-Based Chemoradiotherapy. In: *Pancreas* 45 (5), S. 761–771. DOI: 10.1097/MPA.0000000000000597.
- Yamaguchi, T.; Matsuda, K.; Sagiya, Y.; Iwadate, M.; Fujino, M. A.; Nakamura, Y.; Arakawa, H. (2001): p53R2-dependent pathway for DNA synthesis in a p53-regulated cell cycle checkpoint. In: *Cancer research* 61 (22), S. 8256–8262.

- Yao, Guangyu; Cao, Li; Liu, Mingfeng; Chen, Lujia; Hu, Xiaolei; Ye, Changsheng (2016): Gemcitabine and Capecitabine Combination Chemotherapy in Patients with Metastatic Breast Cancer Pretreated with Anthracyclines and/or Taxanes. In: *Chemotherapy* 61 (4), S. 171–178. DOI: 10.1159/000443366.
- Yoneyama, Hiroshi; Takizawa-Hashimoto, Asako; Takeuchi, Osamu; Watanabe, Yukiko; Atsuda, Koichiro; Asanuma, Fumiki et al. (2015): Acquired resistance to gemcitabine and cross-resistance in human pancreatic cancer clones. In: *Anti-cancer drugs* 26 (1), S. 90–100. DOI: 10.1097/CAD.000000000000165.
- Yoshida, Takahiro; Endo, Yoshio; Obata, Tohru; Kosugi, Yuri; Sakamoto, Kazuki; Sasaki, Takuma (2010): Influence of cytidine deaminase on antitumor activity of 2'-deoxycytidine analogs in vitro and in vivo. In: *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 38 (10), S. 1814–1819. DOI: 10.1124/dmd.110.034397.
- Young, J. D.; Yao, S. Y.; Baldwin, J. M.; Cass, C. E.; Baldwin, Stephen A. (2013): The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. In: *Molecular aspects of medicine* 34 (2-3), S. 529–547. DOI: 10.1016/j.mam.2012.05.007.
- Young, J. D.; Yao, S. Y.; Sun, L.; Cass, C. E.; Baldwin, Stephen A. (2008): Human equilibrative nucleoside transporter (ENT) family of nucleoside and nucleobase transporter proteins. In: *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 38 (7-8), S. 995–1021. DOI: 10.1080/00498250801927427.
- Zhao, L. P.; Xue, C.; Zhang, J. W.; Hu, Z. H.; Zhao, Y. Y.; Zhang, J. et al. (2012): Expression of RRM1 and its association with resistancy to gemcitabine-based chemotherapy in advanced nasopharyngeal carcinoma. In: *Chinese journal of cancer* 31 (10), S. 476–483. DOI: 10.5732/cjc.012.10029.
- Zheng, Z.; Chen, T.; Li, X.; Haura, E.; Sharma, A.; Bepler, G. (2007): DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer. In: *The New England journal of medicine* 356 (8), S. 800–808. DOI: 10.1056/NEJMoa065411.
- Zwitter, Matjaz; Kovac, Viljem; Rajer, Mirjana; Vrankar, Martina; Smrdel, Uros (2010): Two schedules of chemotherapy for patients with non-small cell lung cancer in poor

performance status: a phase II randomized trial. In: *Anti-cancer drugs* 21 (6), S. 662–668. DOI: 10.1097/CAD.0b013e32833ab7a0.

Danksagung

Zuerst möchte ich meine Dankbarkeit für Herrn Prof. Dr. med. Bruno Allolio ausdrücken, der durch seine mitreißende und unermüdliche Art eine neue Begeisterung für die Medizin in mir wecken konnte. Er wird mir stets als Vorbild für eine herausragende Lehre und einen respektvollen und anerkennenden Umgang mit Patienten und Mitarbeitern in Erinnerung bleiben.

Ganz besonderer Dank gilt Priv.-Doz. Cristina L. Ronchi, mir durch die gesamte Arbeit stets als erste Ansprechpartnerin zur Seite gestanden ist und mir auf dem Weg immer wieder das Ziel gezeigt hat. Ihre Zuverlässigkeit und Hilfsbereitschaft in der Betreuung trugen maßgeblich zu dem Fundament bei, auf dem diese Arbeit beruht.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Martin Fassnacht, der mich dazu ermutigt und motiviert hat, immer einen Gedanken weiter zu denken und von einer anderen Seite zu beleuchten. Seine konstruktive Kritik und seine Herangehensweise an wissenschaftliche Aussagen werden nicht nur meine Doktorarbeit bereichern.

Darüber hinaus möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Endokrinologie bedanken. Besonders im Labor gab es niemanden, der mir nicht mit Rat und Tat zur Seite gestanden hätte. Insbesondere möchte ich mich bei Sonja Steinhauer bedanken, die mich nicht nur in jegliche Arbeiten eingewiesen hat, sondern auch stets eine helfende Hand gereicht hat und für mich die gute Seele vor Ort war.

Ich danke auch meinen Freunden, die den Frust geteilt und die Höhen mit mir genossen haben. Herzlichen Dank auch an alle Korrekturleser, die Version für Version aufmerksam durchgearbeitet haben.

Zu guter Letzt gilt ein tief empfundener Dank meiner Familie. Sie hat mir das Studium und diese Arbeit ermöglicht und stand mir in allen Phasen zur Seite. Ohne ihre Unterstützung hätte ich nie das Erreichen können, was ich bis jetzt geschafft habe.