

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Nutzen des BRAF-Mutationstests zur Sensitivitätssteigerung von Feinnadelpunktionen
im Rahmen der Schilddrüsendiagnostik

-

eine retrospektive Analyse von 183 Fällen aus den Jahren 2013 bis 2015

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Zahnmedizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Annika Ricken
aus Bonn

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

30. Juni 2020

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	1
Tabellenverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis.....	3
1 Einleitung	5
2 Literaturdiskussion	6
2.1 Die Schilddrüse.....	6
2.2 Erkrankungen der Schilddrüse.....	7
2.3 Einteilung und Charakterisierung der Schilddrüsenkarzinome	9
2.3.1 Papilläres Schilddrüsenkarzinom (PTC).....	9
2.3.2 Follikuläres Schilddrüsenkarzinom (FTC).....	13
2.3.3 Medulläres Schilddrüsenkarzinom (MTC)	13
2.3.4 Gering Differenziertes Schilddrüsenkarzinom (PDTC).....	14
2.3.5 Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom (ATC).....	14
2.4 Diagnostik der Schilddrüse	15
2.4.1 Klinische Untersuchung.....	15
2.4.2 Feinnadelpunktion.....	17
2.4.3 Biopsie	19
2.4.4 Zytologie und Histologie	19
2.4.5 Molekularpathologie.....	21
2.5 Operative Therapie.....	35
3 Material und Methoden	36
3.1 Patienten	36
3.2 Feinnadelpunktion und zytologische Untersuchung.....	36
3.3 Molekularpathologische Untersuchung	37
3.4 Operation.....	39
3.5 Statistische Analyse	39
3.6 Histologische Untersuchung.....	41

4	Ergebnisse	42
4.1	Diagnosen	42
4.1.1	Zytologie	42
4.1.2	BRAF-Status und histologischer Befund	42
4.2	Statistische Analyse	44
5	Diskussion	46
5.1	Einfluss des BRAF-Mutationstests auf Sensitivität und Spezifität	47
5.2	Zusammenhang zwischen Testperformance und geografischen Unterschieden	48
5.3	Auswahl der Analysetechnik	49
5.4	Limitationen des BRAF-Mutationstests	50
5.4.1	Nicht ermittelbarer BRAF-Status	50
5.4.2	Falsch positive BRAF-Ergebnisse	51
5.4.3	Falsch negative BRAF-Ergebnisse	55
5.4.4	Problem der „ <i>indeterminate nodules</i> “	59
5.5	Einfluss des BRAF-Mutationstests auf Therapie und Prognose	61
5.6	Kosten	66
5.7	Limitationen dieser Studie	68
5.8	Ausblick	69
6	Zusammenfassung	70
7	Literaturverzeichnis	72
8	Danksagung	98
9	Tabellarischer Lebenslauf	99

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Die Schilddrüse, Ansicht von ventral (266).....	6
Abb. 2	Zytomorphologische Beispiele für die drei häufigsten Formen des PTC sowie eines PDTC. (A) klassisches PTC: papilläre Strukturen, begrenzt durch kubische Zellen mit charakteristischen Kernveränderungen (Hämatoxylin und Eosin; x 300). (B) follikuläre Variante des PTC: follikuläre Strukturen, begrenzt durch kubische Zellen mit prominenten Kerneinkerbungen und Pseudoinklusionen (Hämatoxylin und Eosin; x 400). (C) hochzellige Variante des PTC: follikuläre und papilläre Strukturen, Tumorzellen mit säulenförmiger Form und eosinophilem Zytoplasma, teilweise Kernüberlagerungen (Hämatoxylin und Eosin; x 300). (D) PDTC: dichte Proliferation von Zellen mittlerer Größe, spärliches Zytoplasma, fokal ist ein trabekuläres Wachstumsmuster erkennbar (Hämatoxylin und Eosin; x 400) (57).....	11
Abb. 3	BRAF-Kinase als Mediator im MAPK-Signaltransduktionsweg (110).....	24
Abb. 4	Links: Polymorphe, eosinophile Zellen (<i>plump cells</i>) und sichelförmige Zellkerne (147). Rechts: <i>Plump cells</i> mit nukleären Pseudoinklusionen (147)	27
Abb. 5	BRAF-Mutationstest mittels MASA und direkter Sequenzierung (a: Agarose-Gel-Elektrophorese; b: Ergebnisse der direkten Sequenzierung nach PCR bei BRAF-positiven Tumoren: BRAF-Mutation (GTG -> GAG)) (119).....	38
Abb. 6	<i>Vanishing Tumor</i> eines PTMC nach FNA Quelle: Dr. A. Schad, Institut für Pathologie, Universitätsmedizin Mainz ..	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	EU-TIRADS-Kategorien mit entsprechenden sonografischen Merkmalen und Malignitätsrisiken (268)	16
Tabelle 2	Empfohlene diagnostische Kategorien nach dem <i>2017 Bethesda System for Thyroid Cytopathologie</i> (28)	20
Tabelle 3	Durchschnittliche Prävalenz von Mutationen bei verschiedenen Schilddrüsenkarzinomen (10)	22
Tabelle 4	Impliziertes Malignitätsrisiko und empfohlenes klinisches Management (<i>The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology</i>) (28)	33
Tabelle 5	Auswertung der Patientenfälle nach Zytologie, BRAF-Status und Histologie	42
Tabelle 6	Ergebnisse der statistischen Analyse	44

Abkürzungsverzeichnis

ATC	anaplastisches Schilddrüsenkarzinom
AUS	<i>atypia of undetermined significance</i>
cPTC	klassisches papilläres Schilddrüsenkarzinom
CT	Computertomografie
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DTC	differenzierte Schilddrüsenkarzinome
EFVPTC	<i>encapsulated follicular variant of papillary thyroid carcinoma</i>
FDG-PET	Fluorodeoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomografie
FLUS	<i>follicular lesions of undetermined significance</i>
FN	<i>false negative</i>
FNA	Feinnadelaspiration
FNAB	Feinnadelaspirationsbiopsie
FP	<i>false positive</i>
FTC	follikuläres Schilddrüsenkarzinom
FVPTC	follikuläre Variante des papillären Schilddrüsenkarzinoms
Gal-3	Galectin-3
GEC	<i>Gene Expression Classifier</i>
ICC	Immunzytochemie
IHC	Immunhistochemie
IM	<i>incidental microcarcinomas</i>
MASA	<i>mutant allele specific PCR amplification</i>
MTC	medulläres Schilddrüsenkarzinom
mRNA	<i>messenger RNA</i>
miRNA	micro-RNA
Mut	Mutation
N.	Nervus
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NIFTP	<i>noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features</i>
NPV	<i>Negative Predictive Value</i>
p53	Tumorsuppressorgen p53
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDTC	wenig differenziertes Schilddrüsenkarzinom
PET	Positronen-Emissions-Tomografie

Abkürzungsverzeichnis

PET-CT	Positronen-Emissions-Tomografie-Computertomografie
PPV	<i>Positive Predictive Value</i>
PTC	papilläres Schilddrüsenkarzinom
PTMC	papilläres Mikrokarzinom der Schilddrüse
SCN	<i>solid cell nest hyperplasia</i>
SSCP	<i>single strand conformation polymorphism</i>
T3	Triiodthyronin
T4	Thyroxin, Tetraiodthyronin
Tc	Technetium
TBG	Thyroxin-bindendes Globulin
TERT	TERT-Promotor-Mutation
TN	<i>true negative</i>
TP	<i>true positive</i>
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
TTR	Transthyretin, Thyroxin-bindendes Präalbumin
UTC	undifferenziertes Schilddrüsenkarzinom
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	Wildtyp

1 Einleitung

Erkrankungen der Schilddrüse stellen sich häufig als palpable oder sonografisch sichtbare Knoten dar, die zu ca. 95 % gutartigen Charakters sind. Selten können sie maligne entarten (1, 2). Im Fall einer malignen Entartung handelt es sich mit einer Häufigkeit von 50-80 % um ein papilläres Schilddrüsenkarzinom (PTC) (3). Um suspekten Knoten zu untersuchen, kommt die Feinnadelpunktion (FNA) zum Einsatz, mit deren Hilfe zytologische Proben mikroskopisch untersucht werden können. Trotz jahrelanger Erfahrung in der Durchführung erweisen sich etwa 1,8-23,6 % aller durch FNA gewonnenen zytologischen Präparate als insuffizient (4), wodurch eine sichere zytologische Diagnostik nicht garantiert ist. Zudem sind die Sensitivität (65-97 %) und Spezifität (50-100 %) (4-8) der zytologischen Untersuchung häufig nicht zufriedenstellend und reichen nicht aus, um maligne und benigne Befunde voneinander zu unterscheiden (9). Um die präoperative Diagnostik zu unterstützen, haben sich im Laufe der letzten Jahrzehnte molekularpathologische Verfahren etabliert. Durch mehr oder weniger gezielte Marker lassen sich dabei bestimmte Tumoren anhand ihrer genetischen Aberrationen identifizieren (10-14). Von besonderer Bedeutung im Rahmen der Schilddrüsendiagnostik ist die BRAF-Mutation, eine Punktmutation auf dem Gen des B-Raf-Proteins, das durch Überaktivierung einer zellulären Signalkette einen kanzerogenen Effekt auf die Thyreozyten ausübt (15). Sie gilt als spezifisch für das PTC, da sie unter allen Schilddrüsentumoren nahezu ausschließlich bei diesem Karzinom auftritt (16, 17). Die Prävalenz unter den PTC im europäischen Raum beträgt ca. 45 % (18). Durch Identifikation der BRAF-Mutation in zytologischen Proben könnten PTC identifiziert werden, die durch die Zytologie allein möglicherweise übersehen worden wären. Außerdem könnten die therapeutischen Maßnahmen gezielter geplant werden, sodass beispielsweise bei suspekten Knoten anstelle einer diagnostischen Lobektomie primär eine Thyreoidektomie, ggf. mit zentraler Lymphadenektomie, durchgeführt wird.

Das Ziel dieser Studie war es, den Nutzen des BRAF-Mutationstests anhand seines Einflusses auf die Schilddrüsendiagnostik zu überprüfen. Dabei war primär ein Einfluss des Tests auf Sensitivität und Spezifität der FNA von Interesse, zudem sollte analysiert werden, durch welche Faktoren der BRAF-Mutationstest selbst beeinflusst wird und wie dieser das therapeutische Vorgehen verändern könnte. Da die Testperformance stark von den Prävalenzen des PTC bzw. der BRAF-Mutation abhängt, welche sich international unterscheiden (18, 19), soll die vorliegende Studie in erster Linie als Referenz für Mediziner europäischer Staaten dienen.

2 Literaturdiskussion

2.1 Die Schilddrüse

Die Schilddrüse (*Glandula thyroidea*, *Abb. 1*) ist eines der wichtigsten endokrinen Organe des menschlichen Körpers. Sie befindet sich im vorderen Halsbereich ventrolateral der Trachea zwischen den Wirbelkörpern C5 und Th1 (20). Gegliedert wird sie in einen rechten und linken Lappen (*Lobus dexter et sinister*) sowie den *Isthmus glandulae thyroideae*, welcher die beiden Lobi verbindet. Ein *Lobus pyramidalis*, ein embryonales Relikt im kranio-medialen Bereich, ist bei etwa der Hälfte der Fälle zu finden. Auf der Rückseite der Schilddrüse befindet sich die meist paarweise angelegte Nebenschilddrüse (*Glandula parathyroidea*) (20, 21). Da die Schilddrüse mit ihrer äußeren *Capsula fibrosa* dorsal mit der Trachea bzw. dem Schildknorpel des Larynx verwachsen ist, bewegt sie sich bei dem Schluckvorgang auf und ab (2).

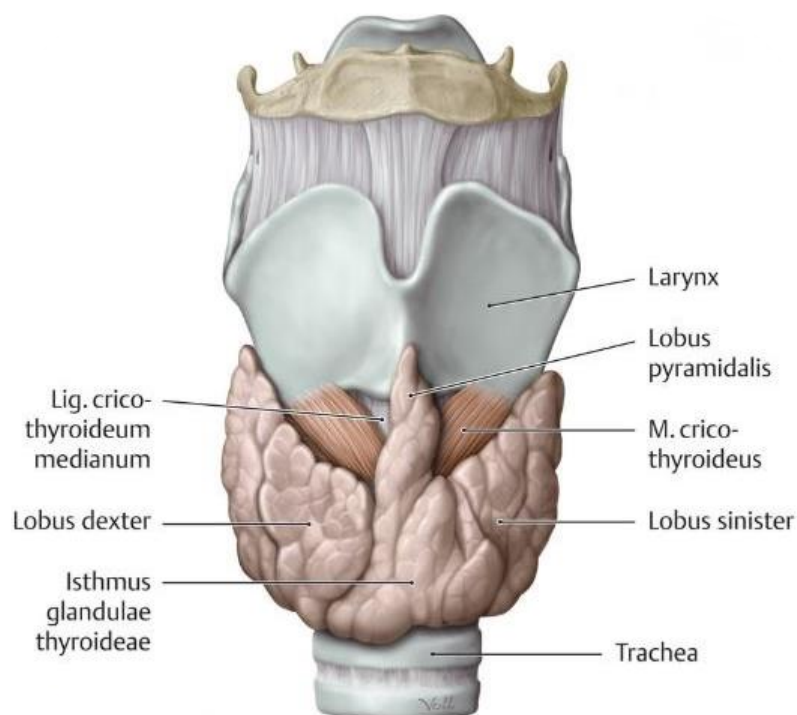


Abb. 1 Die Schilddrüse, Ansicht von ventral (266)

Die Blutversorgung der Schilddrüse erfolgt durch die *Arteria thyroidea superior* und *inferior*, der venöse Abfluss durch die *Vena thyroidea superior*, *Vena thyroidea media* sowie die *Venae thyroideae inferiores* (20). Die Schonung der Nerven und Nebenschilddrüsen bei Operationen an der Schilddrüse stellen regelmäßig eine Herausforderung für den Operateur dar. Bei Verletzung des *N. laryngeus recurrens* kann es zu

einer irreversiblen Rekurrensparese kommen (23). Möglich sind auch Schädigungen der Nebenschilddrüsen und ein postoperativer Hypoparathyreoidismus (219).

Das thyroideale Gewebe besitzt eine follikuläre Struktur. Die zahlreichen Follikel, welche das Gewebe ausfüllen, beinhalten das Kolloid, das u.a. die von der Schilddrüse produzierten Hormone speichert. Die Follikel sind von einem einschichtigen kubischen Epithel mit Mikrovilli ausgekleidet, das einer Basalmembran aufliegt. Der interfollikuläre Raum, welcher von den einzelnen Basalmembranen begrenzt wird, beinhaltet neben Bindegewebe und Bindegewebssepten die parafollikulären Zellen, zu denen z.B. die Calcitonin-sezernierenden C-Zellen zählen (2, 265).

Die Zellen der Follikel, die Thyreozyten, produzieren das Glykoprotein Thyreoglobulin, welches im Lumen der einzelnen Follikel zur Synthese der Schilddrüsenhormone beiträgt. Es handelt sich um die Hormone T3 (Triiodthyronin) und T4 (Thyroxin bzw. Tetraiodthyronin).

Das Vorhandensein der Schilddrüsenhormone im Körper ist essentiell für die Funktion des Stoffwechsels, des Kreislaufs sowie anderer Organe. Zudem sind sie für eine normale intellektuelle und körperliche Entwicklung unerlässlich, indem sie beispielsweise Wirkung auf die Funktion des zentralen Nervensystems haben oder die Bildung und Ausschüttung des Wachstumshormons Somatotropin beeinflussen (24).

2.2 Erkrankungen der Schilddrüse

Die Schilddrüse kann von verschiedenen Erkrankungen betroffen sein, die meisten davon sind benigner Natur (25, 26). Grob unterteilen lassen sich diese in Hypertrophien (Struma), Entzündungen (Thyreoiditis), Autoimmunerkrankungen (z.B. Morbus Basedow), Fehlbildungen, Tumoren sowie damit einhergehende funktionelle Störungen (Hypo- und Hyperthyreose) (27). Der Fokus dieser Studie liegt auf der präoperativen Diagnostik von Schilddrüsenerkrankungen mit Hilfe von molekularpathologischen Tests, mit besonderer Berücksichtigung des BRAF-Mutationstests. Molekularpathologische Untersuchungen von Zellmaterial werden in erster Linie bei Verdacht auf maligne Erkrankungen durchgeführt (28), da bestimmte Genveränderungen spezifische Marker für Karzinome darstellen (10-14). Deshalb werden die benignen Erkrankungen der Schilddrüse hier nur kurz angesprochen und nicht detailliert erläutert.

Struma

Im Volksmund wird die Struma auch Kropf genannt und bezeichnet eine Größenzunahme des Schilddrüsengewebes, ohne Berücksichtigung funktioneller Veränderungen und Ursachen. Strukturell spricht man von einer Struma diffusa, ohne Knotenentwicklung, und einer Struma nodosa mit knotiger Form (29). Beide Formen können auch kombiniert vorliegen und stellen häufig Zufallsbefunde dar. Außerdem unterscheidet man bei der Knotenstruma zwischen einer Struma uni- und multinodosa (29).

Die Entwicklung einer Struma lässt sich allgemein auf eine gesteigerte Proliferation von Thyreozyten zurückführen (2). Diese Symptomatik ist zwar abnormal, aber in den meisten Fällen mit einer gutartigen Erkrankung assoziiert (25, 26). Ätiologisch unterscheidet man die häufige endemische Struma, durch endemischen Jodmangel bedingt, von der nicht-endemischen Struma, die durch andere Faktoren verursacht wird (Morbus Basedow, Entzündungen, Tumoren etc.). Die Therapie beinhaltet je nach Ätiologie sowohl eine medikamentöse Behandlung als auch operative Maßnahmen (2). In manchen Fällen ist eine regelmäßige klinische Kontrolluntersuchung ausreichend, falls kein Verdacht auf Malignität besteht (29).

Thyreoiditis

Schilddrüsenentzündungen können sowohl singulär als auch als Begleitung anderer Erkrankungen auftreten. Man unterscheidet zwischen akuter, akut-subakuter und chronischer Thyreoiditis (1). Eine akute Thyreoiditis kann auf Basis einer Infektion, iatrogen im Rahmen der Behandlung oder auch perineoplastisch entstehen (30). Als subakut wird die Thyreoiditis de Quervain bezeichnet. Sie geht mit lokalen Symptomen (Schmerzen, Schluckbeschwerden etc.) im Bereich der Schilddrüse sowie einem reduzierten Allgemeinzustand mit Fieber und Krankheitsgefühl einher. Ein typisches Beispiel für eine chronische Thyreoiditis ist die Hashimoto-Thyreoiditis, eine Autoimmunerkrankung. Seltener kommen spezifischere Thyreoiditis-Formen vor, wie bei der Riedel-Struma, der Tuberkulose oder beim Morbus Basedow (23).

Schilddrüsentumoren

Nach der *World Health Organization* (WHO) werden die Schilddrüsentumoren histologisch unterteilt in „Schilddrüsenkarzinome“, „Schilddrüsenadenome und verwandte Tumoren“ und „andere Schilddrüsentumoren“ (31). Die Karzinome stellen eine eigene Gruppe dar, da die meisten malignen Tumoren der Schilddrüse epithelialen Ursprungs sind (ca. 95 %) (2). Zu ihnen zählen u.a. das papilläre Schilddrüsenkarzinom (PTC),

das follikuläre Schilddrüsenkarzinom (FTC), das medulläre Schilddrüsenkarzinome (MTC), das gering-differenzierte Schilddrüsenkarzinom (PDTC) sowie das anaplastische Schilddrüsenkarzinom (ATC; auch undifferenziertes Karzinom, UTC). Der typische Vertreter der benignen Schilddrüsentumoren ist das follikuläre Adenom. Andere, seltene Schilddrüsentumoren sind u.a. Lymphome, Teratome, Angiosarkome und auch Metastasen (2, 31).

2.3 Einteilung und Charakterisierung der Schilddrüsenkarzinome

Schilddrüsenkarzinome repräsentieren entsprechend ihrer Häufigkeit etwa 1 % aller malignen Erkrankungen des menschlichen Körpers (32) und kommen unter allen endokrinen Malignomen am häufigsten vor (33). Die Inzidenz ist während der letzten Jahrzehnte international gestiegen (34). Unter den Schilddrüsenkarzinomen unterscheidet man zwischen Karzinomen mit Follikeldifferenzierung, C-Zell-Differenzierung sowie weiteren, seltener vorkommenden Karzinomen. Die Karzinome mit Follikeldifferenzierung, welche ihren Ursprung in den follikulären Zellen haben, unterteilt man in differenzierte (DTC), wenig differenzierte (PDTC) und undifferenzierte, sog. anaplastische Karzinome (ATC) (35). Die DTC stellen die häufigste Gruppe aller bösartigen Schilddrüsentumoren dar (90 %) (3). Zu ihr zählen die aus den follikulären Zellen entstandenen PTC und FTC sowie das Hürthle-Zell-Karzinom, auch onkozytäres Karzinom genannt (36). Das PTC macht den größten Anteil der DTC aus (ca. 50-80 %) und ist daher das häufigste Schilddrüsenkarzinom, gefolgt vom FTC (ca. 40 %) (3).

Das PDTC nimmt einen Platz zwischen den DTC und dem ATC ein und besitzt bisher keine definierten zytologischen bzw. molekulargenetischen Merkmale (37). Es kann de novo entstehen oder sich aus einem vorbestehenden PTC oder FTC entwickeln (10). Im Folgenden wird näher auf die einzelnen Schilddrüsenkarzinome eingegangen, mit jeweiliger Berücksichtigung der Histogenese, molekulargenetischer Merkmale und der Prognose. Der Schwerpunkt liegt auf dem papillären Schilddrüsenkarzinom (PTC), da dieses durch seine hohe Prävalenz der BRAF-Mutationen in dieser Studie im Vordergrund steht.

2.3.1 Papilläres Schilddrüsenkarzinom (PTC)

Das PTC stellt unter den Schilddrüsenkarzinomen die häufigste Karzinomform dar (3). Die Häufigkeit des PTC unter den Schilddrüsenkarzinomen liegt bei ca. 50-80 % (3), in Südkorea sogar bei 91,5-97 %, was in einer erhöhten lokalen Jodaufnahme der

Bevölkerung oder auch einer genetisch bedingten Prädisposition gegenüber der Entwicklung von Schilddrüsenkarzinomen begründet sein könnte (38, 39). Besonders durch starke Fortschritte in der Diagnostik in Form von sensitiveren Testmethoden oder auch durch eine veränderte (subjektive) pathologische Beurteilung werden inzwischen auch besonders kleine, sog. papilläre Mikrokarzinome (PTMC; Durchmesser < 1 cm) häufiger entdeckt. Die weltweit steigende Inzidenz des PTC während der letzten Jahrzehnte ist u.a. darauf zurückzuführen (34, 40).

Charakteristika

Das PTC zeigt sich typischerweise als palpabler, solitärer und szintigrafisch kalter Knoten (1). Zytologisch charakteristisch für das konventionelle PTC (cPTC) ist eine Anhäufung von Zellen, die sich papillenförmig anordnen und ein verzweigtes Netz bilden (Abb. 2). Die Papillen besitzen meist eine gleichmäßige Kontur, die äußeren Zellen sind palisadenartig aufgereiht. Umgeben werden die Papillen meist von einem Plattenepithel. Die meist kubischen, teils aber auch zylindrischen oder squamösen Zellen haben unregelmäßige und vergrößerte Zellkerne. Typischerweise zeigen sich Einkerbungen mit gefalteter Kernmembran und Pseudoinklusionen. Häufig kommt es zu Kernüberlappungen. Da papillenartige Strukturen auch beim follikulären Adenom oder bei diffusen Hyperplasien vorhanden sein können bzw. bei der follikulären Variante des PTC oftmals gar nicht vorliegen, ist eine Differentialdiagnostik allein anhand der Papillen nicht möglich. Im Gegensatz dazu ist die oben genannte charakteristische Morphologie des Zellkerns ausschlaggebend für die Diagnose eines PTC. Ein weiterer Hinweis auf ein PTC ist das Vorliegen von mehrkernigen Riesenzellen und Psammomkörperchen (runden, konzentrisch geschichteten Verkalkungen) im Aspirat (41).

Die hochzellige Variante des PTC (engl. *tall cell variant*) mit den typischerweise deutlich länglichen Zellen (> 50 % der Tumorzellen) (42) ist mit einem Anteil von ca. 4 % der PTC relativ selten (43, 44). Stärker ausgeprägte nukleäre Pseudoinklusionen und häufige Pleomorphismen hyperchromatiner Kerne grenzen sie vom klassischen PTC ab (45). Von Bedeutung ist sie, da sie wie das konventionelle PTC von *BRAF*-Mutationen betroffen sein kann (46) und mit einem aggressiveren Wachstum assoziiert ist (47). Sie kommt meist bei älteren Patienten vor (45, 46).

Die follikuläre Variante des PTC (FVPTC) grenzt sich vom klassischen PTC durch das sehr seltene Auftreten papillärer Strukturen ab (48). Stattdessen überwiegt bei ihr die Anhäufung von Follikeln. Nukleäre Pseudoinklusionen können auftreten (49).

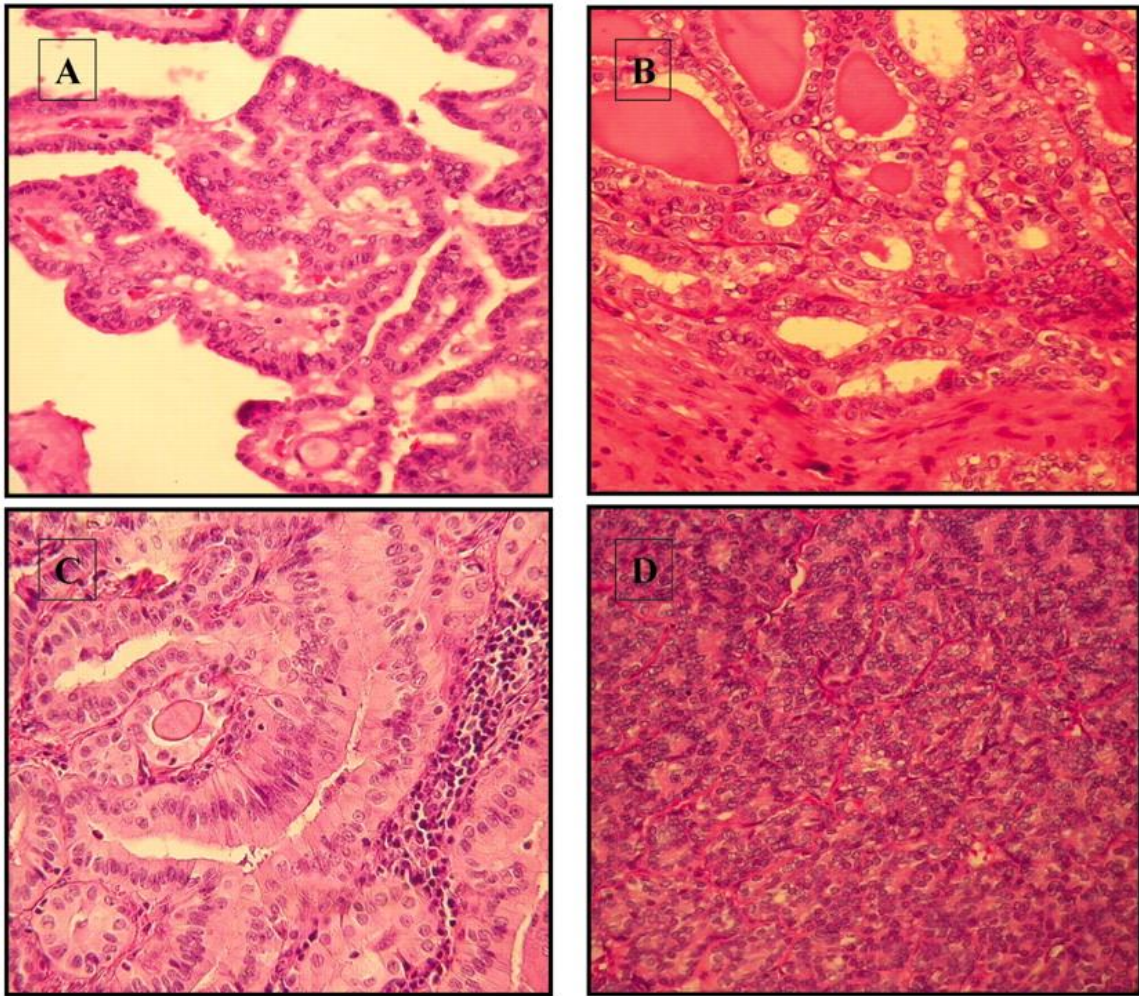


Abb. 2 Zytomorphologische Beispiele für die drei häufigsten Formen des PTC sowie eines PDTTC. (A) klassisches PTC: papilläre Strukturen, begrenzt durch kubische Zellen mit charakteristischen Kernveränderungen (Hämatoxylin und Eosin; x 300). (B) folliculäre Variante des PTC: folliculäre Strukturen, begrenzt durch kubische Zellen mit prominenten Kerneinkerbungen und Pseudoinklusionen (Hämatoxylin und Eosin; x 400). (C) hochzellige Variante des PTC: folliculäre und papilläre Strukturen, Tumorzellen mit säulenförmiger Form und eosinophilem Zytoplasma, teilweise Kernüberlagerungen (Hämatoxylin und Eosin; x 300). (D) PDTTC: dichte Proliferation von Zellen mittlerer Größe, spärliches Zytoplasma, fokal ist ein trabekuläres Wachstumsmuster erkennbar (Hämatoxylin und Eosin; x 400) (57)

Auch ihre molekularpathologischen Charakteristika weichen vom klassischen PTC ab, worauf später näher eingegangen wird. BRAF-Mutationen sind beispielsweise seltener aufzufinden als beim cPTC (50). Es gibt eine bekapselte (EFVPTC) sowie eine unbekapselte bzw. invasive Form des FVPTC (51). Die noninvasive, bekapselte Form des FVPTC (EFVPTC) wird neuerdings nicht mehr zu den Schilddrüsenkarzinomen gezählt und trägt nun als eigenständige Entität den Namen „noninvasive folliculäre Schilddrüsenneoplasie mit Papillen-ähnlichen nukleären Merkmalen“ (engl. *noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features*, NIFTP) (52,

53). Begründet wird diese Neuklassifizierung durch das eher benigne Verhalten dieses Tumors, indem er nicht zu Metastasen oder Rezidiven führt und mit einer sehr guten Prognose einhergeht (54). Zytologische Merkmale eines PTC sind weiterhin erkennbar. Positioniert wird die NIFTP als sog. *borderline tumor* zwischen dem follikulären Adenom und dem FTC oder der invasiven bekapselten Variante des PTC (55).

Neben der klassischen, der hochzelligen und der follikulären Variante sind außerdem die papillären Mikrokarzinome (PMTc) von Bedeutung. Allgemein sind Mikrokarzinome besonders kleine Karzinome mit einem Durchmesser von 1 cm oder weniger. Es handelt sich meist um Zufallsbefunde, die nicht selten übersehen werden. In der Regel ist keine Kapsel vorhanden und das Gewebe ist sklerosiert. Multifokalität ist zudem häufig. Die Inzidenz papillärer Mikrokarzinome steigt in letzter Zeit an. Dies ist vor allem auf verbesserte Diagnostikmethoden zurückzuführen (56).

