

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Diagnostik

Institut für Pathologie mit Molekularpathologie und Zytopathologie

Institutsdirektor

Prof. Dr. med. Guido Sauter

Thyreoglobulin Expression in humanen Tumor- und Normalgeweben

Eine Tissue Microarray-Studie an 3448 Tumoren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
an der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Jana Schneider
aus Münster

Hamburg 2019

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 12.06.2020

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Guido Sauter

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Jens Aberle

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Bedeutung von Tumorerkrankungen.....	1
1.1.1 Tumorentstehung	2
1.1.2 Risikofaktoren.....	3
1.1.3 Symptome	4
1.1.4 Therapieansätze.....	4
1.1.5 Tumoruntersuchung in der Pathologie	6
1.1.6 Immunhistochemie in Tumoren	7
1.2 Thyreoglobulin.....	7
1.2.1 Proteinstruktur	7
1.2.2 Proteinfunktion.....	8
1.2.3 Schilddrüsenhormon-Biosynthese.....	8
1.2.4 Thyreoglobulin-Expression in Tumorgewebe	11
2 FRAGESTELLUNG.....	14
3 MATERIAL UND METHODEN.....	15
3.1 Tissue Microarray-Technik.....	15
3.2 Tissue Microarray-Herstellung	17
3.3 Normalgewebe- / Multitumor-Array	26
3.3.1 Normalgewebe-Array.....	26
3.3.2 Multitumor-Array	27
3.4 Immunhistochemische Färbung.....	27
3.4.1 Verwendeter Antikörper.....	27
3.4.2 Verwendete Reagenzien:	28
3.4.3 Verwendete Geräte:	28

3.4.4	Immunohistochemisches Färbeprotokoll Thyreoglobulin:	28
3.5	Auswertung der Immunhistochemie.....	29
4	ERGEBNISSE.....	30
4.1	Normalgewebe-Array	30
4.2	Multitumor-Array.....	30
5	DISKUSSION	37
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	47
7	SUMMARY	48
8	LITERATURVERZEICHNIS	49
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	57
10	TABELLENVERZEICHNIS.....	59
11	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	60
12	SYMBOLVERZEICHNIS	62
13	ANHANG.....	63
13.1	Datenblatt für den Antikörper Thyreoglobulin	63
13.2	Übersichten vom MTA 5.2. und NTA 9.....	67
13.3	Ausgewählte Ergebnisbilder	69
14	DANKSAGUNG.....	76
15	LEBENS LAUF.....	78
16	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	79

1 EINLEITUNG

1.1 Bedeutung von Tumorerkrankungen

Laut der „World Health Organization“ zählen maligne Tumoren zu den häufigsten Erkrankungen weltweit (WHO 2014). Mehr als die Hälfte aller Menschen erkranken im Laufe ihres Lebens an einem bösartigen Tumor und knapp ein Viertel aller Menschen versterben an den Folgen eines Tumorleidens (Robert Koch-Institut 2017). US-Amerikanische Hochrechnungen prophezeien für das Jahr 2019 1.762.450 neue Krebserkrankungen und 606.880 Krebstodesfälle alleine in den Vereinigten Staaten (Siegel et al. 2019). Die häufigsten und somit wichtigsten Krebserkrankungen und Krebstodesursachen unterscheiden sich bei Männern und Frauen (vgl. Abbildung 1). Beim Mann ist das Prostatakarzinom die häufigste Krebserkrankung, gefolgt vom Bronchialkarzinom, Kolorektalkarzinom, Harnblasenkarzinom und dem malignen Melanom. Bei der Frau dominiert das Mammakarzinom, gefolgt vom Lungenkarzinom, Kolorektalkarzinom, Uteruskarzinom und dem Melanom der Haut. Bei den Todesfällen nehmen die häufigsten Tumoren (Prostatakarzinom, Mammakarzinom) wegen ihrer verhältnismäßig günstigen Prognose jeweils in ihrer Geschlechtergruppe nur den zweiten Platz ein. Die häufigste Todesursache durch ein Karzinom ist bei Männern und Frauen das Bronchialkarzinom. Auch das Pankreaskarzinom ist unter den Krebstodesfällen häufiger vertreten als unter den Neuerkrankungen (Siegel et al. 2019). Ein entscheidender Grund hierfür liegt in der sehr niedrigen 5-Jahres Überlebensrate dieses Tumors von weniger als 10% (Robert Koch-Institut 2017).

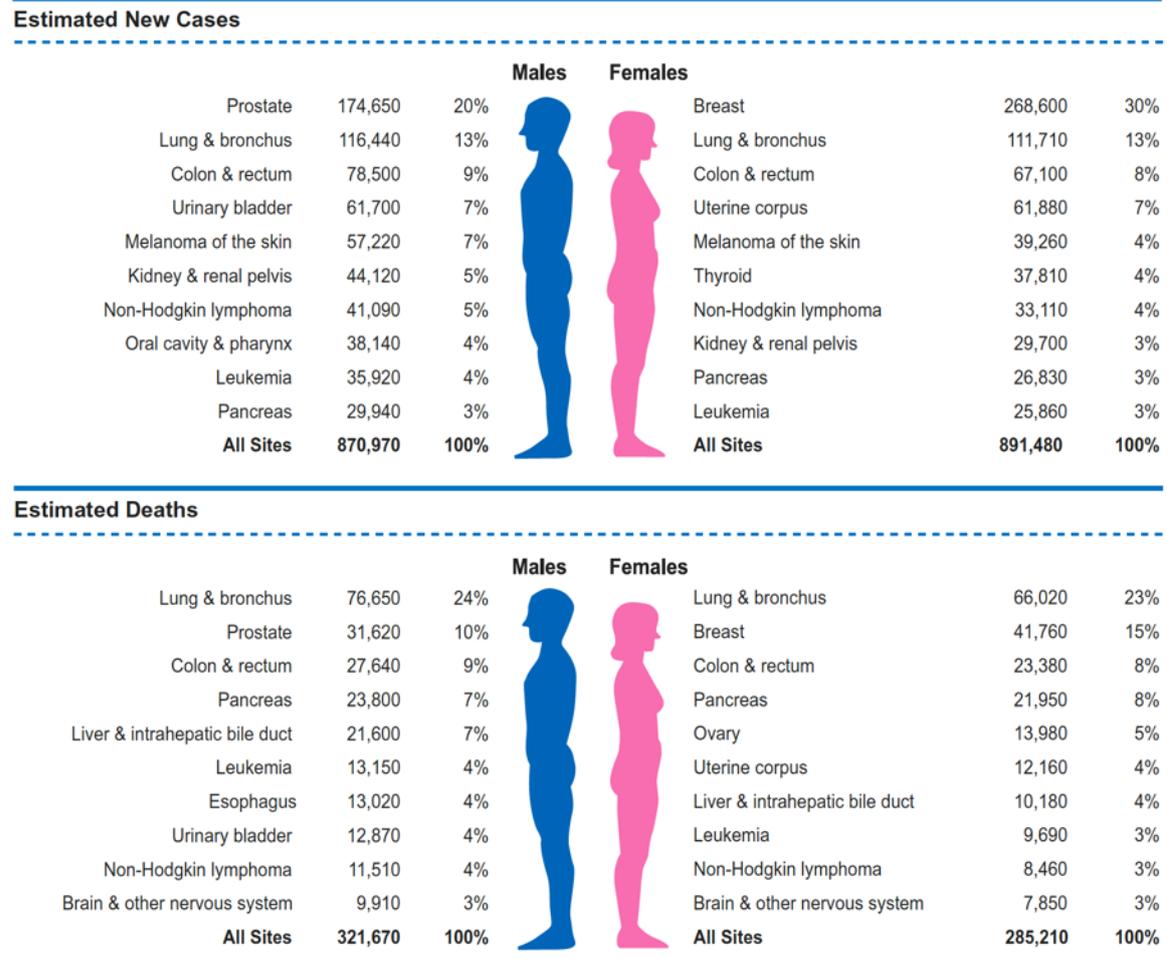


Abbildung 1: Die zehn prävalenten Tumortypen für die geschätzten neuen Krebsfälle und Krebstodesfälle, unterschieden im Geschlecht, United States, 2019.

Die Schätzungen sind auf ein Zehntel gerundet. Dabei sind Basalzellkarzinome, Plattenepithelkarzinome der Haut und *Carcinoma in situ* (ausgenommen der Harnblase) nicht miteingeschlossen. Das Ranking basiert auf geformten Projektionen und kann von den kürzlich beobachteten Daten abweichen. Entnommen aus Siegel et al., 2019.

1.1.1 Tumorentstehung

Tumoren entstehen in verschiedenen Geweben, aber weisen die gleichen Kennzeichen auf, die sog. „Hallmarks of Cancer“. Grundlage der Tumorentstehung sind Veränderungen in der DNA, die bei ausreichender Vielzahl dazu führen, dass die Tumorzellen im Gegensatz zu ihren Ursprungszellen autonom wachsen und nicht mehr den physiologischen wachstumsbegrenzenden Signalen unterliegen. Die Fähigkeit zum unbegrenzten Wachstum entsteht durch eine Akkumulation von Veränderungen in der DNA, die mit Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen einhergehen (Hanahan and Weinberg 2011). Eine bedeutende Rolle spielen dabei Gene, die zu einer vermehrten genetischen Instabilität führen und somit die Entstehung von weiteren zusätzlichen genomischen

Veränderungen begünstigen. DNA-Reparaturgene sorgen in gesunden Zellen dafür, dass diese Punktmutationen oder DNA-Brüche (die Grundlage für Deletionen und Amplifikationen von genomischem Material) repariert werden. Ausbleibende Reparaturen führen zur Akkumulation von Veränderungen in der DNA und tragen damit zur Tumorentstehung bei (Negrini et al. 2010). Ein wesentlicher Schutzmechanismus von Zellen zur Vermeidung von Entartungen ist die Apoptose-Einleitung. Damit haben Zellen die Möglichkeit sich selbst zu eliminieren, wenn gefährliche DNA-Veränderungen vorliegen. Auch dieser Mechanismus gehört zu den physiologischen Fähigkeiten einer Zelle. Bei genetischen Schäden ist der Verlust der Fähigkeit zur Apoptose-Einleitung ein charakteristisches Kennzeichen der Tumorentstehung (Fernald and Kurokawa 2013).

