

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

Molekularpathologische Charakterisierung von papillären Schilddrüsenkarzinomen
mit dem Ziel der individualisierten Diagnostik und Therapie

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

Vorgelegt von

Antonia Gabriele Heymans
aus Mainz

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 02.10.2025

Nachnutzungslizenz: CC BY-NC-ND 4.0

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	IX
1 Einleitung	1
1.1 Ziel der Dissertation	1
1.2 Forschungsfragen	2
2 Literaturdiskussion	2
2.1 Anatomie und Histologie der Schilddrüse	2
2.2 Schilddrüsentumoren	3
2.2.1 Klassifikation von Schilddrüsentumoren	3
2.2.2 Adenome.....	3
2.2.3 Tumoren mit unsicherem Malignitätspotential	4
2.2.4 Schilddrüsenkarzinome	4
2.2.5 TNM-Klassifikation	5
2.3 Papilläre Schilddrüsenkarzinome	8
2.3.1 Epidemiologie	8
2.3.2 Klinisch-radiologisches Erscheinungsbild	10
2.3.3 Makroskopie und Histologie	11
2.3.4 Genetisches Profil	16
2.3.5 Prognose.....	19
2.3.6 Therapie.....	19
3 Material und Methoden.....	22
3.1 Geräte und Hersteller	22
3.2 Verbrauchsmaterialien	23
3.3 Reagenzien, Lösungen und Puffer	24
3.4 Kits.....	25
3.5 Software für Labor, Auswertung und Datenverarbeitung	25
3.6 Kollektiv der Studie	26
3.7 Ermittlung des <i>RAS</i> -Mutationsstatus mittels NGS	27
3.7.1 Quantifizierung der DNA des Tumorgewebes	28
3.7.2 Herstellung der DNA-Bibliotheken (Library Preparation).....	28
3.7.3 Quantifizierung der DNA-Bibliotheken	34
3.7.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	34
3.7.5 Sequenzierung für Illumina.....	35
3.8 Genexpressionsanalysen	36
3.8.1 RNA-Isolierung.....	36

3.8.2	Quantifizierung der RNA	37
3.8.3	cDNA-Herstellung	38
3.8.4	Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	38
3.8.5	Durchführung der real-time PCR	39
3.9	Statistische Analyse und Auswertung.....	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Ergebnisse des Gesamtkollektivs.....	41
4.1.1	Klinische Daten	41
4.1.2	Histopathologische Aspekte	45
4.2	Molekularpathologische Charakterisierung mittels NGS	47
4.2.1	Vergleichbarkeit der beiden Sequenziersysteme MiSeq und NextSeq	51
4.2.2	Klinische Daten zu den PTCs in Abhängigkeit vom Mutationsstatus	51
4.2.3	Histopathologische Aspekte der PTCs in Abhängigkeit vom Mutationsstatus	56
4.3	Bestimmung von Genexpressionen mittels real-time PCR.....	61
4.3.1	Kollektiv der Genexpressionsanalysen	61
4.3.2	Genexpression von <i>TERT</i>	62
4.3.3	Genexpression von <i>GABPB1</i> und <i>GABPB2</i>	65
4.3.4	Genexpression von <i>GADD45B</i>	71
5	Diskussion.....	74
5.1	Auswirkungen eines positiven <i>RAS</i> -Mutationsstatus	74
5.2	Diagnostische Relevanz bei <i>RAS</i> -Mutationen und risikostratifizierte Therapie	78
5.3	Genexpression von <i>TERT</i> , <i>GABPB1</i> und <i>GABPB2</i>	82
5.4	Genexpression von <i>GADD45B</i>	86
6	Fazit und Zusammenfassung	88
7	Ausblick.....	89
8	Literaturverzeichnis	92
9	Anhang.....	111
10	Danksagung.....	118
11	Lebenslauf	119

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ALK	Anaplastische Lymphomkinase
ATC	Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom
BCL2	B-cell lymphoma 2
BRAF	Gen kodiert für die Serin/Threonin-Kinase B-Raf
cDNA	Komplementäre DNA
Ct	Cycle Threshold (Schwellenwertzyklus)
CT	Computertomografie
DHGTC	Differenziertes hochgradiges Schilddrüsenkarzinom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTC	Differenziertes Schilddrüsenkarzinom
EIF1AX	Eukaryotischer Initiationsfaktor
et al.	et alii
ETS	E26 transformation specific
FDG-PET/CT	F-18-Fluorodesoxyglukose Positronen-Emissions-Tomografie/Computertomografie
FFPE	Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet
FTC	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom
FT-UMP	Follikulärer Tumor mit unsicherem Malignitätspotential
GABPB1	GA Binding Protein Transcription Factor Subunit Beta 1
GABPB2	GA Binding Protein Transcription Factor Subunit Beta 2
GADD45B	Growth arrest and DNA-damage-inducible gene family (Mitglied 45B)
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IEFVPTC	Invasiver gekapselter follikulärer Subtyp des PTCs
KI	Künstliche Intelligenz
M.	Musculus
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
Min.	Minuten
M-MLV RT	Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomografie
MTC	Medulläres Schilddrüsenkarzinom
n	Anzahl der Patienten/Patientinnen
N.	Nervus
NGS	Next Generation Sequencing
NIFTP	Nicht-invasive Schilddrüsenneoplasie mit PTC-ähnlichen Kernmerkmalen
NTRK	Neurotrophe Tyrosin-Rezeptor Kinase
o.n.A.	Ohne nähere Angabe
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDTC	Gering differenziertes Schilddrüsenkarzinom
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PPARgamma	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma
PTC	Papilläres Schilddrüsenkarzinom
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
RAS	Gen kodiert für das G-Protein Ras (Rat sarcoma)
RET	Gen kodiert für die Rezeptor-Tyrosinkinase Ret
RNA	Ribonukleinsäure
Sek.	Sekunden
sog.	sogenannt
TEPCR	Transmembranös gelegener Endothelialer Protein-C-Rezeptor

TERT	Telomerase reverse transcriptase
TERT _p	TERT-Promotor
UICC	Union for International Cancer Control
Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz	UM
WDT-UMP	Gut-differenzierter Tumor mit unsicherem Malignitätspotential

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Histologisches Bild von unauffälligem Schilddrüsengewebe	3
Abbildung 2 - Verteilung der bösartigen Neubildungen der Schilddrüse nach histologischem Typ und Geschlecht (Frauen ♀, Männer ♂), ICD-10 C73, Deutschland 2019–2020	9
Abbildung 3 - Altersstandardisierte Inzidenzrate des Surveillance Research Program 2023 für das PTC in den Jahren 2000-2020.....	10
Abbildung 4 - Histologisches Bild eines klassischen/konventionellen PTCs.....	11
Abbildung 5 - Histologisches Bild des follikulären Subtyps des PTCs.....	13
Abbildung 6 - Histologisches Bild des soliden Subtyps des PTCs	15
Abbildung 7 - Histologisches Bild des onkozytären Subtyps des PTCs	15
Abbildung 8 - Signaltransduktionswege bei <i>RAS</i> - und <i>BRAF</i> ^{V600E} -ähnlichen PTCs.....	17
Abbildung 9 - QIAseq Targeted DNA Panels workflow	29
Abbildung 10 - Gelbild der DNA-Bibliotheken zur Qualitätskontrolle	34
Abbildung 11 - Altersverteilung des Kollektivs der Studie	43
Abbildung 12 - Follow-up-Zeit des Kollektivs	44
Abbildung 13 - Rezidivfreies Überleben des Gesamtkollektivs	44
Abbildung 14 - Übersicht über die histologischen PTC-Subtypen	45
Abbildung 15 - <i>BRAF</i> - und <i>RAS</i> -Status des Gesamtkollektivs	50
Abbildung 16 - Altersverteilung bei initialer Operation in Abhängigkeit vom <i>BRAF</i> -Mutationsstatus (Boxplots)	52
Abbildung 17 - Odds Ratios des Rezidivrisikos (Forest-plots).....	53
Abbildung 18 - Rezidivfreies Überleben und <i>BRAF</i> -Mutationsstatus (Kaplan-Meier-Kurven).....	54
Abbildung 19 - Rezidivfreies Überleben und <i>RAS</i> -Mutationsstatus (Kaplan-Meier-Kurven) ..	54
Abbildung 20 - Odds Ratios der Entwicklung von Fernmetastasen (Forest-plots).....	55
Abbildung 21 - Odds Ratios der Radiojod-refraktären Erkrankung (Forest-plots).....	55
Abbildung 22 - Odds Ratio des PTC-Subtyps bei <i>BRAF</i> -Mutation (Forest-plots)	56
Abbildung 23 - Histologisches Bild eines klassischen PTCs mit <i>BRAF</i> ^{V600E} -Mutation.....	56
Abbildung 24 - Odds Ratio des PTC-Subtyps bei <i>RAS</i> -Mutation (Forest-plots)	57
Abbildung 25 - Histologisches Bild des follikulären Subtyps mit <i>NRAS</i> -Mutation	57
Abbildung 26 - Histologisches Bild des follikulären Subtyps mit <i>HRAS</i> -Mutation	58
Abbildung 27 - Odds Ratios der Tumorfokalität unifokal versus multifokal (Forest-plots)	58
Abbildung 28 - Tumorgöße in Abhängigkeit vom <i>BRAF</i> -Mutationsstatus (Boxplots).....	59
Abbildung 29 - Lineare Regressionsanalyse der Tumorgöße (Forest-plots)	59
Abbildung 30 - Odds Ratios des Nodalstatus (Forest-plots)	60
Abbildung 31 - Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der <i>TERT</i> -Expression.....	65
Abbildung 32 - Relative <i>GABPB1/2</i> -Expression innerhalb der <i>TERT</i> _p -mutierten Fälle: <i>BRAF</i> -Wildtyp versus <i>BRAF</i> -Mutation (Boxplots).....	67
Abbildung 33 - Relative <i>GABPB1/2</i> -Expression innerhalb der <i>TERT</i> _p -Wildtyp, aber <i>TERT</i> -exprimierenden Fälle: <i>BRAF</i> -Wildtyp versus <i>BRAF</i> -Mutation (Boxplots)	68
Abbildung 34 - Relative <i>GABPB1/2</i> -Expression: <i>RAS</i> -Wildtyp versus <i>RAS</i> -Mutation (Boxplots).....	69
Abbildung 35 - Relative <i>GABPB1/2</i> -Expression: Unifokal versus multifokal (Boxplots)	70
Abbildung 36 - Relative <i>GABPB1/2</i> -Expression: Kleine versus große Tumoren (Boxplots) ..	71
Abbildung 37 - Relative <i>GADD45B</i> -Expression: Kein Rezidiv versus Rezidiv (Boxplot).....	72
Abbildung 38 - Relative <i>GADD45B</i> -Expression: Spätes versus frühes Rezidiv (Boxplot).....	72
Abbildung 39 - Relative <i>GADD45B</i> -Expression: <i>RAS</i> -Wildtyp versus <i>RAS</i> -Mutation (Boxplot)	73
Abbildung 40 - Molekulare Signaturen des PTCs	75
Abbildung 41 - Gesamtüberleben des Kollektivs der Studie (Kaplan-Meier-Kurve).....	112
Abbildung 42 - Schmelzkurvenanalyse.....	117

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - T-Klassifikation im Studienzeitraum	6
Tabelle 2 - N-Klassifikation im Studienzeitraum.....	7
Tabelle 3 - M-Klassifikation im Studienzeitraum	7
Tabelle 4 - UICC-Stadiengruppierung der Schilddrüsenkarzinome	8
Tabelle 5 - Übersicht über die typischen Kernmerkmale eines PTCs.....	11
Tabelle 6 - Risikostratifizierung zur Diagnostik und Therapie bei DTCs	21
Tabelle 7 - Geräte und Hersteller	22
Tabelle 8 - Verbrauchsmaterialien.....	23
Tabelle 9 - Reagenzien, Lösungen und Puffer.....	24
Tabelle 10 - Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese	24
Tabelle 11 - Kits	25
Tabelle 12 - Software für Labor, Auswertung und Datenverarbeitung.....	25
Tabelle 13 - Pipettierschema zur DNA-Konzentrationsmessung.....	28
Tabelle 14 - Pipettierschema (Fragmentierung, End-Repair und A-Anheftung)	30
Tabelle 15 - Cycler Programm (Fragmentierung, End-Repair und A-Anheftung)	30
Tabelle 16 - Pipettierschema Adapterligation	30
Tabelle 17 - Programm Cycler (Adapterligation)	31
Tabelle 18 - Pipettierschema Target Enrichment.....	32
Tabelle 19 - Programm Cycler (Target enrichment).....	32
Tabelle 20 - Pipettierschema Universal PCR.....	33
Tabelle 21 - Programm Cycler (Universal PCR)	33
Tabelle 22 - Pipettierschema Mastermix RNA-Extraktion	37
Tabelle 23 - Pipettierschema DNase-Reaktionsmix	37
Tabelle 24 - Pipettierschema Mastermix cDNA-Herstellung	38
Tabelle 25 - Primer für die real-time PCR.....	39
Tabelle 26 - Pipettierschema real-time PCR.....	39
Tabelle 27 - Cyclerprogramm real-time PCR.....	40
Tabelle 28 - Klinisch-pathologische Daten des Kollektivs der Studie	41
Tabelle 29 - T-Status des Kollektivs	46
Tabelle 30 - N-Status des Kollektivs.....	46
Tabelle 31 - M-Status des Kollektivs.....	47
Tabelle 32 - <i>BRAF</i> - und <i>RAS</i> -Mutationen in der NGS-Analyse.....	49
Tabelle 33 - Häufigkeiten der Genmutationen im Vergleich mit der COSMIC Datenbank	50
Tabelle 34 - Vergleich der beiden Sequenziersysteme MiSeq und NextSeq.....	51
Tabelle 35 - Kollektiv zur Genexpressionsanalyse.....	61
Tabelle 36 - <i>TERT</i> -Expression in Abhängigkeit vom <i>TERTp</i> -Mutationsstatus.....	63
Tabelle 37 - Klinisch-pathologische Daten in Abhängigkeit von der <i>TERT</i> -Expression und dem <i>TERTp</i> -Mutationsstatus.....	64
Tabelle 38 - Relative <i>GABPB1/2</i> -Expression innerhalb der <i>TERTp</i> -mutierten Fälle: <i>BRAF</i> -Wildtyp versus <i>BRAF</i> -Mutation.....	66
Tabelle 39 - Relative <i>GABPB1/2</i> -Expression innerhalb der <i>TERTp</i> -Wildtyp, aber <i>TERT</i> -exprimierenden Fälle: <i>BRAF</i> -Wildtyp versus <i>BRAF</i> -Mutation	67
Tabelle 40 - Relative <i>GABPB1/2</i> -Expression innerhalb der <i>BRAF</i> -Wildtyp-Fälle: <i>TERTp</i> -Wildtyp versus <i>TERTp</i> -Mutation	68
Tabelle 41 - Relative <i>GABPB1/2</i> -Expression: <i>RAS</i> -Wildtyp versus <i>RAS</i> -Mutation.....	69
Tabelle 42 - Relative <i>GABPB1/2</i> -Expression: Unifokal versus multifokal.....	70
Tabelle 43 - Relative <i>GABPB1/2</i> -Expression: Kleine versus große Tumoren	71
Tabelle 44 - Relative <i>GADD45B</i> -Expression: Kein Rezidiv versus Rezidiv	72
Tabelle 45 - Relative <i>GADD45B</i> -Expression: Spätes Rezidiv versus frühes Rezidiv	72
Tabelle 46 - Relative <i>GADD45B</i> -Expression: Unifokal versus multifokal	73

Tabelle 47 - Relative <i>GADD45B</i> -Expression: <i>RAS</i> -Wildtyp versus <i>RAS</i> -Mutation	73
Tabelle 48 - Übersicht der im QIAseq Targeted DNA Custom Panel enthaltenen Gene	111
Tabelle 49 - Klinische und pathologische Daten in Bezug auf den <i>BRAF</i> -Status	113
Tabelle 50 - Klinische und pathologische Daten in Bezug auf den <i>RAS</i> -Status	115

1 Einleitung

1.1 Ziel der Dissertation

Papilläre Schilddrüsenkarzinome (PTCs) stellen die häufigste Entität der malignen epithelialen Schilddrüsentumoren dar (Zentrum für Krebsregisterdaten 2023). Sie gehören zu den differenzierten Karzinomen und weisen eine Follikelzell-Differenzierung auf. Charakteristisch sind bestimmte Kernmerkmale der Tumorzellen (Asa, Tuttle et al. 2022). Die exakte Klassifikation der Schilddrüsentumoren nach der WHO-Klassifikation (Baloch, Asa et al. 2022, Baloch, Mete et al. 2022, Christofer Juhlin, Mete et al. 2023) bereitet allein auf der Basis der histologischen und zytologischen Kriterien mitunter Probleme. Die zunehmenden Erkenntnisse über die Tumorbilogie auf molekularer Ebene und die neuen und verbesserten Untersuchungsmethoden in der Molekularpathologie ermöglichen die Detektion von tumorassoziierten Veränderungen direkt am Tumorgewebe. So können molekularpathologische Zusatzuntersuchungen zum Mutationsstatus der Tumoren wegweisend für die nähere Charakterisierung und damit für die exakte Klassifizierung sein (Baloch, Asa et al. 2022, Chiba 2024). Sie gewinnen eine zunehmende Bedeutung für die Diagnostik, Therapie und Prognoseeinschätzung bei diversen Tumorerkrankungen (Saller and Boyle 2022, Tímár and Ladányi 2022, Alzumaili and Sadow 2023).

Daten des TCGA (The Cancer Genome Atlas) Research Network (2014) deuten darauf hin, dass PTCs zwei hauptsächliche genetische Profile besitzen, die sich gegenseitig im Grunde ausschließen, darunter PTCs mit *BRAF*-ähnlicher Signatur und PTCs mit einer *RAS*-ähnlichen Signatur (Cancer Genome Atlas Research Network 2014). Aus der Literatur ist bekannt, dass ein positiver *BRAF*-Mutationsstatus bei etwa 55-75% der PTCs vorliegt (Cancer Genome Atlas Research Network 2014, Wei, Wang et al. 2022, COSMIC 2024d). *BRAF*-Mutationen besitzen vor allem eine diagnostische Relevanz und haben einen bedeutsamen Stellenwert in zytologisch uneindeutigen Feinnadelbiopsien (Adeniran, Hui et al. 2011), da das Vorliegen einer *BRAF*-Mutation den Rückschluss auf ein PTC zulässt (Nikiforov 2011b). Inwieweit *BRAF*-Mutationen mit aggressiveren Tumoreigenschaften einhergehen, ist bereits in der Literatur diskutiert worden, obgleich keine eindeutige Prognoseeinschätzung allein auf Basis des *BRAF*-Status gelingt. Insbesondere im Zusammenspiel mit *TERT*-Promotormutationen (*TERT*_p-Mutationen) konnte eine ungünstige Prognose bereits in Studien gezeigt werden (Liu, Qu et al. 2014, Vuong, Altibi et al. 2017, Liu, Zhang et al. 2018, Cao, Zhu et al. 2022, Cheng, Zhou et al. 2023, Staubitz, Müller et al. 2023).

RAS-Mutationen sind dagegen seltener und es ist weniger über die Bedeutung der *RAS*-Mutationen in PTCs bekannt. Da *RAS*-Mutationen auch bei Adenomen vorkommen (Esapa, Johnson et al. 1999, Medici, Kwong et al. 2015), gelten *RAS*-Mutationen im Gegensatz zu *BRAF*-Mutationen nicht als Malignitätszeichen. Insbesondere die prognostische Wertigkeit des biologischen Markers in PTCs ist bisher nicht geklärt (Howell, Hodak et al. 2013, Medici, Kwong et al. 2015, Xing 2016, Bikas, Ahmadi et al. 2023, Harahap, Subekti et al. 2023).

In der vorliegenden Dissertation soll im Rahmen eines Kooperationsprojektes zwischen der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie und dem Institut für Pathologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (UM) die Rolle von *RAS*-Mutationen in PTCs untersucht und deren potenzielle Auswirkungen auf Diagnose, Prognose und Therapie diskutiert werden. Hierzu wurde der Mutationsstatus der *RAS*-Gene (*HRAS*, *KRAS* und *NRAS*) mittels Next Generation Sequencing (NGS) bestimmt. Die genetischen Daten sollten dann mit ebenfalls vorliegenden klinisch-pathologischen Eigenschaften korreliert werden. Zudem sollte das genetische Profil der PTCs auf mRNA-Ebene beleuchtet werden. Hierfür folgten Genexpressionsanalysen von *TERT*, *GABPB1* und *GABPB2*, um das Zusammenspiel von *BRAF*-Mutationen und *TERT*_p-Mutationen zu untersuchen. Es sollte das

Expressionsniveau der Zielgene bei unterschiedlichen genetischen Profilen verglichen werden. Zudem sollte überprüft werden, ob sich der Marker *GADD45B*, wie in der Literatur vorbeschrieben (Barros-Filho, de Mello et al. 2020), als prognostischer Marker eignet. Dazu wurden die Genexpressionslevel in Bezug auf das klinische Outcome verglichen.

Das Ziel der Arbeit ist es, die PTCs durch molekularpathologische Analysen besser zu charakterisieren und damit in Zukunft eine verbesserte Diagnostik, eine Abschätzung der Prognose und eine an den zu erwartenden klinischen Verlauf individuell angepasste Therapie zu ermöglichen. Insbesondere sollten folgende Fragestellungen analysiert werden:

1.2 Forschungsfragen

Hat ein positiver *RAS*-Mutationsstatus Auswirkungen auf die Tumormorphologie, die Tumoraggressivität und die Prognose? Besteht möglicherweise eine diagnostische Relevanz?

Können aufgrund des genetischen Profils chirurgische Empfehlungen für eine risikostratifizierte Therapie abgeleitet werden?

Wie wird das *TERT*-Gen bei *TERT*_p-mutierten im Vergleich zu *TERT*_p-Wildtyp-Fällen exprimiert? Hat die Genexpression von *TERT* Auswirkungen auf das klinische Outcome? Wie werden die *GABPB1*- und *GABPB2*-Gene bei *BRAF*- und *TERT*_p-mutierten PTCs exprimiert?

Eignet sich *GADD45B* als prognostischer Biomarker?

2 Literaturdiskussion

2.1 Anatomie und Histologie der Schilddrüse

Die Schilddrüse umfasst zwei seitliche Schilddrüsenlappen und einen zentral lokalisierten Schilddrüsenisthmus. In Richtung kranial kann ein embryonaler Rest, ein wie ein Polyeder konfigurierter Lobus pyramidalis vorkommen (Schünke, Schulte et al. 2015a). Die Schilddrüsenkapsel besitzt zwei Komponenten, ein inneres (Capsula interna) und ein äußeres Blatt (Capsula externa). Zwischen beiden Blättern befindet sich der Raum, in dem sich die Nebenschilddrüsen und größere Aufzweigungen der Blutgefäße befinden. Die Nebenschilddrüsen bilden ein oberes und ein unteres Paar, sodass der Mensch in der Regel vier Nebenschilddrüsen besitzt. Diese können bei Schilddrüsenoperationen unbeabsichtigt mitreseziert werden (Schünke, Schulte et al. 2015b).

Die Schilddrüse besitzt eine räumliche Nähe zum N. laryngeus recurrens, der vom N. vagus abzweigt und unmittelbar dorsal der Schilddrüse verläuft. Der N. laryngeus recurrens innerviert die innere Kehlkopfmuskulatur. Eine intraoperative Nervenverletzung kann zu Dysphonie oder Dyspnoe führen (Schünke, Schulte et al. 2015b).

Mikroskopisch kommen kolloidgefüllte Follikel unterschiedlicher Größe zur Darstellung (Abbildung 1). Die Follikel werden ausgekleidet durch ein einschichtiges Epithel. Die Höhe der Epithelzellen verändert sich je nach Funktionszustand der Drüse (Ulfig 2011). In der Sekretbildungsphase haben die Epithelzellen einen isoprismatischen bis hochprismatischen Aspekt. Zudem befindet sich wenig Kolloid innerhalb der Follikel. Hier können auch sog. Randvakuolen vorkommen. In der Speicherform sind die Follikel durch reichlich gespeichertes Kolloid groß. Die Epithelzellen zeigen sich abgeflacht (Ulfig 2011). Zwischen den Follikeln oder auch intraepithelial in das Follikel Epithel integriert finden sich die C-Zellen, die in der Embryogenese überwiegend aus den ultimobranchialen Körpern hervorgehen (Nilsson and Williams 2016). Histologisch imponieren die C-Zellen heller und größer als die Epithelien der Follikel. Perifollikulär befindet sich von Kapillaren durchzogenes Bindegewebe (Ulfig 2011).

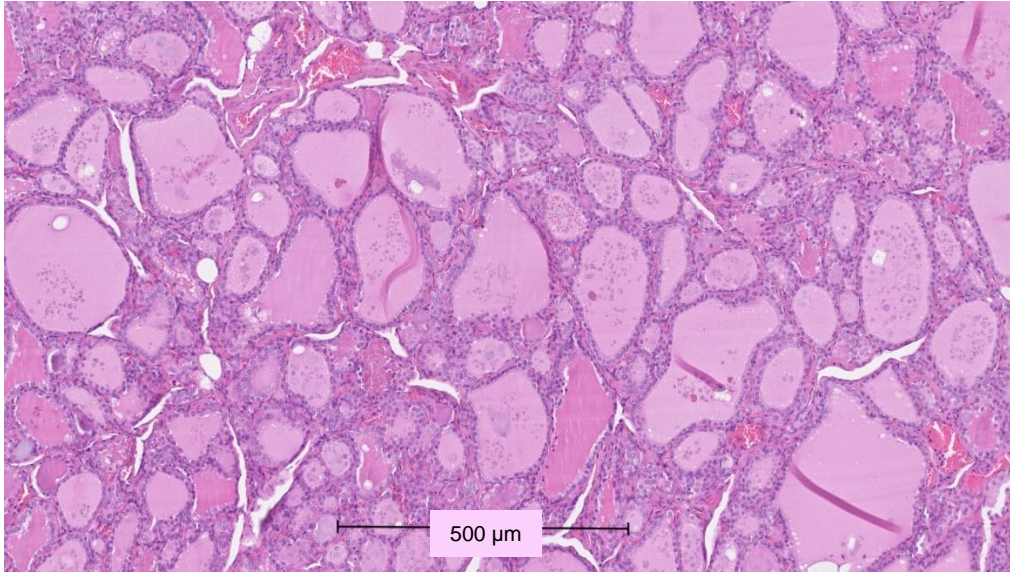


Abbildung 1 - Histologisches Bild von unauffälligem Schilddrüsengewebe

2.2 Schilddrüsentumoren

Die Klassifikation der verschiedenen Tumorentitäten unterlag einem andauernden Wandel. Nachdem zunächst der morphologische Wachstumstyp die wesentliche Rolle gespielt hatte (diffus – knotig, solitär – multifokal), wurde später das Vorkommen von histopathologisch bekannten Strukturen bzw. Zellformationen namensgebend für die Unterteilung in folliculäre und papilläre Tumorproliferationen. Auch die Entwicklung der Molekularpathologie eröffnete eine neue Dimension des Verständnisses des biologisch unterschiedlichen Verhaltens von scheinbar morphologisch ähnlich imponierenden Tumoren.

2.2.1 Klassifikation von Schilddrüsentumoren

Schilddrüsentumoren sind die häufigsten endokrinen Neoplasien (Fruth 2010, Baloch, Asa et al. 2022). Diese können sich aus Calcitonin-sezernierenden C-Zellen oder folliculären Epithelzellen entwickeln, wobei der überwiegende Anteil von Follikel epithelzellen abstammt. Selten ist eine Kombination aus beiden Zelltypen möglich. In die Kategorie der Follikel epitheldifferenzierung fallen benigne Tumoren, low-risk Neoplasien und Karzinome (Asa, Tuttle et al. 2022). Im Folgenden werden die in der WHO-Klassifikation beschriebenen Entitäten vorgestellt, die die Einordnung der Tumoren des in dieser Arbeit untersuchten Kollektivs ermöglichen und erleichtern.

2.2.2 Adenome

Follikuläre Adenome sind benigne folliculäre Neoplasien ohne Invasivität und ohne Ausbildung von Metastasen. Zudem liegen hier keine Kriterien eines PTCs vor. Follikuläre Adenome können in jedem Alter auftreten, kommen aber am häufigsten zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr vor. Frauen sind häufiger betroffen als Männer (Lloyd, Osamura et al. 2017). Histologisch ist ein Adenom von einer fibrösen Kapsel umgeben und weist am häufigsten eine mikro- oder makrofollikuläre Architektur auf (Cancer Genome Atlas Research Network 2014). Zudem können trabekuläre, solide oder insuläre Muster vorkommen. Trotz fehlender Kriterien eines PTCs können jedoch auch Papillen mit unauffälliger zytologischer Morphologie auftreten. Die Zellen weisen runde, basalständige Zellkerne mit gleichförmiger

Chromatinstruktur auf. Auch regressive Veränderungen in Form von fibrosierenden, ödematösen oder zystischen Veränderungen sowie Hyalinisierungen können vorkommen (Lloyd, Osamura et al. 2017). Grundsätzlich kann eine morphologische Abgrenzung bzw. Unterscheidung von hyperplastischen und neoplastischen Veränderungen schwierig sein. Vor allem bei einer multinodulären Schilddrüsenerkrankung werden Knoten ohne Malignitätskriterien im Allgemeinen als hyperplastisch angesehen. Molekularbiologisch weisen Adenome eine klonale Vermehrung von Thyreozyten in den Knoten auf (Asa, Tuttle et al. 2022). Hyperplastische Knoten sind hingegen polyklonal. Somit ist eine definitive Unterscheidung zwischen der echten Neoplasie und einer Hyperplasie gegebenenfalls nur mit molekularpathologischen Untersuchungen möglich. In der aktuellen 5. Edition der WHO-Klassifikation wurde daher der Begriff „Noduläre follikuläre Schilddrüsenerkrankung“ aufgenommen, um dieser Schwierigkeit zu begegnen (Baloch, Asa et al. 2022).

2.2.3 Tumoren mit unsicherem Malignitätspotential

Die Kategorie der Tumoren mit unsicherem Malignitätspotential umfasst eine Gruppe von Tumoren, bei denen eine Kapsel bzw. ein gut umschriebener Tumor mit überwiegend bis ausschließlich follikulärem Aufbau vorliegt (Asa, Tuttle et al. 2022).

Der **Follikuläre Tumor mit unsicherem Malignitätspotential** (FT-UMP) nimmt eine Zwischenstellung zwischen dem follikulären Adenom und dem follikulären Karzinom (FTC) ein, da bei einem FT-UMP eine fragliche Kapsel- oder Gefäßinvasion besteht. Es liegen keine Kernkriterien eines PTCs vor (Williams 2000, Lloyd, Osamura et al. 2017).

Die **Nicht-invasive follikuläre Schilddrüsen-Neoplasie mit PTC-ähnlichen Kernmerkmalen** (NIFTP) wurde 2017 neu in die WHO-Klassifikation eingeführt und weist eine follikuläre Architektur mit einem geringen Anteil (<30%) an soliden, insulären oder trabekulären Strukturen auf, wobei keine echten papillären Strukturen auftreten dürfen (Nikiforov, Baloch et al. 2018). Zusätzlich zeigen sich histologisch Kernkriterien eines PTCs. Allerdings findet sich keine Kapsel-, Lymphgefäß- oder Blutgefäßinvasion und es dürfen keine Nekrosen und keine erhöhte proliferative Aktivität vorliegen. Bei dieser Tumorentität ergibt sich ein äußerst geringes Malignitätspotential (Nikiforov, Seethala et al. 2016, Lloyd, Asa et al. 2018).

Der **Gut-differenzierte Tumor mit unsicherem Malignitätspotential** (WDT-UMP) besitzt zumindest teilweise die Kernkriterien eines PTCs sowie eine fragliche Kapsel- und Gefäßinvasion. Sind diese ausgeschlossen, liegt eine Nicht-invasive Schilddrüsenneoplasie mit PTC-ähnlichen Kernmerkmalen (NIFTP) vor (Lloyd, Osamura et al. 2017). WDT-UMP nehmen somit eine Zwischenstellung zwischen einem NIFTP und dem follikulären Subtyp des PTCs ein.

2.2.4 Schilddrüsenkarzinome

Zu den Schilddrüsenkarzinomen mit Follikelepitheldifferenzierung gehören follikuläre (FTC) und papilläre Schilddrüsenkarzinome (PTC) sowie gering differenzierte (PDTC) und anaplastische Schilddrüsenkarzinome (ATC). Daneben gibt es medulläre Karzinome (MTC), die neuroendokriner Natur sind, sowie selten vorkommende mesenchymale Tumoren (Asa, Tuttle et al. 2022).

2.2.4.1 Gut differenzierte Schilddrüsenkarzinome

Zu den gut differenzierten Schilddrüsenkarzinomen gehören das FTC und das PTC (Asa, Tuttle et al. 2022). Eine wichtige Differenzialdiagnose zum FTC stellt das follikuläre Adenom dar, wobei bei einem FTC ein Kapseldurchbruch und/oder eine Gefäßinvasion vorliegen muss. Das FTC betrifft 10-30% aller Schilddrüsenkarzinome und kommt vor allem im

Erwachsenenalter bei einem Median von 45-50 Jahren vor (Tiedje, Schmid et al. 2015, Barletta, Fadda et al. 2022). Histologisch wurden drei Invasionstypen festgelegt: minimal invasiv, angioinvasiv gekapselt und breit invasiv (Barletta, Fadda et al. 2022). Das FTC hat wie das PTC seinen Ursprung in den Follikelepithelzellen. Allerdings liegen hier keine PTC-typischen Kernmerkmale vor (Barletta, Fadda et al. 2022).

PTCs sind ebenfalls Tumoren mit Follikelzell-Differenzierung und sind charakterisiert durch ein invasives Wachstum (Gefäßinvasion oder Kapselinvasion), eine echte papilläre Architektur und hauptsächlich spezifische Kernmerkmale (Lloyd, Osamura et al. 2017). Eine genauere Einordnung der PTCs findet sich in Kapitel 2.3.

2.2.4.2 Hochgradige, nicht-anaplastische Schilddrüsenkarzinome

2.2.4.2.1 Gering differenzierte Schilddrüsenkarzinome (PDTC)

Die gering oder wenig differenzierten Schilddrüsenkarzinome sind charakterisiert durch eine Histomorphologie mit solidem, trabekulärem oder insulärem Wuchsmuster sowie weiteren Kriterien wie einem Rosinen-artigen Kernaspekt, Nekrosen oder vermehrten Mitosen. Die Diagnose basiert auf den Turin Konsensus Kriterien (Volante, Collini et al. 2007).

2.2.4.2.2 Differenzierte hochgradige Schilddrüsenkarzinome (DHGTC)

Die differenzierten hochgradigen Schilddrüsenkarzinome bilden eine neue Entität in der WHO-Klassifikation 2022 (Asa, Tuttle et al. 2022). Hier liegen high-grade Kriterien wie Tumornekrosen oder eine erhöhte mitotische Aktivität vor, jedoch sind Eigenschaften erkennbar, die den differenzierten Schilddrüsenkarzinomen gleichen. Dazu gehören papilläre oder follikuläre Architekturen oder Kernveränderungen, die für ein PTC typisch wären (Wong, Dong et al. 2021).

2.2.4.2.3 Anaplastische Schilddrüsenkarzinome (ATC)

Anaplastische Schilddrüsenkarzinome sind durch ein undifferenziertes Zellbild charakterisiert und weisen aggressive Tumoreigenschaften auf. Histologisch können diese das Bild eines Sarkoms mit Spindelzellen und mehrkernigen Riesenzellen nachahmen (Deeken-Draisey, Yang et al. 2018). In der aktuellen WHO-Klassifikation 2022 wurde das Plattenepithelkarzinom als morphologisches Muster in das Kapitel des ATCs integriert. Es ist ebenfalls mit einer schlechten Prognose assoziiert (Lam, Lo et al. 2001, Xu, Fuchs et al. 2020, Baloch, Asa et al. 2022).

2.2.5 TNM-Klassifikation

Die Schilddrüsenkarzinome werden anhand des TNM-Systems klassifiziert. Die mehrdimensionale Kategorisierung, welche die Tumorausdehnung (T), die regionale Lymphknotenmetastasierung (N) und die Fernmetastasierung (M) umfasst, ermöglicht eine Schweregradeinteilung der Tumorerkrankung (Edge and Compton 2010). Die Stadieneinteilung berücksichtigt neben dem TNM-Status auch das Alter und die Tumorentität. Im Folgenden werden die TNM-Klassifikationen und Stadieneinteilungen, die im Zeitraum der Patienten-/Patientinnenakquise der Studie (2008-2018) aktuell waren, angeführt. Die Tumoren wurden anhand der jeweils gültigen TNM-Klassifikation bei Diagnosestellung eingeordnet. So galten im jeweiligen Studienzeitraum:

- TNM 6. Auflage 2002 (Wittekind, Bootz et al. 2004)
- TNM 7. Auflage 2010 (Wittekind and Meyer 2012)
- TNM 8. Auflage 2017 (Wittekind 2017)

Unterschiede in den Klassifikationen ergeben sich vor allem bei der Klassifikation der extrathyreoidalen Ausbreitung (T3-Stadium). Bei der extrathyreoidalen Ausbreitung wurde zwischen einer minimalen extrathyreoidalen Ausbreitung, welche das perithyreoidale Weichgewebe einschließt, und einer ausgedehnten extrathyreoidalen Ausbreitung unterschieden (Ito, Tomoda et al. 2006). Jedoch wurde beschrieben, dass kein Unterschied bezüglich der rezidivfreien Überlebensrate bei Patienten/Patientinnen mit Tumoren ohne extrathyreoidale Ausbreitung und mit minimaler extrathyreoidaler Ausbreitung bestand und dass die Fälle mit ausgedehnter extrathyreoidaler Ausbreitung eine signifikant kürzere rezidivfreie Überlebensrate aufwiesen (Ito, Tomoda et al. 2006, Rivera, Ricarte-Filho et al. 2010). Die minimale extrathyreoidale Ausbreitung ist somit in der Klassifikation weggefallen (Tabelle 1, Tabelle 2, Tabelle 3, Tabelle 4).

Tabelle 1 - T-Klassifikation im Studienzeitraum

T – Primärtumor ^{1,2}	TNM 6. Auflage 2002/2004	TNM 7. Auflage 2010/2012	TNM 8. Auflage 2017
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden		
T0	Kein Anhalt für Primärtumor		
T1	Tumor ≤ 2 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Schilddrüse		
T1a		Tumor ≤ 1 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Schilddrüse	
T1b		Tumor > 1 cm und ≤ 2 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Schilddrüse	
T2	Tumor > 2 cm und ≤ 4 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Schilddrüse		
T3	Tumor > 4 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Schilddrüse, oder Tumor mit minimaler extrathyreoidaler Ausbreitung (d.h. Ausbreitung in den M. sternothyroideus oder in das perithyreoidale Weichgewebe)		Tumor > 4 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Schilddrüse, oder Tumor mit makroskopischer extrathyreoidaler Ausbreitung (d.h. Ausbreitung in den M. sternohyoideus, M. sternothyroideus oder M. omohyoideus)
T3a		Tumor > 4 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Schilddrüse	Tumor > 4 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Schilddrüse
T3b		Tumor mit minimaler extrathyreoidaler Ausbreitung (d.h. Ausbreitung in den M. sternothyroideus oder in das perithyreoidale Weichgewebe)	Tumor mit makroskopischer extrathyreoidaler Ausbreitung (d.h. Ausbreitung in den M. sternohyoideus, M. sternothyroideus oder M. omohyoideus)
T4a	Tumor mit Ausbreitung jenseits der Schilddrüsenkapsel und Invasion einer oder mehrerer der folgenden Strukturen: subkutanes Weichgewebe, Larynx, Trachea, Ösophagus, N. laryngeus recurrens		
T4b	Tumor infiltriert prävertebrale Faszie, mediastinale Gefäße oder umschließt die A. carotis		

T – Primär-tumor^{1,2}	TNM 6. Auflage 2002/2004	TNM 7. Auflage 2010/2012	TNM 8. Auflage 2017
¹ TNM 6. Auflage 2002 und TNM 7. Auflage 2010: Alle undifferenzierten/anaplastischen Karzinome werden als T4 klassifiziert. T4a Tumor jeder Größe, auf die Schilddrüse beschränkt (intrathyreoidale undifferenzierte Karzinome: chirurgisch als resektabel beurteilt) T4b Tumor jeder Größe mit Ausbreitung jenseits der Schilddrüsenkapsel (extrathyreoidale undifferenzierte Karzinome: chirurgisch als nicht resektabel beurteilt)			
² TNM 8. Auflage 2017: eingeschlossen papilläre, follikuläre, schlecht differenzierte, Hürthlezzell- und undifferenzierte (anaplastische) Karzinome			
Quelle: modifiziert nach (Wittekind, Bootz et al. 2004, Wittekind and Meyer 2012, Wittekind 2017)			

Tabelle 2 - N-Klassifikation im Studienzeitraum

N - Regionäre Lymphknoten	TNM 6. Auflage 2002/2004	TNM 7. Auflage 2010/2012	TNM 8. Auflage 2017
Nx	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar		
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen (Selektive Neck-Dissektion und histologische Untersuchung von 6 oder mehr Lymphknoten)		
pN1	Regionäre Lymphknotenmetastasen		
pN1a	Metastasen in Lymphknoten des Level VI: prätracheal und paratracheal, inkl. präalaryngeale und Delphi-Lymphknoten		Metastasen in Lymphknoten des Level VI (prätracheal und paratracheal, inkl. präalaryngeale und Delphi-Lymphknoten) oder obere mediastinale Lymphknoten
pN1b	Metastasen in anderen unilateralen, bilateralen oder kontralateralen zervikalen oder oberen mediastinalen Lymphknoten	Metastasen in anderen unilateralen, bilateralen oder kontralateralen zervikalen (Level I, II, III, IV, V) oder retropharyngealen oder oberen mediastinalen Lymphknoten	Metastasen in anderen unilateralen, bilateralen oder kontralateralen zervikalen (Level I, II, III, IV, V) oder retropharyngealen Lymphknoten
Quelle: modifiziert nach (Wittekind, Bootz et al. 2004, Wittekind and Meyer 2012, Wittekind 2017)			

Tabelle 3 - M-Klassifikation im Studienzeitraum

M - Fernmetastasen	TNM 6. Auflage 2002/2004	TNM 7. Auflage 2010/2012	TNM 8. Auflage 2017
Mx	Vorliegen von Fernmetastasen nicht beurteilbar		
M0	Keine Fernmetastasen		
M1	Fernmetastasen vorhanden		
Quelle: modifiziert nach (Wittekind, Bootz et al. 2004, Wittekind and Meyer 2012, Wittekind 2017)			

Tabelle 4 - UICC-Stadiengruppierung der Schilddrüsenkarzinome

UICC-Stadiengruppierung	TNM 6. Auflage 2002/2004	TNM 7. Auflage 2010/2012	TNM 8. Auflage 2017
Papillär oder follikulär < 45 Jahre			Papillär oder follikulär < 55 Jahre
Stadium I	Jedes T, jedes N, M0		Jedes T, jedes N, M0
Stadium II	Jedes T, jedes N, M1		Jedes T, jedes N, M1
Stadium III			
Stadium IV			
Papillär oder follikulär ≥ 45 Jahre			Papillär oder follikulär ≥ 55 Jahre
Stadium I	T1, N0, M0	T1a, T1b, N0, M0	T1a, T1b, T2, N0, M0
Stadium II	T2, N0, M0		T3, N0, M0 oder T1, T2, T3, N1, M0
Stadium III	T3, N0, M0 oder T1, T2, T3, N1a, M0		T4a, jedes N, M0
Stadium IVA	T1, T2, T3, N1b, M0 oder T4a, N0, N1, M0		T4b, jedes N, M0
Stadium IVB	T4b, jedes N, M0		Jedes T, jedes N, M1
Stadium IVC	Jedes T, jedes N, M1		
Quelle: modifiziert nach (Wittekind, Bootz et al. 2004, Wittekind and Meyer 2012, Wittekind 2017)			

2.3 Papilläre Schilddrüsenkarzinome

2.3.1 Epidemiologie

Im Jahr 2020 ist bei 3980 Frauen und bei 1780 Männern in Deutschland eine maligne Schilddrüsenerkrankung diagnostiziert worden. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung lag bei den Frauen bei 51 Jahren, bei den Männern bei 55 Jahren (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Herausgeber) 2023b). Im Vergleich mit anderen vorkommenden Krebserkrankungen ist das mittlere Erkrankungsalter bei Schilddrüsenmalignomen niedriger. Im Jahr 2020 lag das mittlere Erkrankungsalter in Bezug auf alle bösartigen Neubildungen (nach ICD-10 C00 – C97 ohne C44) bei 69 Jahren bei Frauen und bei 70 Jahren bei Männern (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Herausgeber) 2023a). Aus den Daten der Gemeinsamen Publikation des Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. geht hervor, dass die altersstandardisierte Inzidenz in den Jahren 1999 bis 2020 gestiegen ist und in den letzten Jahren nun gleichbleibend ist. Die altersstandardisierte Neuerkrankungsrate betrug im Jahr 2020 in Deutschland für Frauen 8,6 und für Männer 3,6 bezogen auf 100.000 Personen (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Herausgeber) 2023a).

Die papillären Karzinome sind die häufigsten Schilddrüsenkarzinome (Abbildung 2) und treten etwa zwei- bis dreimal häufiger bei Frauen als bei Männern auf. Zudem werden sie in einem breiten Altersspektrum diagnostiziert, wobei auch junge Erwachsene und Kinder betroffen sein können (Mulla and Margo 2000).

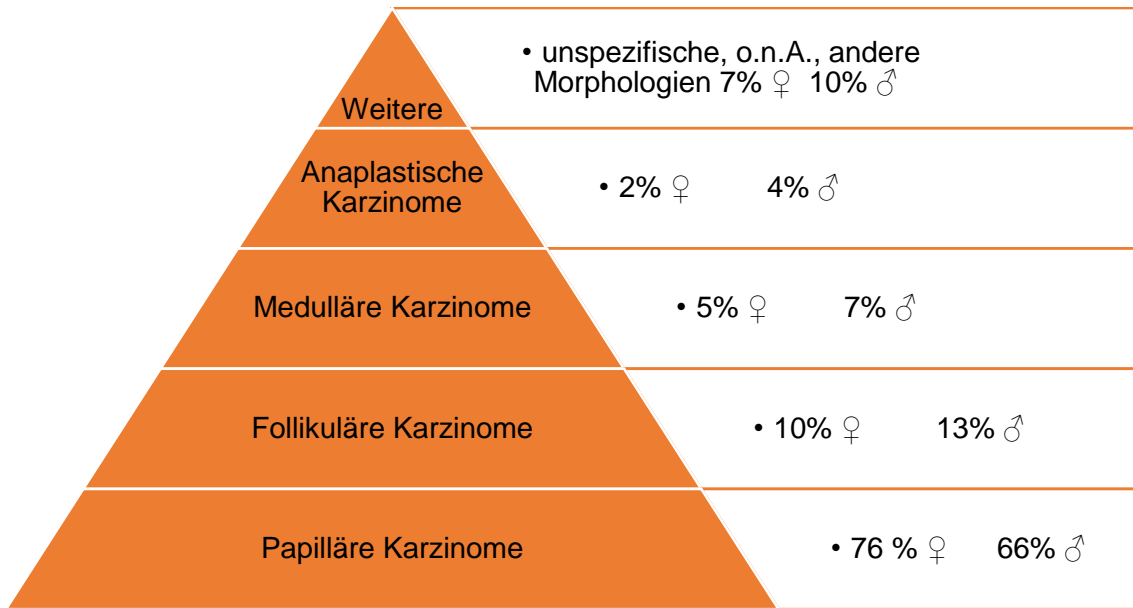
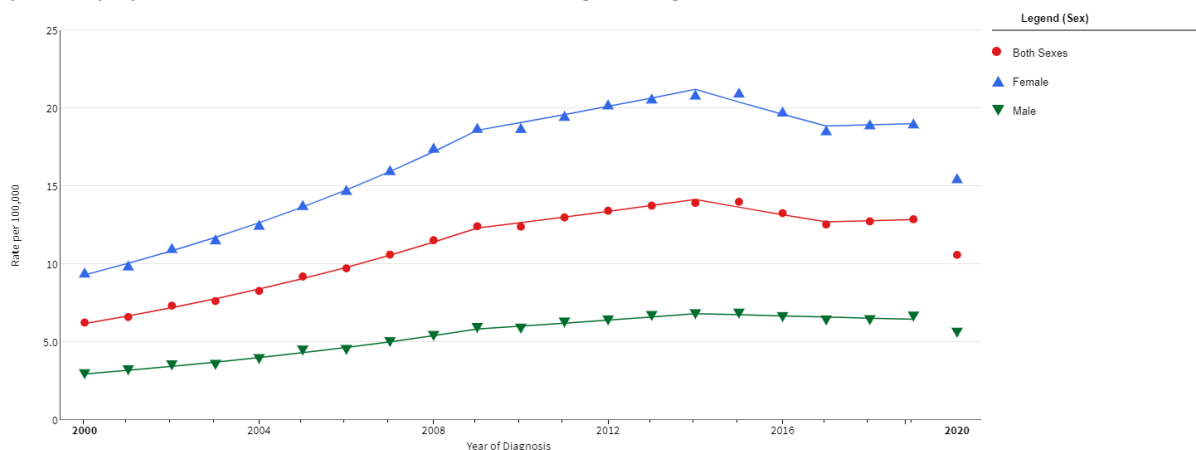


Abbildung 2 - Verteilung der bösartigen Neubildungen der Schilddrüse nach histologischem Typ und Geschlecht (Frauen ♀, Männer ♂), ICD-10 C73, Deutschland 2019–2020

Bildquelle: modifiziert nach (Zentrum für Krebsregisterdaten 2023)

Daten aus den USA zeigen auch für das PTC den Trend einer angestiegenen Inzidenz in den Jahren 2009-2014 bei etwa gleichbleibender Inzidenzrate in den Jahren 2014-2019 (Surveillance Research Program 2023b), (Abbildung 3). Es wird angenommen, dass die angestiegene Inzidenzrate vor allem auf die neuen diagnostischen Möglichkeiten zurückzuführen war (Vaccarella, Dal Maso et al. 2015). Der hauptsächliche, gesicherte Risikofaktor für die Entstehung eines Schilddrüsenkarzinoms ist die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung, vor allem, wenn diese im Kindesalter stattfindet (Dal Maso, Bosetti et al. 2009).

Papillary Subtype of the Thyroid
Recent Trends in SEER Age-Adjusted Incidence Rates, 2000-2020
By Sex, Delay-adjusted SEER Incidence Rate, All Races / Ethnicities, All Ages, All Stages



Data Source:
 • SEER Incidence Data, November 2022 Submission (1975-2020), SEER 22 registries (<https://seer.cancer.gov/registries/terms.html>)

Methodology:
 • Rates are per 100,000 and are age-adjusted to the 2000 US Std Population (19 age groups - Census P25-1130).
 • The Annual Percent Change (APC) and Average Annual Percent Change (AAPC) estimates were calculated from the underlying rates using the Joinpoint Trend Analysis Software (<https://surveillance.cancer.gov/joinpoint/>).
 • Version 4.9, March 2021, National Cancer Institute using the default settings.
 • The APC/AAPC's direction is "Rising" (↑) when the entire 95% confidence interval (C.I.) is above 0, "Falling" (↓) when the entire 95% C.I. is lower than 0, otherwise, the trend is considered "Not Significant".
 • The 2020 incidence rate is displayed but not used in the fit of the trend line(s). Impact of COVID on SEER Cancer Incidence 2020 data (<https://seer.cancer.gov/data/covid-impact.html>)

Race/Ethnicity Coding:
 • For more details on SEER race/ethnicity groupings and changes made to the grouping for this year's data release, please see Race and Hispanic Ethnicity Changes (https://seer.cancer.gov/seerstat/variables/seer/race_ethnicity/).
 • Rates for American Indians/Alaska Natives only include cases that are in a Purchased/Referred Care Delivery Area (PRCDA).
 • Incidence data for Hispanics and Non-Hispanics are based on the NAACCR Hispanic/Latino Identification Algorithm (NHIA).

Cancer Site Coding:
 • See SEER Explorer Cancer Site Definitions (<https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer/cancer-sites.html>) for details about the cancer site coding used for SEER Incidence data.
 • Created by <https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer> on Tue Feb 13, 2024.

Abbildung 3 - Altersstandardisierte Inzidenzrate des Surveillance Research Program 2023 für das PTC in den Jahren 2000-2020

Bildquelle: (Surveillance Research Program 2023a)

2.3.2 Klinisch-radiologisches Erscheinungsbild

PTCs können durch lokale Symptome wie eine schmerzlose Raumforderung im Bereich der Schilddrüsenloge oder auch durch Heiserkeit und Stimmveränderungen auffallen. Zudem können die regionalen Lymphknoten vergrößert sein und lokale Schmerzen auftreten. Bei fortgeschrittenem Tumorleiden können auch über die lokalen Symptome hinausgehende Beschwerden wie Knochenschmerzen/-frakturen oder Gewichtsverlust bestehen (Hundahl, Cady et al. 2000).

Die Ultraschalluntersuchung hat im Rahmen der Diagnostik einen hohen Stellenwert, wobei hier eine hypo- oder isoechogene Raumforderung mit gegebenenfalls unregelmäßiger Begrenzung und irregulärem Gefäßmuster in Form einer Hypervaskularisierung erkannt werden kann. Auch Mikrokalzifikationen oder zystische Anteile können auftreten (Chan, Desser et al. 2003, Jun, Chow et al. 2005). Bei bis zu etwa einem Drittel der Patienten/Patientinnen besteht eine multifokale Tumorerkrankung, die nur einen Schilddrüsenlappen oder auch beide Schilddrüsenlappen betreffen kann (Polat, Cakir et al. 2019). Weitere bildgebende Verfahren sind die Computertomografie (CT), Magnetresonanztomografie (MRT) oder die Szintigrafie. In der Szintigrafie können hypofunktionelle („kalte“) und hyperfunktionelle („heiße“) Knoten unterschieden werden. Die PTCs kommen in der Regel als hypofunktionelle Knoten zur Darstellung, in seltenen Fällen treten diese auch hyperfunktionell auf (Summaria, Rufini et al. 2000, Kim, Asato et al. 2007). Eine F-18-Fluorodesoxyglukose Positronen-Emissions-Tomografie/Computertomografie (FDG-PET/CT)-Untersuchung kann bei speziellen Fragestellungen hinsichtlich der Tumorausbreitung, einer Metastasierung, eines Rezidivs oder bei Jod-negativen Tumoren sinnvoll sein (Palmedo, Bucerius et al. 2006, Lee, Kang et al. 2009).

2.3.3 Makroskopie und Histologie

PTCs können in ihrer Größe stark variieren. Konventionelle PTCs haben häufig eine Tumorgöße von 2-3 cm (Hundahl, Cady et al. 2000, LiVolsi 2011). Makroskopisch sind die Tumoren von fester Konsistenz, weißer Schnittfläche und besitzen eine unscharfe Abgrenzung zum umgebenden Gewebe, wobei Verkalkungen auftreten können (Barletta, Fadda et al. 2022).

Kennzeichnend für ein klassisches/konventionelles PTC sind histologisch die Papillen und die Kernmerkmale. Die aus fibrovaskulärem Stroma bestehenden Papillienstiele können unterschiedliche Muster bilden. Überkleidet werden diese von einem neoplastischen Epithel (Abbildung 4). Beim klassischen PTC ist die papilläre Architektur das vorherrschende Muster (LiVolsi 2011, Baloch, Mete et al. 2022). Differenzialdiagnostisch sind Pseudopapillen abzugrenzen. Zwischen den Papillen können auch neoplastische follikuläre Strukturen oder auch solide Bereiche auftreten (Franssila 1973).

Die qualitativen Kernmerkmale sind Veränderungen in der Kerngröße oder des Kernaspekts, der Kernmembran sowie des Kernchromatins (Nikiforov, Seethala et al. 2016, Baloch, Mete et al. 2022), (Tabelle 5).

Tabelle 5 - Übersicht über die typischen Kernmerkmale eines PTCs

Kategorien	Merkmal
1 Kerngröße und Kernform	Kernvergrößerungen, Kernüberlappungen, Kernelongation (Gray and Doniach 1969)
2 Kernmembran	Irreguläre Kernkontur, Pseudoinklusionen (Zytoplasmainvaginationen), Längsfurchen (sog. grooves) (Gray and Doniach 1969, DeLellis 1993)
3 Kernchromatin	Milchglas-Chromatin (DeLellis 1993, Baloch and LiVolsi 2002)

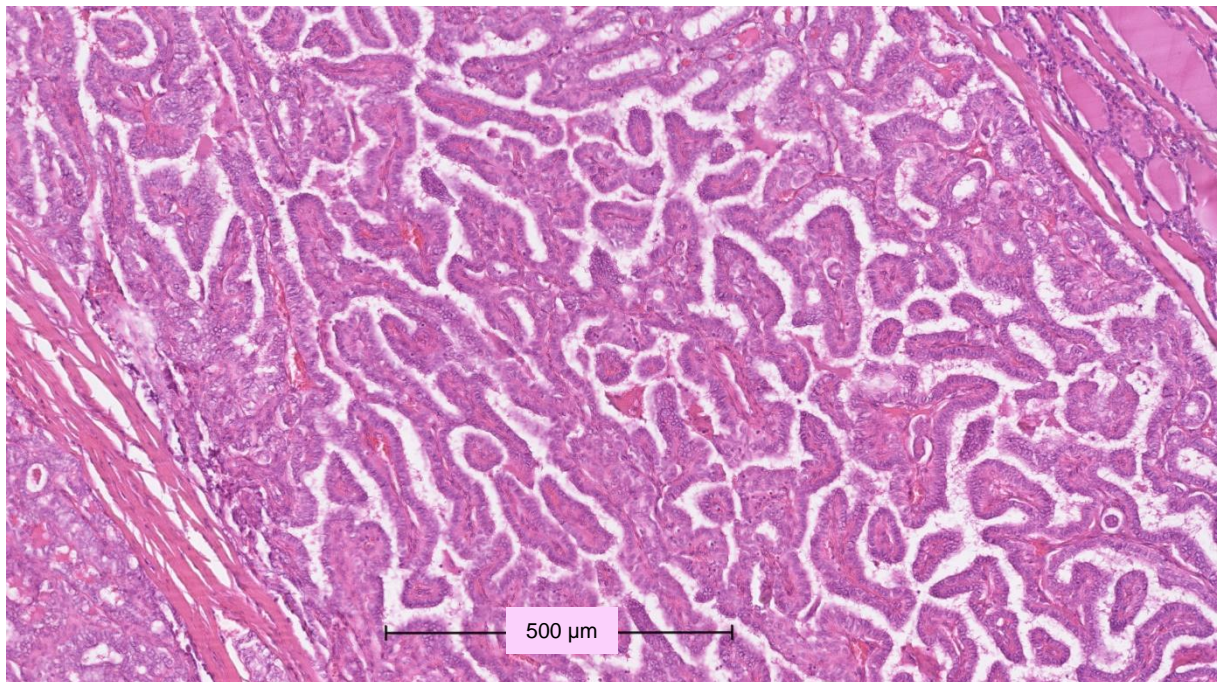


Abbildung 4 - Histologisches Bild eines klassischen/konventionellen PTCs

Die fibrovaskulären Papillienstiele sind überkleidet von neoplastischem Epithel mit den typischen Kernmerkmalen, entsprechend Tabelle 5.