PTC können solitär auftreten oder als multifokale Knoten innerhalb der Schilddrüse verteilt sein. Der Anteil multifokaler Karzinome unter allen PTC wird auf über 30% geschätzt (58). Dabei wird diskutiert, ob die einzelnen Knoten mehreren Primärtumoren entstammen oder intraglanduläre Metastasen eines Ursprungsknotens darstellen (59).

Molekularpathologie

Zu den molekulargenetischen Veränderungen, die typischerweise bei einem PTC nachgewiesen werden können, zählt an erster Stelle die BRAF-Mutation mit durchschnittlich 45 % im europäischen Raum (18) bis über 80 % in Südkorea (19), gefolgt von *RET/PTC-Rearrangements* (10-20 %) sowie RAS-Mutationen (10-20 %) (10). Außerdem können *TKR-Rearrangements* oder ALK-Mutationen auftreten (86, 267). Die Prävalenz der jeweiligen Genveränderungen unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Subtypen des PTC. In Bezug auf die BRAF-Mutation wird darauf in einem späteren Abschnitt näher eingegangen.

Prognose

Die Prognose des PTC ist allgemein sehr gut. Die 10-Jahres-Überlebensrate beträgt mehr als 90 %, bei jungen Patienten sogar 98-100 %. Die Prognose sinkt mit steigendem Alter des Patienten, zunehmender Tumorgröße und extraglandulärer Ausdehnung des Tumors (64).

2.3.2 Follikuläres Schilddrüsenkarzinom (FTC)

Das follikuläre Schilddrüsenkarzinom entwickelt sich morphologisch aus einer Vorläuferläsion mit Kapsel, entsprechend einem Adenom. Ob die Entwicklung eines FTC dabei genetisch determiniert ist oder eine Entartung eines Adenoms spontan entsteht, ist unklar. Das FTC kommt etwas weniger häufig vor als das PTC, zählt aber mit ihm zu den häufigsten Schilddrüsenkarzinomen. Es betrifft meistens Frauen und hat seine höchste Inzidenzrate in Jodmangelgebieten (35).

Charakteristika

Das FTC hat wie das PTC seinen Ursprung in den follikulären Zellen. Namensgebend ist der follikuläre Aufbau des Karzinoms, das von einem Adenom manchmal nur schwer abzugrenzen ist. Papilläre Strukturen fehlen. Eine Kapsel kann, muss aber nicht vorhanden sein. Im Gegensatz zum follikulären Adenom ist es in der Lage, invasiv in benachbarte Strukturen zu wachsen (65).

Molekularpathologie

Eine wichtige Rolle beim FTC spielen vor allem RAS-Mutationen sowie *PAX/PPAR γ -Rearrangements*. Bis zu 85 % der konventionellen FTC besitzen mindestens eine dieser Genveränderungen. Da sowohl RAS-Mutationen als auch *PAX8/PPAR γ -Rearrangements* aber auch bei benignen Schilddrüsenerkrankungen, wie dem follikulären Adenom, sowie beim FVPTC vorkommen können, sind sie weder spezifisch für das FTC noch für Malignität allgemein (66).

Prognose

Die Prognose des FTC ist etwas schlechter als die des PTC. Je nachdem, wie invasiv das Wachstum des Tumors ist, beträgt die 10-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit einem FTC 50-90 % (35).

2.3.3 Medulläres Schilddrüsenkarzinom (MTC)

Das medulläre Schilddrüsenkarzinom hat seinen Ursprung in den parafollikulären C-Zellen der Schilddrüse (65). Es stellt einen Anteil von 1-10 % der Schilddrüsenkarzinome dar (3, 67). Der Entstehung liegt entweder eine familiäre genetische Prädisposition (25 %) oder eine sporadische Keimbahnmutation im RET-Protoonkogen (75 %) zugrunde. Ein typischer Tumormarker der auch als C-Zell-Karzinom bezeichneten Erkrankung ist das von den C-Zellen produzierte Calcitonin (3).

Molekularpathologie

Als Ursache für das MTC liegt meistens eine Mutation des RET-Protoonkogens vor. In RET-negativen Fällen sind Mutationen der RAS-Gene möglich (67).

Prognose

Durch Familien- bzw. Calcitonin-Screenings kommt es immer seltener zur Entwicklung von MTC, da diese bei einer vorliegenden C-Zell-Hyperplasie rechtzeitig prophylaktisch reseziert werden (35). Hat sich bereits ein Karzinom entwickelt, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 75 % (27).

2.3.4 Gering Differenziertes Schilddrüsenkarzinom (PDTC)

Unter den differenzierten Schilddrüsenkarzinomen repräsentiert das PDTC nur einen kleinen Anteil von 0,3-6,7 %. In der neuesten WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2017 positioniert es sich zwischen den differenzierten Karzinomen und dem anaplastischen Schilddrüsenkarzinom (ATC) (37). Das PDTC entsteht überwiegend de novo, seltener entwickelt es sich aus einem bereits bestehenden PTC oder FTC (10).

Molekularpathologie

Molekulargenetisch lässt sich das PDTC nicht klar charakterisieren (35). Es kommen gelegentlich RAS-Mutationen (68) und Mutationen des p53-Tumorsuppressorgens vor. Liegt, in seltenen Fällen, eine BRAF-Mutation vor, ist das PDTC möglicherweise aus einem zugrundeliegenden PTC entstanden (35).

Prognose

Die Prognose des PDTC ist schlechter als die der differenzierten Karzinome und besser als die des ATC. Die 10-Jahres-Überlebensrate beträgt 50 %, etwa 25-35 % der Betroffenen überleben weitere fünf Jahre (69).

2.3.5 Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom (ATC)

Das anaplastische oder auch undifferenzierte Schilddrüsenkarzinom repräsentiert ungefähr 5 % aller Schilddrüsenmalignome (70). In erster Linie soll die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 für die Entstehung dieses Karzinoms verantwortlich sein (71). Außerdem können u.a. BRAF- oder RAS-Mutationen vorliegen (70). Im Falle einer BRAF-Mutation hat sich das Karzinom möglicherweise aus einem differenzierten Schilddrüsenkarzinom entwickelt (35).

Prognose

Das ATC hat wegen seines aggressiven Wachstums unter allen Schilddrüsenkarzinomen die schlechteste Prognose. Über 90 % der Patienten mit einem ATC sterben an dem Karzinom, die mittlere Überlebensrate beträgt maximal sechs Monate (69).

2.4 Diagnostik der Schilddrüse

2.4.1 Klinische Untersuchung

Die Anamnese, körperliche Untersuchung, Bestimmung von Laborwerten, Sonografie, Szintigrafie sowie Feinnadelaspiration nehmen eine wichtige Stellung auf dem Weg zu einer korrekten Diagnose ein.

2.4.1.1 Sonografie

Im Rahmen der Schilddrüsendiagnostik wird die Sonografie routinemäßig angewandt. (2). Durch sie lassen sich Strukturveränderung mit einem Durchmesser von nur 2 mm nachweisen. Dadurch ist die Sonografie ein deutlich sensitiveres Verfahren als die reine Palpation, da sie auch in der Lage ist, nicht palpable Knoten zu identifizieren und deren Abgrenzungen zu benachbarten Strukturen darzustellen (1).

Die EU-TIRADS-Klassifikation, benannt nach dem *2017 European Thyroid Imaging and Reporting Data System*, soll dabei helfen, Befunde nach bestimmten sonografischen Kriterien zu sortieren sowie die Entscheidung für eine Feinnadelpunktion abzuwägen. Es gibt fünf Kategorien (EU-TIRADS 1-5), die den Befunden „normal/ keine Knoten“, „benigne“ sowie „niedriges“, „mittelgradiges“ und „hochgradiges Malignitätsrisiko“ entsprechen (268). *Tabelle 1* definiert die Kategorien anhand ihrer sonografischen Merkmale und ihres durchschnittlichen Malignitätsrisikos in Prozent.

Eine sonografische Untersuchung der Halslymphknoten wird zusätzlich bei allen Schilddrüsenknoten empfohlen und ist nach EU-TIRADS zudem verpflichtend bei Knoten mit mittel- und hochgradigem Malignitätsrisiko (268).

Tabelle 1 EU-TIRADS-Kategorien mit entsprechenden sonografischen Merkmalen und Malignitätsrisiken (268)

Kategorie	Sonografische Merkmale	Malignitätsrisiko (%)
EU-TIRADS 1: normal	Keine Knoten	Keines
EU-TIRADS 2: benigne	Reine Zyste, vollständig spongiform	≈ 0
EU-TIRADS 3: niedriges Risiko	Ovoid, weich, echogleich/ echoreich Keine hochsuspekten Merkmale	2-4
EU-TIRADS 4: mäßiges Risiko	Ovoid, weich, leicht echoarm Keine hochsuspekten Merkmale	6-17
EU-TIRADS 5: hohes Risiko	Mindestens eines der folgenden hochsuspekten Merkmale: <ul style="list-style-type: none"> - Unregelmäßige Form - Unregelmäßige Begrenzung - Mikrokalzifikationen - Deutlich echoarm (und solide) 	26-87

Zur Durchführung einer FNA im Anschluss an die Sonografie werden nach EU-TIRADS folgende Empfehlungen ausgesprochen (268):

- **EU-TIRADS 2:** *keine FNA (oder zur Drainage)*
- **EU-TIRADS 3:** *FNA bei Knoten > 20 mm*
- **EU-TIRADS 4:** *FNA bei Knoten > 15 mm*
- **EU-TIRADS 5:** *FNA bei Knoten > 10 mm; bei Knoten < 10 mm FNA oder aktive Überwachung*

2.4.1.2 Nuklearmedizinische Verfahren

Szintigrafie

Als nuklearmedizinisches Verfahren wird in der Schilddrüsendiagnostik meist auf die bildgebende Technik der Szintigrafie zurückgegriffen, insbesondere bei niedrigem TSH-Spiegel im Serum und dem Verdacht auf einen Strumaknoten (77). Die Ergebnisse der Untersuchung geben Hinweise auf die Stoffwechselaktivität der entsprechenden potentiell pathologischen Struktur.

Bei der Tc-Szintigrafie bedient man sich der Tatsache, dass sich radioaktive Substanzen wie Technetium (Tc) in der Schilddrüse ansammeln, nachdem sie intravenös injiziert wurden. Eine Gammakamera kann anschließend ein maßstabgetreues Bild über

die Verteilung der Substanzen in den Thyreozyten erzeugen. Dabei unterscheidet man diagnostisch zwischen „heißen“, „warmen“ und „kalten“ Areale, die einer lokalen Hyper- bzw. Hypoaktivität entsprechen. Eine lokale Hyperaktivität stellt dabei ein Gebiet funktioneller Autonomie dar (77). Ein maligner Befund ist in diesem Fall sehr unwahrscheinlich, meistens handelt sich um einen Strumaknoten (77). Bei Nachweis einer Autonomie soll daher keine Feinnadelpunktion erfolgen, um unnötige Punktionen (bei benignen Befunden) zu vermeiden (77, 268). Kalte Knoten, die etwa 80-85 % aller Schilddrüsenknoten ausmachen, können auf Malignome sowie Zysten, entzündliche Veränderungen oder Adenome hindeuten. Trotz der überwiegenden Anzahl kalter Knoten, liegt die Malignitätswahrscheinlichkeit aber auch hier nur bei ca. 10 % (270). Die Entscheidung für eine FNA muss in diesen Fällen von weiteren, insbesondere sonografischen Befunden abhängig gemacht werden (260). Zusammenfassend dient die Szintigrafie also dem Nachweis oder Ausschluss einer Autonomie im Gewebe, wodurch die Indikationen für FNA eingeschränkt werden, und nicht der klaren Unterscheidung zwischen benignen und malignen Knoten. Ein Vorteil der Szintigrafie besteht im Übrigen darin, dass sich die injizierten Substanzen auch in Metastasen eines Schilddrüsenkarzinoms anreichern können. Deshalb wird häufig nach einer Resektion eines Malignoms ein Szintigramm zur Kontrolle angefertigt, um den Therapieerfolg zu dokumentieren (1, 271).

2.4.2 Feinnadelpunktion

Die Durchführung von Feinnadelpunktionen zählt nicht zu den routinemäßigen Untersuchungsverfahren der Schilddrüse. Punktionen sollten nur durchgeführt werden, sobald aufgrund der Patientenanamnese sowie klinisch und/oder bildgebend der Verdacht auf eine maligne Veränderung der Schilddrüse besteht.

Folgende Konditionen stellen eine Indikation zur FNA dar (77):

- Patienten mit klinischen Anzeichen eines Schilddrüsenkarzinoms
- Knoten mit einem Durchmesser von > 10 mm und mindestens zwei sonografischen Kriterien für Malignität
- Knoten jeder Größe mit extrakapsulärer Ausdehnung oder unklar bzw. verdächtig erscheinenden Halslymphknoten
- Knoten jeder Größe bei Patienten mit vorangegangener Bestrahlung im Halsbereich

- Nachweis von differenzierten Schilddrüsenkarzinomen in der Anamnese von mehr als zwei Verwandten ersten Grades
- Medulläres Schilddrüsenkarzinom oder Multiple Endokrine Neoplasien (MEN) Typ 2
- Erhöhter Calcitonin-Spiegel

Eine Punktion von Knoten mit einem Durchmesser von < 10 mm soll nur bei ausgewählten Knoten mit hochgradigem Malignitätsrisiko (gemäß EU-TIRADS 5) erfolgen (268). Begründet wird dies mit einer abnehmenden Sensitivität der FNA bei Verringerung des Knotendurchmessers (269). Außerdem soll ausdrücklich keine Punktion bei szintigrafischem Nachweis einer Autonomie sowie bei fehlenden sonografisch suspekten Merkmalen durchgeführt werden (77). Bei sonografisch suspekten Halslymphknoten sollten diese zusätzlich zu dem oder den tumorverdächtigsten Schilddrüsenknoten punktiert werden (268).

Sobald zytologisch ein Anhalt für Malignität besteht, ist eine histologische Abklärung erforderlich (73).

Technik

Da einige Knoten nicht palpabel sind und primär erst sonografisch auffallen, sollte die Feinnadelpunktion immer von einer sonografischen Aufzeichnung begleitet werden (2). Eine Ausnahme können feste, palpable Knoten darstellen (6).

Die Nadel sollte nicht zu dick sein, da sonst rote Blutkörperchen das zytologische Bild des zu untersuchenden Knotens stören können (74). Die Verwendung dünnerer Nadeln, üblicherweise der Größe 23 bis 27 Gauge (75), ist zudem angenehmer für den Patienten (76).

Man unterscheidet zwischen Feinnadelpunktionen mit Aspiration (FNA) und Punktionen, bei denen kein Unterdruck aufgebaut wird (77). Nachdem die Nadel in den zu untersuchenden Knoten eingestochen wurde, wird bei der Methode mit Aspiration zunächst ein Unterdruck aufgebaut und die Nadel anschließend mehrfach und in mehrere Richtungen vor- und zurückbewegt. Fünf bis zehn Oszillationen pro Sekunde steigern den Gewinn an Zellmaterial, da so Gewebefragmente durch die Nadel abgeschnitten werden (78). Mehrmaliges Punktieren scheint die Anzahl nicht-diagnostischer Proben zu reduzieren (79). Leider wird die Qualität einer Feinnadelpunktion in vielen Fällen durch einen zu schwachen Sog oder eine fehlerhafte Ausstrichtechnik

negativ beeinflusst und führt so zu insuffizienten Ergebnissen in der zytologischen Diagnostik. Nach einer Metaanalyse von Bongiovanni, M., *et al.* beträgt der Anteil nicht-diagnostischer, also insuffizienter Feinnadelaspirate 1,8-23,5 % (4). Auch kann der Unterdruck zur Beeinträchtigung der zytologischen Qualität beitragen, indem es zu einer erhöhten Aufnahme von Blutzellen kommt. Außerdem kann das Gewebe des Knotens stark traumatisiert werden, was die histologische Diagnostik beeinflusst. Die Verwendung einer aspirationsfreien Technik kann hier Abhilfe schaffen (273, 274, 275). Die zytologischen Proben werden auf Glasplatten ausgestrichen und anschließend luftgetrocknet oder mit Alkohol fixiert (78). Formalin sollte nicht zur Fixierung verwendet werden, falls eine molekulargenetische Analyse der DNA erfolgen soll, da es eine exakte Isolation der DNA behindert (75). Anschließend stehen die Proben der zytologischen und eventuell molekulargenetischen Untersuchung zur Verfügung. Im Fall einer insuffizienten Probe sollte eine Repunktion durchgeführt werden (80).

2.4.3 Biopsie

Neben der FNA (auch FNA-Biopsie, FNAB) gibt es Methoden für die Entnahme deutlich größerer Gewebemengen, z.B. in Form einer Exzisionsbiopsie. Nach der Leitlinie „Operative Therapie maligner Schilddrüsenerkrankungen“ der Deutschen Gesellschaft für Allgemein- und Viszeralchirurgie (DGAV) ist eine solche Biopsie in Fällen indiziert, bei denen die zytologische Untersuchung nach FNA insuffizient war, eine eindeutige Diagnose vor einer Operation jedoch unbedingt erforderlich ist, um Indikation und ggf. Resektionsausmaß festzulegen. Dies trifft zu bei „großen oder lokal infiltrierenden, potentiell irresektablen Tumoren“, „Verdacht auf ein malignes Lymphom“ sowie „Lymphknotenvergrößerung bei unbekanntem Primärtumor“ (73).

2.4.4 Zytologie und Histologie

Nach Einbettung des Ausstriches steht der Pathologe vor der Aufgabe, das Material zu befunden. Zusätzlich sollte er anamnestische und klinische Befunde des Patienten erhalten haben (77). Die Sensitivität der zytologischen Untersuchung beträgt je nach Qualität des Materials 65-97 %, die Spezifität 50-100 % (4-8). Die Werte werden durch die Erfahrung und teilweise subjektive Interpretation der Pathologen beeinflusst sowie durch die Qualität und Quantität der zu untersuchenden Gewebeproben (81, 82). Auch spielt es eine Rolle, ob ein Pathologe die Aspiration durchführt und untersucht oder dies durch einen behandelnden Arzt anderer Hauptfunktion geschieht, der die Probe

entweder selbst untersucht oder an einen Pathologen weitergibt (81). Zudem kann das Wissen des Pathologen über vorliegende Mutationen die zytologische Diagnosestellung beeinflussen (83).

Tabelle 2 Empfohlene diagnostische Kategorien nach dem *2017 Bethesda System for Thyroid Cytopathologie* (28)

<p>I. NONDIAGNOSTIC OR UNSATISFACTORY Cyst fluid only Virtually acellular specimen Other (obscuring blood, clotting artifact, etc.)</p> <p>II. BENIGN Consistent with a benign follicular nodule (includes adenomatoid nodule, colloid nodule, etc.) Consistent with lymphocytic (Hashimoto) thyroiditis in the proper clinical context Consistent with granulomatous (subacute) thyroiditis Other</p> <p>III. ATYPIA OF UNDETERMINED SIGNIFICANCE or FOLLICULAR LESION OF UNDETERMINED SIGNIFICANCE</p> <p>IV. FOLLICULAR NEOPLASM or SUSPICIOUS FOR A FOLLICULAR NEOPLASM Specify if Hürthle cell (oncocytic) type</p> <p>V. SUSPICIOUS FOR MALIGNANCY Suspicious for papillary carcinoma Suspicious for medullary carcinoma Suspicious for metastatic carcinoma Suspicious for lymphoma Other</p> <p>VI. MALIGNANT Papillary thyroid carcinoma Poorly differentiated carcinoma Medullary thyroid carcinoma Undifferentiated (anaplastic) carcinoma Squamous-cell carcinoma Carcinoma with mixed features (specify) Metastatic carcinoma Non-Hodgkin lymphoma Other</p>
--

Zur Kategorisierung der Befunde existieren verschiedene teils informelle, teils standardisierte Systeme. An der Universitätsmedizin Mainz werden die Befunde üblicherweise in vier Kategorien eingeteilt. Dazu zählen „insuffizient“, „benigne“, „suspekt“ und „maligne“. Ein anderes, das international verbreitete Bethesda-System (*Tabelle 2*) beinhaltet zwei weitere Kategorien: „*atypia of undetermined significance*“ (AUS) bzw. „*follicular lesions of undetermined significance*“ (FLUS) und „*follicular neoplasm*“ bzw. „*suspicious for a follicular neoplasm*“. Jede Kategorie enthält zwei Bezeichnungen, von

denen jeweils nur eine ausgewählt werden soll. Alle insgesamt sechs Kategorien bergen ein unterschiedliches Malignitätsrisiko, die Kategorie „benigne“ etwa 0-3 %, die Kategorie „maligne“ bis zu 99 % (28).

Durch die neue WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2017 ist die Diagnostik von PTC schwieriger geworden. Die darin separat aufgeführten NIFTP lassen sich zytologisch nicht von den PTC unterscheiden (52, 55). Hier hilft eine Testung auf eine BRAF-Mutation. Bei einem positiven Testergebnis ist ein NIFTP ausgeschlossen (55, 130, 131). In einem späteren Abschnitt wird näher auf die NIFTP eingegangen.

2.4.5 Molekularpathologie

Der Einsatz molekularer Marker zur Durchführung von DNA-Analysen ist im Laufe der letzten Jahrzehnte zu einem wichtigen Baustein in der Schilddrüsendiagnostik geworden. Durch sie sollen die Genauigkeit der Feinnadelpunktionen erhöht, die Therapieplanung optimiert und die Prognose des Patienten verbessert werden (10-14). In den meisten Fällen ist durch die Zytologie eine klare Diagnose in Richtung „benigne“ oder „maligne“ möglich. Circa 15-25 % der FNA zählen jedoch zu den Bethesda-Kategorien III und IV mit der allgemeinen Bezeichnung „*indeterminate for malignancy*“ (84). Manche Autoren beziehen die Bezeichnung zusätzlich auf die Kategorie V („suspekt für Malignität“) dazu (85), was den Anteil vergrößert. Bei Fällen der Kategorien IV und V wird in der Regel anschließend operiert und erst durch histologische Untersuchung eine sichere Diagnose gestellt (4). Wird jedoch präoperativ noch eine molekulargenetische Testung durchgeführt, kann ein eindeutiges Testergebnis hilfreich für Diagnostik und Therapieplanung sein. Besonders beim papillären und follikulären Schilddrüsenkarzinom sind molekulargenetische Tests von hoher Bedeutung. Eine Übersicht der häufigsten Genveränderungen bei den Schilddrüsenkarzinomen zeigt *Tabelle 3*.

Beim papillären Schilddrüsenkarzinom lassen sich Punktmutationen auf den BRAF- und RAS-Genen sowie *RET/PTC*- und *TRK-Rearrangements* und ALK-Mutationen nachweisen (10, 19, 86, 267). Mutationen des BRAF-Gens wurden bisher im Falle der Schilddrüse nahezu ausschließlich beim PTC identifiziert und eignen sich aus diesem Grund exzellent als Marker für dieses Karzinom (155, 119). Beim FTC sind wiederum die RAS-Mutationen und *PAX8/PPAR γ -Rearrangements* von Bedeutung (86). Insgesamt haben BRAF- und RAS-Mutationen sowie *RET/PTC*- und *PAX/PPAR γ -Rearrangements* eine größere diagnostische Aussagekraft als andere, seltenere genetische

Veränderungen der Schilddrüse. In den folgenden Abschnitten werden sie einzeln detailliert beschrieben.

Tabelle 3 Durchschnittliche Prävalenz von Mutationen bei verschiedenen Schilddrüsenkarzinomen (10)

Tumor Type	Prevalence, %
Papillary carcinoma	
<i>BRAF</i>	40–45
<i>RET/PTC</i>	10–20
<i>RAS</i>	10–20
<i>TRK</i>	<5
Follicular carcinoma	
<i>RAS</i>	40–50
<i>PAX8-PPARγ</i>	30–35
<i>PIK3CA</i>	<10
<i>PTEN</i>	<10
Poorly differentiated carcinoma	
<i>RAS</i>	25–30
β -Catenin (<i>CTNNB1</i>)	10–20
<i>TP53</i>	20–30
<i>BRAF</i>	10–15
Anaplastic carcinoma	
<i>TP53</i>	70–80
β -Catenin (<i>CTNNB1</i>)	60–70
<i>RAS</i>	40–50
<i>BRAF</i>	20–30
Medullary carcinoma	
Familial forms <i>RET</i>	>95
Sporadic <i>RET</i>	40–50

2.4.5.1 RAS

RAS-Mutationen sind nach den BRAF-Mutationen die zweithäufigsten Mutationen unter den Schilddrüsenkarzinomen (87). 40-50 % der FTC bzw. ATC, 25-30 % der PDTC und 10-20 % der PTC (meistens FVPTC) tragen eine RAS-Mutation (10), außerdem sind sie bei 18-40 % der follikulären Adenome (88-90) sowie beim NIFTP zu finden (91). Man unterscheidet drei Isoformen, *KRAS*, *HRAS* und *NRAS*, wobei letztere am häufigsten vorkommt (91). Durch eine RAS-Mutation kann u.a. sowohl der MAPK-Signaltransduktionsweg als auch der PI3-AKT-Weg aktiviert werden. Der MAPK-Signaltransduktionsweg nimmt zusammen mit Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Hormonen eine regulierende Funktion bei Zellteilung, -wachstum und -differenzierung ein (92). Eine ähnliche Rolle spielt der PI3-AKT-Transduktionsweg (93), und zwar hauptsächlich bei Neoplasien mit vorwiegend follikulärem Muster, wie dem FTC (94). Da RAS-Mutationen auch bei einem großen Teil benigner Schilddrüsenerkrankungen vorkommen (88-90), sind sie nicht spezifisch für Malignität.

2.4.5.2 PAX8/PPAR γ

Ähnlich den RAS-Mutationen kommen *PAX8/PPAR γ -Rearrangements* vor allem bei Karzinomen mit follikulärem Muster sowie beim follikulären Adenom vor (95). Sie sind fast nie simultan mit RAS-Mutationen anzutreffen (66). Es handelt es sich um eine Fusion der gleichnamigen Gene PAX8 und PPAR γ (96). Durch die Genfusion kommt es zur Expression des Proteins PFP, welches wiederum die Aktivität des Tumorsuppressorgens PPAR γ negativ beeinflusst (97). Folglich spielt dieser Prozess eine Rolle in der Entstehung von Tumoren.

2.4.5.3 RET/PTC

Das RET-Protoonkogen codiert für die Rezeptor-Tyrosinkinase Ret (98), welche eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung in der Embryonalentwicklung spielt (99, 100). Die Expression des RET-Gens findet nur in den parafollikulären C-Zellen statt. Dort können RET-Mutationen zur Entwicklung eines MTC führen. Durch von RET-Mutationen zu unterscheidende *RET/PTC-Rearrangements* kann die durch das RET-Gen exprimierte Rezeptor-Tyrosinkinase auch in den follikulären Zellen aktiviert werden (98). Eine solche chromosomale Veränderung führt zu einer ununterbrochenen Aktivität der Tyrosinkinase (101). Darüber kann der bereits beschriebene MAPK-Signaltransduktionsweg aktiviert werden (102). *RET/PTC-Rearrangements* haben folglich das Potenzial zur Tumorgenese (103, 104). Auch wenn sie selten auch bei benignen Tumoren wie den Adenomen gefunden werden, stellen die klonalen *RET/PTC-Rearrangements* spezifische Marker für das PTC dar (10, 105, 106). Bei 10-20 % der PTC lassen sich *RET/PTC-Rearrangements* identifizieren (10).

2.4.5.4 BRAF

Definition

BRAF, oder auch B-Raf, ist ein humanes Protein aus der Familie der Serin-/Threonin-Kinasen, die durch jeweilige RAF-Gene codiert (92) und durch die Bindung an RAS reguliert werden (107, 108). Zusammen mit den Proteinen A-Raf und C-Raf bzw. Raf-1 ist es Teil des MAPK-Signaltransduktionsweges (92, 110), der in *Abb. 3* zu sehen ist. Die Aktivierung dieses Signalweges, z.B. durch eine Mutation des RAF-Gens, ist die Grundlage vieler maligner Tumoren (15). RAF-Gene gelten daher als Onkogene (92). Da das B-Raf-Protein die höchste Kinase-Aktivität unter den drei RAF-

Isoformen besitzt (109), spielt die BRAF-Mutation im Bereich der Karzinome eine vergleichsweise große Rolle.

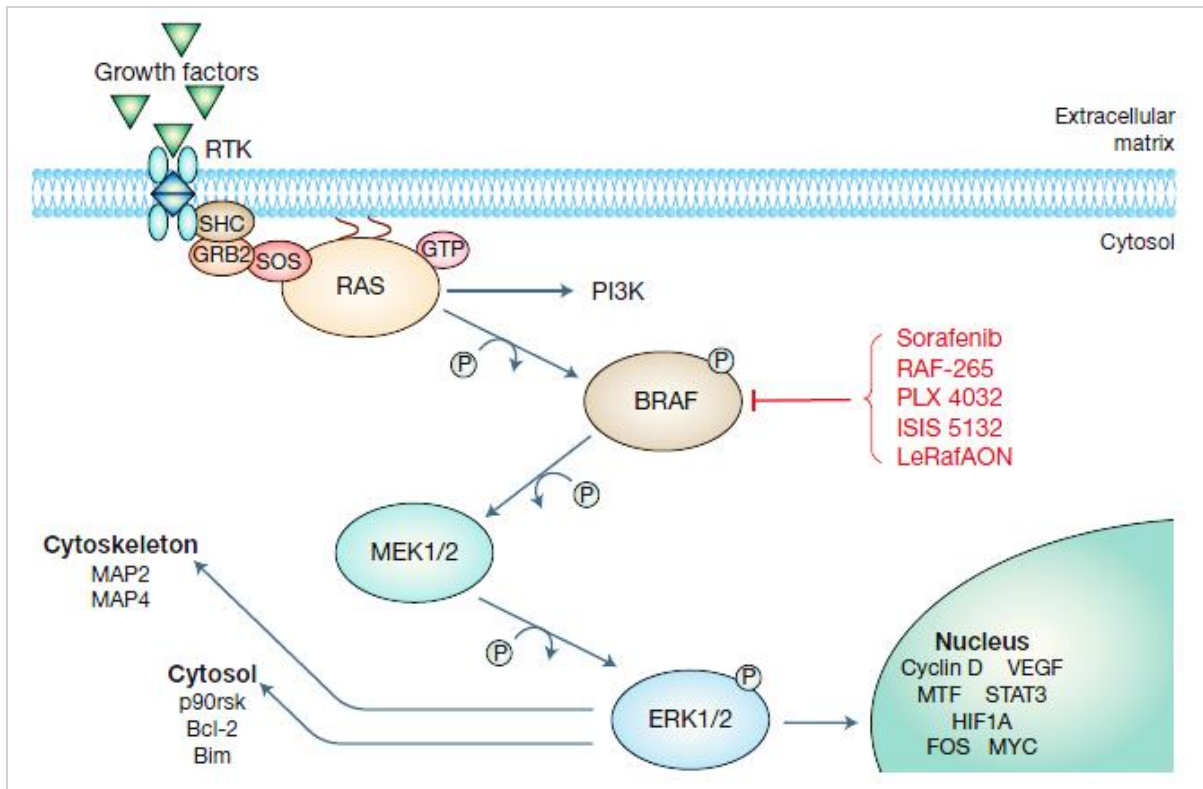


Abb. 3 BRAF-Kinase als Mediator im MAPK-Signaltransduktionsweg (110)

Bei der BRAF-Mutation handelt es sich bei 80-95 % der Fälle um einen Basenaustausch von Thymin gegen Adenin im Codon 600 (V600E, ehemals V599E (111)) des Nukleotids 1799, was infolgedessen bei der Proteinbiosynthese zu einem Austausch der Aminosäure Valin gegen Glutamat führt (112). Man spricht daher von einer BRAF V600E-Mutation. Durch die Mutation wird eine Enzymkaskade aktiviert: Die proteineigene BRAF-Kinase ist durchgehend aktiv und stimuliert den MAPK-Signaltransduktionsweg (15, 111). Dies hat einen kanzerogenen Effekt auf die Zellen des betroffenen Gewebes (111). In seltenen Fällen können auch andere Varianten einer BRAF-Mutation vorliegen. Ein Beispiel dafür ist die BRAF K901E-Mutation, auf die in einem späteren Abschnitt zurückgegriffen wird (113). Während in dieser Arbeit häufig nur von „*BRAF*“ gesprochen wird, ist ausschließlich die BRAF V600E-Mutation gemeint, sollte keine andere Bezeichnung verwendet werden.