Während der Entwicklung einer normalen Zelle in eine hochmaligne Krebszelle sammeln sich im Laufe der zahlreichen dazu nötigen Zellteilungen immer mehr genetische Aberrationen an, sodass letztendlich tausende von Mutationen in einem solchen Tumor vorliegen. Die meisten dieser Mutationen sind sogenannte „Passanger“ Mutationen. Diese sind biologisch nicht relevant, weil sie den betroffenen Tumorzellen keinen Wachstums- oder Überlebensvorteil bieten. Nur verhältnismäßig wenige Mutationen führen bei betroffenen Zellen zu einem Wachstumsvorteil (Stratton et al. 2009).

1.1.2 Risikofaktoren

Entsprechend der uniformen molekularen Pathogenese von Tumoren unterschiedlicher Organsysteme sind auch die Risikofaktoren für die Entstehung verschiedener Krebsarten ähnlich. Im Wesentlichen sind alle exogenen oder endogenen Einflüsse, welche die Entstehung von DNA-Schäden begünstigen, potentiell krebserzeugend (Ames 1989; Wu et al. 2018). Dazu gehört die Exposition von Zellen gegenüber Schadstoffen, wie radioaktiver oder UV-Strahlung, chemischen Substanzen oder exogenen Noxen, die besonders bei Rauchern (Alexandrov et al. 2016) oder Bewohnern von Gebieten mit extrem hoher Luftverschmutzung auftritt (Risom et al. 2005).

1.1.3 Symptome

Auch die Symptome von Tumorerkrankungen unterscheiden sich zwischen den einzelnen Tumorarten grundsätzlich wenig. Primärtumoren zeigen meist keine oder nur wenige Symptome und werden heute häufig durch Vorsorgeuntersuchungen oder zufällig im Rahmen einer anderweitig indizierten medizinischen Untersuchung entdeckt (Wardle et al. 2015). Bedingt durch ihre spezifische Lage, erzeugen Primärtumoren auch lokale Symptome. Beispielsweise kann es beim Kolontumor zu Darmverschlüssen (Cappell 2008), beim Magenkarzinom zu Blutungen (Axon 2006), beim Ösophaguskarzinom zu Schluckstörungen (Enzinger and Mayer 2003) oder beim Lungenkarzinom, bei entsprechender Reizung der Luftröhren, zu Husten kommen (Hamilton et al. 2005).

1.1.4 Therapieansätze

Werden Primärtumoren früh genug diagnostiziert, besteht die Möglichkeit zur Heilung durch eine chirurgische Entfernung oder eine lokale Bestrahlung. Wenn ein Tumor bereits metastasiert hat, ist die Prognose *quoad vitam* schlechter. Metastasen sind für mehr als 90% der Krebs-assoziierten Todesfälle verantwortlich. Dieser Teil der Tumorpathogenese ist noch nicht vollständig verstanden und führt dazu, dass die meisten dieser Patienten letztlich an ihrem Tumor und dessen Auswirkungen versterben (Steeg 2006).

Metastasen können grundsätzlich über drei verschiedene Mechanismen zum Tode führen. Sie können ein (i) unbeherrschbares lokales Problem erzeugen, wie z.B. Hirndruck im Falle einer Hirnmetastase oder eine tödliche Blutung bei Einbruch in ein wichtiges Gefäß. Zudem können Metastasen auch (ii) zur vollständigen Zerstörung lebenswichtiger Organe führen, wie beispielsweise im Falle einer Lebermetastasierung, welche letztlich zum Tod im Leberkoma führt. Darüber hinaus führen nicht wenige Tumoren, im Wesentlichen durch die Sezernierung von Stoffen, die den Metabolismus grundsätzlich stören, zu einem (iii) körperlichen Zerfall (Kachexie) der betroffenen Patienten (Steeg 2006; Fearon et al. 2012).

Die Therapie von metastasierten Tumoren kann nur medikamentös erfolgen. Dabei hat sich das Arsenal der möglichen Therapien in den letzten Jahrzehnten bedeutsam verbessert. Die klassische systemische Tumorthherapie besteht in einer

zytostatischen Chemotherapie mit Substanzen, die grundsätzlich die Zellproliferationen hemmen und damit die am schnellsten wachsenden Gewebe eines Körpers (typischerweise die Tumorzellen) am meisten treffen (Galluzzi et al. 2015; Karow and Lang-Roth 2018). Besonders rasch proliferierende Tumoren, wie Lymphome oder Hodentumoren, können sehr stark auf eine reine Zytostatika-Therapie ansprechen, sodass solche rasch wachsenden Tumortypen in einem Teil der Fälle durch eine alleinige zytostatische Therapie sogar geheilt werden können (Albers et al. 2005). Ein Nachteil der zytostatischen Therapie sind die erheblichen Nebenwirkungen, die sich auf rasch proliferierende Organe und Gewebe auswirken, wie beispielsweise die Blutbildung oder die Darmschleimhaut (He et al. 2017).

Bei hormonabhängigen Tumoren, wie beispielsweise bei Karzinomen der Mamma, der Prostata oder der Schilddrüse, kommen Therapien zum Einsatz, die direkt in den Hormonhaushalt bzw. Stoffwechsel, dieser Tumoren eingreifen. Beim Mamma- und Prostatakarzinomen greifen spezifische Therapien in den Hormonhaushalt der Zellen ein (Androgenrezeptor, Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor) (Xu et al. 2009). Beim Schilddrüsenkarzinom wird die Iodabhängigkeit der Tumoren durch radioaktiv markierte Iodsubstanzen therapeutisch ausgenutzt (Maxon et al. 1992). Vor allem differenzierte Schilddrüsenkarzinome sind weitestgehend in der Lage, mittels Stimulation durch das Thyreoidea-stimulierende Hormon (TSH), Iod in den Zellen aufzunehmen und zu fixieren. Besonders nach einer chirurgischen Behandlung, wie der Thyreoidektomie, kann mit selektiver Bestrahlung durch systemische Radioiodgabe mit dem Radioisotop Iodine-131 (¹³¹I) postoperatives Tumorrestgewebe vollständig eliminiert werden, ohne dass umliegendes nichtthyreoidales Gewebe geschädigt wird (Dietlein et al. 2007).

Weitere Therapieoptionen stellen sogenannte gezielte molekulare Therapien dar, bei denen molekulare Veränderungen, welche im Tumor, aber nicht im Normalgewebe bestehen, gezielt mit einem Medikament angegangen werden. Das Paradebeispiel hierfür ist die 1998 von der amerikanischen „Food and Drug Administration“ erstmals zugelassene Herzeptin® (Trastuzumab) -Therapie beim Mammakarzinom (Carter et al. 1992; Baselga et al. 1998; Vu and Claret 2012). Hierbei erzielten Antikörper, die gegen HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) gerichtet waren, bei HER2 positiven Mammakarzinomen spektakuläre therapeutische Erfolge bis hin zu dauerhaften Heilungen (Hudis 2007). HER2 wird

in normalen Zellen kaum exprimiert, bei 20-30% der Mammakarzinome hingegen durch eine Genamplifikation massiv überexprimiert und stellt somit ein hervorragendes Therapieziel dar (Slamon et al. 1987; Owens et al. 2004).

Seit wenigen Jahren besteht auch die Möglichkeit, nicht den Tumor direkt anzugreifen, sondern mit medikamentösen Mitteln das Immunsystem des Tumorpatienten so zu beeinflussen, dass die physiologische Immunabwehr das Tumorstadium hemmt oder im Optimalfall einen bereits bestehenden Tumor vollständig eliminiert. Die vorwiegend zum Einsatz kommenden Immuntherapien sind derzeit Immuncheckpoint-Inhibitoren, wobei überwiegend das Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) / Programmed Cell Death Protein 1 (PD1) - Regelsystem angegangen wird (Freeman et al. 2000; Topalian et al. 2012; Guan et al. 2017).