Die Zellkerne befinden sich innerhalb eines blass eosinophilen Zytoplasmas. Mitosen sind selten zu beobachten (Lee, Myers et al. 1985). Typisch für PTCs mit papillärem Wachstumsmuster sind sog. Psammomkörper. Diese entsprechen kalzifizierten Depositionen, die sich im Stroma oder in Lymphgefäßen befinden können (Johannessen and Sobrinho-Simões 1980, Tunio, Hirota et al. 1998). Weitere Merkmale im histologischen Bild sind sekundäre zystische Veränderungen und reichlich fibröses, auch desmoplastisch imponierendes Stromagewebe (Koperek, Asari et al. 2011). Auch können sich eingestreute multinukleäre Riesenzellen zeigen, die am ehesten reaktiv auftreten, wenn Kolloid in den interstitiellen Raum austritt (Guitier and DeLellis 1996).

Zu beachten ist, dass die Kernmerkmale in Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebettetem Gewebe nachweisbar und gut sichtbar sind. Bei Schnellschnitt-Untersuchungen wird das Gewebematerial eingefroren, sodass im Kryoschnitt der charakteristische Befund der Zellkerne nicht sicher erkennbar ist (Synoracki, Ting et al. 2015). Jedoch können aufgrund von morphologischen Tumormerkmalen wie papillärem Wachstumsmuster, invasivem Wachstum, Lymphgefäßinfiltrationen oder Psammomkörperchen auch im Gefrierschnitt PTCs relativ sicher erkannt werden (Synoracki, Ting et al. 2015).

PTCs neigen dazu, in Lymphgefäße einzuwandern, sodass regionale Lymphknotenmetastasen relativ häufig beobachtet werden (LiVolsi 2011, Baloch, Mete et al. 2022). Blutgefäßinfiltrationen kommen selten vor (Hundahl, Cady et al. 2000, Mai, Khanna et al. 2002).

2.3.3.1 Histopathologische Subtypen

Die Klassifikation des in dieser Arbeit untersuchten Kollektivs wurde anhand der WHO-Klassifikation 2017 (4. Edition) vorgenommen und nicht nach dem neuen System der 5. Edition der WHO-Klassifikation reklassifiziert. Allerdings wurden die in dem Kollektiv enthaltenen Mikrokarzinome nach dem histologischen und architekturellen Erscheinungsbild der entsprechenden histomorphologischen Variante zugeordnet. Neben dem konventionellen bzw. klassischen PTC wurden in der WHO-Klassifikation 2017 14 weitere Varianten angegeben (Lloyd, Osamura et al. 2017).

Das papilläre **Mikrokarzinom** wurde in der WHO-Klassifikation 2017 beschrieben, definiert war es durch eine maximale Größe von 1 cm. Aufgrund der günstigen Prognose galt es als eigenständiger Subtyp (Carcangiu, Zampi et al. 1985, Rosai, LiVolsi et al. 2003). Allerdings haben Studien ergeben, dass auch Mikrokarzinome aggressive Tumoreigenschaften aufweisen können (Arora, Turbendian et al. 2009, Park, Kim et al. 2010). In der WHO-Klassifikation 2022 existiert kein eigener Subtyp eines Mikrokarzinoms. Tumoren bis zu einer Größe von 1 cm sollen wie die größeren PTCs nach den jeweiligen pathologischen Kriterien einem Subtyp zugeordnet werden (Baloch, Asa et al. 2022).

Die **gekapselte klassische Variante** ist ein komplett fibrös umkapselter Tumor. Dabei darf die Kapsel fokal auch durch den Tumor infiltriert sein (Schröder, Böcker et al. 1984, Carcangiu, Zampi et al. 1985, Evans 1987). Obwohl regionale Lymphknotenmetastasen vorkommen, neigen diese Tumoren nicht zu Fernmetastasen und weisen eine sehr gute Prognose auf (Schröder, Böcker et al. 1984). Differenzialdiagnostisch müssen bei follikulärer Architektur die bereits vorbeschriebenen WDT-UMP und NIFTP abgegrenzt werden. Zudem besteht die Differenzialdiagnose zu einem follikulären Adenom, welches eine papilläre Hyperplasie aufweisen kann. Allerdings fehlen bei einem Adenom die Kernmerkmale eines PTCs (Chan and Tsang 1995).

Bei der **follikulären Variante** des PTCs kommt histologisch ein (fast) vollständiger Aufbau aus Follikeln zur Darstellung (Abbildung 5). Die Kernveränderungen entsprechen den

Kernmerkmalen eines PTCs (Rosaí, Zampi et al. 1983). Es existieren zwei hauptsächliche Formen, die gekapselte mit nachweisbarer Invasion und die infiltrative Form. Zudem ist eine seltenere diffuse Form beschrieben, die sich diffus innerhalb der ganzen Schilddrüse ausbreiten kann, ohne dass ein distinkt abgrenzbarer Tumor zu detektieren ist (Gupta, Ajise et al. 2012, Lloyd, Osamura et al. 2017). Diese Tumoren weisen ein ungünstigeres biologisches Verhalten auf (Ivanova, Soares et al. 2002, Gupta, Ajise et al. 2012). Auch ungewöhnliche Spielarten wie die makrofollikuläre Variante, bei der die kolloidgefüllten Follikel zystisch erweitert sind, kommen vor (Albores-Saavedra, Gould et al. 1991). Zudem sind Tumoren mit kleinen Follikeln, welche verstreut zwischen nicht neoplastischen Follikeln liegen, beschrieben (sog. „sprinkling sign“) (Vanzati, Mercalli et al. 2013). Zu beachten ist, dass Lymphknotenmetastasen von Primärtumoren der follikulären Variante mitunter eine papilläre Architektur aufweisen können (Carcangiu, Zampi et al. 1985).

In der WHO-Klassifikation 2022 ist die **invasive gekapselte follikuläre Variante des PTCs** als eigenständige Entität aufgeführt und stellt aktuell somit keinen Subtyp des PTCs mehr dar (Baloch, Asa et al. 2022). Die **infiltrative follikuläre Variante des PTCs** gehört weiterhin zu den Subtypen des PTCs (Baloch, Asa et al. 2022, Baloch, Mete et al. 2022).

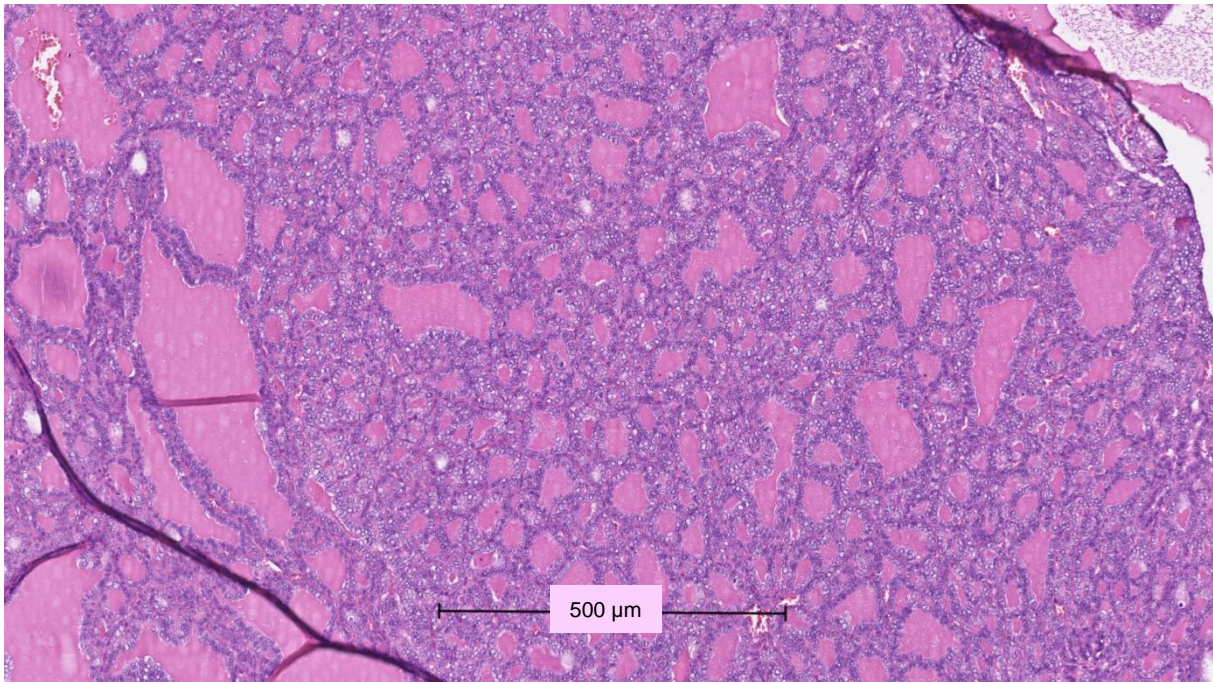


Abbildung 5 - Histologisches Bild des follikulären Subtyps des PTCs

Follikulär aufgebauter Tumor mit PTC-typischen Kernmerkmalen der neoplastischen Epithelien.

Die **diffus sklerosierende Variante** ist charakterisiert durch eine diffuse Tumorerinfiltration, meist ohne Kapsel. Mikroskopisch erkennt man eine Plattenepithelmetaplasie, viele Psammomkörperchen und eine lymphozytäre Entzündung mit Stromafibrose (Chan, Tsui et al. 1987). Diese Variante kommt vor allem bei jungen Frauen vor, bei denen serologisch Zeichen einer Autoimmunthyreoiditis vorliegen können (Fujimoto, Obara et al. 1990). Diese Variante ist mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben assoziiert (Fukushima, Ito et al. 2009, Regalbutto, Malandrino et al. 2011).

Kennzeichnend für die **großzellige Variante** sind Zellen mit einem Verhältnis von Höhe zu Breite von 2 bis 3:1. Die Zytoplasmata sind kräftig eosinophil. Klinisch sind die Tumoren dieser Variante mit einer vermehrten Radiojod-refraktären Erkrankung assoziiert. Zudem weist diese Variante eine ungünstigere Prognose auf (Ghossein and Livolsi 2008, Ganly, Ibrahimasic et al. 2014, Lloyd, Osamura et al. 2017).

Die **kolumnäre Variante** ist gekennzeichnet durch ein pseudostratifiziertes Epithel mit elongierten Kolumnarzellen. Eine extrathyreoidale Ausbreitung ist hier mit einem ungünstigeren biologischen Verhalten des Tumors assoziiert (Wenig, Thompson et al. 1998).

Die **kribriform-Morula-artige Variante**, die noch in der WHO-Klassifikation 2017 eine Variante eines PTCs darstellte, wird in der WHO-Klassifikation 2022 als eigenständiges Karzinom aufgeführt. Dieser Tumor ist häufig mit Syndromen wie der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) assoziiert. Vor allem sind jüngere Frauen betroffen, auch ist eine multifokale Manifestation typisch (Harach, Williams et al. 1994, Cameselle-Teijeiro and Chan 1999, Rohaizak, Jasmi et al. 2003).

Bei der **Hobnail-Variante** finden sich typischerweise papilläre und mikropapilläre Elemente, überkleidet von einem Epithel mit apikalem Zellkern und eosinophilem Zytoplasma. Zudem zeigen sich die Zellen vermehrt diskohäsiv. Diese Variante weist aggressivere Tumoreigenschaften auf (Asioli, Erickson et al. 2010, Asioli, Erickson et al. 2013).

Das **papilläre Karzinom mit Fasciitis-ähnlichem Stroma** ist eine äußerst seltene Variante und besitzt reichliches und zellreiches Stroma. Differenzialdiagnostisch muss eine Transformation in ein anaplastisches Karzinom ausgeschlossen werden (Chan, Carcangiu et al. 1991, Ginter and Scognamiglio 2015).

Die **solide Variante** ist charakterisiert durch überwiegend solides oder auch trabekuläres und nestförmiges Tumorwachstum (Abbildung 6) und kommt häufiger bei Kindern vor, nach Bestrahlung oder nach Exposition gegenüber radioaktiver Strahlung (Nikiforov and Gnepp 1994, Tronko, Bogdanova et al. 1999). Bei Erwachsenen ist diese Variante seltener zu beobachten (Lam, Lo et al. 2005). Wichtig ist die differenzialdiagnostische Abgrenzung gegenüber einem gering differenzierten Karzinom (Volante, Collini et al. 2007).

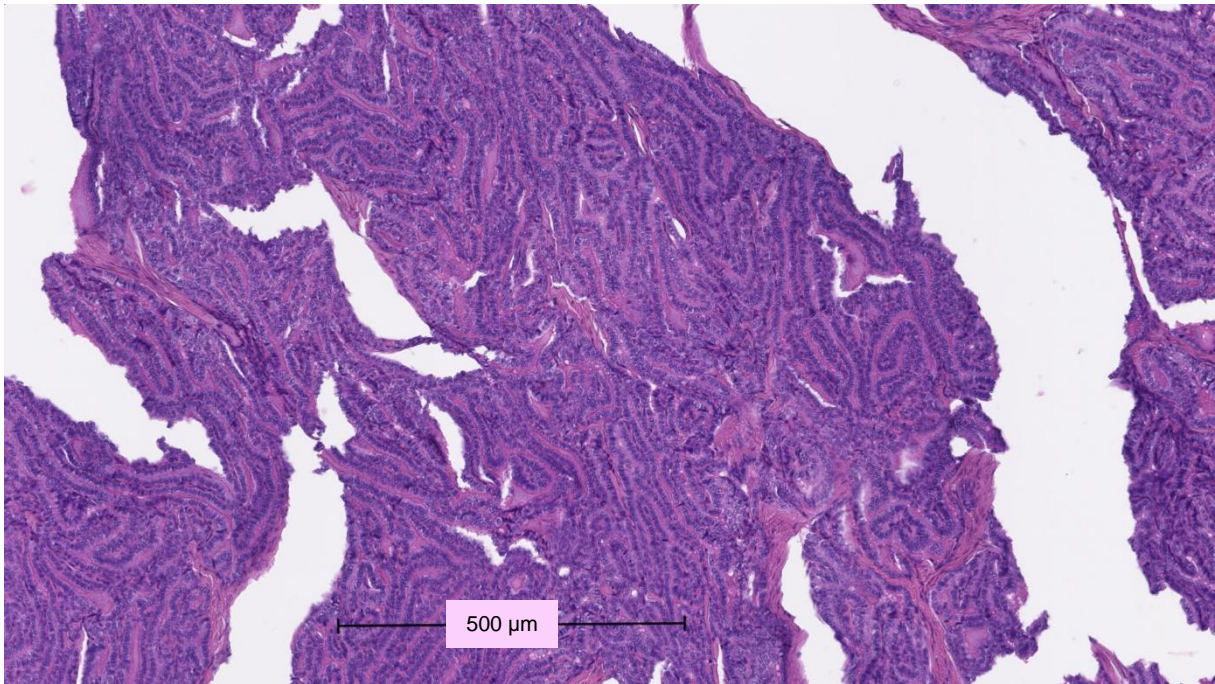


Abbildung 6 - Histologisches Bild des soliden Subtyps des PTCs

Solider Subtyp mit überwiegend trabekulärem Wachstumsmuster.

Die **onkozytäre Variante** ist eine seltene Variante, die durch onkozytäre Tumorzellen charakterisiert ist (Berho and Suster 1997, Mai, Thomas et al. 2004), (Abbildung 7). Diese Variante muss von der großzelligen Variante abgegrenzt werden (Lloyd, Osamura et al. 2017).

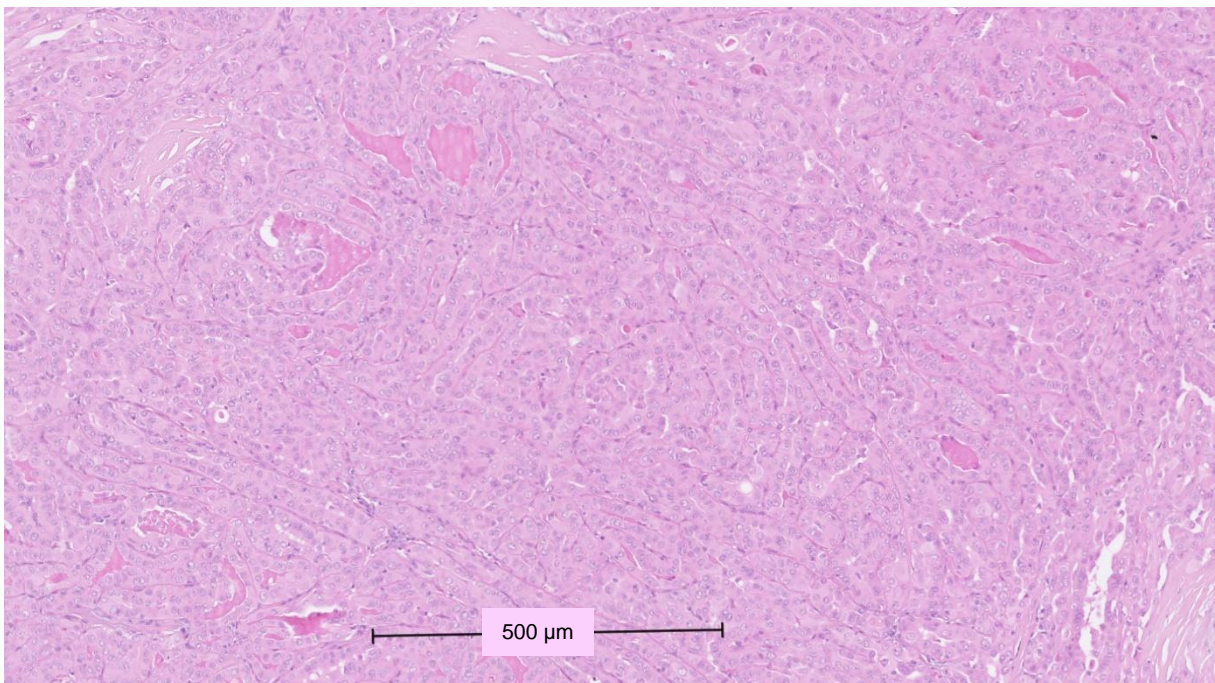


Abbildung 7 - Histologisches Bild des onkozytären Subtyps des PTCs

Der onkozytäre Subtyp eines PTCs ist charakterisiert durch eosinophile Zytoplasmata der neoplastischen Epithelien.

In der **spindelzelligen Variante** findet sich eine vorwiegend spindelzellige Histomorphologie bei metaplastisch veränderten Epithelien (Corrado, Corsello et al. 2014). Differenzialdiagnostisch muss hier ein MTC oder ATC ausgeschlossen werden (Ma, Xia et al. 2015).

Die **klarzellige Variante** weist eine papilläre oder auch solide Architektur auf. Aufgrund der hellzelligen Zytoplasmata muss eine Metastase eines klarzelliges Nierenzellkarzinoms ausgeschlossen werden (Variakojis, Getz et al. 1975).

Die **Warthin-ähnliche Variante** zeigt Ähnlichkeit mit der Morphologie des Warthin-Tumors der Speicheldrüsen. Man erkennt große eosinophile Tumorzellen, die die Papillenstiele bedecken, sowie lymphoplasmazellulär durchwandertes Stromagewebe (Baloch and LiVolsi 1998, Jun, Kim et al. 2016).

2.3.4 Genetisches Profil

Die bedeutendsten genetischen Alterationen bei PTCs resultieren in einer Aktivierung des MAP-Kinase- oder des PI3K-AKT-Signalwegs. Es konnte gezeigt werden, dass sich die jeweiligen Mutationen im Grunde gegenseitig ausschließen (Nikiforov 2011b, Cancer Genome Atlas Research Network 2014). Die Mutationsfrequenz ist in PTCs niedriger als bei Karzinomen anderer Organe (Lawrence, Stojanov et al. 2013, Cancer Genome Atlas Research Network 2014, Lawrence, Stojanov et al. 2014), was auf eine Stabilität des Genoms bei PTCs hinweist (Cancer Genome Atlas Research Network 2014). Die häufigste Mutation, die in PTCs vorkommt, ist eine Mutation im **BRAF**-Gen (Cancer Genome Atlas Research Network 2014). **BRAF**-Mutationen kommen in verschiedenen Tumorentitäten vor, beispielsweise in 50% der Melanome (Ascierto, Kirkwood et al. 2012). Zudem sind **BRAF**-Mutationen in kolorektalen Karzinomen oder anderen proliferativen Erkrankungen wie einer Langerhans-Zell-Histiozytose beschrieben (Loo, Khalili et al. 2018). **BRAF** ist ein Protoonkogen und kodiert für eine Serin/Threonin-Kinase, die den MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg aktiviert. Onkogene Mutationen, wobei die häufigste Mutation die **BRAF^{V600E}**-Mutation darstellt, führen zur konstitutiven Aktivierung des Signalweges. Weitere, seltenere Mutationen in dem **BRAF**-Kodon 600 sind beschrieben (Cantwell-Dorris, O'Leary et al. 2011). Die **BRAF^{V600E}**-Mutation führt zu einer dauerhaften Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs mit Steigerung des ERK-Transkriptionsprogramms. Bei vorliegender **BRAF^{V600E}**-Mutation ist der Mechanismus des negativen Feedbacks von ERK aufgehoben (Cancer Genome Atlas Research Network 2014), (Abbildung 8). Die Ergebnisse des Cancer Genome Atlas Research Network zeigen, dass 61,7% der papillären Schilddrüsenkarzinome **BRAF**-Mutationen aufweisen (Cancer Genome Atlas Research Network 2014). Die **BRAF^{V600E}**-Mutation kommt weder in gutartigen Schilddrüsenknoten noch in follikulären Schilddrüsenkarzinomen vor. Gleichwohl konnte gezeigt werden, dass eine **BRAF^{V600E}**-Mutation in PTCs oder ATCs vorkommen kann, mit der Einschränkung, dass diese durch Progression aus PTCs entstanden sind. Somit gilt, dass bei Nachweis der **BRAF^{V600E}**-Mutation eine Manifestation eines PTCs vorliegt (Nikiforova, Kimura et al. 2003, Nikiforov 2011b, Klöppel, Kreipe et al. 2015).

In 12,9 % der Fälle des durch das Cancer Genome Atlas Research Network untersuchten Kollektivs konnten **RAS**-Mutationen in PTCs in den **RAS**-Kodons 12 und 61 detektiert werden (Cancer Genome Atlas Research Network 2014). Das Ras-Protein ist ein membranassoziiertes Protein mit den Isoformen **HRAS**, **KRAS** und **NRAS**, welches eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion einer Zelle einnimmt (Bauer, Cuvelier et al. 2021). **RAS**-Mutationen kommen bei Pankreas- und Lungenkarzinomen oder kolorektalen Karzinomen vor, bei diesen Entitäten ist überwiegend die **KRAS**-Isoform beteiligt (Kleeff, Korc et al. 2016, Reck, Carbone et al. 2021, Zhu, Pei et al. 2021). Bei malignen Melanomen kommen etwa in einem Viertel der Fälle **NRAS**-Mutationen vor (Pracht, Mogha et al. 2015).

RAS-Proteine fungieren als molekulare Regler, da sie sich entweder im aktiven GTP-gebundenen oder im inaktiven GDP-gebundenen Zustand befinden. Somit ist die Aktivität des RAS-Proteins durch Hydrolyse von GTP-gebundenem RAS zu GDP-gebundenem RAS reguliert (Hobbs, Der et al. 2016). Bei Punktmutationen im *RAS*-Gen können onkogene Allele entstehen, wobei entweder die Affinität zu GTP steigt oder die intrinsische GTP-ase Funktion inhibiert wird. Somit behält das RAS-Protein seine Aktivität und es kommt zur konstitutiven Aktivierung sowohl des MAP-Kinase- als auch des PI3K-AKT-Signalwegs (Simanshu, Nissley et al. 2017). Die Aktivierung dieser Signalwege führt zu Zelldifferenzierung, Zellwachstum und Proliferation. Zudem wird ein antiapoptotischer Weg aktiviert, der in der Endstrecke in einer *BCL2*-Überexpression resultiert und die Apoptose inhibiert (Cancer Genome Atlas Research Network 2014), (Abbildung 8). In gesunden Zellen wird die Aktivierung der Signalwege reguliert. Mutationen im Protoonkogen *RAS* können hingegen durch die konstitutive Aktivierung der Signalwege zur Tumorentstehung führen (Xing 2010, Howell, Hodak et al. 2013, Simanshu, Nissley et al. 2017).

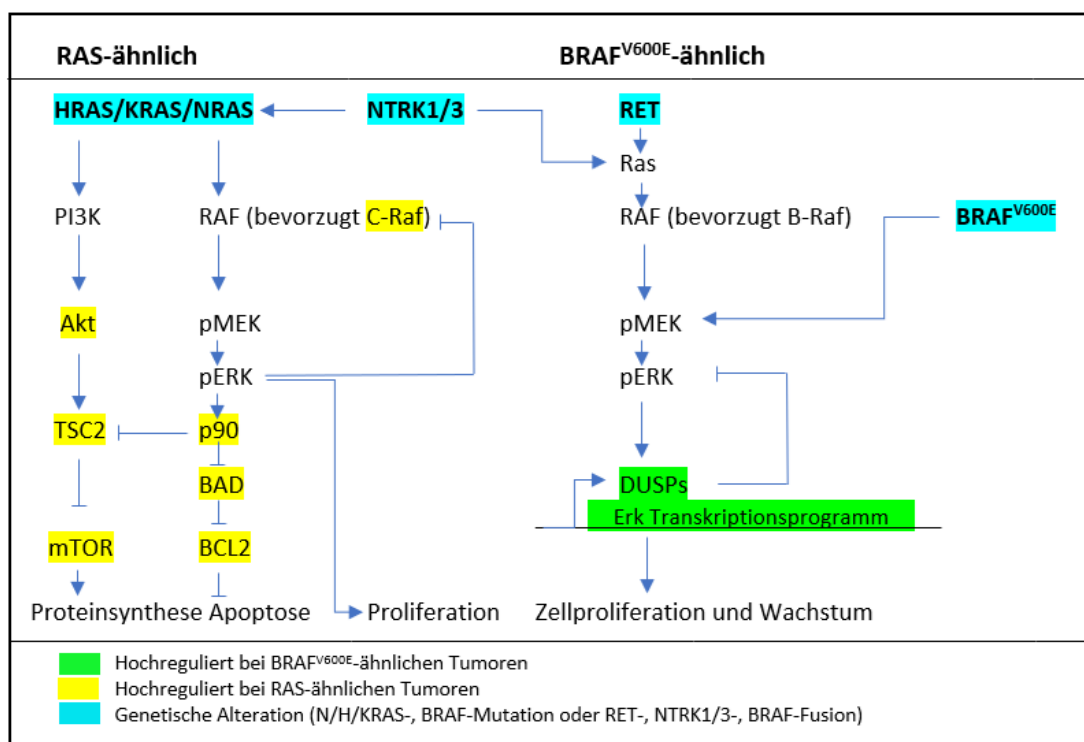


Abbildung 8 - Signaltransduktionswege bei RAS- und BRAF^{V600E}-ähnlichen PTCs

Bildquelle: modifiziert nach (Cancer Genome Atlas Research Network 2014)

Ferner kommen *EIF1AX*-Mutationen in etwa 1,5-2,3 % der PTCs vor. Das *EIF1AX*-Gen kodiert für den eukaryotischen Initiationsfaktor 1A-X, welcher bei der Proteintranslation eine Rolle spielt (Cancer Genome Atlas Research Network 2014).

Mutationen im *PI3K*- und *PPARgamma*-Signalweg betreffen etwa 4,5% der PTCs. In diese Gruppe gehören Mutationen in *PTEN*, *AKT1/2* und *PAX8/PPARG* (Cancer Genome Atlas Research Network 2014).

Mutationen in Tumorsuppressorgenen wie *TP53* kommen in PTCs selten vor (3,7 %) (Cancer Genome Atlas Research Network 2014). Jedoch können differenzierte Schilddrüsenkarzinome durch eine zusätzliche *TP53*-Mutation zu einem aggressiveren Tumortyp fortschreiten (Salvatore, Celetti et al. 1996, Quiros, Ding et al. 2005).

TERT-Promotor-Mutationen sind ebenfalls bei etwa 5-15% der PTCs beschrieben, vor allem spielen diese bei fortgeschrittenem Tumorleiden eine Rolle (Xing, Liu et al. 2014, Bullock, Ren et al. 2016). Zuerst wurden *TERT*_p-Mutationen in malignen Melanomen beschrieben (Horn, Figl et al. 2013). Darüber hinaus kommen diese neben Schilddrüsenkarzinomen (Panebianco, Nikitski et al. 2019) auch in Tumoren des zentralen Nervensystems wie in Glioblastomen, Oligodendrogliomen und Medulloblastomen oder auch in Tumoren des Urogenitaltrakts und in hepatozellulären Karzinomen vor (Huang, Wang et al. 2015). Bekannt sind zwei Mutationen in Chromosom 5, C228T (c.-124C > T) und C250T (c.-146C > T), die dazu führen, dass eine neue Bindungsstelle entsteht, an welche weitere *ETS*-Transkriptionsfaktoren binden und zu einer erhöhten *TERT*-Expression führen können (Panebianco, Nikitski et al. 2019). *TERT*_p-Mutationen bei PTCs scheinen mit einem höheren Alter und mit ungünstigen Tumoreigenschaften wie einem höheren Rezidivrisiko assoziiert zu sein (Liu, Bishop et al. 2013, Cancer Genome Atlas Research Network 2014, Muzza, Colombo et al. 2015). *TERT*_p-Mutationen kommen auch in Kombination mit anderen Mutationen wie *BRAF*-Mutationen vor (Melo, da Rocha et al. 2015, Muzza, Colombo et al. 2015). Studien zeigen, dass *BRAF*-Mutationen in Kombination mit *TERT*_p-Mutationen mit aggressiveren Tumoreigenschaften einhergehen können als mit nur einer nachweisbaren Mutation (Vuong, Altibi et al. 2017). Liu, Zhang et al. (2018) beschreiben die Regulation des mutierten *TERT*-Promotors über eine durch das mutierte *BRAF*^{V600E}-Gen aktivierte Signalkaskade. Hierbei wird über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors FOS die Genexpression von *GABPB* gesteigert. Durch Bildung des *GABPA-GABPB*-Komplexes wird die *TERT*-Expression über Bindung an den mutierten *TERT*-Promotor erhöht (Liu, Zhang et al. 2018).

Neben Punktmutationen sind auch Genfusionen beschrieben, wobei neben den am häufigsten vorkommenden Fusionen mit Beteiligung von ***RET*** auch Fusionen mit Beteiligung von ***NTRK3***, ***NTRK1*** und ***ALK*** auftreten (Cancer Genome Atlas Research Network 2014). Chromosomale Rearrangements kommen häufiger nach Strahlenexposition und im Kindesalter vor (Rabes 2001). ***PAX8/PPARG***_{gamma}-Rearrangements, die zuerst in follikulären Karzinomen gefunden wurden, sind auch bei PTCs bekannt (Cancer Genome Atlas Research Network 2014). Diese Alterationen sind mit einer vermehrten Gefäßinvasion assoziiert und kommen im Rahmen der PTCs vor allem beim follikulären Subtyp vor (Castro, Rebocho et al. 2006). Auch Fusionen mit Beteiligung des *BRAF*-Gens sind beschrieben (Cancer Genome Atlas Research Network 2014).

Es konnte gezeigt werden, dass die genetischen Alterationen mit unterschiedlichen Phänotypen einhergehen. Während *BRAF*-Mutationen gehäuft bei klassischen PTCs und der großzelligen Variante vorkommen und auch *RET/PTC*-Rearrangements mit einem klassischen PTC assoziiert sind (Adeniran, Zhu et al. 2006, Cancer Genome Atlas Research Network 2014), treten *RAS*-Mutationen und auch *EIF1AX*-Mutationen vor allem bei dem follikulären Subtyp auf (Cancer Genome Atlas Research Network 2014, Karunamurthy, Panebianco et al. 2016). *TERT*_p-Mutationen können in allen histologischen Subtypen detektiert werden (Cancer Genome Atlas Research Network 2014).

Es sind zwar zahlreiche Mutationen in PTCs beschrieben, allerdings sind wenige Marker bekannt, die eine sichere Vorhersage bezüglich eines Rezidivs geben. In einer Publikation von Barros-Filho, de Mello et al. (2020) ist die Überexpression von *GADD45B* (Growth arrest and DNA damage-inducible, beta) mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben korreliert. Zudem beschreibt Barros-Filho, dass bei Auswertung der RNA-Sequenzierungsdaten der TCGA-Datenbank bei Analyse von 490 Fällen die Expression von *GADD45B* bei Patienten/Patientinnen mit einem kürzeren Gesamtüberleben erhöht war. Es ergab sich keine Assoziation der *GADD45B*-Expression mit dem Risiko eines Rezidivs (Barros-Filho, de Mello et al. 2020).

2.3.5 Prognose

Differenzierte Schilddrüsenkarzinome weisen im Allgemeinen eine sehr gute Prognose auf. Die 5-Jahresüberlebensrate von an einem PTC erkrankten Patienten/Patientinnen in den USA betrug zwischen 2013 und 2019 99,7% (Surveillance Research Program 2023c). Es haben sich prognostische Faktoren herausgebildet, die mit einer erhöhten Mortalitätsrate einhergehen. Dazu gehören der individuelle Faktor des Alters sowie tumorbezogene Faktoren wie extrathyreoidale Ausbreitung, Fernmetastasierung und eine Tumgröße von über 4 cm (Shaha, Shah et al. 1996). Die Überlebensrate ist somit abhängig vom klinischen Krankheitsstadium (Tabelle 4). Bei fernmetastasiertem Stadium eines PTCs betrug die 5-Jahresüberlebensrate in den USA in dem Zeitraum von 2013 bis 2019 74,2% (Surveillance Research Program 2023a). Ein kleiner Anteil der Patienten/Patientinnen weist einen aggressiveren Krankheitsverlauf mit Neigung zu Rezidiven und einer Radiojod-refraktären Erkrankung auf (Sciuto, Romano et al. 2009). Zu verstehen, welche biologischen Mechanismen zu einem aggressiveren oder weniger aggressiven Verlauf führen, kann in Zukunft auf die Therapie, welche operative Methoden, adjuvante Maßnahmen wie die Radiojodtherapie (Craig, Stretch et al. 2023) sowie mögliche zielgerichtete Therapien einschließt, Einfluss nehmen.

2.3.6 Therapie

Im Jahr 2018 wurde eine S3-Leitlinie „Schilddrüsenkarzinom“ neu angemeldet. Insbesondere aufgrund der intensiven Forschung auf dem Gebiet der differenzierten Schilddrüsenkarzinome besteht infolge der neuen Forschungsergebnisse die Notwendigkeit einer kritischen Begutachtung des bestehenden Verfahrens bezüglich Diagnostik, Therapie und Nachsorge (AWMF online 2018). Auch haben die neuen molekularpathologischen Erkenntnisse in der Schilddrüsenkarzinomforschung Einzug in die pathologische Nomenklatur und Klassifikation erhalten, wobei sich Änderungen insbesondere bei den PTCs ergeben haben. Zudem ist bisher keine nationale S3-Leitlinie etabliert (AWMF online 2018). Eine evidenzbasierte Versorgungsleitlinie wäre bezüglich der interdisziplinären Zusammenarbeit, die vor allem die Abteilungen Endokrine Chirurgie, Endokrinologie, Nuklearmedizin und Pathologie betrifft (AWMF online 2018), wichtig und wünschenswert.

Im Jahr 2015 wurden von der American Thyroid Association (ATA) Leitlinien zur Behandlung von Schilddrüsenmalignomen herausgebracht (Haugen, Alexander et al. 2016). Zudem wurden im Jahr 2017 die Stadieneinteilungen durch das American Joint Committee on Cancer aktualisiert (Tuttle, Haugen et al. 2017). Schilddrüsenkarzinome können abhängig von der klinischen Präsentation und den Tumoreigenschaften entsprechend des Rezidivrisikos in low risk, intermediate risk und high risk Karzinome eingeteilt werden (Araque, Gubbi et al. 2020), siehe auch Tabelle 6.

2.3.6.1 Operative Therapie

Die Behandlung eines differenzierten Schilddrüsenkarzinoms schließt in der Regel eine chirurgische Therapie ein, wobei eine Hemithyreoidektomie, eine subtotale Thyreoidektomie oder totale Thyreoidektomie durchgeführt werden kann. Zudem kann eine Lymphknoten-dissektion erfolgen (Araque, Gubbi et al. 2020). In der im Jahr 2012 verabschiedeten S2k-Leitlinie zur "Operativen Therapie maligner Schilddrüsenenerkrankungen" der Deutschen Gesellschaft für Allgemein- und Viszeralchirurgie (DGAV) wurde vor allem auf die prognostisch günstigen papillären Mikrokarzinome eingegangen, um eine Übertherapie zu vermeiden und das chirurgische Vorgehen bei diesen „low risk“ Karzinomen zu begrenzen (Dralle, Musholt et al. 2013). Hierbei wurde empfohlen, bei Karzinomen ≤ 10 mm ohne regionale Lymphknotenmetastasen oder Fernmetastasen keine totale Thyreoidektomie und auch keine

prophylaktische Lymphknotenresektion durchzuführen, bei solitären Tumoren ≤ 10 mm ist eine Hemithyreoidektomie ausreichend (Dralle, Musholt et al. 2013).

Bei Erwägen einer umfangreichen Operation (mit totaler Thyreoidektomie und Lymphknoten-dissektion) sollte eine Evaluation der Operationsrisiken wie Verletzung des N. laryngeus recurrens oder iatrogener Hypoparathyreoidismus erfolgen und kritisch abgewogen werden (Dralle, Musholt et al. 2013). Entsprechend der genannten deutschen Leitlinie zur operativen Versorgung bösartiger Schilddrüsentumoren rechtfertigt ein PTC von über 10 mm sowie ein metastasiertes PTC eine totale Thyreoidektomie (Dralle, Musholt et al. 2013). Bei klinisch lymphonodal metastasiertem PTC sollte die totale Thyreoidektomie mit einer Lymphknoten-dissektion des zentralen Kompartiments kombiniert werden und bei klinisch-bildgebend suspekten Lymphknoten des lateralen Kompartiments ist eine laterale Lymphknotendissektion der betroffenen Seite und gegebenenfalls der Gegenseite empfohlen, wenn zahlreiche Metastasen in zentralen Lymphknoten bestehen (Dralle, Musholt et al. 2013). Ohne klinischen Verdacht auf Lymphknotenmetastasen ist keine prophylaktische Lymphknotendissektion empfohlen (Dralle, Musholt et al. 2013).

Eine erneute Operation bei inzidentell gefundenem PTC ist notwendig, wenn der Tumor in der primären Operation nicht vollständig entfernt wurde oder das primäre Resektionsausmaß nicht hinreichend für die Tumorausdehnung war (Dralle, Musholt et al. 2013). Bei irresektablen Tumoren aufgrund der anatomischen Nähe zur Trachea oder dem N. laryngeus recurrens sollte anstatt des chirurgischen Eingriffs eine Radiojodtherapie erwogen werden (Dralle, Musholt et al. 2013).

Die Leitlinien der American Thyroid Association (ATA) von 2015 unterstützen zudem auch die Möglichkeit einer Hemithyreoidektomie bei Tumoren zwischen 1-4 cm Größe sowie die Möglichkeit einer Active Surveillance als Behandlungsstrategie bei sog. Mikrokarzinomen (< 1 cm Größe) ohne direkte Notwendigkeit einer Biopsie oder eines chirurgischen Eingriffs (Brito, Ito et al. 2016). Das Memorial Sloan Kettering Cancer Center hat dazu ein System entwickelt, um die klinische Entscheidungsfindung bezüglich einer Active Surveillance zu erleichtern und eine geeignete Gruppe von Erkrankten für diese Behandlungsstrategie herauszufiltern (Brito, Ito et al. 2016), wobei Tumoreigenschaften wie ein solitärer, gut umschriebener Tumor, Eigenschaften wie Alter über 60 Jahre und Bereitschaft zur Wahrnehmung von Verlaufskontrollen sowie medizinische Voraussetzungen in Form eines erfahrenen multidisziplinären Ärzteteams und Möglichkeit einer hochwertigen Ultraschalluntersuchung einfließen (Brito, Ito et al. 2016). Bei Vergrößerung des Tumordurchmessers (um mindestens 3 mm) oder des Tumorumfanges (um mindestens 50 %) und neu aufgetretenen suspekten Lymphknoten in den Verlaufskontrollen sollte hier eine chirurgische Therapie erwogen werden (Tuttle, Fagin et al. 2017).

2.3.6.2 Radiojodtherapie

Die Radiojodtherapie basiert darauf, dass radioaktiv-markiertes Jod (^{131}I) in Schilddrüsengewebe oder differenzierten Schilddrüsentumoren über den Natrium-Jodid-Symporter (NIS) in die Zellen aufgenommen wird und durch die Radioaktivität das Gewebe zerstört wird (Araque, Gubbi et al. 2020). Nach den Leitlinien der American Thyroid Association von 2015 wird diese Therapie angewendet, um residuales Schilddrüsengewebe zu abladien, um adjuvant zu therapieren oder um residuale Tumoranteile zu zerstören (Haugen, Alexander et al. 2016). Jedoch kann sich eine Radiojod-refraktäre Tumorerkrankung entwickeln, bei der das Tumorgewebe kein radioaktives Jod mehr aufnimmt, dieses wird resistent gegen die Therapie (Paschke, Lincke et al. 2015, Araque, Gubbi et al. 2020). Die American Thyroid Association empfiehlt die Ablation von residualem Schilddrüsengewebe nicht routinemäßig

nach Thyreoidektomie bei Patienten/Patientinnen mit low risk Karzinomen (Haugen, Alexander et al. 2016), siehe auch Tabelle 6.

Eine adjuvante Radiojodtherapie sollte bei intermediate risk Karzinomen nach Thyreoidektomie erwogen werden und ist routinemäßig bei high risk Karzinomen nach Thyreoidektomie durchzuführen (Haugen, Alexander et al. 2016). Die Entscheidung für eine Radiojodtherapie sollte interdisziplinär getroffen werden (Haugen, Alexander et al. 2016, Araque, Gubbi et al. 2020). Die European Association of Nuclear Medicine und Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging befürworteten die Mitunterzeichnung der ATA Leitlinien 2015 allerdings nicht, da unterschiedliche Einschätzungen bezüglich der Radiojodtherapie und -diagnostik bestanden (Verburg, Aktolun et al. 2016).

Eine deutsche Leitlinie, die die internationalen Daten einbezieht, liegt bislang nicht vor. Auch die Rolle der molekularen Biomarker zur Entscheidungsfindung bezüglich einer Radiojodtherapie muss noch evaluiert und etabliert werden, hierzu liegen bislang keine eindeutigen Empfehlungen vor (Haugen, Alexander et al. 2016). Ein Ziel wäre es, dass molekulare Biomarker abhängig von ihrem Einfluss auf den klinischen Verlauf in ein Risikostratifizierungssystem integriert werden.

Tabelle 6 - Risikostratifizierung zur Diagnostik und Therapie bei DTCs

Kategorien	Tumoreigenschaften	Minimaler operativer Eingriff	Radiojodtherapie
Low risk	Intrathyreoidale Lage, vollständig entferntes PTC, gekapselte follikuläre Variante des PTCs	Hemi-Thyreoidektomie	Üblicherweise keine
	Keine Fernmetastasen		
	Kein aggressiver histologischer Subtyp (großzellige, kolumnäre oder Hobnail-Variante)		
	Intrathyreoidales FTC mit Kapselinvasion und/oder < 4 Foci mit Gefäßinvasion		
	Klinischer N0-Status oder pathologischer N1-Status mit ≤ 5 Mikro-metastasen		
Intermediate risk	PTC mit mikroskopischer extrathyreoidaler Ausbreitung, Gefäßinvasion	Totale Thyreoidektomie	Sollte als relevante Therapieoption betrachtet werden; in Abhängigkeit von Faktoren wie Alter, aggressiver Histologie, lateralen Lymphknotenmetastasen zu erwägen
	Inkompletter Therapieerfolg		
	Klinischer N1-Status oder pathologischer N1-Status mit > 5 Lymphknotenmetastasen < 3 cm		

Kategorien	Tumoreigenschaften	Minimaler operativer Eingriff	Radiojodtherapie
High risk	Ausgedehnte makroskopische extrathyroidale Ausbreitung	Totale Thyreoidektomie	Ja
	Inkomplette Tumorentfernung		
	Fernmetastasen		
	Lymphknotenmetastasen ≥ 3 cm		
	FTC mit ausgedehnter Gefäßinvasion		
Risikostratifizierung zur Diagnostik und Therapie von DTCs der American Thyroid Association, modifiziert nach (Patel, Yip et al. 2020)			

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Hersteller

Tabelle 7 - Geräte und Hersteller

Geräte	Hersteller	Anwendung
Eppendorf Pipette Research® plus, 8-Kanal, 30-300 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Pipette
Eppendorf Pipettenkarussell mit Eppendorf Pipetten Research® plus 1-Kanal (0,1 – 2,5 µl, 0,5 – 10 µl, 2 – 20 µl, 10 – 100 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1.000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Pipette
Gel Doc XR+ UV Gel Documentation Imaging System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA	Geldokumentation
Heraeus Megafuge 1.0R Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Zentrifuge
Isofreeze cooling PCR rack	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland	Kühlrack für Reaktionsgefäße
Isofreeze cooling rack, 24 Positionen, 0,5 1,5/2,0ml Röhrrchen	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland	Kühlrack für Reaktionsgefäße
Leica TYPE 020-519.011 DMLB 100S	Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Deutschland	Mikroskopieren
Magnetrührer mit Heizung, MR 3001 K	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland	Herstellung des Agarosegels
Magnetständer-96	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Herstellung der DNA-Bibliotheken
Maxwell® RSC Instrument	Promega, Madison, WI, USA	RNA-Extraktion
Mikrowelle 800	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland	Herstellung des Agarosegels

Geräte	Hersteller	Anwendung
Mikrozentrifuge, Micro Star 17R	VWR International bv, Leuven, Belgien	Tischzentrifuge
MiSeq™-System	Illumina, San Diego, CA, USA	Sequenzierung (NGS)
Nanozoomer XP series	Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan	Einscannen der HE-Gewebeschnitte
NextSeq™ 500-System	Illumina, San Diego, CA, USA	Sequenzierung (NGS)
PowerPac™ Basic Netzgerät	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA	Agarose-Gelelektrophorese
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Genexpressionsanalyse
Qubit™ Fluorometer	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	DNA-/RNA-Konzentrationsmessung
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Heizblock für RNA-Extraktion
Veriti™ Thermal Cycler, 96-Well	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	PCR
Vortex-Genie™ 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York, USA	Reagenzglas-Schüttler ("Vortexmischer")
Waage ALC-2100.2	Acculab, Sartorius Lab Instruments, Göttingen, Deutschland	Abwiegen (Agarose)
Wide Mini-Sub Cell GT Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA	Agarose-Gelelektrophorese
Wide Mini-Sub Cell GT Mini Handcasting Kit	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA	Agarose-Gelelektrophorese

3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8 - Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
0.8-ml-Lagerungsplatte	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Axygen® PCR Tubes 0,5 ml	Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA
Einmal-Skalpell Fig. 15	Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka Japan
Eppendorf Safe-Lock Tubes – Reaktionsgefäße 1,5 ml/2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Filterspitzen (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Starlab International, Hamburg, Deutschland
KIMTECH® Tuch	Kimberly-Clark, Dallas, USA
MicroAmp™ optische 96-Well-Reaktionsplatte	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MicroAmp™ optische Klebefolie	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
Objektträger (mit Mattrand)	Diagonal, Münster, Deutschland

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
PCR TW 8-Tube Strip, 0.2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Petrischale, 94/16 mm	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Schraubröhre, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

3.3 Reagenzien, Lösungen und Puffer

Tabelle 9 - Reagenzien, Lösungen und Puffer

Reagenzien, Lösungen und Puffer	Hersteller
100 bp DNA Ladder	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Bromphenol blue	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
DNA-Exitus Plus™	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
DNTP-Set (100 mM)	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ethanol ≥99.8 %	Lab Honeywell, Diagonal, Münster, Deutschland
HPLC-Wasser	Mallinckrodt Baker Deutschland, Griesheim, Deutschland
M-MLV Reverse Transcriptase	Promega, Madison, WI, USA
M-MLV RT 5X Buffer	Promega, Madison, WI, USA
Orange G	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
peqGREEN, DNA/RNA-Farbstoff	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
QIAseq Beads	Qiagen, Hilden, Deutschland
Random Primers	Promega, Madison, WI, USA
RNasin® Plus Ribonuclease Inhibitor	Promega, Madison, WI, USA
Sodium Hydroxide Solution, 2M NaOH	Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Deutschland
Sucrose	Serva Elektrophorsis Heidelberg, Deutschland
SYBR™ Green PCR Master Mix	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tris-Puffer (1 M) pH 8	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
UltraPure™ Agarose	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
UltraPure™ TBE Puffer, 10X	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 10 - Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese	Zusammensetzung
6x Ladepuffer	1 ml 3 % Bromphenol blau 1 ml 3% Xylencyanol 0,4 g Orange G 40 g Sucrose Gelöst in HPLC-Wasser (aufgefüllt bis 100 ml)

3.4 Kits

Tabelle 11 - Kits

Kit	Hersteller	Anwendung
Maxwell® RSC RNA FFPE Kit	Promega, Madison, WI, USA	RNA-Extraktion
MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycles)	Illumina San Diego, CA, USA	Sequenzierung (NGS)
NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 cycles)	Illumina San Diego, CA, USA	Sequenzierung (NGS)
QIAseq 96-Index I Set B (384)	QIAGEN, Hilden, Deutschland	Herstellung der DNA-Bibliotheken
QIAseq Targeted DNA Custom Panel (96) - 301-400 (nNGM 2.0 Panel CDHS-32375Z-340)	QIAGEN, Hilden, Deutschland	Herstellung der DNA-Bibliotheken
Qubit™ dsDNA BR Assay Kit	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Konzentrationsmessung DNA
Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Konzentrationsmessung DNA
Qubit™ RNA HS Assay Kit	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Konzentrationsmessung RNA

3.5 Software für Labor, Auswertung und Datenverarbeitung

Tabelle 12 - Software für Labor, Auswertung und Datenverarbeitung

Programm	Hersteller	Anwendung
Adobe Photoshop CS2 9.0	Adobe Inc., San José, Kalifornien, USA	Beschriftung der Agarosegele
CLC Genomics Workbench 12.0	QIAGEN, Hilden Deutschland	Auswertung Sequenzierdaten
EndNote 20	Clarivate Analytics, Philadelphia, Pennsylvania, USA	Literaturverwaltung
IBM® SPSS® Statistics Version 27	IBM Corporation, Armonk, New York, USA	Statistische Auswertung
Illumina Experiment Manager 1.15.1	Illumina, San Diego, CA, USA	Erstellung Sample Sheet für die Sequenzierung
Klinisches Arbeitsplatzsystem SAP	SAP Deutschland SE & Co. KG, Walldorf, Deutschland	Datenbank für klinische Daten
Microsoft Office Professional Plus 2019 Microsoft Word 2019 Microsoft Excel 2019	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland	Datensammlung, Datenauswertung, Diagrammerstellung
NDP.view2	Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan	Visualisierung eingescannter HE-Gewebeschnitte
PathoPro Version 9.0.9070	ifms GmbH, Saarbrücken, Deutschland	Datenbank für histopathologische Daten
Quantity One 4.6.9	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA	Geldokumentation

Programm	Hersteller	Anwendung
QuantStudio™ Design & Analysis Software – Version 1.5.1	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Genexpressionsanalyse
Qubit Data Logger 1.1.7	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Konzentrationsmessung von DNA und RNA
REST Software 2009 V2.0.13	M. Pfaffl (Technische Universität München) und QIAGEN, Hilden Deutschland	Auswertung Genexpressionsanalysen

3.6 Kollektiv der Studie

Diese Arbeit ist Teil eines Kooperationsprojektes zwischen der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie und dem Institut für Pathologie der UM. In dieser Arbeit wurde ein Kollektiv von 170 Patienten/Patientinnen mit PTCs, die an der UM in den Jahren 2008 bis 2018 operiert und weiterbehandelt wurden, untersucht und das Tumorgewebe molekularpathologisch analysiert. Das Tumorgewebe wurde bei operativen Eingriffen durch die Sektion Endokrine Chirurgie der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie an der UM entnommen und im Institut für Pathologie der UM analysiert und archiviert.

Voraussetzungen für den Einschluss in die Studie war die Einwilligung der Patienten/Patientinnen und das Vorliegen von ausreichendem und qualitativ geeignetem Tumorgewebe für die molekularpathologischen Untersuchungen. Ausgeschlossen wurden Personen mit zusätzlich vorliegenden gering differenzierten (PTCD) und undifferenzierten Karzinomen (ATC) der Schilddrüse. Für die Analysen lagen ein positives Votum der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz (Bearbeitungsnummer 837.120.15 (9888)) und die Einwilligungserklärung aller eingeschlossenen Patienten/Patientinnen vor. Vor der Analyse wurden die patientenbezogenen Daten anonymisiert. Die Durchführung der Studie basiert auf den ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen (Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes). Der Einschluss in die Studie erfolgte prospektiv. Neben primären PTCs wurde auch Tumorgewebe von Metastasen und Rezidiven inkludiert. Bei 17 Patienten/Patientinnen (10%) fand der initiale chirurgische Eingriff in einer externen Klinik statt. Der sekundäre chirurgische Eingriff bei diesen Studienteilnehmern/teilnehmerinnen wurde dann an der UM durchgeführt. Diese Fälle wurden mit dem sekundären Eingriff in die Studie eingeschlossen. Das hier untersuchte Kollektiv entspricht im Wesentlichen dem Fallkollektiv der Veröffentlichung von Staubitz, Müller et al. (2023), jedoch wurden unter Betrachtung ausschließlich vollständiger Datensätze in Bezug auf den RAS-Mutationsstatus in der vorliegenden Arbeit einzelne Patienten/Patientinnen mit unzureichender Probenqualität in der NGS-Analyse ausgeschlossen. Die Analysen dieser Arbeit basieren auf dem unten beschriebenen Fallkollektiv (Tabelle 28) und können vereinzelt geringe Unterschiede zu der genannten Publikation aufweisen.

Die histopathologischen Daten stammten aus der Datenbank PathoPro des Instituts für Pathologie der UM. Die pathologische Beurteilung schloss auch die TNM-Klassifikation ein. Die klinischen Daten des Follow-ups einschließlich Angaben zu Rezidiven, Tod, Radiojodtherapie, Radiojod-refraktärer Erkrankung und Fernmetastasen wurden von (Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der UM) zur Verfügung gestellt.

Das Tumorgewebe lag als Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes (FFPE) Material vor. Für die genetischen Analysen war DNA des Tumorgewebes erforderlich. Die DNA-Gewinnung und die Analyse des *BRAF*^{V600E}-Mutationsstatus wurde im Rahmen des diagnostischen Arbeitsablaufs durch das Institut für Pathologie und durch (Institut für Pathologie der UM) mittels des Maxwell RSC FFPE-Kit (Promega, Madison, WI, USA) sowie allelspezifischer PCR-Amplifikation (Sapio, Posca et al. 2006) an 4 µm dicken Gewebeschnitten des FFPE-Materials durchgeführt, sodass die Daten über den *BRAF*-Mutationsstatus auch für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen zur Verfügung standen. Auch der *TERT*_p-Mutationsstatus wurde von bestimmt und zur Verfügung gestellt.

3.7 Ermittlung des *RAS*-Mutationsstatus mittels NGS

Der Mutationsstatus der *RAS*-Gene (*HRAS*, *KRAS* und *NRAS*) in dem Tumorgewebe der PTCs wurde retrospektiv mittels NGS mit dem MiSeq- und NextSeq-System der Firma Illumina bestimmt. Dabei werden bestimmte Genbereiche der genannten Gene sequenziert und auf Mutationen und Varianten untersucht.

Aus der Literatur ist bekannt, dass *BRAF*- und *RAS*-Mutationen innerhalb eines Tumors im Allgemeinen nicht gleichzeitig auftreten (Soares, Trovisco et al. 2003, Di Cristofaro, Marcy et al. 2006). Daher wurden ausschließlich die im Vorfeld als *BRAF*-Wildtyp identifizierten Fälle in die NGS-Analyse eingeschlossen.

NGS bedeutet, dass zahlreiche DNA-Fragmente parallel und mit hoher Geschwindigkeit sequenziert werden können. Mit dieser Technologie wird die Reihenfolge von Nukleotiden in Zielregionen der DNA oder auch RNA bestimmt. Es ist grundsätzlich auch möglich, ein gesamtes Genom zu sequenzieren. Durch die Verbesserung der Sequenzierentiefe können auch krankheitsrelevante Mutationen detektiert werden, die nur in einem Bruchteil der analysierten Genabschnitte vorkommen (Arnemann 2019).