Vorkommen

Etwa 7 % aller humanen Tumore sind von einer BRAF-Mutation betroffen (114). Im menschlichen Körper zeigt *BRAF* die höchste Frequenz beim malignen Melanom

(> 60%) (110). Ein bekannter Risikofaktor für die Entstehung dieses Karzinoms, die UV-Strahlung, scheint von der BRAF-Mutation unabhängig zu sein, da durch beide jeweils unterschiedliche Aktivierungswege in Gang gesetzt werden, die zur Tumorentstehung beitragen (15). Diverse Autoren berichten von einer hohen Prävalenz der BRAF-Mutation von bis zu 82% in benignen Naevi der Haut (115, 116). Diese Naevi können als prämaligne Läsionen und die BRAF-Mutation wiederum als Risikofaktor für die Entstehung eines malignen Melanoms betrachtet werden (110).

Neben dem malignen Melanom tritt die BRAF-Mutation hauptsächlich bei kolorektalen und ovarialen Karzinomen sowie beim papillären Schilddrüsenkarzinom auf. Es kann außerdem bei Mammakarzinomen, Lungen- und Leberkarzinomen, Gliomen, Sarkomen, dem Multiplen Myelom, der Haarzelleukämie und der Langerhans-Zell-Histiozytose vorkommen (15, 114, 117-121).

Im Bereich der Schilddrüse kommt die BRAF-Mutation hauptsächlich beim PTC vor (16). Durchschnittlich 45 % aller PTC sind Träger einer BRAF-Mutation (18), in Südkorea werden sogar Werte von über 80 % erreicht (19). Seltener ist sie auch beim ATC und PDTC präsent. Es wird davon ausgegangen, dass sich diese Fälle aus einem schon vorher bestehenden PTC entwickelt haben (17). Das Vorliegen einer BRAF-Mutation soll ein PTC nämlich zur Entdifferenzierung zu ATC bzw. PDTC prädisponieren, welche unter dieser Voraussetzung übrigens mit einer deutlich schlechteren Prognose verbunden sind (112). Bei FTC, MTC, follikulären Adenomen und Hyperplasien kommt die BRAF V600E-Mutation im Allgemeinen nicht vor (17, 18, 122-124). Zwei Publikationen berichten von der Identifikation der BRAF-Mutation bei benignen thyroidalen Läsionen. Bei beiden wird jedoch vermutet, dass es sich jeweils um prämaligne Vorstufen des PTC handelte, welche bereits mutierte BRAF-Gene besaßen (125, 126). Unter den PTC lässt sich die BRAF V600E-Mutation am häufigsten bei PTC mit klassischem papillären Aufbau, bei PTC der hochzelligen Variante (18, 127) und beim Warthin-ähnlichen PTC nachweisen (113). Bei der follikulären Variante des PTC (FVPTC) ist die BRAF V600E-Mutation relativ selten zu finden (0-32 %) (18, 127). Der Grund dafür liegt darin, dass diese Form eine größere genetische Ähnlichkeit zu den follikulären Schilddrüsentumoren aufweist, welche ein gegenüber dem PTC anderes genetisches Muster sowie eine höhere Prävalenz für RAS-Mutationen besitzen (111, 128, 129). Eine Studie von Kim, M., *et al.* untersuchte die genetischen Merkmale des NIFTP, welches ehemals einen follikulären Subtyp des PTC darstellte (130). Für NIFTP ist die Abwesenheit der BRAF V600E-Mutation charakteristisch (130, 131).

Unter anderem aufgrund dieses Merkmals entspricht das NIFTP nach der aktuellsten WHO-Klassifikation einer eigenen Entität und gehört nicht mehr zur Gruppe der PTC (55).

Die bereits erwähnte, seltene BRAF K601E-Mutation ist im Gegensatz zu BRAF V600E eher mit der follikuläre Variante des PTC assoziiert (132). Zudem soll sie auch bei benignen Tumoren vorkommen. Macerola, E., *et al.* und Soares, P., *et al.* berichten jeweils von der Identifikation von *BRAF K601E* in einem follikulären Adenom (133, 134).

Eine bestimmte Tumorgöße scheint keine Bedingung für das Vorliegen einer BRAF-Mutation zu sein. Auch bei den papillären Mikrokarzinomen (PTMC) mit < 1 cm und sogar bei sog. *incidental microcarcinomas* (IM) mit < 1 mm Durchmesser soll die Mutation identifizierbar sein (135). Die Prävalenz der BRAF-Mutation ist unter den Mikrokarzinomen etwas geringer (ca. 30 %) als unter den cPTC (136), unter Mikrokarzinomen mit Durchmessern von nur wenigen Millimetern, die zufällig während der histologischen Untersuchung entdeckt werden, beträgt die Prävalenz nach Ugolini, C., *et al.* sogar nur 17 % (ausgenommen Länder mit generell höherer Prävalenz wie Südkorea) (135). Virk, R. K., *et al.* berichten im Fall eines papillären Mikrokarzinoms u.a. von einer signifikanten Assoziation zwischen BRAF-positivem Status und infiltrativem Wachstum sowie zystischen Veränderungen im tumornahen Gewebe (137).

Geografische Unterschiede

Die Prävalenz von *BRAF* beim PTC unterliegt weltweit starken geografischen Unterschieden. Während in Südkorea, einem Land mit einer hohen Inzidenz des PTC, mehr als 80% aller PTC eine positive Mutation aufweisen (19), sind in westlichen Ländern durchschnittlich 45 % der PTC BRAF-positiv (18). Die regionale Jodaufnahme scheint dabei eine große Rolle zu spielen. Nach Kim, H. J., *et al.* stellen Jodid-Konzentration im Urin von weniger als 300 µg/l und von mindestens 500 µg/l Risikofaktoren für das Auftreten von BRAF-Mutationen dar. Die Jodaufnahme einer Bevölkerung hat folglich Einfluss auf die Prävalenz der BRAF-Mutation und damit auch auf die Entwicklung von PTC (39). Auch Guan, H., *et al.* konnten einen Zusammenhang zwischen *BRAF* und Jodaufnahme feststellen, indem sie in einer Region Chinas mit hoher durchschnittlicher Jodaufnahme eine deutlich höhere BRAF-Prävalenz feststellten als in einer Region mit normalhoher Jodaufnahme (138). Vuong, H. G., *et al.* konnten keinen Einfluss der Jodaufnahme auf die Prävalenz der BRAF-Mutation beobachten (139).

Assoziationen mit Patientenalter und -gewicht

BRAF V600E scheint häufiger bei Patienten höheren Alters ab 45 Jahre vorzukommen. Bei Kindern und Jugendlichen wird die Mutation nur sehr selten beobachtet (57). Außerdem vermuten Shi, R. L., *et al.* in ihrer Studie, dass Übergewicht (definiert durch einen *Body Mass Index* von $\geq 24 \text{ kg/m}^2$) das Auftreten von *BRAF*-Mutationen begünstigen könnte (140).

Sonografische Assoziationen

Eine Reihe von Autoren findet keine Assoziation zwischen dem Vorliegen der *BRAF*-Mutation und sonografischen Merkmalen (141-143). Hahn, S. Y., *et al.* und Zhang, Q., *et al.* konnten allerdings feststellen, dass bei *BRAF*-mutierten PTC bestimmte, mit Malignität assoziierte Kriterien durchschnittlich ausgeprägter in der Sonografie zu sehen sind als bei nicht-mutierten PTC. Dazu zählen eine dichte Struktur, ein echoarmes Binnenmuster, eine oval-runde Form, glatte oder fein-gelappte Begrenzungen sowie Mikrokalzifikationen (144, 145).

Zytologische Assoziationen

Neben den typischen zytologischen Merkmalen des PTC ist *BRAF* u.a. mit polygonalen eosinophilen Zellen (engl. *plump cells*), sichelförmigen Zellkernen (Abb. 4) (146, 147) sowie einem erhöhten Zellkerndurchmesser und Perinuklearraum im Vergleich zu nicht-mutierten Zellen assoziiert (148). Kwon, H. J., *et al.* schlagen vor, zytologisch untersuchte Fälle der Kategorie „*suspicious for malignancy*“ anhand der genannten Zellmerkmale zu filtern und die entsprechenden Proben auf eine *BRAF V600E*-Mutation zu testen (146).

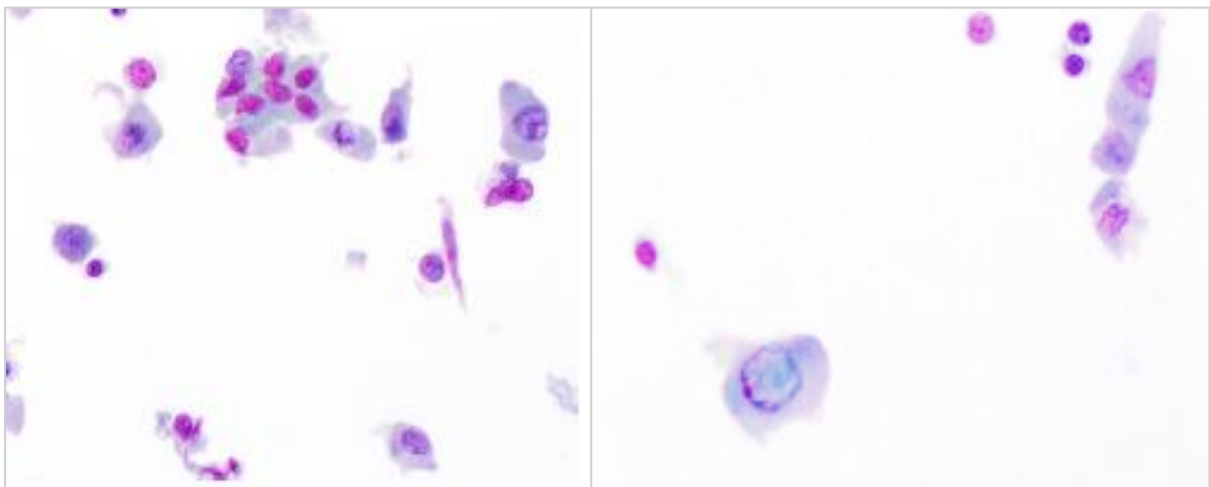


Abb. 4 Links: Polymorphe, eosinophile Zellen (*plump cells*) und sichelförmige Zellkerne (147). Rechts: *Plump cells* mit nukleären Pseudoinklusionen (147)

Verteilung der BRAF-Mutation innerhalb eines Tumors

Subklonalität

Nach Abrosimov, A., Saenko, V., Rogounovitch, T., *et al.* ist der BRAF-Mutationsstatus eines Tumors unabhängig von dem entsprechenden Bereich, der punktiert wurde, und repräsentiert folglich das komplette Tumorgewebe (149). Die Zellpopulation würde man in den Fall als genetisch homogen bzw. klonal bezeichnen. Definitionsgemäß bezeichnet „klonal“ einen Tumor, dessen Zellen alle aus derselben Progenitorzelle entstanden sind und deshalb alle sowohl morphologisch als auch genetisch homogen sind (150). Heutzutage weiß man aber, dass sich die Zellen innerhalb eines Tumors sowohl morphologisch als auch genetisch unterscheiden können, da sich aus der anfänglich klonalen Population unterschiedliche Subpopulationen entwickeln (151). Man bezeichnet dies als Subklonalität eines Tumors (152, 153). Subklonalität findet sich zum Beispiel darin wieder, dass BRAF-positive PTC tatsächlich nur selten rein klonale Tumoren darstellen, sondern meistens sowohl mutierte BRAF-Gene als auch solche vom Wild-Typ enthalten (153). Sie sind folglich genetisch inhomogen. Das Vorkommen von BRAF-Mutationen wird als frühes, subklonales Ereignis in der Entwicklung der PTC angenommen. Während des Tumorwachstums kann sich aus der anfänglichen Subklonalität eine genetisch klonale Zellpopulation entwickeln (152).

Multifokale Karzinome

Sowohl einfache Hyperplasien als auch Tumoren können sich innerhalb des Schilddrüsengewebes multifokal darstellen. Diverse Studien belegen die Möglichkeit einer inhomogenen Verteilung der BRAF-Mutation innerhalb eines multifokalen PTC. Nakazawa, T., *et al.* untersuchten zwölf Fälle mit multifokalem PTC in Bezug auf deren BRAF-Status. Drei dieser Fälle zeigten unterschiedliche BRAF-Status zwischen den verschiedenen Knoten des Karzinoms (58). Auch eine Studie von Kimbrell, H. Z., *et al.* befasste sich mit der unterschiedlichen Verteilung BRAF-mutierter Zellen bei multifokalen PTC. 37 % von insgesamt 57 untersuchten PTC zeigten einen inhomogenen BRAF-Status zwischen unterschiedlichen Knoten eines multifokalen Karzinoms. Interessanterweise zeigte in > 50 % dieser Fälle der größte Knoten einen negativen und der zweitgrößte Knoten einen positiven BRAF-Status. Die Autoren empfehlen deshalb eine molekulargenetische Untersuchung sowohl des größten als auch des zweitgrößten Knotens (154).

BRAF im Zusammenhang mit anderen Mutationen/ Genalterationen*RAS und RET/PTC*

BRAF gilt als spezifisch für das PTC (119, 155). Es gibt beim PTC jedoch noch weitere Genveränderungen, darunter in erster Linie RAS-Mutationen und *RET/PTC-Rearrangements* (86, 156). Im Allgemeinen treten Mutationen von *BRAF* und RAS sowie *RET/PTC-Rearrangements* nicht simultan auf (64, 124). Ein positives Testergebnis auf RAS-Mutationen oder *RET/PTC-Rearrangements* kann folglich eine *BRAF*-Mutation ausschließen, bei einem negativen Testergebnis ist das Vorliegen einer *BRAF*-Mutation noch möglich. Dennoch wurde schon einmal ein simultanes Auftreten von mindestens zwei der oben genannten Genveränderungen dokumentiert (157-159). In diesem Zusammenhang wird von einer schlechteren Prognose gesprochen (157), hervorgerufen durch ein höheres Rezidivrisiko des Karzinoms und eine geringere Überlebenschance (159).

TERT-Promotor-Mutationen (TERT)

Die Telomerase ist ein Protein, welches die Längen der Telomere eines Chromosoms regulieren kann, was während der Zellentwicklung von Bedeutung ist. Eine Untereinheit der Telomerase ist die Telomerase-Reverse-Transkriptase. Das Gen des Promotors, welches bei der Expression der Transkriptase mitwirkt, kann mutieren. Diese *TERT*-Promotor-Mutationen sind spezifisch für bestimmte Tumoren und stellen Einflussfaktoren im Rahmen der Tumorgenese dar. Bisher wurden sie u.a. beim malignen Melanom identifiziert (160). Liu, X., *et al.* wollten aufgrund der Verbindung des malignen Melanoms mit Schilddrüsenkarzinomen, u.a. durch das Vorkommen von *BRAF*-Mutationen, überprüfen, ob *TERT* auch eine Rolle bei den Schilddrüsenmalignomen spielt. Sie konnten diese Mutation erstmalig bei Schilddrüsentumoren beobachten, und zwar ausschließlich beim PTC und beim FTC sowie, sogar mit erhöhter Prävalenz, beim PDTC und ATC. Eine Unterstützung der Entdifferenzierung des PTC in Richtung PDTC bzw. ATC durch *TERT* wird hierbei vermutet. Die Autoren konnten zudem eine relativ hohe Prävalenz von *TERT* bei *BRAF*-positiven PTC erkennen (160). Spätere Studien untersuchten den Zusammenhang zwischen *TERT* und *BRAF* detaillierter und konnten eine signifikante Korrelation zwischen gleichzeitigem Vorliegen von *TERT*, *BRAF* und aggressivem Verhalten des PTC feststellen (144, 161-165). Xing, M., *et al.* sprechen in diesem Zusammenhang sogar von PTC mit „*worst clinicopathologic outcomes*“ (166). Hahn, S. Y., *et al.* berichten zudem von einer deutlichen Zunahme

maligner oder suspekter Merkmale in der Sonografie bei gleichzeitigem Vorliegen von TERT und *BRAF* (144).

p53-Mutationen

Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 werden in erster Linie mit ATC und PDTC assoziiert (167-169). Die aus einer Mutation resultierende Überexpression des p53-Proteins, welches bei der Regulation der physiologischen Zellproliferation mitwirkt (170), soll bei der Tumorgenese bzw. bei der Entdifferenzierung von DTC in Richtung PDTC bzw. ATC eine Rolle spielen (168, 169). Zusätzlich soll eine p53-Mutation mit einer erhöhten Aggressivität des betroffenen Tumors einhergehen, was generell ein Charakteristikum undifferenzierter Schilddrüsenkarzinome darstellt (171).

Wird eine erhöhte Expressionsrate des p53-Proteins im Rahmen der Diagnostik festgestellt, sollte dies folglich als Warnsignal betrachtet werden (172). In einer Studie aus dem Jahr 2015 beschäftigten sich Shin, M. K., *et al.* mit dem Zusammenhang zwischen p53 und *BRAF* im Rahmen papillärer Schilddrüsenkarzinome. Sie konnten keinen signifikanten Zusammenhang feststellen zwischen klinisch-pathologischen Parametern und dem simultanen Auftreten von *BRAF* und p53-Überexpression (173). Dem entgegengesetzt sind Beobachtungen von Fu, Q. F., *et al.*, wonach ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem erhöhten Anteil an p53-Antikörpern im Blutserum und vorliegender *BRAF*-Mutation bei PTC vorliegen soll. Bei simultanem Auftreten beider Parameter wurden eine erhöhte Prävalenz von extrathyroidaler Ausdehnung, Lymphknotenmetastasen, Multifokalität sowie ein durchschnittlich höheres TNM-Stadium des Karzinoms verzeichnet (174).

Assoziationen zwischen *BRAF* und Tumorverhalten bzw. Prognose

Das Vorliegen einer *BRAF*-Mutation scheint mit einem aggressiveren Verhalten des betroffenen Tumors verbunden zu sein. In der Literatur wird in Bezug zu einem positiven *BRAF*-Status von einer stärkeren Größenzunahme, einem höheren Tumorstadium, einer extrathyroidalen Ausdehnung, einer gesteigerten Rezidivrate sowie vermehrten Lymphknoten- und Fernmetastasen berichtet (175-178). Das häufige Vorkommen von *BRAF* bei bilateralen Karzinomen (179) unterstützt diese Assoziationen, da Bilateralität wiederum mit einem aggressiveren Tumorverhalten verbunden ist (180). Finkel, A., *et al.* betrachteten das Tumorverhalten differenzierter in Bezug auf eine *BRAF* betreffende Klonalität und Subklonalität. Subklonalität lag nach Definition der Autoren bei einem Anteil nicht-mutierter *BRAF*-Allele von weniger als 60 % von

der zu erwarteten Menge vor. Es wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen Subklonalität und Tumorgröße dokumentiert. Größere Tumoren sind demnach mit einem größeren Anteil mutierter Allele assoziiert (152). Guerra, A., *et al.* erkannten ebenfalls eine direkte Korrelation zwischen steigendem Anteil BRAF-mutierter Allele und zunehmender Tumorgröße sowie zunehmendem Patientenalter (181). Zudem wurde ein deutlicher Zusammenhang zwischen steigender Rezidivrate und einem Anteil BRAF-mutierter Allele von mindestens 30 % bzw. zwischen abnehmender Rezidivrate und einem Anteil BRAF-mutierter Allele von weniger als 30 % festgestellt.

Nach Cheng, S. P., *et al.* korreliert eine höhere Frequenz mutierter Allele außerdem mit einer häufigeren extrathyroidalen Ausdehnung des Tumors (182).

Subklonalität von BRAF-Mutationen scheint auch das Auftreten von Lymphknotenmetastasen zu beeinflussen. Bei Tumoren mit BRAF-Mutation und Subklonalität ist ein geringeres Vorkommen von Lymphknotenmetastasen zu verzeichnen als bei klonalen Tumoren (152). Diverse weitere Autoren sind der Meinung, dass eine höhere BRAF-Frequenz mit der Entwicklung von Lymphknotenmetastasen assoziiert ist (137, 183-186). Außerdem wird vermutet, dass die BRAF V600E-Mutation dem betroffenen Tumor einen Überlebensvorteil verleiht, indem sie ihm ein schnelleres und stärkeres Wachstum ermöglicht (182). Dieser Überlebensvorteil gilt leider nicht für den Patienten: Während Tumorgröße, extrathyroidale Ausdehnung, Lymphknotenmetastasen, Rezidivrate u.a. proportional zum Anteil mutierter BRAF-Allele steigen, verschlechtert sich bei Vorliegen einer BRAF-Mutation die Prognose für den Betroffenen (187-189).

Hashimoto-Thyreoiditis

Wird ein PTC mit BRAF-Mutation von einer Hashimoto-Thyreoiditis begleitet, scheint diese einen protektiven Effekt zu haben, indem sie das aggressive Verhalten des Karzinoms mindert (190-192).

Resistenz gegenüber radioaktivem Jod

PTC mit mehreren aggressiven Merkmalen können neben einer Thyreoidektomie eine Radio-Jod-Therapie erforderlich machen (193). Allerdings scheint letztere bei PTC mit BRAF-Mutation häufig schlechter anzuschlagen als bei PTC ohne Mutation (194).

miRNA (microRNA)

Micro-RNA sind sehr kleine, endogene, nicht-codierende Ribonukleinsäuren, die eine wichtige Rolle im Zellzyklus einnehmen (195). Die Expressionsrate der miRNA kann

bei Schilddrüsenkarzinomen und bei anderen Karzinomen des Körpers z.B. über zytologische Proben gemessen werden (196). Dabei verhält sich die miRNA-Expression gewebespezifisch (197). Auch bei Vergleich unterschiedlicher Entitäten der Schilddrüsenkarzinome sind Differenzen in ihrer Expression, beispielsweise zwischen dem PDTC und dem PTC zu beobachten (198). Physiologischerweise steigt die miRNA-Expressionsrate während der Zelldifferenzierung, es liegt also eine Hyperexpression vor. Im Rahmen von Karzinomen handelt es sich dagegen meist, entsprechend der abnehmenden Zelldifferenzierung, um eine Hypoexpression der miRNA, seltener um eine Hyperexpression. Entscheidend ist dabei immer die spezielle Variante der untersuchten miRNA. Durch die Expressionsmessung vieler verschiedener miRNA sollen sowohl benigne als auch maligne Läsionen identifiziert werden. Dabei kann sogar schon die miRNA-Konzentration im Blut auf eine Erkrankung hinweisen. Nach Blutentnahme gemessene Serum-Konzentrationen sind außerdem in der Lage, eine Aussage über prognoserelevante Merkmale zu machen, bzgl. eines Karzinoms über die Tumorgroße, Multifokalität oder Lymphknotenmetastasen (199). Huang, Y., *et al.* untersuchten den Zusammenhang zwischen *BRAF* und miRNA-Expression beim PTC. Die miRNA miR-21 schien dabei eine besondere Rolle zu spielen, indem sie häufig gemeinsam mit *BRAF* in gesteigerter Menge vorlag und zudem mit vermehrten Lymphknotenmetastasen assoziiert war. Folglich könnten bestimmte miRNA als prognostische Marker oder Indikatoren für PTC in der Diagnostik dienen (200).

2.4.5.5 Molekularpathologische Analyse

Die Feinnadelaspiration nimmt eine wichtige Stellung in der Diagnostik suspekter Schilddrüsenknoten ein. Leider sind ca. 1,8-23,5 % des durch FNA gewonnenen Zellmaterials nicht für die Diagnostik geeignet (4). Ca. 15-25 % der FNA gehören zu den Kategorien III und IV, auch als *indeterminate cases* bezeichnet (84). Manche Autoren zählen auch die Kategorie V („suspekt für Malignität“) dazu (85), was den Anteil vergrößert. Ähnlich wie bei FNA der Kategorie „insuffizient“, ist vor allem bei den Kategorien III und IV keine eindeutige Diagnose in Richtung benigne oder maligne möglich. Es werden Malignitätswahrscheinlichkeiten von 5-10 % (Kategorie III) bzw. 20-30 % (Kategorie IV) angegeben. Kategorie V erreicht eine Malignitätswahrscheinlichkeit von 75 % (85). Die *American Thyroid Association* sieht für die Bethesda-Kategorie III und für nicht-diagnostische Proben eine Wiederholung der FNA vor (201).

In Bezug auf die Therapie ist nach dem *2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology* für die Kategorien IV und V bereits eine Lobektomie bzw. Thyreoidektomie vorgesehen, um eine histologische Abklärung zu erreichen (*Tabelle 4*). Bei den Kategorien III und IV wird außerdem eine molekulare Testung angeraten (28). Falls anschließend histologisch ein Malignom nach Lobektomie diagnostiziert wird, wird eine Folgeoperation durchgeführt, bei der die Rest-Schilddrüse und, im ungünstigen Fall von Metastasen, betroffene Lymphknoten entfernt werden (260).

Tabelle 4 Impliziertes Malignitätsrisiko und empfohlenes klinisches Management (*The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology*) (28)

<i>Diagnostic category</i>	<i>Risk of malignancy if NIFTP ≠ CA (%)</i>	<i>Risk of malignancy if NIFTP = CA (%)</i>	<i>Usual management^a</i>
Nondiagnostic or unsatisfactory	5–10	5–10	Repeat FNA with ultrasound guidance
Benign	0–3	0–3	Clinical and sonographic follow-up
Atypia of undetermined significance or follicular lesion of undetermined significance	6–18	~10–30	Repeat FNA, molecular testing, or lobectomy
Follicular neoplasm or suspicious for a follicular neoplasm	10–40	25–40	Molecular testing, lobectomy
Suspicious for malignancy	45–60	50–75	Near-total thyroidectomy or lobectomy ^{b,c}
Malignant	94–96	97–99	Near-total thyroidectomy or lobectomy ^c

Adapted with permission from Ali and Cibas (7).
^aActual management may depend on other factors (e.g., clinical, sonographic) besides the FNA interpretation.
^bSome studies have recommended molecular analysis to assess the type of surgical procedure (lobectomy vs. total thyroidectomy).
^cIn the case of “suspicious for metastatic tumor” or a “malignant” interpretation indicating metastatic tumor rather than a primary thyroid malignancy, surgery may not be indicated.
NIFTP, noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features; CA, carcinoma; FNA, fine-needle aspiration.

Mithilfe molekularpathologischer Tests lässt sich präoperativ feststellen, welche Art von Erkrankung vorliegt. Diese Tests werden je nach Zweck angewandt als *rule-in-* oder *rule-out-Tests*, bezogen auf die Vorhersagewahrscheinlichkeit eines malignen bzw. eines benignen Befundes. Abhängig ist dies vom positiven prädiktiven Wert (PPV, *Positive Predictive Value*) bzw. vom negativen prädiktiven Wert (NPV, *Negative Predictive Value*), welche jeweils wiederum zu einer hohen Testsensitivität bzw. -spezifität führen (202). Dabei ist der Effekt eines besonders hohen oder niedrigen PPV bzw. NPV abhängig von der jeweiligen Prävalenz des gesuchten benignen oder malignen Befundes. Ein hoher NPV eines Tests hat beispielsweise in einer Gruppe mit hoher Prävalenz einer malignen Erkrankung einen geringeren Erfolg beim Ausschluss der Malignität als bei einer niedrigen Prävalenz (203). Umgekehrt verhält es sich mit dem PPV. Diese Erkenntnis ist wichtig beim Vergleich des Nutzens von Mutationstests zwischen verschiedenen Bevölkerungsgruppen, die sich bezüglich der Prävalenzen bestimmter Erkrankungen unterscheiden (201).

Es stehen verschiedene Techniken zur genetischen Analyse zytologischer Proben zur Verfügung. Ein Beispiel sind PCR-basierte Methoden, wie die in dieser Studie verwendete MASA (*mutant allele specific PCR amplification*) (123). Weitere Möglichkeiten stellen die direkte Sanger-Sequenzierung, die Pyrosequenzierung, die Immunzyto- bzw. Immunhistochemie (ICC, IHC), *Next Generation Sequencing* (NGS, z.B. *Thyroseq*) sowie als *rule-out-Test* der *Gene Expression Classifier* (GEC) dar, auf die teilweise in der Diskussion zurückgegriffen wird (50, 139, 204-207).

Der BRAF-Mutationstest entspricht grundsätzlich einem *rule-in-Test*, da ein positives Testergebnis eindeutig für Malignität bzw. für das Vorliegen eines PTC steht (202, 208). Als *rule-out-Test* ist er wegen seiner geringen Sensitivität ungeeignet (202).

Materialgewinnung

Grundsätzlich wird der BRAF-Mutationstest im Anschluss an eine Feinnadelpunktion durchgeführt, da für die Analyse Zellmaterial benötigt wird. Entweder werden die für die Zytologie vorgesehenen oder bereits untersuchten FNA-Abstriche analysiert (209, 210), oder separat speziell für die molekulare Testung aufbewahrtes Material verwendet (211, 212). Separates Material können dabei Reste aus den verwendeten Punktionskanülen sein (119) oder durch zusätzliche Punktionen gewonnene Proben (213). Die Verwendung der FNA-Abstriche für die DNA-Analyse ist vorteilhaft, da der Pathologe das Zellmaterial bereits untersucht hat und so dieselben Zellen für die molekulargenetische Analyse verwendet werden, die bereits zytologisch beurteilt wurden. Die Möglichkeit einer späteren Revision des Abstrichs geht dadurch allerdings verloren. Dieses Problem kann durch die Verwendung überschüssigen Materials aus den Punktionskanülen umgangen werden (119).

Techniken

Die Testung auf *BRAF* kann entweder singulär (119) oder im Rahmen eines Panels mit anderen molekularen Markern erfolgen (214), z.B. durch das 7-Gene-Panel oder das *Next Generation Sequencing* (NGS) mit einer größeren Anzahl an Markern (203, 215). Im Rahmen des 7-Gene-Panels wird neben der BRAF-Mutation das Vorliegen von sechs weiteren Genveränderungen untersucht. Dazu zählen die drei häufigsten RAS-Mutationen (*HRAS*, *KRAS*, *NRAS*) sowie *RET/PTC1-* bzw. *RET/PTC3-* und *PAX8/PPAR γ -Rearrangements* (203). Das *Next Generation Sequencing* (NGS) ist eine neuartige Variante der Panel-Testung. Die Bezeichnung „*Next Generation*“ grenzt sie sozusagen von der ersten Generation, der Sanger-Sequenzierung, ab (216). Ein

Vorteil des NGS ist, dass es sowohl einen hohen NPV (>95 %) als auch einen hohen PPV erreichen kann. Demnach kann die NGS theoretisch gleichzeitig als *rule-in-* und *rule-out-Test* fungieren (217). Es ist nur wenig DNA-Material für eine Analyse erforderlich (206) und es kann auf eine Vielzahl von Genveränderungen gleichzeitig getestet werden (216). Ein weiterer Vorteil des NGS-Panels ist, dass zusätzlich die Expression bestimmter Gene analysiert werden kann, was mehr Informationen über die zelluläre Zusammensetzung des untersuchten Knotens liefert. Dadurch können z.B. Erkrankungen der Nebenschilddrüsen festgestellt werden (217).