1.1.5 Tumoruntersuchung in der Pathologie

Praktisch alle Tumorerkrankungen werden anhand von bioptisch entnommenem Tumormaterial durch einen Pathologen diagnostiziert. Die Rolle des Pathologen hat sich dabei in den letzten Jahrzehnten drastisch verändert. Die histopathologische und molekulare Aufarbeitung von Tumorproben ist nicht nur für die Diagnose, sondern auch für die korrekte und optimale Therapie der betroffenen Patienten von entscheidender Bedeutung. Bei der Beurteilung des Gewebes trifft der Pathologe zahlreiche wichtige Entscheidungen. Zunächst wird festgestellt, ob es sich um einen malignen oder benignen Tumor handelt. Handelt es sich um einen malignen Tumor wird eine Malignitätsgradierung ausgeführt, welche typischerweise zwei bis drei Kategorien enthält (z.B. low grade, intermediate grade, high grade). Daraufhin wird das Tumorstadium (pT) festgelegt und mit der Untersuchung der Lymphknoten der pN-Status bestimmt. In den meisten Fällen erkennt der Pathologe von Beginn an, um welche Art von Tumor es sich handelt, vorausgesetzt, dass bei einem Patienten zuerst der Primärtumor diagnostiziert wird. Bei einem Teil der Krebspatienten entstehen Symptome allerdings erst durch eine Metastase, die dementsprechend zuerst entdeckt und biopsiert wird. In dieser Situation ist die Zuordnung eines Tumors zu seinem Ursprungsorgan schwierig, denn viele Tumorarten weisen keine organspezifische Morphologie auf. Beispielsweise können Adenokarzinome aus der Prostata, dem Darm, dem Pankreas, dem Magen, dem Ösophagus oder auch der

Lunge entstammen und selbst Schilddrüsenkarzinome gleichen mit ihrer follikulären Struktur Adenokarzinomen (Oien 2009).

1.1.6 Immunhistochemie in Tumoren

Bei Metastasen muss der Ursprungsort des Tumors, wenn sich dieser nicht klinisch ermitteln lässt, durch eine immunhistochemische (IHC) Untersuchung bestimmt werden (Conner and Hornick 2015). Dabei werden Marker eingesetzt, die im Optimalfall gewebespezifisch sind, also nur in einem bestimmten Gewebetyp vorkommen. Typische Beispiele hierfür sind die prostataspezifischen Marker Prostataspezifisches Antigen (PSA) und das Prostataspezifische Membranantigen (PSMA) (Oesterling 1991; Silver et al. 1997). Bei der Nutzung solcher gewebespezifischen Proteine zur Zuordnung von Tumoren ist es von außerordentlicher Bedeutung, dass sich der Pathologe auf die Spezifität der von ihm verwendeten Antikörper verlassen kann (Bernacki et al. 2014; Gremel et al. 2014). Wird nämlich aufgrund einer PSA-Positivität bei einer Adenokarzinom-Metastase die Diagnose Prostatakarzinom gestellt, führt dies zu einer antiandrogenen Behandlung, die bei einem Prostatakarzinom einen erheblichen klinischen Effekt aufweist, bei anderen Tumorarten aber völlig nutzlos ist und somit bei dem Patienten nur die Nebenwirkungen einer chemischen Kastration hinterlässt (Petraki and Sfikas 2007; Ricci et al. 2014). Tatsächlich gibt es Studien, welche eine PSA-Positivität auch in anderen Tumoren, außer den Prostatakarzinomen, gezeigt haben. Beispielsweise wurde eine PSA-Positivität in Mammakarzinomen oder Speicheldrüsentumoren in teilweise hoher Häufigkeit beschrieben (Magklara et al. 2000; Olsson et al. 2005; Perez-Ibave et al. 2018).

1.2 Thyreoglobulin

Thyreoglobulin (Tg) ist ein Protein, das im Schilddrüsenepithel von den Thyreozyten gebildet wird.

1.2.1 Proteinstruktur

Das 660-kDa große Glykoprotein wird ausschließlich und speziell von den Follikel epithelzellen, den Thyreozyten, der Schilddrüse produziert. Das Tg-Molekül

besteht aus zwei identischen Untereinheiten, die ausgedehnte posttranslatorische Modifikationen durchlaufen, dazu zählen Glykolysierung, Phosphorylierung, Sulfatierung und Iodierung (Van Herle et al. 1979a, b). Im Tg-Protein wurden 134 Tyrosin-Moleküle und einige weitere Aminosäuren nachgewiesen. Davon sind etwa 20% iodiert. Die primäre Struktur des humanen Tgs ist von ihrer komplementären DNA-Sequenz abgeleitet, die aus 8448 Basen besteht (Malthiery and Lissitzky 1987).

1.2.2 Proteinfunktion

Im Tg-Molekül werden Iod und die Schilddrüsenhormone Triiodthyronin (T3) und Thyroxin (T4) in ihrer inaktiven Form, innerhalb des Follikellumen aufbewahrt. Dadurch bildet Tg den Hauptbestandteil des Kolloids. Gleichzeitig stellt Tg eine Vorläufer-Form der Biosynthese der Schilddrüsenhormone T3 und T4 dar, die nur durch die Interaktion mit Iod stattfinden kann (van de Graaf et al. 2001; Xavier et al. 2016). Iod muss aktiv mit der Nahrung aufgenommen werden, daher treten Unterschiede in der Inzidenz auf, abhängig von der geographischen Lage (Delange 1994; Zimmermann 2009).

Bei einem Überfluss an Schilddrüsenhormonen wird Tg Megalin vermittelt (Marino et al. 2000), ohne lysosomale Aufspaltung, durch die Zelle transportiert und durch Exozytose am basolateralen Pol der Thyreozyten in den Blutstrom abgegeben (vgl. Abbildung 2). Dadurch wird die Biosynthese der Schilddrüsenhormone zudem durch ein negatives Feedback System des Tgs autokrin reguliert (Suzuki et al. 1998; Marinò and McCluskey 2000).

1.2.3 Schilddrüsenhormon-Biosynthese

Die gesamte Biosynthese der Schilddrüsenhormone, und damit die Transkription des Tg-Gens als Vorläufer von T3 und T4, ist ein komplexes System und ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Allein die Transkription vom Tg-Gen ist abhängig von den Transkriptionsfaktoren Paired-Box-Protein (PAX8) (Zannini et al. 1992), Homeobox-Gen NK2 Homeobox 2 (abgekürzt NKX2-1 oder TTF-1, thyroid transcription factor-1) (Lazzaro et al. 1991) und Forkhead-Box-Protein E1 (FOXO1 oder TTF-2, thyroid transcription factor-2) (Zannini et al. 1997). Das Vorkommen

und die Interaktion speziell von PAX8 und TTF-1 treten so nur in der Schilddrüse auf (Di Palma et al. 2003). Zudem ist eine Interaktion der drei Transkriptionsfaktoren mit dem Coaktivator p300 an der Promoter Region des Tg-Gens essentiell (Grasberger et al. 2005). Das Ausmaß an Tg-mRNA Expression wird darüber hinaus über die Stimulation der Thyroid Adenylatzyklase durch TSH reguliert (Van Heuverswyn et al. 1984; Gerard et al. 1989; Postiglione et al. 2002).

Nach vielen post-translationalen Modifikationen im endoplasmatischen Retikulum hinsichtlich der Sekretion und Iodination wird Tg durch Exozytose in das Lumen der Follikel sezerniert. Iodid-Ionen werden durch Natrium-Iodid-Symporter (NIS) in die Thyreozyten eingeschleust (Dai et al. 1996) und mit der Stimulation von TSH durch die Zelle transportiert (Carvalho and Dupuy 2017). An der apikalen Oberfläche der Thyreozyten wird Iod durch das Protein Pendrin in das Lumen der Follikel geschleust (Royaux et al. 2000). Im Follikellumen findet im weiteren Verlauf der Biosynthese von den Schilddrüsenhormonen die Iodination von Tg statt. Dabei spielt die Thyroid Peroxidase (TPO) eine entscheidende katalytische Rolle. Genauso wie Tg ist auch TPO abhängig von den Transkriptionsfaktoren PAX8, NKX2-1 und FOXE1 (Ruf and Carayon 2006). TPO wird durch Wasserstoffperoxidase (H_2O_2) oxidiert, das an der apikalen Membranoberfläche der Thyreozyten von Dualoxidase 2 (DUOX2) produziert wird. Die oxidierte TPO ist in der Lage Iodid-Ionen zu ihrer reaktiven Form zu oxidieren. Diese sehr reaktive Form von Iod bindet an einen Tyrosylrest des Tgs und bildet Monoiodotyrosine (MIT) und Diiodotyrosine (DIT), weiterhin gebunden am Tg-Molekül. Im nächsten Schritt werden MIT/DIT mit einem weiteren DIT miteinander gekoppelt, wodurch T3 und T4 entstehen (Dunn and Dunn 2001; Ruf and Carayon 2006; Carvalho and Dupuy 2017). Das iodierter Tg wird, wiederum von TSH stimuliert, durch Endozytose, teilweise Megalin Rezeptor-vermittelt (Marino et al. 2000), in die Zelle eingeschleust. Intrazellulär erfolgt einer von drei möglichen Abläufen. Einerseits wird das Tg-Molekül (i) direkt durch die Zelle transportiert und in die Blutbahn abgegeben, andererseits findet (ii) eine lysosomale Aufspaltung des Tg-Moleküls statt. Dabei entstehen T3, T4, MIT, DIT und weitere Iodotyrosine. T3 und T4 werden durch entsprechende Transporter, beispielsweise dem MCT8 (Monocarboxylate Transporter 8) (Di Cosmo et al. 2010), an der basolateralen Plasmamembran in den Blutkreislauf abgegeben. MIT, DIT, weitere Iodotyrosine und Tg werden deiodiert

und recycelt. (iii) Schwach iodiniertes Tg wird direkt recycelt und im Follikellumen neu Iodiniert. (Dunn and Dunn 2001; Carvalho and Dupuy 2017).