Für die Analyse wurde das QIASeq Targeted DNA Panel (nNGM 2.0 Panel) verwendet. nNGM ist das nationale Netzwerk Genomische Medizin und führt in deutschen Netzwerkzentren standardisierte umfangreiche diagnostische molekularpathologische Untersuchungen an Bronchialkarzinomen durch. Für diese Arbeit wurde das genannte Genpanel an Tumormaterial von PTCs angewendet. Alle in dem Panel enthaltene Gene sind im Anhang (Tabelle 48) aufgeführt.

Bei der NGS-Auswertung und Analyse wurden die ausgewählten Gene *NRAS*, *HRAS*, *KRAS*, *BRAF* und *TP53* untersucht. Der Fokus der Analyse lag auf der Detektion von Mutationen in den *RAS*-Genen, da das Kollektiv bereits im Vorfeld auf die am häufigste vorkommende *BRAF*^{V600E}-Mutation (Cantwell-Dorris, O'Leary et al. 2011) untersucht wurde und die *TP53*-Mutationen bei PTCs selten bestehen und eher bei gering differenzierten oder anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen vorkommen (Cancer Genome Atlas Research Network 2014, Manzella, Stella et al. 2017). Die *NRAS*-, *HRAS*- und *KRAS*-Gene wurden in den relevanten Genbereichen, genauer in den Exonen 2-4 auf Mutationen untersucht. Die Analyse des *BRAF*-Gens betraf die Exone 11 und 15 und die Analyse des *TP53*-Gens die Exone 4, 5, 6, 7 und 8. Basierend auf dem QIAseq Targeted DNA Panel Handbook (QIAGEN 2021) wurde der Arbeitsablauf durchgeführt. Die Gene wurden in bestimmten Genbereichen angereichert, vervielfältigt und es wurden DNA-Bibliotheken erstellt (Library Preparation). Dann folgten die Sequenzierung und die abschließende Analyse mit der Biomedical Workbench 12 Software (Qiagen, Venlo, Niederlande).

3.7.1 Quantifizierung der DNA des Tumorgewebes

Vor der Herstellung der DNA-Bibliotheken wurde die DNA-Konzentration des Tumorgewebes mit Hilfe des Qubit™ dsDNA-BR (Broad Range) Assay-Kits oder Qubit™ dsDNA-HS (High Sensitivity) Assay-Kits (Tabelle 11) und dem Qubit Fluorometer (Tabelle 7) gemäß Herstellerprotokoll gemessen. Die Qubit™ working solution wurde mit dem im Kit enthaltenen Puffer und Reagent im Verhältnis von 1:200 hergestellt. Puffer und Reagent mussten für die Messung Raumtemperatur haben. Mithilfe zweier im Kit enthaltener Standards wurde die Messung kalibriert. Proben wurden 1:200 mit der Qubit™ working solution und Standards 1:20 verdünnt. Diese beiden Kits funktionieren selektiv für doppelsträngige DNA, wobei Fluoreszenzfarbstoffe an die DNA binden. Anhand des ausgesandten Fluoreszenzsignals kann die DNA-Konzentration bestimmt werden.

Tabelle 13 - Pipettierschema zur DNA-Konzentrationsmessung

	Standard-Teströhrchen	Proben-Teströhrchen
Volumen der working solution	190 µL	199 µL
Volumen des Standards	10 µL	—
Volumen der Probe	—	1 µL
Gesamtvolumen in jedem Teströhrchen	200 µL	200 µL

Es wurden dünnwandige, klare 500 µl-Röhrchen (Axygen™ PCR-Röhrchen, 0.5 ml) verwendet (Tabelle 8). Die Proben bzw. Standards wurden mit der working solution in den Röhrchen mit einem Vortexmischer vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 2 Min. konnte mit der Messung begonnen werden. Am Qubit Fluorometer wurde das DNA-Assay ausgewählt und am verbundenen Rechner der QuBit Data-Logger gestartet. Nach Kalibrierung der Messung mit den Standards folgten die Konzentrationsbestimmungen der Proben.

3.7.2 Herstellung der DNA-Bibliotheken (Library Preparation)

Der im Folgenden beschriebene QIAseq targeted DNA workflow (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurde zur Herstellung der DNA-Bibliotheken für die anschließende Sequenzierung angewendet (Abbildung 9).

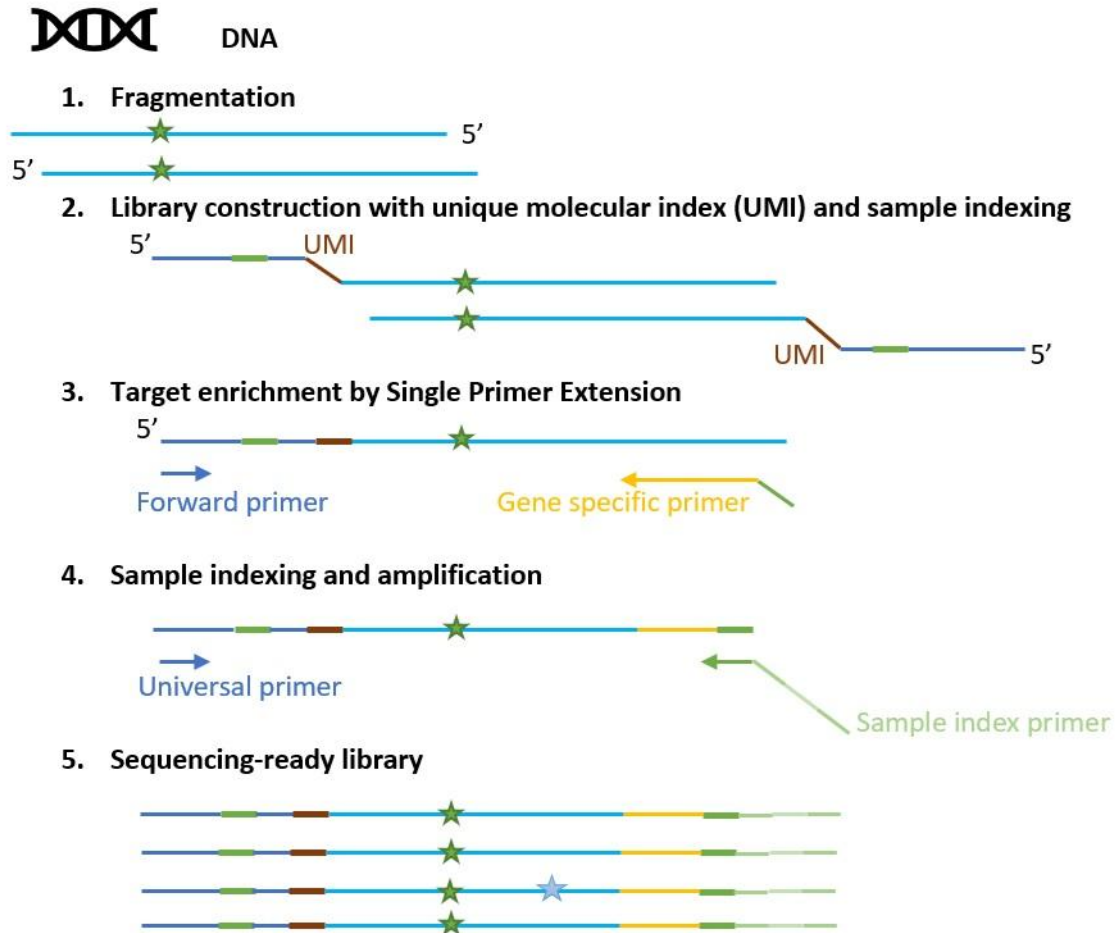


Abbildung 9 - QIASEq Targeted DNA Panels workflow

Bildquelle: modifiziert nach (QIAGEN 2021)

3.7.2.1 Fragmentierung, End-Repair und A-Anheftung

Für die Herstellung der DNA-Bibliotheken wurde eine einzusetzende DNA-Menge des Tumorgewebes von 100 ng angestrebt, mindestens sollten 10 ng DNA eingesetzt werden. Bei geringer initialer Konzentration der DNA konnten in einigen Fällen nicht 100 ng DNA verwendet werden, sodass in der vorliegenden Fallkohorte eine DNA-Menge im Bereich von 15,66 – 100 ng eingesetzt wurde. Das Volumen der einzusetzenden DNA-Probe (x) konnte mithilfe der Formel $x = \frac{100ng}{DNA-Konzentration}$ berechnet werden. Zu dem Reaktionsmix aus Fragmentation Buffer 10x, FERA-Solution und dem Fragmentationsenzym wurde dann das berechnete Volumen der DNA-Probe (x) gegeben und mit Nuklease-freiem Wasser auf 25 µl aufgefüllt (Tabelle 14). Durch Arbeiten auf einem gekühlten Block konnte eine Temperatur von 4 °C ermöglicht werden.

Tabelle 14 - Pipettierschema (Fragmentierung, End-Repair und A-Anheftung)

Reagenzien	Volumen
Fragmentation Buffer 10x	2,5 µl
FERA Solution	0,75 µl
Fragmentationsenzym	5 µl
10-100ng DNA	x
Nuklease-freies Wasser	16,75µl - x
Gesamtvolumen	= 25 µl

Nach Mischen mit der Pipette und kurzem Zentrifugieren wurde der Mix im Thermocycler nach dem folgenden Schema zur Fragmentierung inkubiert. Der Thermocycler war vor Schritt 1 bereits auf 4 °C gekühlt (Tabelle 15).

Tabelle 15 - Cycler Programm (Fragmentierung, End-Repair und A-Anheftung)

Schritt	Temperatur	Inkubationszeit
1	4 °C	1 min
2	32 °C	14 min
3	72 °C	30 min
4	4 °C	∞

3.7.2.2 Adapterligation

Für die Ligation wurde folgender Mastermix angesetzt (Tabelle 16). Die Proben wurden nach Abschluss der Inkubation kurz zentrifugiert. Weiterhin wurde auf einem gekühlten Block (4 °C) gearbeitet. Der Mastermix wurde zu den Proben aus dem Thermocycler gegeben.

Tabelle 16 - Pipettierschema Adapterligation

Reagenzien	Volumen
Ligation Buffer 5x	10 µl
DNA Ligase	5 µl
Gesamtvolumen	= 15 µl

Es standen 12 unterschiedliche molekular gekennzeichnete Adapter zur Verfügung: UMI/IL-N716, IL-N718, IL-N719, IL-N720, IL-N721, IL-N722, IL-N723, IL-N724, IL-N726, IL-N727, IL-N728 und IL-N729. Zu jedem Ansatz wurden jeweils 2,8 µl eines unterschiedlichen Adapters

pipettiert. Dann folgte die Zugabe von 7,2 µl Ligation solution. Das Mischen erfolgte mittels langsamen Pipettierens aufgrund deren hoher Viskosität. Das Endvolumen lag somit bei 50 µl. Der nächste Schritt beinhaltete die Inkubation im Thermocycler mit geöffnetem Deckel (Tabelle 17).

Tabelle 17 - Programm Cycler (Adapterligation)

Schritt	Temperatur	Inkubationszeit
1	20 °C	15 min
2	4 °C	∞

3.7.2.2.1 Aufreinigung der Adapter-ligierten DNA

Bead-Aufreinigung 1: Für die Aufreinigungsschritte wurden 100 µl QIAseq Beads verwendet und in eine MIDI-Platte (Tabelle 8) vorgelegt. Die Probe (50µl) wurde mit einem Verhältnis von 1:1 mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt, sodass das Volumen bei 100 µl lag. Die Probe wurde zu den QIAseq Beads hinzugegeben und zum Mischen mit der Mehrkanalpipette auf- und abpipettiert. Es schloss sich eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Min. an, sodass die DNA an die Beads binden konnte. Nach Aufstellen auf eine Magnetplatte, wurde gewartet, bis sich die Beads im Bereich des Magnetfeldes konzentrieren und die Lösung klar war. Dieser Vorgang dauerte rund 10 Min. Der Überstand wurde mithilfe einer Pipette abgenommen und verworfen.

Ethanol-Aufreinigung 1: Der folgende Ablauf beschreibt den Waschschrift mittels Ethanols. Es wurden 200µl 80%-iger Ethanol zu den Beads gegeben und die MIDI-Platte zwei- bis dreimal schräg versetzt auf der Magnetplatte bewegt, sodass die Beads gewaschen wurden. Nach Absetzen der MIDI-Platte am Startpunkt wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Der Waschschrift mit 200µl 80%-igem Ethanol wurde wiederholt. Wichtig war, dass der Überstand am Ende vollständig abgenommen wurde. Am besten konnte dies mit einer 10er Pipette erreicht werden. Bei Raumtemperatur wurde gewartet, bis die Beads komplett getrocknet waren. Erkennbar war dies dadurch, dass die aus Beads bestehenden Pellets in getrocknetem Zustand leichte Risse aufwiesen. Dies dauerte etwa 5-10 Min.

Bead-Aufreinigung 2: Nach Abnehmen der MIDI-Platte von der Magnetplatte, wurde die im Pellet enthaltene DNA mit 52µl Nuklease-freiem Wasser gelöst und mittels Mehrkanalpipette gemischt. Danach wurde die MIDI-Platte erneut auf die Magnetplatte gesetzt. Sobald nach einigen Min. eine vollständig klare Lösung zu sehen war, wurden 50 µl des Überstandes in eine neue Reihe pipettiert. Danach konnte die Platte vom Magnetfeld genommen werden. Im nächsten Schritt wurden 50µl QIAseq-Beads hinzugegeben und gemischt. Es schloss sich eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Min. an. Die DNA konnte somit wieder an die Beads binden. Nach Absetzen der MIDI-Platte auf dem Magnetfeld wurde nach einigen Min. die Lösung sichtbar klar, sodass der Überstand entfernt und verworfen werden konnte.

Ethanol-Aufreinigung 2: Nun erfolgte erneut die oben beschriebene **Ethanol-Aufreinigung**.

Nach Abnehmen der MIDI-Platte von der Magnetplatte, wurde die an den Beads haftende DNA mit 12µl Wasser gelöst und mittels Pipette gemischt. Die MIDI-Platte wurde nun auf die Magnetplatte gestellt. Als die Lösung nach einigen Min. komplett klar war, wurden 9,4 µl Überstand in neue Eppendorf PCR Tubes (Tabelle 8) pipettiert.

3.7.2.3 Anreicherung von Genbereichen (Target enrichment)

Für diesen Abschnitt wurde zuerst folgender Mastermix angesetzt (Tabelle 18). Dieser wurde zu der unter dem Kapitel 3.7.2.2 generierten DNA-Probe von 9,4 µl hinzugegeben, sodass ein Gesamtvolumen von 20 µl resultierte.

Tabelle 18 - Pipettierschema Target Enrichment

Reagenzien	Volumen
TEPCR Buffer 5x	4 µl
nNGM 2.0 Primer-Mix	5 µl
IL-Forward Primer	0,8 µl
HotStarTaq DNA Polymerase	0,8 µl
Gesamtvolumen	= 10,6 µl

Danach wurde die PCR nach folgendem Schema im Cycler durchgeführt (Tabelle 19).

Tabelle 19 - Programm Cycler (Target enrichment)

Schritt	Temperatur	Inkubationszeit
1 Denaturierung	95 °C	13 min
	98 °C	2 min
2*	98 °C	15 s
	68 °C	10 min
3	72 °C	5 min
4	4 °C	5 min
5	4 °C	∞

*Schritt 2 wurde 8 Mal wiederholt.

3.7.2.3.1 Aufreinigung vom Target enrichment

Im ersten Schritt wurden 100 µl QIAseq Beads in eine MIDI-Platte vorgelegt. Dann wurde die Probe von 20 µl mit 80 µl Nuklease-freiem Wasser auf 100 µl verdünnt. Diese wurde zu den Beads gegeben und mittels Pipette gemischt. Nach Abstellen der MIDI-Platte auf der Magnetplatte wurde einige Min. gewartet, bis die Lösung klar wurde. Danach konnte man den Überstand verwerfen. Dann folgte der Waschschrift mit Ethanol wie unter Kapitel 3.7.2.2.1 vorbeschrieben. Die getrockneten Pellets wurden in 16 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst, sodass die DNA binden konnte. Die MIDI-Platte wurde auf die Magnetplatte gestellt. Als die Lösung komplett klar war, wurde 13,4 µl Überstand in neue Eppendorf PCR Tubes pipettiert.

3.7.2.4 Universal PCR

Für die Universal PCR wurde zuerst ein Reagenzienmix angesetzt (Tabelle 20).

Tabelle 20 - Pipettierschema Universal PCR

Reagenzien	Volumen
U-PCR Buffer 5x	4 µl
HotStarTaq DNA Polymerase	1 µl
H ₂ O	1,6 µl
Gesamtvolumen	= 6,6 µl

Als Index Primer standen IL-S502, IL-S503, IL-S505, IL-S506, IL-S507, IL-S508, IL-S510 und IL-S511 zur Verfügung. Der Mastermix von 6,6 µl wurde jeweils zu einem lyophilisierten Index Primer hinzugegeben. Dieses Volumen wurde dann zu den 13,4 µl DNA-Probe im Eppendorf PCR Tube gegeben (Gesamtvolumen: 20 µl). Es folgte die PCR im Cycler mit folgendem Programm (Tabelle 21).

Tabelle 21 - Programm Cycler (Universal PCR)

Schritt	Temperatur	Inkubationszeit
1 Denaturierung	95 °C	13 min
	98 °C	2 min
2*	98 °C	15 s
	60 °C	2 min
3	72 °C	5 min
4	4 °C	5 min
5	4 °C	∞

*Schritt 2 wurde 26 Mal wiederholt.

3.7.2.4.1 Aufreinigung der Universal PCR

Dann folgten die zuvor unter Kapitel 3.7.2.2.1 beschriebenen Aufreinigungsschritte mit QIAseq Beads und Ethanol mit dem Unterschied, dass das Probenvolumen hier bei 20 µl lag und initial mit 80 µl Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt wurde.

Nach Abnehmen der MIDI-Platte von der Magnetplatte, wurde die an den Beads haftende DNA mit 30 µl Wasser gelöst und mittels Pipette gemischt. Die MIDI-Platte wurde auf die Magnetplatte gestellt. Nach einigen Min. war die Lösung komplett klar und der Überstand von 28 µl konnte in ein neues Eppendorf PCR Tube pipettiert werden. Die Proben entsprachen nun den fertigen DNA-Bibliotheken.

3.7.3 Quantifizierung der DNA-Bibliotheken

Die Konzentration der DNA-Bibliotheken wurde mithilfe des Qubit™ dsDNA-HS (High Sensitivity) Assay-Kits und dem Qubit® Fluorometer gemessen. Hierbei wird eine möglichst genaue Messung für empfindliche DNA-Proben ermöglicht. Die Konzentrationsmessung erfolgte analog wie in Kapitel 3.7.1 vorbeschrieben.

3.7.4 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente anhand ihrer unterschiedlichen Länge im elektrischen Feld aufgetrennt werden (McDonell, Simon et al. 1977). Die negativ geladenen Nukleinsäure-Stränge bewegen sich zur Anode, wobei kleinere Fragmente schneller wandern und sich größere Fragmente langsamer durch das Gel bewegen. Die Verteilung der unterschiedlich langen DNA-Fragmente kann im Gelbild kontrolliert werden und stellt somit die Qualitätskontrolle der hergestellten DNA-Bibliotheken dar. Es sollten möglichst viele unterschiedlich lange DNA-Fragmente im Gelbild zu sehen sein (Abbildung 10).

Es wurde ein 2%-iges Agarosegel verwendet. Hierfür wurde 2 g Agarose in 100 ml 1 x TRIS-Borsäure-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) aufgekocht und gelöst. Dann wurde 1 µl des Fluoreszenzfarbstoffs peqGREEN hinzugegeben und vermischt. Um die später zu befüllenden Taschen zu erzeugen, wurde ein Kamm eingesetzt und die Flüssigkeit in den Gelschlitten gegossen. Nach dem Aushärten wurde der Kamm entfernt.

Die Elektrophoresekammer wurde mit dem TBE-Puffer gefüllt. Der Gelschlitten wurde anschließend in die Kammer eingesetzt. Pro Tasche wurden 8 µl einer DNA-Bibliothek und 2 µl DNA-Ladepuffer pipettiert. Die seitlichen Taschen wurden mit 5 µl eines 100 bp DNA-Leiters befüllt, der DNA-Stränge bekannter unterschiedlicher Länge enthielt. Die Spannung wurde auf 100 V angelegt. Mithilfe der durch den DNA-Leiter entstandenen Banden konnten die Längen der in der Probe enthaltenen DNA-Fragmente bestimmt werden. Die Banden wurden durch den Fluoreszenzfarbstoff peqGREEN unter UV-Licht sichtbar gemacht und nach 15, 25 und 35 Min. zur Dokumentation fotografiert.

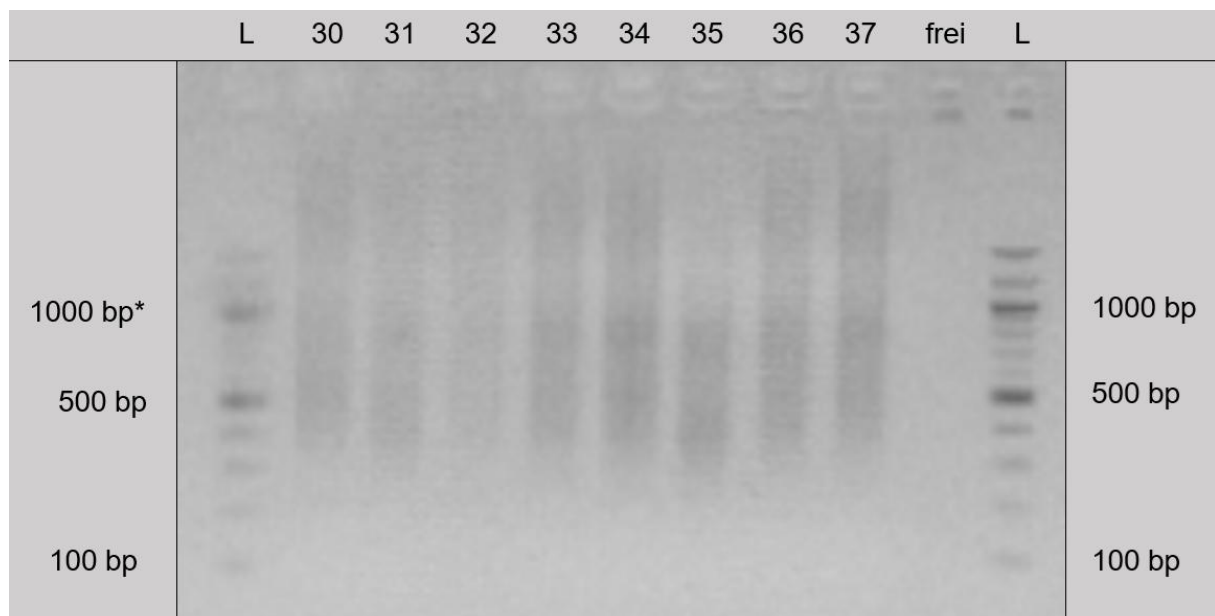


Abbildung 10 - Gelbild der DNA-Bibliotheken zur Qualitätskontrolle

Diese Abbildung zeigt exemplarisch das Gelbild der Proben 30-37 nach 35 Min., L bezeichnet den DNA-Leiter. *bp = Basenpaare.

3.7.5 Sequenzierung für Illumina

3.7.5.1 Poolen der DNA-Bibliotheken

Die nächsten Schritte bereiteten die DNA-Bibliotheken für die Sequenzierung mit dem MiSeq- und NextSeq-System (Illumina, San Diego, California, USA) vor. Die Durchführung fand auf Eis statt. In Abhängigkeit von der Qualität der DNA-Bibliotheken wurden pro Probe 15-45 ng DNA eingesetzt. Das einzusetzende Volumen (x) der DNA-Bibliothek wurde mithilfe der gemessenen DNA-Konzentration (vgl. Kapitel 3.7.3) berechnet: $x = \frac{\text{DNA-Menge in ng}}{\text{DNA-Konzentration}}$. Es wurde ein Probenpool mit allen in diesem Sequenzierungslauf zu untersuchenden Proben hergestellt. Hierfür wurden die errechneten Probenvolumina in ein Röhrchen gepoolt, mittels Vortexmischer vermischt und kurz zentrifugiert. Es musste darauf geachtet werden, dass alle gepoolten DNA-Bibliotheken über eine unterschiedliche Kombination aus Adapter und Index Primer verfügen, um die DNA-Proben bei der Analyse individuell analysieren zu können. Dann wurde ein Durchschnittswert der DNA-Konzentration (y) aller eingesetzten Proben berechnet: $y = \frac{\text{gepoolte DNA-Menge in ng}}{\text{gepooltes DNA-Volumen}}$. Die Endkonzentration sollte 4 nM, folglich 0,9 ng/µl bei einem Endvolumen von 50 µl betragen. Das einzusetzende Volumen der gepoolten DNA (z) wurde mit folgender Formel berechnet: $z = \frac{45\text{ng}}{y}$. Dieses Volumen wurde in ein neues Röhrchen pipettiert und mit Resuspension Buffer (RSB) auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt. 5 µl dieser Lösung wurde mit 5 µl 0,2 N NaOH versetzt und mittels Vortexmischer gemischt. Dann wurde das Reaktionsgefäß 1 Min. bei 2000 rpm zentrifugiert und 5 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die DNA-Bibliotheken wurden in diesem Schritt denaturiert. Zu dem Volumen von 10 µl wurden 990 µl HT1-Puffer (Hybridization Buffer) hinzugegeben, sodass eine DNA-Konzentration von 20 pM erreicht wurde. Das Reaktionsgefäß wurde mittels Vortexer gemischt und kurz zentrifugiert. Die jeweilige Reagenzienkartusche für die Sequenzierung wurde eine Stunde im Wasserbad aufgetaut und vor der Verwendung mehrfach invertiert.

Mithilfe des Illumina Experiment Managers (Tabelle 12) wurde ein Sample Sheet erstellt. Hier wurden Probenamen, Adapter und Indizes hinterlegt. Bei den FASTQ Only Workflow-Specific Settings wurde „Custom Primer for Read 1“ ausgewählt.

3.7.5.2 Sequenzierung für Illumina MiSeq

Bei dem Illumina MiSeq-System wurden für ein Gesamtvolumen von 600 µl zu 300 µl der DNA-Lösung 300 µl gekühlter HT1-Puffer hinzugegeben, vermischt und kurz zentrifugiert. Die DNA-Konzentration betrug im letzten Schritt 10 pM. Der Qiagen-Sequenzierungsprimer wurde auf 0,5 µM verdünnt. Hierbei wurden 597 µl HT1 mit 3 µl QIAseq A Read 1 Custom Primer vermischt. Diese Lösung von 600 µl wurde nach Anstechen mit einer 1ml-Pipettenspitze in die gekennzeichnete Position der Reagenzienkartusche gegeben (Position 18). Die 600 µl Lösung der gepoolten, verdünnten und denaturierten DNA-Bibliotheken wurde in die dafür vorgesehene Vertiefung der Reagenzienkartusche (Position 17) gegeben. Die Fließzelle wurde mit destilliertem Wasser und einem fusselfreien Tuch gereinigt, um Salzablagerungen von der Fließzelle zu entfernen, und in das Gerät eingesetzt. Zudem wurden in das Gerät die PR2-Flasche (Puffer) und die Abfall-Flasche platziert. Nach Einlegen der Reagenzienkartusche wurde der Lauf gestartet.

3.7.5.3 Sequenzierung für Illumina NextSeq

Bei dem Illumina NextSeq-System war ein Gesamtvolumen von 1300 µl erforderlich. Es wurden zu 78 µl der DNA-Lösung 1222 µl gekühlter HT1-Puffer hinzugegeben, vermischt und kurz zentrifugiert. Es wurde eine DNA-Konzentration von 1,2 pM erreicht. Der Qiagen-Sequenzierungsprimer wurde auf 0,3 µM verdünnt. Dafür wurden 1994 µl HT1 mit 6 µl QIAseq

A Read 1 Custom Primer vermischt. Die 2 ml Sequenzierungsprimer wurden nach Anstechen der gekennzeichneten Position in die Reagenzienkartusche (Position 7) gegeben. 1,3 ml der gepoolten, verdünnten und denaturierten DNA-Bibliotheken wurden in die vorgesehene Vertiefung (Position 10, Load Samples) gegeben. Die Fließzelle wurde mit einem fussselfreien Tuch gesäubert und eingelegt. Zudem wurden Pufferkartusche und Abfallbehälter im Gerät platziert. Nach Einlegen der Reagenzienkartusche wurde der Lauf gestartet.

3.7.5.4 Auswertung der Sequenzierdaten

Die generierten bcl-Dateien (base call) wurden in das FASTQ-Format konvertiert und in die CLC Genomic Workbench 12.0 (Qiagen, Venlo, Niederlande) importiert. Diese Software ermöglichte die Analyse der Sequenzierdaten der verschiedenen Proben auf Basis des menschlichen Referenzgenoms GRCh37.p13 (hg 19). Die im Genpanel enthaltenen Gene *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* und *TP53* wurden auf Varianten überprüft. Ausschließlich Varianten mit einer minimalen Abdeckung von 100 Lesevorgängen und mit einer Allelfrequenz von über 5 % wurden berücksichtigt. Zudem wurden synonyme Veränderungen, die nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz im Protein führen, herausgefiltert. Zur Überprüfung und Bewertung der detektierten Genvarianten wurden der COSMIC Genome Browser, die CIVic-Datenbank und die Online-Datenbank Cancer Hotspots verwendet. COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer) ist eine von erfahrenen Wissenschaftlern geführte Online-Datenbank, die zahlreiche unterschiedliche somatische Mutationen enthält, die beim Menschen zur Krebsentstehung führen, basierend auf der Überprüfung einer großen Anzahl wissenschaftlicher Veröffentlichungen (Forbes, Beare et al. 2016). CIVic ist eine Online-Plattform mit zusätzlicher Unterstützung bei der klinischen Interpretation von Krebs-assoziierten Mutationen (The McDonnell Genome Institute at Washington University School of Medicine o.D.-b). Cancer Hotspots liefert Informationen über signifikante Mutationen, die aus einer großen genomischen Datenmenge unter Einbezug verschiedener Krebsarten gewonnen wurden (Chang, Bhattarai et al. 2018, Kravis Center for Molecular Oncology at Memorial Sloan Kettering Cancer Center o.D.).

3.8 Genexpressionsanalysen

3.8.1 RNA-Isolierung

Für die qRT-PCR-Analysen ist das Ausgangsmaterial Formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes (FFPE-)Gewebe, aus welchem RNA des Tumorgewebes extrahiert wurde. Dies wurde mit dem Maxwell RSC RNA FFPE Kit (Tabelle 11) nach den zugehörigen Herstellerangaben umgesetzt. Das Tumoreal wurde auf dem jeweiligen HE-Schnitt im Vorfeld mithilfe der Unterstützung von (Institut für Pathologie der UM) markiert und der Tumorzellgehalt geschätzt. Zuerst wurden in ein 1,5 ml Probengefäß 300 µl Mineralöl hinzugefügt. Abhängig von der Größe des Tumoreals auf den Gewebeschnitten wurden ein bis zehn Gewebeschnitte des FFPE-Materials verwendet. Nach Anfertigung der 4 µm dicken Gewebeschnitte durch (Institut für Pathologie der UM), wurde das Material des eingezeichneten Tumorbereichs in das Mineralöl enthaltende Reaktionsgefäß mittels eines Skalpells gekratzt. Das Reaktionsgefäß wurde für 10 Sek. mit dem Vortexmischer gemischt. Dann wurde das Probengefäß für 2 Min. im Heizblock auf 80 °C erhitzt und danach bei Raumtemperatur abgekühlt. Im nächsten Schritt wurde pro Probe folgender Mastermix, bestehend aus Lysepuffer, Proteinkinase K und Blue Dye vorbereitet (Tabelle 22).

Tabelle 22 - Pipettierschema Mastermix RNA-Extraktion

Reagenzien	Volumen
Lysepuffer	224 µl
Proteinkinase K	25 µl
Blue Dye	1 µl
Gesamtvolumen	= 250 µl

Das Volumen von 250 µl Mastermix wurde zu jeder Probe hinzugegeben und für 5 Sek. mit dem Vortexmischer vermischt. Um die wässrige Phase von der öligen Phase zu trennen, wurde das Reaktionsgefäß für 20 Sek. bei 10.000 g zentrifugiert. Das Pellet, das sich in der wässrigen Phase gebildet hat, wurde mit einer Pipette darin gelöst. Das Reaktionsgefäß wurde daraufhin zuerst bei 56 °C für 15 Min. und dann bei 80 °C für eine Stunde im Heizblock inkubiert sowie bei Raumtemperatur für 15 Min. abgekühlt.

Dann wurde der DNase-Reaktionsmix hergestellt (Tabelle 23).

Tabelle 23 - Pipettierschema DNase-Reaktionsmix

Reagenzien	Volumen
MnCl ₂ , 0,09 M	26 µl
DNase Buffer	14 µl
DNase I	10 µl
Gesamtvolumen	=50 µl

Pro Probe wurden 50 µl Reaktionsmix zu der wässrigen Phase hinzugegeben und durch 10-maliges Pipettieren vermischt. Dann folgte die Inkubationszeit bei Raumtemperatur für 15 Min. Das Reaktionsgefäß wurde daraufhin bei voller Geschwindigkeit für 2 Min. zentrifugiert. Unmittelbar nach der Zentrifugation wurde die wässrige Phase in Position 1 der Maxwell-Kartusche überführt. Der Stempel wurde in Position 8 eingesteckt. Die im Kit enthaltenen Reaktionsgefäße wurden nach Beschriften mit Probennummern in den Halter eingesetzt und 50 µl Nuklease-freies Wasser vorgelegt. Die Deckel sollten offen belassen werden. Dann wurde der Halter in das Gerät Maxwell® RSC Instrument eingesetzt und das Programm Maxwell RSC FFPE RNA zur RNA-Extraktion gestartet.

3.8.2 Quantifizierung der RNA

Die Konzentration der eluierten RNA wurde mithilfe des Qubit™ RNA HS Assay Kits (Tabelle 11) und dem Qubit® Fluorometer nach den Herstellerangaben gemessen. Die Qubit™ working solution wurde mit dem im Kit enthaltenen Puffer (Qubit™ RNA HS Buffer) und Reagent (Qubit™ RNA HS Reagent) im Verhältnis von 1:200 hergestellt. Am Qubit® Fluorometer musste das RNA-Essay ausgewählt werden. Die weiteren Schritte zur Konzentrationsmessung wurden analog der Beschreibung unter Kapitel 3.7.1 durchgeführt. Die RNA wurde auf einen Konzentrationsbereich von 45-50 ng/µl eingestellt.

3.8.3 cDNA-Herstellung

Die extrahierte und eingestellte RNA wurde durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Herstellung basierte auf dem M-MLV Reverse Transcriptase Protocol (Promega). Im ersten Schritt wurden für jede Probe 3 µl Random Primer in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Dann wurden 11 µl der isolierten RNA zu den Random Primern hinzupipettiert. Das Volumen pro Reaktionsgefäß lag dann bei 14 µl. Die Reaktionsgefäße wurden bei 70 °C für 5 Min. inkubiert, um die RNA zu denaturieren und anschließend heruntergekühlt sowie 1 Min. bei 4 °C belassen, um eine Renaturierung zu verhindern. Dann wurde ein Mastermix mit 5x Puffer, RNAsin-PLUS, dNTPs und MMLV in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorbereitet (Tabelle 24).

Tabelle 24 - Pipettierschema Mastermix cDNA-Herstellung

Reagenzien	Volumen
5x Puffer	5 µl
RNAsin-PLUS	0,8 µl
MMLV	1 µl
dNTPs 2,5 mM	4,2 µl
Gesamtvolumen	= 11 µl

Nach kurzem Zentrifugieren wurden 11 µl Mastermix pro 0,2 ml Reaktionsgefäß hinzugegeben und 60 Min. bei 40 °C inkubiert. Anschließend wurden die cDNA-Proben bei -20 °C gelagert.

3.8.4 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Die real-time PCR ist eine Weiterentwicklung der ursprünglichen PCR, die in den 1980er Jahren entwickelt wurde (Saiki, Scharf et al. 1985). In der Echtzeit-PCR kann durch einen fluoreszierenden Farbstoff die Menge des gebildeten DNA-Produkts quantifiziert werden. Dies eignet sich als Methode zur Genexpressionsanalyse. Das Fluoreszenzsignal wird bei jedem Zyklus der PCR gemessen und verhält sich proportional zur Menge des generierten DNA-Produkts (Kubista, Andrade et al. 2006). Der C_t-Wert (Cycle Threshold, Schwellenwertzyklus) gibt den Zyklus an, bei dem das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz übersteigt und in die exponentielle Phase übergeht. Er stellt somit den Schnittpunkt zwischen einer Amplifikationskurve und einer Schwellenwertlinie dar (Thermo Fisher Scientific 2016).

3.8.4.1 Primerdesign

Die Primer, die für die quantitative PCR verwendet wurden, wurden zuvor mithilfe des Programms Primer 3 (Tabelle 12) generiert. Die Sequenzen des jeweiligen Zielgens wurden online im Genom-Browser ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>) und beim NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) recherchiert. Bei dem Programm Primer 3 (<https://primer3.ut.ee/>) wurden eine Primerlänge von etwa 20 bp, eine Produktlänge von 100-200 bp und der GC-Gehalt auf 45-60% eingestellt. Je mehr G- und C-Nukleotide enthalten sind, desto stabiler wird die DNA und desto höher ist die Schmelztemperatur. Diese wurde auf etwa 60 °C gesetzt. Nachdem die Exongrenzen der eingegebenen Sequenz markiert wurden, generierte das Programm Primer 3 auf Basis der vorliegenden Sequenz und der genannten Voreinstellungen neue Primer. Die Primer für die Zielgene *GABPB1*, *GABPB2* und *GADD45B* sowie für das Referenzgen *GAPDH* wurden auf

diese Weise generiert. Die Primer für die *TERT*-Sequenz stammen aus der Publikation „Regulation of mutant TERT by BRAF V600E/MAP kinase pathway through FOS/GABP in human cancer“ (Liu, Zhang et al. 2018). Die Primer für das Referenzgen ACTB wurden von (Institut für Pathologie der UM) zur Verfügung gestellt (Tabelle 25).

Tabelle 25 - Primer für die real-time PCR

	Gen	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Produktlänge in bp*
Referenzgene	ACTB	TCCTCTCCCAA GTCCACACA	GGCACGAAGG CTCATCATT	130
	GAPDH	CCCACTCCTCC ACCTTTGAC	CCACCACCCT GTTGCTGTAG	108
Zielgene	TERT	GTCCGAGGTGT CCCTGAGTA	CAGGGCCTCG TCTTCTACAG	81
	GABPB1	GCAGAGATGCC AGAACCAAAG	GTTCTGTGGC CCAATGGAGA	153
	GABPB2	GCAGCAAGAAA AGGCCAAGA	CCTGCTAACA CCTGCTCGAA	156
	GADD45B	GTACGAGTCGG CCAAGTTGA	ACTGGATGAG CGTGAAGTGG	119

***bp = Basenpaaren**

Um die Primereffizienz aller Primer zu bestimmen, wurde für die qPCR eine Verdünnungsreihe der cDNA (unverdünnt, 1:5, 1:25 und 1:125) erstellt. Die Negativkontrolle bildete Wasser. Die gemessenen C_T-Werte wurden auf einer logarithmischen Skala gegen die cDNA-Konzentration aufgetragen und die Steigung ermittelt. Um die Effizienz zu errechnen, wurde folgende Formel verwendet:

$$Effizienz (\%) = (10^{\frac{-1}{Steigung}} - 1) \times 100$$

3.8.5 Durchführung der real-time PCR

Jede Probe für die quantitative PCR wurde in Triplikaten angesetzt und in eine 96-Well-Platte pipettiert. Auf jeder Platte wurde eine Standard-Verdünnungsreihe inklusive Negativkontrolle in Duplikaten mitgeführt. In jedes Well wurden folgende Komponenten gegeben (Tabelle 26):

Tabelle 26 - Pipettierschema real-time PCR

Reagenzien	Volumen
2x SYBR Green Mix	5 µl
Primer forward	0,2 µl
Primer reverse	0,2 µl
cDNA	1 µl
HPLC-Wasser	3,6 µl
Gesamtvolumen pro Well	= 10 µl

Die Platte wurde mit einer Klebefolie verschlossen, kurz zentrifugiert, in das Quant-Studio 5 Real-Time-PCR-System eingelegt (Tabelle 7) und das Programm der qRT-PCR gestartet (Tabelle 27).

Tabelle 27 - Cyclerprogramm real-time PCR

	Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (Sek.)
Hold stage	1	50 °C	120 s
	2	95 °C	600 s
PCR stage*	1	95 °C	15 s
	2	60 °C	60 s
Melt Curve Stage	1	95 °C	15 s
	2	60 °C	60 s
	3 (Dissoziation)	95 °C	1 s

*Schritt der PCR stage wurde 40 Mal wiederholt.

Nach Fertigstellung des qRT-PCR-Programms folgte die Evaluation mit der QuantStudio™ Design und Analysis Software (Tabelle 12). Die C_T -Werte der Triplikate der einzelnen Proben wurden gemittelt, sodass für jede Probe ein C_T -Wert generiert wurde. Zudem wurden die Schmelzkurven aller Triplikate analysiert. Idealerweise zeigt diese ausschließlich einen Peak. Diesen erhält man, wenn nur ein spezifisches amplifiziertes Produkt generiert wurde (siehe Anhang Abbildung 42). Beim Vorliegen von unspezifischen Produkten und Primerdimeren sind in der Schmelzkurve weitere Peaks zu erkennen. C_T -Werte, die innerhalb der Triplikate über 4 Zyklen voneinander abwichen, sowie C_T -Werte der Wells mit unspezifischen Produkten entsprechend der Schmelzkurve, wurden verworfen. Zudem wurden die PCR-Produkte auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen, um zu überprüfen, ob die Länge des PCR-Produktes der erwarteten Länge entsprach (Tabelle 25) und ob ein einziges PCR-Produkt entstanden ist, analog der Beschreibung unter dem Kapitel 3.7.4.

3.9 Statistische Analyse und Auswertung

Die patientenbezogenen Daten, die klinischen Daten und die histopathologischen Daten wurden in einer Excel-Tabelle gesammelt und zur statistischen Auswertung in das SPSS-Programm übertragen. Die klinischen Daten wurden von (Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der UM) zur Verfügung gestellt.

Zu den stetigen intervallskalierten Variablen wurden Median, Mittelwert, Standardabweichung, Maximum und Minimum gebildet. Häufigkeiten sowie die logistische und lineare Regressionsanalyse wurden eigenständig mittels SPSS (Tabelle 12) berechnet. Die Regressionsanalyse wurde durchgeführt, um Abhängigkeiten zwischen den genetischen Alterationen und den klinischen sowie histopathologischen Eigenschaften zu untersuchen. Binäre logistische Regression wurde für binäre abhängige Variablen verwendet und lineare Regression für metrische abhängige Variablen wie Alter oder Tumorgröße. Mittels Shapiro-Wilk-Test wurde die Normalverteilung der Daten für das Alter und die Tumorgröße getestet und bestätigt. Somit wurde eine Anwendbarkeit der linearen Regression überprüft. Es wurden

die Odds-Ratios und Konfidenzintervalle von 97,5% berechnet. Das rezidivfreie Überleben in Abhängigkeit von genetischen Alterationen wurde mit dem Log-Rank-Test mittels SPSS berechnet. SPSS generierte zudem die zugehörigen Kaplan-Meier-Kurven. Mit dem Wilcoxon-Test wurde überprüft, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen den Ergebnissen des MiSeq- und Next-Seq-Sequenziersystems gab. Die Genexpressionsanalysen wurden mithilfe der REST©-Software (Relative expression software tool, Tabelle 12) durchgeführt. Diese Software verwendet randomisierte Tests zur Signifikanzprüfung und visualisiert die Ergebnisse mittels Boxplots. Der Chi-Quadrat-Test wurde verwendet, um die Signifikanz der Unterschiede zwischen zwei Gruppen in Bezug auf die klinisch-pathologischen Parameter zu bestimmen. Der exakte Test nach Fisher wurde angewandt, wenn die Anzahl der Fälle unter 5 betrug. Der Chi-Quadrat-Test und der exakte Test nach Fisher wurden mittels SPSS durchgeführt. Ergebnisse mit einem p-Wert von $< 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse des Gesamtkollektivs

4.1.1 Klinische Daten

In einem zehnjährigen Zeitraum von 2008 bis 2018 wurde bei den in die Studie eingeschlossenen 170 Patienten/Patientinnen aufgrund der Erkrankung an einem PTC eine chirurgische Intervention durchgeführt. Eine Übersicht über die klinisch-pathologischen Daten des Gesamtkollektivs der untersuchten PTCs ist in Tabelle 28 dargestellt.

Tabelle 28 - Klinisch-pathologische Daten des Kollektivs der Studie

Merkmal	Gesamtkollektiv n=170
Klinische Daten	
Medianes Alter	48 Jahre
Geschlecht	
Weiblich	117 (68,8%)
Männlich	53 (31,2%)
Initialer operativer Eingriff	
Thyreoidektomie	137 (80,6%)
Hemithyreoidektomie	32 (18,8%)
Subtotale Thyreoidektomie	1 (0,6%)
Medianes Follow-up	55 Monate (\pm 4,58 Jahre)
Rezidiv	
Nein	147 (86,5%)
Ja	23 (13,5%)
Fernmetastasen im Verlauf des Follow-ups	
Nein	165 (97,1%)
Ja	5 (2,9%)

Merkmal	Gesamtkollektiv n=170
Radiojodtherapie durchgeführt	
Nein	26 (15,3%)
Ja	144 (84,7%)
Radiojodrefraktäre Erkrankung (nach Abschluss der Radiojodtherapie)	
Nein	132 (91,7%)
Ja	12 (8,3%)
Tumorbedingte Todesfälle	
Nein	169 (99,4%)
Ja	1 (0,6%)
Histologische Daten	
Mediane Tumorgröße	13,00 mm
Fokalität	
Unifokal	123 (72,4%)
Multifokal	47 (27,6%)
Histologischer Subtyp	
Klassisch	120 (70,5%)
Follikulär	45 (26,5%)
Onkozytär	3 (1,8%)
Solide	2 (1,2%)
Lymphknotenmetastasen	
Nein (pN0)	70 (41,2)
Ja (pN1, pN1a, pN1b)	62 (36,5)
Keine Lymphknoten untersucht/ unbekannt (pNX)	38 (22,3%)
Anzahl tumorbefallener Lymphknoten pro Individuum	Median 0,00 Mittelwert 2,86

Die Anzahl der Frauen lag bei 117 (68,8%) und die Anzahl der Männer betrug 53 (31,2%). Der jüngste Patient war bei der initialen Operation 8 Jahre alt und die älteste Patientin 85 Jahre alt, sodass das Kollektiv eine Altersspannweite von 77 Jahren umfasste (Abbildung 11). Das mediane Alter aller Erkrankten betrug 48,00 Jahre.

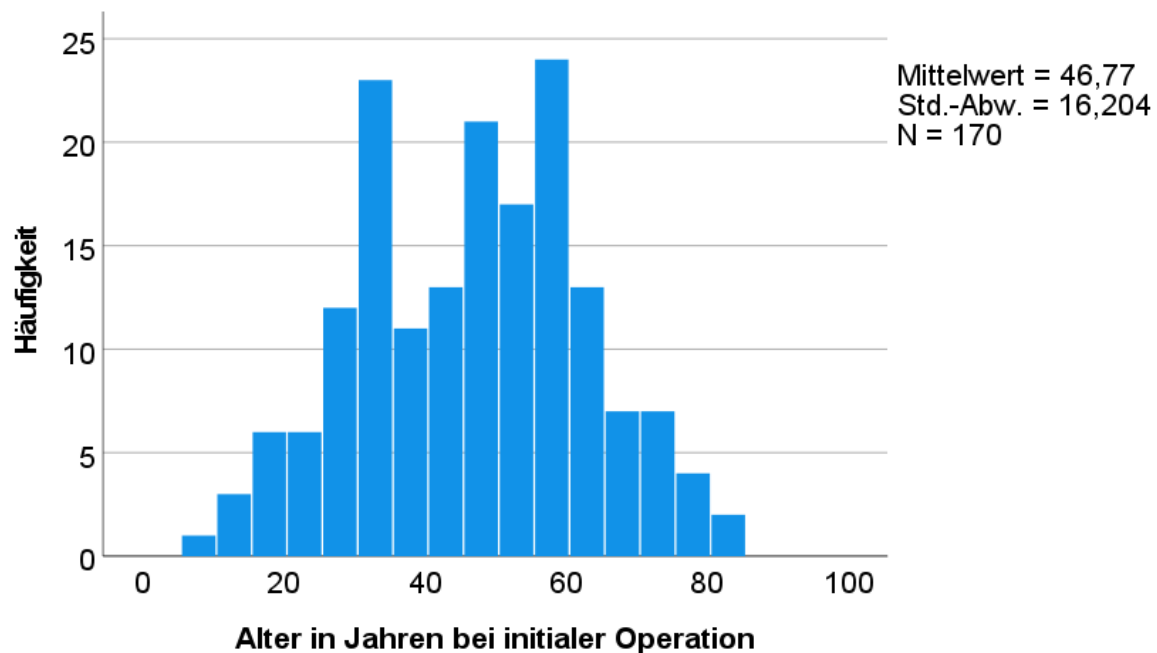


Abbildung 11 - Altersverteilung des Kollektivs der Studie

Bei 137 Patienten/Patientinnen wurde eine Thyreoidektomie durchgeführt (80,6%), bei 32 Fällen eine Hemithyreoidektomie (18,8%) und bei einem Patienten eine subtotale Thyreoidektomie (0,6%). Bei 27 Patienten/Patientinnen (15,9%) war eine zweizeitige Thyreoidektomie aufgrund der malignen histologischen Befunde im primären Operationspräparat notwendig. Während der initialen Operation wurde in 93 Fällen eine zusätzliche Lymphknotendissektion durchgeführt. Diese umfasste in rund zwei Dritteln der Fälle eine zentrale Lymphadenektomie (57/93 $\hat{=}$ 61,3%). Die weiteren Eingriffe umfassten zusätzlich zu der zentralen Lymphadenektomie eine laterale Lymphadenektomie, entweder unilateral oder bilateral, oder eine nicht näher bezeichnete Lymphknotenexstirpation und Neck dissection. Bei 33 Patienten/Patientinnen wurde ein sekundärer Lymphknoteneingriff durchgeführt.

Die mediane Zeit des postoperativen Follow-ups betrug im Gesamtkollektiv 55 Monate ($\hat{=}$ 4,58 Jahre) bei einer Spannweite von 0 bis 396 Monaten (Abbildung 12).

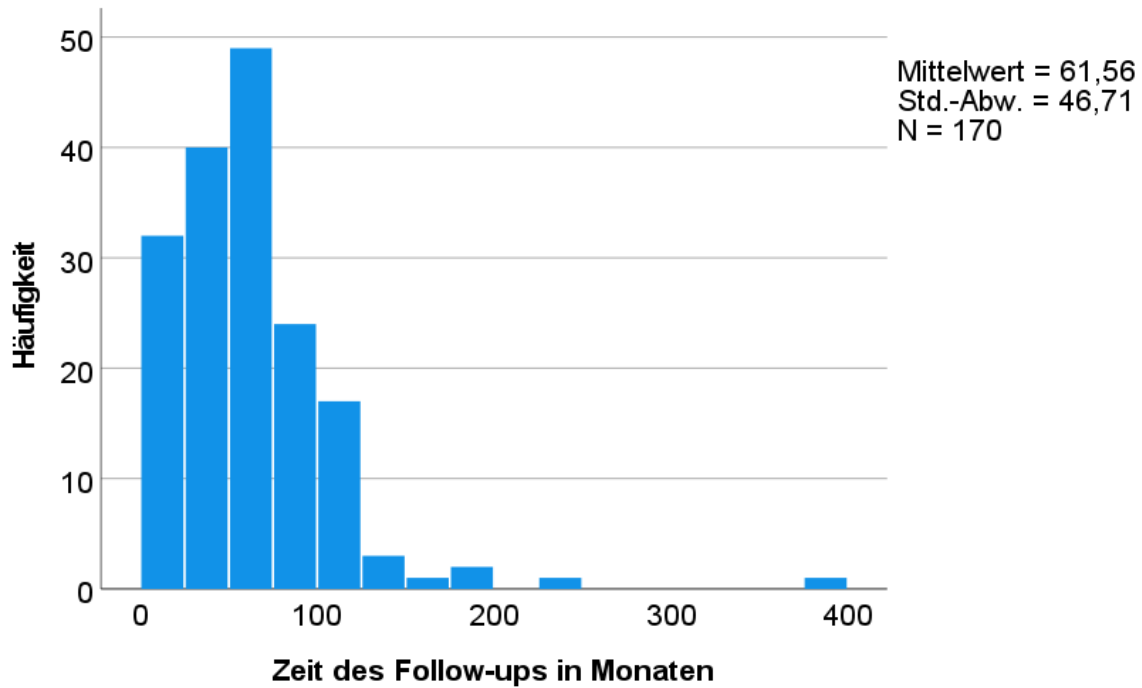


Abbildung 12 - Follow-up-Zeit des Kollektivs

Bei 23 Patienten/Patientinnen (13,5%) wurde im Verlauf des Follow-ups ein Rezidiv festgestellt. Dieses trat zwischen 0 – 195 Monaten nach der initialen Operation auf, bei einem Median von 6 Monaten. Bei einem Patienten bestand eine Tumorpersistenz bei Zustand nach R2-Resektion. Diese wurde in der Analyse nicht als Rezidiv gewertet.

Folgende Grafik zeigt das rezidivfreie Überleben des Gesamtkollektivs (Abbildung 13).

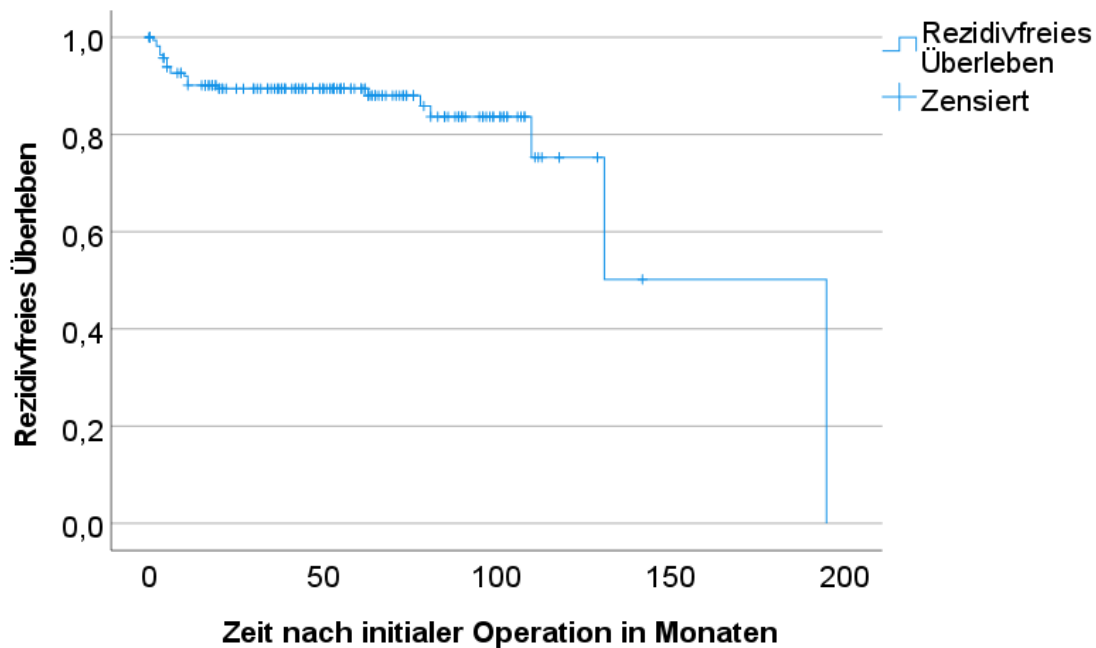


Abbildung 13 - Rezidivfreies Überleben des Gesamtkollektivs

Auf der x-Achse ist die Zeit nach initialer Operation in Monaten bis zum letzten Follow-up oder bis zum Rezidiv aufgetragen. Die Fälle, bei denen kein Rezidiv im Zeitraum des Follow-ups auftrat, wurden im Verlauf zensiert.

In 5 Fällen (2,9%) kam es im Verlauf der Nachsorge zur Entwicklung von Fernmetastasen. Diese waren ossär (3/5) und pulmonal (2/5) lokalisiert. Bei 144 Patienten/Patientinnen des Kollektivs (84,7%) wurde eine Radiojodtherapie durchgeführt. Unter jenen 144 erkrankten Personen entwickelten 12 Fälle (8,3%) eine Radiojod-refraktäre Tumorerkrankung. Ein Patient ist infolge der Tumorerkrankung im Laufe des Follow-ups verstorben (0,6%), siehe Anhang (Abbildung 41).

4.1.2 Histopathologische Aspekte

Während 123 Tumoren (72,4%) unifokal lokalisiert waren, konnte bei 47 Patienten/Patientinnen (27,6%) ein multifokales Tumorstadium diagnostiziert werden. 120 der Tumoren gehörten nach Abgleich mit der Primärbefundung zu den klassischen PTCs (70,5%), 45 Tumoren (26,5%) waren dem follikulären Subtyp zuzuordnen sowie 3 (1,8%) dem onkozytären und 2 (1,2%) dem soliden Subtyp (Abbildung 14). 51 der Schilddrüsenpräparate wiesen eine begleitende Thyreoiditis nach histopathologischen Kriterien auf.