Ein Vorteil einer kollektiven Testung besteht darin, dass mehrere Genalterationen unterschiedlicher und teilweise hoher Spezifitäten kombiniert werden, sodass Tendenzen zu verschiedene Diagnosen (bspw. FTC oder PTC) gleichzeitig ausgesprochen werden können (203, 215). Ein Nachteil liegt vor, wenn keine der beinhaltenden Genveränderungen einen NPV von > 95 % besitzt. Die Abwesenheit einer Mutation würde dann nicht zwangsläufig einen Ausschluss von Malignität bedeuten (75).

2.5 Operative Therapie

Bei unklarer klinischer und zytologischer Situation wird häufig eine diagnostische Lobektomie durchgeführt, die eine primäre histologische Beurteilung des Gewebes ermöglicht. Bei dann tendenziell oder eindeutig malignen Befunden ist meist eine Rest-Thyreoidektomie, ggf. mit zentraler Lymphadenektomie, indiziert, bei der das komplette Schilddrüsenorgan entfernt wird (4, 201, 220, 260). Zwar kann dadurch eine komplette Entfernung des Tumors ermöglicht und das Risiko eines Rezidivs verringert werden (218), die Operation geht aber auch mit Risiken einher, wie einem Hypoparathyreoidismus oder dem Verlust der Stimmbandfunktion durch Verletzung des N. laryngeus recurrens (219).

3 Material und Methoden

3.1 Patienten

Für diese Studie wurden retrospektiv die Therapieberichte von Patienten der Universitätsmedizin Mainz aus dem Zeitraum Januar 2013 bis Dezember 2015 analysiert, bei denen Feinnadelpunktionen der Schilddrüse durchgeführt wurden. Unter diesen Patientenfällen wurden gezielt diejenigen Fälle herausgefiltert, bei denen die zytologischen Proben präoperativ genetischen Analysen unterzogen wurden, dabei mindestens einer Testung auf eine Mutation des BRAF-Gens. Es handelte sich insgesamt um 1298 Fälle.

Um die diagnostische Relevanz des BRAF-Mutationstests feststellen zu können, wurden anschließend nur die Fälle zur Auswertung herangezogen, bei denen, basierend auf den zytologischen und molekulargenetischen Untersuchungsergebnissen, eine Operation der Schilddrüse stattgefunden hat und die Resektate histologisch beurteilt wurden. Insgesamt handelte es sich hierbei um 183 Fälle.

3.2 Feinnadelpunktion und zytologische Untersuchung

Indiziert war eine FNA bei Vorliegen eines suspekten Knotens. Der Verdacht konnte durch sonografische und/oder szintigrafische Auffälligkeiten begründet sein. Die Größe eines Knotens allein stellte keinen Grund für eine Punktion dar. Knoten mit einem Durchmesser von < 1 cm wurden nur in einzelnen Ausnahmefällen punktiert. Um Treffsicherheit zu gewährleisten, wurde jede Punktion durch Sonografie begleitet. Nach Aufbau eines Soges wurde die Kanüle wiederholt in mehreren Ausrichtungen vor- und zurückgeschoben, um eine ausreichende Menge an Zellmaterial zu gewinnen. Ein Teil des Aspirationsmaterials wurde anschließend für die zytopathologische Untersuchung sofort auf Glasplatten ausgestrichen. Für die molekulargenetische Testung war restliches Material in der für die FNA benutzten Kanüle (*washout*) vorgesehen. Es wurde also kein zusätzliches Mal punktiert, um Material für die Molekularpathologie zu gewinnen, und das Zellmaterial auf den Glasplatten blieb erhalten. Die benutzten Kanülen wurden sicher verschlossen, und sowohl Glasplatten als auch Kanülen wurden an das Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz übergeben. Dort wurden die Abstriche von verschiedenen Pathologen untersucht. Beim ersten Mikroskopieren war der Mutationsstatus den Pathologen in der Regel unbekannt.

An der Universitätsmedizin Mainz werden die zytologischen Befunde anders als beim international verbreiteten Bethesda-System in vier Kategorien eingeteilt: „insuffizient“, „benigne“, „suspekt“ und „maligne“. Zu der Kategorie „insuffizient“ wurden alle Fälle gezählt, bei denen die Aussagekraft des Präparates aufgrund von zellarmem oder durch Blut verunreinigtem Material eingeschränkt war. Als „benigne“ wurden u.a. die Diagnosen Struma, Adenome oder unauffällige Präparate ohne Anzeichen für Malignität eingestuft. Suspekte Befunde waren solche mit Verdacht auf eine follikuläre Neoplasie (z.B. aufgrund von onkozytären Zellproliferaten) und Fälle mit unsicherem Malignitätsausschluss. Auch *indeterminate nodules*, entsprechend den Bethesda-Kategorien III-IV, zählten in dieser Studie zur Kategorie „suspekt“. Zu den malignen Diagnosen zählten Fälle mit eindeutigem Malignitätsnachweis, wie PTC, FTC, MTC, PDTC, ATC und sonstige maligne Erkrankungen, wie Lymphome oder Metastasen aus anderen Körperregionen.

3.3 Molekularpathologische Untersuchung

Die molekularpathologische Untersuchung erfolgte in allen Feinnadelpunktaten unabhängig vom Ergebnis der Zytologie. Für die molekularpathologische Untersuchung wurden die aufbewahrten Kanülen der FNA mit 400 µl Lysepufferlösung gespült und resuspendiert. Der Lysepuffer enthielt 500 mM Tris und 1 % SDS. Anschließend wurden sie über Nacht dem Verdauungsenzym Proteinase K ausgesetzt und eine Nukleinsäure-Purifizierung durch Phenol- und Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die BRAF-Testung erfolgte durch zwei parallele Wildtyp (WT)-spezifische und Mutations (Mut)-spezifische Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) (123): *BRAF-forward-WT*, GTGATTTTGGTCT AGCTACAGT; *BRAF-forward-Mut*, GTGATTTTGGTC TAGCTACAGA; und *BRAF-Reverse*, GGCCAAAATT TAATCAGTGGA. Im Rahmen der ersten zehn Zyklen wurde ein modifiziertes PCR-Programm verwendet, um eine optimale Sensitivität und Spezifität zu gewährleisten (Erhöhung der Temperatur um 1 °C pro Zyklus): 95 °C für 30 s, 72 °C → 63 °C für 30 s und 72 °C für 45 s, gefolgt von 30 Zyklen mit 95 °C für 30 s, 60 °C für 30 s und 72 °C für 45 s. Als Matrix für eine einzelne PCR-Reaktion von 25 µg Gesamtvolumen wurde ein Maximum von 250 ng Nukleinsäuren in einem Volumen von 2,5 µg verwendet. Die Proben wurden mindestens zweimal getestet. In jedem Durchlauf diente eine Probe, die 2,5 ng der gesamten Nukleinsäurepräparation aus einem Präparat mit mutiertem BRAF V600E-Gen enthielt

und in 250 ng eines qualitativ hochwertigen Nukleinsäurepräparates aus einem Wildtyp-BRAF-Fall verdünnt war, als positive Kontrolle. Als negative Kontrolle wurden 250 ng eines qualitativ hochwertigen Nukleinsäurepräparates aus einem BRAF-Wildtyp-Fall verwendet, zusätzlich zu einer Kontrolle ohne DNA (nur Master-Mix). PCR-Primer und Platin-Taq-Polymerase wurden von *Invitrogen* (Karlsruhe, DE) bezogen. In positiven Fällen wurde ein zusätzliches 224-nt-Fragment von BRAF-Exon 15 amplifiziert, um die Identifikation einer V600E-Mutation durch direkte Sequenzierung unter Verwendung von *Beckman CEQ-8000* und Reagenzien zu bestätigen (Abb. 5) (119).

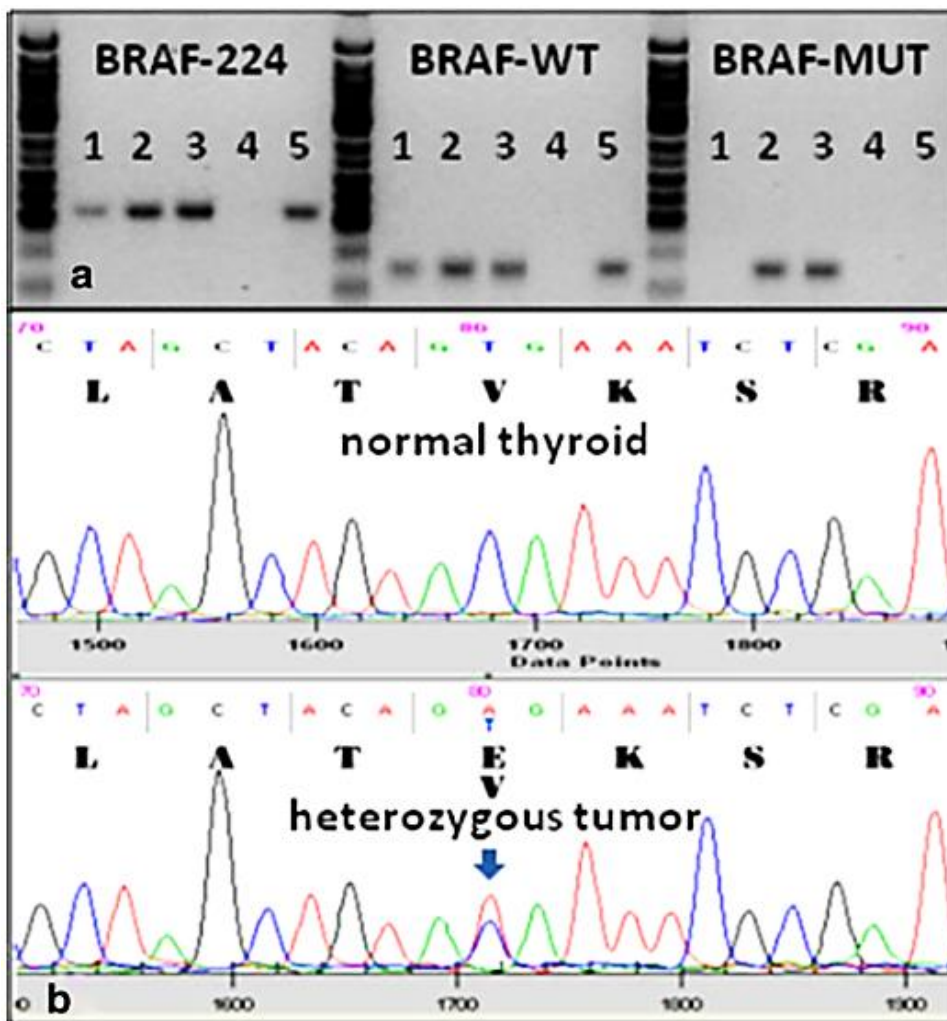


Abb. 5 BRAF-Mutationstest mittels MASA und direkter Sequenzierung (a: Agarose-Gel-Elektrophorese; b: Ergebnisse der direkten Sequenzierung nach PCR bei BRAF-positiven Tumoren: BRAF-Mutation (GTG -> GAG)) (119)

Die Proben wurden teilweise zusätzlich auf *PAX8/PPAR γ* - und *RET/PTC1-Rearrangements* getestet, allerdings nur, wenn *BRAF* negativ war. Dies hatte vor allem ökonomische Gründe. Die dafür nötige Analysetechnik wird hier nicht weiter beschrieben.

Die untersuchten Proben wurden entsprechend des Testergebnisses als BRAF+ (positiv) bzw. braf (negativ) gekennzeichnet. Die verschiedenen Varianten der BRAF-Mutation (z.B. *BRAF V600E*, *BRAF V600K*) wurden alle gleichwertig behandelt. Die Testergebnisse einer ggf. zusätzlichen Testung auf *RET/PTC-* oder *PAX8/PPAR γ -Rearrangements* wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

3.4 Operation

Die Indikation für eine Operation war abhängig von einem Zusammenspiel aus klinischen Befunden, sonografischem Erscheinungsbild, Zytologie und Patienteneinwilligung.

3.5 Statistische Analyse

Für die vorliegende Studie wurden in einer ersten Excel-Tabelle (hier nicht gezeigt) zunächst für jeden Patienten sowohl die Ergebnisse des BRAF-Mutationstests als auch der zytologischen Untersuchung dokumentiert - anhand der kritischen Wertung des untersuchenden Pathologen eingeteilt in die vier oben genannten Kategorien. Die Befunde der postoperativen, histologischen Untersuchung wurden ebenfalls dokumentiert - wortgetreu gemäß dem OP-Bericht.

In einer darauffolgenden Tabelle (*Tabelle 5*) erfolgte die Gegenüberstellung der Gesamtzahl von präoperativen und postoperativen Befunden. Sie zeigt in der obersten Zeile die vier Kategorien der zytologischen Befunde, jeweils mit einer Spalte für die Angabe der Anzahl positiver BRAF-Mutationstests. Dieser stehen in der linken Spalte die postoperativen histologischen Befunde gegenüber, jetzt eingeteilt in mehrere Kategorien: benigne, Adenom, PTC, FTC, MTC, ATC, PDTC, Metastase, sonstige Malignome. Benigne Befunde beinhalten dieselben Fälle wie bei der zytologischen Untersuchung, davon abgegrenzt sind die Adenome als separate Kategorie. Unter „Metastase“ sind Metastasen innerhalb der Schilddrüse zu verstehen, die von Karzinomen anderer Körperregionen stammen. Alle Befunde, die nicht in die genannten Kategorien eingeteilt werden konnten, wurden der Kategorie „Sonstige Malignome“ zugeordnet, da es sich ausschließlich um maligne Fälle handelte.

Die Ergebnisse von *Tabelle 5* wurden in einer weiteren Tabelle zusammengetragen (*Tabelle 6*). Ziel der nächsten Analyse war die Bestimmung von richtig positiven (TP, *true positive*), richtig negativen (TN, *true negative*), falsch positiven (FP, *false positive*)

und falsch negativen (FN, *false negative*) Testergebnisse in der zytologischen Untersuchung allein, in der molekulargenetischen Untersuchung allein und in der Kombination von zytologischer und molekulargenetischer Testung der Präparate.

In Bezug auf die zytologische Untersuchung lag ein richtig positives Ergebnis (TP) vor, wenn präoperativ ein suspekter oder maligner Befund vorlag und dieser sich postoperativ als maligne darstellte. Suspekte und maligne Befunde wurden beide als positiv gewertet, da beide in der Regel eine Operation indizieren. Ein richtig negatives Ergebnis entsprach einem sowohl prä- als auch postoperativ benignen Befund. Konnte im Rahmen der Molekularpathologie eine präoperativ festgestellte BRAF-Mutation einem PTC im Resektat zugeordnet werden, galt das BRAF-Testergebnis als richtig positiv. Im Falle eines negativen BRAF-Mutationstests bei postoperativ benignem Befund oder bei malignen Befunden außer PTC war das Ergebnis richtig negativ.

Unter den zytologischen Befunden wurde die Kategorie „insuffizient“ nicht in die Analyse miteinbezogen, da die zugehörigen FNA weder einem positiven noch einem negativen Befund zugeordnet werden konnten und somit kein Vergleich mit postoperativen histologischen Befunden möglich war. Die BRAF-Ergebnisse der insuffizienten FNA wurden jedoch in die Analyse aufgenommen, da der BRAF-Status hier unabhängig von der Qualität des zytologischen Abstrichs bestimmt werden konnte.

Im Rahmen der Molekularpathologie ist es wichtig, darauf zu achten, dass histologisch als PTC diagnostizierte Präparate nur zu ca. 45 % eine BRAF-Mutation aufweisen (18). Demnach ist es nicht ganz korrekt, den präoperativ negativen BRAF-Status eines histologisch nachgewiesenen PTC als falsch negativ zu bewerten. In der Diskussion wird näher auf dieses Problem eingegangen.

Anhand der gesammelten Zahlen für Zytologie allein, Molekularpathologie allein und deren Kombination wurden die Sensitivität, die Spezifität, der positive prädiktive Wert (PPV), der negative prädiktive Wert (NPV), die Genauigkeit (*accuracy*) sowie die Falsch-Positiv- und Falsch-Negativ-Rate (*Rate of FP/ Rate of FN*) ermittelt (*Tabelle 6*). Die Berechnung wurde folgendermaßen durchgeführt:

Sensitivität = $[TP/(TP+FN)]$, *Spezifität* = $[TN/(TN+FP)]$, *PPV* = $[TP/(TP+FP)]$, *NPV* = $[TN/(TN+FN)]$, *Accuracy* = $[(TN+TP)/(TN+TP+FN+FP)]$, *Rate of FN* = $[FN/(FN+TP)]$, *Rate of FP* = $[FP/(FP+TN)]$.

3.6 Histologische Untersuchung

Die histologische Beurteilung der Resektate erfolgte durch das Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz. Die entsprechenden Befunde wurden durch die Pathologen nicht wie in der Zytologie in Kategorien eingeteilt, stattdessen wurde die exakte Diagnose aus dem OP-Bericht genannt. Nahezu alle Resektate wurden erneut auf *BRAF* getestet.

4 Ergebnisse

4.1 Diagnosen

Von den 1298 Feinnadelpunktionen mit Molekularpathologie wurden insgesamt 183 Fälle der statistischen Analyse unterzogen, die sowohl zytologisch als auch histologisch untersucht worden waren (*Tabelle 5*).

Tabelle 5 Auswertung der Patientenfälle nach Zytologie, BRAF-Status und Histologie

Histologie		Zytologie							
Resultat	N	insuffizient	BRAF+	benigne	BRAF+	suspekt	BRAF+	maligne	BRAF+
benigne	80	14		58	1	8		0	
Adenom	20	10		6		4		0	
PTC	62	8*	6	5*	2	15	10	34	30
FTC	4	0		0		4		0	
MTC	3	1		2		0		0	
ATC	1	0		0		0		1	
PDTC	5	0		2		1		2	
Metastase	1	1		0		0		0	
Sonstige Malignome	7	1		4		0		2	
Summe	183	35		77		32		39	

* = jeweils ein Fall präoperativ BRAF-negativ und postoperativ BRAF-positiv

4.1.1 Zytologie

Zu den 183 zytologischen Diagnosen zählen 35 insuffiziente, 77 benigne, 32 suspekten und 39 maligne Fälle.

4.1.2 BRAF-Status und histologischer Befund

Unter den 35 zytologisch insuffizienten Fällen wurden histologisch 11 Strumaknoten, drei Fälle mit Hashimoto-Thyreoiditis, zehn Adenome, acht PTC (davon ein FVPTC und zwei PTC mit begleitender Hashimoto-Thyreoiditis), ein MTC, eine Metastase eines Adenokarzinoms und ein diffus-großzelliges B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom diagnostiziert. Ein positiver BRAF-Mutationstest lag bei sechs von acht PTC vor, darunter auch beide PTC mit begleitender Hashimoto-Thyreoiditis. Bei einem der zwei übrigen, BRAF-negativen PTC handelte es sich um ein FVPTC. Beim zweiten BRAF-negativen PTC wurde bei postoperativer Testung eine BRAF-Mutation festgestellt. Insgesamt wurden schließlich sechs der zytologisch nicht beurteilbaren Präparate positiv auf *BRAF* getestet und histologisch als PTC diagnostiziert. Bei einer der insuffizienten

Proben konnte der BRAF-Status aus unbekanntem Gründen nicht ermittelt werden. Sie wurde für die statistische Analyse als BRAF-negativ bewertet. Histologisch handelte es sich um einen Strumaknoten.

Unter den 77 zytologisch benignen Fällen waren histologisch 56 Strumaknoten, eine Thyreoiditis de Quervain sowie ein lediglich als „tumorfrei“ bewerteter Fall, sechs Adenome (darunter ein Hürthle-Zell-Tumor), zwei MTC, fünf PTC (davon ein FVPTC und ein PTC-Rezidiv), zwei B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome, ein gering differenziertes Sarkom, zwei PDTC und ein Angiosarkom. BRAF-positiv waren drei von 56 Fällen, davon ein Strumaknoten und zwei PTC (darunter das PTC-Rezidiv). Sowohl beim Strumaknoten als auch beim PTC-Rezidiv konnte der positive BRAF-Status postoperativ nicht bestätigt werden. Bei einem der übrigen 53 Fälle, die initial BRAF-negativ waren, wurde postoperativ eine BRAF-Mutation festgestellt. Er stellte sich histologisch als PTC dar.

Unter den 32 zytologisch als suspekt bewerteten Fällen fanden sich histologisch sechs Strumaknoten, eine Hashimoto-Thyreoiditis, ein ektopes Schilddrüsengewebe, vier Adenome (darunter ein Hürthle-Zell-Adenom), 15 PTC (davon zwei FVPTC, ein teilweise follikulär wachsendes PTC, drei Mikrokarzinome, insgesamt zwei multifokale und ein bilaterales PTC), vier FTC (davon ein FTC mit Übergang zum PDTC und ein onkozytär differenziertes FTC) sowie ein PDTC. Alle der insgesamt zehn positiven BRAF-Testungen waren PTC zuzuordnen (darunter zwei FVPTC, zwei papillären Mikrokarzinomen, einem multifokalen PTC und einem bilateralen PTC).

Es wurden 39 Fälle zytologisch als maligne eingestuft und auf BRAF getestet. Bei 34 von 39 Fällen handelte es sich histologisch um ein PTC, außerdem fanden sich ein ATC, zwei PDTC (davon war eines laut Befundbericht wahrscheinlich aus einem PTC entstanden), ein B-Zell-Lymphom sowie ein Adenokarzinom. BRAF-Mutationen wurden ausschließlich bei PTC identifiziert; 30 von 34 PTC waren BRAF-positiv.

Insgesamt hatten 49 der 183 Fälle einen positiven BRAF-Status (26,8%). Darunter befanden sich 48 PTC und ein Strumaknoten. Die Ergebnisse der Mutationsanalyse der FNA konnten beim Strumaknoten sowie bei einem der PTC (PTC-Rezidiv) im histologischen Präparat nicht bestätigt werden. Der Anteil der PTC unter allen präoperativ BRAF-positiven Befunden (einschließlich des Strumaknotens) beträgt 97,96%. Sechs der 35 zytologisch insuffizienten Proben waren BRAF-positiv und entsprachen alle

histologisch einem PTC. Das entspricht einem Anteil von 17,1 %. Unter den 77 zytologisch benignen Proben waren zwei BRAF-positiv, beide entsprachen histologisch einem PTC. Der Anteil beträgt hier 2,6 %.

Bei 83 der insgesamt 183 Fälle handelte es sich um maligne Erkrankungen, die Malignitätsrate unter den analysierten Schilddrüsenknoten entspricht demnach 45,4 %. 62 der 183 Fälle (33,9 %) bzw. 62 der 83 Malignome (74,7 %) bzw. 62 aller Schilddrüsenkarzinome (83,33 %) waren PTC. 48 von 62 PTC waren BRAF-positiv (77,4%).

4.2 Statistische Analyse

Tabelle 6 Ergebnisse der statistischen Analyse

	Zytologie	Molekularpathologie	Zytologie mit Molekularpathologie
TP	59	48	67
TN	64	91	63
FP	12	1	13
FN	13	14	11
Total	148*	154	154

* beinhaltet nicht die Fälle der Kategorie „insuffizient“

Sensitivität	0,819	0,774	0,859
Spezifität	0,842	0,989	0,829
PPV	0,831	0,980	0,838
NPV	0,831	0,867	0,851
Accuracy	0,831	0,903	0,844
Rate of FN	0,181	0,226	0,141
Rate of FP	0,158	0,012	0,171

Durch die Zytologie allein wurden 59 von insgesamt 83 Malignomen korrekt als solche erkannt. Weitere acht Malignome wurden durch die zusätzliche Anwendung des BRAF-Mutationstests identifiziert, was kombiniert einer Anzahl von 67 Malignomen entspricht (TP). 64 Befunde wurden durch die Zytologie korrekt als benigne eingestuft, durch die Kombination mit der Molekularpathologie verringerte sich die Anzahl wegen eines falsch positiven Falls in der BRAF-Analyse auf 63 (TN). 12 Fälle wurden durch die Zytologie als suspekt beurteilt, entsprachen aber histologisch gutartigen Erkrankungen. Durch einen falsch positiven Fall in der BRAF-Analyse erhöhte sich die Anzahl auf 13 Fälle bei Kombination beider Methoden (FP). 13 zytologisch als benigne eingestufte Fälle erwiesen sich als maligne Befunde, durch die Kombination mit der BRAF-

Analyse und zwei positive BRAF-Ergebnisse verringerte sich die Anzahl auf 11 Fälle (FN).

Die Auswertung zeigt, dass die zusätzliche Anwendung des BRAF-Mutationstests die Sensitivität der zytologischen Untersuchung erhöht. Die Sensitivität der zytologischen Untersuchung (81,9 %) ist durch den zusätzlichen BRAF-Mutationstest um vier Prozentpunkte auf 85,9 % gestiegen. Die Spezifität der zytologischen Untersuchung ist wiederum durch den zusätzlichen BRAF-Test von 84,2 % auf 82,9 % gesunken. Der PPV blieb nahezu konstant (83,1 % bzw. 83,8 %), der NPV stieg von 83,1 % auf 85,1 %. Der PPV des BRAF-Mutationstests selbst beträgt 98,0 %, der NPV 86,7 %. Die Genauigkeit (*accuracy*) ist von 82,4 % auf 84,4 % gestiegen. Die Falsch-Negativ-Rate verringerte sich von 18,1 % auf 14,1 %, die Falsch-Positiv-Rate stieg von 15,8 % auf 17,1 %.

5 Diskussion

Schilddrüsenknoten sind häufige Veränderungen der Schilddrüse (221, 222). Auch wenn die meisten von ihnen benigne Erkrankungen darstellen (221, 222), sind im Falle eines Verdachts auf Malignität höchste Ansprüche an die Diagnostik gestellt. Dabei geht es in erster Linie darum, maligne Befunde schnell als solche zu erkennen und eine gezielte Therapie einzuleiten. Feinnadelpunktionen gelten schon lange als Methode der Wahl, wenn Palpation, Ultraschall und ggf. Szintigrafie den Verdacht einer Malignität nicht eindeutig ausschließen können (119, 201). Als minimalinvasiver, kostengünstiger, kurzer und einfacher Eingriff hat sich die Technik weltweit sehr gut etabliert. Die gemessenen Werte der vorliegenden Studie für Sensitivität und Spezifität der FNA betragen 82 bzw. 84 %, welche im Bereich von Ergebnissen der Literatur liegen (65-97 % für die Sensitivität bzw. 50-100 % für die Spezifität) (4-8). Bedauerlicherweise gelten 1,8-23,5 % aller FNA als zytologisch insuffizient (4), weil sie beispielsweise zu wenige Zellen enthalten oder durch Blut oder andere Bestandteile verunreinigt wurden (79). Etwa 3-10,6 % der FNA führen zudem zu falsch negativen Ergebnissen (7, 223, 224).

Die Fehlerquellen sind vielfältig. Die Qualität der zytologischen Abstriche ist von den Untersuchungsbedingungen und der Technik der FNA abhängig (74, 78). Die Erfahrung des Behandlers ist dabei relevant (81, 85). Außerdem spielt die Art und Weise der Beurteilung durch den Pathologen eine Rolle, beispielsweise wenn dieser insuffiziente oder nicht eindeutig beurteilbare Proben als nicht-neoplastisch bewertet oder wenn die Befunde in Kategorien eingeteilt werden, die nicht differenziert genug sind (82). Manche Erkrankungen sind auch allgemein schwierig zytologisch zu diagnostizieren. Im Falle des PTC ist die Spezifität der FNAB beispielsweise nicht ausreichend, um die folliculäre Variante des PTC (FVPTC) zu erkennen, unabhängig vom histologischen Subtyp (bekapselt bzw. infiltrativ) (225). Falls bei unklarer Diagnose auch eine wiederholte FNA kein eindeutiges Ergebnis erzielt, bleibt neben einer strengen Überwachung manchmal nur eine Operation als nächste Maßnahme, um diagnostische Sicherheit zu erreichen (201). Ein zweizeitiges Vorgehen ist hier nicht selten, indem zunächst eine Lobektomie durchgeführt wird, auf die bei maligner Diagnose eine Rest-Thyreoidektomie folgt (4, 201, 220, 260). Dieses Vorgehen resultiert in einer zeitlichen Verzögerung der erforderlichen Therapie, und der Patient wird aufgrund der multiplen Eingriffe physisch und psychisch stark belastet (226). Zudem erhöhen sich die Kosten

für die Behandlung (227, 228). Molekularpathologische Testungen, wie auf *BRAF*, sollen die diagnostischen Fehler der FNA ausgleichen, indem sie Mutationen und andere Genveränderungen erkennen, die als spezifisch für bestimmte Malignome gelten. Im Folgenden werden Vor- und Nachteile des *BRAF*-Mutationstests zur Identifikation des PTC aus verschiedenen Blickwinkeln diskutiert.

5.1 Einfluss des *BRAF*-Mutationstests auf Sensitivität und Spezifität

In der vorliegenden Studie wurde durch die Anwendung des *BRAF*-Mutationstests im Rahmen der präoperativen Diagnostik eine deutliche Steigerung der Sensitivität von 81,9 auf 85,9 % erreicht. Die Spezifität ist dabei von 84,2 auf 82,9 % gesunken, wurde also kaum beeinträchtigt. Musholt, T. J., *et al.* erzielten ebenfalls eine Steigerung der Sensitivität bei Anwendung der gleichen Analysetechnik (von 70,4 auf 85,7 %), allerdings mit Einbeziehung der Testung auf *RET/PTC-Rearrangements*. Die Spezifität blieb konstant bei 76,4 % (119). Kim, S. K., *et al.* berichten von einer starken Zunahme der Spezifität durch Kombination der FNA mit einer *BRAF*-Testung (von 36,4 auf 95,5 %). Die Sensitivität dagegen ist durch die Kombination um etwas mehr als zehn Prozentpunkte (von 100 auf 89,6 %) gesunken (229).

Jinijh *et al.* und Fnais, N., *et al.* fassten in zwei Metaanalysen jeweils einige internationale Studien zusammen und sind der Meinung, dass ein *BRAF*-Mutationstest aufgrund seiner hohen Spezifität zwar in der Lage sei, die Diagnostik zu verbessern, als singulärer Test wegen seiner geringen Sensitivität aber nicht ausreiche (230, 231). Gerade bei *indeterminate nodules* ist die geringe Sensitivität von Bedeutung, da sie auch bei negativem *BRAF*-Status weiterhin maligne sein können. Folglich scheint der *BRAF*-Test nur dann einen Mehrwert zu haben, wenn er positiv ausfällt. Natürlich können die Standpunkte der genannten Metaanalysen nicht exakt auf die Praxis der Universitätsmedizin Mainz bezogen werden. Die Analysemethoden der verglichenen Studien unterscheiden sich, außerdem sind diese unterschiedlicher Herkunft (mehr als 50 % der Studien in der Metaanalyse von Fnais, Soobiah *et al.* stammen aus Südkorea oder den USA (231)), sodass die durchschnittlichen Ergebnisse auch hauptsächlich die Bevölkerung dieser Staaten repräsentieren und keine eindeutige Empfehlung für europäische Länder wie Deutschland darstellen können. Begründet wird dies durch die weltweit unterschiedlichen Prävalenzen des PTC unter den Schilddrüsenkarzinomen sowie der *BRAF*-Mutation unter den PTC (18, 19). Der Erfolg der jeweiligen Technik zur Identifikation einer *BRAF*-Mutation wird insofern beeinflusst, als dass ihre Sensitivität

und Spezifität von den Prävalenzen innerhalb der untersuchten Population abhängen. Eine Vergleichbarkeit von Studien wird damit erschwert, wenn diese unterschiedlichen geografischen Ursprungs sind, auch wenn die Studien vergleichbare Analysetechniken verwendet haben, wie in der Metaanalyse von Fnais, Soobiah *et al.* (231). Im folgenden Abschnitt wird näher auf dieses Problem eingegangen.