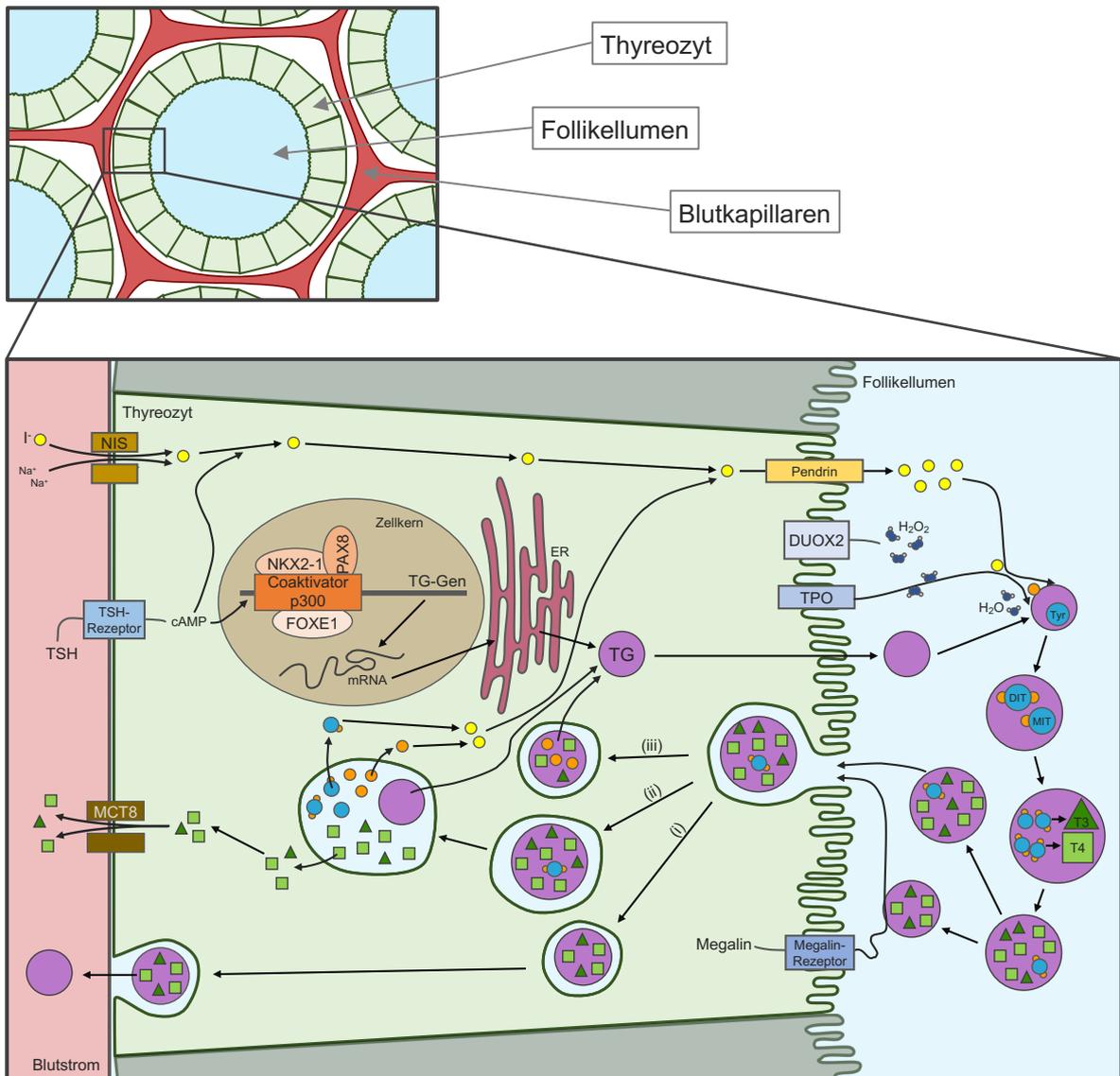


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Schilddrüsenhormon-Biosynthese

Die Transkription des Tg-Gens ist abhängig von NKX2-1, PAX8, FOXE1 und dem Coaktivator p300 und wird durch TSH stimuliert. Im ER finden post-translationale Modifikationen statt und das fertig gefaltete Tg-Protein wird ins Follikellumen ausgeschleust. Iodid gelangt über den NIS in den Thyreozyten und wird mit Hilfe von TSH durch die Zelle transportiert und über einen Iodidkanal ins Follikellumen geleitet. Hier findet durch H₂O₂, das mit der DUOX2 produziert wird, und der TPO die Iodination von Tg statt. Reaktives Iod bindet an Tyrosylreste und bildet damit MIT und DIT. Gebunden am Tg-Molekül koppeln diese sich zu T₃ und T₄. Tg wird durch Endozytose, teilweise Megalin Rezeptor-vermittelt, wieder in die Zelle eingeschleust. (i) Tg wird direkt durch die Zelle ins Blut abgegeben. (ii) Tg wird lysosomal gespalten. T₃ und T₄ werden über Transporter, wie MCT8, in die Blutbahn abgegeben. DIT, MIT, weitere Iodotyrosine und Tg werden recycelt. (iii) Schwach iodiniertes Tg wird direkt recycelt.

Tg: Thyreoglobulin; NKX2-1: Hämobox-Gen NK2 Homebox 2; PAX8: Paired-Box-Protein; FOXE2: Forkhead-Box-Protein E1; TSH: Thyreoidea-stimulierendes Hormon; ER: endoplasmatisches Retikulum; NIS: Natrium-Iodid-Symporter; DUOX2: Dualoxidase 2; TPO: Thyroid Peroxidase; T₃: Triiodthyronin; T₄: Thyroxin; MCT8: Monocarboxylate Transporter 8; Tyr: Tyrosylrest; mRNA: engl. messenger ribunucleic acid

Zusammenfassend sind mindestens vier Moleküle nötig, die an der apikalen Plasmamembran interagieren müssen, damit die Biosynthese der Schilddrüsenhormone stattfinden kann: Iod, Tg, H₂O₂, TPO

Insgesamt reguliert follikuläres Tg, je nach Grad der Iodination, sowohl die Expression von Schilddrüsen-Transkriptionsfaktoren als auch die Expression von Proteinen, die in der Iodverfügbarkeit involviert sind, wie z.B. NIS und Pendrin (Suzuki et al. 1998; Suzuki and Kohn 2006).

1.2.4 Thyreoglobulin-Expression in Tumorgeweben

Für die Diagnostik von Schilddrüsenkarzinomen werden Antikörper gegen Tg eingesetzt, insbesondere dann, wenn die Karzinomdiagnose primär an metastatischem Gewebe vorgenommen wird. Tg gilt als hochspezifischer Gewebemarker für Schilddrüsenkarzinome (de Micco et al. 1987; Kaufmann et al. 2002; Gremel et al. 2014). Tatsächlich hat eine ausgiebige Literaturrecherche im Rahmen dieser Doktorarbeit keinen einzigen Fall identifizieren können, bei dem immunhistochemisch in einem extrathyreoidalen Karzinom eine Tg-Anfärbung gefunden worden ist. Einzige Ausnahme ist das sog. *Struma Ovarii* (McCluggage and Young 2005), bei dem allerdings echtes Schilddrüsenengewebe im Ovar gebildet wird, sodass nicht von einem falsch-positiven Befund gesprochen werden kann. Bei den zwei positiven Fällen in Studie Nr. 5 (vgl. Tabelle1) handelt es sich um Metastasen der Schilddrüse (Pineda-Daboin et al. 2006).

Allerdings gibt es auch Gründe, an der absoluten Spezifität von Tg für das Schilddrüsenkarzinom zu zweifeln. Ein Grund dafür ist, dass die Zahl der bisher untersuchten extrathyreoidalen Tumoren verhältnismäßig gering ist. In Tabelle 1 sind die in der Datenbank Medline/PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>; Suchbegriffe: immunohistochemistry, thyroglobulin, cancer; Stand: 18.12.2018) identifizierten Studien, bei denen Nichtschilddrüsenkarzinome auf Tg untersucht wurden, zusammengestellt. Insgesamt enthält die Liste 60 Tumoren von sechs verschiedenen Tumortypen. Ausgenommen bei den zuletzt genannten Werten ist die Studie von Gremel et al. 2014. Diese ist die einzige identifizierte Studie, bei der eine größere Anzahl Tumoren aus insgesamt 18 Organen mit 27 verschiedenen Antikörpern getestet worden ist. Unter den 940 getesteten Tumoren von 48

verschiedenen Tumortypen sind 502 Metastasen miteingeschlossen. Bei der Schilddrüse ist lediglich das papilläre Schilddrüsenkarzinom (10x Metastase, 8x Primärtumor) mit einbezogen worden. Viele Tumorarten sind nie auf Tg untersucht worden und wenn, dann nur in sehr geringer Zahl.

Ein weiterer Grund, an der Gewebespezifität des Tgs zu zweifeln, ist, dass sich Tumorzellen, aufgrund der erzeugten Genominstabilität, häufig so weit von ihrem Ausgangsgewebe unterscheiden und dadurch prinzipiell jedes Gen mindestens in Einzelfällen aktiviert und damit exprimiert werden könnte (Hanahan and Weinberg 2011).