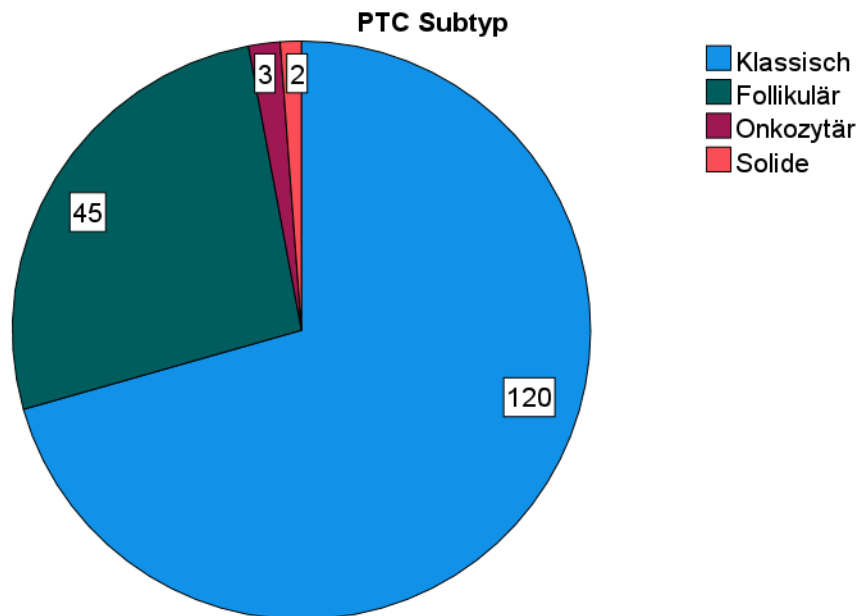


Abbildung 14 - Übersicht über die histologischen PTC-Subtypen

Der mediane Tumordurchmesser betrug 13,00 mm bei einem Mittelwert von 19,26 mm und einer Spannweite von 1 – 150 mm. Die genaue Tumorgroße war bei 11 Patienten/Patientinnen unbekannt und überwiegend aufgrund von externen Primäroperationen nicht mehr eruierbar.

Wichtig bei der histologischen Tumordiagnose ist die Klassifikation des Tumors nach TNM-System. Bei der hier vorliegenden Studie wurde die jeweils gültige TNM-Klassifikation zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zugrunde gelegt, entsprechend Kapitel 2.2.5 TNM-Klassifikation (Tabelle 1, Tabelle 2, Tabelle 3). Bei einem Fall waren keine T- und N-Klassifikationen bei externem Vorbefund hinterlegt. Rund der Hälfte der Tumoren (89/169 \cong 52,7%) konnte bei Diagnosestellung ein pT1-Status zugeordnet werden. Es lag 51 Mal ein pT1a-Status und 36 Mal ein pT1b-Status vor. 20 Tumoren (11,8%) wiesen einen pT2-Status und 53 Tumoren (31,4%) einen pT3-Status auf. Hier waren 5 Tumoren mit pT3a- und 3 Tumoren mit pT3b-Status eingeschlossen. Einen pT4-Status hatten 7 PTCs (4,1%), eingeschlossen 5 Tumoren mit pT4a-Status (Tabelle 29).

Tabelle 29 - T-Status des Kollektivs

T-Status			Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozentwerte
Gültig	pT1	pT1	2	1,2	1,2
		pT1a	51	30	30,2
		pT1b	36	21,2	21,3
	pT2		20	11,8	11,8
	pT3	pT3	45	26,5	26,6
		pT3a	5	2,9	3
		pT3b	3	1,8	1,8
	pT4	pT4	2	1,2	1,2
		pT4a	5	2,9	3
	Gesamt			169	99,4
Fehlend*	Unbekannt		1	0,6	
Gesamt			170	100	

*fehlende Angabe des T-Status in einem Fall

70 Patienten/Patientinnen (41,4%) wiesen keine Lymphknotenmetastasen auf, entsprechend einem pN0-Status. Bei 62 Fällen (36,7%) wurden Metastasen in regionären Lymphknoten detektiert, entsprechend einem pN1-Status, unter Einschluss von 16 Patienten/Patientinnen (9,5%) mit pN1a- und 35 Patienten/Patientinnen (20,7%) mit pN1b-Status. 37 Fälle (21,9%) wurden pNX klassifiziert, weil keine Lymphknoten histologisch untersucht wurden (Tabelle 30). Die Anzahl der tumorbefallenen Lymphknoten war im Mittel 2,86 bei einem Median von 0,00 und einer Spannweite von 0 bis 40 tumorbefallenen Lymphknoten.

Tabelle 30 - N-Status des Kollektivs

N-Status			Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozentwerte
Gültig	pN0		70	41,2	41,4
	pN1	pN1	11	6,5	6,5
		pN1a	16	9,4	9,5
		pN1b	35	20,6	20,7
	pNx		37	21,8	21,9
	Gesamt		169	99,4	100
Fehlend*	Unbekannt		1	0,6	
Gesamt			170	100	

*fehlende Angabe des N-Status in einem Fall

Bei Diagnosestellung eines PTCs hatten 4 Erkrankte (2,4%) des Kollektivs Fernmetastasen, folglich einen M1-Status (Tabelle 31), wobei die Fernmetastasen hier ausschließlich die Lunge betrafen. Zusammengenommen mit den Fällen, die im Verlauf des Follow-ups eine Fernmetastasierung entwickelt haben (vgl. Kapitel 4.1.1), wiesen insgesamt 9 Patienten/Patientinnen (5,3%) im Kollektiv der 170 Fälle eine fernmetastasierte Erkrankung auf.

Tabelle 31 - M-Status des Kollektivs

		Häufigkeit	Prozent
Gültig	M0	166	97,6
	M1	4	2,4
	Gesamt	170	100

Fast alle Tumoren, genauer 163 (95,9%) der PTCs, wurden vollständig im Gesunden reseziert, entsprechend einem R0-Status. Bei 6 Tumoren erfolgte eine R1-Resektion nach histomorphologischen Kriterien. In diesen Fällen reichten mikroskopisch Anteile des Tumors an den Resektionsrand heran. Bei einem Tumor erfolgte eine R2-Resektion, bei der makroskopisch sichtbare Tumorreste im Körper verblieben.

4.2 Molekularpathologische Charakterisierung mittels NGS

Bei den 170 untersuchten Tumoren war eine *BRAF*-Mutationsanalyse wie beschrieben im Vorfeld gemäß dem Ablauf in der pathologischen Diagnostik und durch ein weiteres wissenschaftliches Projekt im Institut für Pathologie (.....) bereits durchgeführt worden, sodass der *BRAF*-Mutationsstatus zum Abgleich mit den Analysen der vorliegenden Arbeit zur Verfügung stand. Im Vorfeld wurden 103 Fälle mit einer *BRAF*^{V600E}-Mutation detektiert. Da aus der Literatur bekannt ist, dass *BRAF*- und *RAS*-Mutationen sich im Grunde gegenseitig ausschließen (Nikiforov 2011a, Cancer Genome Atlas Research Network 2014), wurden die übrigen 67 *BRAF*^{V600E}-Wildtyp-Fälle mittels NGS-Analyse untersucht, insbesondere um *RAS*-Mutationen zu identifizieren. Zusätzlich wurden die Gene *BRAF* und *TP53* des verwendeten Genpanels betrachtet (siehe Anhang Tabelle 48).

Im Rahmen der Auswertung der Sequenzierdaten in der CLC Genomis Workbench erhält man unter anderem Angaben zur detektierten Genvariante, der dazugehörigen Coverage, der Frequenz, dem Transkript und der Veränderung auf Proteinebene. So kann auch geprüft werden, ob die vorliegende Variante eine Änderung der Aminosäuresequenz zur Folge hat. Die „Coverage“ (im Deutschen „Abdeckung“) zeigt an, wie viele Reads in einer DNA-Sequenz generiert wurden. Je höher die Coverage, desto häufiger wurde der DNA-Bereich gelesen und desto zuverlässiger werden die Ergebnisse der Sequenzierung (Arnemann 2019). „Count“ bezieht sich auf die Anzahl der Sequenzierungsreads/-fragmente, die einem bestimmten Gen zugeordnet werden können. Wenn man die Anzahl der Counts durch die Coverage teilt, erhält man die Frequenz. Die „Frequency“ (im Deutschen „Frequenz“) gibt folglich wieder, in welcher Häufigkeit die detektierte DNA-Sequenzvariante in der herangezogenen Probe nachweisbar ist (Lehmann and Stenzinger 2022). Die Frequenz ist entscheidend für die Identifikation von genetischen Variationen. In der Analyse wurden Varianten mit einer Allelfrequenz von über 5% berücksichtigt.

In der Sequenzierungsanalyse konnte in drei Tumoren eine *BRAF*^{V600E}-Mutation nachgewiesen werden, die vorher nicht bekannt war. Folglich wurde anstatt der bereits bekannten 103 *BRAF*^{V600E}-mutierten Fälle in insgesamt 106 der 170 untersuchten PTCs und somit in 62,4% der Fälle eine *BRAF*^{V600E}-Mutation detektiert. Der Basenaustausch bewirkt den Einbau von Glutaminsäure anstatt Valin in das Protein an Position 600 (Tabelle 32). Weitere seltenere *BRAF*-Mutationen konnten nicht detektiert werden. Entsprechend der Online Datenbank CIVic tritt die *BRAF*^{V600E}-Mutation in vielen Krebsarten auf und stellt die mit am umfangreichsten untersuchte Genvariante in Malignomen dar (The McDonnell Genome Institute at Washington University School of Medicine o.D.-a). Auch nach der Online

Datenbank Cancer Hotspots ist die *BRAF*^{V600E}-Mutation die häufigste bekannte *BRAF*-Mutation (Kravis Center for Molecular Oncology at Memorial Sloan Kettering Cancer Center o.D.).

Unter den 64 Fällen mit *BRAF*^{V600E}-Wildtyp wurden 12 *RAS*-mutierte PTCs gefunden (7,1% in Bezug auf das Gesamtkollektiv von 170 Fällen). Die größte Gruppe innerhalb der 12 *RAS*-Mutationen bildeten die PTCs mit einer Mutation im *NRAS*-Gen, die 58,3% der *RAS*-Mutationen ausmachten. In vorliegender Studie wurden 7 Fälle mit einer *NRAS*-Mutation detektiert (4,1% in Bezug auf das Gesamtkollektiv). 4 PTCs wiesen eine *HRAS*-Mutation auf (2,4% in Bezug auf das Gesamtkollektiv). Bei einem Fall konnte eine *KRAS*-Mutation nachgewiesen werden (0,6% in Bezug auf das Gesamtkollektiv). Bei keinem der untersuchten Fälle lag eine *TP53*-Mutation vor.

In allen 7 *NRAS*-mutierten PTCs wurde in der NGS-Analyse die gleiche Mutation detektiert. Es handelt sich um eine Punktmutation, bei der ein Basenaustausch in der DNA in Kodon Q61 vorliegt (Tabelle 32). Die Punktmutation verursacht den Einbau von Arginin statt Glutamin an Position 61. Diese Änderung der Aminosäure im Protein nennt man Missense-Mutation. Nach der Online Datenbank Cancer Hotspots stellt die vorliegende *NRAS*-Mutation (Kurzform *NRAS Q61R*) eine bekannte Hotspot-Mutation dar (Kravis Center for Molecular Oncology at Memorial Sloan Kettering Cancer Center o.D.).

Bezüglich der *HRAS*-Mutationen der 4 Fälle wurden zwei verschiedene Mutationen innerhalb des Kodons Q61 nachgewiesen (Tabelle 32). Auch hier handelt es sich um Punktmutationen mit konsekutiver Änderung der Aminosäure im Protein (Missense-Mutation). Die Punktmutation verursacht entweder den Einbau von Lysin oder Arginin anstatt Glutamin an Position 61 im Protein. Beide Mutationen (Kurzformen *HRAS Q61K* und *HRAS Q61R*) sind in der Online Datenbank Cancer Hotspots als Hotspot-Mutationen bekannt (Kravis Center for Molecular Oncology at Memorial Sloan Kettering Cancer Center o.D.).

Die *KRAS*-Mutation des einen PTCs entspricht ebenfalls einer Punktmutation und wurde in Kodon G12 nachgewiesen (Tabelle 32). Der Basenaustausch bewirkt den Einbau von Valin anstatt Glycin an Position 12 des Proteins (Missense-Mutation). Auch die gefundene *KRAS*-Mutation (Kurzform *KRAS G12V*) ist bereits eine bekannte Mutation entsprechend der Online Datenbank Cancer Hotspots (Kravis Center for Molecular Oncology at Memorial Sloan Kettering Cancer Center o.D.).

Tabelle 32 - *BRAF*- und *RAS*-Mutationen in der NGS-Analyse

Mutation	Abdeckung (=Coverage)	Frequenz (=Frequency)	Variante im Transkript	Variante im Protein
<i>BRAF</i>-Gen	1377	31,08	NM_004333.4:c.1799T>A	NP_004324.2:p.Val600Glu
	674	10,98	NM_004333.4:c.1799T>A	NP_004324.2:p.Val600Glu
	1163	10,58	NM_004333.4:c.1799T>A	NP_004324.2:p.Val600Glu
<i>NRAS</i>-Gen	920	37,17	NM_002524.4:c.182A>G	NP_002515.1:p.Gln61Arg
	1278	42,49	NM_002524.4:c.182A>G	NP_002515.1:p.Gln61Arg
	1034	19,63	NM_002524.4:c.182A>G	NP_002515.1:p.Gln61Arg
	2502	35,85	NM_002524.4:c.182A>G	NP_002515.1:p.Gln61Arg
	1995	37,64	NM_002524.4:c.182A>G	NP_002515.1:p.Gln61Arg
	998	26,85	NM_002524.4:c.182A>G	NP_002515.1:p.Gln61Arg
	928	9,05	NM_002524.4:c.182A>G	NP_002515.1:p.Gln61Arg
<i>HRAS</i>-Gen	6209	9,58	NM_005343.3:c.181C>A	NP_005334.1:p.Gln61Lys
	1654	35,97	NM_005343.3:c.181C>A	NP_005334.1:p.Gln61Lys
	5935	40,66	NM_005343.3:c.182A>G	NP_005334.1:p.Gln61Arg
	4861	10,35	NM_005343.3:c.182A>G	NP_005334.1:p.Gln61Arg
<i>KRAS</i>-Gen	652	17,18	NM_033360.3:c.35G>T	NP_203524.1:p.Gly12Val

Zusammenfassend wurden bei dem hier vorliegenden Kollektiv die Mutationen im *NRAS*- und im *HRAS*-Gen in Kodon Q61 und die Mutation im *KRAS*-Gen in Kodon G12 gefunden. Aus der Literatur ist bekannt, dass der Großteil der Krebs-assoziierten Mutationen der *RAS*-Gene in den Kodons G12, G13 und Q61 sowie in einem kleineren Anteil in den Kodons K117 und A146 vorkommt (Tripathi, Dsouza et al. 2022). Die in dieser Arbeit detektierten Mutationen stellen somit in der Literatur bekannte Hotspot-Mutationen dar. Folgendes Säulendiagramm visualisiert zusammenfassend den Mutationsstatus des Kollektivs in Bezug auf die *BRAF*- und *RAS*-Gene (Abbildung 15).

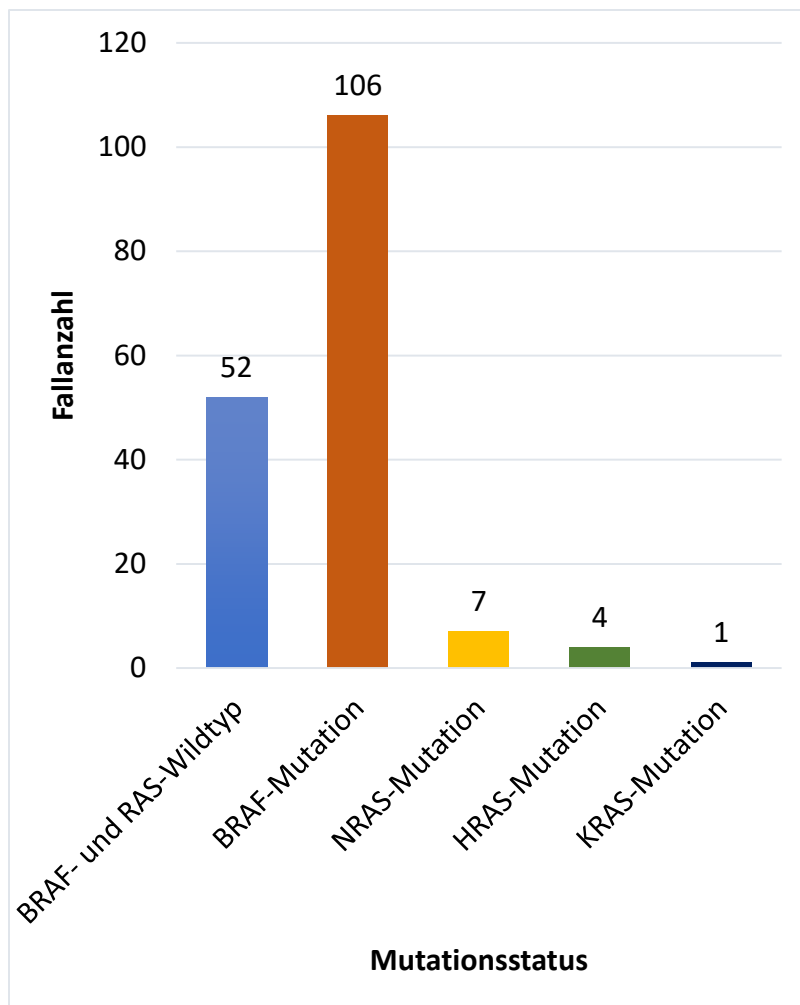


Abbildung 15 - *BRAF*- und *RAS*-Status des Gesamtkollektivs

Bei Vergleich mit der COSMIC Datenbank ergibt sich eine relativ ähnliche Häufigkeitsverteilung der Mutationen der *BRAF*-, *NRAS*-, *HRAS*-, und *KRAS*-Gene in PTCs wie in dem hier untersuchten Kollektiv (Tabelle 33).

Tabelle 33 - Häufigkeiten der Genmutationen im Vergleich mit der COSMIC Datenbank

Mutationen im entsprechenden Gen	Häufigkeit im vorliegenden Kollektiv	Häufigkeit in der COSMIC Datenbank
NRAS	4,1%	5,74% (COSMIC 2024a)
HRAS	2,4%	2,07% (COSMIC 2024b)
KRAS	0,6%	1,17% (COSMIC 2024c)
BRAF	62,4%	54,73% (COSMIC 2024d)

4.2.1 Vergleichbarkeit der beiden Sequenziersysteme MiSeq und NextSeq

Es wurden 67 Fälle mittels NGS untersucht. Wie in Kapitel 3.7.5 beschrieben, wurden sowohl das MiSeq- als auch das NextSeq-System verwendet. Der MiSeq-Sequenzierer ist eine kleinere Sequenzierungsplattform, der NextSeq ist eine größere Plattform mit höherem Durchsatz. Die Auswertungsalgorithmen der Sequenzierdaten wurden für beide Geräte gleich durchgeführt. 45 Fälle wurden mit dem NextSeq-System und 22 Fälle mit dem MiSeq-System analysiert. Zur Validierung und zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden 6 Fälle, die mit dem NextSeq-Sequenzierer untersucht wurden und auswertbar waren, zusätzlich mit dem MiSeq-Gerät untersucht. In 4 Fällen war bei beiden Sequenziersystemen die gleiche Mutation mit einer ähnlichen Allelfrequenz detektiert worden. In Bezug auf die Frequenz ergab sich im nicht-parametrischen Test zweier verbundener Stichproben (Wilcoxon-Test) kein Unterschied ($p=0,465$), (Tabelle 34). Bei zwei Fällen wurden sowohl beim NextSeq- als auch beim MiSeq-System ausschließlich Wildtypsequenzen für *RAS*, *BRAF* und *TP53* gefunden. In den Übersichtstabellen zu den detektierten Mutationen in Kapitel 4.2 wurden die Ergebnisse des Sequenziersystems angegeben, die eine höhere Coverage (Abdeckung) im Bereich der Genvarianten aufgewiesen haben.

Tabelle 34 - Vergleich der beiden Sequenziersysteme MiSeq und NextSeq

Fallnummer	Illumina-System	Mutation	Count	Coverage	Frequency	Signifikanz
1	NextSeq	<i>HRAS</i>	311	3124	9,96	p=0,465
	MiSeq		503	4861	10,35	
2	NextSeq	<i>BRAF</i>	74	674	10,98	
	MiSeq		113	1323	8,54	
3	NextSeq	<i>NRAS</i>	792	2221	35,66	
	MiSeq		897	2502	35,85	
4	NextSeq	<i>NRAS</i>	84	928	9,05	
	MiSeq		74	985	7,51	
5	NextSeq	Nein	Wildtyp-Sequenzen für <i>RAS</i> , <i>BRAF</i> und <i>TP53</i>			
	MiSeq					
6	NextSeq	Nein	Wildtyp-Sequenzen für <i>RAS</i> , <i>BRAF</i> und <i>TP53</i>			
	MiSeq					

4.2.2 Klinische Daten zu den PTCs in Abhängigkeit vom Mutationsstatus

Im Folgenden werden die klinischen Daten der PTCs in Abhängigkeit vom *BRAF*- und *RAS*-Mutationsstatus dargestellt. Die univariate Analyse mit Darstellung des Zusammenhangs von Mutationsstatus und klinischen Daten findet sich tabellarisch auch im Anhang (Tabelle 49, Tabelle 50).

4.2.2.1 Alter und Geschlechterverteilung

Von den 106 *BRAF*^{V600E}-mutierten PTCs waren in 74 Fällen (69,8%) Frauen betroffen und in 32 Fällen Männer (30,2%). Die Geschlechterverteilung war ähnlich der Vergleichsgruppe mit

BRAF-Wildtypsequenz ($p=0,721$) bei hier 67,2% Frauenanteil und 32,8% Männeranteil. Bezüglich des Alters bei initialem Schilddrüseneingriff konnte ein Unterschied zwischen den *BRAF*^{V600E}-mutierten gegenüber den *BRAF*-Wildtyp-Fällen gefunden werden ($p=0,021$), wobei *BRAF*-Mutationen mit einem höheren Alter assoziiert waren (Abbildung 16). Der Median bei den *BRAF*^{V600E}-mutierten Fällen betrug 48,50 Jahre (bei einer Spannweite von 23 – 85 Jahren), bei der Wildtyp-Gruppe 47,00 Jahre (bei einer Spannweite von 8 – 77 Jahren).

Unter den zwölf an einem *RAS*-mutierten PTC erkrankten Personen waren elf Frauen und ein Mann. Da PTCs auch im *RAS*-Wildtyp-Kollektiv bei Frauen häufiger vorkamen, ergab sich hier kein signifikanter Unterschied ($p=0,111$). *RAS*-Mutationen kamen in einer Altersspanne von 30 – 77 Jahren vor. Es ergab sich kein Zusammenhang von Alter und *RAS*-Mutationsstatus ($p=0,689$).

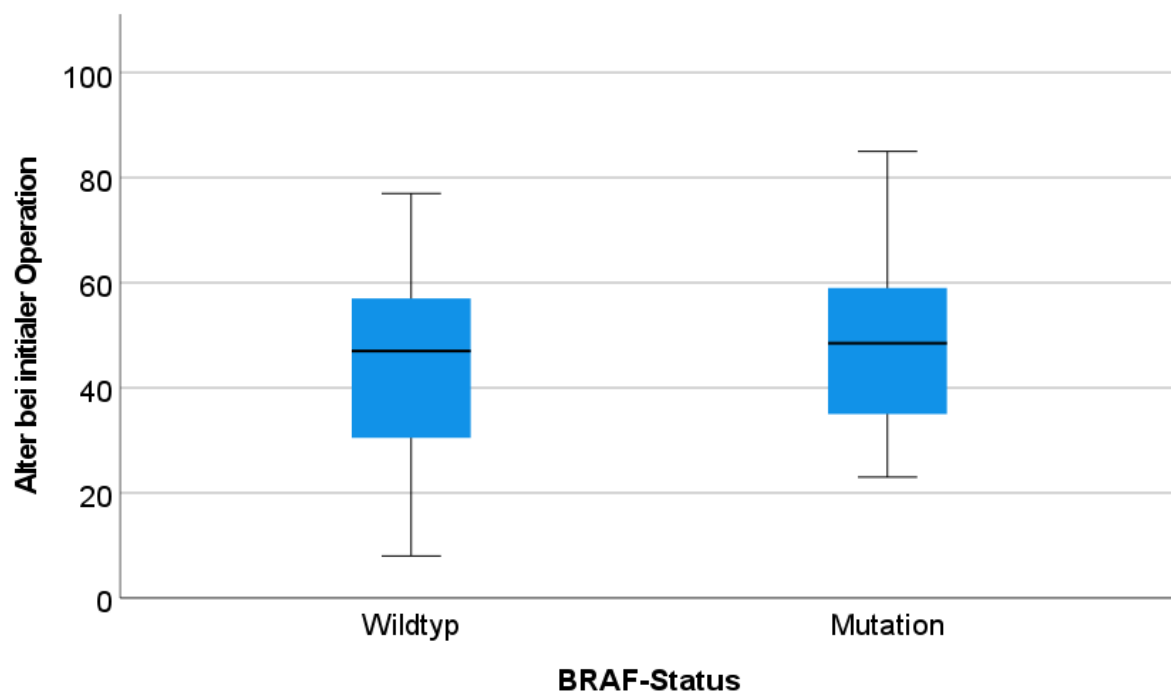


Abbildung 16 - Altersverteilung bei initialer Operation in Abhängigkeit vom *BRAF*-Mutationsstatus (Boxplots)

4.2.2.2 Operativer Eingriff

Bei 86,8% der *BRAF*^{V600E}-mutierten Fälle (92/106) wurde bereits initial eine Thyreoidektomie durchgeführt, eine Hemithyreoidektomie bei 13,2% der Fälle (14/106). Im Vergleich dazu erfolgte bei 70,3% der Wildtyp-Fälle (45/64) eine initiale Thyreoidektomie, bei 28,1% (18/64) eine Hemithyreoidektomie und bei 1,6% (1/64) eine subtotale Thyreoidektomie. Unter den *BRAF*^{V600E}-mutierten Fällen erfolgte bei 11 Patienten/Patientinnen nach initialem Schilddrüseneingriff eine komplettierende Thyreoidektomie.

Unter den *RAS*-mutierten Fällen wurde bei 6 Patienten/Patientinnen eine Thyreoidektomie durchgeführt und bei 6 Fällen eine Hemithyreoidektomie. Bei allen 6 Fällen mit initialer Hemithyreoidektomie erfolgte ein zweizeitiger Eingriff im Sinne einer komplettierenden Thyreoidektomie.

4.2.2.3 Rezidive, rezidivfreies Überleben und Todesfälle

Die $BRAF^{V600E}$ -mutierten Fälle wurden mit einer medianen Follow-up-Zeit von 53,50 Monaten nachbeobachtet. Auch die Patienten/Patientinnen mit RAS -mutierten PTCs wurden etwa 5 Jahre im Rahmen des Follow-ups nachverfolgt, der Median lag bei 60 Monaten. Der eine Todesfall, der während des Follow-ups 12 Jahre nach initialem operativem Eingriff aufgrund tumorbedingter Komplikationen auftrat, hatte ein PTC mit $BRAF^{V600E}$ -Mutation.

Im Gesamtkollektiv wurden bei insgesamt 23 Patienten/Patientinnen Rezidive beobachtet, 15 Tumoren davon wiesen eine $BRAF^{V600E}$ -Mutation auf und 2 PTCs eine RAS -Mutation. Somit traten bei 15/106 (14,2%) der $BRAF$ -mutierten Fälle Rezidive auf, innerhalb der $BRAF$ -Wildtyp-Kohorte waren 8/64 Fälle (12,5%) von einem Rezidiv betroffen. Es ergab sich kein Einfluss des $BRAF$ -Mutationsstatus auf die Rezidivrate ($p=0,761$), (Abbildung 17). Bei den RAS -mutierten PTCs waren es 2/12 PTCs (16,7%), die ein Rezidiv entwickelten. Das RAS -Wildtyp-Kollektiv wies in 13,4% der Fälle Rezidive auf (21/157). Auch eine RAS -Mutation hatte keinen statistisch fassbaren Einfluss auf die Rezidivrate ($p=0,742$), (Abbildung 17).

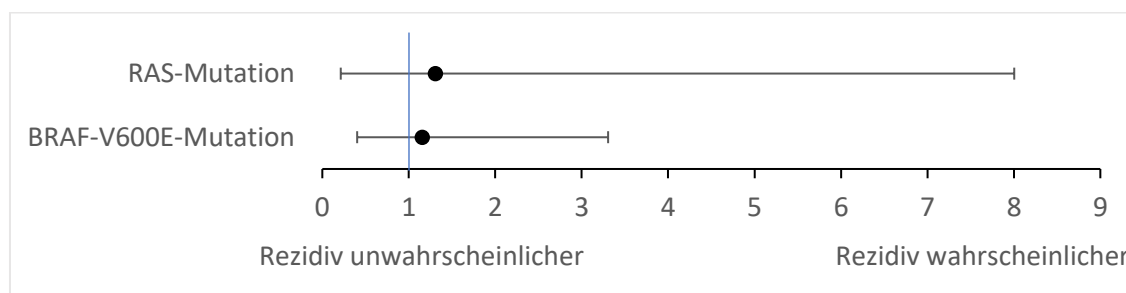


Abbildung 17 - Odds Ratios des Rezidivrisikos (Forest-plots)

Veranschaulichung der Odds Ratios (mit 97,5% Konfidenzintervall) bezüglich des Rezidivrisikos in Abhängigkeit von RAS -Mutation und $BRAF^{V600E}$ -Mutation mittels Forest-plots bei logistischer Regressionsanalyse.

Folgende Grafik stellt das rezidivfreie Überleben bei Vergleich der Gruppen $BRAF$ -Wildtyp ($n=64$) versus $BRAF$ -Mutation ($n=106$) in Kaplan-Meier-Kurven dar. Die Personen, die im Verlauf des Follow-ups kein Rezidiv erlitten hatten, sind in der Grafik nach Ende des Follow-ups zensiert. Die Kurven unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($p=0,940$), sodass $BRAF$ -Mutationen in der vorliegenden Analyse keinen Einfluss auf die Zeit des rezidivfreien Überlebens hatten. Zu beachten ist, dass sich die beiden Kurven im Verlauf mehrfach überschneiden, sodass der p -Wert für sich genommen nur eingeschränkt repräsentativ ist. Allerdings unterscheiden sich auch die Kurven in der Anfangsphase bis zu einem Zeitpunkt von 70 Monaten nach initialer Operation ebenfalls nicht signifikant ($p=0,388$), jedoch mit einer leichten Tendenz zu einer höheren rezidivfreien Überlebensrate bei den $BRAF$ -Wildtyp-Fällen (Abbildung 18).

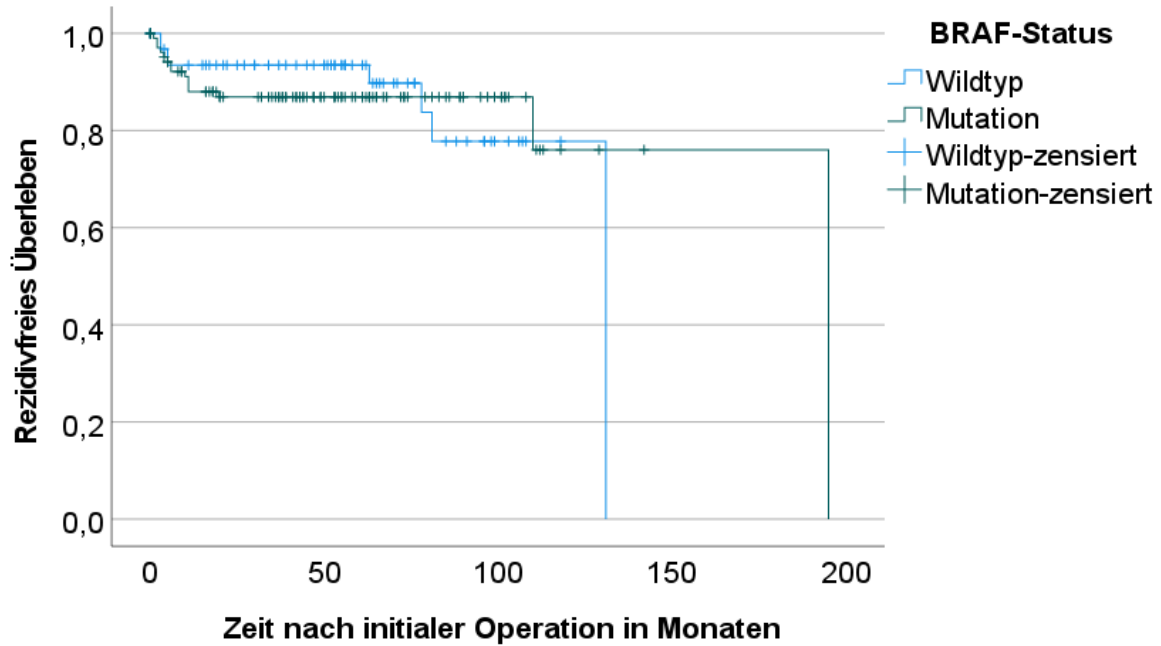


Abbildung 18 - Rezidivfreies Überleben und *BRAF*-Mutationsstatus (Kaplan-Meier-Kurven)

Folgende Kaplan-Meier-Kurven stellen das rezidivfreie Überleben bei Vergleich der Gruppen *RAS*-Wildtyp ($n=158$) versus *RAS*-Mutation ($n=12$) dar. Die Kurven unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($p=0,565$), folglich hatten *RAS*-Mutationen keinen Einfluss auf die Zeit des rezidivfreien Überlebens. Allerdings überschneiden sich auch hier beide Kurven, sodass der p -Wert alleine nur eingeschränkt repräsentativ ist (Abbildung 19).

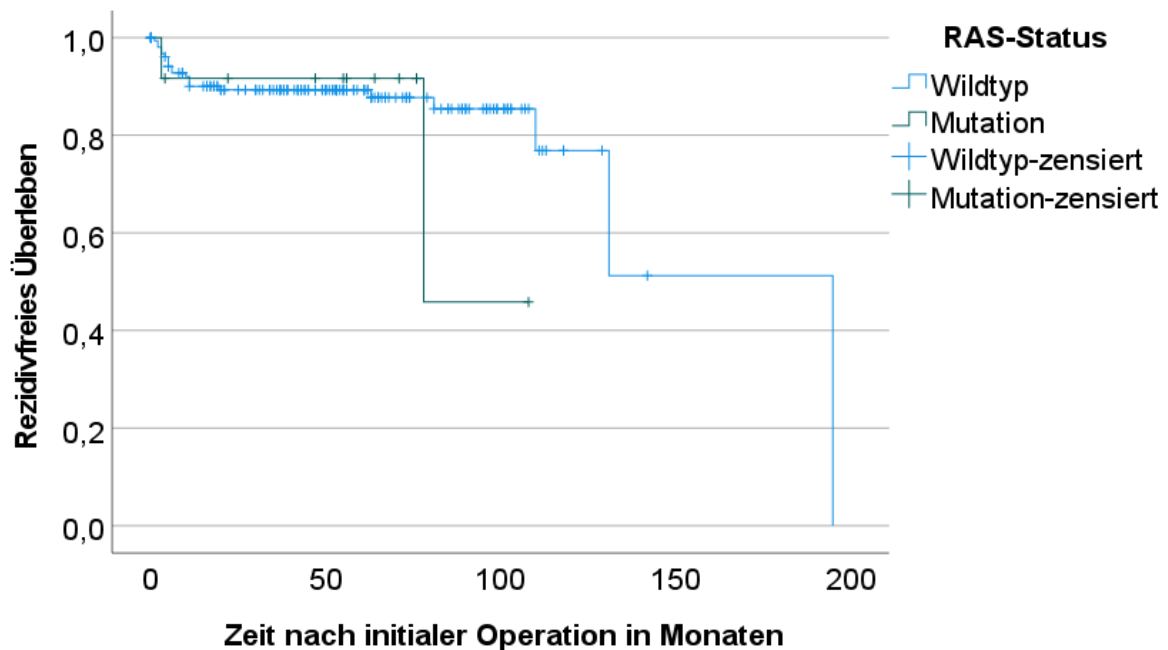


Abbildung 19 - Rezidivfreies Überleben und *RAS*-Mutationsstatus (Kaplan-Meier-Kurven)

4.2.2.4 Fernmetastasen

Eine *BRAF*-Mutation spielte keine signifikante Rolle bezüglich der Entwicklung von Fernmetastasen ($p=0,912$) im Verlauf. 2,8% (3/106) der *BRAF*^{V600E}-mutierten Fälle und 3,1 % (2/64) der *BRAF*-Wildtyp-Fälle entwickelten im Laufe des Follow-ups Fernmetastasen, wobei bei beiden Gruppen ossäre und pulmonale Metastasen vorkamen. Bei Erstdiagnosestellung wies nur ein Fall mit *BRAF*-mutiertem PTC eine fernmetastasierte Erkrankung auf (1/106; 0,9 %). Dagegen hatten 3/63 (4,7%) der *BRAF*-Wildtyp-Fälle einen M1-Status bei Diagnosestellung ($p=0,159$). PTCs mit *BRAF*-Mutation neigten in der vorliegenden Analyse somit nicht zu einer erhöhten Fernmetastasierungsrate (Abbildung 20).

Keiner der *RAS*-mutierten Fälle wies bei Erstdiagnosestellung Fernmetastasen auf, wobei im Verlauf des Follow-ups bei einem Fall eine ossäre Fernmetastase auftrat (1/12; 8,33%). In der statistischen Analyse ergab sich kein Zusammenhang zwischen einer *RAS*-Mutation und dem Auftreten von Fernmetastasen ($p=0,280$) (Abbildung 20).

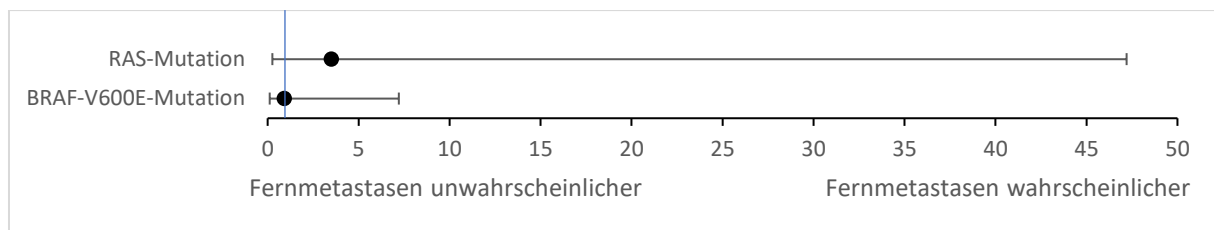


Abbildung 20 - Odds Ratios der Entwicklung von Fernmetastasen (Forest-plots)

Veranschaulichung der Odds Ratios (mit 97,5% Konfidenzintervall) bezüglich der Entwicklung von Fernmetastasen im Verlauf in Abhängigkeit von *RAS*-Mutation und *BRAF*^{V600E}-Mutation mittels Forest-plots bei logistischer Regressionsanalyse.

4.2.2.5 Radiojod-refraktäre Erkrankung

10,5% der *BRAF*-mutierten PTCs wiesen eine Radiojod-refraktäre Erkrankung auf. Dagegen ergab sich bei 5,2 % der *BRAF*-Wildtyp-Fälle eine Radiojod-refraktäre Erkrankung. Allerdings konnte in der statistischen Analyse keine signifikante Auswirkung der *BRAF*-Mutation auf eine Radiojod-refraktäre Erkrankung beobachtet werden ($p=0,269$). Es bestand lediglich eine Tendenz zu einer Radiojod-refraktären Erkrankung bei Vorliegen einer *BRAF*-Mutation. Die Analyse erfolgte unter Ausschluss der 26 Patienten/Patientinnen, bei denen keine Radiojodtherapie durchgeführt wurde. Alle 12 Patienten/Patientinnen mit *RAS*-mutierten PTCs erhielten eine Radiojodtherapie. Es konnte festgestellt werden, dass keine dieser Personen eine Radiojod-refraktäre Erkrankung entwickelte (Abbildung 21).

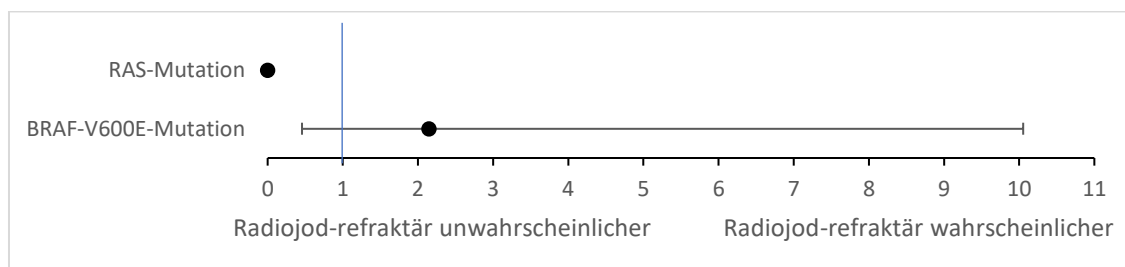


Abbildung 21 - Odds Ratios der Radiojod-refraktären Erkrankung (Forest-plots)

Veranschaulichung der Odds Ratios (mit 97,5% Konfidenzintervall) bezüglich der Radiojod-refraktären Erkrankung in Abhängigkeit von *RAS*-Mutation und *BRAF*^{V600E}-Mutation mittels Forest-plots bei logistischer Regressionsanalyse.

4.2.3 Histopathologische Aspekte der PTCs in Abhängigkeit vom Mutationsstatus

Die histopathologischen Aspekte der PTCs in Abhängigkeit vom *BRAF*- und *RAS*-Mutationsstatus werden hier aufgezeigt. Die univariate Analyse mit Darstellung des Zusammenhangs von Mutationsstatus und histopathologischen Daten findet sich auch im Anhang (Tabelle 49 und Tabelle 50).

4.2.3.1 PTC-Subtyp

BRAF^{V600E}-Mutationen traten grundsätzlich in klassischen PTCs sowie in verschiedenen Varianten des PTCs auf. In dem hier untersuchten Kollektiv entsprach ein Großteil der 106 *BRAF*^{V600E}-mutierten Tumoren dem klassischen Typ des PTC (85/106; 80,2%). Zudem wiesen 16 follikuläre, 3 onkozytäre und 2 solide Subtypen der PTCs eine *BRAF*^{V600E}-Mutation auf. *BRAF*^{V600E}-Mutationen kamen häufiger in klassischen PTCs als in der follikulären Variante vor ($p < 0,001$) (Abbildung 22). Die statistische Analyse vergleicht hier ausschließlich die klassischen PTCs mit dem follikulären Subtyp. Die onkozytäre und solide Variante wurde aufgrund der geringen Fallzahl ausgeschlossen. Das histologische Bild eines *BRAF*^{V600E}-mutierten klassischen PTC zeigt Abbildung 23.

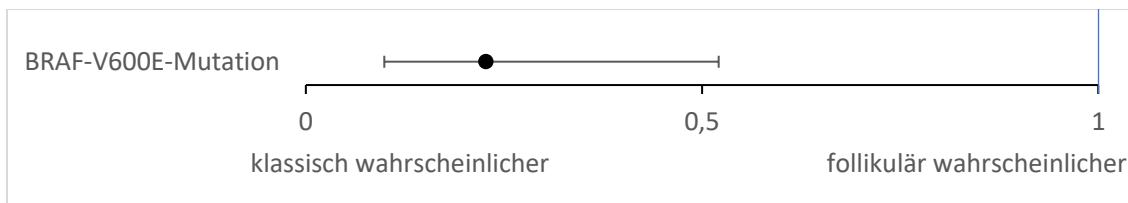


Abbildung 22 - Odds Ratio des PTC-Subtyps bei *BRAF*-Mutation (Forest-plots)

Veranschaulichung der Odds Ratio (mit 97,5% Konfidenzintervall) bezüglich des PTC-Subtyps in Abhängigkeit einer *BRAF*^{V600E}-Mutation mittels Forest-plot bei logistischer Regressionsanalyse.

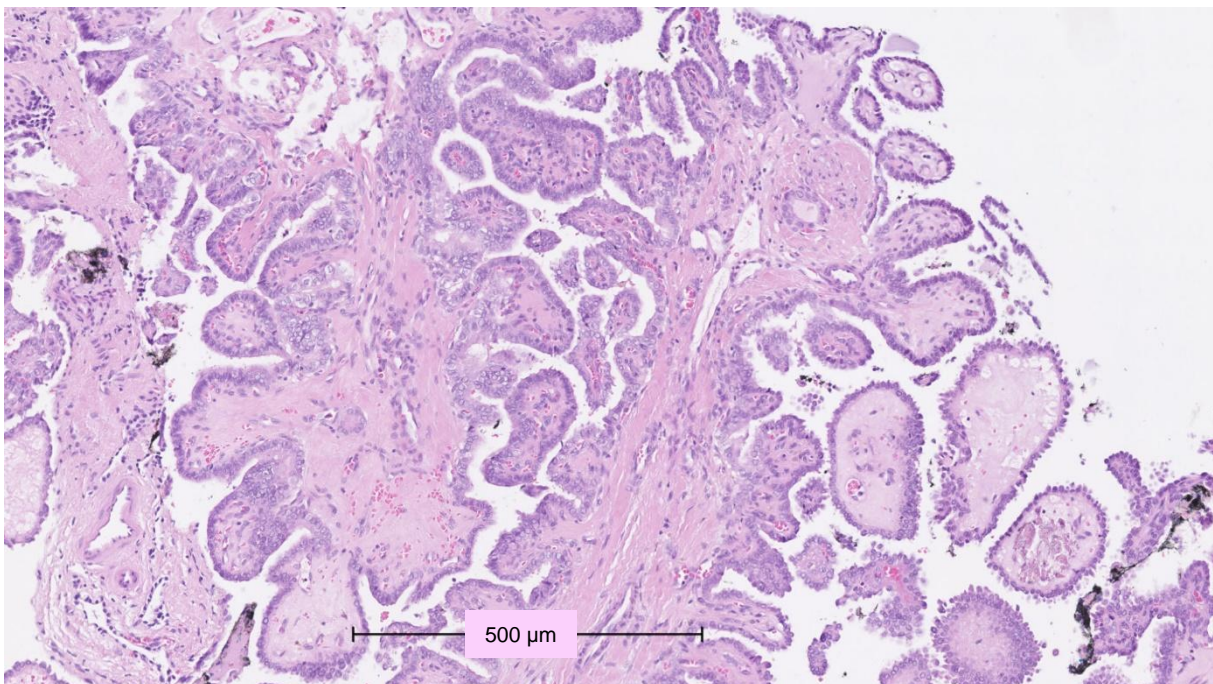


Abbildung 23 - Histologisches Bild eines klassischen PTCs mit *BRAF*^{V600E}-Mutation

10 der 12 *RAS*-mutierten PTCs (83,3%) wiesen eine überwiegend folliculäre histologische Architektur auf und wurden der folliculären Variante zugeordnet. Ein *NRAS*- und ein *KRAS*-mutiertes PTC waren konventionelle klassische PTCs. Eine *RAS*-Mutation war statistisch vermehrt mit dem Vorliegen des folliculären Subtyps assoziiert ($p < 0,001$) und weniger mit dem klassischen Subtyp (Abbildung 24). Der onkozytäre und solide Subtyp wurde bei geringer Fallzahl von der Analyse ausgeschlossen. Beispiele für die folliculäre Histologie *RAS*-mutierter PTCs sind in Abbildung 25 und Abbildung 26 dargestellt.

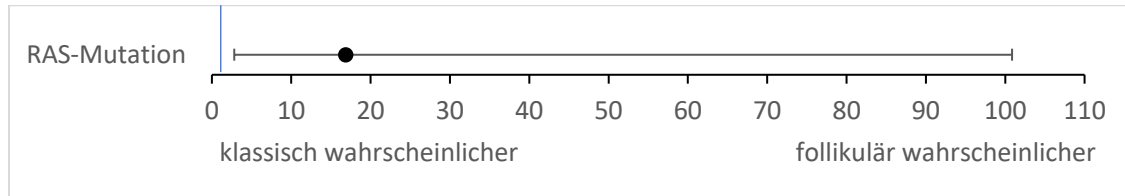


Abbildung 24 - Odds Ratio des PTC-Subtyps bei *RAS*-Mutation (Forest-plots)

Veranschaulichung der Odds Ratio (mit 97,5% Konfidenzintervall) bezüglich des PTC-Subtyps in Abhängigkeit einer *RAS*-Mutation mittels Forest-plot bei logistischer Regressionsanalyse.

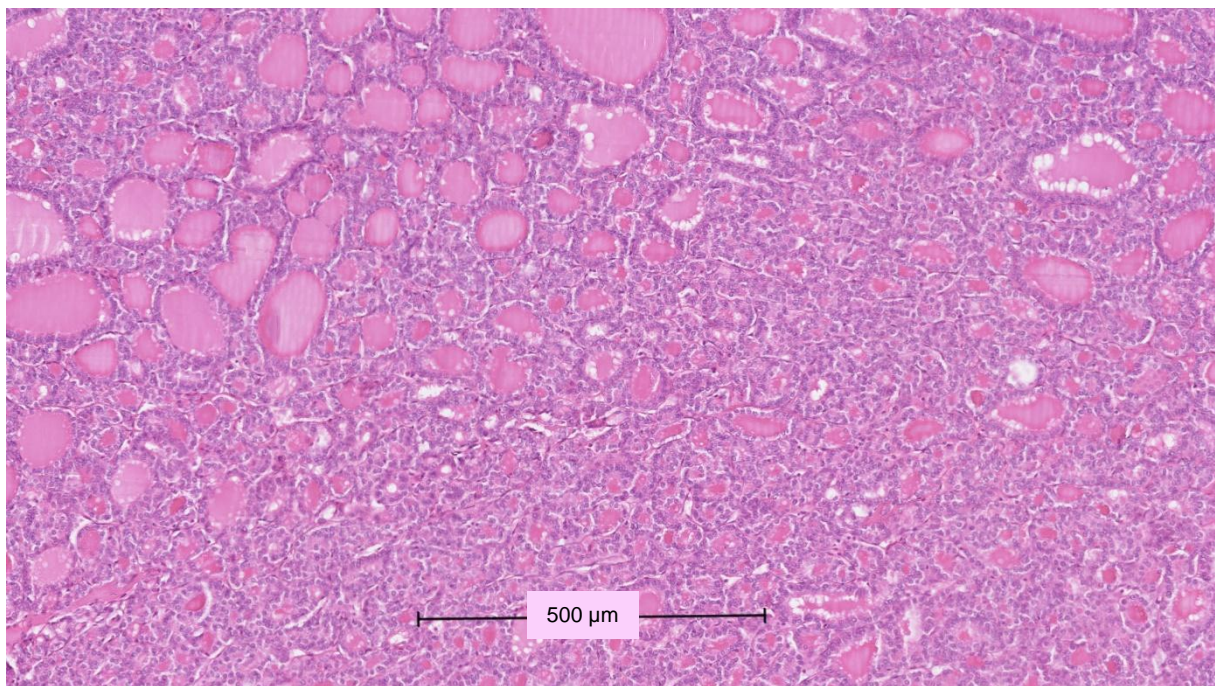


Abbildung 25 - Histologisches Bild des folliculären Subtyps mit *NRAS*-Mutation

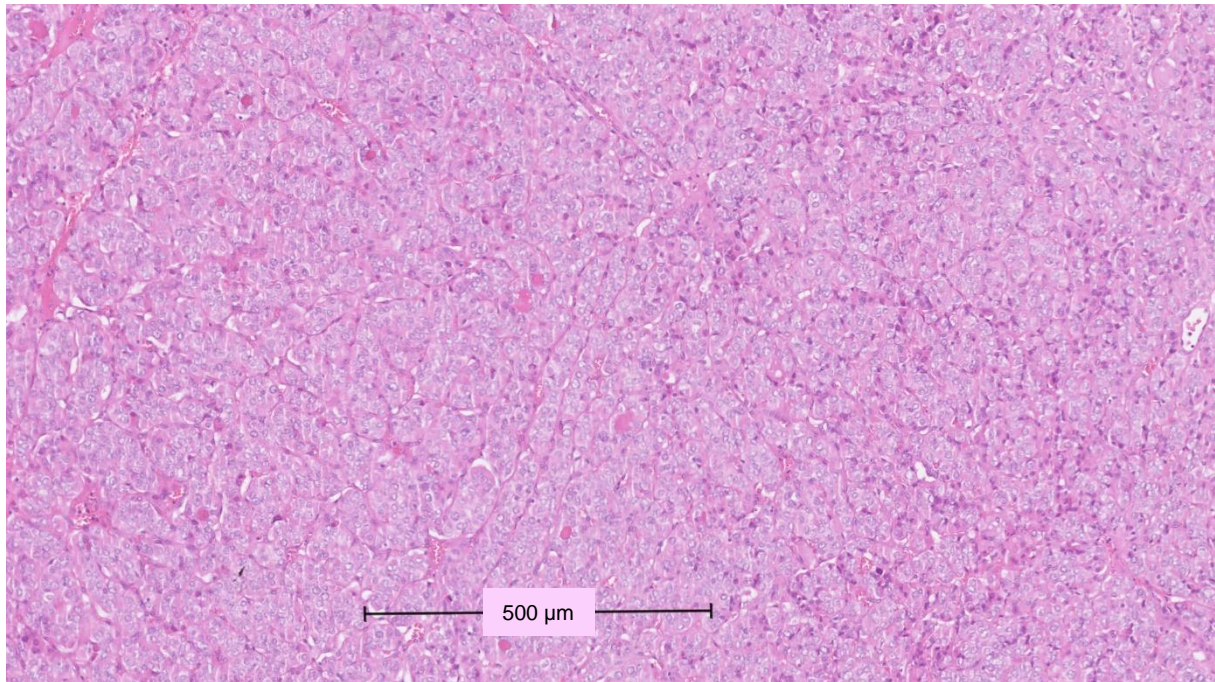


Abbildung 26 - Histologisches Bild des follikulären Subtyps mit *HRAS*-Mutation

Vorwiegend mikrofollikulärer Aufbau.

4.2.3.2 Fokalität

Aus der statistischen Analyse geht hervor, dass PTCs mit *BRAF*^{V600E}-Mutation häufiger multifokal als unifokal vorkamen ($p=0,020$) (Abbildung 27). 11 PTCs mit *RAS*-Mutation kamen unifokal, ein PTC mit *RAS*-Mutation kam multifokal vor (1/11; 9,09%). Genauer handelte es sich um den einzigen Fall, bei dem eine *KRAS*-Mutation detektiert werden konnte. Es konnte kein statistischer Zusammenhang zwischen einer *RAS*-Mutation und Multifokalität hergestellt werden ($p=0,221$) (Abbildung 27).

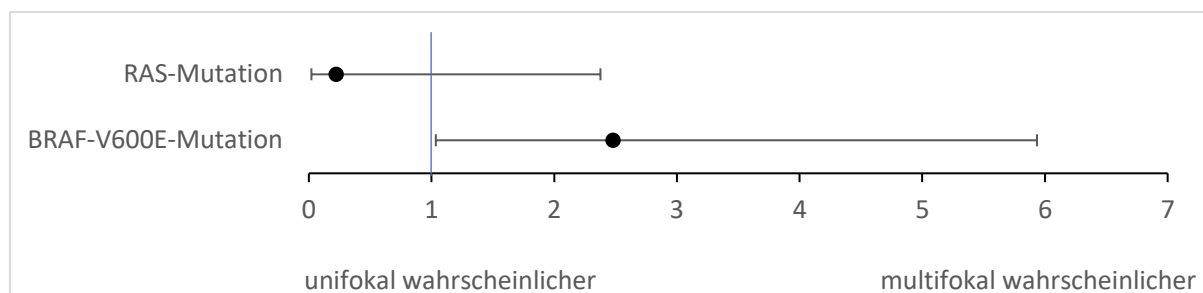


Abbildung 27 - Odds Ratios der Tumorfokalität unifokal versus multifokal (Forest-plots)

Veranschaulichung der Odds Ratios (mit 97,5% Konfidenzintervall) bezüglich der Tumorfokalität in Abhängigkeit von *RAS*-Mutation und *BRAF*^{V600E}-Mutation mittels Forest-plots bei logistischer Regressionsanalyse.

4.2.3.3 Tumorgröße

Die Tumorgröße war bei den *BRAF*^{V600E}-mutierten PTCs mit medianem Tumordurchmesser von 12,00 mm im Vergleich mit den *BRAF*-Wildtyp-PTCs mit medianem Tumordurchmesser von 15,00 mm kleiner ($p=0,022$) (Abbildung 28, Abbildung 29). Bei 8 Fällen mit *BRAF*-Mutation und bei 3 Fällen mit *BRAF*-Wildtyp war die Tumorgröße nicht bekannt.

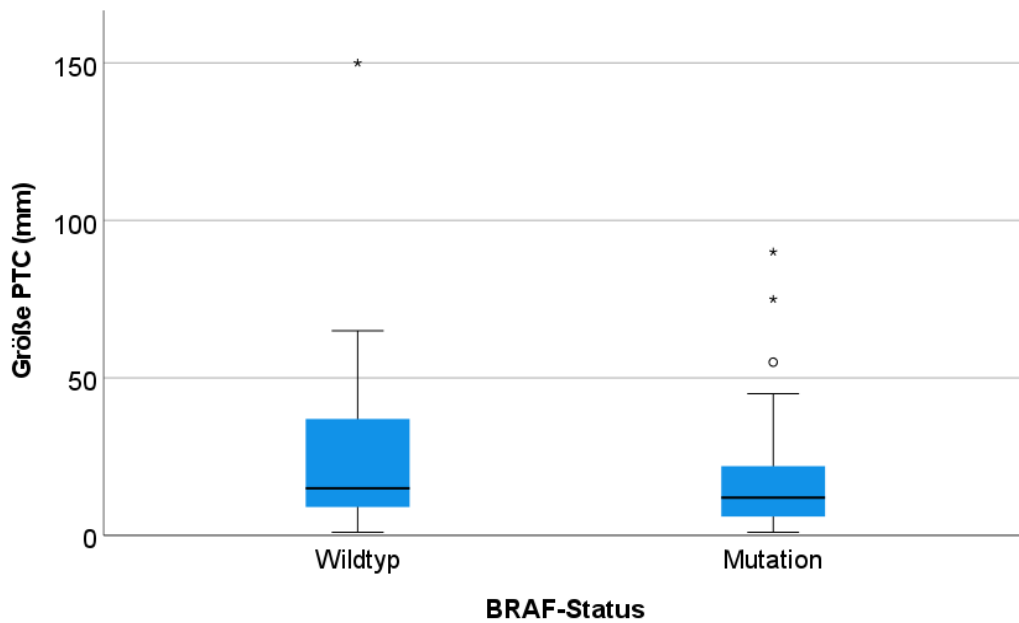


Abbildung 28 - Tumorgröße in Abhängigkeit vom *BRAF*-Mutationsstatus (Boxplots)

Die Tumorgröße der *RAS*-mutierten PTCs lag im Median bei 34,00 mm (bei einer Spannweite von 10 – 50 mm), verglichen mit der Wildtyp-Kohorte mit einem Median von 12,00 mm (bei einer Spannweite von 1 – 150 mm). Es lag eine Tendenz zu einem größeren Tumordiameter in *RAS*-mutierten Fällen vor. Das Ergebnis war in der linearen Regressionsanalyse grenzwertig nicht signifikant ($p=0,05$), wobei auch die 0 durch das 97,5%-Konfidenzintervall eingeschlossen wurde, sodass das Ergebnis formal als nicht signifikant galt (Abbildung 29). Bei 11 *RAS*-Wildtyp-Fällen war die genaue Tumorgröße bei externer Voroperation nicht bekannt.