5.2 Zusammenhang zwischen Testperformance und geografischen Unterschieden

Die BRAF-Mutation kommt im Rahmen der Schilddrüsenerkrankungen nahezu ausschließlich beim PTC vor (16). Testungen auf *BRAF* eignen sich daher gut, um PTC zu identifizieren (119, 155). Die Prävalenz der Mutation unter den PTC entspricht einem Wert von ungefähr 45 % in europäischen Staaten bis über 80 % in asiatischen Staaten wie Südkorea (18, 19). Das muss beachtet werden, wenn man den Nutzen verschiedener BRAF-Tests international vergleicht. Als *rule-in-Test* ist der Erfolg des BRAF-Mutationstests stark von der Sensitivität der jeweiligen Methode abhängig (202, 208, 232). Die Methode sollte daher an die Prävalenz des PTC bzw. der BRAF-Mutation unter den PTC innerhalb der untersuchten Bevölkerungsgruppe angepasst werden. Ein *rule-in-Test* mit nur mittelmäßiger Spezifität bzw. mittelmäßigen PPV zur Identifikation eines PTC ist in einem Land wie Südkorea (hohe Prävalenz von PTC, hohe Frequenz von BRAF unter den PTC (19, 38)) besser geeignet als in einem Land wie Deutschland. Dort, wo die Prävalenz des PTC geringer ist, sind folglich *rule-in-Tests* mit besonders hoher Spezifität gefragt. Ähnlich verhält es sich mit einem *rule-out-Test*, wie z.B. dem *Afirma Gene Expression Classifier* (GEC), der durch seine hohe Sensitivität benigne Läsionen identifizieren soll (233). Bei einer Malignitätswahrscheinlichkeit bzw. Prävalenz des PTC von 15-30 % kann die Sensitivität bzw. der NPV des Tests noch hoch genug sein, um eine Malignität auszuschließen. Bei höherer Malignitätswahrscheinlichkeit bzw. Prävalenz und demnach weniger benignen Fällen könnte der NPV allerdings schon nicht mehr dafür ausreichen (203).

In der vorliegenden Studie liegt eine Malignitätsrate unter den in die Studie eingeschlossenen Schilddrüsenknoten von 45,4 % vor. Dabei ist natürlich zu beachten, dass diese Knoten bereits aus einer größeren Gruppe stammen, die durch primärdiagnostische Maßnahmen anhand (suspekter) Befunde vorselektiert wurde. Die Prävalenz der BRAF-Mutation unter den PTC ist verhältnismäßig hoch (77,4 %) und übersteigt deutlich den Durchschnitt für europäische Länder (45 %) (18). Der BRAF-Mutationstest

allein erzielte sowohl einen hohen PPV (98 %) als auch einen hohen NPV (86,7 %). Gemäß den *European Thyroid Association Guidelines* (75) ist der angewandte BRAF-Mutationstest aufgrund seines hohen PPV von über 95 % als *rule-in-Test* in der Schilddrüsendiagnostik geeignet. In der Kombination mit der zytologischen Untersuchung wird zwar kein PPV von > 95 % erreicht, dafür sind die Werte von sowohl Sensitivität als auch NPV gestiegen. Demnach ist eindeutig, dass die Anwendung des BRAF-Mutationstests zur Steigerung der Sensitivität in der Diagnostik beiträgt.

5.3 Auswahl der Analysetechnik

Zur DNA-Analyse stehen diverse Methoden zur Verfügung, die sich in ihrer Sensitivität und Spezifität hinsichtlich der Identifikation einer BRAF-Mutation unterscheiden. In der vorliegenden Studie wurde zur singulären BRAF-Testung die Methode der PCR mit anschließender direkter Sequenzierung zur Bestätigung eines positiven Befundes angewandt, entsprechend einer Studie von Musholt *et al.* (119). Bei der PCR handelte es sich um die *mutant allele-specific PCR amplification* (MASA), bei der sowohl für Wildtyp- als auch mutierte Allele ein *forward primer* eingesetzt wird, der nur eine Basensubstitution (T/A) am 3'-Ende durchführt. Mutierte und nicht-mutierte Allele werden unterschieden und beide auf gleiche Weise und parallel amplifiziert (123). Dieses Prinzip ist aufgrund der Häufigkeit genetisch inhomogener Tumoren von Vorteil (119). Sapio *et al.* verglichen MASA mit der DNA-Sequenzierung und dem SSCP (*single strand conformation polymorphism*). Die höchste Sensitivität wurde durch die Anwendung von MASA erreicht (123). Jin *et al.* verglichen verschiedene Analysetechniken: die direkte Sequenzierung, einen kolorimetrischen Test, eine Echtzeit-PCR mit Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer und eine Allel-spezifische Echtzeit-PCR (MASA). Sie befürworten die Anwendung von MASA wegen deutlicher Zeitersparnis und geringeren Kosten im Vergleich zu Tests, die spezifische fluoreszierende Proben erfordern. Die Sensitivität zur Identifizierung mutierter Zellen sei zudem höher als die der direkten Sequenzierung (234). Aufgrund der genannten Vorteile kam für diese Studie die MASA-Technik zur Anwendung.

Panel-Testungen sind der singulären Testung auf *BRAF* in einigen Punkten überlegen. Aufgrund der Ausstattung ist in der Universitätsmedizin Mainz jedoch nur eine singuläre Testung möglich, teilweise mit zusätzlicher Testung auf *RET/PTC*- bzw. *PAX8/PPAR γ -Rearrangements* oder RAS-Mutationen.

5.4 Limitationen des BRAF-Mutationstests

Der Erfolg des BRAF-Mutationstests wird beeinflusst durch verschiedene Faktoren. Trotz sehr hoher Spezifität und nachweislich positivem Einfluss auf die Sensitivität von Feinnadelpunktionen kann es zu Situationen kommen, in denen der BRAF-Status nicht ermittelt werden kann, er falsch positiv oder falsch negativ ist. Die Fehlerquote im Rahmen der molekularpathologischen Analyse liegt bei 0,33 %. Davon sind 60 % auf die präanalytische Phase zurückzuführen (235), wozu allgemein die Feinnadelpunktion zählt. In den folgenden Abschnitten wird auf kritische Situationen im Rahmen der BRAF-Testung eingegangen und es werden mögliche Lösungen diskutiert.

5.4.1 Nicht ermittelbarer BRAF-Status

In der vorliegenden Studie ereignete sich ein Fall, bei dem der BRAF-Status nicht ermittelt werden konnte. Zwar ist die genaue Ursache unbekannt, allgemein kann so ein Ereignis aber auf eine mangelhafte Qualität der zytologischen Probe zurückgeführt werden. Auch die Menge mutierter Zellen in der Aspirationsprobe spielt eine Rolle. Rowe, L. R., *et al.* geben als kritische Grenze, ab der eine FNA-Probe für den BRAF-Mutationstest geeignet ist, einen Anteil mutierter Zellen von mindestens 50 % an. Ist der Anteil geringer, liege das an einer größeren Durchmischung der mutierten Zellen mit Wildtyp-Zellen und/oder anderen Zellen (236). Die korrekte Lokalisation der Punktionskanüle im suspekten Bereich ist also ebenso wichtig wie eine adäquate Aspirationsstechnik, um möglichst viele Zellen zu gewinnen. Beim Herausziehen der Kanüle werden zudem Zellen abgestreift, bei denen es sich eventuell um diagnostisch entscheidende Zellen handelt. Lee, K. H., *et al.* nennen eine geringe Erfahrung des Behandlers und insuffiziente zytologische Proben als Risikofaktoren für ein unklares bzw. möglicherweise falsch negatives BRAF-Testergebnis (237). Als Konsequenz lässt sich für die Praxis ableiten, dass die Qualität der zytologischen Probe, basierend auf einer adäquaten Technik der Feinnadelpunktion und des Abstrichs, stark über ein korrektes Ergebnis des BRAF-Mutationstests mitentscheidet. Zudem haben Sensitivität und Spezifität der molekularpathologischen Analysetechnik entscheidenden Einfluss auf die Genauigkeit des Tests und die Aussagekraft des BRAF-Status. Zwar gibt es inzwischen hochsensitive Methoden, um mutierte Gene auch bei starkem Mangel an Tumorzellen zu identifizieren, diese gehen jedoch mit einem höheren Risiko für falsch positive Ergebnisse einher (238). Rossi *et al.* schlagen für Fälle mit nicht ausreichendem oder für die molekulare Analyse unbrauchbarem Zellmaterial eine Testung mittels

Immunzytochemie vor (239). Um das Zellangebot der zytologisch und molekularpathologisch zu untersuchenden Proben zu optimieren, z.B. indem besonders bei unklaren FNA ausschließlich abnormale Zellen herausgefiltert werden, kann außerdem die Methode der *Laser capture microdissection* angewandt werden. Ein Nachteil sind dabei allerdings die hohen Anschaffungskosten des Lasers (240).

5.4.2 Falsch positive BRAF-Ergebnisse

Falsch positive BRAF-Ergebnisse erhöhen zwar die Vorsicht beim Umgang mit den entsprechenden Befunden, sie können aber zu unnötigen Therapien führen und die Mortalität sowie die Kosten für die Behandlung erhöhen. Zudem werden Patienten unnötig psychisch belastet, weil ein positiver BRAF-Status in der Regel mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht wird (19, 175-178, 193, 241-243). Da man davon ausgeht, dass *BRAF* im Falle der Schilddrüse nur beim PTC (seltener auch beim ATC und PDTC) vorkommt (16, 17), gelten all die Fälle als falsch positiv, bei denen kein PTC, aber trotzdem eine BRAF-Mutation vorliegt. Über ein Auftreten von BRAF-mutierten Allelen bei gutartigen Befunden in der Schilddrüse wurde bisher nur in zwei Publikationen berichtet. Bei beiden handelte es sich jedoch aus Sicht der Autoren vermutlich um benigne Vorstadien eines PTC, die die BRAF-Mutation bereits enthielten (125, 126).

In der vorliegenden Studie wird ein BRAF-positiver Befund dokumentiert, dessen zytologische Diagnose gutartig ausfiel und der histologisch einem Strumaknoten entsprach. Interessanterweise konnte der anfangs positive BRAF-Status postoperativ nicht mehr bestätigt werden. Aufgrund der gutartigen Diagnose kann man also präoperativ von einem falsch positiven BRAF-Ergebnis sprechen. Dieses führte zu einer Reduktion der Spezifität durch Kombination der FNA mit der BRAF-Testung (von 84,2 auf 82,9 %). Es kommen verschiedene Erklärungen für solch ein Ereignis in Frage.

Wenn auch nicht in diesem Fall zutreffend, können bei unklarer, ggf. unauffälliger Zytologie ohne eindeutigen Hinweis auf Malignität BRAF-mutierte Zellen vorliegen, wenn es sich z.B. um die Manifestation einer Erkrankung fremden Ursprungs in der Schilddrüse handelt. Die Zellen des Präparates müssen in dem Fall nicht eindeutig darauf hinweisen. Erkrankungen, die mit einer BRAF-Mutation einhergehen können und sich in seltenen Fällen in der Schilddrüse manifestieren, sind Melanome, kolorektale Karzinome, Sarkome, Ovarialkarzinome, Mammakarzinome, Leberkarzinome, Gliome, Lun-

genkarzinome, das multiple Myelom, die Langerhans-Zell-Histiozytose sowie die Haarzell-Leukämie (15, 114, 117, 118, 120, 121). Auch andere Schilddrüsenerkrankungen neben dem PTC, z.B. ATC und PDTC, sollten in Erwägung gezogen werden, falls keine eindeutigen klinischen oder zytologischen Merkmale für ein PTC gegeben sind (17). Bei unklarem Befund, aber positiven BRAF-Status sollte folglich auf jeden Fall so lange nach einer malignen Erkrankung im ganzen Körper gesucht werden, bis diese mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden kann. Allgemeinbefunde und anamnestische Hintergründe sind dabei von hoher Bedeutung.

Naevi, im Volksmund Muttermale, sind gutartige pigmentierte Flecken der Haut, die generell als gutartig gelten. Unter bestimmten Bedingungen können sie sich aber zu einem Melanom entwickeln oder bei erhöhter Anzahl die Entstehung eines Melanoms begünstigen. Bis zu 82 % der Naevi der Haut sind Träger einer BRAF-Mutation (115, 116). Die BRAF-Mutation stellt hier einen Risikofaktor für die Entstehung eines Melanoms dar (110). Da bei einer Schilddrüsenpunktion durch die Haut gestochen wird, ist es wichtig, dabei auf Naevi zu achten, um diese nicht zu perforieren. Mögliche BRAF-mutierte Zellen eines Naevus könnten sonst in das Zellpräparat gelangen und beim zu untersuchenden Schilddrüsenknoten fälschlicherweise zu einem positiven BRAF-Testergebnis führen. Das falsch positive BRAF-Ergebnis des Strumaknotens dieser Studie könnte durch so ein Ereignis zustande gekommen sein. Um solche Fehler zu vermeiden, könnte für die Punktion ein Mandrin verwendet werden, welcher sich innerhalb der Kanüle befindet und erst beim Erreichen des Knotens entfernt wird. Eine Aufnahme von Zellen erfolgt dadurch erst, wenn die Kanülenöffnung den zu untersuchenden Knoten erreicht hat. So werden eine Mitnahme von Zellen aus der Hautschicht und eine mögliche Kontamination, u.a. mit Naevus-Zellen, vermieden (77).

Eine weitere mögliche Fehlerursache, die ebenfalls mit der Feinnadelpunktion in Verbindung steht, stellen *Vanishing Tumors* dar (Abb. 6). Dabei liegt, im Gegensatz zum zuvor beschriebenen Fall, tatsächlich ein Tumor vor. Durch die Punktion des Knotens wird eine Gewebereaktion ausgelöst, die innerhalb von 20-40 Tagen zu ausgeprägten Zell- und Gewebeveränderungen (zystische Degeneration, Fibrosklerose, Blutungen, granulierende Entzündungen, Nekrosen etc.) führen kann, sodass der möglicherweise bösartige Tumor histologisch nicht mehr als solcher zu identifizieren ist. Alternativ kann auch ein ganzes, nur wenige Millimeter großes Karzinom zufällig getroffen und komplett durch die Punktion entfernt werden. In der Folge sind Zytologie zwar suspekt

und präoperativer BRAF-Test positiv, die Histologie gibt aber keinen Anhalt für Malignität.

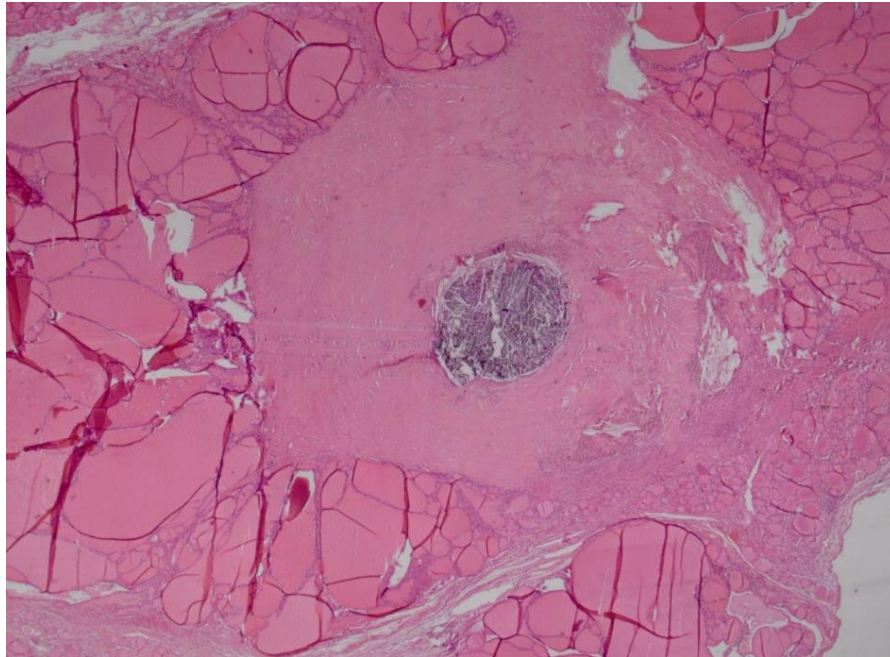


Abb. 6 *Vanishing Tumor* eines PTMC nach FNA
Quelle: Dr. A. Schad, Institut für Pathologie, Universitätsmedizin Mainz

Das Ereignis eines *Vanishing Tumors* stellt ein großes Problem dar, da es die finale Diagnose verändert und den weiteren Verlauf beeinflusst, indem kein klarer Therapieplan erstellt werden kann. Von Seiten der Behandler bzw. Chirurgen sollte dafür eine zweite Meinung hinzugezogen werden (272). Zur Ursachenbeseitigung schlagen verschiedene Autoren eine Probengewinnung durch Feinnadeln ohne Erzeugung eines Unterdrucks vor. Dabei wird lediglich die Kanüle in das Gewebe hinein- und hinausgeschoben. Durch Verzicht auf eine Spritze, mit der normalerweise die Aspiration erzeugt wird, werden deutlich weniger Flüssigkeiten wie Blut aufgenommen, die die zytologische Beurteilung qualitativ beeinträchtigen. Auch kommt es zu einer geringeren Traumatisierung des Gewebes und zu weniger Schmerzen für den Patienten (273, 274, 275).

Eine weitere mögliche Ursache für einen falsch positiven BRAF-Status kann eine nicht optimal angepasste Sensitivität des BRAF-Testverfahrens sein. Es werden für die BRAF-Testung Falsch-Positiv-Raten von 0,08 bis 5,4 % angegeben (126, 244). Dabei ist die Falsch-Positiv-Rate abhängig von der verwendeten Analyseverfahren. Hochsensible Methoden wie die *DPO-based multiplex PCR* oder die MEMO-Sequenzierung sind dazu in der Lage, eine BRAF-Mutation zu identifizieren, wenn der Anteil mutierter Zellen unter sonstigen Wildtyp-Zellen 2 % bzw. sogar nur 0,1 % ausmacht (244). Die

Toleranzgrenzen dieser Techniken sind folglich sehr niedrig. Kim, S. W., *et al.* dokumentieren fünf Fälle, bei denen präoperativ ein positiver BRAF-Status durch *DPO-based multiplex PCR* registriert wurde, obwohl zytologisch und histologisch ein benigner Befund vorlag. Die Autoren nennen als Ursache für dieses Ereignis die sehr niedrige Toleranzgrenze des Tests (245). Dadurch wurden möglicherweise BRAF-Wildtyp-Allele als mutierte Allele erkannt. Die für die vorliegende Studie angewandte Methode (PCR (MASA) und direkte Sequenzierung) ist weniger sensitiv als die *DPO-based multiplex PCR* und Fälle wie in der Studie von Kim, S. W., *et al.* stellen eine Ausnahme dar. Deshalb ist der falsch positive Fall sehr wahrscheinlich nicht auf eine mögliche Schwäche der BRAF-Analyse zurückzuführen.

Auch eine Vorläuferläsion eines PTC ist als Erklärung für das falsch positive BRAF-Ergebnis denkbar, wie Cameselle-Teijeiro, J., *et al.* in einer Studie erklären. Die Autoren vermuten eine histogenetische Verbindung zwischen einer *solid cell nest hyperplasia* (SCN) und einem PTC. Die SCN könnte aus Sicht der Autoren eine Vorläuferläsion eines PTC darstellen (125). Da in der Studie von Cameselle-Teijeiro, J., *et al.* jedoch eine Kontamination der Proben während der Analyse nicht zu 100 % ausgeschlossen ist, ist diese Vermutung mit Vorsicht zu interpretieren, zumal der allgemeine Konsens lautet, dass das PTC keine präkanzerösen Vorstadien besitzt. Der molekularpathologisch falsch positive Fall der vorliegenden Studie war zytologisch eindeutig als benigne klassifiziert und zeigte keine zytologischen Auffälligkeiten (z.B. papilläre Strukturen), zudem wurde auch postoperativ kein PTC diagnostiziert. Deshalb ist das Vorliegen einer Vorläuferläsion hier sehr unwahrscheinlich.

Ferner besteht die Möglichkeit, dass tatsächlich alle mutierten Zellen des Tumors der molekularpathologischen Analyse zugeführt wurden, und somit weder in der Zytologie noch in der Histologie Auffälligkeiten im Sinne von Tumorzellen sichtbar waren. Besonders im Fall von Mikrokarzinomen könnte ein Erkennen eines PTC dann erschwert sein. Dass die Präparate aber nicht zumindest histologisch suspekt erscheinen, ist bei positivem BRAF-Status unwahrscheinlich.

Fazit: Die Ursache für den falsch positiven BRAF-Status des einen Strumaknotens bleibt unklar. In derartigen Fällen (mit benigner Zytologie und positivem BRAF-Status) sollte eine besteht aus einer wiederholten Sonografie bzw. einer erneuten Feinnadelpunktion mit Sonografie, mit oder ohne erneute BRAF-Testung des initialen und des zweiten Präparats. In einer Studie von Kim, S. Y., *et al.* mit dem Titel „*What to do with thyroid nodules showing benign cytology and BRAF(V600E) mutation?*“ sprechen sich

die Autoren dafür aus, dass bei BRAF-positiven Knoten mit mindestens zwei suspekten Merkmalen in der Sonografie sowie bei inkongruenten Erscheinungsbildern zwischen Sonografie und Zytologie eine Thyreoidektomie durchgeführt werden sollte, auch wenn der zytologische Befund gutartig ausfällt (246).

5.4.3 Falsch negative BRAF-Ergebnisse

BRAF-negative PTC

Während ein positiver BRAF-Test z.B. bei einem eindeutig benignen Befund für ein falsch positives Ergebnis spricht (gesetzt den üblichen Konsens, dass *BRAF* bei keinen benignen Schilddrüsenerkrankungen auftritt), fällt die Entscheidung, einen Fall bezogen auf seinen BRAF-Status als falsch negativ zu bezeichnen, deutlich schwerer. In Südkorea liegt die Prävalenz der BRAF-Mutation unter den PTC zwar bei über 80 % (19), in westlichen Ländern wie Deutschland beträgt bei einem Fehlen der Mutation die Malignitätswahrscheinlichkeit jedoch weiterhin ca. 45 % (18). Schließlich kann es sich auch bei einem BRAF-negativen Befund um ein PTC handeln. Umso wichtiger ist es für den Behandler, auch bei einem negativen Mutationstest so lange Verdacht zu schöpfen, bis eine maligne Erkrankung ausgeschlossen werden kann.

In erste Linie muss die Lücke, die durch den BRAF-Mutationstest nicht erfasst wird, geschlossen werden. Denkbar sind dafür Tests mit Markern, die die Proben auf weitere mit PTC assoziierte Genveränderungen oder Expressionsraten analysieren. Zusätzlich kommen auch Tests infrage, die mit benignen Erkrankungen assoziierte Marker verwenden, um die relativ geringe Sensitivität des BRAF-Tests zu kompensieren. In Bezug auf die BRAF-Mutation allein sollte darauf geachtet werden, dass der verwendete BRAF-Mutationstest verschiedene Varianten der Mutation erkennt, z.B. auch die seltene BRAF K601E-Mutation (244). Die follikuläre Variante des PTC, welche nicht selten von der BRAF-Mutation verschont bleibt (113), könnte z.B. dadurch entdeckt werden. Weitere, bei Abwesenheit von BRAF relevante Mutationen sind RAS-Mutationen. Neben benignen Erkrankungen wie dem follikulären Adenom (88-90), können sie auch bei Schilddrüsenkarzinomen vorkommen, vorzugsweise bei solchen mit follikulärem Muster (10). Dabei kann es sich um ein FTC, ein FVPTC oder ein NIFTP handeln (91, 225). Zudem sind BRAF- und RAS-Mutationen in der Regel nicht gleichzeitig anzutreffen (124). Bei einem positiven RAS-Status und negativem BRAF-Status besteht folglich weiterhin Verdacht auf Malignität. Gilt ein Knoten als suspekt, der

BRAF-Status ist aber negativ, empfehlen einige Autoren daher eine anschließende Testung auf RAS-Mutationen (247, 248).

Großflächiger angewandt eignet sich eine Panel-Testung wie das *Next Generation Sequencing*, das viele weitere Marker enthält und durch sowohl hohen NPV als auch hohen PPV gleichzeitig als *rule-in-* und *rule-out-Test* fungieren kann. Neben Genveränderungen können auch veränderte Expressionsraten bestimmter Proteine analysiert werden (217). Nikiforov, Y. E., *et al.* verwendeten das System *ThyroSeq*, ein NGS-Panel mit insgesamt 56 Markern für Punktmutationen und Genfusionen, und empfehlen es speziell für *indeterminate nodules* der Bethesda-Kategorie III (AUS/ FLUS). Unter diesen können auch PTC sein, die sich zytologisch nicht eindeutig darstellen und keine BRAF-Mutation tragen. Die Spezifität verringerte sich zwar im Vergleich zu kleineren 7-Gene-Panels zugunsten der Sensitivität, der PPV sei jedoch weiterhin höher als bei *rule-out-Tests* wie dem GEC (217). Taye, A., *et al.* stellten dagegen bei *indeterminate nodules* und einem hohen NPV von > 95 % einen relativ geringen PPV (22 %) fest und raten daher, NGS-positive Ergebnisse nur mit Vorsicht zu behandeln (249). Gleichzeitig hohe NPV und PPV scheinen beim NGS also nicht grundsätzlich gegeben zu sein. Wahrscheinlich haben geografisch unterschiedliche Prävalenzen auch bei der NGS einen relevanten Einfluss auf die Testergebnisse. Trotzdem bietet die NGS aufgrund der großen Bandbreite an Markern mehr Vorteile zur Identifizierung maligner Schilddrüsenerkrankungen im Vergleich zur singulären Testung auf *BRAF*. Eine wesentliche Rolle spielen aber auch die Kosten, die im Rahmen der Anwendung entstehen. In einem späteren Abschnitt wird darauf eingegangen.

Neben den singulären und kombinierten Testverfahren mit genetischen Markern gibt es weitere Parameter, die präoperativ überprüft werden können. Eine erhöhte oder verringerte Expressionsrate spezifischer miRNA kann hinweisend für das Vorliegen eines bestimmten Karzinoms sein (199). Eine zusätzliche Anwendung einer miRNA-Analyse könnte den „toten Winkel“ der singulären BRAF-Testung, zumindest teilweise, einsehbar machen. Vorteile sind zum einen die einfache Identifizierung und Analyse der miRNA sowie ihre relativ hohe Widerstandsfähigkeit, wodurch Artefakten vor der Analyse vorgebeugt wird (199).

Die Bestimmung der Expressionsrate von Galectin-3 in Kombination mit der BRAF-Testung führte in einer Studie von Sapio, M. R., *et al.* zu einer deutlichen Reduktion falsch negativer Ergebnisse in der Diagnostik. Demnach könnte sich auch dieser Marker als Ergänzung zum BRAF-Test eignen (250). Zwar ist Gal-3 nicht spezifisch für

das PTC, sondern kann auch bei anderen Karzinomen wie dem FTC sowie bei benignen Erkrankungen vorkommen, eine deutlich gesteigerte Expressionsrate weist aber wahrscheinlich auf ein Karzinom hin (62, 63).

Ähnlich verhält es sich mit p53, dessen Expressionsrate bei Karzinomen, besonders beim ATC, deutlich erhöht sein kann. Eine kombinierte Testung von *BRAF* und p53 könnte somit ebenfalls zu einer Diagnostikverbesserung führen, zumal das gleichzeitige Vorkommen auf eine erhöhte Aggressivität eines PTC hinweisen soll (174). Fu, Q. F., *et al.* empfehlen im Rahmen der Diagnostik eine kombinierte Testung auf sowohl *BRAF* als auch p53-Antikörper im Serum des Patienten (174).

TERT-Promotor-Mutationen können ebenfalls bei PTC vorkommen und kombiniert mit *BRAF* zu einem aggressiveren Verhalten des Tumors führen (160, 166). Die Identifikation dieser Mutationen lässt bei gleichzeitig stark suspektem Erscheinungsbild des Tumors also das Vorliegen einer *BRAF*-Mutation vermuten. Eine Testung könnte sich bei *BRAF*-negativen Befunden anbieten.

Präoperativ negativer bei postoperativ positivem BRAF-Status

Auch wenn in der vorliegenden Studie nur die präoperativen *BRAF*-Testergebnisse in die Analyse integriert wurden, sollten auch die zwei Fälle diskutiert werden, bei denen sich erst im Rahmen der histologischen Untersuchung eine *BRAF*-Mutation identifizieren ließ. Die jeweilige präoperative FNA wurde als benigne bzw. insuffizient eingestuft. Der begleitende *BRAF*-Status war jeweils negativ. Histologisch handelte es sich schließlich um zwei PTC mit begleitenden Strumaknoten.

Möglicherweise wurden in beiden Fällen anstelle des PTC die begleitenden Strumaknoten punktiert und mutierte Zellen daher nicht erfasst. Wie auch jene PTC, die sowohl prä- als auch postoperativ *BRAF*-negativ waren, wurden auch diese zwei Fälle in der statistischen Analyse bzgl. der Molekularpathologie als falsch negativ gewertet.

Zwar wurden die Patienten wegen weiterer suspekter Merkmale im Rahmen der klinischen Untersuchung operiert, jedoch hätte ein primär positives *BRAF*-Testergebnis möglicherweise schneller zu einer gezielten Therapie führen können. Wäre der Knoten klinisch weniger auffällig gewesen, hätte es möglicherweise sogar gar keine Indikation für eine Operation gegeben und die PTC wären vorerst unentdeckt geblieben. Um solche Situationen verhindern zu können, untersuchten Yoon, J. H., *et al.* den Nutzen einer wiederholten präoperativen Feinnadelpunktion und einer wiederholten *BRAF*-Testung, mit dem Fokus auf *indeterminate nodules* und zytologisch nicht beurteilbaren,

d.h. insuffizienten Proben. Alle insgesamt 49 Proben waren bei initialer Testung BRAF-negativ. 17 der insgesamt 49 untersuchten Fälle wurden aufgrund ihrer Zytologie und klinischer bzw. sonografischer Merkmale als „wahrscheinlich benigne“ eingestuft, waren auch bei sekundärer Testung BRAF-negativ und schließlich histologisch benigne. Von den übrigen 32 Fällen, welche sonografisch als suspekt bewertet wurden, waren sieben Fälle bei sekundärer Testung BRAF-positiv und histologisch maligne (PTC). Unter den 32 Fällen waren auch solche, die initial als nicht-diagnostisch, unklar (*indeterminate*) oder sogar benigne beurteilt, nach sekundärer FNA jedoch zytologisch als suspekt oder maligne eingestuft wurden. Zwar erwiesen sich diese beim zweiten Mal nicht alle als BRAF-positiv, stellten aber trotzdem histologisch PTC dar. Ebenso kam es vor, dass eine in der Zytologie primär als atypisch und sekundär als benigne eingestufte Probe erst bei sekundärer genetischer Testung BRAF-positiv war und histologisch schließlich ein PTC darstellte (251).