Tabelle 1: Zusammenstellung von Publikationen mit immunhistochemischen Tg-Färbungen von Nichtschilddrüsentumoren

Nr.	Referenz	Organ	Tumortyp	Klon	Wirt	Name (Firma)	Verdünnung	Fallzahl	Tg-positiv	Positiv [%]
1	(Keen et al. 1999)	Ovar	Ovarialkarzinom (serös, papillär)	Monoklonal	Mouse	DAK-Tg6 (Dako)	1:800	17	1	6%
2	(McCluggage and Young 2005)	Ovar	Ovarialkarzinom	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	2	N/A
3	(Zhu et al. 2013)	Lunge	Primäres Adenokarzinom (mimt PTC ¹ nach)	N/A	N/A	N/A	N/A	1	0	0%
4	(Oishi et al. 2014)	Nasopharynx	Adenokarzinom (TL-LGNPPA ²)	Monoklonal	Mouse	DAK-Tg6 (Dako)	1:100	1	0	0%
5	(Pineda-Daboin et al. 2006)	Nasopharynx	Adenokarzinom (NPAC ³)	Monoklonal	Mouse	DAK-Tg6 (Dako)	N/A	18	2	11%
6	(Dawane et al. 2015)	Niere	TLFCK ⁴	Polyklonal	Rabbit	N/A	N/A	1	0	0%
7	(Kim et al. 2017)	Thymus	Schilddrüsen Krebs	Polyklonal	Rabbit	A0251 (Dako)	N/A	22	1	5%
8	(Gremel et al. 2014)	Verschiedene	Verschiedene	Polyklonal	N/A	N/A	1:20000	940	18	2%

¹ engl. Papillary thyroid cancer; dt. Papilläres Schilddrüsenkarzinom

² engl. Thyroid-like low-grade nasopharyngeal papillary adenocarcinoma; dt. Schilddrüsenähnliches nasopharyngeales papilläres Adenokarzinom

³ engl. Nasopharyngeal adenocarcinoma; dt. Nasopharyngeales Adenokarzinom

⁴ engl. Thyroid-like follicular carcinoma of the kidney; dt. Schilddrüsenähnliches follikuläres Karzinom der Niere

2 FRAGESTELLUNG

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es zu klären, ob die Tg-Expression tatsächlich eine schilddrüsentumorspezifische Eigenschaft ist oder ob auch andere Tumorarten ektopisch Tg exprimieren können. Zu diesem Zweck wird ein Tissue Microarray (TMA), bestehend aus 3448 verschiedenen Tumorproben von 83 verschiedenen Tumorkategorien und -unterkategorien immunhistochemisch untersucht. Dieser wird mit Normalgewebe verglichen um abschließend eine präzise Aussage über die Spezifität der Tg-Expression in Schilddrüsengewebe treffen zu können.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Tissue Microarray-Technik

Die TMA-Technik ist ein Verfahren, das die gleichzeitige Untersuchung von Hunderten von Tumoren auf einem einzigen Gewebeschnitt erlaubt. Bei der Herstellung von TMAs werden aus geeigneten Tumoren mit einer Hohlnadel 0,6 mm messende Gewebezylinder entnommen und in ein zuvor angefertigtes, entsprechendes Loch, in einen sogenannten Empfängerparaffinblock, eingebracht. In einen Empfängerblock werden am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) jeweils ca. 600 verschiedene Gewebeproben eingebracht. Diese enthalten im Regelfall 386 bis 597 Tumoren und eine Kontrollsektion mit bis zu 30 ausgewählten Normalgeweben.

Die Einbringung der Tumorproben erfolgt nach einem vorher festgelegten System, wobei jede einzelne Gewebeprobe an einer definierten Position, bzw. Koordinate, eingebracht wird. Das am UKE verwendete Standardkoordinatensystem ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt. Alle Proben auf einem TMA werden am UKE mit diesem Koordinatensystem den klinischen und pathologischen Daten zugeordnet. Dies stellt eine optimale Pseudonymisierung dar und eine hervorragende Grundlage, die Gewebeproben permanent zu anonymisieren. Hierzu werden die Biopsienummern, die zur Identifizierung der Patienten dienen, im Ursprungsdatenfile gelöscht. Ein entsprechendes Beispiel ist in Abbildung 4 als Ausschnitt aus einem solchen Datenfile veranschaulicht.

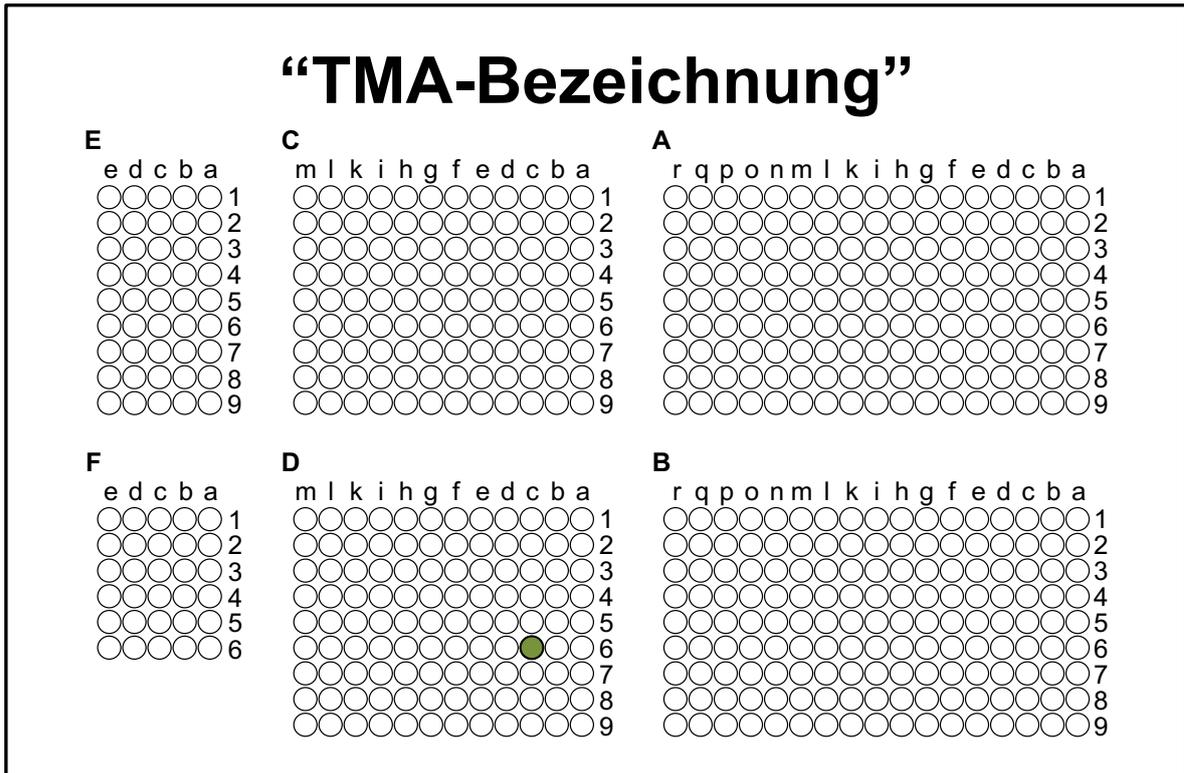


Abbildung 3: Tissue Microarray (TMA)-Kordinatensystem

Dieses schematisch dargestellte Koordinatensystem wird am UKE standardisiert verwendet. Jede Koordinate bzw. jeder sogenannte „Spot“ wird einer definierten Gewebeprobe zugeordnet. Zur besseren Orientierung, bei der Auswertung am Mikroskop, haben die Quadranten A/B, C/D und E/F eine unterschiedliche Anzahl an Spots. Quadrant F ist für die Kontrollgruppe mit Normalgewebe vorgesehen. ● Entspricht dem Spot D6c (bei mehr als einem Block wird die Bezeichnung des Array Segmentes vorangestellt, Beispiel: EB8b, vgl. Abbildung 4).

Array Name	Array Segment	Lokalisation	E-Nummer/Jahr	Block-Nr.	Tumorentität
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
MTA 5.2	E	B 7q	E-XXXXX/XXXX	1D	Schilddrüsenkarzinom, follikulär
MTA 5.2	E	B 7r	E-XXXXX/XXXX	1F	Schilddrüsenkarzinom, follikulär
MTA 5.2	E	B 8a	E-XXXXX/XXXX	1G	Schilddrüsenkarzinom, follikulär
MTA 5.2	E	B 8b	E-XXXXX/XXXX	1H	Schilddrüsenkarzinom, follikulär
MTA 5.2	E	B 8c	E-XXXXX/XXXX	1D	Schilddrüsenkarzinom, papillär
MTA 5.2	E	B 8d	E-XXXXX/XXXX	2A	Schilddrüsenkarzinom, papillär
MTA 5.2	E	B 8e	E-XXXXX/XXXX	1C	Schilddrüsenkarzinom, papillär
MTA 5.2	E	B 8f	E-XXXXX/XXXX	2B	Schilddrüsenkarzinom, papillär
MTA 5.2	E	B 8g	E-XXXXX/XXXX	1A	Schilddrüsenkarzinom, papillär
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮

Abbildung 4: Tissue Microarray (TMA)-Datenfile

Das verwendete Beispiel ist ein Ausschnitt aus dem Multitumor Array (MTA) 5.2. Entnahme-Nummer (E-Nummer, im Beispiel anonymisierte Biopsieentnahmenummern) und Block-Nr. (im Beispiel verändert) sind wichtig für die TMA-Herstellung und somit zur eindeutigen Definierung jeder einzelnen Koordinate. Abschließend werden die Informationen, die zur Identifizierung der Patienten Voraussetzung sind, aus dem Ursprungsdatenfile gelöscht. X: Platzhalter.