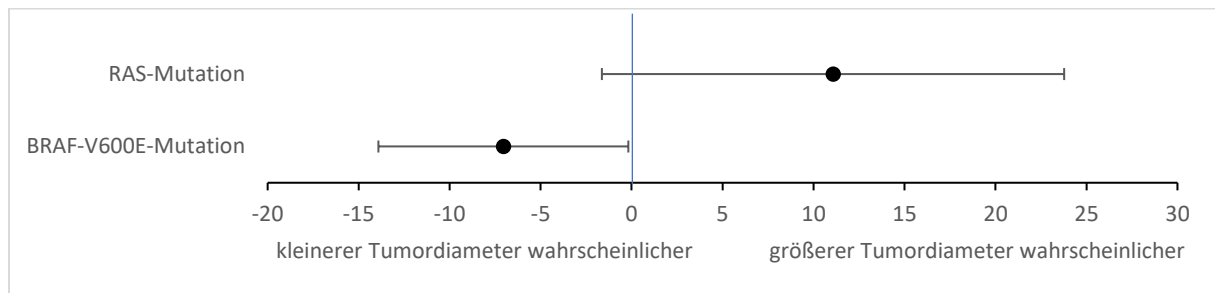


Abbildung 29 - Lineare Regressionsanalyse der Tumorgröße (Forest-plots)

Veranschaulichung der Regressionskoeffizienten (mit 97,5% Konfidenzintervall) bezüglich der Tumorgröße in Abhängigkeit von *RAS*-Mutation und *BRAF*^{V600E}-Mutation (mittels Forest-plots) bei linearer Regressionsanalyse.

4.2.3.4 Begleitthyreoiditis

Bei Vergleich der *BRAF*-mutierten und *BRAF*-Wildtyp-Fälle konnte kein Unterschied bezüglich des Vorliegens einer Begleitthyreoiditis gefunden werden ($p=0,679$). Eine Begleitthyreoiditis kam bei 4 der 12 *RAS*-mutierten Fälle vor (33,3%). Ein vergleichbarer Anteil der *RAS*-Wildtyp-Fälle (29,7%) wies eine Thyreoiditis auf. Es ergab sich auch hier kein Zusammenhang ($p=0,794$).

4.2.3.5 Pathologische T- und N-Klassifikation, R-Status

Wie beschrieben, wurde die jeweils gültige TNM-Klassifikation zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zugrunde gelegt (Tabelle 1, Tabelle 2, Tabelle 3). Bei einem Fall mit *BRAF*^{V600E}-Mutation waren keine T- und N-Klassifikationen bei externem Vorbefund hinterlegt. Rund die Hälfte der *BRAF*^{V600E}-mutierten (57/105) und der *BRAF*-Wildtyp-Fälle (32/64) waren einem pT1-Status zuzuordnen. Ein pT2-Status kam bei den *BRAF*^{V600E}-mutierten PTCs in 7,6% (8/105) und bei den *BRAF*-Wildtyp-PTCs in 18,8% (12/64) der Fälle vor, wohingegen ein pT3-Status bei 34,3% (36/105) der *BRAF*^{V600E}-mutierten und bei 26,6% (17/64) der *BRAF*-Wildtyp-Fälle vorkam. Die wenigsten Fälle waren einem pT4-Status zuzuordnen, 3,8% (4/105) der *BRAF*^{V600E}-mutierten PTCs und 4,7% (3/64) der *BRAF*-Wildtyp-Fälle.

Bei 39 Patienten/Patientinnen mit *BRAF*^{V600E}-Mutation (37,1%) wurden regionäre Lymphknotenmetastasen detektiert (pN1-Status), 50 Fälle (47,6%) hatten keine Lymphknotenmetastasen, entsprechend einem pN0-Status, und bei 16 Personen (15,2%) wurden keine regionären Lymphknoten histologisch untersucht (pNX). Zum Vergleich wurden bei der *BRAF*-Wildtyp-Gruppe in 35,9% der Fälle (23/64) Lymphknotenmetastasen detektiert. Keine Lymphknotenmetastasen konnten in 31,3% (20/64) nachgewiesen werden (pN0-Status). Bei einem Anteil von 32,8% (21/64) standen keine Lymphknoten für die histologische Untersuchung zur Verfügung. In der logistischen Regressionsanalyse hatte eine *BRAF*-Mutation keinen Einfluss auf den Lymphknotenstatus (pN0 versus pN1), unter Ausschluss der pNX-Fälle ($p=0,298$) (Abbildung 30). In beiden Gruppen (*BRAF*^{V600E}-mutiert und *BRAF*-Wildtyp) lag der Median bei 0,00 initial tumorbefallener Lymphknoten pro Individuum. Bei den *BRAF*^{V600E}-mutierten Fällen lag der Mittelwert initial tumorbefallener Lymphknoten bei 2,42 (bei einer Spannweite von 0 – 21) und bei den *BRAF*-Wildtyp-Fällen bei 3,56 (bei einer Spannweite von 0 – 40).

3 Tumoren mit *RAS*-Mutation wurden als pT1 (darunter zweimal pT1a und einmal pT1b), 5 als pT2 und 4 als pT3-Status klassifiziert. Der pT4-Status kam in dieser Gruppe nicht vor. Bei 4 Fällen (33,3%) wurden keine Lymphknotenmetastasen gefunden (pN0), bei einem Fall (8,3%) wurden Lymphknotenmetastasen detektiert (pN1a) und bei 7 Fällen (58,3%) wurden keine Lymphknoten entnommen (pNX). Bei dem als pN1a-klassifizierten Fall war eine *KRAS*-Mutation im Tumorgewebe detektiert worden. Hier wurden in 4 von 19 entnommenen Lymphknoten Metastasen diagnostiziert. Der Median der tumorbefallenen Lymphknoten pro Individuum betrug innerhalb der *RAS*-mutierten PTCs 0,00 bei einem Mittelwert von 0,33. Der Median der *RAS*-Wildtyp-Gruppe lag ebenfalls bei 0,00 bei einem Mittelwert von 3,05 und einer Spannweite von 0 – 40. In der logistischen Regressionsanalyse lag lediglich eine leichte Tendenz zur fehlenden Lymphknotenmetastasierung bei den *RAS*-mutierten PTCs vor ($p=0,248$) (Abbildung 30).

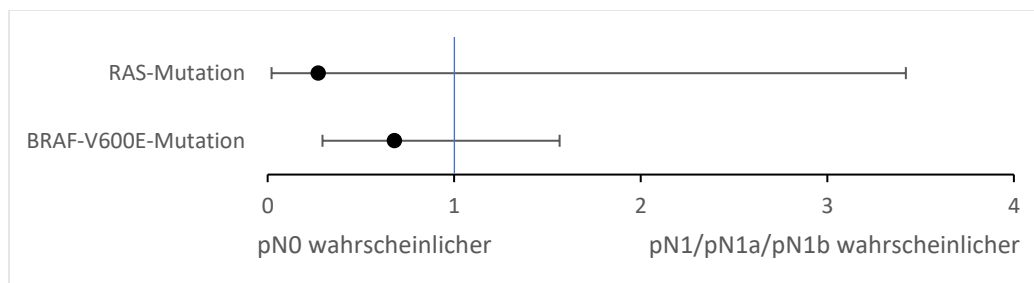


Abbildung 30 - Odds Ratios des Nodalstatus (Forest-plots)

Veranschaulichung der Odds Ratios (mit 97,5% Konfidenzintervall) bezüglich des Nodalstatus in Abhängigkeit von *RAS*-Mutation und *BRAF*^{V600E}-Mutation mittels Forest-plots bei logistischer Regressionsanalyse.

3 von 106 *BRAF*-mutierte und 3 von 64 *BRAF*-Wildtyp PTCs wurden initial nach histomorphologischen Kriterien R1-reseziert. Ein Fall mit *BRAF*-Mutation wurde R2-reseziert. Alle 12 *RAS*-mutierten PTCs wurden initial R0-reseziert.

4.3 Bestimmung von Genexpressionen mittels real-time PCR

4.3.1 Kollektiv der Genexpressionsanalysen

In der Literatur ist beschrieben, dass *TERT*-Promotormutationen vor allem in Verbindung mit *BRAF*-Mutationen eine schlechte Prognose begünstigen (Liu, Qu et al. 2014, Vuong, Altibi et al. 2017, Cao, Zhu et al. 2022, Cheng, Zhou et al. 2023). Die *TERT*_p-Mutationen des Gesamtkollektivs wurden im Vorfeld im Rahmen eines weiteren Forschungsvorhabens des Instituts für Pathologie und der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der UM durch untersucht und standen für die folgende Analyse zur Verfügung. Es wurden 16 Fälle mit einer *TERT*-Promotor C228T-Mutation gefunden (Staubitz, Müller et al. 2023).

Das Gesamtkollektiv von 170 Patienten/Patientinnen wurde unter Berücksichtigung des Mutationsstatus des *TERT*-Promotors und des *BRAF*^{V600E}-Gens in vier Gruppen aufgeteilt. In Bezug auf das Gesamtkollektiv waren 61 Fälle *BRAF*- und *TERT*_p-Wildtyp (Gruppe A), 13 Fälle *BRAF*- und *TERT*_p-mutiert (Gruppe B), 3 Fälle *BRAF*-Wildtyp und *TERT*-mutiert (Gruppe C) sowie 93 Fälle *BRAF*-mutiert und *TERT*_p-Wildtyp (Gruppe D). Aus den Gruppen A und D wurde ein Anteil der Fälle untersucht, die einen Tumorzellgehalt von mindestens 50% boten und sich aus dem Gewebe geeignete RNA für die weiterführenden Untersuchungen extrahieren ließ. Die Gruppe A diente als Kontrollgruppe ohne vorliegende *BRAF*- oder *TERT*_p-Mutation. Alle Fälle des Gesamtkollektivs aus Gruppe B und C wurden untersucht. Da *TERT*_p-Mutationen häufiger in Verbindung mit *BRAF*-Mutationen vorkamen, leiten sich die unterschiedlich großen Fallanzahlen in den jeweiligen Gruppen ab. Somit ergab sich das mittels real-time PCR untersuchte Kollektiv von insgesamt 52 Patienten/Patientinnen. Diese wurden insgesamt mit einem medianen Follow-up von 63 Monaten ($\pm 5,25$ Jahren) nachverfolgt, bei einer Spannweite von 13-396 Monaten. Die klinisch-pathologischen Eigenschaften sind in der Übersicht in Tabelle 35 dargestellt. In der Publikation von Staubitz-Vernazza, Müller et al. (2024) wurde das Fallkollektiv für die Genexpressionsanalysen im zeitlichen Verlauf nach Akquise der Daten der vorliegenden Arbeit um zusätzliche Fälle erweitert und die Gewebeproben erneut analysiert.

Tabelle 35 - Kollektiv zur Genexpressionsanalyse

Gruppen	A	B	C	D
Genetisches Profil	TERT_p^{Wildtyp} BRAF^{Wildtyp}	TERT_p^{Mutation} BRAF^{Mutation}	TERT_p^{Mutation} BRAF^{Wildtyp}	TERT_p^{Wildtyp} BRAF^{Mutation}
Fallzahl zur Genexpressions-analyse	16	13	3	20
Klinische Daten				
Medianes Alter	31,5 Jahre	62,0 Jahre	49,0 Jahre	42,0 Jahre
Geschlecht				
Weiblich	10 (62,5%)	5 (38,5%)	2 (66,7%)	14 (70,0%)
Männlich	6 (37,5%)	8 (61,5%)	1 (33,3%)	6 (30,0%)

Gruppen	A	B	C	D
Genetisches Profil	TERT^pWildtyp BRAF^{Wildtyp}	TERT^pMutation BRAF^{Mutation}	TERT^pMutation BRAF^{Wildtyp}	TERT^pWildtyp BRAF^{Mutation}
Medianes Follow-up	56,5 Monate (\pm 4,71 Jahre)	42,0 Monate (\pm 3,50 Jahre)	164,0 Monate (\pm 13,67 Jahre)	67,5 Monate (\pm 5,63 Jahre)
Rezidiv				
Nein	16 (100%)	5 (38,5%)	1 (33,3%)	20 (100%)
Ja	0 (0%)	8 (61,5%)	2 (66,7%)	0 (0%)
Fernmetastasen initial und im Verlauf des Follow-ups				
Nein	15 (93,7%)	10 (76,9%)	2 (66,7%)	20 (100%)
Ja	1 (6,3%) <i>initial</i>	3 (23,1%) <i>im Verlauf</i>	1 (33,3%) <i>im Verlauf</i>	0 (0%)
Radiojodtherapie durchgeführt				
Nein	1 (6,3%)	2 (15,38%)	0 (0%)	1 (5,0%)
Ja	15 (93,7%)	11 (84,62%)	3 (100%)	19 (95,0%)
Radiojod-refraktäre Erkrankung (nach Abschluss der Radiojodtherapie)				
Nein	16 (100%)	6 (46,2%)	2 (66,7%)	20 (100%)
Ja	0 (0%)	7 (53,8%)	1 (33,3%)	0 (0%)
Aggressive Tumorerkrankung				
Nein	15 (93,7%)	4 (30,77%)	1 (33,3%)	20 (100%)
Ja	1 (6,3%)	9 (69,23%)	2 (66,7%)	0 (0%)
Tumorbedingte Todesfälle				
Nein	16 (100%)	12 (92,31%)	3 (100%)	20 (100%)
Ja	0 (0%)	1 (7,69%)	0 (0%)	0 (0%)
Histologische Daten				
Mediane Tumorgroße	20 mm	35 mm	36 mm	16 mm
Fokalität				
Unifokal	14 (87,5%)	9 (69,2%)	3 (100%)	15 (75,0%)
Multifokal	2 (12,5%)	4 (30,8%)	0 (0%)	5 (25,0%)
Histologischer Subtyp				
Klassisch	6 (37,5%)	12 (92,3%)	2 (66,7%)	17 (85,0%)
Follikulär	10 (62,5%)	0 (0%)	1 (33,3%)	2 (10,0%)
Onkozytär	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Solide	0 (0%)	1 (7,7%)	0 (0%)	1 (5%)

4.3.2 Genexpression von *TERT*

Mittels quantitativer real-time PCR wurde die *TERT*-Genexpression der beschriebenen Kohorte untersucht und mittels REST-Software (Tabelle 12) analysiert. Es wurde erwartet, dass bei Nachweis einer *TERT^p*-Mutation auch eine erhöhte *TERT*-Expression detektiert werden kann. Umgekehrt war anzunehmen, dass eine geringere *TERT*-Expression bei den

*TERT*_p-Wildtyp-Fällen zu registrieren ist. Dennoch sollte zudem die Frage beantwortet werden, ob auch bei *TERT*_p-Wildtyp-Fällen eine *TERT*-Expression festzustellen ist.

Insgesamt wurde nur ein geringes Maß an mRNA-Expression der Telomerase detektiert. Daher wurde kategorial unterschieden, ob eine Expression zu detektieren war oder nicht. Ein C_t -Wert von <38 zeigte eine Genexpression an, wohingegen ein C_t -Wert von ≥ 38 eine unspezifische Amplifikation bedeutete und als fehlende Genexpression eingeordnet wurde. Von allen *TERT*_p-mutierten Fällen ($n=16 \triangleq$ Gruppe B+C) zeigten alle eine *TERT* mRNA-Expression mit C_t -Werten von 31,260 – 35,660. Es wurde zudem überprüft, ob eine *TERT* mRNA-Expression auch bei Fällen mit *TERT*_p-Wildtyp vorgelegen hat. 25% (9/36) der *TERT*_p-Wildtyp-Fälle (Gruppe A+D) zeigten auch ohne Mutation des *TERT*-Promotors eine mRNA-Expression der Telomerase, davon wiesen 5 Fälle eine *BRAF*^{V600E}-Mutation und 4 Fälle keine *BRAF*^{V600E}-Mutation auf (Tabelle 36). In der binär logistischen Regressionsanalyse hatte der *BRAF*-Mutationsstatus keinen statistisch fassbaren Einfluss auf das Vorliegen einer *TERT*-Expression ($p=0,222$). In dem untersuchten Kollektiv wiesen 4 Patienten/Patientinnen eine *RAS*-Mutation auf, darunter waren 3 *NRAS*-Mutationen und eine *HRAS*-Mutation. Zwei dieser Fälle wiesen eine mRNA-Expression der Telomerase auf, wobei bei einem Fall auch eine *TERT*-Promotormutation vorlag.

Tabelle 36 - *TERT*-Expression in Abhängigkeit vom *TERT*_p-Mutationsstatus

	<i>TERT</i>-Expression (C_t-Wert ≥ 38)	Keine <i>TERT</i>-Expression (C_t-Wert < 38)
<i>TERT</i>_p-Mutation	n=16 (30,77%)	n=0 (0 %)
<i>TERT</i>_p-Wildtyp	n=9 (17,31%) <ul style="list-style-type: none"> ▪ davon 5 <i>BRAF</i>^{V600E}-mutiert ▪ davon 4 <i>BRAF</i>^{V600E}-Wildtyp 	n=27 (51,92%)

Es wurde untersucht, ob Unterschiede in Bezug auf klinisch-pathologische Eigenschaften in Abhängigkeit von dem *TERT*_p-Mutationsstatus und dem Vorliegen einer *TERT*-Expression bestanden (Tabelle 37). Hierfür wurden drei verschiedene Gruppen gebildet. Die erste Gruppe bestand aus Fällen mit *TERT*_p-Mutation und *TERT*-Expression ($n=16$). Die zweite Fallgruppe wies eine *TERT*-Expression auf ohne vorliegende *TERT*_p-Mutation ($n=9$) und die dritte Gruppe bestand aus Fällen ohne *TERT*-Expression und ohne *TERT*_p-Mutation. Die Gruppen wurden paarweise mittels Chi-Quadrat-Test oder dem exakten Test nach Fisher (wenn die Fallanzahl < 5 betrug) in Bezug auf individuelle Faktoren, aggressive Eigenschaften und histopathologische Charakteristika verglichen. Als aggressive Tumoreigenschaften galten Rezidive, Fernmetastasen und eine Radiojod-refraktäre Tumorerkrankung. Bei *TERT*_p-mutierten/*TERT*-exprimierenden Fällen kam es häufiger zu Rezidiven und einer Radiojod-refraktären Erkrankung im Vergleich mit beiden anderen Gruppen. In Bezug auf das Auftreten von Fernmetastasen waren die Ergebnisse nicht signifikant, obwohl eine Tendenz zu einer fernmetastasierten Erkrankung bei der *TERT*_p-mutierten/*TERT*-exprimierenden Gruppe bestand. Zudem war die *TERT*-Expression in Kombination mit der *TERT*_p-Mutation mit einem höheren Alter assoziiert. Interessanterweise konnten keine Unterschiede in Bezug auf die aggressiven Tumoreigenschaften bei Vergleich der *TERT*-exprimierenden *TERT*_p-Wildtyp-Fälle mit den nicht *TERT*-exprimierenden *TERT*-Wildtyp-Fällen detektiert werden. Die histopathologischen Eigenschaften wie PTC-Subtyp und Fokalität unterschieden sich zwischen allen Gruppen nicht signifikant (Tabelle 37). Des Weiteren konnte ein kürzeres rezidivfreies Überleben bei den *TERT*-exprimierenden gegenüber den nicht *TERT*-exprimierenden Fällen nachgewiesen werden (Abbildung 31).

Tabelle 37 - Klinisch-pathologische Daten in Abhängigkeit von der *TERT*-Expression und dem *TERTp*-Mutationsstatus

Gruppen	1	2	3			
Genetisches Profil	TERT-Expression/ TERTp-Mutation	TERT-Expression/ TERTp-Wildtyp	keine TERT-Expression/ TERTp-Wildtyp	p (1 vs. 2)	p (1 vs. 3)	p (2 vs. 3)
Fallzahl	16	9	27			
Klinische Daten						
Medianes Alter	58,0 Jahre	31,0 Jahre	39,0 Jahre	0,011	0,006	0,648
< 55 Jahre	5 (31,3%)	8 (8,9%)	20 (74,1%)			
≥ 55 Jahre	11 (68,7%)	1 (1,1%)	7 (25,9%)			
Geschlecht						
Weiblich	7 (43,7%)	6 (66,7%)	18 (66,7%)	0,411	0,141	1,000
Männlich	9 (56,3%)	3 (33,3%)	9 (33,3%)			
Medianes Follow-up	62,5 Monate (±5,21 Jahre)	38,0 Monate (±3,16 Jahre)	64,0 Monate (±5,33 Jahre)			
Rezidiv						
Nein	6 (37,5%)	9 (100%)	27 (100%)	0,003	<0,001	n.a.
Ja	10 (62,5%)	0 (0%)	0 (0%)			
Fernmetastasen initial und im Verlauf des Follow-ups						
Nein	12 (75,0%)	9 (100%)	26 (96,3%)	0,260	0,056	1,000
Ja	4 (25,0%) <i>im Verlauf</i>	0 (0%)	1 (3,7%) <i>initial</i>			
Radiojodtherapie durchgeführt						
Nein	2 (12,5%)	0 (0%)	2 (7,4%)			
Ja	14 (87,5%)	9 (100%)	25 (92,6%)			
Radiojodrefraktäre Erkrankung (nach Abschluss der Radiojodtherapie)						
Nein	8 (50,0%)	9 (100%)	27 (100%)	0,007	<0,001	n.a.
Ja	8 (50,0%)	0 (0%)	0 (0%)			
Aggressive Tumorerkrankung						
Nein	5 (31,3%)	9 (100%)	26 (96,3%)	0,001	<0,001	1,000
Ja	11 (68,7%)	0 (0%)	1 (3,7%)			
Tumorbedingte Todesfälle						
Nein	15 (93,75%)	9 (100%)	27 (100%)			
Ja	1 (6,25%)	0 (0%)	0 (0%)			
Histologische Daten						
Mediane Tumorgroße	35 mm	16 mm	17 mm			

Gruppen	1	2	3			
Genetisches Profil	TERT-Expression/ TERTp-Mutation	TERT-Expression/ TERTp-Wildtyp	keine TERT-Expression/ TERTp-Wildtyp	p (1 vs. 2)	p (1 vs. 3)	p (2 vs. 3)
Fokalität						
Unifokal	12 (75,0%)	6 (66,7%)	23 (85,2%)	0,673	0,443	0,333
Multifokal	4 (25,0%)	3 (33,3%)	4 (14,8%)			
Histologischer Subtyp						
Klassisch	14 (87,5%)	6 (66,7%)	17 (63,0%)	0,130	0,063	1,000
Follikulär	1 (6,25%)	3 (33,3%)	9 (33,3%)			
Onkozytär*	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)			
Solide*	1 (6,25%)	0 (0%)	1 (3,7%)			
*Der onkozytäre und solide Subtyp wurden nicht in die statistische Analyse einbezogen.						

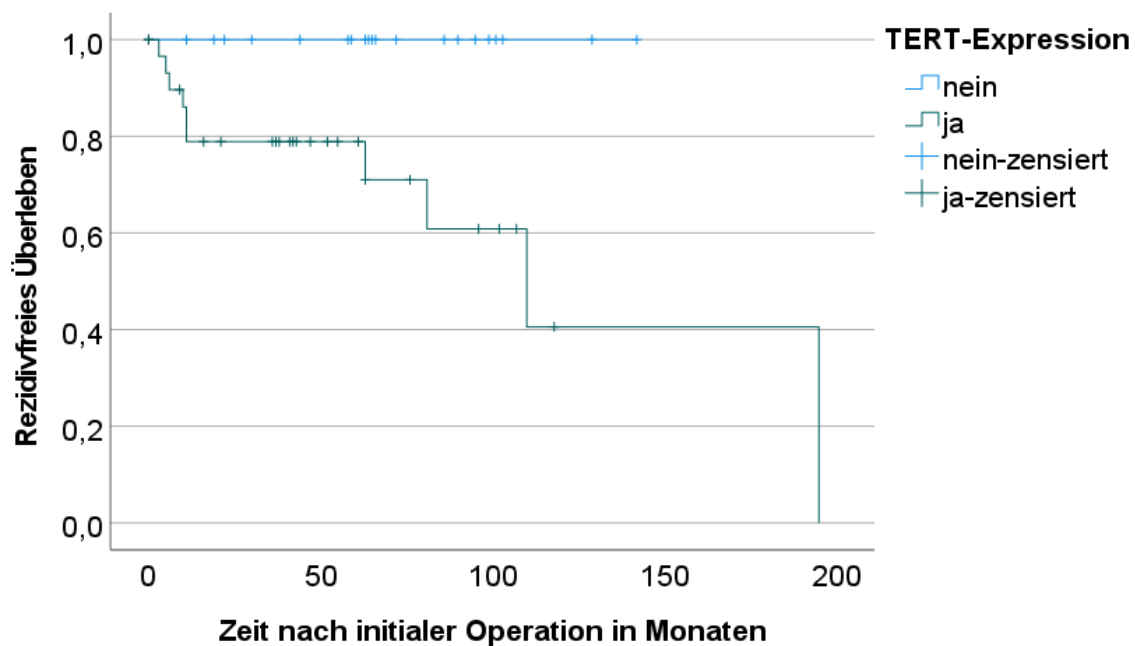


Abbildung 31 - Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der TERT-Expression

Die Kaplan-Meier-Kurven vergleichen das rezidivfreie Überleben der Fälle mit nachgewiesener TERT-Expression und ohne nachgewiesene TERT-Expression. Es wird deutlich, dass die TERT-exprimierenden Fälle ein kürzeres rezidivfreies Überleben aufwiesen ($p=0,006$).

4.3.3 Genexpression von GABPB1 und GABPB2

Wie in der Literatordiskussion (Kapitel 2.3.4) beschrieben, sind in Publikationen Mechanismen über die Synergien der BRAF- und der TERT-Promotor-Mutationen diskutiert worden. Nach Liu, Zhang et al. besteht durch die BRAF^{V600E}-Mutation eine Aktivierung eines Signalweges, der über eine gesteigerte Expression von GABPB eine vermehrte TERT-Expression bewirkt (Liu, Zhang et al. 2018). Um das Zusammenwirken der BRAF^{V600E}-Mutation und der TERTp-Mutation zu untersuchen, wurde am beschriebenen Kollektiv der 52 Patienten/Patientinnen die

mRNA-Expression der Gene *GABPB1* und *GABPB2* untersucht und innerhalb der Gruppen verglichen (Tabelle 35). Gruppe B (*TERTp*- und *BRAF*-Mutation) wurde als Zielgruppe festgelegt, da entsprechend der Literatur innerhalb dieser Gruppe eine gesteigerte Expression der Gene *GABPB1* und *GABPB2* zu erwarten war (Liu, Zhang et al. 2018). Diese Gruppe wurde mit anderen Fallgruppen verglichen. Zudem wurden die Fallgruppen untereinander verglichen.

4.3.3.1 Genexpression von *GABPB1* und *GABPB2* in Abhängigkeit vom Mutationsstatus

Im Vergleich mit der Kontrollgruppe A (*BRAF*- und *TERTp*-Wildtyp) konnte in der Zielgruppe B (*BRAF*- und *TERTp*-Mutation) keine gesteigerte Expression von *GABPB1* und *GABPB2* detektiert werden ($p=0,669$ für *GABPB1*, $p=0,678$ *GABPB2*). Auch im Vergleich mit der Gruppe D (*BRAF*-Mutation und *TERTp*-Wildtyp) zeigte sich keine Überexpression von *GABPB1* und *GABPB2* in der Zielgruppe B. Innerhalb der *BRAF*-mutierten Fälle ergab sich ebenfalls kein Unterschied der *GABPB1*- und *GABPB2*-Expression bei Vergleich zwischen *TERTp*-mutierten und *TERTp*-Wildtyp-Fällen ($p=0,996$ für *GABPB1*, $p=0,423$ für *GABPB2*).

Die mRNA von *GABPB1* und *GABPB2* war zudem zwischen den *TERTp*-mutierten Fällen (Gruppen B+C) und den *TERTp*-Wildtyp-Fällen (Gruppen A+D) ungeachtet des *BRAF*-Status nicht signifikant über- oder unterexprimiert ($p=0,286$ für *GABPB1*, $p=0,520$ für *GABPB2*).

Allerdings zeigte sich innerhalb der *TERTp*-mutierten Fälle ein Unterschied der Genexpression von *GABPB1* und *GABPB2* abhängig vom *BRAF*-Status. Die *BRAF*-mutierten Fälle (Gruppe B) wiesen hier gegenüber den *BRAF*-Wildtyp-Fällen (Gruppe C) eine Überexpression von *GABPB1* und *GABPB2* auf ($p=0,003$ für *GABPB1*, $p=0,008$ für *GABPB2*). Für *GABPB1* zeigte sich bei den *BRAF*-mutierten PTCs eine erhöhte Expression für *GABPB1* um einen mittleren Faktor von 4,249 und für *GABPB2* um einen mittleren Faktor von 3,753 (Tabelle 38, Abbildung 32).

Tabelle 38 - Relative *GABPB1/2*-Expression innerhalb der *TERTp*-mutierten Fälle: *BRAF*-Wildtyp versus *BRAF*-Mutation

Gen	Art	Effizienz	Expression	Standardfehler	95% Konfidenzintervall	p-Wert	Ergebnis
ACTB	Referenzgen	0,8519	0,765				
GAPDH	Referenzgen	0,8632	1,307				
GABPB1	Zielgen	0,9435	4,249	1,445 - 10,385	0,953 - 17,725	0,003	Über-Expression
GABPB2	Zielgen	1,2153	3,753	1,777 - 8,236	1,049 - 16,184	0,008	Über-Expression

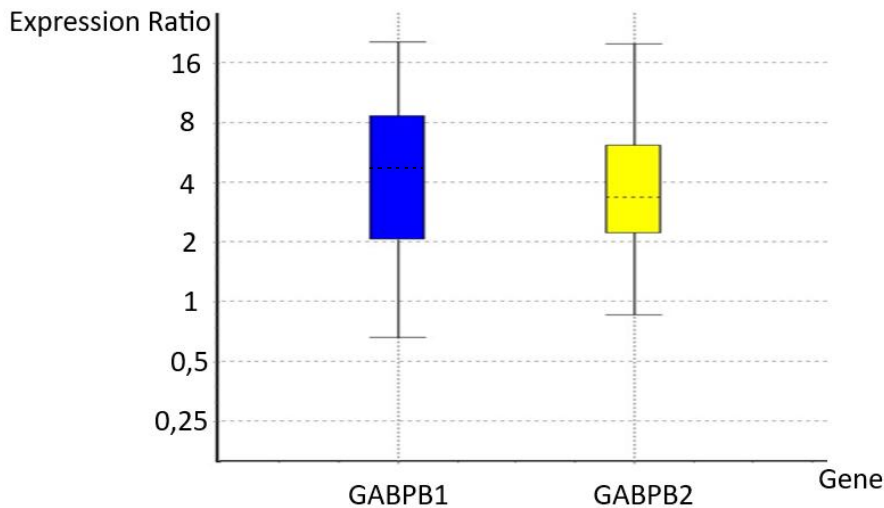


Abbildung 32 - Relative *GABPB1/2*-Expression innerhalb der *TERT* ρ -mutierten Fälle: *BRAF*-Wildtyp versus *BRAF*-Mutation (Boxplots)

Zwischen allen *BRAF*-mutierten PTCs (Gruppen B+D) und allen *BRAF*-Wildtyp-Fällen (Gruppen A+C) fand sich kein Unterschied in der *GABPB1*- und *GABPB2*-Expression ($p=0,125$ für *GABPB1* und $p=0,879$ für *GABPB2*). Allein eine vorliegende *BRAF*^{V600E}-Mutation ohne *TERT* ρ -Mutation (Gruppe D) führte zu keiner gesteigerten Expression von *GABPB1* und *GABPB2* im Vergleich mit der *BRAF*- und *TERT* ρ -Wildtyp-Kontrollgruppe A ($p= 0,665$ für *GABPB1*, $p=0,212$ für *GABPB2*).

Bei Vergleich der *TERT*-exprimierenden Fälle der Gruppe A ($n=4$, *BRAF*-Wildtyp) mit den *TERT*-exprimierenden Fällen der Gruppe D ($n=5$, *BRAF*-mutiert) konnte jedoch eine erhöhte *GABPB1*-Expression um einen mittleren Faktor von 2,466 in den Fällen mit *BRAF*-Mutation nachgewiesen werden (Tabelle 39, Abbildung 33). Bei der *GABPB2*-Expression zeigte sich kein signifikantes Ergebnis ($p=0,489$).

Tabelle 39 - Relative *GABPB1/2*-Expression innerhalb der *TERT* ρ -Wildtyp, aber *TERT*-exprimierenden Fälle: *BRAF*-Wildtyp versus *BRAF*-Mutation

Gen	Art	Effizienz	Expression	Standard- fehler	95% Konfidenz- intervall	p-Wert	Ergebnis
ACTB	Referenz- gen	0,8519	0,955				
GAPDH	Referenz- gen	0,8632	1,047				
GABPB1	Zielgen	0,9435	2,466	1,346 - 5,278	1,133 - 10,417	0,005	Über-Expression
GABPB2	Zielgen	1,2153	1,441	0,724 - 3,565	0,199 - 7,642	0,489	

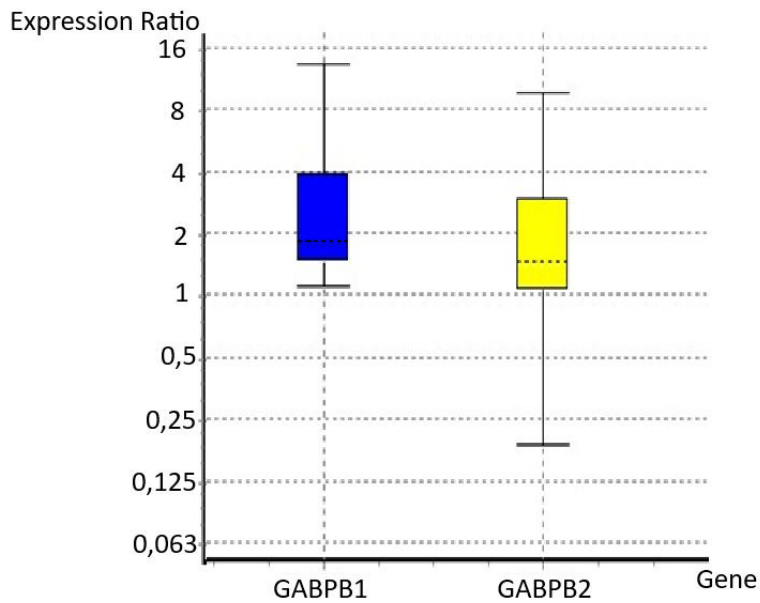


Abbildung 33 - Relative *GABPB1/2*-Expression innerhalb der *TERT* μ -Wildtyp, aber *TERT*-exprimierenden Fälle: *BRAF*-Wildtyp versus *BRAF*-Mutation (Boxplots)

Interessanterweise konnte innerhalb der *BRAF*-Wildtyp-Fälle (Gruppen A+C) eine verringerte Expression von *GABPB1* und *GABPB2* bei den *TERT* μ -mutierten PTCs (Gruppe C) nachgewiesen werden ($p=0,006$ für *GABPB1*, $p=0,004$ für *GABPB2*) (Tabelle 40).

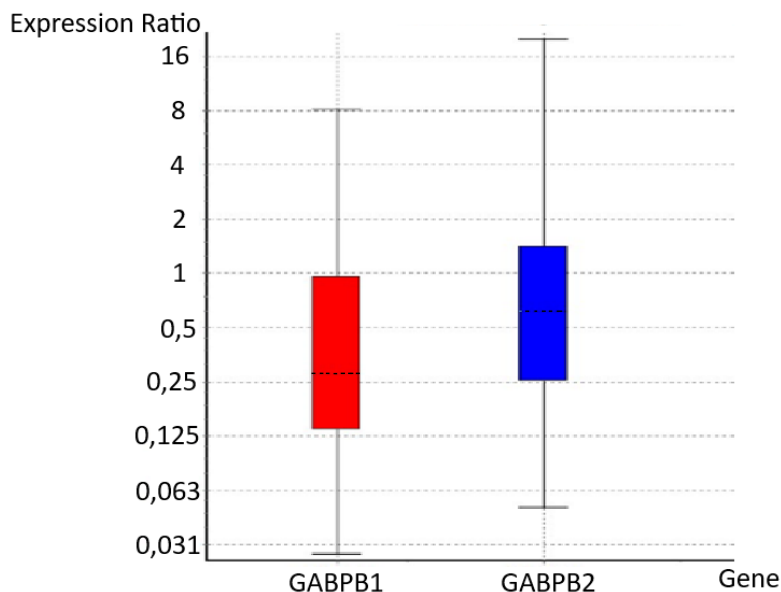
Tabelle 40 - Relative *GABPB1/2*-Expression innerhalb der *BRAF*-Wildtyp-Fälle: *TERT* μ -Wildtyp versus *TERT* μ -Mutation

Gen	Art	Effizienz	Expression	Standardfehler	95% Konfidenzintervall	p-Wert	Ergebnis
ACTB	Referenzgen	0,8519	1,22				
GAPDH	Referenzgen	0,8632	0,819				
GABPB1	Zielgen	0,9435	0,259	0,081 - 0,794	0,055 - 2,466	0,006	Unter-Expression
GABPB2	Zielgen	1,2153	0,237	0,105 - 0,508	0,069 - 1,194	0,004	Unter-Expression

Bei Vergleich der *GABPB1*- und *GABPB2*-Expression zwischen den *RAS*-Wildtyp- ($n=48$) und *RAS*-mutierten ($n=4$) Fällen ergab sich eine verringerte *GABPB1*-Expression bei den *RAS*-mutierten Tumoren ($p=0,004$) (Tabelle 41, Abbildung 34). Bezüglich *GABPB2* ergab sich kein statistisch nachweisbarer Unterschied ($p=0,329$).

Tabelle 41 - Relative *GABPB1/2*-Expression: *RAS*-Wildtyp versus *RAS*-Mutation

Gen	Art	Effizienz	Expression	Standardfehler	95% Konfidenzintervall	p-Wert	Ergebnis
ACTB	Referenzgen	0,8519	1,071				
GAPDH	Referenzgen	0,8632	0,934				
GABPB1	Zielgen	0,9435	0,34	0,098 - 1,467	0,056 - 3,771	0,004	Unter-Expression
GABPB2	Zielgen	1,2153	0,636	0,171 - 2,150	0,075 - 7,202	0,329	

**Abbildung 34 - Relative *GABPB1/2*-Expression: *RAS*-Wildtyp versus *RAS*-Mutation (Boxplots)**

4.3.3.2 Genexpression von *GABPB1* und *GABPB2* in Abhängigkeit von klinischen und histopathologischen Eigenschaften

Ferner wurde untersucht, ob Unterschiede in der *GABPB1*- und *GABPB2*-Expression in Bezug auf klinische oder histopathologische Eigenschaften bestanden. Die *GABPB1*- und *GABPB2*-Expression unterschied sich nicht bei Vergleich nicht-aggressiver und aggressiver PTCs ($p=0,557$ für *GABPB1*, $p=0,579$ für *GABPB2*). Auch konnten im Einzelnen keine Unterschiede in der *GABPB1*- und *GABPB2*-Expression zwischen Fällen mit oder ohne aufgetretenes Rezidiv ($p=0,467$ für *GABPB1*, $p=0,509$ für *GABPB2*), zwischen Fällen mit oder ohne Fernmetastasen (initial oder im Verlauf des Follow-ups) ($p=0,375$ für *GABPB1*, $p=0,694$ für *GABPB2*) sowie zwischen Fällen mit und ohne Radiojod-refraktäre Erkrankung ($p=0,460$ für *GABPB1*, $p=0,257$ für *GABPB2*) detektiert werden. Zudem fand sich kein Unterschied der *GABPB1*- und *GABPB2*-Expression zwischen Fällen mit spätem und frühem Rezidiv ($p=0,565$ für *GABPB1*, $p=0,448$ für *GABPB2*).

Bei Vergleich der klassischen PTCs mit den follikulären PTCs ergab sich kein Unterschied in der *GABPB1*- und *GABPB2*-Expression ($p=1,000$ für *GABPB1*, $p=0,978$ für *GABPB2*). Hingegen zeigte sich eine erhöhte *GABPB1*-Expression bei den multifokalen PTCs im Vergleich zu den unifokalen PTCs ($p=0,014$). Der Unterschied bezüglich der *GABPB2*-

Expression war nicht signifikant, es zeigte sich jedoch ebenfalls eine Tendenz zur erhöhten Expression für *GABPB2* ($p=0,06$) (Tabelle 42, Abbildung 35).

Tabelle 42 - Relative *GABPB1/2*-Expression: Unifokal versus multifokal

Gen	Art	Effizienz	Expression	Standardfehler	95% Konfidenzintervall	p-Wert	Ergebnis
ACTB	Referenzgen	0,8519	0,831				
GAPDH	Referenzgen	0,8632	1,203				
GABPB1	Zielgen	0,9435	1,746	0,797 - 4,035	0,479 - 12,709	0,014	Über-Expression
GABPB2	Zielgen	1,2153	1,721	0,571 - 5,157	0,172 - 13,137	0,06	Kein signifikanter Unterschied (Tendenz zur erhöhten Expression)

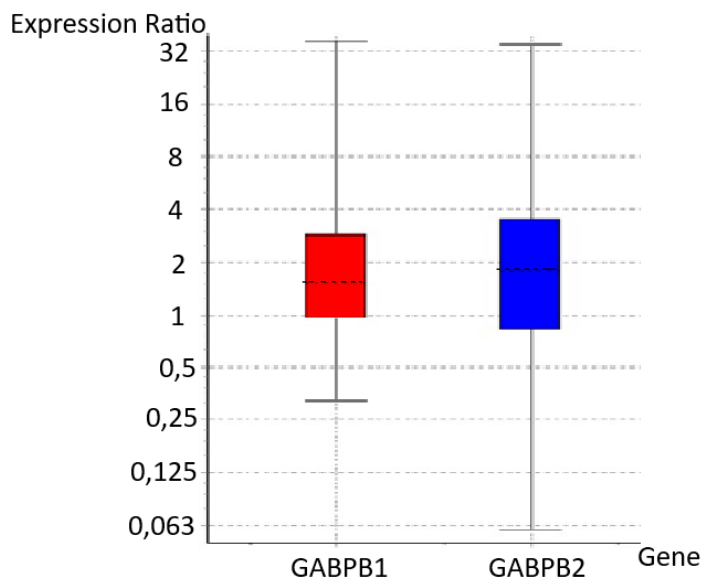
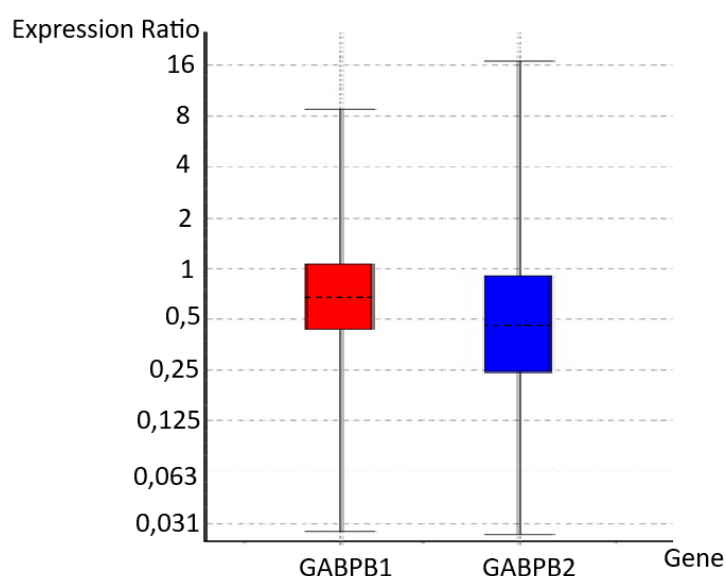


Abbildung 35 - Relative *GABPB1/2*-Expression: Unifokal versus multifokal (Boxplots)

Bei Vergleich der *GABPB1*- und *GABPB2*-Expression zwischen einem kleineren und einem größeren Tumordiameter zeigte sich ein Unterschied in der *GABPB2*-Expression in Form einer Unterexpression bei größeren Tumoren ($p=0,001$) (Tabelle 43, Abbildung 36). Als Grenze wurde die mediane Tumorgöße von 20 mm festgelegt. Bezüglich der *GABPB1*-Expression ergab sich auch hier die Tendenz zur Unterexpression.

Tabelle 43 - Relative *GABPB1/2*-Expression: Kleine versus große Tumoren

Gen	Art	Effizienz	Expression	Standardfehler	95% Konfidenzintervall	p-Wert	Ergebnis
ACTB	Referenzgen	0,8519	1,037				
GAPDH	Referenzgen	0,8632	0,964				
GABPB1	Zielgen	0,9435	0,678	0,303 - 1,398	0,078 - 4,605	0,055	Kein signifikanter Unterschied (Tendenz zur verringerten Expression)
GABPB2	Zielgen	1,2153	0,471	0,167 - 1,360	0,064 - 3,974	0,001	Unter-Expression

**Abbildung 36 - Relative *GABPB1/2*-Expression: Kleine versus große Tumoren (Boxplots)**

4.3.4 Genexpression von *GADD45B*

In der Literatur ist beschrieben, dass eine Überexpression von *GADD45B* mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben und auch mit einem kürzeren Gesamtüberleben korreliert (Barros-Filho, de Mello et al. 2020). Somit stellte sich die Frage, ob *GADD45B* als prognostischer Marker in dem hier untersuchten Kollektiv bestätigt werden kann.

4.3.4.1 Genexpression von *GADD45B* in Abhängigkeit von klinischen und histopathologischen Eigenschaften

Rezidive traten bei den 52 untersuchten Patienten/Patientinnen in 10 Fällen auf. Es wurde die Expression von *GADD45B* in dem Tumorgewebe bei den Erkrankten mit aufgetretenem Rezidiv innerhalb des Follow-ups mit der Expression in der Fallgruppe ohne Rezidiv verglichen, ohne signifikanten Unterschied ($p=0,335$) (Tabelle 44, Abbildung 37). Auch bei Vergleich der Expression zwischen den Fällen mit frühen und späten Rezidiven konnte kein Unterschied in der Höhe der *GADD45B*-Expression detektiert werden ($p=0,535$), obwohl eine minimale Tendenz zu einer erhöhten Expression um einen mittleren Faktor von 1,462 bei der

Gruppe der frühen Rezidive vorlag (Tabelle 45, Abbildung 38). Als Grenze zwischen frühem und spätem Rezidiv wurde der Median von 11 Monaten festgelegt.

Tabelle 44 - Relative *GADD45B*-Expression: Kein Rezidiv versus Rezidiv

Gen	Art	Effizienz	Expression	Standardfehler	95% Konfidenzintervall	p-Wert	Ergebnis
ACTB	Referenzgen	0,8519	1,01				
GAPDH	Referenzgen	0,8632	0,99				
GADD45B	Zielgen	0,9475	0,744	0,226 - 2,527	0,093 - 8,531	0,335	Nicht signifikant

Tabelle 45 - Relative *GADD45B*-Expression: Spätes Rezidiv versus frühes Rezidiv

Gen	Art	Effizienz	Expression	Standardfehler	95% Konfidenzintervall	p-Wert	Ergebnis
ACTB	Referenzgen	0,8519	1,181				
GAPDH	Referenzgen	0,8632	0,847				
GADD45B	Zielgen	0,9475	1,462	0,396 - 5,048	0,243 - 8,787	0,535	Nicht signifikant

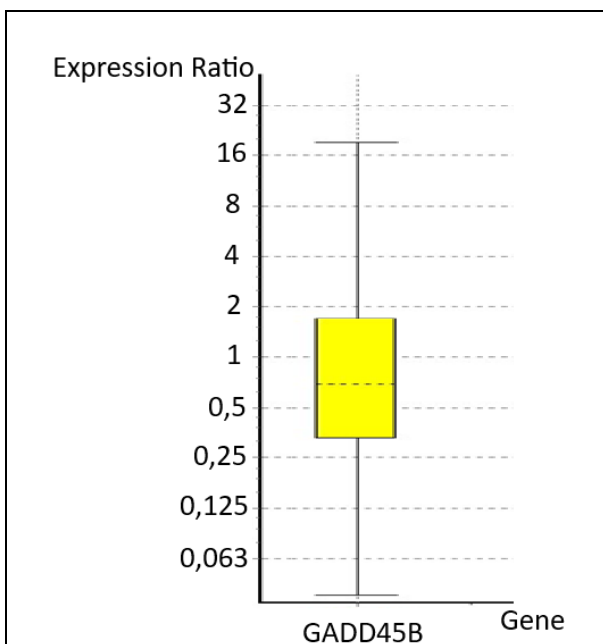


Abbildung 37 - Relative *GADD45B*-Expression: Kein Rezidiv versus Rezidiv (Boxplot)

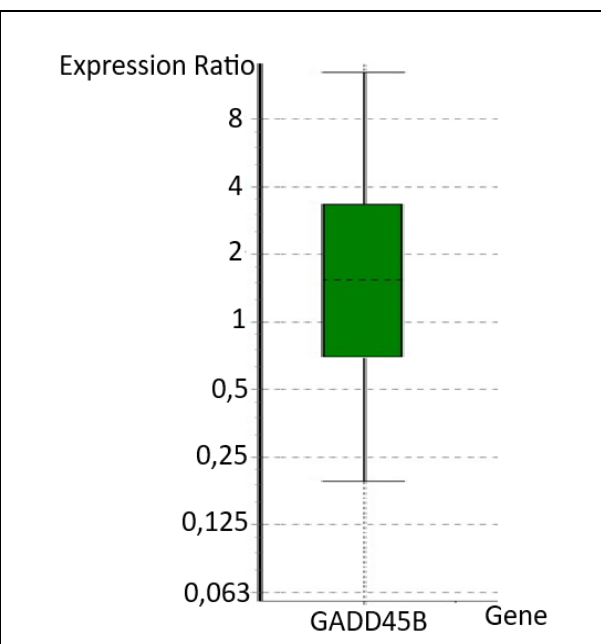


Abbildung 38 - Relative *GADD45B*-Expression: Spätes versus frühes Rezidiv (Boxplot)

Auch bei Vergleich der PTCs mit Fernmetastasen und ohne Fernmetastasierung ($p=0,763$) und bei Vergleich der Patienten/Patientinnen mit Radiojod-refraktärer Erkrankung und ohne Radiojod-refraktäre Erkrankung ($p=0,145$) ergaben sich keine Unterschiede in der mRNA-Expression von *GADD45B*. *GADD45B* wurde in Tumoren mit und ohne aggressive Tumoreigenschaften nicht unterschiedlich exprimiert ($p=0,334$).

Bei den beiden Subtypen (klassisch vs. follikulär) unterschied sich die *GADD45B*-Expression nicht ($p=0,707$). Auch unterschied sich die *GADD45B*-Expression nicht abhängig von der Tumorgroße ($p=0,765$). Allerdings war die *GADD45B*-Expression in multifokalen gegenüber unifokalen Tumoren um einen mittleren Faktor von 1,869 erhöht ($p=0,029$) (Tabelle 46).

Tabelle 46 - Relative *GADD45B*-Expression: Unifokal versus multifokal

Gen	Art	Effizienz	Expression	Standardfehler	95% Konfidenzintervall	p-Wert	Ergebnis
ACTB	Referenzgen	0,8519	0,831				
GAPDH	Referenzgen	0,8632	1,203				
GADD45B	Zielgen	0,9475	1,869	0,656 - 5,748	0,116 - 15,927	0,029	Über-Expression

4.3.4.2 Genexpression von *GADD45B* in Abhängigkeit vom Mutationsstatus

Die *GADD45B*-Expression unterschied sich nicht signifikant bei Vergleich aller *TERT* μ -mutierten (Gruppen B+C) und *TERT* μ -Wildtyp-Fälle (Gruppen A+D) ($p=0,455$) sowie bei Vergleich aller *BRAF*-mutierten (Gruppen B+D) mit allen *BRAF*-Wildtyp-Fällen (Gruppen A+C) ($p=0,779$). Jedoch konnte eine geringere *GADD45B*-Expression um einen mittleren Faktor von 0,343 bei den *RAS*-mutierten PTCs gegenüber den *RAS*-Wildtyp-Fällen beobachtet werden ($p=0,016$), (Tabelle 47, Abbildung 39).

Tabelle 47 - Relative *GADD45B*-Expression: *RAS*-Wildtyp versus *RAS*-Mutation

Gen	Art	Effizienz	Expression	Standardfehler	95% Konfidenzintervall	p-Wert	Ergebnis
ACTB	Referenzgen	0,8519	1,071				
GAPDH	Referenzgen	0,8632	0,934				
GADD45B	Zielgen	0,9475	0,343	0,087 - 2,059	0,045 - 7,777	0,016	Unter-Expression

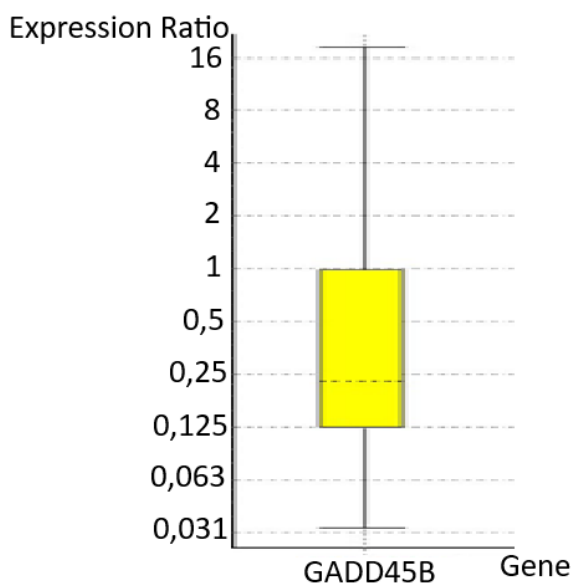


Abbildung 39 - Relative *GADD45B*-Expression: *RAS*-Wildtyp versus *RAS*-Mutation (Boxplot)

5 Diskussion

Schilddrüsenkarzinome stellen die häufigsten Malignome des endokrinen Systems dar, wobei innerhalb dieser Gruppe das PTC am häufigsten vorkommt (Lloyd, Osamura et al. 2017, Zentrum für Krebsregisterdaten 2023). Im Allgemeinen weist das PTC eine exzellente Prognose auf, wobei dennoch bei einem Anteil der Erkrankten aggressive Verläufe auftreten. Besondere Relevanz hat das PTC, da diese Tumoren in allen Altersgruppen, auch bei Kindern und jungen Erwachsenen auftreten und auch im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen in einem jüngeren Alter vorkommen (Mulla and Margo 2000, Fruth 2010, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Herausgeber) 2023b). In den letzten Jahren hat die Forschung bezüglich genetischer Alterationen in PTCs an Bedeutung gewonnen, einerseits, um die Mechanismen der Tumorentstehung zu verstehen und andererseits, um eine mögliche Prognose für den einzelnen Patienten/die einzelne Patientin abzuleiten. Das davon abgeleitete Ziel für die Zukunft wäre eine individualisierte Therapie, eben auch in Abhängigkeit vom genetischen Profil.

BRAF-Mutationen sind von enormer diagnostischer Relevanz, da bei Vorliegen einer *BRAF*-Mutation ein PTC vorliegt und der Beweis einer malignen Erkrankung erbracht ist (Nikiforova, Kimura et al. 2003, Nikiforov 2011a, Ferrari, Fallahi et al. 2018). Vor diesem Hintergrund hat die molekularpathologische Analyse einer präoperativen Feinnadelbiopsie eine besondere Bedeutung. Bei *RAS*-Mutationen fällt diese Einordnung nicht ganz leicht. Das biologische Verhalten von Tumoren mit *RAS*-Mutationen und die prognostische Relevanz von *RAS*-Mutationen in PTCs sind nur ansatzweise geklärt.

5.1 Auswirkungen eines positiven *RAS*-Mutationsstatus

- **Hat ein positiver *RAS*-Mutationsstatus Auswirkungen auf die Tumormorphologie, die Tumoraggressivität und die Prognose?**

In der vorliegenden Analyse wurden von den 170 PTCs 12 Tumoren mit *RAS*-Mutationen identifiziert (7,1 %). Bei dem fast 500 Patienten/Patientinnen umfassenden Kollektiv des Cancer Genome Atlas Research Networks wurde eine etwas höhere Frequenz von *RAS*-Mutationen gefunden, nämlich eine Frequenz von 12,9 % (Cancer Genome Atlas Research Network 2014). Auch in weiteren Studien schwanken die Frequenzen von *RAS*-Mutationen in PTCs von 0 – 21% (Namba, Rubin et al. 1990, Zhu, Gandhi et al. 2003, Liu, Hou et al. 2004, Cancer Genome Atlas Research Network 2014, Ren, Yao et al. 2022, Harahap, Subekti et al. 2023). Dies könnte durch die unterschiedlich großen Fallkollektive, vielleicht auch durch regionale Besonderheiten erklärt werden. In der vorliegenden Arbeit stellten die meisten *RAS*-betreffenden Mutationen *NRAS*-Mutationen in Kodon 61 (7/12) dar, zudem kamen 4 *HRAS*-Mutationen vor, die ebenfalls das Kodon 61 betrafen sowie lediglich eine *KRAS*-Mutation in Kodon 12.