Im Fall von zytologisch insuffizienten FNA sowie solchen der Bethesda-Kategorie III empfiehlt das *Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology* eine Repunktion mit erneuter zytologischer Untersuchung (28). Yoon, J. H., *et al.* konnten zeigen, dass auch eine wiederholte BRAF-Testung sinnvoll sein kann, da erst sekundär BRAF-Mutationen nachgewiesen werden könnten und dann sofort eine Thyreoidektomie eingeleitet würde. Die Sensitivität einer Repunktion durch die zusätzliche, erneute Anwendung des BRAF-Mutationstests wurde zudem von 83,3 % auf 91,7 % erhöht (251).

Zu beachten ist, dass in der Studie von Yoon, J. H., *et al.* bei initialer und sekundärer FNA jeweils ein weiteres Mal punktiert wurde, um Material für die BRAF-Testung zu erhalten. Demnach waren die Untersuchungsproben für Zytologie und Molekularpathologie nicht identisch. Die Qualität der zytologisch untersuchten Probe sowie des Zellmaterials für die BRAF-Testung konnte sich unterscheiden, sodass ein negativer BRAF-Status nicht zwingend mit der zytologischen Probe in Verbindung gebracht werden musste. So kann es zum Beispiel passieren, dass bei der der Zytologie gewidmeten Punktion zufällig alle mutationstragenden Zellen entnommen werden und folglich in der für die Molekularpathologie entnommenen Probe keine Mutationen mehr nachzuweisen sind. Der zytologische Befund wäre dann je nach Zellangebot tendenziell benigne oder maligne, der BRAF-Status wäre negativ, und histologische könnte es sich dennoch um ein PTC handeln. In der vorliegenden Studie wurde für Zytologie und Molekularpathologie das Zellmaterial einer einzigen Punktion verwendet. Dadurch bestand mit höherer Wahrscheinlichkeit ein Zusammenhang zwischen Zytologie und Molekularpathologie. Zwar wurden für die molekularpathologische Untersuchung nur

Materialüberschüsse der Kanüle als *washouts* verwendet, sodass es sich auch hier um unterschiedliche Zellen handelte, beide Proben stammten aber zumindest aus derselben Lokalisation im Gewebe und wurden unter gleichen Bedingungen während der Punktion gewonnen. Aufgrund der möglichen inhomogenen Verteilung der BRAF-Mutation innerhalb des Knotens ist es letztendlich Zufall, ob sich mutierte Zellen in den Proben befinden.

Die zytologischen Diagnosen „insuffizient“ bzw. „benigne“ der zwei präoperativ negativen, postoperativ dann BRAF-positiven Proben weisen darauf hin, dass präoperativ Zellpräparate ohne Anhalt für Malignität bzw. mit Mangel an zu beurteilbaren Zellen für die molekularpathologische Testung verwendet wurden. Diese Tatsache kann ein Grund dafür sein, dass die verwendete Analysemethode keine mutierten Zellen identifizieren konnte und somit das Testergebnis für *BRAF* negativ ausfiel. Beide PTC wurden von einer Struma colloidosa et nodosa, also einem gewöhnlichen Strumagewebe, begleitet. Möglicherweise erfolgte die Punktion in beiden Fällen in den gutartigen Anteil des Knotens bzw. im Falle einer Inhomogenität des BRAF-Status innerhalb des Knotens in einen Bereich mit weniger mutierten Zellen und führte deshalb zu den entsprechenden Befunden. Schlussfolgernd könnte also in Anlehnung an Yoon, J. H., *et al.* (251) eine Empfehlung für BRAF-negative und gleichzeitig zytologisch insuffiziente, benigne und auch suspekte FNA lauten, die BRAF-Testung zu wiederholen - entweder mittels einer aufbewahrten, anderen Probe (z.B. des zytologisch untersuchten Abstrichs), oder anhand neu gewonnenen Materials.

Als eine weniger wahrscheinliche, aber denkbare Möglichkeit für einen präoperativ negativen und gleichzeitig postoperativ positiven BRAF-Status stellen Neumutationen dar. Diese könnten im weiteren Verlauf nach primärer Punktion und BRAF-Testung auftreten, sodass sie erst später identifiziert werden können (236).

5.4.4 Problem der „*indeterminate nodules*“

Indeterminate nodules, FNA der Bethesda-Kategorien III und IV, sind ein bekanntes Problem in der Diagnostik von Schilddrüsenerkrankungen. Ca. 15-25 % der FNA gehören dieser Gruppe an (84), und noch mehr, wenn auch die Kategorie V („suspekt für Malignität“) dazugezählt wird, wie es manche Autoren tun (85). Ähnlich wie bei FNA der Kategorie „insuffizient“ ist hier keine eindeutige Diagnose in Richtung benigne oder maligne möglich. Es werden Malignitätswahrscheinlichkeiten von 5-10 % (Kategorie III) bzw. 20-30 % (Kategorie IV) angegeben (85). Der Großteil dieser Knoten ist folglich

zytologisch benigne. Leider werden dennoch viele Knoten dieser Kategorien aus diagnostischen Gründen operiert (9). Als präoperativer, molekulargenetischer Test würde sich aufgrund der durchschnittlich geringen Malignitätswahrscheinlichkeit ein *rule-out-Test* mit einem hohen NPV und hoher Sensitivität zur Diagnostik eignen. Der BRAF-Mutationstest ist ein *rule-in-Test* mit hohem PPV (98 % in dieser Studie), jedoch relativ geringem NPV (202, 208), sodass mithilfe des BRAF-Tests wahrscheinlich nur ein kleiner Teil der *indeterminate nodules* eindeutig als maligne diagnostiziert werden könnte. Ein Beispiel für einen *rule-out-Test* mit hohem NPV ist der *Afirma Gene Expression Classifier* (GEC). Dieser bestimmt die Expressionsraten bestimmter mRNA, die mit benignen Erkrankungen assoziiert sind (252). Würde bei passender Malignitätsrate der GEC angewandt und bei einem Teil der zytologisch unklaren Fälle eine Malignität durch den GEC ausgeschlossen, könnte anschließend nur bei weiterhin verdächtigen Knoten ein *rule-in-Test* angewandt werden (207). Würde andersherum zuerst ein *rule-in-Test*, z.B. ein singulärer BRAF-Mutationstest, durchgeführt, und keine Mutation identifiziert, könnte durch den GEC der Verdacht auf Malignität entweder aufgehoben oder verstärkt werden. Marti, J. L., *et al.* untersuchten retrospektiv die Effizienz des GEC der Marke *Afirma* an zwei verschiedenen Institutionen in New York mit unterschiedlichen Prävalenzen der malignen Schilddrüsenerkrankungen. Wie auch beim BRAF-Mutationstest, hat beim GEC die Prävalenz für Malignität innerhalb der untersuchten Bevölkerungsgruppe einen relevanten Einfluss auf Testsensitivität und -spezifität bzw. NPV und PPV. Die Autoren stellten fest, dass der GEC die aussagekräftigsten Ergebnisse bei einer Prävalenz für Malignität von 15-21 % unter den *indeterminate nodules* erzielt (233). Je nachdem, wie hoch die Malignitätswahrscheinlichkeit unter Schilddrüsenknoten der Bethesda-Kategorien III und IV in Mainz ist, könnte sich bei negativem BRAF-Status der GEC als primäre Methode für diese Fälle eignen, um den Verdacht auf Malignität entweder aufzuheben oder zu steigern.

Da in der vorliegenden Studie nicht das Bethesda-System mit den Kategorien III und IV zur Diagnostik genutzt wurde, ist eine differenzierte Betrachtung der Malignitätsrate dieser Kategorien nicht möglich. Die Kategorie „suspekt“ hat eine Malignitätsrate von 62,5 %, was nicht dem typischen Wertebereich der *indeterminate nodules* entspricht, und kann demnach nicht repräsentativ herangezogen werden.

Mit Ausnahme eines Autors wird der routinemäßige Einsatz des GEC bei *indeterminate nodules* nach der *European Thyroid Association* nicht empfohlen, um Malignität auszuschließen. Als Grund dafür wird der Mangel an Langzeitdaten zur Auswertung

von FNA bei *indeterminate nodules* angegeben, die aufgrund ihres negativen GEC-Ergebnisses nicht operiert wurden (75). Langzeitergebnisse müssen folglich noch abgewartet werden, um sich auf Ergebnisse des GEC verlassen zu können. Zudem sind die Kosten für einen GEC ausgesprochen hoch, was die Anwendung nach dem oben vorgeschlagenen Algorithmus stark infrage stellt (253).

Es sind weitere Alternativen zum singulären BRAF-Mutationstest möglich, z.B. das NGS-Panel (217) oder zusätzliche Bestimmungen von Expressionsraten (z.B. p53 (174), Galectin-3 (250) oder TERT (160, 166), um für die Grauzone der *indeterminate nodules*, zu denen auch BRAF-negative PTC zählen können, eine bessere Einschätzung zu ermöglichen. Wie bereits erwähnt, ist bei NGS-Panels jedoch kein Verlass auf einen hohen NPV, da auch dieser geografischen Unterschieden aufgrund unterschiedlicher Prävalenzen unterliegt (249). Bei einer Malignitätsrate der Schilddrüsenknoten von 45,4 % und einer Prävalenz der PTC unter den Schilddrüsenkarzinomen von 83,33 % in der vorliegenden Studie lässt sich aber vermuten, dass ein NGS-Panel die Diagnostik positiv unterstützen würde. Unabhängig davon lassen sich durch ein NGS-Panel durch die Vielzahl der verwendeten Marker wahrscheinlich mehr Erkrankungen identifizieren als bei singulärer BRAF-Testung. Auch hier muss der Nutzen gegenüber den entstehenden Kosten im Vergleich zur singulären BRAF-Testung abgewogen werden.

5.5 Einfluss des BRAF-Mutationstests auf Therapie und Prognose

Es ist plausibel, dass durch eine schnellere Diagnose und eine gezielte Therapieplanung sowohl die Mortalitätsrate als auch die Behandlungskosten gesenkt werden können. In der vorliegenden Studie wurde das jeweilige therapeutische Vorgehen der Fälle nicht dokumentiert bzw. analysiert, sodass zu einer möglichen Therapiebeeinflussung nur Hypothesen aufgestellt werden können.

Bevor die molekularpathologische Analyse zur Diagnostik der Schilddrüse verfügbar war, waren neben klinischen Befunden die Feinnadelpunktion und die zytologische Untersuchung wegweisend für das folgende therapeutische Vorgehen. Eindeutig als maligne beurteilte Knoten wurden operiert, alle anderen Befunde wurden entweder klinisch beobachtet oder es wurde eine diagnostische Lobektomie durchgeführt. Besonders bei suspekten und unklaren Befunden ist dieses Vorgehen kritisch zu betrachten, da es sich bei ihnen um maligne Läsionen handeln kann. Zwar ist es möglich, intraoperativ Gefrierschnitte zu begutachten, die Genauigkeit der Untersuchung wird

aber durch Faktoren wie Subjektivität des Pathologen, eventuell schlechte Qualität des Zellmaterials sowie Zeitdruck limitiert. Daher wird das Resektat oft erst histologisch untersucht und bei Malignität eine zweite Operation zur Nachresektion (sog. Komplettierungs-Thyreoidektomie bzw. Rest-Thyreoidektomie) eingeleitet (201).

Eine Thyreoidektomie ist allgemein mit intraoperativen Risiken wie Nervenverletzungen oder einem permanenten Hypoparathyreoidismus sowie Hämatomen, Seromen und Wundinfektionen verbunden (23, 254). Es erscheint naheliegend, dass ein mehrfacher Eingriff das Gesamtrisiko erhöhen würde. Menegaux, F., *et al.* und Reeve, T. S., *et al.* berichten von einem höheren Komplikationsrisiko bei zweizeitigem Vorgehen (255, 256). Andere Autoren halten die Risiken von ein- und zweizeitigen Therapien dagegen für vergleichbar (254, 257). Zu beachten ist, dass das Komplikationsrisiko einer Rest-Thyreoidektomie zum einen abhängt von Art und Ausmaß der Erstoperation (75). Zum anderen ist der Zeitpunkt der Zweitoperation relevant (258). Aus diesem Grund sollte man eine höhere Inzidenz von Komplikationen in Relation zu diesen Parametern betrachten und nicht allgemein voraussetzen. Darüber hinaus sollte man außerdem auch weitere, perioperative Risiken hinzuziehen, die beispielsweise in Verbindung mit der Narkose oder anderen vorbereitenden Maßnahmen bestehen. Eine steigende psychische Belastung des Patienten ist bei steigender Anzahl der Eingriffe sicherlich auch nicht außer Acht zu lassen. Die lokale Rezidivrate ist bei einzeitigem operativem Vorgehen mit primärer Thyreoidektomie zudem geringer als bei zweizeitigem Vorgehen, besonders wenn gleichzeitig eine prophylaktische zentrale Lymphknotenresektion durchgeführt wird (259). Die Prognose scheint für betroffene Patienten folglich besser zu sein, wenn bei hoher Wahrscheinlichkeit für Malignität (z.B. aufgrund eines positiven BRAF-Mutationstests) auf eine diagnostische Lobektomie verzichtet und primär eine Thyreoidektomie durchgeführt wird.

In Bezug auf eine mögliche Beeinflussung der Therapieplanung, unabhängig von einer möglichen Komplikationsminderung, kommen Fnais, N., *et al.* in einer Metaanalyse allerdings zu dem Ergebnis, dass die alleinige Testung auf *BRAF* aufgrund ihrer geringen Sensitivität die initiale Therapie nur eingeschränkt verändert. In den Fällen, in denen ein suspekter Knoten mit negativem BRAF-Status vorliegt, werde weiterhin zunächst diagnostisch operiert, da es sich u.a. um ein PTC ohne BRAF-Mutation handeln könnte (231). Zudem beschränkt sich die Anwendung eines BRAF-Mutationstests auf die Identifikation von PTC, andere Malignome könnten weiterhin unentdeckt bleiben (136).

Man werfe einen Blick auf die Ergebnisse dieser Studie. Bei 18 Fällen (sechs insuffiziente, zwei benigne, zehn suspekta FNA) war der positive BRAF-Status (theoretisch) ausschlaggebend für eine Therapieänderung. Hier konnte (theoretisch) auf eine zweizeitige Operation verzichtet, die Therapiedauer insgesamt verkürzt und die Belastung des Patienten gesenkt werden. Nach dem *Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology* wird bei insuffizienter FNA eine wiederholte FNA mit begleitender Sonografie empfohlen (28). Ist der BRAF-Test bei insuffizienter FNA positiv, muss nicht zwingendermaßen eine Repunktion durchgeführt werden, wenn beispielsweise noch andere suspekta Merkmale im klinischen Bild vorhanden sind. Wird dennoch die Punktion wiederholt, kann sich auch eine molekulare Testung bei insuffizienter FNA lohnen, wie die vorliegende Studie zeigt. 17,1 % der insuffizienten FNA wurden allein durch den BRAF-Mutationstest als PTC identifiziert, sechs der acht PTC in dieser Kategorie wurden auf diese Weise entdeckt. Das Ergebnis des BRAF-Mutationstests könnte die zytologische Beurteilung wesentlich beeinflussen bzw. unterstützen, indem der Pathologe zum Beispiel bei einem positiven Test intensiver auf maligne Merkmale achtet. Möglicherweise könnte bei insuffizienter FNA ohne Molekularpathologie eine Repunktion zunächst ausreichen, wie es auch vom *2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology* empfohlen wird (28). Sind dann zytologisch suspekta Merkmale erkennbar, kann immer noch eine molekulargenetische Testung erfolgen.

Für zytologisch benigne FNA ist normalerweise nur eine klinische Verlaufskontrolle angezeigt (28). Allerdings wurden immerhin zwei der insgesamt fünf PTC dieser Kategorie durch den BRAF-Mutationstest identifiziert. Kim, S. Y., *et al.* empfehlen für zytologisch benigne FNA mit positivem BRAF-Status eine Thyreoidektomie, unter der Bedingung, dass mindestens zwei suspekta sonografische Merkmale vorliegen bzw. zytologische und sonografische Befunde nicht kongruent sind (246). Dieser Empfehlung wurde in den zwei Fällen zumindest unbewusst gefolgt, falls sonografisch suspekta Merkmale vorlagen. Leider kam es zusätzlich zu den zwei Fällen zu einem falsch positiven BRAF-Ergebnis bei benigner Zyto- und Histologie. Natürlich haben präoperativ noch andere, suspekta Befunde neben der Zytologie vorgelegen, die überhaupt den Anlass zu einer Feinnadelpunktion gegeben haben. Daher war die Indikation zur Operation gerechtfertigt. Dennoch wären rückblickend sowohl eine Repunktion, eine sonografische Reevaluation sowie eventuell eine erneute BRAF-Testung empfehlenswert gewesen, sodass die Operation möglicherweise hätte vermieden werden können.

Für FNA der Kategorie „suspekt“ („Hürthle-Zell-Neoplasie“, „suspekt für Malignität“) empfiehlt die *American Thyroid Association* eine Lobektomie oder Thyreoidektomie, abhängig von der Größe der Läsion und anderen Risikofaktoren (260). Wie viele Fälle der Kategorie „suspekt“ in dieser Studie zu den *indeterminate nodules* gezählt und wie viele wiederum durch mehr suspekten Merkmale eher der Bethesda-Kategorie V entsprechen hätten, ist ungewiss, da alle suspekten Fälle einer gemeinsamen Kategorie zugeordnet wurden. Allgemein kann der BRAF-Mutationstest unter den *indeterminate nodules* sicherlich diagnostische Hilfe leisten, wie im vorherigen Kapitel bereits diskutiert wurde. Angesichts der häufigen benignen Fälle unter den Kategorien III und IV wurde der Nutzen des alleinigen BRAF-Tests allerdings infrage gestellt. Wie man an den Ergebnissen sieht, wurden aber 20 von 32 zytologisch suspekten FNA (62,5 %) histologisch als maligne bestätigt, was die durchschnittliche Malignitätsrate von 5-30 % der Kategorien III und IV deutlich übertrifft und sich eher der Malignitätsrate der Kategorie V annähert (bis 75 %) (85). Deshalb entspricht die Kategorie „suspekt“ in dieser Studie eher einer Bethesda-Kategorie V als den häufig als *indeterminate nodules* bezeichneten Fällen der Kategorien III und IV. Aufgrund der hohen Malignitätswahrscheinlichkeit waren vermutlich häufiger suspekten, den PTC ähnliche Merkmale in der Zytologie erkennbar als bei Fällen der Kategorien III oder IV. Möglicherweise wurde auch sonografisch ein stärkerer Verdacht auf Malignität geschöpft. Die Durchführung des BRAF-Mutationstests ist demnach durchaus sinnvoll gewesen, da einige PTC bereits präoperativ als solche erkannt werden konnten. Zwar hatte ein positiver BRAF-Test keinen so wesentlichen Einfluss auf die Therapieentscheidung wie bei insuffizienten oder benignen FNA, da bei suspekten Fällen sowieso eine Operation indiziert ist (201), die Kenntnis über die Mutation und die damit verbundene sehr hohe Wahrscheinlichkeit eines PTC kann aber die Planung der Therapie inklusive des Resektionsausmaßes beeinflussen. Der reguläre Einsatz des BRAF-Mutationstests in der Kategorie „suspekt“ sollte unter Berücksichtigung der lokalen Prävalenzen für BRAF unter den PTC und der erforderlichen Kosten abgewogen werden. Der Einsatz in individuellen Fällen zur besseren Therapieplanung kann aber durchaus befürwortet werden. Immerhin empfiehlt auch das *Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology* seit dem Jahr 2017, bei FNA der Kategorien III und IV die molekulare Testung in Betracht zu ziehen. Die Testung soll dabei eher zur Risikoeinschätzung beitragen als zur operativen Planung (28).

Im Fall von zytologisch malignen Knoten hat die BRAF-Testung nur wenig Einfluss auf die Therapie, da in der Regel primär eine Thyreoidektomie durchgeführt wird (201).

Besonders bei bereits bestätigter Malignität kann ein positiver BRAF-Mutationstest die Behandler jedoch vorbereiten auf ein aggressiveres Verhalten des Tumors, mögliche Rezidive, die Entwicklung von Lymphknotenmetastasen und weitere prognostisch ungünstige Faktoren, die ein positiver BRAF-Status mit sich bringen kann (18, 19, 175-178, 193, 194, 241, 242). Zudem wäre dadurch möglich, eine unterstützende medikamentöse Therapie in Form von BRAF-Inhibitoren anzuwenden, die bereits in der Behandlung des malignen Melanoms zum Einsatz kommen (261).

Yoon, J. H. *et al.* hatten mit ihrer Methode Erfolg, bei einem negativen BRAF-Testergebnis sowohl Punktion als auch BRAF-Testung zu wiederholen. Auf *BRAF* wurde also wie in dieser Studie auch direkt initial getestet. Die Sensitivität der Untersuchung wurde durch die Wiederholung nach negativem BRAF-Test deutlich erhöht. Die Autoren sehen in ihrer Methode außerdem den Vorteil, dass das Ergebnis des BRAF-Tests keiner subjektiven Beurteilung unterliege wie die Sonografie und demnach die weitere Therapie besonders bei sekundär insuffizienten, benignen oder suspekten FNA angesichts des BRAF-Testergebnisses präziser geplant werden könne (251). Wäre der BRAF-Mutationstest in der vorliegenden Studie präoperativ in allen negativen Fällen wiederholt worden, hätten möglicherweise auch weitere der histologisch bestätigten PTC entdeckt werden können. Eine wiederholte Feinnadelpunktion hätte ebenfalls mehr Informationen liefern können.

Bekanntlich sind im europäischen Raum durchschnittlich nur etwa die Hälfte der PTC von einer BRAF-Mutation betroffen (45 %) (18). Die Tatsache, dass in der vorliegenden Studie eine Prävalenz von 77,4 % erreicht wird, spricht für eine gute Selektion der Knoten im Rahmen der Primärdiagnostik sowohl vor als auch nach einer Punktion. Der hohe Anteil der BRAF-Mutationen ist u.a. darauf zurückzuführen, dass in dieser Studie hauptsächlich Knoten mit Durchmesser von mindestens 1 cm punktiert wurden (entsprechend EU-TIRADS (268)), bei denen die Frequenz von *BRAF* generell höher ist als bei Mikrokarzinomen mit einem Durchmesser von < 1 cm (135, 136). Ebenso gibt es bestimmte sonografische Merkmale, die häufig mit einem positiven BRAF-Status korrelieren (dichte Struktur, echoarmes Binnenmuster, oval-runde Form, glatte oder fein-gelappte Begrenzungen, Mikrokalzifikationen) (144, 145). Knoten, die diese Merkmale im Ultraschall zeigten, konnten dadurch direkt für eine Testung auf *BRAF* vorge-merkt werden.

Eine wiederholte Punktion mit wiederholter BRAF-Testung sollte in jedem Fall als Chance für zusätzlichen Informationsgewinn gesehen werden. Das Vorgehen sollte

aber unter Berücksichtigung weiterer klinischer Merkmale, der Patientenbelastung, des möglichen Einflusses auf die lokal übliche Therapie und der Kosten abgewogen werden. In Bezug auf weitere klinische Merkmale könnte zum Beispiel besonders bei solchen Knoten erneut auf *BRAF* getestet werden, bei denen die oben genannten sonografischen Merkmale vorkommen, die häufig mit *BRAF* assoziiert sind. Eine vorherige, wiederholte Sonografie wäre hier sinnvoll.

Grundsätzlich ist der Einfluss von vorliegenden genetischen Mutationen auf die Therapie abhängig von verschiedenen Faktoren. Besonders bei FNA der Kategorien III und IV, den *indeterminate nodules*, spielt die Malignitätswahrscheinlichkeit innerhalb der untersuchten Gruppe vor Durchführung der Testung eine Rolle, da diese entscheidende Auswirkung auf den NPV und PPV des Molekulartests hat. Bei Anwendung eines Panels sollte zudem nicht der PPV des Gesamt-Panels zum Anlass für eine Therapieentscheidung genommen werden, sondern der PPV jeder einzelnen untersuchten Mutation, da z.B. eine vorliegende RAS-Mutation mit einer geringeren Malignitätswahrscheinlichkeit (60-87 %) verbunden ist als eine *BRAF*-Mutation (> 95 %) (75). Ebenso sollte bei einem negativen Panel-Ergebnis nicht definitiv auf einen benignen Befund geschlossen werden, sondern bei klinischem, zytologischem und sonografischem Verdacht auf Malignität weiterhin zumindest eine diagnostische Operation in Erwägung gezogen werden (75). Paschke *et al.* kommen in ihren Leitlinien aus dem Jahr 2017 zu dem Entschluss, dass eine Testung auf Mutationen, die mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 95 % eine Malignität vorhersagt, die Häufigkeit diagnostischer Lobektomien reduzieren und damit das Therapievorgehen verändern kann (75). Der Mutationstest der vorliegenden Studie mit einer Spezifität von 98,9 % ist folglich erfolgversprechend. Mutationen mit geringerer Spezifität wie jene aus der RAS-Gruppe dagegen seien als Indikatoren für eine Thyreoidektomie nicht geeignet, wohl aber für einen operativen Eingriff allgemein (z.B. Lobektomie) (75).

5.6 Kosten

Bei der Entscheidung zur Anwendung eines *BRAF*-Mutationstests sind auch die entstehenden Kosten relevant. Diese unterscheiden sich je nach verwendeter Technik. In der Universitätsmedizin Mainz kostet eine *BRAF*-Analyse zwischen 60 und 90 Euro. Zusätzlich kommen 120-180 Euro bei positivem Testergebnis zur Überprüfung mittels direkter Sequenzierung hinzu (119). Eine US-amerikanische Studie aus dem Jahr 2014 nennt Kosten von ca. 97 US-Dollar pro Test (262). In Anbetracht der Tatsache,

dass durch einen positiven Test, der sehr stark mit Malignität assoziiert ist, speziell bei zytologisch benignen oder unklaren Fällen ein zweizeitiges Vorgehen umgangen werden kann, kann davon ausgegangen werden, dass sich die Behandlungskosten in solch einem Fall mindestens um die Differenz aus den Kosten der ausbleibenden Operation und den Kosten des BRAF-Mutationstest verringern. Diese Differenz liegt dann bei bis zu 7000 Euro pro Patient (119). Zusätzlich sind Kosten zu beachten, die durch Komplikationen entstehen, wie beispielsweise die Behandlung von Wundinfektionen, Nervenverletzungen etc. (262), auch wenn die Komplikationsrate bei einem zweizeitigen Vorgehen nach manchen Autoren nicht höher sein soll als bei Durchführung einer primären Thyreoidektomie (254, 257). Yip, L., *et al.* untersuchten eine mögliche Kostenersparnis durch Anwendung eines Panels inklusive BRAF V600E-Testung der Kategorien III und IV. Durch die Anwendung kam es zu einer Reduktion von diagnostischen Lobektomien und entsprechend zu einem Anstieg von primären Thyreoidektomien. Insgesamt zeigte sich eine deutliche Kostenersparnis durch die Panel-Anwendung beim Vergleich von Zytologie „ohne Molekularpathologie und mit zweizeitiger Operation“ und Zytologie „mit Molekularpathologie mit einzeitiger Operation bei positiven Mutationstest“ (227). Die Kosten für die Anwendung eines NGS-Panels als mögliche Alternative zur singulären BRAF-Testung übertreffen allerdings deutlich die Kosten einer singulären Testung (bis zu 3200 US-Dollar pro Test) (253). Ein kleineres Panel mit weniger als zehn Markern wäre zwar kostengünstiger, aber ebenfalls teurer als eine singuläre Testung (227). Welcher Test aus finanzieller Sicht infrage kommt, muss demnach je nach verfügbarem Budget entschieden werden.

Die tatsächliche Kostenersparnis wurde in der vorliegenden Studie nicht untersucht. Deshalb ist hierzu keine definitive Aussage möglich. Der vorgeschlagene Algorithmus, bei BRAF-positiven Befunden (und bestenfalls weiteren suspekten Merkmalen) statt einer Lobektomie primär eine Thyreoidektomie durchzuführen, lässt aber eine deutliche Kostenersparnis vermuten. Eine prospektive Studie über einen längeren Zeitraum wäre hier vorteilhaft, um ggf. auch Kosten für Nachsorgebehandlungen durch Komplikationen in die Analyse miteinzubeziehen. Im Fall der zytologisch und histologisch benignen, BRAF-negativen Befunde bedeutet die Anwendung des BRAF-Mutationstests rückblickend vermutlich keine Kostenersparnis für die Behandlung, wenn aufgrund anderer suspekter Merkmale trotzdem operiert wurde. Da ein positives Testergebnis das therapeutische Vorgehen jedoch beeinflusst und es sich auch bei zytologisch benignen Knoten um PTC handeln kann, wie in der Studie bewiesen wurde, sollte der BRAF-Mutationstest als eine Chance angesehen werden, für die sich eine Investition lohnt.

5.7 Limitationen dieser Studie

Die vorliegende Studie unterliegt einigen Limitationen. Da es sich um eine retrospektive Analyse handelt, war eine exakte Kontrolle sowohl des präoperativen als auch des intra- und postoperativen Vorgehens nicht möglich. Allein die interne Datenbank der Universitätsmedizin Mainz inklusive zytologischer Wertungen und OP-Berichte wurden als maßgebende Informationen verwendet. Die analysierte Patientengruppe wurde außerdem weder nach Alter noch nach Geschlecht und ethnischer Herkunft sortiert. Durch diese Informationen hätten Zusammenhänge zwischen einer vorliegenden BRAF-Mutation und den genannten Patientenmerkmalen analysiert werden können. Auch die präoperativ geschätzte Größe der Knoten wurde nicht berücksichtigt. Durch diese Information hätte man möglicherweise Zusammenhänge zwischen der Knotengröße und Suffizienz der FNA, BRAF-Status, Indikation zu operativen Maßnahmen, postoperativen Komplikationen und postoperativ abweichendem BRAF-Status aufzeigen können. Damit verbunden sind auch all die Knoten, die zwar punktiert, aber nicht operiert wurden. Die Daten zu diesen Patienten wurden in der Studie nicht berücksichtigt. Sie hätten Aufschluss darüber geben können, welche klinischen und zytologischen Merkmale mit und ohne BRAF-Mutation keine Indikation für eine Operation darstellen. Die daraus abgeleitete klinische Relevanz bestimmter Befunde würde dadurch klarer und therapeutische Entscheidungen könnten besser nachvollzogen werden.

Um die Frage zu beantworten, inwiefern der Test die Sensitivität und Spezifität von Feinnadelpunktionen bzw. der zytologischen Untersuchung beeinflusst, fehlen in der vorliegenden Studie Informationen über die Anzahl und den Erfahrungsgrad der Behandler (der untersuchenden und punktierenden Ärzte, der Pathologen und der Chirurgen). Sowohl die klinische Untersuchung inklusive der Sonografie als auch die zytologische Beurteilung der Proben enthalten subjektive Anteile, die die Diagnosestellung beeinflussen können. Folglich sind die zahlreichen Diagnosen und Therapieentscheidungen in dieser Studie nicht exakt miteinander vergleichbar.

Im Rahmen der zytologischen Beurteilung der Proben wurden die Diagnosen in vier Kategorien eingeteilt (insuffizient, benigne, suspekt, maligne). Eine zusätzliche Kategorie im Sinne der Bethesda-Kategorien III und IV entfiel dadurch, sodass eine separate Betrachtung und Analyse von *indeterminate nodules*, die in vielen internationalen Studien diskutiert werden, nicht möglich war. In der vorliegenden Studie wurden solche unklaren Fälle der Kategorie „suspekt“ zugeordnet. Diese Kategorie umfasst aber eine Vielzahl von Befunden, die mehr oder weniger stark ausgeprägte suspektere Merkmale

aufweisen können und sich in Bezug auf ihre Malignitätswahrscheinlichkeit unterscheiden.