3.2 Tissue Microarray-Herstellung

Die Herstellung von TMAs ist im Gesamten, von der Datenbankdurchsuchung bis zur IHC-Färbung, ein komplexes Unterfangen. Für die vorliegende Untersuchung wurden zunächst zur Identifikation potentiell geeigneter Fälle Listen erstellt und die entsprechenden Schnitte der Präparate herausgesucht. Naturgemäß erwiesen sich nicht alle herausgesuchten Schnitte als brauchbar für einen TMA, denn die zu stanzenden Areale müssen ausreichend groß sein und müssen einen hohen Tumorzellgehalt aufweisen. Nach der endgültigen Auswahl der Fälle sind die Tumoreale, die den Kriterien für die TMA-Herstellung (Tumorzellgehalt) entsprachen, durch einen Pathologen eingezeichnet worden. Im Anschluss daran wurden die Gewebeblöcke herausgesucht, wobei auch diese sich manchmal als nicht mehr brauchbar für eine TMA-Herstellung erwiesen haben, z.B. dann, wenn sie offensichtlich für die Primäruntersuchung weitestgehend aufgebraucht worden waren. Nachdem die Blöcke identifiziert worden sind, wurden die definitiven Stanzlisten hergestellt, wobei den einzelnen Gewebeproben Koordinaten zugeordnet wurden. Schnitte und Blöcke wurden letztlich koordiniert im Bereich der Tissue Arrayer-Geräte zusammen sortiert. Die verschiedenen Schritte zur Vorbereitung der TMA-Herstellung sind in den Abbildungen 7-9 dargestellt.

Für die Herstellung der TMAs waren erforderlich (vgl. Abbildung 6):

- Tissue Arrayer-Gerät
- Bohrer (\varnothing 0.6 mm)
- Stanznadel (\varnothing 0,6 mm)
- sortierte Stapel mit Schnitten und Blöcken
- passendes Koordinatensystem und Datenfile
- leerer Paraffinempfängerblock, eingespannt in einer Schiene.

Jede Gewebeprobe wurde mit Hilfe der Stanznadel in ein vorgebohrtes Loch im Empfängerblock an definierter Position eingebracht. Alle einzelnen Arbeitsschritte der TMA-Herstellung sind in Abbildung 10-12 dargestellt.

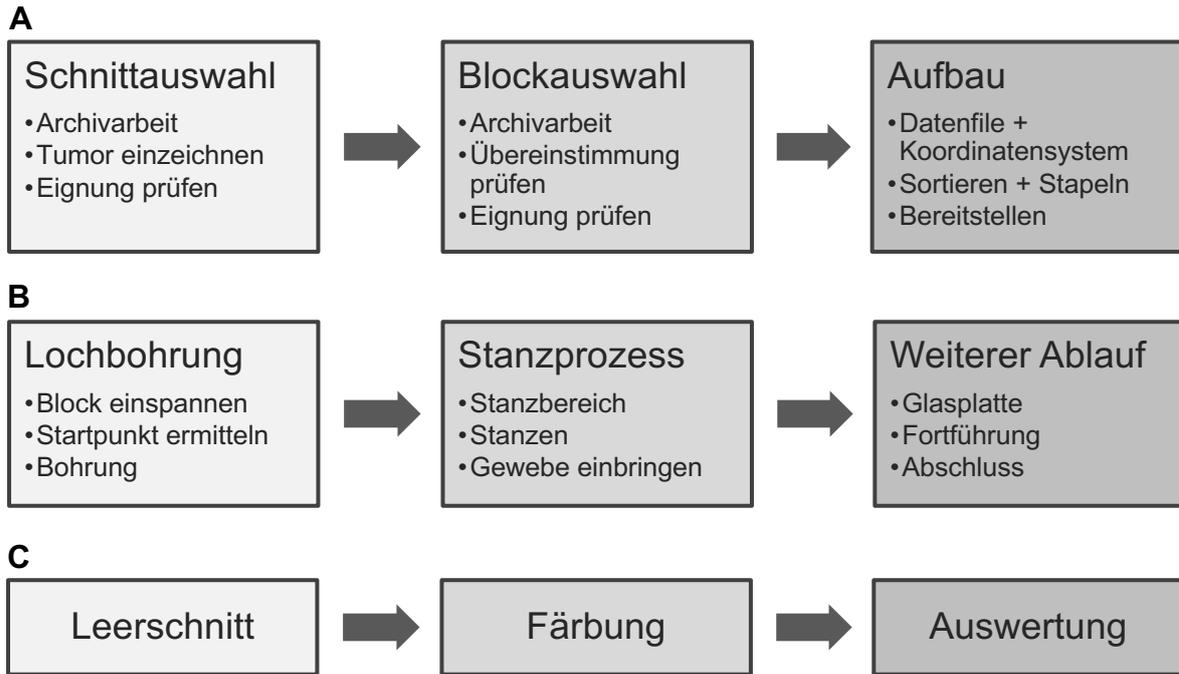


Abbildung 5: Ablauf der Tissue Microarray (TMA)-Herstellung

A) Vorbereitung der TMA-Herstellung; B) TMA-Herstellung; C) TMA-Bearbeitung
 Die einzelnen Teilschritte sind in den Abbildungen 7-13 im Detail beschrieben.

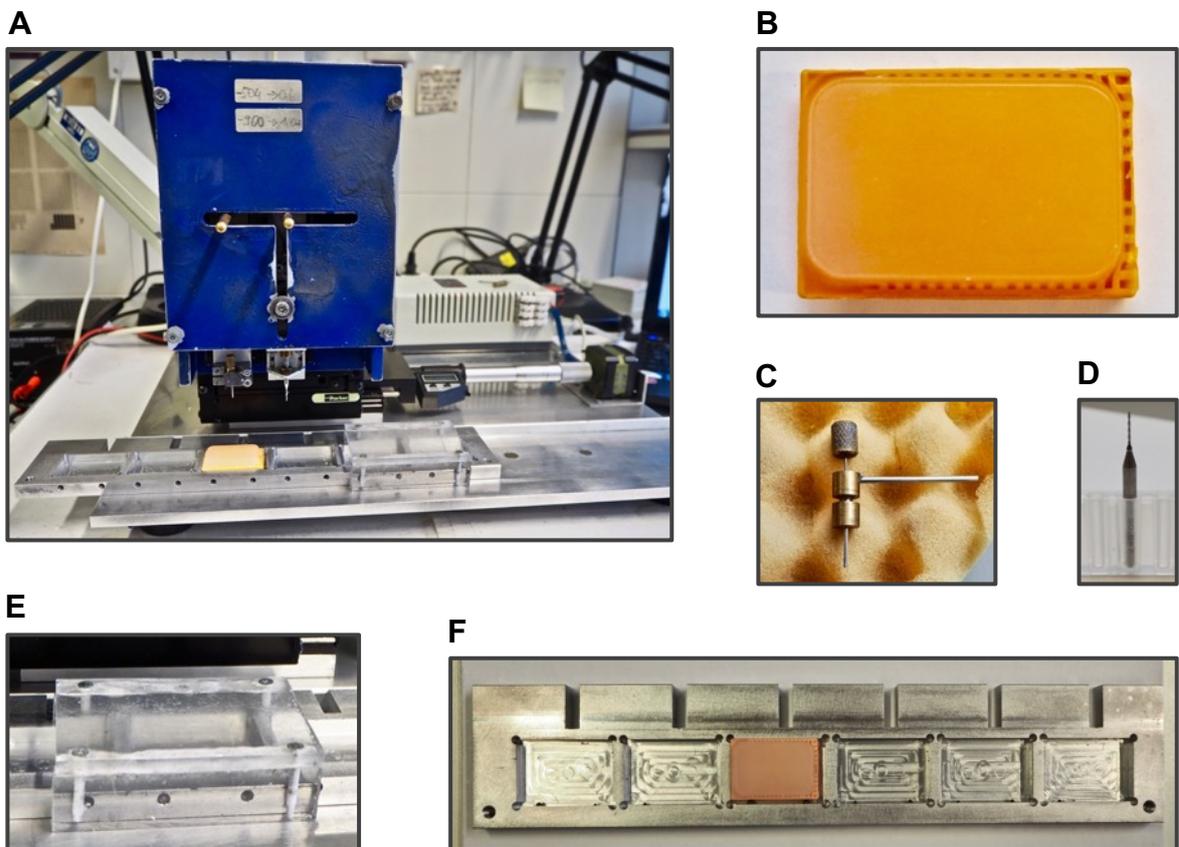


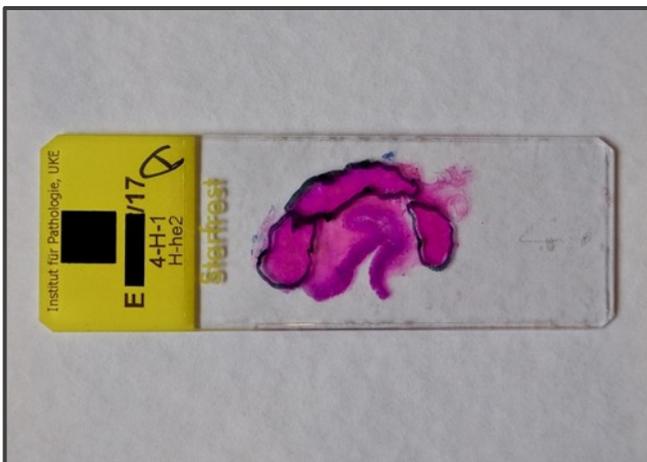
Abbildung 6: Materialien zur Tissue Microarray (TMA)-Herstellung