Tumormorphologie und RAS-Mutationsstatus

Das Cancer Genome Atlas Research Network hat das Genexpressionsprofil von 402 PTCs untersucht und herausgefunden, dass PTCs entweder eine *BRAF*^{V600E}-ähnliche oder eine *RAS*-ähnliche Signatur aufweisen (Cancer Genome Atlas Research Network 2014), (Abbildung 40).

Die *BRAF*^{V600E}-ähnliche Signatur zeigte ein klassisches papilläres Wachstumsmuster, einen geringen Differenzierungsgrad, ein hohes Maß an Signalwirkung im MAP-Kinase-Signalweg und eine hohe Frequenz von *BRAF*^{V600E}-Mutationen (Cancer Genome Atlas Research Network 2014, Lloyd, Osamura et al. 2017). *RAS*-ähnliche PTCs wiesen ein follikuläres Wachstumsmuster auf und zeigten häufig eine Umkapselung, einen hohen Differenzierungsgrad und ein geringes Maß an Signalwirkung im MAP-Kinase-Signalweg

sowie eine hohe Frequenz von *RAS*-Mutationen (Cancer Genome Atlas Research Network 2014, Lloyd, Osamura et al. 2017). Auch in dem in dieser Arbeit untersuchten Kollektiv waren *RAS*-Mutationen häufiger mit einem follikulären Wuchsmuster assoziiert, wobei *BRAF*-Mutationen häufiger mit dem klassischen Subtyp assoziiert waren. Diese Ergebnisse decken sich auch mit weiteren Studien (Zhu, Gandhi et al. 2003, Adeniran, Zhu et al. 2006, Di Cristofaro, Marcy et al. 2006, Harahap, Subekti et al. 2023). Zwei *RAS*-mutierte Fälle des vorliegenden Kollektivs wurden histologisch dem konventionellen klassischen Typ zugeordnet, wobei bei Betrachtung der Histomorphologie auch follikuläre Tumoranteile vorkamen, ohne dass die Kriterien für einen follikulären Subtyp erfüllt waren. PTCs können somit histomorphologisch durchaus einen heterogenen Aspekt aufweisen.

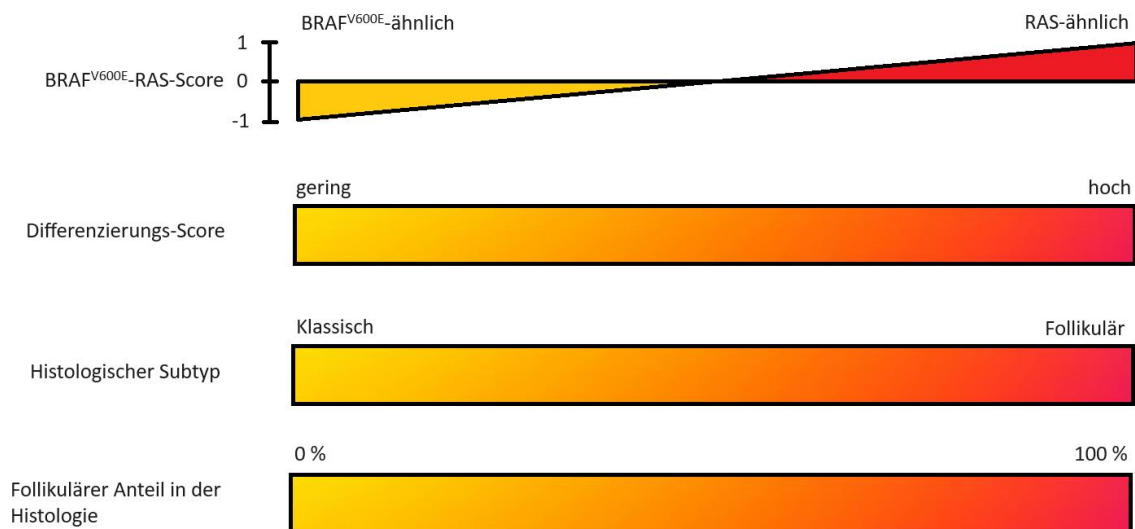


Abbildung 40 - Molekulare Signaturen des PTCs

Bildquelle: Modifiziert nach (Cancer Genome Atlas Research Network 2014)

RAS-Mutationen kommen im Allgemeinen in Neoplasien mit follikulärem Wuchsmuster vor (Cancer Genome Atlas Research Network 2014). Das heißt, *RAS*-Mutationen treten nicht nur in PTCs, sondern auch in follikulären Karzinomen und in benignen Neoplasien wie follikulären Adenomen auf (Esapa, Johnson et al. 1999, Jeong, Hong et al. 2015). Zudem sind *RAS*-Mutationen auch in den follikulär aufgebauten Schilddrüsentumoren mit unsicherem Malignitätspotential wie WDT-UMP und FT-UMP zu detektieren (Hofman, Lassalle et al. 2009).

Auch in NIFTPs kommen *RAS*-Mutationen in bis zu 60% der Fälle vor (Baloch, Asa et al. 2022). Die Aufnahme dieser neuen Tumorentität in die WHO-Klassifikation war insofern bedeutsam, da ein Tumor mit oder trotz papillärer Kernkriterien keinem Malignom mehr entsprach. Einige Tumoren, die in früheren Jahren als follikuläre Variante eines PTCs klassifiziert wurden, konnten nun NIFTPs zugeordnet werden. Da *RAS*-Mutationen nicht nur in Malignomen, sondern auch in benignen Neoplasien und in Neoplasien mit unsicherem malignem Potential vorkommen (Hofman, Lassalle et al. 2009), bestand die Hypothese, dass *RAS*-Mutationen in PTCs möglicherweise mit einer günstigeren Prognose und weniger aggressiven Tumoreigenschaften assoziiert sind.

Tumoraggressivität – Rezidive, Fernmetastasen und Gesamtüberleben

RAS-Mutationen in follikulären Adenomen entsprechen möglicherweise einer initialen Alteration (Esapa, Johnson et al. 1999), die eine Prädisposition für eine maligne

Transformation und eine Dedifferenzierung der Tumoren darstellen kann (Howell, Hodak et al. 2013). Es wird angenommen, dass Tumoren mit *RAS*-Mutationen dazu neigen, im Verlauf weitere Mutationen zu entwickeln, die zu weniger differenzierten Tumoren führen können (Gianoukakis, Giannelli et al. 2011, Howell, Hodak et al. 2013). Studien belegen, dass *RAS*-Mutationen in 18-55% der PDTCs auftreten und auch in bis zu der Hälfte der ATCs vorkommen (Basolo, Pisaturo et al. 2000, Motoi, Sakamoto et al. 2000, Garcia-Rostan, Zhao et al. 2003). Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass *RAS*-Mutationen möglicherweise mit einer aggressiven Tumorbilogie, die zu einer vermehrten Fernmetastasierung, erhöhten Rezidivraten und einem geringeren Gesamtüberleben führt, assoziiert sind sowie folglich mit einer ungünstigen Prognose einhergehen. Allerdings wurden in den PDTCs und den ATCs am häufigsten *KRAS*-Mutationen gefunden und in den PTCs des von Garcia-Rostan, Zhao et al. untersuchten Kollektivs lediglich eine *NRAS*- und eine *KRAS*-Mutation (Garcia-Rostan, Zhao et al. 2003). In jener Studie waren *KRAS*-Mutationen signifikant mit Fernmetastasen assoziiert und sowohl *KRAS*- als auch *NRAS*-Mutationen mit einem geringeren Gesamtüberleben (Garcia-Rostan, Zhao et al. 2003). *HRAS*-Mutationen waren hier nicht mit einem kürzeren Überleben assoziiert (Garcia-Rostan, Zhao et al. 2003). In einer Studie von Fukahori, Yoshida et al., betreffend eines Kollektivs aus FTCs, war die *NRAS*-Mutation in Kodon 61 mit Fernmetastasen assoziiert und *RAS*-Mutationen signifikant mit einem geringeren Gesamtüberleben verknüpft, wobei keine signifikant erhöhte Rezidivrate beobachtet wurde (Fukahori, Yoshida et al. 2012). Auch eine Studie aus dem Jahr 1994, die ein Kollektiv von 91 PTCs untersucht hat, zeigte eine höhere Fernmetastasierungsrate, Mortalitätsrate und Rezidivrate in *NRAS*-mutierten PTCs im Vergleich zu *RAS*-Wildtyp PTCs (Hara, Fulton et al. 1994) und stellte somit eine *NRAS*-Mutation als unabhängigen prognostischen Faktor in Bezug auf die Tumoraggressivität von PTCs heraus (Hara, Fulton et al. 1994). Allerdings wurde erst im Jahr 2004 die Diagnose eines PDTCs in die WHO-Klassifikation eingeführt (Volante and Papotti 2010), sodass die Tumorklassifikation von vor 30 Jahren nicht mehr mit der heutigen Einteilung gleichzusetzen ist und anzunehmen ist, dass in den Fallkollektiven der früheren Jahre möglicherweise auch PDTCs einbezogen wurden. Wie bereits beschrieben, kommen *RAS*-Mutationen auch in einem nicht unerheblichen Anteil gering differenzierter Karzinome vor. Möglicherweise waren auch zusätzliche Mutationen in den *RAS*-mutierten PTCs für aggressivere Tumoreigenschaften verantwortlich, die in den genannten Studien nicht untersucht wurden. Nach Bikas, Ahmadi et al. führen zusätzliche Mutationen in *RAS*-mutierten Schilddrüsenkarzinomen und nicht *RAS*-Mutationen alleine zu einer aggressiveren Tumorbilogie sowie einer erhöhten Rezidivrate und Sterblichkeitsrate (Bikas, Ahmadi et al. 2023). Auch weitere aktuellere Studien weisen auf ein Niedrigrisiko-Verhalten mit beispielsweise einer eher gekapselten bzw. umschriebenen Morphologie ohne extrathyreoidale Ausbreitung *RAS*-mutierter PTCs hin (Medici, Kwong et al. 2015, Xing 2016, Harahap, Subekti et al. 2023). In der Studie von Medici, Kwong et al. konnte in einem Kollektiv von *RAS*-mutierten zytologisch gutartigen Schilddrüsenknoten keine Tumorprogression und damit maligne Transformation im Verlauf eines langjährigen Follow-ups detektiert werden (Medici, Kwong et al. 2015).

In dem in dieser Arbeit untersuchten Kollektiv wurden insgesamt 12 *RAS*-mutierte PTCs detektiert. Zwei der Erkrankten erlitten Rezidive, diese betrafen zwei *NRAS*-mutierte Fälle (2/12; 16,7%). Das *RAS*-Wildtyp-Kollektiv wies in 13,4% der Fälle Rezidive auf (21/157). Bei vorliegender *RAS*-Mutation bestand in der statistischen Analyse kein erhöhtes Rezidivrisiko gegenüber der *RAS*-Wildtyp-Kohorte. Dies deckt sich beispielsweise mit einer Studie von Barros-Filho, de Mello et al. (2020) mit langfristigem Follow-up. Auch unterschied sich das rezidivfreie Überleben von den *NRAS*-mutierten und *NRAS*-Wildtyp-PTCs nicht signifikant. Bei Erstdiagnosestellung zeigte keiner der *RAS*-mutierten Fälle Fernmetastasen, wobei im Verlauf des Follow-ups bei einem Fall eine ossäre Fernmetastase auftrat (1/12; 8,33%). Es ergab sich statistisch kein Zusammenhang bezüglich einer *RAS*-Mutation und der Entwicklung von

Fernmetastasen im Verlauf. Allerdings wurden Fernmetastasen nur bei einem geringen Anteil der Patienten/Patientinnen überhaupt entwickelt, 5,3% des Fallkollektivs wiesen initial oder im Verlauf Fernmetastasen auf. In der Studie von Gupta, Dasyam et al., bei der *RAS*-Mutationen in Feinnadelpunktaten untersucht und mit der histologischen Entität nach der Operation korreliert wurden, fand sich ebenfalls von allen 44 PTCs in nur einem Fall eine Fernmetastasierung und zwar bei Erstdiagnosestellung (1/44; 2,3 %) (Gupta, Dasyam et al. 2013). Da in dem hier vorliegenden Kollektiv nur ein Patient an Tumor-assoziierten Komplikationen innerhalb des Follow-ups verstarb, war eine genauere Analyse des Gesamtüberlebens am vorliegenden Kollektiv nicht sinnvoll. Zu beachten ist, dass aufgrund der in der heutigen Zeit weit fortgeschrittenen Diagnostik und der Therapiemöglichkeiten die Überlebensraten bei PTCs bereits ausgesprochen günstig sind. Um eine valide statistische Aussage bezüglich des Unterschieds des Überlebens bei *RAS*-mutierten versus *RAS*-Wildtyp-PTCs zu geben, wären umfangreichere Fallkollektive notwendig. Die Datenlage bezüglich anderer aktueller Studien, die die Gesamtüberlebensrate bei *RAS*-mutierten PTCs untersucht haben, ist begrenzt. Auch die aktuelle Studie von Harahap, Subteki et al. aus dem Jahr 2023 ist aufgrund der geringen Fallanzahl und begrenzter Datenlage bezüglich der Überlebensrate limitiert (Harahap, Subteki et al. 2023).

Radiojodtherapie als Outcome-Prädiktor

Das Ansprechen auf eine Radiojodtherapie gilt als aussagekräftiger Prädiktor für ein gutes klinisches Outcome (Sciuto, Romano et al. 2009). Bei einer Radiojod-refraktären Tumorerkrankung ist der MAPK-Signalweg involviert. Die *BRAF*^{V600E}-Mutation führt zur Herunterregulierung von Schlüsselgenen wie dem Natrium-Jodid-Symporter oder der Thyreoperoxidase (Durante, Puxeddu et al. 2007), welche im Jodmetabolismus eine entscheidende Rolle spielen (Ulfig 2011). Nach Cao, Zhu et al. korreliert vor allem die Koexistenz von *BRAF*- und *TERT*-Mutationen mit einer Radiojod-refraktären Erkrankung (Cao, Zhu et al. 2022). Auch andere Autoren beschreiben *BRAF*-Mutationen als Risikofaktor für eine Radiojod-refraktäre Erkrankung (Luo, Jiang et al. 2020). In einer Studie von Sabra, Dominguez et al. wurde die Jodaufnahme bei metastasierten Schilddrüsenkarzinomen untersucht und herausgefunden, dass die Radiojod-sensitiven Tumoren vor allem *RAS*-Mutationen aufwiesen (Sabra, Dominguez et al. 2013). Dies kann dadurch erklärt werden, dass *RAS*-Mutationen anders als *BRAF*-Mutationen auf den MAPK-Signalweg einwirken (Cancer Genome Atlas Research Network 2014) (Abbildung 8). Passend dazu wies in dem in dieser Arbeit untersuchten Kollektiv keiner der 12 *RAS*-mutierten Fälle eine Radiojod-refraktäre Erkrankung auf. Bei den *BRAF*-mutierten Fällen wiesen 10,5% der PTCs eine Radiojod-refraktäre Erkrankung auf. Obwohl kein signifikanter Effekt beobachtet werden konnte, bestand eine leichte Tendenz zur Radiojod-refraktären Erkrankung bei *BRAF*-mutierten PTCs. Auch Simões-Peireira, Mourinho et al. beschrieben innerhalb eines Kollektivs aus metastasierten DTCs eine Korrelation von Radiojod-Sensitivität und Histologie, wobei die follikuläre Variante des PTCs und FTCs die höchste Sensitivität aufwiesen (Simões-Pereira, Mourinho et al. 2021).

Resümee zu *RAS*-Mutationen

In dem hier untersuchten Kollektiv konnten die in den genannten Studien postulierten aggressiven Tumoreigenschaften bei *RAS*-Mutationen nicht beobachtet werden. Allerdings ergab sich bei vorliegendem Kollektiv eine geringe Fallanzahl von 12 *RAS*-mutierten PTCs, sodass mögliche vorliegende Effekte eventuell nicht hinreichend gezeigt werden konnten. Es ergeben sich aufgrund der hier vorliegenden Daten keine Anhaltspunkte für einen aggressiveren Verlauf. In diesem Kontext muss auch konstatiert werden, dass im Rahmen gegenwärtiger Änderungen in der WHO-Klassifikation neue Tumorentitäten (wie das NIFTP im Jahr 2017) eingeführt wurden und aufgrund der guten Prognose aktiv der Begriff Malignom verlassen wurde, obgleich in einem Großteil dieser Tumoren *RAS*-Mutationen detektiert werden können (Lloyd, Osamura et al. 2017, Baloch, Asa et al. 2022). Dies spricht auch dafür,

dass *RAS*-Mutationen per se nicht mit aggressiven Tumoreigenschaften verknüpft sein müssen. Auch die Publikation von Kure, Wada et al. deutet an, dass *RAS*-mutierte PTCs eine günstige Prognose haben, wenn diese gekapselt sind (Kure, Wada et al. 2019). In einer Metaanalyse von Yang, Gong et al. konnte zudem gezeigt werden, dass der mit *RAS*-Mutationen assoziierte follikuläre Subtyp (Harahap, Subekti et al. 2023) im Vergleich mit dem klassischen Typ ein günstigeres klinisch-pathologisches Verhalten, unter anderem in Bezug auf das Rezidivrisiko oder das Vorkommen von Lymphknotenmetastasen, aufweist (Yang, Gong et al. 2015).

5.2 Diagnostische Relevanz bei *RAS*-Mutationen und risikostratifizierte Therapie

- Besteht möglicherweise eine diagnostische Relevanz bei *RAS*-Mutationen?
- Können aufgrund des genetischen Profils chirurgische Empfehlungen für eine risikostratifizierte Therapie abgeleitet werden?

Diagnostische Relevanz der Detektion von *RAS*-Mutationen

Tatsächlich stellt sich die Frage, inwieweit *RAS*-Mutationen eine diagnostische Relevanz haben, was insbesondere auch für Feinnadelbiopsien interessant ist. Wie bereits beschrieben kommen *RAS*-Mutationen in follikulären Neoplasien wie follikulären Adenomen, follikulären Karzinomen und dem follikulären Subtyps des PTCs vor (Adeniran, Zhu et al. 2006, Howell, Hodak et al. 2013, Baloch, Mete et al. 2022). Gerade bei diesen Tumorentitäten ist es rein auf Basis der Zytologie für den Pathologen oder die Pathologin schwierig, eindeutig zwischen einer malignen und benignen Läsion zu unterscheiden (Gupta, Dasyam et al. 2013, Howell, Hodak et al. 2013). Schwierigkeiten bestehen vor allem darin, dass in dem follikulären Subtyp des PTCs die für ein PTC eigentlich typischen papillären Strukturen fehlen und die für die Diagnose eines PTCs essentiellen Kernkriterien oft weniger ausgeprägt sind (Gupta, Dasyam et al. 2013). Diese Schwierigkeiten in der Beurteilung der Feinnadelpunktate können zur Diagnose eines zytologisch uneindeutigen Knotens führen. In einer prospektiven Studie von Gupta et al. war der zytologische Befund unter 66 Patienten/Patientinnen mit *RAS*-mutierten Schilddrüsenknoten bei 94 % uneindeutig, bei 4 % maligne und bei 3 % benigne (Gupta, Dasyam et al. 2013). Mit Abstand die meisten dieser Tumoren stellten sich als PTC heraus, neben wenigen FTCs, MTCs und ATCs (Gupta, Dasyam et al. 2013). In einer Publikation von Nikiforov, Ohori et al. war die *RAS*-Mutation mit 71 % die häufigste detektierte genetische Alteration in Schilddrüsenknoten mit uneindeutigem zytologischen Ergebnis, daneben wurden *BRAF*-Mutationen in 22 % der Fälle sowie *PAX8-PPARgamma*- und *RET/PTC*-Alterationen in einem geringeren Anteil gefunden (Nikiforov, Ohori et al. 2011). Die Wahrscheinlichkeit für Malignität in dieser Studie lag bei nachgewiesener *RAS*-Mutation bei 85 % (Nikiforov, Ohori et al. 2011). In der genannten Studie von Gupta, Dasyam et al., bei der *RAS*-Mutationen in Feinnadelpunktaten untersucht wurden, entsprachen alle 46 *RAS*-mutierten PTCs nach dem chirurgischen Eingriff dem follikulären Subtyp eines PTCs (Gupta, Dasyam et al. 2013). Bei etwa der Hälfte der Patienten/Patientinnen trat das PTC bilateral auf (Gupta, Dasyam et al. 2013), sodass bei den meisten Fällen mit initialer Lobektomie eine komplettierende Thyreoidektomie durchgeführt wurde (Gupta, Dasyam et al. 2013). Patel, Carty et al. beobachteten ebenfalls, dass die meisten histologisch gesicherten Malignome mit präoperativ bekannter *RAS*-Mutation der gekapselten follikulären Variante eines PTCs entsprachen (Patel, Carty et al. 2017). Zudem ergaben sich hier Unterschiede bezüglich der *RAS*-Isoformen, wobei die höchste Malignitätsrate in den Feinnadelpunktaten mit uneindeutiger Zytologie bei *HRAS*-Mutationen (92%) bestand, verglichen mit *NRAS*- (74%) und *KRAS*-Mutationen (61%) (Patel, Carty et al. 2017). Allerdings ergab sich eine geringere Rate an bilateralen *RAS*-mutierten

Malignomen im Vergleich mit der Studie von Gupta, Dasyam et al. (Gupta, Dasyam et al. 2013, Patel, Carty et al. 2017).

Resümee zur diagnostischen Relevanz von RAS-Mutationen

Das Detektieren einer *RAS*-Mutation zeigt zwar keine eindeutige Malignität an, lässt jedoch auf die Manifestation einer Neoplasie schließen (Nikiforov 2011b). Eine nachgewiesene *RAS*-Mutation in einem Feinnadelbiopsat kann somit die primäre chirurgische Therapie beeinflussen und zu einer Anpassung des Therapieregimes führen (Nikiforov, Ohori et al. 2011). Dies bedeutet auch, dass eine *RAS*-Mutation durchaus diagnostisch relevant ist. Das Resektionsausmaß bei Vorliegen einer *RAS*-Mutation in einem zytologisch uneindeutigen Feinnadelpunktat ist sicherlich zu diskutieren. Initial kann eine diagnostische Lobektomie durchgeführt werden (Howell, Hodak et al. 2013), um die Einordnung der Läsion histologisch zu belegen. Wenngleich sich nach einer Resektion die *RAS*-positive Läsion als benigne herausstellen sollte, kann argumentiert werden, dass *RAS*-Mutationen wie beschrieben auch zu einer malignen Transformation beitragen können und eine Resektion daher auch für ein Adenom eine adäquate Therapie darstellen könnte (Howell, Hodak et al. 2013). Ferner kann bei wie vorbeschrieben hoher Wahrscheinlichkeit für Malignität eines *RAS*-positiven, zytologisch uneindeutigen Knotens auch initial eine totale Thyreoidektomie erwogen werden, um das Risiko für eine Reoperation im Zuge eines komplettierenden Eingriffs zu umgehen (Howell, Hodak et al. 2013). Sollte sich der Knoten jedoch im Zuge der pathologischen Untersuchung tatsächlich als benigne herausstellen, würde eine totale Thyreoidektomie jedoch keinem adäquaten Eingriff entsprechen. Zudem sind zytologisch uneindeutige Knoten mit *RAS*-Mutation mit hoher Wahrscheinlichkeit follikuläre PTCs ohne Beteiligung des zentralen Lymphknotenkompartiments (Patel, Carty et al. 2017), sodass bei unifokalem Knoten mit präoperativ bekannter *RAS*-Mutation eine Lobektomie eine suffiziente Therapie darstellen könnte, vorausgesetzt es bestehen keine anderweitigen Indikationen zur totalen Thyreoidektomie (Patel, Carty et al. 2017). Voraussetzung ist ebenfalls, dass keine koinzidenten weiteren Mutationen detektiert wurden und alleine eine *RAS*-Mutation vorliegt (Xing 2016).

Bei zytologisch uneindeutigen Schilddrüsenknoten bietet sich bei der molekularpathologischen Analyse an, ein Genpanel anzuwenden, welches mehrere relevante Alterationen inklusive *BRAF*^{V600E}- und *RAS*-Mutationen sowie *PET/PTC*- und *PAX8/PPAR γ* -Rearrangements untersucht (Ferrari, Fallahi et al. 2018), um die Sensitivität bei der Beurteilung zu erhöhen (Xing 2016). Eine Übertherapie angesichts möglicher chirurgischer Komplikationen sollte im Allgemeinen vermieden werden sowie Nutzen und Risiko abgewogen werden.

Entwicklungen des Therapieregimes

Über die letzten Jahrzehnte hat man weltweit eine Zunahme von PTCs, vor allem von PTCs mit einer Tumorgöße von unter 1 cm registrieren können (Hughes, Haymart et al. 2011, Miranda-Filho, Lortet-Tieulent et al. 2021). Zudem belegen Studien einen überwiegend günstigeren Verlauf bei kleinen PTCs im Vergleich zu größeren PTCs von über 1 cm (Carcangiu, Zampi et al. 1985, Rosai, LiVolsi et al. 2003). Das machte ein Umdenken in der Therapie notwendig, da eine bisher angewandte vollständige Thyreoidektomie bei Niedrigrisiko-Karzinomen möglicherweise keine onkologischen Vorteile bietet und zu mehr Folgeproblemen führt als bei einer weniger eingreifenden Hemithyreoidektomie (Dralle, Weber et al. 2023). Nach der Veröffentlichung der American Thyroid Association guidelines 2015 hat sich das operative Management bereits verändert mit der Folge, dass die Rate an Hemithyreoidektomien gestiegen ist (Ullmann, Gray et al. 2019), die Rate an Thyreoidektomien gesunken ist (Zhu, Sha et al. 2020) sowie gleichzeitig die Rate an durchgeführten komplettierenden Thyreoidektomien nicht zugenommen (Ullmann, Gray et al. 2019), beziehungsweise sogar abgenommen hat (Zhu, Sha et al. 2020). Chan, Karamali et al. (2020) haben systematisch die Rezidivrate nach Hemithyreoidektomie bei Niedrigrisiko-DTCs

untersucht. Zunächst unterschieden sich die 10-Jahres-Überlebensraten bei Patienten/Patientinnen mit Hemithyreoidektomie und Thyreoidektomie nicht. Jedoch konnte eine signifikante, gering erhöhte Rezidivrate nach Durchführung einer Hemithyreoidektomie im Vergleich nach Thyreoidektomie festgestellt werden. Allerdings wird bezüglich der Interpretation auch auf eine Heterogenität der Studien verwiesen (Chan, Karamali et al. 2020). Kim, Lee et al. fanden bei mittels Hemithyreoidektomie behandelten PTCs mit einer Größe von 1-4 cm keinen Unterschied im rezidivfreien Überleben innerhalb eines Follow-ups von im Median 7 Jahren mit der Einschränkung, dass bei Patienten/Patientinnen mit kontralateralen Knoten ein erhöhtes Rezidivrisiko festgestellt werden konnte (Kim, Lee et al. 2017). Zusammenfassend ergibt sich nach Betrachtung verschiedener Studien kein onkologischer Nachteil bei Durchführung einer Hemithyreoidektomie bei Vorliegen eines Niedrigrisiko-PTCs von 1-4 cm Größe.

Hemithyreoidektomie versus Thyreoidektomie

Bei Betrachtung des postoperativen Status der Patienten/Patientinnen ergeben sich deutliche Vorteile einer Hemithyreoidektomie gegenüber einer totalen Thyreoidektomie. In der Literatur wurden geringere Komplikationsraten nach Hemithyreoidektomie versus Thyreoidektomie beschrieben (Kuba, Yamanouchi et al. 2017). Zu den häufigsten langfristig relevanten postoperativen Komplikationen nach Thyreoidektomie gehören eine symptomatische Hypokalzämie und Stimmstörungen wie Heiserkeit (Viqar, Masood et al. 2022). Beeinträchtigungen in der Lebensqualität wurden bei Patienten/Patientinnen mit Thyreoidektomie häufiger berichtet als bei einer Hemithyreoidektomie (Nickel, Tan et al. 2019). Auch andere Studien beobachten eine reduzierte Lebensqualität bei vorliegendem Hypoparathyreoidismus (Büttner, Locati et al. 2020, Frey, Figueres et al. 2021, Jørgensen, Homøe et al. 2021), welcher nach inzidenteller Parathyreoidektomie im Rahmen einer Schilddrüsenoperation auftreten kann (Neagoe, Cvasciuc et al. 2017).

Bei der Entscheidung für oder gegen eine Hemithyreoidektomie nimmt auch die Rolle der Pathologie im Rahmen der intraoperativen Gefrierschnittuntersuchung bei Anforderung eines sog. Schnellschnitts eine entscheidende Rolle ein (Synoracki, Ting et al. 2015). Hierbei können wichtige Faktoren wie Tumorgröße, Invasion der Schilddrüsenkapsel und auch eine Lymphknotenmetastasierung erkannt werden (Synoracki, Ting et al. 2015), sodass entsprechend intraoperativ reagiert werden kann. Allerdings ergeben sich hier auch Herausforderungen bezüglich der pathologischen Diagnose. Die für ein PTC charakteristischen Kernmerkmale sind in der Gefrierschnittuntersuchung nicht eindeutig erkennbar (Synoracki, Ting et al. 2015) und in dem follikulären Subtyp sind diese Kernkriterien zudem weniger stark ausgeprägt (Gupta, Dasyam et al. 2013). Zudem liegt bei diesem PTC-Subtyp kein papilläres Wachstum vor, sodass es vor allem bei dem follikulären Subtyp in der Gefrierschnittuntersuchung zu diagnostischen Schwierigkeiten kommen kann. Da *RAS*-Mutationen fast ausschließlich bei dem follikulären Subtyp vorkommen (Cancer Genome Atlas Research Network 2014), ergeben sich diese Probleme insbesondere auch für die *RAS*-mutierten PTCs. So kann die sichere Unterscheidung zwischen einer benignen und malignen Läsion in der intraoperativen Gefrierschnittuntersuchung Schwierigkeiten bereiten.

Bei der Frage nach dem Resektionsausmaß spielen verschiedene Tumoreigenschaften eine Rolle. Dazu gehören Größe, Multifokalität, der histologische Subtyp und auch ein Lymphknotenbefall (Dralle, Weber et al. 2023). Die Entscheidungsfindung bezüglich einer möglichen Hemithyreoidektomie anstatt einer totalen Thyreoidektomie ist somit von vielen Faktoren abhängig. Auch die molekularen Eigenschaften spielen mehr und mehr eine Rolle, jedoch liegen hierfür noch keine allgemein gültigen Empfehlungen vor. Möglicherweise kann ein bekannter *BRAF*- oder *RAS*-Mutationsstatus der Tumoren die Risikostratifizierung der im Allgemeinen heterogenen Tumorgruppe von PTCs erleichtern und in der Zukunft die Therapie beeinflussen.

Risikostratifizierung der Therapie

Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Kollektiv waren *RAS*-Mutationen nicht signifikant mit einem multifokalen PTC assoziiert. Eine multifokale Tumorerkrankung trat in nur einem Fall mit *RAS*-Mutation auf (1/12; 8,3 %). Bei allen Fällen mit initialer Hemithyreoidektomie (n=6) wurde jedoch eine komplettierende totale Thyreoidektomie durchgeführt. In der publizierten Studie von Harahap et al., die eine ähnliche Anzahl an Patienten/Patientinnen mit PTCs untersucht hat, waren *RAS*-Mutationen ebenfalls nicht mit Multifokalität verknüpft (Harahap, Subekti et al. 2023), obwohl bei *HRAS*-mutierten Fällen im Vergleich zu *NRAS*-mutierten Fällen vermehrt multifokale PTCs beobachtet wurden (Harahap, Subekti et al. 2023). In dem hier untersuchten Kollektiv konnte dies nicht beobachtet werden. Hier wies das multifokale *RAS*-mutierte PTC eine *KRAS*-Mutation auf. Im in vorliegender Arbeit untersuchten Kollektiv bestand ferner eine Tendenz zu einem größeren Tumordurchmesser bei *RAS*-mutierten PTCs. *BRAF*-mutierte PTCs neigten in der vorliegenden Studie zu einem kleineren Tumordurchmesser. Diese Beobachtungen passen zu der Studie von Semsar-Kazerooni, Morand et al. (2022). Zudem konnte in jener Studie trotz einer insgesamt kleineren Tumorgroße bei den *BRAF*^{V600E}-mutierten PTCs eine Korrelation mit aggressiven Tumoreigenschaften wie extrathyreoidaler Ausbreitung, Lymphknotenmetastasen oder aggressiveren histologischen Subtypen gesehen werden. Die Tumorgroße an sich korrelierte hier nicht mit aggressiven pathologischen Tumoreigenschaften (Semsar-Kazerooni, Morand et al. 2022). Allerdings liegen in der Literatur bezüglich des Zusammenhangs von Tumorgroße und *BRAF*-Mutation variable Ergebnisse vor (Wei, Wang et al. 2022). Der systematische Review von Wei, Wang et al. zeigte keine Korrelation bezüglich Tumorgroße und *BRAF*-Mutation (Wei, Wang et al. 2022). Verschiedene Ergebnisse können auf unterschiedliche patientenbezogene Charakteristika der Studien zurückgeführt werden, wie beispielsweise die Größe der Studie mit unterschiedlicher Anzahl an eingeschlossenen Personen oder gegebenenfalls unterschiedliche Häufigkeiten der PTC-Subtypen (Wei, Wang et al. 2022). Zudem können internationale Unterschiede bezüglich der Verfügbarkeit und des Zugangs zu bildgebenden Verfahren wie hochauflösenden Ultraschalluntersuchungen zu divergenten Studienergebnissen beitragen (Semsar-Kazerooni, Morand et al. 2022).

Im Gegensatz zu den *RAS*-Mutationen war die *BRAF*^{V600E}-Mutation in Übereinstimmung mit anderen Studien allerdings häufiger mit Multifokalität assoziiert (Zhang, Liu et al. 2016, Wei, Wang et al. 2022). Dies deutet darauf hin, dass bei Vorliegen einer *BRAF*-Mutation eine totale Thyreoidektomie erwogen werden kann, um das Rezidivrisiko zu reduzieren. In einer Studie von Woo, Kim et al. wurde Multifokalität als prädiktiver Marker für ein erhöhtes Rezidivrisiko beobachtet (Woo, Kim et al. 2021). Ohne klinisch-bildgebende Hinweise für eine multifokale Tumorerkrankung kann eine Hemithyreoidektomie dagegen bei *RAS*-Mutationen ausreichend sein, vorausgesetzt der Tumor kann so vollständig entfernt werden. Anzumerken ist, dass nicht abschließend geklärt ist, ob bei einem multifokalen PTC unabhängige Tumoren gleichzeitig auftreten oder ob die Multifokalität auf einem Tumor beruht, der intrathyreoidal metastasiert (Iacobone, Jansson et al. 2014) und die unterschiedlichen Tumorfoci subklonale Alterationen erwerben (Jovanovic, Delahunt et al. 2008). Dies könnte auch eine Erklärung für eine differente histologische Morphologie verschiedener Tumorfoci sein (Jovanovic, Delahunt et al. 2008). Zu beachten ist, dass in der vorliegenden Arbeit nicht alle Tumorfoci eines Patienten/einer Patientin mittels NGS-Analyse untersucht wurden.

Lymphnodale Manifestation

Auch das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen spielt bei dem Resektionsausmaß und bei der Betrachtung aggressiver Tumoreigenschaften eine Rolle. Lymphknotenmetastasen wurden in vorliegender Arbeit nicht vermehrt bei *RAS*-mutierten PTCs gefunden. Dagegen ergab sich eher eine Tendenz zur Abwesenheit von Lymphknotenmetastasen. In der aktuellen Studie von Harahap, Subekti et al. waren *RAS*-Mutationen signifikant mit der Abwesenheit von Lymphknotenmetastasen assoziiert (Harahap, Subekti et al. 2023). Harahap, Subekti et al.

haben ihre Beobachtungen damit erklärt, dass *RAS*-Mutationen vermehrt mit gekapselten Tumoren einhergehen (Harahap, Subekti et al. 2023) und hierbei auch weniger Lymphknotenmetastasen zu erwarten sind. Dies deckt sich mit weiteren Studien, bei denen unter den untersuchten *RAS*-mutierten PTCs Lymphknotenmetastasen selten (Gupta, Dasyam et al. 2013) bzw. nicht vorkamen (Medici, Kwong et al. 2015). Passend dazu wurde auch eine geringe Rate an Lymphknotenmetastasen bei dem follikulären Subtyp des PTCs beschrieben (Zhu, Gandhi et al. 2003, Yang, Gong et al. 2015), die gleichzeitig eine hohe Rate an *RAS*-Mutationen aufweist (Zhu, Gandhi et al. 2003, Cancer Genome Atlas Research Network 2014). Möglicherweise war die Fallanzahl in der hier vorliegenden Arbeit zu gering, um signifikante Effekte zu demonstrieren, obwohl die Tendenz in die gleiche Richtung weist. In der Studie von Harahap, Subekti et al. war in der Gesamtheit auch eine etwas höhere Rate an *RAS*-mutierten PTCs detektiert worden (Harahap, Subekti et al. 2023) als im hier vorliegenden Kollektiv. Im Gegensatz zu den *RAS*-Mutationen war eine *BRAF*-Mutation in mehreren publizierten Studien vermehrt mit einer lymphnodalen Manifestation assoziiert (Wei, Wang et al. 2022, Harahap, Subekti et al. 2023). Dies konnte am vorliegenden Kollektiv allerdings nicht reproduziert werden. Und auch Kim, Woo et al. konnten eine *BRAF*-Mutation nicht als unabhängigen Indikator für regionäre Lymphknotenmetastasen identifizieren (Kim, Woo et al. 2015). Aus den Beobachtungen der verschiedenen Studien kann man ableiten, dass bei Vorliegen einer *RAS*-Mutation keine prophylaktische Lymphadenektomie vorgenommen werden müsste. Insbesondere jedoch bei bekannter *BRAF*-Mutation sollten die regionären Lymphknoten gründlich klinisch-bildgebend auf Metastasen überprüft werden. Ohne den klinischen Verdacht auf Lymphknotenmetastasen ergibt sich jedoch kein Anhalt dafür, dass eine prophylaktische Lymphknotendissektion zwingend notwendig wäre. Der in diesem Fall möglicherweise geringe Nutzen einer Lymphknotendissektion muss gegen das Risiko operativer Folgen abgewogen werden.

5.3 Genexpression von *TERT*, *GABPB1* und *GABPB2*

- **Wie wird das *TERT*-Gen bei *TERTp*-mutierten im Vergleich zu *TERTp*-Wildtyp-Fällen exprimiert?**
- **Hat die Genexpression von *TERT* Auswirkungen auf das klinische Outcome?**
- **Wie werden die Gene *GABPB1* und *GABPB2* bei *BRAF*- und *TERTp*-mutierten PTCs exprimiert?**

Das *Telomerase Reverse Transkriptase* (*TERT*) Gen kodiert für die katalytische Untereinheit der Telomerase (Gomez, Armando et al. 2012, Horn, Figl et al. 2013, Liu, Bishop et al. 2013). Die Telomerase sorgt aufgrund der Verlängerung der Telomere für chromosomale Stabilität (Gomez, Armando et al. 2012), besonders bedeutsam ist dies in Keim- und Stammzellen (Hastie, Dempster et al. 1990, Shay and Wright 2010). Bei somatischen Zellen kann aufgrund der unidirektionalen DNA-Polymerasen bei jedem Replikationszyklus ein Anteil des Chromosoms nicht repliziert werden und geht somit verloren (Gomez, Armando et al. 2012). Wenn in den Zellen eine gewisse Verkürzung der Telomere erreicht wird, wird ein DNA-Schaden signalisiert und die Zelle befindet sich in einem Zustand der sog. Seneszenz (Shay and Wright 2010). Dieser Zustand kann jedoch umgangen werden, indem Checkpoint-Gene des Zellzyklus inaktiviert werden, sodass sich die Zelle trotz DNA-Schäden weiter teilt und die Telomere weiter verkürzt werden (Shay and Wright 2010). In diesem kritischen Zustand wird in der Regel die Apoptose eingeleitet (Shay and Wright 2010). Es kann jedoch passieren, dass die Zelle dem Zelltod entgeht und eine Immortalisierung eintritt. Dies geschieht durch eine gesteigerte Expression der Telomerase und durch Stabilisierung der Telomere (Shay and Wright 2010). Eine Aktivierung der Telomerase in malignen Tumoren kann somit eine konstitutive Zellproliferation bewirken. Die genaue Regulation der Reaktivierung des *TERT*-

Promotors ist in seiner komplexen Gesamtheit noch nicht vollständig verstanden und kann mehrere Veränderungen einbeziehen (Akincilar, Unal et al. 2016). Bekannt ist, dass Mutationen in der Promotorregion von *TERT* zu einer Reaktivierung der Telomerase führen können. Die bekanntesten Mutationen sind hierbei c.-124C > T (C228T) und c.-146C > T (C250T) (Akincilar, Unal et al. 2016, Panebianco, Nikitski et al. 2019). Diese führen dazu, dass eine neue Bindungsstelle für weitere ETS-Transkriptionsfaktoren entsteht und in der Folge eine gesteigerte mRNA-Expression der Telomerase resultiert. In vorliegender Arbeit wurde die *TERT*-Expression sowohl bei *TERT*_p-mutierten als auch bei *TERT*_p-Wildtyp-PTCs mittels quantitativer real-time PCR untersucht.

Genexpression des *TERT*-Gens

In dieser vorliegenden Studie zeigten alle *TERT*_p-mutierten Fälle erwartungsgemäß eine mRNA-Expression des *TERT*-Gens (16/16). Weitere Studien demonstrieren ebenfalls eine bei vorliegender *TERT*-Promotormutation erhöhte *TERT*-Expression auf mRNA-Ebene (Vinagre, Almeida et al. 2013) und auch auf Proteinebene (Muzza, Colombo et al. 2015). Zudem wurde in einem Anteil der *TERT*_p-Wildtyp Fälle ebenfalls eine *TERT*-Expression beobachtet, obwohl keine *TERT*_p-Mutation detektiert werden konnte (9/36; 25%). Aus den Beobachtungen kann man schließen, dass zusätzlich noch andere Mechanismen vorliegen müssen, die zu einer *TERT*-Expression führen, auch unabhängig von einer *TERT*_p-Mutation. Studien zeigen, dass eine vermehrte Expression des Protoonkogens *c-Myc* die Transkription des *TERT*-Gens durch direkte Bindung an den *TERT*-Promotor steigert (Wang, Xie et al. 1998, Wu, Grandori et al. 1999, Gay-Bellile, Véronèse et al. 2017, Liu, Zhang et al. 2018). Zudem führt nach weiteren Studien eine Hypermethylierung des *TERT*-Promotors zu einer *TERT*-Expression (Losi, Botticelli et al. 2021, Li, Xue et al. 2024). Ein weiterer Mechanismus, der in einer gesteigerten *TERT*-Expression resultiert, ist eine erhöhte *TERT*-Genkopienzahl (Gay-Bellile, Véronèse et al. 2017). In jener Studie wurde bei einem Fallkollektiv mit Mammakarzinomen bei erhöhter *TERT*-Genkopienzahl ein ungünstiger Krankheitsverlauf bezüglich des rezidivfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens festgestellt (Gay-Bellile, Véronèse et al. 2017). Die genannten Mechanismen wurden in der hier vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Auch wurde keine Untersuchung der *TERT*-Expression auf Proteinebene durchgeführt.

Aggressive Tumoreigenschaften

In vorliegender Arbeit wurde untersucht, ob PTCs mit *TERT*-mRNA-Expression mit aggressiven Tumoreigenschaften assoziiert sind. In die Gruppe der aggressiven PTCs wurden Tumoren mit Fernmetastasen, Rezidiven und einer Radiojod-refraktären Tumorerkrankung gezählt. Es konnte gezeigt werden, dass *TERT*-exprimierende/*TERT*_p-mutierte Fälle häufiger Rezidive und eine Radiojod-refraktäre Erkrankung entwickelten. Dazu passend demonstrierten Liu und Xing in ihrem umfangreichen Review, dass *TERT*_p-Mutationen signifikant mit Fernmetastasen, Rezidiven und Tod assoziiert sind (Liu and Xing 2016). Zu beachten ist, dass hier nicht die mRNA-Expression von *TERT*, sondern die *TERT*_p-Mutationen zugrunde gelegt wurden. In dem hier vorliegenden Kollektiv wies, wie beschrieben, neben den *TERT*_p-mutierten PTCs ein Anteil der *TERT*_p-Wildtyp-Fälle ebenfalls eine *TERT*-Expression auf. Diese Beobachtungen decken sich mit bestehender Literatur (Tanaka, Matsuse et al. 2019). In der Studie von Tanaka, Matsuse et al. wurde bei den *TERT*-exprimierenden *TERT*_p-Wildtyp-Fällen gegenüber den nicht *TERT*-exprimierenden *TERT*_p-Wildtyp-Fällen ein erhöhtes Rezidivrisiko festgestellt (Tanaka, Matsuse et al. 2019). Dies deutet darauf hin, dass trotz fehlender *TERT*_p-Mutation eine *TERT*-Expression ungünstige Tumoreigenschaften fördern kann. Auch nach Kwon et Yi war eine höhere *TERT*-mRNA-Expression mit einem ungünstigeren Überleben assoziiert und erwies sich als besserer Vorhersagewert für die Sterbewahrscheinlichkeit als eine *TERT*_p-Mutation (Kwon and Yi 2021). Am hier vorliegenden Kollektiv konnte ein kürzeres krankheitsfreies Überleben bei den *TERT*-exprimierenden Fällen gegenüber den Fällen ohne detektierte *TERT*-Expression gezeigt werden. Bei detaillierter Betrachtung der in dieser Arbeit untersuchten Fälle zeigt sich jedoch, dass keiner der *TERT*-

exprimierenden *TERT*_p-Wildtyp-Fälle aggressive Tumoreigenschaften im Sinne von Rezidiven, Fernmetastasen oder einer Radiojod-refraktären Erkrankung aufgewiesen haben. Wahrscheinlich war die beobachtete Assoziation zu aggressiven Tumoreigenschaften in dem hier vorliegenden Kollektiv bei den *TERT*-exprimierenden Fällen bedingt durch eine *TERT*_p-Mutation. Die Assoziation zwischen *TERT*_p-Mutationen und aggressiven Tumoreigenschaften konnte bereits demonstriert werden (Tanaka, Matsuse et al. 2019, Staubitz, Müller et al. 2023). Möglicherweise war die Telomerase-Expression der *TERT*_p-Wildtyp-Fälle zu gering, um ins Gewicht zu fallen. Möglicherweise muss ein gewisses Maß an Telomerase exprimiert werden, um die chromosomale Stabilität zu gewährleisten, sodass die aggressiven Tumoreigenschaften ausgebildet werden können. Eventuell führen andere bereits diskutierte Mechanismen, die den *TERT*-Promotor aktivieren, zu einer weniger gesteigerten *TERT*-Expression als bei Vorliegen einer *TERT*_p-Mutation. Hierzu können weitere Analysen mit größeren Kollektiven sinnvoll sein, um die Frage nach aggressiveren Tumoreigenschaften bei *TERT*-exprimierenden Tumoren zu beantworten und ob eine *TERT*-mRNA-Expression möglicherweise als prognostischer Marker insbesondere bei jungen Patientinnen und Patienten dienen könnte, wie von Tanaka, Matsuse et al. diskutiert (Tanaka, Matsuse et al. 2019).

Zusammenspiel von *TERT*_p-Mutationen und *BRAF*-Mutationen

*TERT*_p-Mutationen kamen in der hier vorliegenden Arbeit und wie in der Literatur beschrieben häufig mit *BRAF*-Mutationen zusammen vor (Vinagre, Almeida et al. 2013, Liu and Xing 2016, Liu, Zhang et al. 2018). Eine Koexistenz von *BRAF*- und *TERT*_p-Mutationen wurde nicht nur in Schilddrüsenkarzinomen (Vinagre, Almeida et al. 2013, Cao, Zhu et al. 2022, Staubitz, Müller et al. 2023), sondern beispielsweise auch in malignen Melanomen beschrieben (Horn, Figl et al. 2013). Eine aktivierende *BRAF*-Mutation scheint einen Effekt auf den mutierten *TERT*-Promotor und somit auf die *TERT*-Expression zu haben (Horn, Figl et al. 2013, Vinagre, Almeida et al. 2013, Liu and Xing 2016). Liu, Zhang et al. fanden heraus, dass im Rahmen der *BRAF*^{V600E}-assoziierten Signalkaskade die Bindung des *GABP*-Komplexes an den mutierten *TERT*-Promotor gesteigert wird und somit der mutierte *TERT*-Promotor über *GABPB* reguliert wird (Liu, Zhang et al. 2018). Der *GABP*-Komplex ist ein Heterodimer, welches aus den Untereinheiten *GABPA* und *GABPB* besteht und als Transkriptionsfaktor fungiert (LaMarco, Thompson et al. 1991, Thompson, Brown et al. 1991). Liu, Zhang et al. beobachteten, dass die Expression der katalytisch aktiven Untereinheit *GABPB* des *GABP*-Komplexes in Rahmen der *BRAF*^{V600E}-involvierenden MAPK-Signalkaskade gefördert und in der Folge eine *TERT*-Expression beobachtet wird (Liu, Zhang et al. 2018).

Mittels Genexpressionsanalysen wurde in dieser Arbeit überprüft, ob am eigenen Kollektiv ähnliche Zusammenhänge gezeigt werden können. *GABPB* wird durch die Gene *GABPB1* und *GABPB2* kodiert (de la Brousse, Birkenmeier et al. 1994). Die Genexpression von *GABPB1* und *GABPB2* wurde in einer explorativen Analyse mittels real-time PCR untersucht. In Kenntnis der durch Liu, Zhang et al. (2018) beobachteten Ergebnisse wurde erwartet, dass die Genexpression von *GABPB1* und *GABPB2* bei *BRAF*- und *TERT*_p-mutierten PTCs gesteigert ist und dass hier möglicherweise auch die *TERT*-Genexpression hochreguliert ist. Unter allen *TERT*_p-mutierten Fällen zeigte sich eine erhöhte Expression von *GABPB1* und *GABPB2* bei den *BRAF*-mutierten Fällen im Vergleich zu den *BRAF*-Wildtyp-Fällen, passend zu der genannten Hypothese. Eine Einschränkung besteht jedoch bei den Fallanzahlen, die in den Gruppen verglichen wurden. Insbesondere die Gruppe der *TERT*_p-mutierten und *BRAF*-Wildtyp PTCs (n=3) war sehr klein, sodass aus statistischer Sicht keine eindeutig valide Aussage möglich ist. Allein eine vorliegende *BRAF*-Mutation führte nicht zu einer gesteigerten *GABPB1*- und *GABPB2*-Expression. Unter den *TERT*_p-exprimierenden, aber *TERT*_p-Wildtyp-Fällen konnte jedoch eine erhöhte *GABPB1*-Expression bei den *BRAF*-mutierten PTCs im Vergleich zu den *BRAF*-Wildtyp-Fällen detektiert werden. Dies deutet möglicherweise doch auf einen Zusammenhang einer *BRAF*^{V600E}-Mutation mit einer *GABPB*-Expression hin, jedoch

waren die Fallzahlen hierbei sehr gering und zudem ist aus der Literatur bekannt, dass *GABPB* ausschließlich an den mutierten *TERT*-Promotor bindet (Liu, Zhang et al. 2018). Die Ergebnisse sind somit nicht ganz eindeutig zu interpretieren, obwohl Liu und Zhang gezeigt haben, dass durch die *BRAF*^{V600E}-Mutation die Expression von *GABPB1* gesteigert wird (Liu, Zhang et al. 2018). Dagegen spricht, dass sich bei Vergleich der *BRAF*- und *TERT*p-mutierten Fallgruppe mit der *BRAF*- und *TERT*p-Wildtyp-Kontrollgruppe bezüglich der *GABPB1/2*-Expression kein Unterschied zwischen den Gruppen ergab. Auch Xing, Mu et al. (2022) konnten keine eindeutige Assoziation zwischen der *GABPB1*-Expression und einer *BRAF*^{V600E}-Mutation feststellen (Xing, Mu et al. 2022).

In einer Arbeit von Mancini, Xavier-Magalhães et al. wurde in Glioblastomzellen durch einen genetischen Knockdown von *GABPB1* eine reduzierte *TERT*-Expression bei vorliegender *TERT*p-Mutation erreicht. Die Daten demonstrieren, dass *GABPB1* eine zentrale Stellung bei der Aktivierung des mutierten *TERT*-Promotors einzunehmen scheint (Mancini, Xavier-Magalhães et al. 2018), wobei auch sekundäre Mechanismen diskutiert werden, die auf die Aktivierung des *TERT*-Promotors einwirken (Chaires, Trent et al. 2014, Makowski, Willems et al. 2016). *GABPB2* scheint hierbei eine untergeordnete Rolle zu spielen (Mancini, Xavier-Magalhães et al. 2018). In der Arbeit von Mancini, Xavier-Magalhães et al. wurde nach genetischem Knockdown von *GABPB1* im Mausmodell ein längeres Gesamtüberleben und eine verringerte Tumoralast festgestellt (Mancini, Xavier-Magalhães et al. 2018). Da *GABPB1* nur den mutierten *TERT*-Promotor aktiviert, wurde diskutiert, ob *GABPB1* nicht als Target für eine mögliche zielgerichtete Therapie in Frage kommt, um die Immortalisierung der Tumorzellen zu verhindern (Mancini, Xavier-Magalhães et al. 2018). Xing, Mu et al. (2022) fanden jedoch zusätzlich heraus, dass *GABPB1* nicht nur die *TERT*-Genexpression aktiviert, sondern in Schilddrüsenkarzinomen auch als Tumorsuppressor fungiert, der eine Progression der Tumorerkrankung verhindert. Der Gen-Knockdown von *GABPB1* führte ebenfalls zu einer verringerten *TERT*-Genexpression. Allerdings führte die Herunterregulierung von *GABPB1* hier zu aggressiveren Tumoreigenschaften. Beispielsweise wurde ein erhöhtes Metastasierungspotential in einem Zebrafisch-Xenotransplantatmodell beobachtet. Zudem war die Menge an *GABPB1*-mRNA in einer Kohorte von ATCs signifikant geringer als in einer Gruppe von PTCs (Xing, Mu et al. 2022). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Verlust der *GABPB1*-Genexpression auf eine progressive Tumorerkrankung hindeutet. Auch epigenetische Effekte wie eine Hypermethylierung des *GABPB1*-Promotors können die *GABPB1*-Expression regulieren. Eine vermehrte Hypermethylierung ging in der Studie von Xing, Mu et al. mit einer verringerten Expression von *GABPB1* und mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben einher, dieser Effekt war unabhängig von einer *BRAF*^{V600E}-Mutation (Xing, Mu et al. 2022).

Resümee zur Genexpression von *GABPB*

Die variablen Beobachtungen in den Studien können auch auf die unterschiedlichen verwendeten Zelllinien zurückgeführt werden. Die insgesamt heterogenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Regulation von *GABPB* und die von *GABPB*-abhängigen Wirkungsweisen komplex sind und sich möglicherweise in unterschiedlichen Gewebearten und Tumoren unterscheiden können. Zudem können in Schilddrüsenkarzinomen auch andere Transkriptionsfaktoren wie ETS Faktor *EV5* an den mutierten *TERT*-Promotor binden und diesen aktivieren (Bullock, Lim et al. 2019). Solche Effekte wurden in der hier vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Auch der Zusammenhang von histopathologischen Tumoreigenschaften und der Expression von *GABPB* ist bislang noch nicht geklärt. Zur weiterführenden Analyse sind größere Fallkollektive notwendig.

Genexpression von *GABPB* in Abhängigkeit vom *RAS*-Mutationsstatus

Bei den getesteten *RAS*-mutierten Fällen (n=4) ergab sich eine geringere Expression von *GABPB1* gegenüber den *RAS*-Wildtyp-Fällen. Allerdings ist hierbei die geringe *RAS*-mutierte

Fallanzahl zu beachten, sodass keine eindeutigen Schlussfolgerungen gezogen werden können. Es ist beschrieben, dass *RAS*-Mutationen mit einer geringeren Signalwirkung im MAPK-Signalweg assoziiert sind als *BRAF*-Mutationen (Cancer Genome Atlas Research Network 2014). Möglicherweise wirken *RAS*-Mutationen auch weniger auf die Signalkaskade ein, die die Expression von *GABPB1/2* reguliert.

***TERTp*-Mutationen und *RAS*-Mutationen**

In dem hier vorliegenden Kollektiv wies ein *NRAS*-mutierter Fall eine koexistierende *TERTp*-Mutation auf. Nach Muzza, Colombo et al. hatten in einem Kollektiv von FTCs *RAS*- und *TERTp*-mutierte Fälle gegenüber den *RAS*-Wildtyp und *TERTp*-mutierten Fällen ein schlechteres Outcome im Sinne von signifikant vermehrten Rezidiven beziehungsweise Tumorpersistenz (Muzza, Colombo et al. 2015). Song, Lim et al. konnten in einem Kollektiv aus DTCs feststellen, dass koexistierende *TERTp*- und *RAS*-Mutationen zu einer erhöhten Rezidiv- und Mortalitätsrate führten (Song, Lim et al. 2016). Da in dem hier vorliegenden Kollektiv insgesamt wenige Fälle mit *RAS*-Mutationen vorkamen und nur ein Fall eine zusätzliche *TERTp*-Mutation aufwies, konnte hier keine statistisch valide Aussage getroffen werden, inwieweit *RAS*-Mutationen und *TERTp*-Mutationen zusammenwirken und welche Tumoreigenschaften resultieren.

5.4 Genexpression von *GADD45B*

Eignet sich *GADD45B* als prognostischer Biomarker?

Zwar ist das genetische Profil der PTCs bereits umfangreich untersucht worden, jedoch fehlt es an Markern, die eine prognostische Aussage zulassen.