Die BRAF-Analyse ist insofern limitiert, als dass in der vorliegenden Studie ein negativer BRAF-Status unter PTC als ein falsch negatives Ergebnis gewertet wurde. Ein verbesserter Umgang mit dieser Situation ist vermutlich unter Berücksichtigung der Bayes-Statistik möglich, durch die die Prävalenz der BRAF-Mutation unter den PTC von ca. 45 % in die Berechnung von Sensitivität, Spezifität, NPV und PPV miteinbezogen werden könnte (263).

Insgesamt ist der Vergleich dieser Studie mit anderen Studien dadurch limitiert, dass sich die Prävalenzen der PTC und der BRAF-Mutation in Deutschland und anderen europäischen Ländern von denen aus anderen, v.a. asiatischen Ländern unterscheiden (18, 19). Dies ist zu berücksichtigen, wenn eine allgemeine Aussage z.B. über eine mögliche Sensitivitätssteigerung der FNA durch den BRAF-Mutationstest gemacht werden soll. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie repräsentieren folglich in erste Linie europäische Länder mit ähnlichen Prävalenzen.

5.8 Ausblick

Die genetische Analyse von FNA auf eine BRAF-Mutation - singularär oder in Kombination mit anderen Markern - wurde bereits aus verschiedenen Blickwinkeln untersucht. Einige Autoren sprechen sich für die prä- und postoperative Anwendung von NGS-Panels, z.B. *ThyroSeq*, aus, die aufgrund ihrer hohen erzielbaren NPV und PPV erfolgversprechend für die Diagnostik sind (206, 215, 264). Weitere Forschung in dem Bereich ist erforderlich, um die Technik der NGS in der Praxis zu etablieren, mit Berücksichtigung des Verhältnisses zwischen Nutzen, Aufwand der Durchführung und erforderlichen Kosten. In der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Universitätsmedizin Mainz ist die routinemäßige Anwendung eines NGS-Panels in Vorbereitung. Der Langzeitnutzen und die Kosteneffektivität unter den gegebenen Bedingungen müssen in Zukunft überprüft werden.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Studie befasst sich mit dem Nutzen des BRAF-Mutationstests in der Schilddrüsendiagnostik. Aufgrund der Fehleranfälligkeit von FNA und deren zytologischer Untersuchung, resultierend in insuffizienten Proben und Einschränkung der Sensitivität (4-8), kommen molekulargenetische Analysen zur Anwendung, die eine objektive Beurteilung der Proben ermöglichen und maligne und benigne Befunde besser voneinander unterscheiden sollen. Die BRAF-Mutation gilt als spezifischer Marker für das PTC (119, 155), das häufigste Karzinom der Schilddrüse (3). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich eine molekulargenetische Testung auf *BRAF* positiv auf die Diagnostik und Therapieplanung auswirkt, indem mehr PTC schon präoperativ als solche erkannt werden.

Für die Studie wurden 183 Fälle statistisch ausgewertet, bei denen im Zeitraum zwischen Januar 2013 und Dezember 2015 eine FNA durchgeführt, die Proben sowohl zytologisch beurteilt als auch molekulargenetisch auf die BRAF V600E-Mutation getestet wurden und bei denen aufgrund der Untersuchungsergebnisse eine Operation mit anschließender histologischer Untersuchung stattfand. Für die molekularpathologische Analyse kam die Methode der PCR (MASA) mit anschließender direkter Sequenzierung zum Einsatz. MASA erweist sich als relativ kostengünstige Methode, die mit einer relativen Zeitersparnis und einer hohen Sensitivität für mutierte Zellen einhergeht (123, 234).

Beim anschließenden Vergleich zwischen der Kombination aus FNA und BRAF-Testung einerseits und FNA ohne molekulargenetische Analyse andererseits konnte gezeigt werden, dass eine präoperative Testung auf BRAF die Sensitivität von Feinnadelpunktionen bzw. deren zytologischer Untersuchung erhöht (von 81,9 auf 85,9 %). Außerdem beweist diese Studie, dass der BRAF-Mutationstest nicht nur bei zytologisch suspekten, sondern auch bei zytologisch als insuffizient oder benigne eingestuft Befunden dazu in der Lage ist, PTC zu identifizieren. Falsch negativen Befunden in der Zytologie wird damit entgegengewirkt. Es wird zudem davon ausgegangen, dass anhand eines bekannten BRAF-Status mögliche prognostische Risiken vorhergesehen werden können, die mit BRAF-Mutationen assoziiert sind. Basierend auf diesen Erkenntnissen lautet die Schlussfolgerung, dass die präoperative Anwendung des BRAF-Mutationstests sowohl die zytologische Diagnostik als auch die Therapieplanung positiv unterstützt. Pathologen werden durch einen positiven BRAF-Status

eventuell achtsamer in der Beurteilung der Präparate. Außerdem kann die Anzahl diagnostischer Lobektomien möglicherweise reduziert werden, was die Patientenbelastung verringern, die Therapiedauer verkürzen und die Behandlungskosten reduzieren würde.

Auch wenn die Rate BRAF-positiver PTC in dieser Studie, durch gezielte primärdiagnostische Vorselektion, relativ hoch ausfällt (77,4 %), können im europäischen Raum nur circa 45 % aller PTC durch eine singuläre Testung auf *BRAF* identifiziert werden (18). Durch Ausweitung der molekularpathologischen Diagnostik auf Panels, wie das *Next Generation Sequencing* (NGS), besteht die Hoffnung, dass durch Einbezug weiterer molekularer Marker mehr Patienten mit diagnostisch unklaren Knoten von einer Operation verschont bleiben.

7 Literaturverzeichnis

1. Ziegler R. Schilddrüse. In: Arastéh KB, Hanns-Wolf. Duale Reihe - Innere Medizin. 2. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2009. S. 738-66.
2. Dodt C. Endokrines System. In: Renz-Polster H, Krautzig, S., Braun, J. Basislehrbuch innere Medizin. 4. Auflage. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2008. S. 773-94.
3. Reincke M, Beuschlein, F., Gain, Th., Bottermann, P. Schilddrüsenerkrankungen. In: Böhm H, Schmiegel. Innere Medizin. 6. Auflage. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2009. S. 1115-8.
4. Bongiovanni M, Spitale A, Faquin WC, Mazzucchelli L, Baloch ZW. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: a meta-analysis. *Acta cytologica*. 2012;56(4):333-9.
5. Gul K, Ersoy R, Dirikoc A, Korukluoglu B, Ersoy PE, Aydin R, et al. Ultrasonographic evaluation of thyroid nodules: comparison of ultrasonographic, cytological, and histopathological findings. *Endocrine*. 2009;36(3):464-72.
6. Guo H-Q, Zhang Z-H, Zhao H, Niu L-J, Chang Q, Pan Q-J. Factors Influencing the Reliability of Thyroid Fine-Needle Aspiration: Analysis of Thyroid Nodule Size, Guidance Mode for Aspiration and Preparation Method. *Acta cytologica*. 2015;59(2):169-74.
7. Bakhos R, Selvaggi SM, DeJong S, Gordon DL, Pitale SU, Herrmann M, et al. Fine-needle aspiration of the thyroid: rate and causes of cytohistopathologic discordance. *Diagnostic cytopathology*. 2000;23(4):233-7.
8. Gharib H, Goellner JR. Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid: an appraisal. *Annals of internal medicine*. 1993;118(4):282-9.
9. Tee YY, Lowe AJ, Brand CA, Judson RT. Fine-needle aspiration may miss a third of all malignancy in palpable thyroid nodules: a comprehensive literature review. *Annals of surgery*. 2007;246(5):714-20.
10. Nikiforov YE. Molecular diagnostics of thyroid tumors. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2011;135(5):569-77.
11. Beisa A, Kvietkauskas M, Beisa V, Stoskus M, Ostaneviciute E, Jasiunas E, et al. Significance of BRAF V600E Mutation and Cytomorphological Features for the Optimization of Papillary Thyroid Cancer Diagnostics in Cytologically Indeterminate Thyroid Nodules. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2018.

-
12. Yip L, Ferris RL. Clinical application of molecular testing of fine-needle aspiration specimens in thyroid nodules. *Otolaryngologic clinics of North America*. 2014;47(4):557-71.
 13. Cantara S, Capezzone M, Marchisotta S, Capuano S, Busonero G, Toti P, et al. Impact of proto-oncogene mutation detection in cytological specimens from thyroid nodules improves the diagnostic accuracy of cytology. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(3):1365-9.
 14. Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith TM, Haugen BR, Klopper JP, Zhu Z, et al. Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(6):2092-8.
 15. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949-54.
 16. Mehta V, Nikiforov YE, Ferris RL. Use of molecular biomarkers in FNA specimens to personalize treatment for thyroid surgery. *Head & neck*. 2013;35(10):1499-506.
 17. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(11):5399-404.
 18. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocrine-related cancer*. 2005;12(2):245-62.
 19. Kim KH, Kang DW, Kim SH, Seong IO, Kang DY. Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma in a Korean population. *Yonsei medical journal*. 2004;45(5):818-21.
 20. Hansen JT, Lambert, D. R., Netter, F. H. *Netters Klinische Anatomie*. Stuttgart: Thieme; 2004. S. 536.
 21. Gratzl, M. Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Pankreasinseln, Nebennieren und Epiphyse. In: Junqueira L. C., Carneiro, J., *Histologie*. 6. Auflage. Heidelberg: Springer-Verlag; 2005. S. 352-356.
 22. Schulte K-M. *Chirurgische Anatomie*. In: Rothmund M, Schumpelick, V., Siewert, J., *Praxis der Viszeralchirurgie. Endokrine Chirurgie*. 2. Auflage. Berlin: Springer; 2007. S. 34.
 23. Aumüller G, Wennemuth, G. Halsorgane. In: *Duale Reihe - Anatomie*. 4. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2017. S. 935.

-
24. Gärtner R, Reincke, M. Schilddrüse. In: Siegenthaler W, Blum, W. E. Klinische Pathophysiologie. 9. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2006. S. 271-275.
 25. Hegedus L. Clinical practice. The thyroid nodule. The New England journal of medicine. 2004;351(17):1764-71.
 26. Smith-Bindman R, Lebda P, Feldstein VA, Sellami D, Goldstein RB, Brasic N, et al. Risk of thyroid cancer based on thyroid ultrasound imaging characteristics: results of a population-based study. JAMA Intern Med. 2013;173(19):1788-96.
 27. Krams M. Neuroendokrines System. In: Krams M, Frahm, S. O., Kellner, U., Mawrin, C. Kurzlehrbuch Pathologie. 2. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2013. S. 500-5.
 28. Cibas ES, Ali SZ. The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. Thyroid : official journal of the American Thyroid Association. 2017;27(11):1341-6.
 29. Führer D, Bockisch A, Schmid KW. Euthyreote Struma mit und ohne Knoten – Diagnostik und Therapie. 2012;109(29-30):506-16.
 30. Heufelder AE, Hofbauer LC. Die Thyreoiditiden: Aktueller Stand der Pathogenese, Diagnostik und Therapie. Dt. Ärzteblatt. 1998;95(9):466-476.
 31. Frilling A, Weber F. Schilddrüsenkarzinom. In: Allgemein- und Viszeralchirurgie up2date. 2007: Thieme. S. 73-88.
 32. Tacaliti A, Silvetti F, Palmonella G, Boscaro M. Anaplastic thyroid carcinoma. Frontiers in endocrinology. 2012;3:84.
 33. Nguyen QT, Lee EJ, Huang MG, Park YI, Khullar A, Plodkowski RA. Diagnosis and treatment of patients with thyroid cancer. Am Health Drug Benefits. 2015;8(1):30-40.
 34. La Vecchia C, Malvezzi M, Bosetti C, Garavello W, Bertuccio P, Levi F, et al. Thyroid cancer mortality and incidence: a global overview. International journal of cancer Journal international du cancer. 2015;136(9):2187-95.
 35. Schmid KW. Pathogenese, Klassifikation und Histologie von Schilddrüsenkarzinomen. Der Onkologe. 2010;16(7):644-56.
 36. Bychkov A, Jung CK. Aberrant expression of CD20 in thyroid cancer and its clinicopathologic significance. Human pathology. 2018;71:74-83.
 37. Wei S. Poorly differentiated thyroid carcinoma: PathologyOutlines.com website; 2017, unter: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/thyroidinsular.html> (abgerufen am: 03.02.2019).
 38. Hong AR, Lim JA, Kim TH, Choi HS, Yoo WS, Min HS, et al. The Frequency and Clinical Implications of the BRAF(V600E) Mutation in Papillary Thyroid Cancer

Patients in Korea Over the Past Two Decades. *Endocrinology and metabolism* (Seoul, Korea). 2014;29(4):505-13.

39. Kim HJ, Park HK, Byun DW, Suh K, Yoo MH, Min YK, et al. Iodine intake as a risk factor for BRAF mutations in papillary thyroid cancer patients from an iodine-replete area. *European journal of nutrition*. 2018;57(2):809-15.

40. Girardi FM, Barra MB, Zettler CG. Analysis of pattern of occurrence of thyroid carcinoma between 2001 and 2010. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2015;81(5):541-8.

41. LiVolsi VA, Albores-Saavedra J, Asa SL, et. al. Papillary Carcinoma. In: DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C. *World Health Organization. Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs*. Lyon: IARC Press; 2004. S. 58-59.

42. LiVolsi VA. Papillary carcinoma tall cell variant (TCV): a review. *Endocrine pathology*. 2010;21(1):12-5.

43. Villar-Taibo R, Peteiro-Gonzalez D, Cabezas-Agricola JM, Aliyev E, Barreiro-Morandeira F, Ruiz-Ponte C, et al. Aggressiveness of the tall cell variant of papillary thyroid carcinoma is independent of the tumor size and patient age. *Oncology letters*. 2017;13(5):3501-7.

44. Ito Y, Hirokawa M, Fukushima M, Inoue H, Yabuta T, Uruno T, et al. Prevalence and prognostic significance of poor differentiation and tall cell variant in papillary carcinoma in Japan. *World journal of surgery*. 2008;32(7):1535-43; discussion 44-5.

45. Bocklage T, DiTomasso JP, Ramzy I, Ostrowski ML. Tall cell variant of papillary thyroid carcinoma: cytologic features and differential diagnostic considerations. *Diagnostic cytopathology*. 1997;17(1):25-9.

46. Islam S. Papillary carcinoma - tall cell variant: PathologyOutlines.com website; 2009, unter: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/thyroidtallcellvariant.html> (abgerufen am: 03.02.2019).

47. Michels JJ, Jacques M, Henry-Amar M, Bardet S. Prevalence and prognostic significance of tall cell variant of papillary thyroid carcinoma. *Human pathology*. 2007;38(2):212-9.

48. Walts AE, Mirocha JM, Bose S. Follicular variant of papillary thyroid carcinoma (FVPTC): histological features, BRAF V600E mutation, and lymph node status. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2015;141(10):1749-56.

49. Islam S. Papillary carcinoma - follicular variant: PathologyOutlines.com website; 2009, unter: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/thyroidfollicularvariant.html> (abgerufen am: 03.02.2019).

-
50. Park JY, Kim WY, Hwang TS, Lee SS, Kim H, Han HS, et al. BRAF and RAS mutations in follicular variants of papillary thyroid carcinoma. *Endocrine pathology*. 2013;24(2):69-76.
51. Liu J, Singh B, Tallini G, Carlson DL, Katabi N, Shaha A, et al. Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a clinicopathologic study of a problematic entity. *Cancer*. 2006;107(6):1255-64.
52. Nikiforov YE, Seethala RR, Tallini G, Baloch ZW, Basolo F, Thompson LD, et al. Nomenclature Revision for Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: A Paradigm Shift to Reduce Overtreatment of Indolent Tumors. *JAMA oncology*. 2016;2(8):1023-9.
53. Bychkov A. World Health Organization (WHO) classification: PathologyOutlines.com website; 2017, unter: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/thyroidwho.html> (abgerufen am: 03.02.2019).
54. Thompson LD. Ninety-four cases of encapsulated follicular variant of papillary thyroid carcinoma: A name change to Noninvasive Follicular Thyroid Neoplasm with Papillary-like Nuclear Features would help prevent overtreatment. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2016;29(7):698-707.
55. Jug R, Poller, D., Jiang, X. Noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features (NIFTP): PathologyOutlines.com website; 2018, unter: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/thyroidglandNIFTP.html> (abgerufen am: 13.02.2019).
56. Dideban S, Abdollahi A, Meysamie A, Sedghi S, Shahriari M. Thyroid Papillary Microcarcinoma: Etiology, Clinical Manifestations, Diagnosis, Follow-up, Histopathology and Prognosis. *Iran J Pathol*. 2016;11(1):1-19.
57. Fugazzola L, Puxeddu E, Avenia N, Romei C, Cirello V, Cavaliere A, et al. Correlation between B-RAFV600E mutation and clinico-pathologic parameters in papillary thyroid carcinoma: data from a multicentric Italian study and review of the literature. *Endocrine-related cancer*. 2006;13(2):455-64.
58. Nakazawa T, Kondo T, Tahara I, Kasai K, Inoue T, Oishi N, et al. Multicentric occurrence of multiple papillary thyroid carcinomas--HUMARA and BRAF mutation analysis. *Cancer medicine*. 2015;4(8):1272-80.
59. Park SY, Park YJ, Lee YJ, Lee HS, Choi SH, Choe G, et al. Analysis of differential BRAF(V600E) mutational status in multifocal papillary thyroid carcinoma:

-
- evidence of independent clonal origin in distinct tumor foci. *Cancer*. 2006;107(8):1831-8.
60. Xu XC, el-Naggar AK, Lotan R. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. *Am J Pathol*. 1995;147(3):815-22.
61. Niedziela M, Maceluch J, Korman E. Galectin-3 is not an universal marker of malignancy in thyroid nodular disease in children and adolescents. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002;87(9):4411-5.
62. Fernandez PL, Merino MJ, Gomez M, Campo E, Medina T, Castronovo V, et al. Galectin-3 and laminin expression in neoplastic and non-neoplastic thyroid tissue. *The Journal of pathology*. 1997;181(1):80-6.
63. Paron I, Scaloni A, Pines A, Bachi A, Liu FT, Puppini C, et al. Nuclear localization of Galectin-3 in transformed thyroid cells: a role in transcriptional regulation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;302(3):545-53.
64. Islam S. Papillary carcinoma - general: PathologyOutlines.com website; 2009 [updated March 2009, unter: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/thyroidpapillary.html> (abgerufen am: 03.02.2019).
65. Thomas C. *Histopathologie*. 14. Auflage. Stuttgart: Schattauer; 2006. S. 272-274.
66. Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW, 2nd, Tallini G, et al. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(5):2318-26.
67. Wei S. Medullary carcinoma: PathologyOutlines.com website; 2018, unter: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/thyroidmedullary.html> (abgerufen am: 03.02.2019).
68. Volante M, Rapa I, Gandhi M, Bussolati G, Giachino D, Papotti M, et al. RAS mutations are the predominant molecular alteration in poorly differentiated thyroid carcinomas and bear prognostic impact. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(12):4735-41.
69. Siewert J, Rothmund, M., Schumpelick, V. *Praxis der Viszeralchirurgie*. Berlin: Springer; 2013. S. 144-145.

-
70. Wei S. Anaplastic carcinoma: PathologyOutlines.com website; 2018, unter: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/thyroidUndiff.html> (abgerufen am: 03.02.2019).
71. Fuhrer D, Schmid KW. [Benign thyroid nodule or thyroid cancer?]. Benigner Schilddrüsenknoten oder Schilddrüsenmalignom? Internist (Berl). 2010;51(5):611-9.
72. Griffeth LK. Use of PET/CT scanning in cancer patients: technical and practical considerations. Proc (Bayl Univ Med Cent). 2005;18(4):321-30.
73. (DGAV) DGfA-uV. S2k Leitlinie "Operative Therapie maligner Schilddrüsenerkrankungen"; 2012, unter: https://www.dgav.de/fileadmin/media/texte_pdf/caek/Leitlinie_Maligne_Schilddruesen_erkrankungen_Operative_Therapie_2012-11.pdf (abgerufen am: 21.02.2019).
74. Inci MF, Ozkan F, Yuksel M, Salk I, Sahin M. The effects of sonographic and demographic features and needle size on obtaining adequate cytological material in sonography-guided fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. Endocrine. 2013;43(2):424-9.
75. Paschke R, Cantara S, Crescenzi A, Jarzab B, Musholt TJ, Sobrinho Simoes M. European Thyroid Association Guidelines regarding Thyroid Nodule Molecular Fine-Needle Aspiration Cytology Diagnostics. European thyroid journal. 2017;6(3):115-29.
76. Tangpricha V, Chen BJ, Swan NC, Sweeney AT, de las Morenas A, Safer JD. Twenty-one-gauge needles provide more cellular samples than twenty-five-gauge needles in fine-needle aspiration biopsy of the thyroid but may not provide increased diagnostic accuracy. Thyroid : official journal of the American Thyroid Association. 2001;11(10):973-6.
77. Feldkamp J, Fuhrer D, Luster M, Musholt TJ, Spitzweg C, Schott M. Feinnadelpunktion in der Abklärung von Schilddrüsenknoten. 2016;113(20):353-9.
78. Layfield LJ, Cibas ES, Gharib H, Mandel SJ. Thyroid aspiration cytology: current status. CA Cancer J Clin. 2009;59(2):99-110.
79. Naim C, Karam R, Edde D. Ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy of the thyroid: methods to decrease the rate of unsatisfactory biopsies in the absence of an on-site pathologist. Canadian Association of Radiologists journal = Journal l'Association canadienne des radiologistes. 2013;64(3):220-5.
80. Chow LS, Gharib H, Goellner JR, van Heerden JA. Nondiagnostic thyroid fine-needle aspiration cytology: management dilemmas. Thyroid : official journal of the American Thyroid Association. 2001;11(12):1147-51.

-
81. Hall TL, Layfield LJ, Philippe A, Rosenthal DL. Sources of diagnostic error in fine needle aspiration of the thyroid. *Cancer*. 1989;63(4):718-25.
 82. Raab SS, Vrbin CM, Grzybicki DM, Sudilovsky D, Balassanian R, Zarbo RJ, et al. Errors in thyroid gland fine-needle aspiration. *American journal of clinical pathology*. 2006;125(6):873-82.
 83. Eszlinger M, Piana S, Moll A, Bosenberg E, Bisagni A, Ciarrocchi A, et al. Molecular testing of thyroid fine-needle aspirations improves presurgical diagnosis and supports the histologic identification of minimally invasive follicular thyroid carcinomas. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2015;25(4):401-9.
 84. Alexander EK. Approach to the patient with a cytologically indeterminate thyroid nodule. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008;93(11):4175-82.
 85. Baloch ZW, LiVolsi VA, Asa SL, Rosai J, Merino MJ, Randolph G, et al. Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid lesions: a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference. *Diagnostic cytopathology*. 2008;36(6):425-37.
 86. Poller DN, Glaysher S. Molecular pathology and thyroid FNA. *Cytopathology : official journal of the British Society for Clinical Cytology*. 2017;28(6):475-81.
 87. Howell GM, Hodak SP, Yip L. RAS mutations in thyroid cancer. *The oncologist*. 2013;18(8):926-32.
 88. Namba H, Rubin SA, Fagin JA. Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 1990;4(10):1474-9.
 89. Esapa CT, Johnson SJ, Kendall-Taylor P, Lennard TW, Harris PE. Prevalence of Ras mutations in thyroid neoplasia. *Clinical endocrinology*. 1999;50(4):529-35.
 90. Motoi N, Sakamoto A, Yamochi T, Horiuchi H, Motoi T, Machinami R. Role of ras mutation in the progression of thyroid carcinoma of follicular epithelial origin. *Pathology, research and practice*. 2000;196(1):1-7.
 91. Baloch ZW, Seethala RR, Faquin WC, Papotti MG, Basolo F, Fadda G, et al. Noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features (NIFTP): A changing paradigm in thyroid surgical pathology and implications for thyroid cytopathology. *Cancer cytopathology*. 2016;124(9):616-20.
 92. Zebisch A, Troppmair J. Back to the roots: the remarkable RAF oncogene story. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2006;63(11):1314-30.
 93. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev*. 1999;13(22):2905-27.

-
94. Xing M. Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2010;20(7):697-706.
 95. Armstrong MJ, Yang H, Yip L, Ohori NP, McCoy KL, Stang MT, et al. PAX8/PPARgamma rearrangement in thyroid nodules predicts follicular-pattern carcinomas, in particular the encapsulated follicular variant of papillary carcinoma. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2014;24(9):1369-74.
 96. Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, et al. PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science (New York, N Y)*. 2000;289(5483):1357-60.
 97. Placzkowski KA, Reddi HV, Grebe SK, Eberhardt NL, McIver B. The Role of the PAX8/PPARgamma Fusion Oncogene in Thyroid Cancer. *PPAR Res*. 2008;2008:672829.
 98. D'Cruz AK, Vaish R, Vaidya A, Nixon IJ, Williams MD, Vander Poorten V, et al. Molecular markers in well-differentiated thyroid cancer. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*. 2018;275(6):1375-84.
 99. Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F, Pachnis V. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature*. 1994;367(6461):380-3.
 100. Durbec PL, Larsson-Blomberg LB, Schuchardt A, Costantini F, Pachnis V. Common origin and developmental dependence on c-ret of subsets of enteric and sympathetic neuroblasts. *Development (Cambridge, England)*. 1996;122(1):349-58.
 101. Xing M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nature reviews Cancer*. 2013;13(3):184-99.
 102. Melillo RM, Castellone MD, Guarino V, De Falco V, Cirafici AM, Salvatore G, et al. The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(4):1068-81.
 103. Knauf JA, Kuroda H, Basu S, Fagin JA. RET/PTC-induced dedifferentiation of thyroid cells is mediated through Y1062 signaling through SHC-RAS-MAP kinase. *Oncogene*. 2003;22(28):4406-12.

-
104. Jhiang SM, Sagartz JE, Tong Q, Parker-Thornburg J, Capen CC, Cho JY, et al. Targeted expression of the ret/PTC1 oncogene induces papillary thyroid carcinomas. *Endocrinology*. 1996;137(1):375-8.
105. Bychkov A. Practical molecular pathology: PathologyOutlines.com website; 2016, unter: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/thyroidcancerpracticalmolecpath.html> (abgerufen am: 20.02.2019).
106. Sadetzki S, Calderon-Margalit R, Modan B, Srivastava S, Tuttle RM. Ret/PTC activation in benign and malignant thyroid tumors arising in a population exposed to low-dose external-beam irradiation in childhood. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(5):2281-9.
107. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *The Biochemical journal*. 2000;351 Pt 2:289-305.
108. Nishida Y, Inoue YH, Tsuda L, Adachi-Yamada T, Lim YM, Hata M, et al. The Raf/MAP kinase cascade in cell cycle regulation and differentiation in *Drosophila*. *Cell Struct Funct*. 1996;21(5):437-44.
109. Marais R, Light Y, Paterson HF, Mason CS, Marshall CJ. Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(7):4378-83.
110. DeLuca AM, Srinivas A, Alani RM. BRAF kinase in melanoma development and progression. *Expert reviews in molecular medicine*. 2008;10:e6.
111. Ciampi R, Nikiforov YE. Alterations of the BRAF gene in thyroid tumors. *Endocrine pathology*. 2005;16(3):163-72.
112. Nikiforova MN, Nikiforov YE. Molecular diagnostics and predictors in thyroid cancer. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2009;19(12):1351-61.
113. Trovisco V, Vieira de Castro I, Soares P, Maximo V, Silva P, Magalhaes J, et al. BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. *The Journal of pathology*. 2004;202(2):247-51.
114. Kuhn E, Ragazzi M, Zini M, Giordano D, Nicoli D, Piana S. Critical Pitfalls in the use of BRAF Mutation as a Diagnostic Tool in Thyroid Nodules: a Case Report. *Endocrine pathology*. 2016;27(3):220-3.
115. Uribe P, Wistuba II, Gonzalez S. BRAF mutation: a frequent event in benign, atypical, and malignant melanocytic lesions of the skin. *The American Journal of dermatopathology*. 2003;25(5):365-70.

-
116. Poynter JN, Elder JT, Fullen DR, Nair RP, Soengas MS, Johnson TM, et al. BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. *Melanoma research*. 2006;16(4):267-73.
117. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature*. 2002;418(6901):934.
118. Singer G, Oldt R, 3rd, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman RJ, et al. Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003;95(6):484-6.
119. Musholt TJ, Fottner C, Weber MM, Eichhorn W, Pohlenz J, Musholt PB, et al. Detection of papillary thyroid carcinoma by analysis of BRAF and RET/PTC1 mutations in fine-needle aspiration biopsies of thyroid nodules. *World journal of surgery*. 2010;34(11):2595-603.
120. Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Gerrero R, et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer research*. 2002;62(23):6997-7000.
121. Rollins BJ. Genomic Alterations in Langerhans Cell Histiocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2015;29(5):839-51.
122. Musholt PB, Musholt TJ, Morgenstern SC, Worm K, Sheu SY, Schmid KW. Follicular histotypes of oncocytic thyroid carcinomas do not carry mutations of the BRAF hot-spot. *World journal of surgery*. 2008;32(5):722-8.
123. Sapio MR, Posca D, Troncone G, Pettinato G, Palombini L, Rossi G, et al. Detection of BRAF mutation in thyroid papillary carcinomas by mutant allele-specific PCR amplification (MASA). *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2006;154(2):341-8.
124. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer research*. 2003;63(7):1454-7.
125. Cameselle-Teijeiro J, Abdulkader I, Perez-Becerra R, Vazquez-Boquete A, Alberte-Lista L, Ruiz-Ponte C, et al. BRAF mutation in solid cell nest hyperplasia associated with papillary thyroid carcinoma. A precursor lesion? *Human pathology*. 2009;40(7):1029-35.
126. Chung KW, Yang SK, Lee GK, Kim EY, Kwon S, Lee SH, et al. Detection of BRAFV600E mutation on fine needle aspiration specimens of thyroid nodule refines

cyto-pathology diagnosis, especially in BRAF600E mutation-prevalent area. *Clinical endocrinology*. 2006;65(5):660-6.

127. Lee JH, Lee ES, Kim YS. Clinicopathologic significance of BRAF V600E mutation in papillary carcinomas of the thyroid: a meta-analysis. *Cancer*. 2007;110(1):38-46.

128. Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE. Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *American journal of clinical pathology*. 2003;120(1):71-7.

129. McFadden DG, Dias-Santagata D, Sadow PM, Lynch KD, Lubitz C, Donovan SE, et al. Identification of oncogenic mutations and gene fusions in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(11):E2457-62.

130. Kim M, Jeon MJ, Oh HS, Park S, Kim TY, Shong YK, et al. BRAF and RAS Mutational Status in Noninvasive Follicular Thyroid Neoplasm with Papillary-Like Nuclear Features and Invasive Subtype of Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma in Korea. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2018;28(4):504-10.

131. Howitt BE, Paulson VA, Barletta JA. Absence of BRAF V600E in non-infiltrative, non-invasive follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Histopathology*. 2015;67(4):579-82.

132. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Feijao T, Rebocho AP, Fonseca E, et al. BRAF mutations typical of papillary thyroid carcinoma are more frequently detected in undifferentiated than in insular and insular-like poorly differentiated carcinomas. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2004;444(6):572-6.

133. Macerola E, Torregrossa L, Ugolini C, Bakkar S, Vitti P, Fadda G, et al. BRAF(K601E) Mutation in a Follicular Thyroid Adenoma: A Case Report. *International journal of surgical pathology*. 2017;25(4):348-51.

134. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene*. 2003;22(29):4578-80.

135. Ugolini C, Giannini R, Lupi C, Salvatore G, Miccoli P, Proietti A, et al. Presence of BRAF V600E in very early stages of papillary thyroid carcinoma. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2007;17(5):381-8.

-
136. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocrine reviews*. 2007;28(7):742-62.
137. Virk RK, Van Dyke AL, Finkelstein A, Prasad A, Gibson J, Hui P, et al. BRAFV600E mutation in papillary thyroid microcarcinoma: a genotype-phenotype correlation. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2013;26(1):62-70.
138. Guan H, Ji M, Bao R, Yu H, Wang Y, Hou P, et al. Association of high iodine intake with the T1799A BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(5):1612-7.
139. Vuong HG, Kondo T, Oishi N, Nakazawa T, Mochizuki K, Inoue T, et al. Genetic alterations of differentiated thyroid carcinoma in iodine-rich and iodine-deficient countries. *Cancer medicine*. 2016;5(8):1883-9.
140. Shi RL, Qu N, Liao T, Wei WJ, Lu ZW, Ma B, et al. Relationship of body mass index with BRAF (V600E) mutation in papillary thyroid cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2016;37(6):8383-90.
141. Li Q, Yuan J, Wang Y, Zhai Y. Association between the BRAF V600E mutation and ultrasound features of the thyroid in thyroid papillary carcinoma. *Oncology letters*. 2017;14(2):1439-44.
142. Park AY, Son EJ, Kim JA, Youk JH, Park YJ, Park CS, et al. Associations of the BRAF(V600E) mutation with sonographic features and clinicopathologic characteristics in a large population with conventional papillary thyroid carcinoma. *PloS one*. 2014;9(10):e110868.
143. Hwang J, Shin JH, Han BK, Ko EY, Kang SS, Kim JW, et al. Papillary thyroid carcinoma with BRAFV600E mutation: sonographic prediction. *AJR American journal of roentgenology*. 2010;194(5):W425-30.
144. Hahn SY, Kim TH, Ki CS, Kim SW, Ahn S, Shin JH, et al. Ultrasound and clinicopathological features of papillary thyroid carcinomas with BRAF and TERT promoter mutations. *Oncotarget*. 2017;8(65):108946-57.
145. Zhang Q, Liu BJ, Ren WW, He YP, Li XL, Zhao CK, et al. Association between BRAF V600E Mutation and Ultrasound Features in Papillary Thyroid Carcinoma Patients with and without Hashimoto's Thyroiditis. *Scientific reports*. 2017;7(1):4899.
146. Kwon HJ, Kim EK, Kwak JY. Cytomorphologic features in thyroid nodules read as "suspicious for malignancy" on cytology may predict thyroid cancers with the BRAF mutation. *Pathology, research and practice*. 2015;211(9):671-6.

-
147. Rossi ED, Bizzarro T, Martini M, Capodimonti S, Cenci T, Fadda G, et al. Morphological features that can predict BRAF(V600E) -mutated carcinoma in paediatric thyroid cytology. *Cytopathology : official journal of the British Society for Clinical Cytology*. 2017;28(1):55-64.
148. Mungan S, Ersoz S, Saygin I, Sagnak Z, Cobanoglu U. Nuclear morphometric findings in undetermined cytology: A possible clue for prediction of BRAF mutation in papillary thyroid carcinomas. *Endocrine research*. 2017;42(2):138-44.
149. Abrosimov A, Saenko V, Rogounovitch T, Namba H, Lushnikov E, Mitsutake N, et al. Different structural components of conventional papillary thyroid carcinoma display mostly identical BRAF status. *International journal of cancer*. 2007;120(1):196-200.
150. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science (New York, NY)*. 1976;194(4260):23-8.
151. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
152. Finkel A, Liba L, Simon E, Bick T, Prinz E, Sabo E, et al. Subclonality for BRAF Mutation in Papillary Thyroid Carcinoma Is Associated With Earlier Disease Stage. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2016;101(4):1407-13.
153. Guerra A, Sapio MR, Marotta V, Campanile E, Rossi S, Forno I, et al. The primary occurrence of BRAF(V600E) is a rare clonal event in papillary thyroid carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(2):517-24.
154. Kimbrell HZ, Sholl AB, Ratnayaka S, Japa S, Lacey M, Carpio G, et al. BRAF Testing in Multifocal Papillary Thyroid Carcinoma. *BioMed research international*. 2015;2015:486391.
155. Pizzolanti G, Russo L, Richiusa P, Bronte V, Nuara RB, Rodolico V, et al. Fine-needle aspiration molecular analysis for the diagnosis of papillary thyroid carcinoma through BRAF V600E mutation and RET/PTC rearrangement. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2007;17(11):1109-15.
156. Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nature reviews Endocrinology*. 2011;7(10):569-80.
157. Zou M, Baitei EY, Alzahrani AS, BinHumaid FS, Alkhafaji D, Al-Rijjal RA, et al. Concomitant RAS, RET/PTC, or BRAF mutations in advanced stage of papillary thyroid carcinoma. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2014;24(8):1256-66.

-
158. Henderson YC, Shellenberger TD, Williams MD, El-Naggar AK, Fredrick MJ, Cieply KM, et al. High rate of BRAF and RET/PTC dual mutations associated with recurrent papillary thyroid carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(2):485-91.
159. Costa AM, Herrero A, Fresno MF, Heymann J, Alvarez JA, Cameselle-Teijeiro J, et al. BRAF mutation associated with other genetic events identifies a subset of aggressive papillary thyroid carcinoma. *Clinical endocrinology*. 2008;68(4):618-34.
160. Liu X, Bishop J, Shan Y, Pai S, Liu D, Murugan AK, et al. Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers. *Endocrine-related cancer*. 2013;20(4):603-10.
161. Moon S, Song YS, Kim YA, Lim JA, Cho SW, Moon JH, et al. Effects of Coexistent BRAF(V600E) and TERT Promoter Mutations on Poor Clinical Outcomes in Papillary Thyroid Cancer: A Meta-Analysis. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2017;27(5):651-60.
162. Liu X, Qu S, Liu R, Sheng C, Shi X, Zhu G, et al. TERT promoter mutations and their association with BRAF V600E mutation and aggressive clinicopathological characteristics of thyroid cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(6):E1130-6.
163. Ren H, Shen Y, Hu D, He W, Zhou J, Cao Y, et al. Co-existence of BRAF(V600E) and TERT promoter mutations in papillary thyroid carcinoma is associated with tumor aggressiveness, but not with lymph node metastasis. *Cancer management and research*. 2018;10:1005-13.
164. Jin L, Chen E, Dong S, Cai Y, Zhang X, Zhou Y, et al. BRAF and TERT promoter mutations in the aggressiveness of papillary thyroid carcinoma: a study of 653 patients. *Oncotarget*. 2016;7(14):18346-55.
165. Bullock M, Ren Y, O'Neill C, Gill A, Aniss A, Sywak M, et al. TERT promoter mutations are a major indicator of recurrence and death due to papillary thyroid carcinomas. *Clinical endocrinology*. 2016;85(2):283-90.
166. Xing M, Liu R, Liu X, Murugan AK, Zhu G, Zeiger MA, et al. BRAF V600E and TERT promoter mutations cooperatively identify the most aggressive papillary thyroid cancer with highest recurrence. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(25):2718-26.
167. Gauchotte G, Philippe C, Lacomme S, Leotard B, Wissler MP, Allou L, et al. BRAF, p53 and SOX2 in anaplastic thyroid carcinoma: evidence for multistep carcinogenesis. *Pathology*. 2011;43(5):447-52.

-
168. Ito T, Seyama T, Mizuno T, Tsuyama N, Hayashi T, Hayashi Y, et al. Unique association of p53 mutations with undifferentiated but not with differentiated carcinomas of the thyroid gland. *Cancer research*. 1992;52(5):1369-71.
169. Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH, Koeffler HP. High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *The Journal of clinical investigation*. 1993;91(1):179-84.
170. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature*. 1991;351(6326):453-6.
171. Soares P, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simoes M. Immunohistochemical detection of p53 in differentiated, poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid. *Histopathology*. 1994;24(3):205-10.
172. Park KY, Koh JM, Kim YI, Park HJ, Gong G, Hong SJ, et al. Prevalences of Gs alpha, ras, p53 mutations and ret/PTC rearrangement in differentiated thyroid tumours in a Korean population. *Clinical endocrinology*. 1998;49(3):317-23.
173. Shin MK, Kim JW, Min SK, Lee DJ, Kim JH, Lee SC, et al. Associations of the BRAF (V600E) mutation and p53 protein expression with clinicopathological features of papillary thyroid carcinomas patients. *Oncology letters*. 2015;10(3):1882-8.
174. Fu QF, Pan PT, Zhou L, Liu XL, Guo F, Wang L, et al. Clinical significance of preoperative detection of serum p53 antibodies and BRAF(V600E) mutation in patients with papillary thyroid carcinoma. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2015;8(11):21327-34.
175. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, et al. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(9):4393-7.
176. Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, Steward DL, Fidler JP, Giordano TJ, et al. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *The American journal of surgical pathology*. 2006;30(2):216-22.
177. Jo YS, Li S, Song JH, Kwon KH, Lee JC, Rha SY, et al. Influence of the BRAF V600E mutation on expression of vascular endothelial growth factor in papillary thyroid cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(9):3667-70.
178. Kebebew E, Weng J, Bauer J, Ranvier G, Clark OH, Duh QY, et al. The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Annals of surgery*. 2007;246(3):466-70; discussion 70-1.

-
179. Rossi ED, Martini M, Capodimonti S, Lombardi CP, Pontecorvi A, Vellone VG, et al. BRAF (V600E) mutation analysis on liquid-based cytology-processed aspiration biopsies predicts bilaterality and lymph node involvement in papillary thyroid microcarcinoma. *Cancer cytopathology*. 2013;121(6):291-7.
180. Wang Z, Chen JQ, Liu JL, Qin XG. Clinical impact of BRAF mutation on the diagnosis and prognosis of papillary thyroid carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *European journal of clinical investigation*. 2016;46(2):146-57.
181. Guerra A, Fugazzola L, Marotta V, Cirillo M, Rossi S, Cirello V, et al. A high percentage of BRAFV600E alleles in papillary thyroid carcinoma predicts a poorer outcome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(7):2333-40.
182. Cheng SP, Hsu YC, Liu CL, Liu TP, Chien MN, Wang TY, et al. Significance of allelic percentage of BRAF c.1799T > A (V600E) mutation in papillary thyroid carcinoma. *Annals of surgical oncology*. 2014;21 Suppl 4:S619-26.
183. Kim MH, Bae JS, Lim DJ, Lee H, Jeon SR, Park GS, et al. Quantification of BRAF V600E alleles predicts papillary thyroid cancer progression. *Endocrine-related cancer*. 2014;21(6):891-902.
184. Ahn HY, Chung YJ, Kim BS, Kang KH, Seok JW, Kim HS, et al. Clinical significance of the BRAF V600E mutation in multifocal papillary thyroid carcinoma in Korea. *Surgery*. 2014;155(4):689-95.
185. Fraser S, Go C, Aniss A, Sidhu S, Delbridge L, Learoyd D, et al. BRAF(V600E) Mutation is Associated with Decreased Disease-Free Survival in Papillary Thyroid Cancer. *World journal of surgery*. 2016;40(7):1618-24.
186. Zarkesh M, Zadeh-Vakili A, Azizi F, Fanaei SA, Foroughi F, Hedayati M. The Association of BRAF V600E Mutation With Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 Expression and Clinicopathological Features in Papillary Thyroid Cancer. *International journal of endocrinology and metabolism*. 2018;16(2):e56120.
187. Musholt TJ, Schonefeld S, Schwarz CH, Watzka FM, Musholt PB, Fottner C, et al. Impact of pathognomonic genetic alterations on the prognosis of papillary thyroid carcinoma. ESES vienna presentation. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie*. 2010;395(7):877-83.
188. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Viola D, Elisei R, Bendlova B, et al. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *Jama*. 2013;309(14):1493-501.
189. He G, Zhao B, Zhang X, Gong R. Prognostic value of the BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma. *Oncology letters*. 2014;7(2):439-43.

-
190. Kim SJ, Myong JP, Jee HG, Chai YJ, Choi JY, Min HS, et al. Combined effect of Hashimoto's thyroiditis and BRAF(V600E) mutation status on aggressiveness in papillary thyroid cancer. *Head & neck*. 2016;38(1):95-101.
 191. Zeng RC, Jin LP, Chen ED, Dong SY, Cai YF, Huang GL, et al. Potential relationship between Hashimoto's thyroiditis and BRAF(V600E) mutation status in papillary thyroid cancer. *Head & neck*. 2016;38 Suppl 1:E1019-25.
 192. Kwak HY, Chae BJ, Eom YH, Hong YR, Seo JB, Lee SH, et al. Does papillary thyroid carcinoma have a better prognosis with or without Hashimoto thyroiditis? *International journal of clinical oncology*. 2015;20(3):463-73.
 193. Han SA, Park WS, Jang JH, Min SY, Ryu JK, Song JY. BRAF mutation may predict higher necessity of postoperative radioactive iodine ablation in papillary thyroid cancer. *Annals of surgical treatment and research*. 2014;87(4):174-9.
 194. Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, Rivera M, Heguy A, Ladanyi M, et al. Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. *Cancer research*. 2009;69(11):4885-93.
 195. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97.
 196. Nikiforova MN, Tseng GC, Steward D, Diorio D, Nikiforov YE. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008;93(5):1600-8.
 197. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(4):259-69.
 198. Schwertheim S, Sheu SY, Worm K, Grabellus F, Schmid KW. Analysis of deregulated miRNAs is helpful to distinguish poorly differentiated thyroid carcinoma from papillary thyroid carcinoma. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2009;41(6):475-81.
 199. Forte S, La Rosa C, Pecce V, Rosignolo F, Memeo L. The role of microRNAs in thyroid carcinomas. *Anticancer research*. 2015;35(4):2037-47.
 200. Huang Y, Liao D, Pan L, Ye R, Li X, Wang S, et al. Expressions of miRNAs in papillary thyroid carcinoma and their associations with the BRAFV600E mutation. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2013;168(5):675-81.
 201. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with

Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* : official journal of the American Thyroid Association. 2016;26(1):1-133.

202. Ward LS, Kloos RT. Molecular markers in the diagnosis of thyroid nodules. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2013;57(2):89-97.

203. Nishino M. Molecular cytopathology for thyroid nodules: A review of methodology and test performance. *Cancer cytopathology*. 2016;124(1):14-27.

204. Moon HJ, Kim E-K, Chung WY, Shin DY, Kwak JY. BRAF mutation in fine-needle aspiration specimens as a potential predictor for persistence/recurrence in patients with classical papillary thyroid carcinoma larger than 10 mm at a BRAF mutation prevalent area. *Head & neck*. 2015;37(10):1432-8.

205. Oh HS, Kwon H, Park S, Kim M, Jeon MJ, Kim TY, et al. Comparison of Immunohistochemistry and Direct Sanger Sequencing for Detection of the BRAF(V600E) Mutation in Thyroid Neoplasm. *Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)*. 2018;33(1):62-9.

206. Le Mercier M, D'Haene N, De Neve N, Blanchard O, Degand C, Rorive S, et al. Next-generation sequencing improves the diagnosis of thyroid FNA specimens with indeterminate cytology. *Histopathology*. 2015;66(2):215-24.

207. Pagan M, Kloos RT, Lin CF, Travers KJ, Matsuzaki H, Tom EY, et al. The diagnostic application of RNA sequencing in patients with thyroid cancer: an analysis of 851 variants and 133 fusions in 524 genes. *BMC bioinformatics*. 2016;17 Suppl 1:6.

208. Eszlinger M, Hegedus L, Paschke R. Ruling in or ruling out thyroid malignancy by molecular diagnostics of thyroid nodules. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2014;28(4):545-57.

209. Rehfeld C, Munz S, Krogdahl A, Jensen EM, Siebolts U, Ferraz C, et al. Impact of different methodologies on the detection of point mutations in routine air-dried fine needle aspiration (FNA) smears. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2013;45(7):513-7.

210. Wobker SE, Kim LT, Hackman TG, Dodd LG. Use of BRAF v600e immunocytochemistry on FNA direct smears of papillary thyroid carcinoma. *Cancer cytopathology*. 2015;123(9):531-9.

211. Nikiforov YE, Ohori NP, Hodak SP, Carty SE, LeBeau SO, Ferris RL, et al. Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 FNA samples. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(11):3390-7.

-
212. Troncone G, Cozzolino I, Fedele M, Malapelle U, Palombini L. Preparation of thyroid FNA material for routine cytology and BRAF testing: a validation study. *Diagnostic cytopathology*. 2010;38(3):172-6.
213. Nikiforova MN, Nikiforov Y. E. Thyroid Cancer. In: Leonard DGB. *Molecular Pathology in Clinical Practice*. 2. Auflage. Springer; 2016. S. 481.
214. Pusztaszeri MP, Krane JF, Faquin WC. BRAF testing and thyroid FNA. *Cancer cytopathology*. 2015;123(12):689-95.
215. Nikiforova MN, Wald AI, Roy S, Durso MB, Nikiforov YE. Targeted next-generation sequencing panel (ThyroSeq) for detection of mutations in thyroid cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(11):E1852-60.
216. Meldrum C, Doyle MA, Tothill RW. Next-generation sequencing for cancer diagnostics: a practical perspective. *Clin Biochem Rev*. 2011;32(4):177-95.
217. Nikiforov YE, Carty SE, Chiosea SI, Coyne C, Duvvuri U, Ferris RL, et al. Impact of the Multi-Gene ThyroSeq Next-Generation Sequencing Assay on Cancer Diagnosis in Thyroid Nodules with Atypia of Undetermined Significance/Follicular Lesion of Undetermined Significance Cytology. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2015;25(11):1217-23.
218. Efremidou EI, Papageorgiou MS, Liratzopoulos N, Manolas KJ. The efficacy and safety of total thyroidectomy in the management of benign thyroid disease: a review of 932 cases. *Can J Surg*. 2009;52(1):39-44.
219. Christensen SB, Ljungberg O, Tibblin S. Surgical treatment of thyroid carcinoma in a defined population: 1960 to 1977. Evaluation of the results after a conservative surgical approach. *American journal of surgery*. 1983;146(3):349-54.
220. Yip L, Stang MT, Carty SE. Thyroid carcinoma: the surgeon's perspective. *Radiol Clin North Am*. 2011;49(3):463-71, vi.
221. Durante C, Grani G, Lamartina L, Filetti S, Mandel SJ, Cooper DS. The Diagnosis and Management of Thyroid Nodules: A Review. *Jama*. 2018;319(9):914-24.
222. Haugen BR, Woodmansee WW, McDermott MT. Towards improving the utility of fine-needle aspiration biopsy for the diagnosis of thyroid tumours. *Clinical endocrinology*. 2002;56(3):281-90.
223. Wu HH-J, Jones JN, Osman J. Fine-needle aspiration cytology of the thyroid: ten years experience in a community teaching hospital. *Diagnostic cytopathology*. 2006;34(2):93-6.

-
224. Yang J, Schnadig V, Logrono R, Wasserman PG. Fine-needle aspiration of thyroid nodules: a study of 4703 patients with histologic and clinical correlations. *Cancer*. 2007;111(5):306-15.
225. Lee SR, Jung CK, Kim TE, Bae JS, Jung SL, Choi YJ, et al. Molecular genotyping of follicular variant of papillary thyroid carcinoma correlates with diagnostic category of fine-needle aspiration cytology: values of RAS mutation testing. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association*. 2013;23(11):1416-22.
226. Miccoli P. Application of molecular diagnostics to the evaluation of the surgical approach to thyroid cancer. *Current genomics*. 2014;15(3):184-9.
227. Yip L, Farris C, Kabaker AS, Hodak SP, Nikiforova MN, McCoy KL, et al. Cost impact of molecular testing for indeterminate thyroid nodule fine-needle aspiration biopsies. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(6):1905-12.
228. Poller DN, Glaysher S. BRAF V600 co-testing is technically feasible in conventional thyroid fine needle aspiration (FNA) cytology smears and can reduce the need for completion thyroidectomy. *Cytopathology : official journal of the British Society for Clinical Cytology*. 2014;25(3):155-9.
229. Kim SK, Hwang TS, Yoo YB, Han HS, Kim DL, Song KH, et al. Surgical results of thyroid nodules according to a management guideline based on the BRAF(V600E) mutation status. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(3):658-64.
230. Jinih M, Foley N, Osho O, Houlihan L, Toor AA, Khan JZ, et al. BRAF(V600E) mutation as a predictor of thyroid malignancy in indeterminate nodules: A systematic review and meta-analysis. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2017;43(7):1219-27.
231. Fnais N, Soobiah C, Al-Qahtani K, Hamid JS, Perrier L, Straus SE, et al. Diagnostic value of fine needle aspiration BRAF(V600E) mutation analysis in papillary thyroid cancer: a systematic review and meta-analysis. *Human pathology*. 2015;46(10):1443-54.
232. Martinuzzi C, Pastorino L, Andreotti V, Garuti A, Minuto M, Fiocca R, et al. A combination of immunohistochemistry and molecular approaches improves highly sensitive detection of BRAF mutations in papillary thyroid cancer. *Endocrine*. 2016;53(3):672-80.

-
233. Marti JL, Avadhani V, Donatelli LA, Niyogi S, Wang B, Wong RJ, et al. Wide Inter-institutional Variation in Performance of a Molecular Classifier for Indeterminate Thyroid Nodules. *Annals of surgical oncology*. 2015;22(12):3996-4001.
234. Jin L, Sebo TJ, Nakamura N, Qian X, Oliveira A, Majerus JA, et al. BRAF mutation analysis in fine needle aspiration (FNA) cytology of the thyroid. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B*. 2006;15(3):136-43.
235. Hofgartner WT, Tait JF. Frequency of problems during clinical molecular-genetic testing. *American journal of clinical pathology*. 1999;112(1):14-21.
236. Rowe LR, Bentz BG, Bentz JS. Utility of BRAF V600E mutation detection in cytologically indeterminate thyroid nodules. *CytoJournal*. 2006;3:10.
237. Lee KH, Kim HS, Han BK, Ko EY, Ki CS, Shin JH. Incidence and predictive factors of inadequate fine-needle aspirates for BRAF(V600E) mutation analysis in thyroid nodules. *AJR American journal of roentgenology*. 2014;202(2):391-6.
238. DiLorenzo MM, Miller JL, Tuluc M, Wang ZX, Savarese VW, Pribitkin EA. False-positive FNA due to highly sensitive BRAF assay. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. 2014;20(1):e8-10.
239. Rossi ED, Martini M, Capodimonti S, Cenci T, Straccia P, Angrisani B, et al. Analysis of immunocytochemical and molecular BRAF expression in thyroid carcinomas: a cytohistologic institutional experience. *Cancer cytopathology*. 2014;122(7):527-35.
240. Bongiovanni M, Molinari F, Eszlinger M, Paschke R, Barizzi J, Merlo E, et al. Laser capture microdissection is a valuable tool in the preoperative molecular screening of follicular lesions of the thyroid: an institutional experience. *Cytopathology : official journal of the British Society for Clinical Cytology*. 2015;26(5):288-96.
241. Kim J, Giuliano AE, Turner RR, Gaffney RE, Umetani N, Kitago M, et al. Lymphatic mapping establishes the role of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinoma. *Annals of surgery*. 2006;244(5):799-804.
242. Lupi C, Giannini R, Ugolini C, Proietti A, Berti P, Minuto M, et al. Association of BRAF V600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92(11):4085-90.

-
243. Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, et al. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(12):6373-9.
244. Lee ST, Kim SW, Ki CS, Jang JH, Shin JH, Oh YL, et al. Clinical implication of highly sensitive detection of the BRAF V600E mutation in fine-needle aspirations of thyroid nodules: a comparative analysis of three molecular assays in 4585 consecutive cases in a BRAF V600E mutation-prevalent area. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(7):2299-306.
245. Kim SW, Lee JI, Kim JW, Ki CS, Oh YL, Choi YL, et al. BRAFV600E mutation analysis in fine-needle aspiration cytology specimens for evaluation of thyroid nodule: a large series in a BRAFV600E-prevalent population. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(8):3693-700.
246. Kim SY, Kim EK, Kwak JY, Moon HJ, Yoon JH. What to do with thyroid nodules showing benign cytology and BRAF(V600E) mutation? A study based on clinical and radiologic features using a highly sensitive analytic method. *Surgery*. 2015;157(2):354-61.
247. An JH, Song KH, Kim SK, Park KS, Yoo YB, Yang JH, et al. RAS mutations in indeterminate thyroid nodules are predictive of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Clinical endocrinology*. 2015;82(5):760-6.
248. Hwang TS, Kim WY, Han HS, Lim SD, Kim WS, Yoo YB, et al. Preoperative RAS mutational analysis is of great value in predicting follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *BioMed research international*. 2015;2015:697068.
249. Taye A, Gurciullo D, Miles BA, Gupta A, Owen RP, Inabnet WB, 3rd, et al. Clinical performance of a next-generation sequencing assay (ThyroSeq v2) in the evaluation of indeterminate thyroid nodules. *Surgery*. 2018;163(1):97-103.
250. Sapio MR, Guerra A, Posca D, Limone PP, Deandrea M, Motta M, et al. Combined analysis of galectin-3 and BRAFV600E improves the accuracy of fine-needle aspiration biopsy with cytological findings suspicious for papillary thyroid carcinoma. *Endocrine-related cancer*. 2007;14(4):1089-97.
251. Yoon JH, Kim EK, Moon HJ, Kwak JY. Is follow-up BRAF(V600E) mutation analysis helpful in the differential diagnosis of thyroid nodules with negative results on initial analysis? *PloS one*. 2013;8(3):e58592.
252. de Koster EJ, de Geus-Oei LF, Dekkers OM, van Engen-van Grunsven I, Hamming J, Corssmit EPM, et al. Diagnostic Utility of Molecular and Imaging

Biomarkers in Cytological Indeterminate Thyroid Nodules. *Endocrine reviews*. 2018;39(2):154-91.

253. Sciacchitano S, Lavra L, Ulivieri A, Magi F, De Francesco GP, Bellotti C, et al. Comparative analysis of diagnostic performance, feasibility and cost of different test-methods for thyroid nodules with indeterminate cytology. *Oncotarget*. 2017;8(30):49421-42.

254. Erdem E, Gulcelik MA, Kuru B, Alagol H. Comparison of completion thyroidectomy and primary surgery for differentiated thyroid carcinoma. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2003;29(9):747-9.

255. Menegaux F, Turpin G, Dahman M, Leenhardt L, Chadarevian R, Aurengo A, et al. Secondary thyroidectomy in patients with prior thyroid surgery for benign disease: a study of 203 cases. *Surgery*. 1999;126(3):479-83.

256. Reeve TS, Delbridge L, Brady P, Crummer P, Smyth C. Secondary thyroidectomy: a twenty-year experience. *World journal of surgery*. 1988;12(4):449-53.

257. Tan MP, Agarwal G, Reeve TS, Barraclough BH, Delbridge LW. Impact of timing on completion thyroidectomy for thyroid cancer. *The British journal of surgery*. 2002;89(6):802-4.

258. Glockzin G, Hornung M, Kienle K, Thelen K, Boin M, Schreyer AG, et al. Completion thyroidectomy: effect of timing on clinical complications and oncologic outcome in patients with differentiated thyroid cancer. *World journal of surgery*. 2012;36(5):1168-73.

259. Wang TS, Cheung K, Farrokhyar F, Roman SA, Sosa JA. A meta-analysis of the effect of prophylactic central compartment neck dissection on locoregional recurrence rates in patients with papillary thyroid cancer. *Annals of surgical oncology*. 2013;20(11):3477-83.

260. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2009;19(11):1167-214.

261. Holderfield M, Deuker MM, McCormick F, McMahon M. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nature reviews Cancer*. 2014;14(7):455-67.

-
262. Lee WS, Palmer BJ, Garcia A, Chong VE, Liu TH. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: A cost-utility analysis of preoperative testing. *Surgery*. 2014;156(6):1569-77; discussion 77-8.
263. Sponsel RD. Das Bayes'sche Theorem Erlangen: Abteilung Arbeiten zur Definitionslehre, Methodologie, Meßproblematik, Statistik und Wissenschaftstheorie besonders in Psychologie, Psychotherapie und Psychotherapieforschung. Internet Publikation für Allgemeine und Integrative Psychotherapie IP-GIPT; 2002, unter: <http://www.sgipt.org/wisms/statm/bayes-1.htm> (abgerufen am: 20.02.2019).
264. Ke Z, Liu Y, Zhang Y, Li J, Kuang M, Peng S, et al. Diagnostic value and lymph node metastasis prediction of a custommade panel (thyroline) in thyroid cancer. *Oncology reports*. 2018.
265. Heitz, Ph. U., Komminoth, P., Klöppel, G. Schilddrüse. In: Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph. U. Pathologie. 3. Auflage. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2004. S. 385-386.
266. Schünke, Schulte, Schumacher. Prometheus, Kopf, Hals und Neuroanatomie. Thieme, 2015. S. 222. Grafiker: Markus Voll.
267. Führer D, Musholt T, Schmid KW. Molecular Pathogenesis of Thyroid Nodules: Relevance for Clinical Care. *Laryngorhinootologie*. 2017;96(9):590-6.
268. Russ G, Bonnema SJ, Erdogan MF, Durante C, Ngu R, Leenhardt L. European Thyroid Association Guidelines for Ultrasound Malignancy Risk Stratification of Thyroid Nodules in Adults: The EU-TIRADS. *Eur Thyroid J*. 2017 Sep;6(5):225-237.
269. Dong Wook Kim, Eun Joo Lee, Sang Hyo Kim, Tae Hyun Kim, Sang Hyub Lee, Dae Hwan Kim, Myung Ho Rho. Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration Biopsy of Thyroid Nodules: Comparison in Efficacy According to Nodule Size. *Thyroid* 2009 19:1, 27-31.
270. Bomeli SR, LeBeau SO, Ferris RL. Evaluation of a thyroid nodule. *Otolaryngol Clin North Am*. 2010;43:229–38.
271. Guanghui Liu, Na Li, Xuena Li, Song Chen, Bulin Du, and Yaming Li, "Thyroid Remnant Estimation by Diagnostic Dose Scintigrammetry or Scintigraphy after Thyroidectomy: A Comparison with Therapeutic Dose Imaging," *BioMed Research International*, vol. 2016, Article ID 4763824, 5 pages, 2016.
272. Bhatia P, Deniwar A, Mohamed HE, Sholl A, Murad F, Aslam R, Kandil E. Vanishing tumors of thyroid: histological variations after fine needle aspiration. *Gland Surg*. 2016 Jun;5(3):270-7.

-
273. Sharma C, Krishnanand G. Histologic analysis and comparison of techniques in fine needle aspiration-induced alterations in thyroid. *Acta Cytol.* 2008 Jan-Feb;52(1):56-64.
274. Ramachandra L, Kudva R, Rao BH, Agrawal S. A Comparative Study of Fine Needle Aspiration Cytology (FNAC) and Fine Needle Non-aspiration Cytology (FNNAC) Technique in Lesions of Thyroid Gland. *Indian J Surg.* 2011;73(4):287–290.
275. Pinki P, Alok D, Ranjan A, Nanak Chand M. Fine Needle Aspiration Cytology versus Fine Needle Capillary Sampling in Cytological Diagnosis of Thyroid Lesions. *Iran J Pathol.* 2015;10(1):47–53.

8 Danksagung

9 Tabellarischer Lebenslauf