A) Tissue Microarrayer; B) Leerer Empfängerblock; C) Stanznadel D) Bohrer (ø 0,6 mm); E) Schlitten; F) Schiene



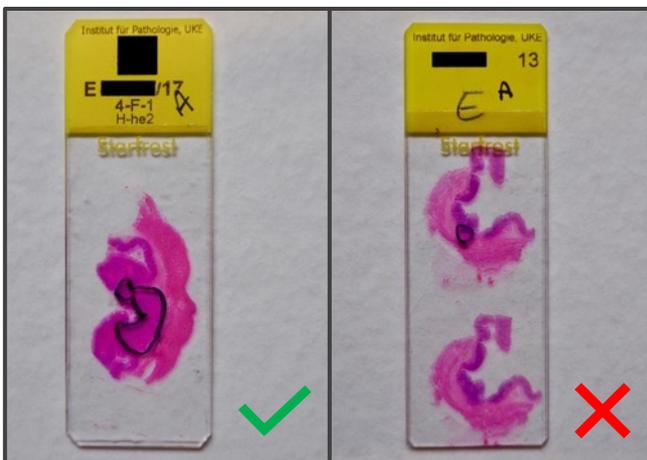
1. Archivarbeit

Mit Hilfe einer Liste, die an Hand der Datenbank des UKEs angefertigt wurde, werden alle ausgewählten Fälle mit den zugehörigen Schnitten, die eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung aufweisen, aus dem Archiv herausgesucht.



2. Tumoreinzeichnung

Auf den vorliegenden Schnitten werden mit einem Foliestift die Tumorbereiche vom Pathologen eingezeichnet.



3. Eignung prüfen

Aus jedem Fall wird der Schnitt mit der größten Tumormenge ausgewählt (Schnitt „A“). Fälle ohne oder mit zu geringer Tumormenge werden aussortiert.

Abbildung 7: Arbeitsschritte der Schnittauswahl. (1. – 3.)

Die Arbeitsschritte der Schnittauswahl bestehen aus Archivarbeit, Tumor einzeichnen und Eignung der herausgesuchten Schnitte prüfen.



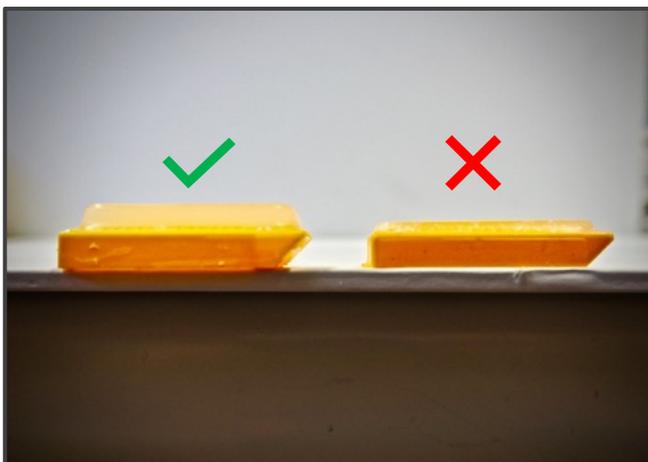
4. Archivarbeit

Passend zu den ausgewählten Schnitten werden die entsprechenden Gewebelöcke aus dem Archiv herausgesucht.



5. Übereinstimmung prüfen

Es wird überprüft, ob der ausgewählte Schnitt und der Gewebelöck miteinander übereinstimmen.



6. Eignung prüfen

Blöcke mit den folgenden Eigenschaften werden aussortiert:

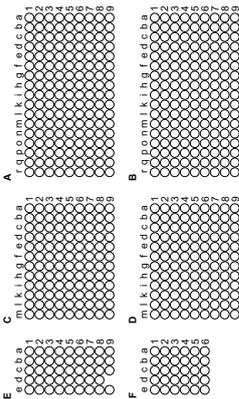
- zu weit heruntergeschnitten
- Gewebe nicht stanzbar
- zu stanzender Tumorbereich nicht mehr ausreichend vorhanden

Abbildung 8: Arbeitsschritte der Blockauswahl. (4. – 6.)

Die Arbeitsschritte der Blockauswahl besteht aus Archivarbeit, Übereinstimmung von Schnitt und Block prüfen und Eignung des Blockes prüfen.

Sample Name	Area	Experiment	Location/Date	Channel/Label	Block No.	Coordinates
MTA 5.2	A	A.1a		0-0000000000	80a	0000000000
MTA 5.2	A	A.1b		0-0000000000	80b	0000000000
MTA 5.2	A	A.1c		0-0000000000	80c	0000000000
MTA 5.2	A	A.1d		0-0000000000	80d	0000000000
MTA 5.2	A	A.1e		0-0000000000	80e	0000000000
MTA 5.2	A	A.1f		0-0000000000	80f	0000000000
MTA 5.2	A	A.1g		0-0000000000	80g	0000000000
MTA 5.2	A	A.1h		0-0000000000	80h	0000000000
MTA 5.2	A	A.1i		0-0000000000	80i	0000000000
MTA 5.2	A	A.1j		0-0000000000	80j	0000000000
MTA 5.2	A	A.1k		0-0000000000	80k	0000000000
MTA 5.2	A	A.1l		0-0000000000	80l	0000000000
MTA 5.2	A	A.1m		0-0000000000	80m	0000000000
MTA 5.2	A	A.1n		0-0000000000	80n	0000000000
MTA 5.2	A	A.1o		0-0000000000	80o	0000000000
MTA 5.2	A	A.1p		0-0000000000	80p	0000000000
MTA 5.2	A	A.1q		0-0000000000	80q	0000000000
MTA 5.2	A	A.1r		0-0000000000	80r	0000000000
MTA 5.2	A	A.1s		0-0000000000	80s	0000000000
MTA 5.2	A	A.1t		0-0000000000	80t	0000000000
MTA 5.2	A	A.1u		0-0000000000	80u	0000000000
MTA 5.2	A	A.1v		0-0000000000	80v	0000000000
MTA 5.2	A	A.1w		0-0000000000	80w	0000000000
MTA 5.2	A	A.1x		0-0000000000	80x	0000000000
MTA 5.2	A	A.1y		0-0000000000	80y	0000000000
MTA 5.2	A	A.1z		0-0000000000	80z	0000000000

MTA 5.2 A



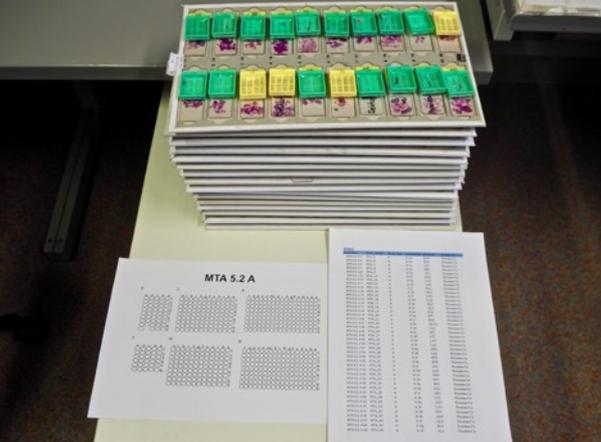
7. Datenfile und Koordinatensystem

Das am UKE verwendete standardisierte Koordinatensystem wird passend zum finalen Datenfile angepasst.



8. Sortieren und Stapeln

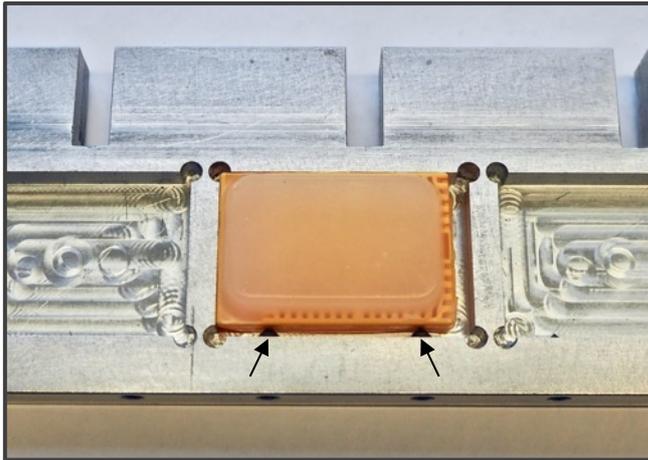
So wie im Datenfile vorgegeben, werden die Schnitt/Block - Kombinationen sortiert, auf Objektträgerpappen ausgelegt und anschließend gestapelt.



9. Bereitstellen

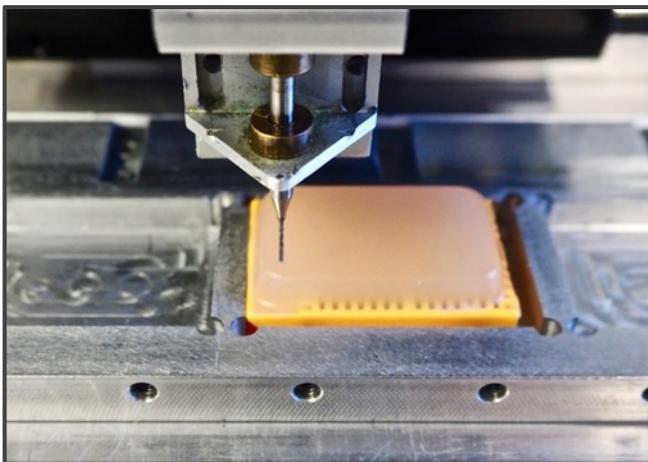
Der fertige Schnitt/Block - Stapel wird neben dem Tissue Arrayer-Gerät bereitgestellt, genauso werden Datenfile und Koordinatensystem für einen ständigen Abgleich bereitgelegt.