GADD45B (growth arrest and DNA damage-inducible 45 beta) gehört zu der Gruppe der *GADD45*-Genfamilie, die die Zellproliferation reguliert (Barros-Filho, de Mello et al. 2020). Studien zeigen, dass *GADD45B* bei Zellstress und DNA-Schäden induziert wird (Moskalev, Smit-McBride et al. 2012, Salvador, Brown-Clay et al. 2013) und komplexe Funktionen in der Zelle einnimmt. Dazu gehören Zellzyklus-Kontrolle, Apoptose und DNA-Reparatur (Salvador, Brown-Clay et al. 2013) sowie die Verhinderung des Zellwachstums über die Aktivierung des p38 MAPK-Signalwegs (Xue, Sun et al. 2020). Die Rolle in Tumorzellen wird diskutiert.

In einer Studie von Barros-Filho, de Mello et al. (2020) wurde das Genexpressionsprofil zahlreicher Gene bestimmt und es stellte sich eine erhöhte Expression von *GADD45B* als Marker für ein kürzeres krankheitsfreies Überleben heraus. Auch konnte bei einer vermehrten Expression von *GADD45B* ein kürzeres Gesamtüberleben beobachtet werden. Es ergab sich jedoch keine Assoziation mit dem Risiko eines Rezidivs (Barros-Filho, de Mello et al. 2020). Auch in Ovarialkarzinomen ist eine Überexpression von *GADD45B* als Hinweis auf ein kürzeres krankheitsfreies Überleben und Gesamtüberleben beschrieben (Gong, Cai et al. 2021). Interessanterweise konnten Barros-Filho, Mello et al. zwar eine verminderte Expression von *GADD45B* in den PTCs mit günstiger Prognose im Vergleich zu PTCs mit aggressivem Verlauf nachweisen, allerdings war die *GADD45B*-Expression im Normalgewebe nicht reduziert und wies große Schwankungen auf (Barros-Filho, de Mello et al. 2020). Diese Beobachtungen können damit erklärt werden, dass dem Tumor benachbartes, histologisch normales Schilddrüsengewebe ebenfalls epigenetische Modifikationen aufweisen kann, sodass das DNA-Methylierungsmuster des Normalgewebes dem des Tumorgewebes ähnelt. Dies kann man auch als Effekt der Feldkanzerisierung bezeichnen (Yim, Choi et al. 2019).

Eine reduzierte Expression von *GADD45B*, beispielsweise durch epigenetische Modifikation, ist in Tumorentitäten wie hepatozellulären Karzinomen (Qiu, Zhou et al. 2004) oder in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen beschrieben (Do, Kim et al. 2019). Umgekehrt ist in der

Literatur beschrieben, dass in den häufigsten Tumorentitäten eine erhöhte *GADD45B*-Expression mit einem kürzeren rezidivfreien Überleben und Gesamtüberleben einhergeht (Verzella, Bennett et al. 2018). Schilddrüsenkarzinome waren in jener Datenanalyse jedoch nicht einbezogen worden.

In der hier vorliegenden Studie konnte in Übereinstimmung mit Barros-Filho, de Mello et al. (2020) die *GADD45B*-Expression nicht mit dem Risiko eines Rezidivs assoziiert werden. Allerdings ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der *GADD45B*-Expression bei Vergleich der Gruppen mit frühem und spätem Rezidiv. Es konnte zwar eine leichte Tendenz zur erhöhten Expression in der Fallgruppe mit frühem Rezidiv gesehen werden, die vorherbeschriebenen signifikanten Beobachtungen (Barros-Filho, de Mello et al. 2020) konnten am vorliegenden Kollektiv jedoch nicht bestätigt werden. Zudem konnte kein Unterschied in der *GADD45B*-Expression bei Tumoren mit aggressiven gegenüber Tumoren ohne aggressive Tumoreigenschaften detektiert werden. In der hier vorliegenden Analyse fand kein Vergleich mit Normalgewebe statt.

***GADD45B* und Radiojod-Therapie**

Vor dem Hintergrund der Funktion von *GADD45B* stellt sich auch die Frage, ob PTCs mit einer reduzierten *GADD45B*-Expression ein besseres Ansprechen auf eine mögliche Radiojodtherapie zeigen. Im vorliegenden Kollektiv wiesen die Fälle mit einer Radiojod-refraktärer Erkrankung keine erhöhte *GADD45B*-Expression auf, sodass dies am vorliegenden Kollektiv nicht belegt werden kann. Interessanterweise konnte eine erhöhte Expression von *GADD45B* in multifokalen Tumoren gegenüber unifokalen PTCs detektiert werden. Möglicherweise spielen hier auch epigenetische Effekte und eine Feldkanzerisierung eine Rolle.

***GADD45B*-Expression in Bezug auf das genetische Profil**

Die *GADD45B*-Expression unterschied sich nicht in Abhängigkeit vom Mutationsstatus des *TERT*-Promotors oder des *BRAF*-Gens. Nach Barros-Filho, de Mello et al. war die *GADD45B*-Expression allerdings in *BRAF*-mutierten PTCs geringer als in den *BRAF*-Wildtyp-Fällen (Barros-Filho, de Mello et al. 2020). In dem hier vorliegenden Kollektiv war jedoch die *RAS*-Mutation mit einer geringeren *GADD45B*-Expression assoziiert. Eine veränderte Expression der *GADD45*-Proteine wurde in soliden Tumoren (Qiu, Zhou et al. 2004, Do, Kim et al. 2019, Wang, Wu et al. 2021) und auch bei hämatopoetischen Malignomen (Liebermann, Tront et al. 2011) beschrieben. Jedoch existieren verschiedene Beobachtungen in unterschiedlichen Tumorentitäten, die beispielsweise auch das Therapieansprechen betreffen. So ist die Assoziation einer erhöhten Expression von *GADD45B* mit einer Chemotherapieresistenz bei Ovarialkarzinomzellen beschrieben (Cheng, Manorek et al. 2006). Andererseits erhöhte eine vermehrte *GADD45B*-Expression in fortgeschrittenen Prostatakarzinomen die Chemosensitivität (Wang, Wu et al. 2021). Im Mausmodell konnten Hinweise gefunden werden, dass die Funktion der *GADD45*-Proteine, die Tumorentwicklung entweder zu fördern oder zu inhibieren, von verschiedenen Faktoren abhängt (Liebermann, Tront et al. 2011). Dazu gehören neben dem Zelltyp auch die molekularen Eigenschaften der involvierten Onkogene und konsekutiv die Signalwege, die einbezogen werden (Liebermann, Tront et al. 2011). Um die genaue Funktion von *GADD45B*, die Reaktion auf onkogene Stressoren und die Interaktion mit den Signalkaskaden zukünftig besser zu verstehen, ist weitere Forschung notwendig (Liebermann, Tront et al. 2011).

6 Fazit und Zusammenfassung

Schilddrüsentumoren stellen die häufigsten endokrinen Neoplasien dar (Baloch, Asa et al. 2022). Das PTC ist das häufigste Schilddrüsenkarzinom und wird in einem breiten Altersspektrum diagnostiziert (Mulla and Margo 2000). Obwohl die Erkenntnisse bezüglich der beteiligten Mutationen beim PTC sowie das Wissen über die zugehörigen Signalwege zugenommen haben, sind die Mechanismen auf molekularer Ebene nicht vollständig geklärt. Auch die Einschätzung der Prognose bei den unterschiedlichen auftretenden Mutationen ist nicht sicher belegt. Bezüglich der häufig vorkommenden *BRAF*-Mutationen wurden die Tumoreigenschaften bereits in vielen Studien untersucht. Da *RAS*-Mutationen seltener auftreten, sind Einschätzungen über die Tumoreigenschaften und die Prognose schwieriger, zudem liegen wenige aktuelle Daten vor.

PTCs haben im Allgemeinen eine gute Prognose. Ziel ist es, Marker zu identifizieren, die auf einen ungünstigen Verlauf hinweisen. Damit könnten die Fälle herausgefiltert werden, bei denen ein aggressiver Verlauf zu erwarten ist und dementsprechend die Therapie angepasst werden. Auf der anderen Seite kann es auch molekulare Alterationen geben, die einen eher günstigen Verlauf anzeigen.

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde bei 170 Patienten/Patientinnen mit PTCs der *RAS*-Mutationsstatus bestimmt. Der *BRAF*-Mutationsstatus und der *TERT*_p-Status lagen ebenfalls vor. Es konnte gezeigt werden, dass *RAS*-Mutationen häufiger im follikulären Subtyp und *BRAF*-Mutationen im klassischen Typ des PTCs vorkamen. Unter den *RAS*-Mutationen war die *NRAS*-Mutation am häufigsten vertreten, gefolgt von der *HRAS*- und der *KRAS*-Mutation. Bei vorliegender *RAS*-Mutation bestand kein erhöhtes Rezidivrisiko und kein Unterschied bezüglich des rezidivfreien Überlebens gegenüber den *RAS*-Wildtyp-Fällen. Ebenfalls bestand kein Zusammenhang mit einer Fernmetastasierung. Jedoch bestand eine leichte Tendenz zur Abwesenheit einer Lymphknotenmetastasierung. Zudem traten keine Radiojod-refraktären Krankheitsverläufe auf. Zusammenfassend konnten aggressive Tumoreigenschaften bei *RAS*-Mutationen nicht beobachtet werden. Es bestand ferner eine Tendenz zu einem weniger aggressiven Verlauf. Zwar bestand eine Tendenz zu einem größeren Tumordurchmesser, jedoch waren *RAS*-Mutationen nicht mit einer multifokalen Tumorerkrankung assoziiert. Vorausgesetzt der Tumor kann vollständig entfernt werden, kann eine Hemithyreoidektomie bei Vorliegen einer *RAS*-Mutation unter Voraussetzung eines Ausschlusses weiterer Indikationen für eine totale Hemithyreoidektomie eine adäquate chirurgische Therapieoption sein. Zudem ergaben sich keine Hinweise, dass eine prophylaktische Lymphadenektomie sinnvoll ist. Möglicherweise können PTCs mit *RAS*-Mutation in die Gruppe der Low risk Tumoren (Tabelle 6) eingeteilt werden, bei denen der minimale chirurgische Eingriff eine Hemithyreoidektomie darstellt. *BRAF*-Mutationen zeigten eine Assoziation mit multifokalem Tumorwachstum, sodass die Einteilung in die Gruppe der Tumoren mit Intermediate risk diskutiert werden kann (Tabelle 6). Bei der Gruppe der Intermediate risk Tumoren wird von der American Thyroid Association eine Thyreoidektomie als geeignete chirurgische Therapieoption angesehen (Patel, Yip et al. 2020).

Zudem wurden in der vorliegenden Arbeit bei einem Anteil des Fallkollektivs Genexpressionsanalysen unter Berücksichtigung des *BRAF*- und *TERT*_p-Mutationsstatus durchgeführt. Alle *TERT*_p-mutierten PTCs zeigten erwartungsgemäß eine mRNA-Expression des *TERT*-Gens. Ein Anteil der *TERT*_p-Wildtyp-Fälle wies ebenfalls eine *TERT*-Expression auf. Dies deutet darauf hin, dass andere Mechanismen außer einer *TERT*_p-Mutation zu einer *TERT*-Expression führen können. Bei *TERT*_p-mutierten/*TERT*-exprimierenden Fällen kam es häufiger zu Rezidiven und einer Radiojod-refraktären Erkrankung. Ferner konnte ein kürzeres rezidivfreies Überleben bei den *TERT*-exprimierenden gegenüber den nicht *TERT*-exprimierenden Fällen nachgewiesen werden. Die *TERT*-exprimierenden *TERT*_p-Wildtyp-

Fälle neigten jedoch nicht zu aggressiven Tumoreigenschaften, sodass die aggressiven Tumoreigenschaften nächstliegend auf die *TERT*-Mutation zurückzuführen waren. Es konnte keine eindeutige Assoziation zwischen einer *BRAF*-Mutation und der *GABPB1/2*-Expression beobachtet werden. Das Rezidivrisiko korrelierte nicht mit dem Ausmaß der *GADD45B*-Expression. Es ergab sich lediglich eine leichte Tendenz zur erhöhten Expression von *GADD45B* bei PTCs mit frühem Rezidiv, sodass sich *GADD45B* am vorliegenden Kollektiv nicht als klarer prognostischer Marker herausgestellt hat.

7 Ausblick

In den letzten Jahren haben sich in der WHO-Klassifikation bezüglich der Tumorentitäten einige Änderungen ergeben. In der neuesten WHO-Klassifikation (5. Edition) wurde der Tumor „Invasiver gekapselter follikulärer Subtyp des PTCs“ (IEFVPTC) als eigenständige Entität eingeführt. Er wird nicht unter der Kategorie PTC gelistet (Asa, Tuttle et al. 2022). Dieser Tumor weist eine hohe Frequenz an *RAS*-Mutationen auf (Rivera, Ricarte-Filho et al. 2010) und ist als Tumorentität insofern bedeutsam, da die Tumoreigenschaften trotz der typischen Kernkriterien eines PTCs eher denen eines FTCs entsprechen. Dazu gehören beispielsweise eine geringere Rate an Lymphknotenmetastasen und Ausbildung von Fernmetastasen unter Umgehung der Lymphknoten (Ganly, Wang et al. 2015). Es existieren wie bei einem FTC auch bei den IEFVPTC die Unterkategorien von minimal invasiv, gekapselt angioinvasiv und breit invasiv. Dieser Tumor nimmt somit eine Art Zwischenstellung zwischen einem FTC und einem PTC ein. Bei dem infiltrativen follikulären Subtyp des PTCs werden *BRAF*-Mutationen häufiger detektiert als *RAS*-Mutationen (Rivera, Ricarte-Filho et al. 2010). Bei der Klassifikation der Tumoren in der vorliegenden Studie wurde die zu dem jeweiligen Zeitpunkt gültige WHO-Klassifikation herangezogen, sodass möglicherweise Fälle, die heute in die Kategorie der IEFVPTC fallen würden, weiterhin unter der Entität eines PTCs mit follikulärem Subtyp geführt wurden. Studien, die die Tumoreigenschaften und Prognose eines PTCs inklusive seiner Subtypen mit der Entität eines IEFVPTC vergleicht, wären interessant und wünschenswert.

Auf Basis des Genexpressionsprofils lassen sich wie beschrieben PTCs im Grunde in zwei Gruppen einteilen, *BRAF*-ähnliche und *RAS*-ähnliche PTCs (Cancer Genome Atlas Research Network 2014). Lim, Lee et al. haben für diese beiden Gruppen die Mechanismen einer Tumorprogression untersucht und festgestellt, dass sich diese beiden Gruppen bezüglich der Mikroumgebung des Tumors unterscheiden (Lim, Lee et al. 2023). Bei der *BRAF*-ähnlichen Signatur spielen Veränderungen der extrazellulären Matrix und tumorassoziierte Fibroblasten eine Rolle, während bei der *RAS*-ähnlichen Signatur die Immunantwort und das Immunglobulinniveau reduziert sind (Lim, Lee et al. 2023). Das Verständnis über unterschiedliche Progressionsmechanismen kann vor allem bei therapierefraktären PTCs für eine Therapie entscheidend sein, diese sind bislang jedoch nicht vollständig geklärt (Lim, Lee et al. 2023).

Wie bereits beschrieben, ist offenbar die Tumormorphologie bei *RAS*- und *BRAF*-Mutationen unterschiedlich. *RAS*-Mutationen waren mit einem follikulären Wachstumsmuster und *BRAF*-Mutationen mit einem klassischen papillären Wachstum assoziiert. Hier bieten sich vor allem weitere Forschungsmöglichkeiten im Feld der künstlichen Intelligenz (KI). Möglicherweise lassen sich vorliegende Mutationen im Tumorgewebe anhand des histomorphologischen Erscheinungsbildes über ein KI-gestütztes Verfahren vorhersagen (Jurmeister, Bockmayr et al. 2019, Förtsch, Klauschen et al. 2021). Die Ansätze zur Risikostratifizierung beschränken sich zudem nicht mehr allein auf die Histologie und den Mutationsstatus einzelner Gene, sondern schließen ganze Genexpressionsprofile ein (Craig, Stretch et al. 2023). Auch könnten zukünftig ganze Genexpressionsprofile in Zusammenschau mit der Morphologie mittels

Maschinellem Lernen analysiert werden und möglicherweise Vorhersagen bezüglich einer Prognose gegeben werden. Die zu verarbeitenden Datenmengen wären hier immens. Voraussetzung für solch eine Analyse wäre ein tiefes informatisches, medizinisches und biologisches Wissen.

Ferner wäre es interessant zu untersuchen, ob sich die Tumorcharakteristika bei Mutationen der verschiedenen *RAS*-Isoformen (*NRAS*, *HRAS* und *KRAS*) unterscheiden. Studien weisen darauf hin, dass sich Unterschiede bei den unterschiedlichen *RAS*-Isoformen in der Zytologie ergeben (Radkay, Chiosea et al. 2014). Inwiefern sich die *RAS*-Mutationen der Isoformen bei den PTCs unterscheiden, ist noch nicht abschließend geklärt. Dies konnte aufgrund der geringen Fallanzahl an *RAS*-Mutationen in der vorliegenden Studie nicht suffizient beurteilt werden.

Basierend auf dem genetischen Profil sind in anderen malignen Erkrankungen wie beispielsweise nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen zielgerichtete Therapien bereits etabliert und können zu einem verbesserten Gesamtüberleben und rezidivfreien Überleben führen (Zhou and Li 2022). Eine Radiojod-refraktäre Tumorerkrankung stellt eine besondere therapeutische Herausforderung beim fortgeschrittenen PTC dar. In solchen Fällen ist die Anwendung der Proteinkinase-Inhibitoren Lenvatinib und Sorafenib von der Food and Drug Administration (FDA) (National Cancer Institute 2021) und der European Medical Agency (EMA) (European Medicines Agency 2014, European Medicines Agency 2021) zugelassen. Es ist beschrieben, dass Inhibitoren des MAPK-Signalwegs die Expression von in den Jodid-Metabolismus involvierten Genen (Liu, Hu et al. 2007) und die Aufnahme von Radiojod erhöhen können und somit einer Radiojod-refraktären Erkrankung entgegengewirkt werden kann (Ho, Grewal et al. 2013). Dies spielt vor allem bei *BRAF*-Mutationen eine Rolle, da in der Literatur die *BRAF*^{V600E}-Mutation ein Risikofaktor für eine Radiojod-refraktäre Erkrankung darstellt (Luo, Jiang et al. 2020). Selektive *BRAF*-Inhibitoren wie Vemurafenib, Dabrafenib und Cobimetinib, die auf die *BRAF*^{V600E}-Mutation zielen, sind bisher nicht für Schilddrüsenkarzinome, sondern zur Behandlung bei malignen Melanomen zugelassen (European Medicines Agency 2015, European Medicines Agency 2018a, European Medicines Agency 2018b, National Cancer Institute 2021, Avram, Giovanella et al. 2022). In einer Studie von Hescheler, Riemann et al. wurde in einer *in silico* Analyse ein hohes Therapieansprechen auf die selektiven *BRAF*-Inhibitoren, vor allem bei dem klassischen Typ und großzelligen Subtyp des PTCs vorhergesagt (Hescheler, Riemann et al. 2021), sodass sich hieraus zukünftig möglicherweise neue Behandlungsstrategien ergeben werden. Auch sind Studien zur Anwendung von Vemurafenib bei Patienten/Patientinnen mit *BRAF*^{V600E}-mutierten PTCs bereits durchgeführt worden (Brose, Cabanillas et al. 2016, Tsumagari, Abd Elmageed et al. 2018). Zurzeit sind keine Substanzen von der FDA zugelassen, die auf die PTC-spezifischen *NRAS*-, *HRAS*- oder *KRAS*-Mutationen zielen (Hescheler, Riemann et al. 2021). Die Untersuchung von selektiven *RAS*-Inhibitoren kann ein weiteres Forschungsfeld darstellen.

Auch eine mögliche Inhibition der *TERT*-Expression bei *TERT*_p-mutierten Tumoren wurde bereits *in vitro* untersucht. In Glioblastomzellen konnte bei einem Knockdown der *TERT*-Expression ein Verlust der proliferativen Aktivität festgestellt werden (Aquilanti, Kageler et al. 2023). Und auch in Schilddrüsenkarzinomzellen wurde durch pharmakologische Inhibition eine Herunterregulierung der *TERT*-Expression erreicht (Maggisano, Celano et al. 2019). Die systemische therapeutische Anwendung eines *TERT*-Inhibitors beim Menschen stellt jedoch Herausforderungen dar, da die Telomerase nicht nur im Tumorgewebe, sondern auch physiologisch beispielsweise in Stammzellen exprimiert wird (Hastie, Dempster et al. 1990, Shay and Wright 2010) und eine wichtige Funktion einnimmt. Da *GABPB* laut Literatur die *TERT*-Expression fördert, wurde auch die Inhibition von *GABPB* als mögliche Therapiestrategie für *TERT*_p-mutierte Tumoren bereits diskutiert (Mancini, Xavier-Magalhães et al. 2018). Allerdings wurde in Schilddrüsenkarzinomen auch eine Tumorsuppressorfunktion

entdeckt (Xing, Mu et al. 2022), sodass hier eine therapeutische Inhibition von *GABPB* nicht zweckmäßig erscheint. Die Rolle von *GABPB* im Zusammenspiel mit den zellulären Signalwegen und dessen Regulation lässt zudem Fragen offen.

Die vorliegende Arbeit mit molekularpathologischen Untersuchungen von Schilddrüsenkarzinomen eines Fallkollektivs der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der UM kann als wichtiger Baustein betrachtet werden zur Erforschung der komplexen Zusammenhänge zwischen Tumorbiologie und individualisierter Behandlung. Diese sollte zur weiteren Optimierung der Diagnostik und Überlebensqualität für Patienten und Patientinnen mit papillären Schilddrüsenkarzinomen dienen, insbesondere deshalb, weil diese Tumoren bei Menschen jeder Altersklasse vorkommen können.

8 Literaturverzeichnis

- Adeniran, A. J., P. Hui, D. C. Chhieng, M. L. Prasad, K. Schofield and C. Theoharis (2011). BRAF mutation testing of thyroid fine-needle aspiration specimens enhances the predictability of malignancy in thyroid follicular lesions of undetermined significance. *Acta Cytol* 55(6): 570-575.
- Adeniran, A. J., Z. Zhu, M. Gandhi, D. L. Steward, J. P. Fidler, T. J. Giordano, P. W. Biddinger and Y. E. Nikiforov (2006). Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol* 30(2): 216-222.
- Akincilar, S. C., B. Unal and V. Tergaonkar (2016). Reactivation of telomerase in cancer. *Cell Mol Life Sci* 73(8): 1659-1670.
- Albores-Saavedra, J., E. Gould, C. Vardaman and F. Vuitch (1991). The macrofollicular variant of papillary thyroid carcinoma: a study of 17 cases. *Hum Pathol* 22(12): 1195-1205.
- Alzumaili, B. and P. M. Sadow (2023). Update on Molecular Diagnostics in Thyroid Pathology: A Review. *Genes (Basel)* 14(7).
- Aquilanti, E., L. Kageler, J. Watson, D. M. Baird, R. E. Jones, M. Hodges, Z. M. Szegletes, J. G. Doench, C. A. Strathdee, J. R. M. F. Figueroa, K. L. Ligon, M. Beck, P. Y. Wen and M. Meyerson (2023). Telomerase inhibition is an effective therapeutic strategy in TERT promoter-mutant glioblastoma models with low tumor volume. *Neuro-Oncology* 25(7): 1275-1285.
- Araque, K. A., S. Gubbi and J. Klubo-Gwiedzinska (2020). Updates on the Management of Thyroid Cancer. *Horm Metab Res* 52(8): 562-577.
- Arnemann, J. (2019). Next-Generation-Sequencing (NGS). Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. A. M. Gressner and T. Arndt. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 1746-1747.
- Arora, N., H. K. Turbendian, M. A. Kato, T. A. Moo, R. Zarnegar and T. J. Fahey, 3rd (2009). Papillary thyroid carcinoma and microcarcinoma: is there a need to distinguish the two? *Thyroid* 19(5): 473-477.
- Asa, S. L., R. M. Tuttle and C. Durante (2022). WHO Classification of Tumours online - Endocrine and Neuroendocrine Tumours (5th ed.) - Thyroid tumours - Thyroid tumours: Introduction [Internet]. International Agency for Research on Cancer. Zitiert am 21.10.2023. Erhältlich: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chaptercontent/53/32>.
- Ascierto, P. A., J. M. Kirkwood, J. J. Grob, E. Simeone, A. M. Grimaldi, M. Maio, G. Palmieri, A. Testori, F. M. Marincola and N. Mozzillo (2012). The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J Transl Med* 10: 85.
- Asioli, S., L. A. Erickson, A. Righi and R. V. Lloyd (2013). Papillary thyroid carcinoma with hobnail features: histopathologic criteria to predict aggressive behavior. *Hum Pathol* 44(3): 320-328.
- Asioli, S., L. A. Erickson, T. J. Sebo, J. Zhang, L. Jin, G. B. Thompson and R. V. Lloyd (2010). Papillary thyroid carcinoma with prominent hobnail features: a new aggressive variant of moderately differentiated papillary carcinoma. A clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular study of eight cases. *Am J Surg Pathol* 34(1): 44-52.
- Avram, A. M., L. Giovanella, B. Greenspan, S. A. Lawson, M. Luster, D. Van Nostrand, J. G. Peacock, P. P. Ovčariček, E. Silberstein, M. Tulchinsky, F. A. Verburg and A. Vrachimis (2022). SNMMI Procedure Standard/EANM Practice Guideline for Nuclear Medicine Evaluation and Therapy of Differentiated Thyroid Cancer: Abbreviated Version. *J Nucl Med* 63(6): 15n-35n.

- AWMF online, P. d. w. M. (2018). S3-Leitlinie Schilddrüsenkarzinom [Internet]. Zitiert am 15.02.2024. Erhältlich: <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/031-056OL>.
- Baloch, Z. W., S. L. Asa, J. A. Barletta, R. A. Ghossein, C. C. Juhlin, C. K. Jung, V. A. LiVolsi, M. G. Papotti, M. Sobrinho-Simoes, G. Tallini and O. Mete (2022). Overview of the 2022 WHO Classification of Thyroid Neoplasms. *Endocr Pathol* 33(1): 27-63.
- Baloch, Z. W. and V. A. LiVolsi (1998). Fine-Needle Aspiration Cytology of Papillary Hurthle Cell Carcinoma with Lymphocytic Stroma "Warthin-Like Tumor" of the Thyroid. *Endocr Pathol* 9(1): 317-323.
- Baloch, Z. W. and V. A. LiVolsi (2002). Etiology and significance of the optically clear nucleus. *Endocr Pathol* 13(4): 289-299.
- Baloch, Z. W., O. Mete, G. Fadda, K. Kakudo, T. Kondo, V. LiVolsi, S. Piana, P. Sadow, M. Bongiovanni, J. Barletta and C. K. Jung (2022). WHO Classification of Tumours online - Endocrine and Neuroendocrine Tumours (5th ed.) - Thyroid tumours - Follicular cell-derived neoplasms - Malignant neoplasms - Papillary thyroid carcinoma [Internet]. International Agency for Research on Cancer. Zitiert am 03.02.2024. Erhältlich: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chaptercontent/53/44>.
- Barletta, J., G. Fadda, K. Kakudo, T. Kondo, V. LiVolsi, S. L. Asa, C. K. Jung and C. C. Juhlin (2022). WHO Classification of Tumours online - Endocrine and Neuroendocrine Tumours (5th ed.) - Thyroid tumours - Follicular cell-derived neoplasms - Malignant neoplasms - Follicular thyroid carcinoma [Internet]. International Agency for Research on Cancer. Zitiert am 03.02.2024. Erhältlich: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chaptercontent/53/45>.
- Barros-Filho, M. C., J. B. H. de Mello, F. A. Marchi, C. A. L. Pinto, I. C. da Silva, P. K. F. Damasceno, M. B. P. Soares, L. P. Kowalski and S. R. Rogatto (2020). GADD45B Transcript Is a Prognostic Marker in Papillary Thyroid Carcinoma Patients Treated With Total Thyroidectomy and Radioiodine Therapy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 11: 269.
- Basolo, F., F. Pisaturo, L. E. Pollina, G. Fontanini, R. Elisei, E. Molinaro, P. Iacconi, P. Miccoli and F. Pacini (2000). N-ras mutation in poorly differentiated thyroid carcinomas: correlation with bone metastases and inverse correlation to thyroglobulin expression. *Thyroid* 10(1): 19-23.
- Bauer, J., N. Cuvelier, N. Ragab, K. Simon-Keller, F. Nitzki, N. Geyer, D. S. Botermann, D. P. Elmer, A. Rosenberger, T. A. Rando, S. Biressi, J. A. Fagin, D. Saur, C. Dullin, H. U. Schildhaus, W. Schulz-Schaeffer, F. Aberger, A. Uhmann and H. Hahn (2021). Context-dependent modulation of aggressiveness of pediatric tumors by individual oncogenic RAS isoforms. *Oncogene* 40(31): 4955-4966.
- Berho, M. and S. Suster (1997). The oncocytic variant of papillary carcinoma of the thyroid: a clinicopathologic study of 15 cases. *Hum Pathol* 28(1): 47-53.
- Bikas, A., S. Ahmadi, T. Pappa, E. Marqusee, K. Wong, M. A. Nehs, N. L. Cho, J. Haase, G. M. Doherty, K. Sehgal, J. A. Barletta, E. K. Alexander and I. Landa (2023). Additional Oncogenic Alterations in RAS-Driven Differentiated Thyroid Cancers Associate with Worse Clinicopathologic Outcomes. *Clin Cancer Res* 29(14): 2678-2685.
- Brito, J. P., Y. Ito, A. Miyauchi and R. M. Tuttle (2016). A Clinical Framework to Facilitate Risk Stratification When Considering an Active Surveillance Alternative to Immediate Biopsy and Surgery in Papillary Microcarcinoma. *Thyroid* 26(1): 144-149.
- Brose, M. S., M. E. Cabanillas, E. E. Cohen, L. J. Wirth, T. Riehl, H. Yue, S. I. Sherman and E. J. Sherman (2016). Vemurafenib in patients with BRAF(V600E)-positive metastatic or unresectable papillary thyroid cancer refractory to radioactive iodine: a non-randomised, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 17(9): 1272-1282.

- Bullock, M., G. Lim, Y. Zhu, H. Åberg, S. Kurdyukov and R. Clifton-Bligh (2019). ETS Factor ETV5 Activates the Mutant Telomerase Reverse Transcriptase Promoter in Thyroid Cancer. *Thyroid* 29(11): 1623-1633.
- Bullock, M., Y. Ren, C. O'Neill, A. Gill, A. Aniss, M. Sywak, S. Sidhu, L. Delbridge, D. Learoyd, F. de Vathaire, B. G. Robinson and R. J. Clifton-Bligh (2016). TERT promoter mutations are a major indicator of recurrence and death due to papillary thyroid carcinomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 85(2): 283-290.
- Büttner, M., L. D. Locati, M. Pinto, C. Araújo, I. M. Tomaszewska, N. Kiyota, E. Vidhubala, C. Brannan, E. Hammerlid, O. Husson, D. Salem, G. Ioannidis, E. Gamper, J. I. Arraras, G. Andry, J. Inhestern, J. Theurer, K. Taylor and S. Singer (2020). Quality of Life in Patients With Hypoparathyroidism After Treatment for Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 105(12).
- Cameselle-Teijeiro, J. and J. K. Chan (1999). Cribriform-morular variant of papillary carcinoma: a distinctive variant representing the sporadic counterpart of familial adenomatous polyposis-associated thyroid carcinoma? *Mod Pathol* 12(4): 400-411.
- Cancer Genome Atlas Research Network (2014). Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell* 159(3): 676-690.
- Cantwell-Dorris, E. R., J. J. O'Leary and O. M. Sheils (2011). BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy. *Mol Cancer Ther* 10(3): 385-394.
- Cao, J., X. Zhu, Y. Sun, X. Li, C. Yun and W. Zhang (2022). The genetic duet of BRAF V600E and TERT promoter mutations predicts the poor curative effect of radioiodine therapy in papillary thyroid cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 49(10): 3470-3481.
- Carcangiu, M. L., G. Zampi, A. Pupi, A. Castagnoli and J. Rosai (1985). Papillary carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic study of 241 cases treated at the University of Florence, Italy. *Cancer* 55(4): 805-828.
- Castro, P., A. P. Rebocho, R. J. Soares, J. Magalhães, L. Roque, V. Trovisco, I. Vieira de Castro, M. Cardoso-de-Oliveira, E. Fonseca, P. Soares and M. Sobrinho-Simões (2006). PAX8-PPARgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 91(1): 213-220.
- Chaires, J. B., J. O. Trent, R. D. Gray, W. L. Dean, R. Buscaglia, S. D. Thomas and D. M. Miller (2014). An improved model for the hTERT promoter quadruplex. *PLoS One* 9(12): e115580.
- Chan, B. K., T. S. Desser, I. R. McDougall, R. J. Weigel and R. B. Jeffrey, Jr. (2003). Common and uncommon sonographic features of papillary thyroid carcinoma. *J Ultrasound Med* 22(10): 1083-1090.
- Chan, J. K., M. L. Carcangiu and J. Rosai (1991). Papillary carcinoma of thyroid with exuberant nodular fasciitis-like stroma. Report of three cases. *Am J Clin Pathol* 95(3): 309-314.
- Chan, J. K. and W. Y. Tsang (1995). Endocrine malignancies that may mimic benign lesions. *Semin Diagn Pathol* 12(1): 45-63.
- Chan, J. K., M. S. Tsui and C. H. Tse (1987). Diffuse sclerosing variant of papillary carcinoma of the thyroid: a histological and immunohistochemical study of three cases. *Histopathology* 11(2): 191-201.
- Chan, S., K. Karamali, A. Kolodziejczyk, G. Oikonomou, J. Watkinson, V. Paleri, I. Nixon and D. Kim (2020). Systematic Review of Recurrence Rate after Hemithyroidectomy for Low-Risk Well-Differentiated Thyroid Cancer. *Eur Thyroid J* 9(2): 73-84.
- Chang, M. T., T. S. Bhattarai, A. M. Schram, C. M. Bielski, M. T. A. Donoghue, P. Jonsson, D. Chakravarty, S. Phillips, C. Kandoth, A. Penson, A. Gorelick, T. Shamu, S. Patel, C. Harris, J. Gao, S. O. Sumer, R. Kundra, P. Razavi, B. T. Li, D. N. Reales, N. D. Socci,

- G. Jayakumaran, A. Zehir, R. Benayed, M. E. Arcila, S. Chandarlapaty, M. Ladanyi, N. Schultz, J. Baselga, M. F. Berger, N. Rosen, D. B. Solit, D. M. Hyman and B. S. Taylor (2018). Accelerating Discovery of Functional Mutant Alleles in Cancer. *Cancer Discov* 8(2): 174-183.
- Cheng, T. C., G. Manorek, G. Samimi, X. Lin, C. C. Berry and S. B. Howell (2006). Identification of genes whose expression is associated with cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 58(3): 384-395.
- Cheng, X., Y. Zhou, S. Xu, H. Yu, J. Wu, J. Bao and L. Zhang (2023). Risk-stratified Distant Metastatic Thyroid Cancer with Clinicopathological Factors and BRAF/TERT Promoter Mutations. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 131(11): 577-582.
- Chiba, T. (2024). Molecular Pathology of Thyroid Tumors: Essential Points to Comprehend Regarding the Latest WHO Classification. *Biomedicines* 12(4).
- Christofer Juhlin, C., O. Mete and Z. W. Baloch (2023). The 2022 WHO classification of thyroid tumors: novel concepts in nomenclature and grading. *Endocr Relat Cancer* 30(2).
- Corrado, S., S. M. Corsello, A. Maiorana, E. D. Rossi, A. Pontecorvi, G. Fadda and G. Papi (2014). Papillary thyroid carcinoma with predominant spindle cell component: report of two rare cases and discussion on the differential diagnosis with other spindled thyroid neoplasm. *Endocr Pathol* 25(3): 307-314.
- COSMIC (2024a). view of mutations across NRAS [Internet]. Zitiert am 01.02.2024. Erhältlich: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?hn=&ln=NRAS&sh=&sn=thyroid&ss=>.
- COSMIC (2024b). view of mutations across HRAS [Internet]. Zitiert am 01.02.2024. Erhältlich: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?hn=&ln=HRAS&sh=&sn=thyroid&ss=>.
- COSMIC (2024c). view of mutations across KRAS [Internet]. Zitiert am 01.02.2024. Erhältlich: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?hn=&ln=KRAS&sh=&sn=thyroid&ss=>.
- COSMIC (2024d). view of mutations across BRAF [Internet]. Zitiert am 01.02.2024. Erhältlich: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?hn=&ln=BRAF&sh=&sn=thyroid&ss=>.
- Craig, S., C. Stretch, F. Farshidfar, D. Sheka, N. Alabi, A. Siddiqui, K. Kopciuk, Y. J. Park, M. Khalil, F. Khan, A. Harvey and O. F. Bathe (2023). A clinically useful and biologically informative genomic classifier for papillary thyroid cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 14: 1220617.
- Dal Maso, L., C. Bosetti, C. La Vecchia and S. Franceschi (2009). Risk factors for thyroid cancer: an epidemiological review focused on nutritional factors. *Cancer Causes & Control* 20(1): 75-86.
- de la Brousse, F. C., E. H. Birkenmeier, D. S. King, L. B. Rowe and S. L. McKnight (1994). Molecular and genetic characterization of GABP beta. *Genes Dev* 8(15): 1853-1865.
- Deeken-Draisey, A., G. Y. Yang, J. Gao and B. A. Alexiev (2018). Anaplastic thyroid carcinoma: an epidemiologic, histologic, immunohistochemical, and molecular single-institution study. *Hum Pathol* 82: 140-148.
- DeLellis, R. A. (1993). Orphan Annie eye nuclei: a historical note. *Am J Surg Pathol* 17(10): 1067-1068.
- Di Cristofaro, J., M. Marcy, V. Vasko, F. Sebag, N. Fakhry, D. Wynford-Thomas and C. De Micco (2006). Molecular genetic study comparing follicular variant versus classic papillary thyroid carcinomas: association of N-ras mutation in codon 61 with follicular variant. *Hum Pathol* 37(7): 824-830.

- Do, H., D. Kim, J. Kang, B. Son, D. Seo, H. Youn, B. Youn and W. Kim (2019). TFAP2C increases cell proliferation by downregulating GADD45B and PMAIP1 in non-small cell lung cancer cells. *Biological Research* 52(1): 35.
- Dralle, H., T. J. Musholt, J. Schabram, T. Steinmüller, A. Frilling, D. Simon, P. E. Goretzki, B. Niederle, C. Scheuba, T. Clerici, M. Hermann, J. Kußmann, K. Lorenz, C. Nies, P. Schabram, A. Trupka, A. Zielke, W. Karges, M. Luster, K. W. Schmid, D. Vordermark, H.-J. Schmoll, R. Mühlenberg, O. Schober, H. Rimmele, A. Machens, G. for the German Societies of, S. Visceral, Endocrinology, M. Nuclear, Pathology, Radiooncology, H. Oncological and V. the German Thyroid Cancer Patient Support Organization Ohne Schilddrüse leben e (2013). German Association of Endocrine Surgeons practice guideline for the surgical management of malignant thyroid tumors. *Langenbeck's Archives of Surgery* 398(3): 347-375.
- Dralle, H., F. Weber, A. Machens, T. Brandenburg, K. W. Schmid and D. Führer-Sakel (2023). Hemithyreoidektomie oder totale Thyreoidektomie beim papillären Niedrigrisikokarzinom der Schilddrüse? *Die Chirurgie* 94(1): 79-92.
- Durante, C., E. Puxeddu, E. Ferretti, R. Morisi, S. Moretti, R. Bruno, F. Barbi, N. Avenia, A. Scipioni, A. Verrienti, E. Tosi, A. Cavaliere, A. Gulino, S. Filetti and D. Russo (2007). BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 92(7): 2840-2843.
- Edge, S. B. and C. C. Compton (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. *Annals of Surgical Oncology* 17(6): 1471-1474.
- Esapa, C. T., S. J. Johnson, P. Kendall-Taylor, T. W. Lennard and P. E. Harris (1999). Prevalence of Ras mutations in thyroid neoplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 50(4): 529-535.
- European Medicines Agency (2014). Nexavar - sorafenib [Internet]. 05/2014. Zitiert am 16.05.2024, EMA/347706/2014. Erhältlich: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/nexavar-epar-summary-public_en.pdf.
- European Medicines Agency (2015). Cotellic - cobimetinib [Internet]. 11/2015. Zitiert am 16.05.2024, EMA/635489/2015. Erhältlich: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/cotellic-epar-summary-public_en.pdf.
- European Medicines Agency (2018a). Zelboraf (vemurafenib) - An overview of Zelboraf and why it is authorised in the EU [Internet]. 02/2018. Zitiert am 16.05.2024, EMA/107042/2018. Erhältlich: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/zelboraf-epar-summary-public_en.pdf.
- European Medicines Agency (2018b). Tafinlar (dabrafenib) - An overview of Tafinlar and why it is authorised in the EU [Internet]. 08/2018. Zitiert am 16.05.2024, EMA/612087/2018. Erhältlich: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/tafinlar-epar-medicine-overview_en.pdf.
- European Medicines Agency (2021). Lenvima (lenvatinib) - An overview of Lenvima and why it is authorised in the EU [Internet]. 11/2021. Zitiert am 16.05.2024, EMA/694337/2021. Erhältlich: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/lenvima>.
- Evans, H. L. (1987). Encapsulated papillary neoplasms of the thyroid. A study of 14 cases followed for a minimum of 10 years. *Am J Surg Pathol* 11(8): 592-597.
- Ferrari, S. M., P. Fallahi, I. Ruffilli, G. Elia, F. Ragusa, S. R. Paparo, S. Ulisse, E. Baldini, R. Giannini, P. Miccoli, A. Antonelli and F. Basolo (2018). Molecular testing in the diagnosis of differentiated thyroid carcinomas. *Gland Surg* 7(Suppl 1): S19-s29.

- Forbes, S. A., D. Beare, H. Boutselakis, S. Bamford, N. Bindal, J. Tate, C. G. Cole, S. Ward, E. Dawson, L. Ponting, R. Stefancsik, B. Harsha, C. Y. Kok, M. Jia, H. Jubb, Z. Sondka, S. Thompson, T. De and P. J. Campbell (2016). COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Research* 45(D1): D777-D783.
- Försch, S., F. Klauschen, P. Hufnagl and W. Roth (2021). Künstliche Intelligenz in der Pathologie. *Dtsch Arztebl International* 118(12): 199-204.
- Franssila, K. O. (1973). Is the differentiation between papillary and follicular thyroid carcinoma valid? *Cancer* 32(4): 853-864.
- Frey, S., L. Figueres, F. Pattou, M. Le Bras, C. Caillard, M. Mathonnet, A. Hamy, L. Brunaud, J. C. Lifante, C. Trésallet, F. Sebag, F. Menegaux, C. Blanchard, M. Leroy and E. Mirallié (2021). Impact of Permanent Post-thyroidectomy Hypoparathyroidism on Self-evaluation of Quality of Life and Voice: Results From the National QoL-Hypopara Study. *Ann Surg* 274(5): 851-858.
- Fruth, K. (2010). Epidemiologie und Ätiologie des Schilddrüsenkarzinoms. *TumorDiagnostik & Therapie* 31(01): 12-14.
- Fujimoto, Y., T. Obara, Y. Ito, T. Kodama, M. Aiba and K. Yamaguchi (1990). Diffuse sclerosing variant of papillary carcinoma of the thyroid. Clinical importance, surgical treatment, and follow-up study. *Cancer* 66(11): 2306-2312.
- Fukahori, M., A. Yoshida, H. Hayashi, M. Yoshihara, S. Matsukuma, Y. Sakuma, S. Koizume, N. Okamoto, T. Kondo, M. Masuda and Y. Miyagi (2012). The associations between RAS mutations and clinical characteristics in follicular thyroid tumors: new insights from a single center and a large patient cohort. *Thyroid* 22(7): 683-689.
- Fukushima, M., Y. Ito, M. Hirokawa, H. Akasu, K. Shimizu and A. Miyauchi (2009). Clinicopathologic characteristics and prognosis of diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma in Japan: an 18-year experience at a single institution. *World J Surg* 33(5): 958-962.
- Ganly, I., T. Ibrahimasic, M. Rivera, I. Nixon, F. Palmer, S. G. Patel, R. M. Tuttle, J. P. Shah and R. Ghossein (2014). Prognostic implications of papillary thyroid carcinoma with tall-cell features. *Thyroid* 24(4): 662-670.
- Ganly, I., L. Wang, R. M. Tuttle, N. Katabi, G. A. Ceballos, H. R. Harach and R. Ghossein (2015). Invasion rather than nuclear features correlates with outcome in encapsulated follicular tumors: further evidence for the reclassification of the encapsulated papillary thyroid carcinoma follicular variant. *Hum Pathol* 46(5): 657-664.
- Garcia-Rostan, G., H. Zhao, R. L. Camp, M. Pollan, A. Herrero, J. Pardo, R. Wu, M. L. Carcangiu, J. Costa and G. Tallini (2003). ras Mutations Are Associated With Aggressive Tumor Phenotypes and Poor Prognosis in Thyroid Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 21(17): 3226-3235.
- Gay-Bellile, M., L. Véronèse, P. Combes, E. Eymard-Pierre, F. Kwiatkowski, M. M. Dauplat, A. Cayre, M. Privat, C. Abrial, Y. J. Bignon, M. A. Mouret-Reynier, P. Vago, F. Penault-Llorca and A. Tchirkov (2017). TERT promoter status and gene copy number gains: effect on TERT expression and association with prognosis in breast cancer. *Oncotarget* 8(44): 77540-77551.
- Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Herausgeber), R. K.-I. (2023a). Krebs in Deutschland für 2019/2020. Krebs in Deutschland, Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 14. Ausgabe: 16 f.
- Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Herausgeber), R. K.-I. (2023b). Krebs in Deutschland für 2019/2020. Krebs in Deutschland, Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 14. Ausgabe: 118-121.

- Ghossein, R. and V. A. Livolsi (2008). Papillary thyroid carcinoma tall cell variant. *Thyroid* 18(11): 1179-1181.
- Gianoukakis, A. G., S. M. Giannelli, W. A. Salameh and L. W. McPhaul (2011). Well differentiated follicular thyroid neoplasia: Impact of molecular and technological advances on detection, monitoring and treatment. *Molecular and Cellular Endocrinology* 332(1): 9-20.
- Ginter, P. S. and T. Scognamiglio (2015). Papillary thyroid carcinoma with nodular fasciitis-like stroma: a usual entity with distinctive morphology. *Int J Surg Pathol* 23(4): 305-307.
- Gomez, D. E., R. G. Armando, H. G. Farina, P. L. Menna, C. S. Cerrudo, P. D. Ghiringhelli and D. F. Alonso (2012). Telomere structure and telomerase in health and disease (review). *Int J Oncol* 41(5): 1561-1569.
- Gong, L., L. Cai, G. Li, J. Cai and X. Yi (2021). GADD45B Facilitates Metastasis of Ovarian Cancer Through Epithelial-Mesenchymal Transition. *Onco Targets Ther* 14: 255-269.
- Gray, A. and I. Doniach (1969). Morphology of the nuclei of papillary carcinoma of the thyroid. *Br J Cancer* 23(1): 49-51.
- Grueter, G. E. and R. A. DeLellis (1996). Multinucleate giant cells in papillary thyroid carcinoma. A morphologic and immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol* 106(6): 765-768.
- Gupta, N., A. K. Dasyam, S. E. Carty, M. N. Nikiforova, N. P. Ohori, M. Armstrong, L. Yip, S. O. LeBeau, K. L. McCoy, C. Coyne, M. T. Stang, J. Johnson, R. L. Ferris, R. Seethala, Y. E. Nikiforov and S. P. Hodak (2013). RAS mutations in thyroid FNA specimens are highly predictive of predominantly low-risk follicular-pattern cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 98(5): E914-922.
- Gupta, S., O. Ajise, L. Dultz, B. Wang, D. Nonaka, J. Ogilvie, K. S. Heller and K. N. Patel (2012). Follicular variant of papillary thyroid cancer: encapsulated, nonencapsulated, and diffuse: distinct biologic and clinical entities. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 138(3): 227-233.
- Hara, H., N. Fulton, T. Yashiro, K. Ito, L. J. DeGroot and E. L. Kaplan (1994). N-ras mutation: an independent prognostic factor for aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. *Surgery* 116(6): 1010-1016.
- Harach, H. R., G. T. Williams and E. D. Williams (1994). Familial adenomatous polyposis associated thyroid carcinoma: a distinct type of follicular cell neoplasm. *Histopathology* 25(6): 549-561.
- Harahap, A. S., I. Subekti, S. S. Panigoro, Asmarinah, Lisnawati, R. A. Werdhani, H. Agustina, D. Khoirunnisa, M. Mutmainnah, Salinah, A. D. Siswoyo and M. F. Ham (2023). Profile of BRAFV600E, BRAFK601E, NRAS, HRAS, and KRAS Mutational Status, and Clinicopathological Characteristics of Papillary Thyroid Carcinoma in Indonesian National Referral Hospital. *Appl Clin Genet* 16: 99-110.
- Hastie, N. D., M. Dempster, M. G. Dunlop, A. M. Thompson, D. K. Green and R. C. Allshire (1990). Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 346(6287): 866-868.
- Haugen, B. R., E. K. Alexander, K. C. Bible, G. M. Doherty, S. J. Mandel, Y. E. Nikiforov, F. Pacini, G. W. Randolph, A. M. Sawka, M. Schlumberger, K. G. Schuff, S. I. Sherman, J. A. Sosa, D. L. Steward, R. M. Tuttle and L. Wartofsky (2016). 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* 26(1): 1-133.
- Hescheler, D. A., B. Riemann, M. J. M. Hartmann, M. Michel, M. Faust, C. J. Bruns, H. Alakus and C. Chiapponi (2021). Targeted Therapy of Papillary Thyroid Cancer: A Comprehensive Genomic Analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 12: 748941.

- Ho, A. L., R. K. Grewal, R. Leboeuf, E. J. Sherman, D. G. Pfister, D. Deandreis, K. S. Pentlow, P. B. Zanzonico, S. Haque, S. Gavane, R. A. Ghossein, J. C. Ricarte-Filho, J. M. Domínguez, R. Shen, R. M. Tuttle, S. M. Larson and J. A. Fagin (2013). Selumetinib-enhanced radioiodine uptake in advanced thyroid cancer. *N Engl J Med* 368(7): 623-632.
- Hobbs, G. A., C. J. Der and K. L. Rossman (2016). RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *J Cell Sci* 129(7): 1287-1292.
- Hofman, V., S. Lassalle, C. Bonnetaud, C. Butori, C. Loubatier, M. Ilie, O. Bordone, P. Brest, N. Guevara, J. Santini, B. Franc and P. Hofman (2009). Thyroid tumours of uncertain malignant potential: frequency and diagnostic reproducibility. *Virchows Arch* 455(1): 21-33.
- Horn, S., A. Figl, P. S. Rachakonda, C. Fischer, A. Sucker, A. Gast, S. Kadel, I. Moll, E. Nagore, K. Hemminki, D. Schadendorf and R. Kumar (2013). TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science* 339(6122): 959-961.
- Howell, G. M., S. P. Hodak and L. Yip (2013). RAS mutations in thyroid cancer. *Oncologist* 18(8): 926-932.
- Huang, D. S., Z. Wang, X. J. He, B. H. Diplas, R. Yang, P. J. Killela, Q. Meng, Z. Y. Ye, W. Wang, X. T. Jiang, L. Xu, X. L. He, Z. S. Zhao, W. J. Xu, H. J. Wang, Y. Y. Ma, Y. J. Xia, L. Li, R. X. Zhang, T. Jin, Z. K. Zhao, J. Xu, S. Yu, F. Wu, J. Liang, S. Wang, Y. Jiao, H. Yan and H. Q. Tao (2015). Recurrent TERT promoter mutations identified in a large-scale study of multiple tumour types are associated with increased TERT expression and telomerase activation. *Eur J Cancer* 51(8): 969-976.
- Hughes, D. T., M. R. Haymart, B. S. Miller, P. G. Gauger and G. M. Doherty (2011). The most commonly occurring papillary thyroid cancer in the United States is now a microcarcinoma in a patient older than 45 years. *Thyroid* 21(3): 231-236.
- Hundahl, S. A., B. Cady, M. P. Cunningham, E. Mazzaferri, R. F. McKee, J. Rosai, J. P. Shah, A. M. Fremgen, A. K. Stewart and S. Hölzer (2000). Initial results from a prospective cohort study of 5583 cases of thyroid carcinoma treated in the united states during 1996. U.S. and German Thyroid Cancer Study Group. An American College of Surgeons Commission on Cancer Patient Care Evaluation study. *Cancer* 89(1): 202-217.
- Iacobone, M., S. Jansson, M. Barczyński and P. Goretzki (2014). Multifocal papillary thyroid carcinoma--a consensus report of the European Society of Endocrine Surgeons (ESES). *Langenbecks Arch Surg* 399(2): 141-154.
- Ito, Y., C. Tomoda, T. Uruno, Y. Takamura, A. Miya, K. Kobayashi, F. Matsuzuka, K. Kuma and A. Miyauchi (2006). Prognostic significance of extrathyroid extension of papillary thyroid carcinoma: massive but not minimal extension affects the relapse-free survival. *World J Surg* 30(5): 780-786.
- Ivanova, R., P. Soares, P. Castro and M. Sobrinho-Simões (2002). Diffuse (or multinodular) follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of ten cases of an aggressive form of differentiated thyroid carcinoma. *Virchows Arch* 440(4): 418-424.
- Jeong, S. H., H. S. Hong, J. J. Kwak and E. H. Lee (2015). Analysis of RAS mutation and PAX8/PPAR γ rearrangements in follicular-derived thyroid neoplasms in a Korean population: frequency and ultrasound findings. *J Endocrinol Invest* 38(8): 849-857.
- Johannessen, J. V. and M. Sobrinho-Simões (1980). The origin and significance of thyroid psammoma bodies. *Lab Invest* 43(3): 287-296.
- Jørgensen, C. U., P. Homøe, M. Dahl and M. F. Hitz (2021). Postoperative Chronic Hypoparathyroidism and Quality of Life After Total Thyroidectomy. *JBMR Plus* 5(4): e10479.

- Jovanovic, L., B. Delahunt, B. McIver, N. L. Eberhardt and S. K. Grebe (2008). Most multifocal papillary thyroid carcinomas acquire genetic and morphotype diversity through subclonal evolution following the intra-glandular spread of the initial neoplastic clone. *J Pathol* 215(2): 145-154.
- Jun, H. H., S. M. Kim, S. W. Hong, Y. S. Lee, H. S. Chang and C. S. Park (2016). Warthin-like variant of papillary thyroid carcinoma: single institution experience. *ANZ J Surg* 86(6): 492-494.
- Jun, P., L. C. Chow and R. B. Jeffrey (2005). The sonographic features of papillary thyroid carcinomas: pictorial essay. *Ultrasound Q* 21(1): 39-45.
- Jurmeister, P., M. Bockmayr, P. Seegerer, T. Bockmayr, D. Treue, G. Montavon, C. Vollbrecht, A. Arnold, D. Teichmann, K. Bressemer, U. Schüller, M. von Laffert, K. R. Müller, D. Capper and F. Klauschen (2019). Machine learning analysis of DNA methylation profiles distinguishes primary lung squamous cell carcinomas from head and neck metastases. *Sci Transl Med* 11(509).
- Karunamurthy, A., F. Panebianco, J. H. S, J. Vorhauer, M. N. Nikiforova, S. Chiosea and Y. E. Nikiforov (2016). Prevalence and phenotypic correlations of EIF1AX mutations in thyroid nodules. *Endocr Relat Cancer* 23(4): 295-301.
- Kim, M. J., M. C. Lee, G. H. Lee, H. S. Choi, S. W. Cho, S. J. Kim, K. E. Lee, Y. J. Park and D. J. Park (2017). Extent of surgery did not affect recurrence during 7-years follow-up in papillary thyroid cancer sized 1-4 cm: Preliminary results. *Clin Endocrinol (Oxf)* 87(1): 80-86.
- Kim, S. K., J. W. Woo, J. H. Lee, I. Park, J. H. Choe, J. H. Kim and J. S. Kim (2015). Role of BRAF V600E mutation as an indicator of the extent of thyroidectomy and lymph node dissection in conventional papillary thyroid carcinoma. *Surgery* 158(6): 1500-1511.
- Kim, T. S., R. Asato, T. Akamizu, D. Harada, Y. Nakashima, T. Higashi, N. Yamamoto, Y. Tamura, H. Tamaki, S. Hirano, S. Tanaka and J. Ito (2007). A rare case of hyperfunctioning papillary carcinoma of the thyroid gland. *Acta Otolaryngol Suppl(557)*: 55-57.
- Kleeff, J., M. Korc, M. Apte, C. La Vecchia, C. D. Johnson, A. V. Biankin, R. E. Neale, M. Tempero, D. A. Tuveson, R. H. Hruban and J. P. Neoptolemos (2016). Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2: 16022.
- Klöppel, G., H. H. Kreipe and W. Remmele (2015). Urogenitale und Endokrine Organe, Gelenke und Skelett, Springer: 638 ff.
- Koperek, O., R. Asari, B. Niederle and K. Kaserer (2011). Desmoplastic stromal reaction in papillary thyroid microcarcinoma. *Histopathology* 58(6): 919-924.
- Kravis Center for Molecular Oncology at Memorial Sloan Kettering Cancer Center (o.D.). Cancer Hotspots [Internet]. Zitiert am 24.06.2024. Erhältlich: <https://www.cancerhotspots.org/#/home>.
- Kuba, S., K. Yamanouchi, N. Hayashida, S. Maeda, T. Adachi, C. Sakimura, F. Kawakami, H. Yano, M. Matsumoto, R. Otsubo, S. Sato, H. Fujioka, T. Kuroki, T. Nagayasu and S. Eguchi (2017). Total thyroidectomy versus thyroid lobectomy for papillary thyroid cancer: Comparative analysis after propensity score matching: A multicenter study. *Int J Surg* 38: 143-148.
- Kubista, M., J. M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonák, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjöback, B. Sjögreen, L. Strömbom, A. Ståhlberg and N. Zoric (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27(2-3): 95-125.
- Kure, S., R. Wada and Z. Naito (2019). Relationship between genetic alterations and clinicopathological characteristics of papillary thyroid carcinoma. *Medical Molecular Morphology* 52(4): 181-186.

- Kwon, J. H. and J. W. Yi (2021). Correlation between telomerase reverse transcriptase messenger RNA expression and survival of patients with papillary thyroid carcinoma. *Surgery* 169(1): 43-49.
- Lam, A. K., C. Y. Lo and K. S. Lam (2005). Papillary carcinoma of thyroid: A 30-yr clinicopathological review of the histological variants. *Endocr Pathol* 16(4): 323-330.
- Lam, K. Y., C. Y. Lo and M. C. Liu (2001). Primary squamous cell carcinoma of the thyroid gland: an entity with aggressive clinical behaviour and distinctive cytokeratin expression profiles. *Histopathology* 39(3): 279-286.
- LaMarco, K., C. C. Thompson, B. P. Byers, E. M. Walton and S. L. McKnight (1991). Identification of Ets- and notch-related subunits in GA binding protein. *Science* 253(5021): 789-792.
- Lawrence, M. S., P. Stojanov, C. H. Mermel, J. T. Robinson, L. A. Garraway, T. R. Golub, M. Meyerson, S. B. Gabriel, E. S. Lander and G. Getz (2014). Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* 505(7484): 495-501.
- Lawrence, M. S., P. Stojanov, P. Polak, G. V. Kryukov, K. Cibulskis, A. Sivachenko, S. L. Carter, C. Stewart, C. H. Mermel, S. A. Roberts, A. Kiezun, P. S. Hammerman, A. McKenna, Y. Drier, L. Zou, A. H. Ramos, T. J. Pugh, N. Stransky, E. Helman, J. Kim, C. Sougnez, L. Ambrogio, E. Nickerson, E. Shefler, M. L. Cortés, D. Auclair, G. Saksena, D. Voet, M. Noble, D. DiCara, P. Lin, L. Lichtenstein, D. I. Heiman, T. Fennell, M. Imielinski, B. Hernandez, E. Hodis, S. Baca, A. M. Dulak, J. Lohr, D.-A. Landau, C. J. Wu, J. Melendez-Zajgla, A. Hidalgo-Miranda, A. Koren, S. A. McCarroll, J. Mora, R. S. Lee, B. Crompton, R. Onofrio, M. Parkin, W. Winckler, K. Ardlie, S. B. Gabriel, C. W. M. Roberts, J. A. Biegel, K. Stegmaier, A. J. Bass, L. A. Garraway, M. Meyerson, T. R. Golub, D. A. Gordenin, S. Sunyaev, E. S. Lander and G. Getz (2013). Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 499(7457): 214-218.
- Lee, D. H., W. J. Kang, H. S. Seo, E. Kim, J. H. Kim, K. R. Son and D. G. Na (2009). Detection of metastatic cervical lymph nodes in recurrent papillary thyroid carcinoma: computed tomography versus positron emission tomography-computed tomography. *J Comput Assist Tomogr* 33(5): 805-810.
- Lee, T. K., R. T. Myers, R. B. Marshall, M. G. Bond and B. Kardon (1985). The significance of mitotic rate: a retrospective study of 127 thyroid carcinomas. *Hum Pathol* 16(10): 1042-1046.
- Lehmann, U. and A. Stenzinger (2022). Das molekularpathologische Brevier: Allelfrequenzen in der NGS-Analytik. *Der Pathologe* 43(2): 154-156.
- Li, S., J. Xue, K. Jiang, Y. Chen, L. Zhu and R. Liu (2024). TERT promoter methylation is associated with high expression of TERT and poor prognosis in papillary thyroid cancer. *Front Oncol* 14: 1325345.
- Liebermann, D. A., J. S. Tront, X. Sha, K. Mukherjee, A. Mohamed-Hadley and B. Hoffman (2011). Gadd45 stress sensors in malignancy and leukemia. *Crit Rev Oncog* 16(1-2): 129-140.
- Lim, J., H. S. Lee, J. Park, K. S. Kim, S. K. Kim, Y. W. Cho and Y. S. Song (2023). Different Molecular Phenotypes of Progression in BRAF- and RAS-Like Papillary Thyroid Carcinoma. *Endocrinol Metab (Seoul)* 38(4): 445-454.
- Liu, D., S. Hu, P. Hou, D. Jiang, S. Condouris and M. Xing (2007). Suppression of BRAF/MEK/MAP kinase pathway restores expression of iodide-metabolizing genes in thyroid cells expressing the V600E BRAF mutant. *Clin Cancer Res* 13(4): 1341-1349.
- Liu, R. and M. Xing (2016). TERT promoter mutations in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 23(3): R143-155.

- Liu, R., T. Zhang, G. Zhu and M. Xing (2018). Regulation of mutant TERT by BRAF V600E/MAP kinase pathway through FOS/GABP in human cancer. *Nat Commun* 9(1): 579.
- Liu, R. T., C. Y. Hou, H. L. You, C. C. Huang, L. Hock, F. F. Chou, P. W. Wang and J. T. Cheng (2004). Selective occurrence of ras mutations in benign and malignant thyroid follicular neoplasms in Taiwan. *Thyroid* 14(8): 616-621.
- Liu, X., J. Bishop, Y. Shan, S. Pai, D. Liu, A. K. Murugan, H. Sun, A. K. El-Naggar and M. Xing (2013). Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers. *Endocr Relat Cancer* 20(4): 603-610.
- Liu, X., S. Qu, R. Liu, C. Sheng, X. Shi, G. Zhu, A. K. Murugan, H. Guan, H. Yu, Y. Wang, H. Sun, Z. Shan, W. Teng and M. Xing (2014). TERT promoter mutations and their association with BRAF V600E mutation and aggressive clinicopathological characteristics of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 99(6): E1130-1136.
- LiVolsi, V. A. (2011). Papillary thyroid carcinoma: an update. *Modern Pathology* 24: S1-S9.
- Lloyd, R. V., S. L. Asa, V. A. LiVolsi, P. M. Sadow, A. S. Tischler, R. A. Ghossein, R. M. Tuttle and Y. E. Nikiforov (2018). The evolving diagnosis of noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features (NIFTP). *Human Pathology* 74: 1-4.
- Lloyd, R. V., R. Y. Osamura, G. Klöpffer and J. Rosai (2017). WHO classification of tumours of endocrine organs (4th edition): 65-145.
- Loo, E., P. Khalili, K. Beuhler, I. Siddiqi and M. A. Vasef (2018). BRAF V600E Mutation Across Multiple Tumor Types: Correlation Between DNA-based Sequencing and Mutation-specific Immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 26(10): 709-713.
- Losi, L., L. Botticelli, L. Garagnani, L. Fabbiani, R. Panini, G. Gallo, R. Sabbatini, A. Maiorana and J. Benhattar (2021). TERT promoter methylation and protein expression as predictive biomarkers for recurrence risk in patients with serous borderline ovarian tumours. *Pathology* 53(2): 187-192.
- Luo, Y., H. Jiang, W. Xu, X. Wang, B. Ma, T. Liao and Y. Wang (2020). Clinical, Pathological, and Molecular Characteristics Correlating to the Occurrence of Radioiodine Refractory Differentiated Thyroid Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Oncol* 10: 549882.
- Ma, X., C. Xia, H. Liu and W. Zhu (2015). Primary thyroid spindle cell tumors: spindle cell variant of papillary thyroid carcinoma? *Int J Clin Exp Pathol* 8(10): 13528-13531.
- Maggisano, V., M. Celano, S. M. Lepore, M. Sponziello, F. Rosignolo, V. Pecce, A. Verrienti, F. Baldan, C. Mio, L. Allegri, M. Maranghi, R. Falcone, G. Damante, D. Russo and S. Bulotta (2019). Human telomerase reverse transcriptase in papillary thyroid cancer: gene expression, effects of silencing and regulation by BET inhibitors in thyroid cancer cells. *Endocrine* 63(3): 545-553.
- Mai, K. T., P. Khanna, H. M. Yazdi, D. G. Perkins, J. P. Veinot, J. Thomas, M. Lamba and B. D. Nair (2002). Differentiated thyroid carcinomas with vascular invasion: a comparative study of follicular, Hürthle cell and papillary thyroid carcinoma. *Pathology* 34(3): 239-244.
- Mai, K. T., J. Thomas, H. M. Yazdi, A. S. Commons, M. Lamba and A. W. Stinson (2004). Pathologic study and clinical significance of Hürthle cell papillary thyroid carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 12(4): 329-337.
- Makowski, M. M., E. Willems, J. Fang, J. Choi, T. Zhang, P. W. Jansen, K. M. Brown and M. Vermeulen (2016). An interaction proteomics survey of transcription factor binding at recurrent TERT promoter mutations. *Proteomics* 16(3): 417-426.
- Mancini, A., A. Xavier-Magalhães, W. S. Woods, K. T. Nguyen, A. M. Amen, J. L. Hayes, C. Fellmann, M. Gapinske, A. M. McKinney, C. Hong, L. E. Jones, K. M. Walsh, R. J. A.

- Bell, J. A. Doudna, B. M. Costa, J. S. Song, P. Perez-Pinera and J. F. Costello (2018). Disruption of the β 1L Isoform of GABP Reverses Glioblastoma Replicative Immortality in a TERT Promoter Mutation-Dependent Manner. *Cancer Cell* 34(3): 513-528.e518.
- Manzella, L., S. Stella, M. S. Pennisi, E. Tirrò, M. Massimino, C. Romano, A. Puma, M. Tavarelli and P. Vigneri (2017). New Insights in Thyroid Cancer and p53 Family Proteins. *International Journal of Molecular Sciences* 18(6): 1325.
- McDonell, M. W., M. N. Simon and F. W. Studier (1977). Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *Journal of Molecular Biology* 110(1): 119-146.
- Medici, M., N. Kwong, T. E. Angell, E. Marqusee, M. I. Kim, M. C. Frates, C. B. Benson, E. S. Cibas, J. A. Barletta, J. F. Krane, D. T. Ruan, N. L. Cho, A. A. Gawande, F. D. Moore and E. K. Alexander (2015). The variable phenotype and low-risk nature of RAS-positive thyroid nodules. *BMC Medicine* 13(1): 184.
- Melo, M., A. G. da Rocha, J. Vinagre, M. Sobrinho-Simões and P. Soares (2015). Coexistence of TERT promoter and BRAF mutations in papillary thyroid carcinoma: added value in patient prognosis? *J Clin Oncol* 33(6): 667-668.
- Miranda-Filho, A., J. Lortet-Tieulent, F. Bray, B. Cao, S. Franceschi, S. Vaccarella and L. Dal Maso (2021). Thyroid cancer incidence trends by histology in 25 countries: a population-based study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 9(4): 225-234.
- Moskalev, A. A., Z. Smit-McBride, M. V. Shaposhnikov, E. N. Plyusnina, A. Zhavoronkov, A. Budovsky, R. Tacutu and V. E. Fraifeld (2012). Gadd45 proteins: Relevance to aging, longevity and age-related pathologies. *Ageing Research Reviews* 11(1): 51-66.
- Motoi, N., A. Sakamoto, T. Yamochi, H. Horiuchi, T. Motoi and R. Machinami (2000). Role of ras mutation in the progression of thyroid carcinoma of follicular epithelial origin. *Pathol Res Pract* 196(1): 1-7.
- Mulla, Z. D. and C. E. Margo (2000). Primary Malignancies of the Thyroid: Epidemiologic Analysis of the Florida Cancer Data System Registry. *Annals of Epidemiology* 10(1): 24-30.
- Muzza, M., C. Colombo, S. Rossi, D. Tosi, V. Cirello, M. Perrino, S. De Leo, E. Magnani, E. Pignatti, B. Vigo, M. Simoni, G. Bulfamante, L. Vicentini and L. Fugazzola (2015). Telomerase in differentiated thyroid cancer: Promoter mutations, expression and localization. *Molecular and Cellular Endocrinology* 399: 288-295.
- Namba, H., S. A. Rubin and J. A. Fagin (1990). Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 4(10): 1474-1479.
- National Cancer Institute (2021). Drugs Approved for Thyroid Cancer [Internet]. U.S. Department of Health and Human Services. Updated 19.01.2021. Zitiert am 16.05.2024. Erhältlich: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/thyroid>.
- Neagoe, R. M., I. T. Cvasciuc, M. Muresan and D. T. Sala (2017). INCIDENTAL PARATHYROIDECTOMY DURING THYROID SURGERY - RISK, PREVENTION AND CONTROVERSIES; AN EVIDENCE-BASED REVIEW. *Acta Endocrinol (Buchar)* 13(4): 467-475.
- Nickel, B., T. Tan, E. Cvejic, P. Baade, D. S. A. McLeod, N. Pandeya, P. Youl, K. McCaffery and S. Jordan (2019). Health-Related Quality of Life After Diagnosis and Treatment of Differentiated Thyroid Cancer and Association With Type of Surgical Treatment. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 145(3): 231-238.
- Nikiforov, Y. and D. R. Gnepp (1994). Pediatric thyroid cancer after the Chernobyl disaster. Pathomorphologic study of 84 cases (1991-1992) from the Republic of Belarus. *Cancer* 74(2): 748-766.
- Nikiforov, Y. E. (2011a). Molecular analysis of thyroid tumors. *Mod Pathol* 24 Suppl 2: S34-43.

- Nikiforov, Y. E. (2011b). Molecular diagnostics of thyroid tumors. *Arch Pathol Lab Med* 135(5): 569-577.
- Nikiforov, Y. E., Z. W. Baloch, S. P. Hodak, T. J. Giordano, R. V. Lloyd, R. R. Seethala and B. M. Wenig (2018). Change in Diagnostic Criteria for Noninvasive Follicular Thyroid Neoplasm With Papillarylike Nuclear Features. *JAMA Oncol* 4(8): 1125-1126.
- Nikiforov, Y. E., N. P. Otori, S. P. Hodak, S. E. Carty, S. O. LeBeau, R. L. Ferris, L. Yip, R. R. Seethala, M. E. Tublin, M. T. Stang, C. Coyne, J. T. Johnson, A. F. Stewart and M. N. Nikiforova (2011). Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 FNA samples. *J Clin Endocrinol Metab* 96(11): 3390-3397.
- Nikiforov, Y. E., R. R. Seethala, G. Tallini, Z. W. Baloch, F. Basolo, L. D. Thompson, J. A. Barletta, B. M. Wenig, A. Al Ghuzlan, K. Kakudo, T. J. Giordano, V. A. Alves, E. Khanafshar, S. L. Asa, A. K. El-Naggar, W. E. Gooding, S. P. Hodak, R. V. Lloyd, G. Maytal, O. Mete, M. N. Nikiforova, V. Nosé, M. Papotti, D. N. Poller, P. M. Sadow, A. S. Tischler, R. M. Tuttle, K. B. Wall, V. A. Livolsi, G. W. Randolph and R. A. Gosselin (2016). Nomenclature Revision for Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: A Paradigm Shift to Reduce Overtreatment of Indolent Tumors. *JAMA Oncol* 2(8): 1023-1029.
- Nikiforova, M. N., E. T. Kimura, M. Gandhi, P. W. Biddinger, J. A. Knauf, F. Basolo, Z. Zhu, R. Giannini, G. Salvatore, A. Fusco, M. Santoro, J. A. Fagin and Y. E. Nikiforov (2003). BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 88(11): 5399-5404.
- Nilsson, M. and D. Williams (2016). On the Origin of Cells and Derivation of Thyroid Cancer: C Cell Story Revisited. *Eur Thyroid J* 5(2): 79-93.
- Palmedo, H., J. Bucerius, A. Joe, H. Strunk, N. Hortling, S. Meyka, R. Roedel, M. Wolff, E. Wardelmann, H. J. Biersack and U. Jaeger (2006). Integrated PET/CT in differentiated thyroid cancer: diagnostic accuracy and impact on patient management. *J Nucl Med* 47(4): 616-624.
- Panbianco, F., A. V. Nikitski, M. N. Nikiforova and Y. E. Nikiforov (2019). Spectrum of TERT promoter mutations and mechanisms of activation in thyroid cancer. *Cancer Med* 8(13): 5831-5839.
- Park, Y. J., Y. A. Kim, Y. J. Lee, S. H. Kim, S. Y. Park, K. W. Kim, J. K. Chung, Y. K. Youn, K. H. Kim, D. J. Park and B. Y. Cho (2010). Papillary microcarcinoma in comparison with larger papillary thyroid carcinoma in BRAF(V600E) mutation, clinicopathological features, and immunohistochemical findings. *Head Neck* 32(1): 38-45.
- Paschke, R., T. Lincke, S. P. Müller, M. C. Kreissl, H. Dralle and M. Fassnacht (2015). Therapie des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms. *Dtsch Arztebl International* 112(26): 452-458.
- Patel, K. N., L. Yip, C. C. Lubitz, E. G. Grubbs, B. S. Miller, W. Shen, P. Angelos, H. Chen, G. M. Doherty, T. J. Fahey, III, E. Kebebew, V. A. Livolsi, N. D. Perrier, J. A. Sipos, J. A. Sosa, D. Steward, R. P. Tufano, C. R. McHenry and S. E. Carty (2020). The American Association of Endocrine Surgeons Guidelines for the Definitive Surgical Management of Thyroid Disease in Adults. *Annals of Surgery* 271(3).
- Patel, S. G., S. E. Carty, K. L. McCoy, N. P. Otori, S. O. LeBeau, R. R. Seethala, M. N. Nikiforova, Y. E. Nikiforov and L. Yip (2017). Preoperative detection of RAS mutation may guide extent of thyroidectomy. *Surgery* 161(1): 168-175.
- Polat, S. B., B. Cakir, B. Evranos, H. Baser, N. Cuhaci, C. Aydin and R. Ersoy (2019). Preoperative predictors and prognosis of bilateral multifocal papillary thyroid carcinomas. *Surg Oncol* 28: 145-149.

- Pracht, M., A. Mogha, A. Lespagnol, A. Fautrel, N. Mouchet, F. Le Gall, V. Paumier, C. Lefeuvre-Plesse, N. Rioux-Leclerc, J. Mosser, E. Oger, H. Adamski, M. D. Galibert and T. Lesimple (2015). Prognostic and predictive values of oncogenic BRAF, NRAS, c-KIT and MITF in cutaneous and mucous melanoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 29(8): 1530-1538.
- QIAGEN (2021). QIAseq Targeted DNA Panels workflow [Internet]. Zitiert am 24.01.2024. Erhältlich: <https://www.qiagen.com/de-us/products/discovery-and-translational-research/next-generation-sequencing/dna-sequencing/somatic-panels/qiaseq-targeted-dna-panels>.
- Qiu, W., B. Zhou, H. Zou, X. Liu, P. G. Chu, R. Lopez, J. Shih, C. Chung and Y. Yen (2004). Hypermethylation of growth arrest DNA damage-inducible gene 45 beta promoter in human hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 165(5): 1689-1699.
- Quiros, R. M., H. G. Ding, P. Gattuso, R. A. Prinz and X. Xu (2005). Evidence that one subset of anaplastic thyroid carcinomas are derived from papillary carcinomas due to BRAF and p53 mutations. *Cancer* 103(11): 2261-2268.
- Rabes, H. M. (2001). Gene rearrangements in radiation-induced thyroid carcinogenesis. *Med Pediatr Oncol* 36(5): 574-582.
- Radkay, L. A., S. I. Chiosea, R. R. Seethala, S. P. Hodak, S. O. LeBeau, L. Yip, K. L. McCoy, S. E. Carty, K. E. Schoedel, M. N. Nikiforova, Y. E. Nikiforov and N. P. Ohori (2014). Thyroid nodules with KRAS mutations are different from nodules with NRAS and HRAS mutations with regard to cytopathologic and histopathologic outcome characteristics. *Cancer Cytopathol* 122(12): 873-882.
- Reck, M., D. P. Carbone, M. Garassino and F. Barlesi (2021). Targeting KRAS in non-small-cell lung cancer: recent progress and new approaches. *Ann Oncol* 32(9): 1101-1110.
- Regalbuto, C., P. Malandrino, A. Tumminia, R. Le Moli, R. Vigneri and V. Pezzino (2011). A diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma: clinical and pathologic features and outcomes of 34 consecutive cases. *Thyroid* 21(4): 383-389.
- Ren, M., Q. Yao, L. Bao, Z. Wang, R. Wei, Q. Bai, B. Ping, C. Chang, Y. Wang, X. Zhou and X. Zhu (2022). Diagnostic performance of next-generation sequencing and genetic profiling in thyroid nodules from a single center in China. *Eur Thyroid J* 11(3).
- Rivera, M., J. Ricarte-Filho, R. M. Tuttle, I. Ganly, A. Shaha, J. Knauf, J. Fagin and R. Ghossein (2010). Molecular, morphologic, and outcome analysis of thyroid carcinomas according to degree of extrathyroid extension. *Thyroid* 20(10): 1085-1093.
- Rohaizak, M., A. Y. Jasmi, M. A. Ismail, M. J. Munchar and F. A. Meah (2003). Thyroid carcinoma in patients with familial adenomatous polyposis. *Asian J Surg* 26(3): 183-185.
- Rosai, J., V. A. LiVolsi, M. Sobrinho-Simoes and E. D. Williams (2003). Renaming papillary microcarcinoma of the thyroid gland: the Porto proposal. *Int J Surg Pathol* 11(4): 249-251.
- Rosai, J., G. Zampi and M. L. Carcangiu (1983). Papillary carcinoma of the thyroid. A discussion of its several morphologic expressions, with particular emphasis on the follicular variant. *Am J Surg Pathol* 7(8): 809-817.
- Sabra, M. M., J. M. Dominguez, R. K. Grewal, S. M. Larson, R. A. Ghossein, R. M. Tuttle and J. A. Fagin (2013). Clinical outcomes and molecular profile of differentiated thyroid cancers with radioiodine-avid distant metastases. *J Clin Endocrinol Metab* 98(5): E829-836.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732): 1350-1354.

- Saller, J. J. and T. A. Boyle (2022). Molecular Pathology of Lung Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 12(3).
- Salvador, J. M., J. D. Brown-Clay and A. J. Fornace, Jr. (2013). Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 793: 1-19.
- Salvatore, D., A. Celetti, N. Fabien, C. Paulin, M. L. Martelli, C. Battaglia, D. Califano, C. Monaco, G. Viglietto, M. Santoro and A. Fusco (1996). Low frequency of p53 mutations in human thyroid tumours; p53 and Ras mutation in two out of fifty-six thyroid tumours. *Eur J Endocrinol* 134(2): 177-183.
- Sapio, M. R., D. Posca, G. Troncone, G. Pettinato, L. Palombini, G. Rossi, G. Fenzi and M. Vitale (2006). Detection of BRAF mutation in thyroid papillary carcinomas by mutant allele-specific PCR amplification (MASA). *Eur J Endocrinol* 154(2): 341-348.
- Schröder, S., W. Böcker, H. Dralle, K. B. Kortmann and C. Stern (1984). The encapsulated papillary carcinoma of the thyroid. A morphologic subtype of the papillary thyroid carcinoma. *Cancer* 54(1): 90-93.
- Schünke, M., E. Schulte and U. Schumacher (2015a). Prometheus LernAtlas der Anatomie: Kopf, Hals und Neuroanatomie, Thieme: 11.
- Schünke, M., E. Schulte and U. Schumacher (2015b). Prometheus LernAtlas der Anatomie: Kopf, Hals und Neuroanatomie, Thieme: 222 - 224.
- Sciuto, R., L. Romano, S. Rea, F. Marandino, I. Sperduti and C. L. Maini (2009). Natural history and clinical outcome of differentiated thyroid carcinoma: a retrospective analysis of 1503 patients treated at a single institution. *Ann Oncol* 20(10): 1728-1735.
- Semsar-Kazerooni, K., G. B. Morand, A. E. Payne, S. D. da Silva, V. I. Forest, M. P. Hier, M. P. Pusztaszeri, M. Tamilia and R. J. Payne (2022). Mutational status may supersede tumor size in predicting the presence of aggressive pathologic features in well differentiated thyroid cancer. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 51(1): 9.
- Shaha, A. R., J. P. Shah and T. R. Loree (1996). Risk group stratification and prognostic factors in papillary carcinoma of thyroid. *Annals of Surgical Oncology* 3(6): 534-538.
- Shay, J. W. and W. E. Wright (2010). Telomeres and telomerase in normal and cancer stem cells. *FEBS Lett* 584(17): 3819-3825.
- Simanshu, D. K., D. V. Nissley and F. McCormick (2017). RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell* 170(1): 17-33.
- Simões-Pereira, J., N. Mourinho, T. C. Ferreira, E. Limbert, B. M. Cavaco and V. Leite (2021). Avidity and Outcomes of Radioiodine Therapy for Distant Metastasis of Distinct Types of Differentiated Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 106(10): e3911-e3922.
- Soares, P., V. Trovisco, A. S. Rocha, J. Lima, P. Castro, A. Preto, V. Máximo, T. Botelho, R. Seruca and M. Sobrinho-Simões (2003). BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 22(29): 4578-4580.
- Song, Y. S., J. A. Lim, H. Choi, J. K. Won, J. H. Moon, S. W. Cho, K. E. Lee, Y. J. Park, K. H. Yi, D. J. Park and J. S. Seo (2016). Prognostic effects of TERT promoter mutations are enhanced by coexistence with BRAF or RAS mutations and strengthen the risk prediction by the ATA or TNM staging system in differentiated thyroid cancer patients. *Cancer* 122(9): 1370-1379.
- Staubitz-Vernazza, J. I., C. Müller, A. Heymans, A. S. Nedwed, M. Schindeldecker, M. Hartmann, M. Kloth, A. Schad, W. Roth, T. J. Musholt and N. Hartmann (2024). Gene Expression Profiles of AHNAK2, DCSTAMP, FN1, and TERT Correlate With Mutational Status and Recurrence in Papillary Thyroid Carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 63(8): e23256.

- Staubitz, J. I., C. Müller, A. Heymans, C. Merten, B. Roos, A. Poplawski, A. Ludt, S. Strobl, E. Springer, A. Schad, W. Roth, T. J. Musholt and N. Hartmann (2023). Approach to risk stratification for papillary thyroid carcinoma based on molecular profiling: institutional analysis. *BJS Open* 7(3).
- Summariá, V., V. Rufini, P. Mirk, A. M. Costantini, F. Reale and G. Maresca (2000). Diagnostic imaging of differentiated thyroid carcinoma. *Rays* 25(2): 177-190.
- Surveillance Research Program, N. C. I. (2023a). SEER*Explorer: An interactive website for SEER cancer statistics [Internet]. Surveillance Research Program, National Cancer Institute. Updated 16.11.2023. Zitiert am 17.01.2024. Erhältlich: <https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer/>.
- Surveillance Research Program, N. C. I. (2023b). SEER*Explorer: An interactive website for SEER cancer statistics, Papillary Subtype of the Thyroid, Recent Trends in SEER Age-Adjusted Incidence Rates, 2000-2020 [Internet]. Updated 16.11.2023. Zitiert am 13.02.2024. Erhältlich: https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer/application.html?site=650&data_type=1&graph_type=2&compareBy=sex&chk_sex_1=1&chk_sex_3=3&chk_sex_2=2&rate_type=2&race=1&age_range=1&stage=101&advopt_precision=1&advopt_show_ci=on&hdn_view=0&advopt_show_apc=on&advopt_display=2#resultsRegion0.
- Surveillance Research Program, N. C. I. (2023c). SEER*Explorer: An interactive website for SEER cancer statistics, Papillary Subtype of the Thyroid, SEER 5-Year Relative Survival Rates, 2013-2019 [Internet]. Updated 16.11.2023. Zitiert am 13.02.2024. Erhältlich: https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer/application.html?site=650&data_type=4&graph_type=5&compareBy=stage&chk_stage_104=104&chk_stage_105=105&chk_stage_106=106&chk_stage_107=107&series=9&sex=1&race=1&age_range=1&advopt_precision=1&advopt_show_ci=on&hdn_view=1#resultsRegion1.
- Synoracki, S., S. Ting, U. Siebolts, H. Dralle, O. Koperek and K. W. Schmid (2015). Intraoperativer Gefrierschnitt der Schilddrüse. *Der Pathologe* 36(4): 362-371.
- Tanaka, A., M. Matsuse, V. Saenko, T. Nakao, K. Yamanouchi, C. Sakimura, H. Yano, E. Nishihara, M. Hirokawa, K. Suzuki, A. Miyauchi, S. Eguchi, K. I. Yoshiura, S. Yamashita, T. Nagayasu and N. Mitsutake (2019). TERT mRNA Expression as a Novel Prognostic Marker in Papillary Thyroid Carcinomas. *Thyroid* 29(8): 1105-1114.
- The McDonnell Genome Institute at Washington University School of Medicine (o.D.-a). BRAF V600E [Internet]. CIVic. Zitiert am 24.06.2024. Erhältlich: <https://civicdb.org/molecular-profiles/12/summary>.
- The McDonnell Genome Institute at Washington University School of Medicine (o.D.-b). About CIVic [Internet]. Zitiert am 24.06.2024. Erhältlich: <https://civicdb.org/pages/about>.
- Thermo Fisher Scientific, A. B. (2016). Real-time PCR: understanding Ct.
- Thompson, C. C., T. A. Brown and S. L. McKnight (1991). Convergence of Ets- and notch-related structural motifs in a heteromeric DNA binding complex. *Science* 253(5021): 762-768.
- Tiedje, V., K. W. Schmid, F. Weber, A. Bockisch and D. Führer (2015). Differenzierte Schilddrüsenkarzinome. *Internist (Berl)* 56(2): 153-166; quiz 167-158.
- Tímár, J. and A. Ladányi (2022). Molecular Pathology of Skin Melanoma: Epidemiology, Differential Diagnostics, Prognosis and Therapy Prediction. *Int J Mol Sci* 23(10).
- Tripathi, S., N. R. Dsouza, A. J. Mathison, E. Leverage, R. Urrutia and M. T. Zimmermann (2022). Enhanced interpretation of 935 hotspot and non-hotspot RAS variants using evidence-based structural bioinformatics. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 20: 117-127.

- Tronko, M. D., T. I. Bogdanova, I. V. Komissarenko, O. V. Epstein, V. Oliynyk, A. Kovalenko, I. A. Likhtarev, I. Kairo, S. B. Peters and V. A. LiVolsi (1999). Thyroid carcinoma in children and adolescents in Ukraine after the Chernobyl nuclear accident: statistical data and clinicomorphologic characteristics. *Cancer* 86(1): 149-156.
- Tsumagari, K., Z. Y. Abd Elmageed, A. B. Sholl, E. A. Green, S. Sobti, A. R. Khan, A. Kandil, F. Murad, P. Friedlander, A. H. Boulares and E. Kandil (2018). Bortezomib sensitizes thyroid cancer to BRAF inhibitor in vitro and in vivo. *Endocrine-Related Cancer* 25(1): 99-109.
- Tunio, G. M., S. Hirota, S. Nomura and Y. Kitamura (1998). Possible relation of osteopontin to development of psammoma bodies in human papillary thyroid cancer. *Arch Pathol Lab Med* 122(12): 1087-1090.
- Tuttle, R. M., J. A. Fagin, G. Minkowitz, R. J. Wong, B. Roman, S. Patel, B. Untch, I. Ganly, A. R. Shaha, J. P. Shah, M. Pace, D. Li, A. Bach, O. Lin, A. Whiting, R. Ghossein, I. Landa, M. Sabra, L. Boucai, S. Fish and L. G. T. Morris (2017). Natural History and Tumor Volume Kinetics of Papillary Thyroid Cancers During Active Surveillance. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 143(10): 1015-1020.
- Tuttle, R. M., B. Haugen and N. D. Perrier (2017). Updated American Joint Committee on Cancer/Tumor-Node-Metastasis Staging System for Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancer (Eighth Edition): What Changed and Why? *Thyroid* 27(6): 751-756.
- Ulfig, N. (2011). *Kurzlehrbuch Histologie*, Thieme. 3. Auflage: 154-156.
- Ullmann, T. M., K. D. Gray, D. Stefanova, J. Limberg, J. L. Buicko, B. Finnerty, R. Zarnegar, T. J. Fahey, 3rd and T. Beninato (2019). The 2015 American Thyroid Association guidelines are associated with an increasing rate of hemithyroidectomy for thyroid cancer. *Surgery* 166(3): 349-355.
- Vaccarella, S., L. Dal Maso, M. Laversanne, F. Bray, M. Plummer and S. Franceschi (2015). The Impact of Diagnostic Changes on the Rise in Thyroid Cancer Incidence: A Population-Based Study in Selected High-Resource Countries. *Thyroid* 25(10): 1127-1136.
- Vanzati, A., F. Mercuri and J. Rosai (2013). The "sprinkling" sign in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a clue to the recognition of this entity. *Arch Pathol Lab Med* 137(12): 1707-1709.
- Variakojis, D., M. L. Getz, E. Paloyan and F. H. Straus (1975). Papillary clear cell carcinoma of the thyroid gland. *Hum Pathol* 6(3): 384-390.
- Verburg, F. A., C. Aktolun, A. Chiti, S. Frangos, L. Giovanella, M. Hoffmann, I. Iakovou, J. Mihailovic, B. J. Krause, W. Langsteger, M. Luster, E. on behalf of the and E. T. C. the (2016). Why the European Association of Nuclear Medicine has declined to endorse the 2015 American Thyroid Association management guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 43(6): 1001-1005.
- Verzella, D., J. Bennett, M. Fischietti, A. K. Thotakura, C. Recordati, F. Pasqualini, D. Capece, D. Vecchiotti, D. D'Andrea, B. Di Francesco, M. De Maglie, F. Begalli, L. Tornatore, S. Papa, T. Lawrence, S. J. Forbes, A. Sica, E. Alesse, F. Zazzeroni and G. Franzoso (2018). GADD45 β Loss Ablates Innate Immunosuppression in Cancer. *Cancer Research* 78(5): 1275-1292.
- Vinagre, J., A. Almeida, H. Pópulo, R. Batista, J. Lyra, V. Pinto, R. Coelho, R. Celestino, H. Prazeres, L. Lima, M. Melo, A. G. da Rocha, A. Preto, P. Castro, L. Castro, F. Pardal, J. M. Lopes, L. L. Santos, R. M. Reis, J. Cameselle-Teijeiro, M. Sobrinho-Simões, J. Lima, V. Máximo and P. Soares (2013). Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat Commun* 4: 2185.

- Viqar, S., A. Masood and N. Zia (2022). Early and late complications of thyroidectomy: A descriptive cohort study in Rawalpindi. *J Pak Med Assoc* 72(11): 2184-2188.
- Volante, M., P. Collini, Y. E. Nikiforov, A. Sakamoto, K. Kakudo, R. Katoh, R. V. Lloyd, V. A. LiVolsi, M. Papotti, M. Sobrinho-Simoes, G. Bussolati and J. Rosai (2007). Poorly differentiated thyroid carcinoma: the Turin proposal for the use of uniform diagnostic criteria and an algorithmic diagnostic approach. *Am J Surg Pathol* 31(8): 1256-1264.
- Volante, M. and M. Papotti (2010). Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma: 5 Years after the 2004 WHO Classification of Endocrine Tumours. *Endocrine Pathology* 21(1): 1-6.
- Vuong, H. G., A. M. A. Altibi, U. N. P. Duong and L. Hassell (2017). Prognostic implication of BRAF and TERT promoter mutation combination in papillary thyroid carcinoma-A meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 87(5): 411-417.
- Wang, J., L. Y. Xie, S. Allan, D. Beach and G. J. Hannon (1998). Myc activates telomerase. *Genes Dev* 12(12): 1769-1774.
- Wang, Q., W. Wu, Z. Gao, K. Li, S. Peng, H. Fan, Z. Xie, Z. Guo and H. Huang (2021). GADD45B Is a Potential Diagnostic and Therapeutic Target Gene in Chemotherapy-Resistant Prostate Cancer. *Front Cell Dev Biol* 9: 716501.
- Wei, X., X. Wang, J. Xiong, C. Li, Y. Liao, Y. Zhu and J. Mao (2022). Risk and Prognostic Factors for BRAF(V600E) Mutations in Papillary Thyroid Carcinoma. *Biomed Res Int* 2022: 9959649.
- Wenig, B. M., L. D. Thompson, C. F. Adair, B. Shmookler and C. S. Heffess (1998). Thyroid papillary carcinoma of columnar cell type: a clinicopathologic study of 16 cases. *Cancer* 82(4): 740-753.
- Williams, E. D. (2000). Guest Editorial: Two Proposals Regarding the Terminology of Thyroid Tumors. *Int J Surg Pathol* 8(3): 181-183.
- Wittekind, C. (2017). Schilddrüse. TNM-Klassifikation maligner Tumoren, Wiley-VCH. 8. Auflage: 69 ff.
- Wittekind, C., F. Bootz and H. J. Meyer (2004). Schilddrüse. TNM Klassifikation maligner Tumoren. C. Wittekind, F. Bootz and H. J. Meyer. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.
- Wittekind, C. and H.-J. Meyer (2012). Schilddrüse. TNM-Klassifikation maligner Tumoren, Wiley-VCH. 7. Auflage 2010 4., korrigierter Nachdruck 2012: 55 ff.
- Wong, K. S., F. Dong, M. Telatar, J. H. Lorch, E. K. Alexander, E. Marqusee, N. L. Cho, M. A. Nehs, G. M. Doherty, M. Afkhami and J. A. Barletta (2021). Papillary Thyroid Carcinoma with High-Grade Features Versus Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma: An Analysis of Clinicopathologic and Molecular Features and Outcome. *Thyroid* 31(6): 933-940.
- Woo, J., H. Kim and H. Kwon (2021). Impact of Multifocality on the Recurrence of Papillary Thyroid Carcinoma. *J Clin Med* 10(21).
- Wu, K.-J., C. Grandori, M. Amacker, N. Simon-Vermot, A. Polack, J. Lingner and R. Dalla-Favera (1999). Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nature Genetics* 21(2): 220-224.
- Xing, M. (2010). Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Thyroid* 20(7): 697-706.
- Xing, M. (2016). Clinical utility of RAS mutations in thyroid cancer: a blurred picture now emerging clearer. *BMC Med* 14: 12.
- Xing, M., R. Liu, X. Liu, A. K. Murugan, G. Zhu, M. A. Zeiger, S. Pai and J. Bishop (2014). BRAF V600E and TERT promoter mutations cooperatively identify the most aggressive papillary thyroid cancer with highest recurrence. *J Clin Oncol* 32(25): 2718-2726.

- Xing, X., N. Mu, X. Yuan, N. Wang, C. C. Juhlin, K. Strååt, C. Larsson, S. Y. Neo and D. Xu (2022). Downregulation and Hypermethylation of GABPB1 Is Associated with Aggressive Thyroid Cancer Features. *Cancers (Basel)* 14(6).
- Xu, B., T. Fuchs, S. Dogan, I. Landa, N. Katabi, J. A. Fagin, R. M. Tuttle, E. Sherman, A. J. Gill and R. Ghossein (2020). Dissecting Anaplastic Thyroid Carcinoma: A Comprehensive Clinical, Histologic, Immunophenotypic, and Molecular Study of 360 Cases. *Thyroid* 30(10): 1505-1517.
- Xue, M., H. Sun, R. Xu, Y. Wang, J. Guo, X. Li, Y. Cheng, C. Xu, C. Tang, B. Sun and L. Chen (2020). GADD45B Promotes Glucose-Induced Renal Tubular Epithelial-Mesenchymal Transition and Apoptosis via the p38 MAPK and JNK Signaling Pathways. *Front Physiol* 11: 1074.
- Yang, J., Y. Gong, S. Yan, Q. Shi, J. Zhu, Z. Li, Q. Chen and R. Gong (2015). Comparison of the clinicopathological behavior of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma and classical papillary thyroid carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Mol Clin Oncol* 3(4): 753-764.
- Yim, J. H., A. H. Choi, A. X. Li, H. Qin, S. Chang, S.-W. T. Tong, P. Chu, B.-W. Kim, D. Schmolze, R. Lew, Y. Ibrahim, V. A. Poroyko, S. Salvatierra, A. Baker, J. Wang, X. Wu, G. P. Pfeifer, Y. Fong and M. A. Hahn (2019). Identification of Tissue-Specific DNA Methylation Signatures for Thyroid Nodule Diagnostics. *Clinical Cancer Research* 25(2): 544-551.
- Zentrum für Krebsregisterdaten, R. K. I. (2023). Verteilung der bösartigen Neubildungen der Schilddrüse nach histologischem Typ und Geschlecht, ICD-10 C73, Deutschland 2019–2020 [Internet]. Stand 07.12.2023. Zitiert am 13.02.2024. Erhältlich: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Schilddruesenkrebs/schilddruesenkrebs_node.html#:~:text=Die%20Sterberaten%20in%20Deutschland%20sind,Karzinome%20haben%20eine%20ung%C3%BCnstige%20Prognose.
- Zhang, Q., S. Z. Liu, Q. Zhang, Y. X. Guan, Q. J. Chen and Q. Y. Zhu (2016). Meta-Analyses of Association Between BRAF(V600E) Mutation and Clinicopathological Features of Papillary Thyroid Carcinoma. *Cell Physiol Biochem* 38(2): 763-776.
- Zhou, Z. and M. Li (2022). Targeted therapies for cancer. *BMC Medicine* 20(1): 90.
- Zhu, C. Y., S. W. Sha, C. H. Tseng, S. E. Yang, L. E. Orr, M. Levin, C. W. Wong, M. J. Livhits, J. Rao and M. W. Yeh (2020). Trends in the Surgical Management of Known or Suspected Differentiated Thyroid Cancer at a Single Institution, 2010-2018. *Thyroid* 30(11): 1639-1645.
- Zhu, G., L. Pei, H. Xia, Q. Tang and F. Bi (2021). Role of oncogenic KRAS in the prognosis, diagnosis and treatment of colorectal cancer. *Mol Cancer* 20(1): 143.
- Zhu, Z., M. Gandhi, M. N. Nikiforova, A. H. Fischer and Y. E. Nikiforov (2003). Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am J Clin Pathol* 120(1): 71-77.

9 Anhang

Tabelle 48 - Übersicht der im QIAseq Targeted DNA Custom Panel enthaltenen Gene

QIAseq Targeted DNA Custom Panel (96) - nNGM 2.0 Panel CDHS-32375Z-340
ALK
BRAF
CTNNB1
EGFR
ERBB2
FGFR1
FGFR2
FGFR3
FGFR4
HRAS
IDH1
IDH2
KEAP1
KRAS
MAP2K1
MET
NRAS
NTRK1
NTRK2
NTRK3
PIK3CA
PTEN
RET
ROS1
STK11
TP53

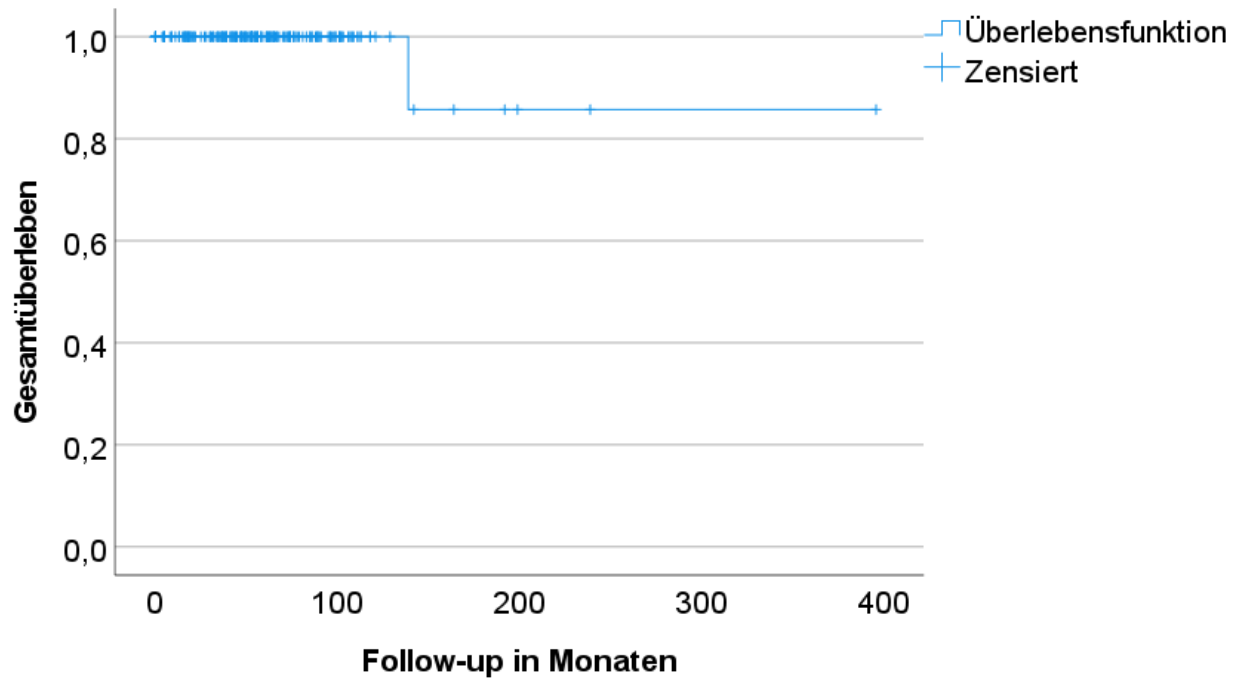


Abbildung 41 - Gesamtüberleben des Kollektivs der Studie (Kaplan-Meier-Kurve)

Ein Patient mit *BRAF*-mutiertem PTC ist im Verlauf des Follow-ups aufgrund tumorbedingter Komplikationen verstorben.

Tabelle 49 - Klinische und pathologische Daten in Bezug auf den *BRAF*-Status

Merkmal	<i>BRAF</i> -Status		Univariate Analyse			
	Wildtyp n=64 (37,6%)	<i>BRAF</i> - Mutation n=106 (62,4%)	Odds- Ratio bei logisti- scher Re- gression	Regres- sions- koeffizient bei linearer Regression	97,5% Konfi- denz- intervall	p- Wert
Klinische Daten						
Medianes Alter	47,00 Jahre	48,50 Jahre		5,922	0,196 – 11,648	0,021
Geschlecht						
Weiblich	43 (67,2%)	74 (69,8%)	Ref			
Männlich	21 (32,8%)	32 (30,2%)	1,129		0,527 – 2,420	0,721
Medianes Follow-up	55,50 Monate (\pm 4,63 Jahre)	53,50 Monate (\pm 4,46 Jahre)				
Rezidiv						
Nein	56 (87,5%)	91 (85,8%)	Ref			
Ja	8 (12,5%)	15 (14,2%)	1,154		0,403 – 3,306	0,761
Fernmetastasen im Verlauf des Follow-ups						
Nein	62 (96,9%)	103 (97,2%)	Ref			
Ja	2 (3,1%)	3 (2,8%)	0,903		0,113 – 7,210	0,912
Radiojodtherapie durchgeführt						
Nein	6 (9,4%)	20 (18,9%)				
Ja	58 (90,6%)	86 (81,1%)				
Radiojodrefraktäre Erkrankung						
Nein	55 (94,8%)	77 (89,5%)	Ref			
Ja	3 (5,2%)	9 (10,5%)	2,143		0,457 – 10,053	0,269
Tumorbedingte Todesfälle						
Nein	64 (100%)	105 (99,1%)				
Ja	0	1 (0,9%)				
Histologische Daten						
Mediane Tumgröße	15,00 mm	12,00 mm		-7,045	-13,913 – 0,177	0,022

Merkmal	BRAF-Status		Univariate Analyse			
	Wildtyp n=64 (37,6%)	BRAF-Mutation n=106 (62,4%)	Odds-Ratio bei logisti- scher Re- gression	Regres- sions- koeffizient bei linearer Regression	97,5% Konfi- denz- intervall	p- Wert
Fokalität						
Unifokal	53 (82,8%)	70 (66,0%)	Ref			
Multifokal	11 (17,2%)	36 (34,0%)	2,478		1,035 – 5,935	0,020
Histologischer Subtyp						
Klassisch	35	85 (80,2%)	Ref			
Follikulär	29	16 (15,1%)	0,227		0,099 – 0,521	< 0,001
Onkozytär*	0	3 (2,8%)				
Solide*	0	2 (1,9%)				
Begleitende Thyreoiditis						
Nein	46 (71,9%)	73 (68,9%)	Ref			
Ja	18 (28,1%)	33 (31,1%)	1,155		0,529 – 2,522	0,679
Lymphknotenmetastasen						
Nein (pN0)	20 (31,3%)	50 (47,6%)	Ref			
Ja (pN1, pN1a, pN1b)	23 (35,9%)	39 (37,1%)	0,678		0,294 – 1,565	0,298
Keine Lymph- knoten unter- sucht/ unbe- kannt (pNX)	21 (32,8%)	16 (15,2%)				
Anzahl tumor- befallener Lymphknoten pro Individuum	Median 0,00 Mittelwert 3,56	Median 0,00 Mittelwert 2,42		-1,139	-3,307 – 1,028	0,236
*Der onkozytäre und solide Subtyp wurden nicht in die statistische Analyse einbezogen.						

Tabelle 50 - Klinische und pathologische Daten in Bezug auf den *RAS*-Status

Merkmal	RAS-Status		Univariate Analyse			
	Wildtyp (oder <i>BRAF</i> - Mutation) n=158	<i>NRAS</i> -, <i>HRAS</i> - oder <i>KRAS</i> - Mutation n=12	Odds- Ratio bei logisti- scher Re- gression	Regres- sions- koeffizient bei linearer Regression	97,5% Konfi- denz- intervall	p- Wert
Klinische Daten						
Medianes Alter	48,00 Jahre	44,00 Jahre		1,950	-9,050 – 12,951	0,689
Geschlecht						
Weiblich	106 (67,1%)	11 (91,7%)	Ref			
Männlich	52 (32,9%)	1 (8,3 %)	0,185		0,017 – 1,986	0,111
Medianes Follow-up	53,50 Monate	60,00 Monate				
Rezidiv						
Nein	137 (86,6%)	10 (83,3%)	Ref			
Ja	21 (13,4%)	2 (16,7%)	1,305		0,213 – 8,004	0,742
Fernmetastasen im Verlauf des Follow-ups						
Nein	154 (97,5%)	11 (91,7%)	Ref			
Ja	4 (2,5%)	1 (8,3%)	3,500		0,259 – 47,206	0,280
Radiojodtherapie durchgeführt						
Nein	26 (16,5%)	0 (0%)				
Ja	132 (83,5%)	12 (100%)				
Radiojodrefraktäre Erkrankung						
Nein	146 (92,4%)	12 (100%)	Ref			
Ja	12 (7,6%)	0 (0%)	0			0,999
Tumorbedingte Todesfälle						
Nein	157 (99,4%)	12 (100%)				
Ja	1 (0,6%)	0				
Histologische Daten						
Mediane Tumorgroße	12,00 mm	34,00 mm		11,071	-1,631 – 23,774	0,050

Merkmal	RAS-Status		Univariate Analyse			
	Wildtyp (oder <i>BRAF</i> - Mutation) n=158	<i>NRAS</i> -, <i>HRAS</i> - oder <i>KRAS</i> - Mutation n=12	Odds- Ratio bei logisti- scher Re- gression	Regres- sions- koeffizient bei linearer Regression	97,5% Konfi- denz- intervall	p- Wert
Fokalität						
Unifokal	112 (70,9%)	11 (91,7%)	Ref			
Multifokal	46 (29,1%)	1 (8,3%)	0,221		0,021 – 2,377	0,154
Histologischer Subtyp						
Klassisch	118 (74,7%)	2 (16,7%)	Ref			
Follikulär	35 (22,2%)	10 (83,3%)	16,857		2,817 – 100,862	< 0,001
Onkozytär*	3 (1,9%)	0 (0%)				
Solide*	2 (1,3%)	0 (0%)				
Begleitende Thyreoiditis						
Nein	111 (70,3%)	8 (66,7%)	Ref			
Ja	47 (29,7%)	4 (33,3%)	1,181		0,283 – 4,919	0,794
Lymphknotenmetastasen						
Nein (pN0)	66 (41,8%)	4 (33,3%)	Ref			
Ja (pN1, pN1a, pN1b)	61 (38,6%)	1 (8,3%)	0,270		0,021 – 3,421	0,248
Keine Lymph- knoten untersucht/ unbekannt (pNX)	31 (19,6%)	7 (58,3%)				
Anzahl tumor- befallener Lymphknoten pro Individuum	Median: 0,00 Mittelwert: 3,05	Median: 0,00 Mittelwert: 0,33		-2,718	-6,795 – 1,359	0,134
*Der onkozytäre und solide Subtyp wurden nicht in die statistische Analyse einbezogen.						

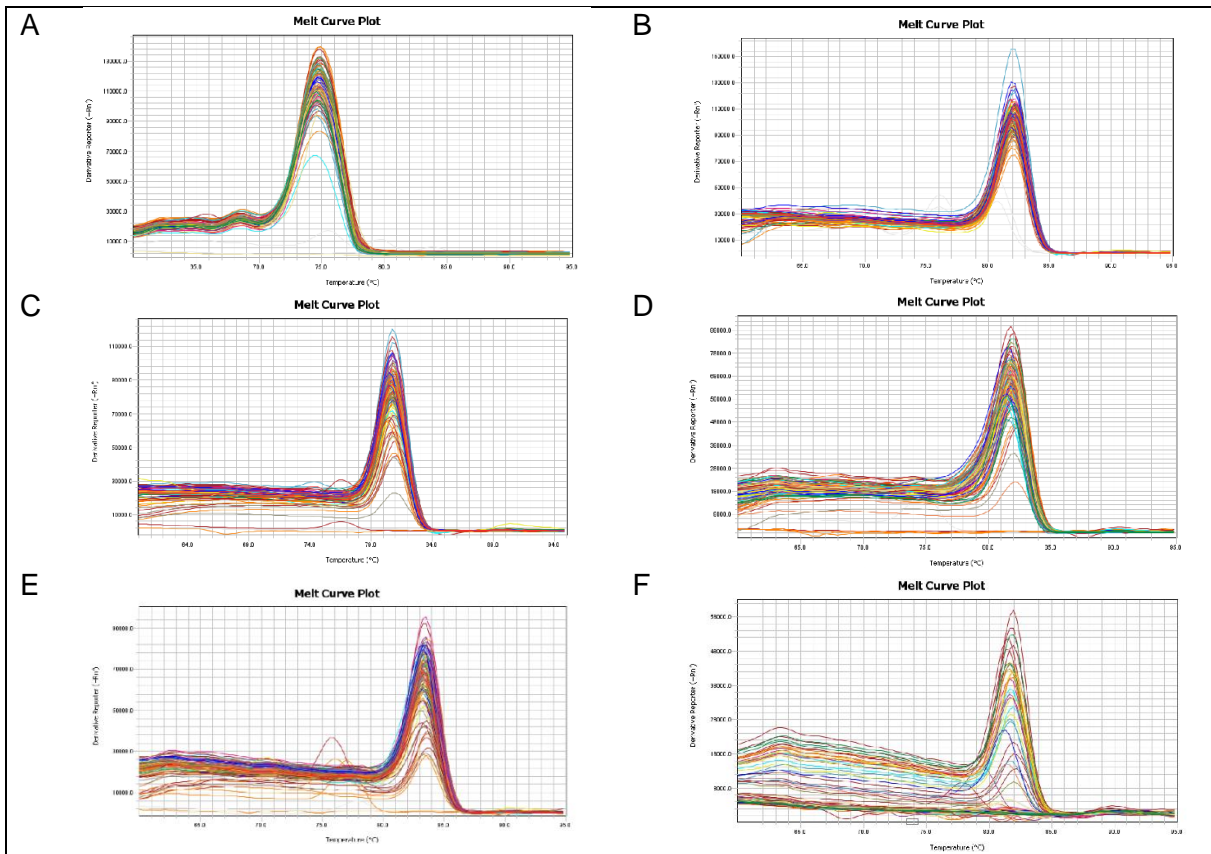


Abbildung 42 - Schmelzkurvenanalyse

Die Schmelzkurvenanalyse dient zur Beurteilung, ob eine spezifische Amplifikation der Zielgene erfolgt ist. Dargestellt sind die Schmelzkurven der Referenzgene *ACTB* (A) und *GAPDH* (B) sowie der Zielgene *GABPB1* (C), *GABPB2* (D), *GADD45B* (E) und *TERT* (F).

10 Danksagung

Ich möchte mich bei allen, die mich während der Anfertigung der Doktorarbeit unterstützt haben, an dieser Stelle ganz herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn, Leiter der Endokrinen Chirurgie und stellvertretender Direktor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Universitätsmedizin Mainz, für die Vergabe des interessanten und anspruchsvollen Themas und die Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Frau aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie danke ich sehr für die gute Betreuung und die Identifikation des Patientenkollektivs mit den dazugehörigen klinischen Daten.

Herzlichen Dank sage ich Herrn, der als Direktor des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz diese Arbeit ermöglichte.

Besonders bedanke ich mich bei meinem Betreuer Herrn (Molekularpathologie, Leitung NGS) für die große Unterstützung im naturwissenschaftlichen Bereich und bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Ebenso vielen Dank an alle anderen, die an dem Projekt mitgewirkt haben. Ich danke Herrn (Ärztliche Leitung Molekularpathologie) für die Begutachtung der Gewebeschnitte, Frau für die Anfertigung der Gewebeschnitte, Frau für das Überlassen der DNA-Proben und der Analysen bezüglich weiterer Mutationsanalysen und Frau (Team Forschung) für die Bereitstellung von Primern für die Genexpressionsanalyse.

Außerdem möchte ich mich bei dem gesamten Team der Molekularpathologie um Frau (Team Diagnostik) für die große Hilfsbereitschaft bedanken. Ich fand eine gut organisierte und kollegiale Arbeitsatmosphäre vor. Insbesondere möchte ich mich bei Frau (Team Forschung) für die gute Einarbeitung zu Beginn und für die Hilfe im Labor bedanken.

Besonderer Dank auch an Herrn (Institut für Pathologie), der das Einscannen der Gewebeschnitte ermöglicht hat.

Frau des Instituts für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) danke ich für die statistische Beratung.

Abschließend danke ich meinen Eltern und Freunden für die Ermutigung während der Erstellung der Dissertation.

11 Lebenslauf