Abbildung 9: Arbeitsschritte des Aufbaus. (7. – 9.)
 Die Arbeitsschritte des Aufbaus bestehen aus Anfertigung von Datenfile und Koordinatensystem, Sortieren und Stapeln und Bereitstellen.



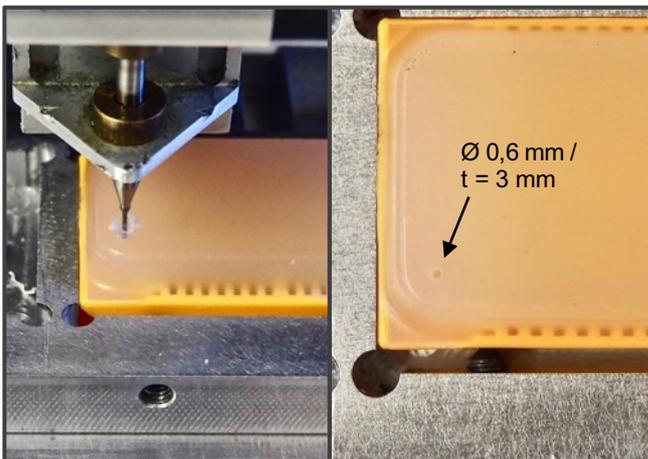
10. Block einspannen

Ein leerer Empfängerparaffinblock wird in die Vertiefung der Schiene eingelegt. Der Block wird an der oberen Ecke ausgerichtet und mittels Gewindestiften (←) fixiert.



11. Startpunkt ermitteln

Der Startpunkt für den ersten Spot, A1a, wie im Koordinatensystem vorgegeben, wird festgelegt. Dadurch wird sichergestellt, dass die Größe des Paraffinblocks optimal genutzt wird.



12. Bohrung

Mit einem 0,6 mm Bohrer wird ein 3 mm tiefes Sackloch in den Paraffinblock gebohrt.

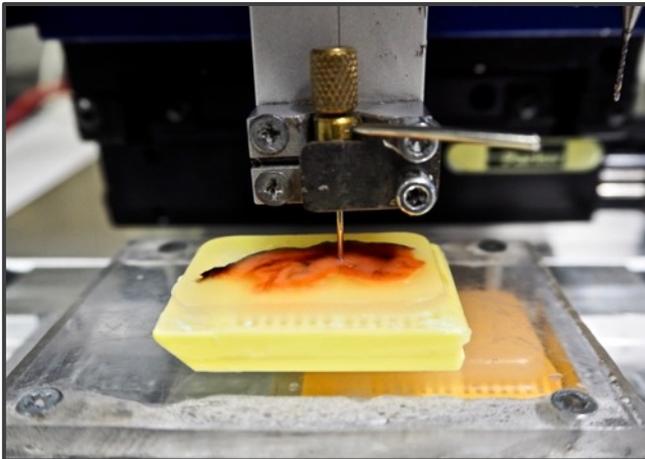
Abbildung 10: Arbeitsschritte der Lochbohrung. (10. - 12.)

Die Arbeitsschritte der Lochbohrung bestehen aus Block einspannen, Startpunkt ermitteln und Bohrung des Lochs.



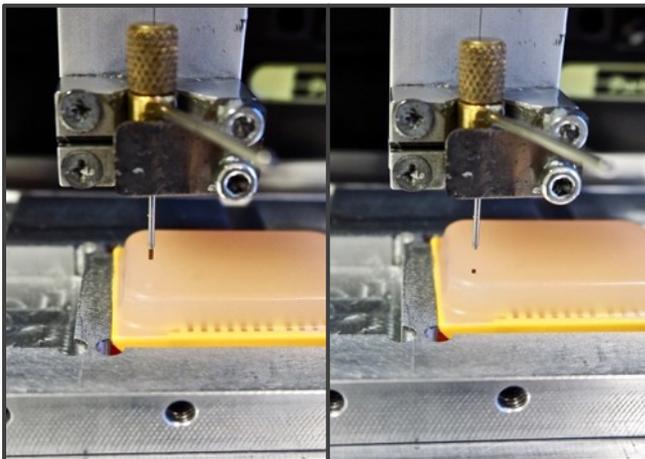
13. Stanzbereich

An Hand des Schnittes mit eingezeichnetem Tumorbereich wird der Stanzbereich im Gewebeblock ermittelt, indem der Schnitt passend auf den Block gelegt wird.



14. Stanzen

Der Gewebeblock wird auf dem Schlitten positioniert. Danach wird die Stanznadel mit einem 0,6 mm Holzyylinder in den Tumorbereich des Gewebeblockes geführt.

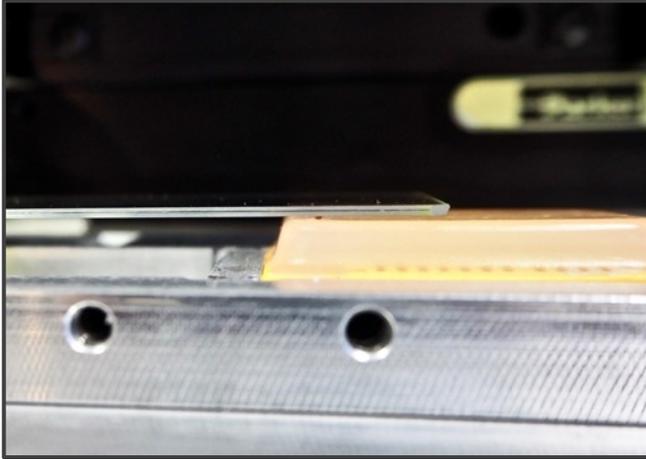


15. Gewebe einbringen

Das Tumorgewebe wird aus der Stanznadel in das vorgebohrte Loch des Empfängerblockes eingebracht.

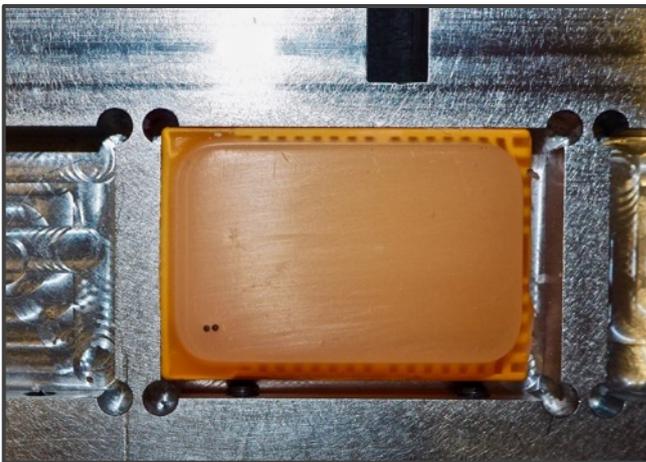
Abbildung 11: Arbeitsschritte des Stanzprozesses. (13. - 15.)

Die Arbeitsschritte des Stanzprozesses bestehen aus Stanzbereich ermitteln, Stanzen und Gewebe in das vorgebohrte Loch einbringen.



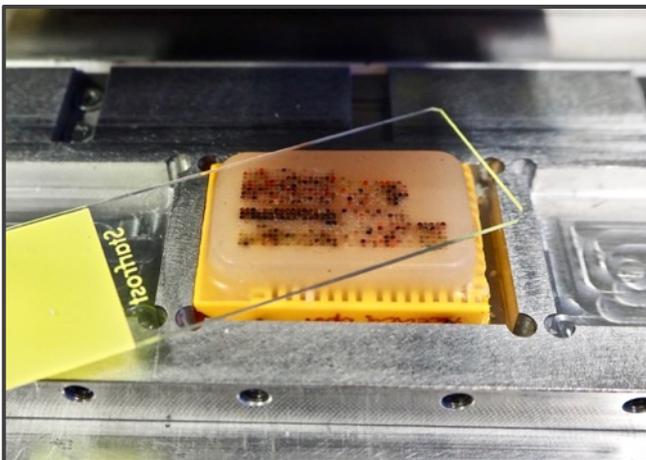
16. Glasplatte

Mit einer Glasplatte wird die Gewebsstanze leicht angedrückt, so dass diese minimal über den Paraffinblock hinausragt. Alle Gewebsstanzen sollten auf gleicher Höhe sein, so wird gewährleistet, dass bereits auf dem ersten Schnitt alle zu analysierenden Gewebeproben vorliegen.



17. Fortführung

Das Gerät wird exakt um 0,85 mm (0,6 mm Lochdurchmesser + 0,25 mm Abstand zwischen den Löchern) zur nächsten Koordinatenposition weitergefahren.



18. Abschluss

Die Arbeitsschritte 10 bis 17 werden wiederholt bis der TMA fertig gestanzt ist. Jeder Gewebeblock mit Schnitt muss dabei mit dem Datenfile und der richtigen Koordinatenposition abgeglichen werden.

Abbildung 12: Arbeitsschritte der Weiterführung. (16. - 18.)

Die Arbeitsschritte der Weiterführung bestehen aus Andrücken mit einer Glasplatte, Fortführung und dem Abschluss.

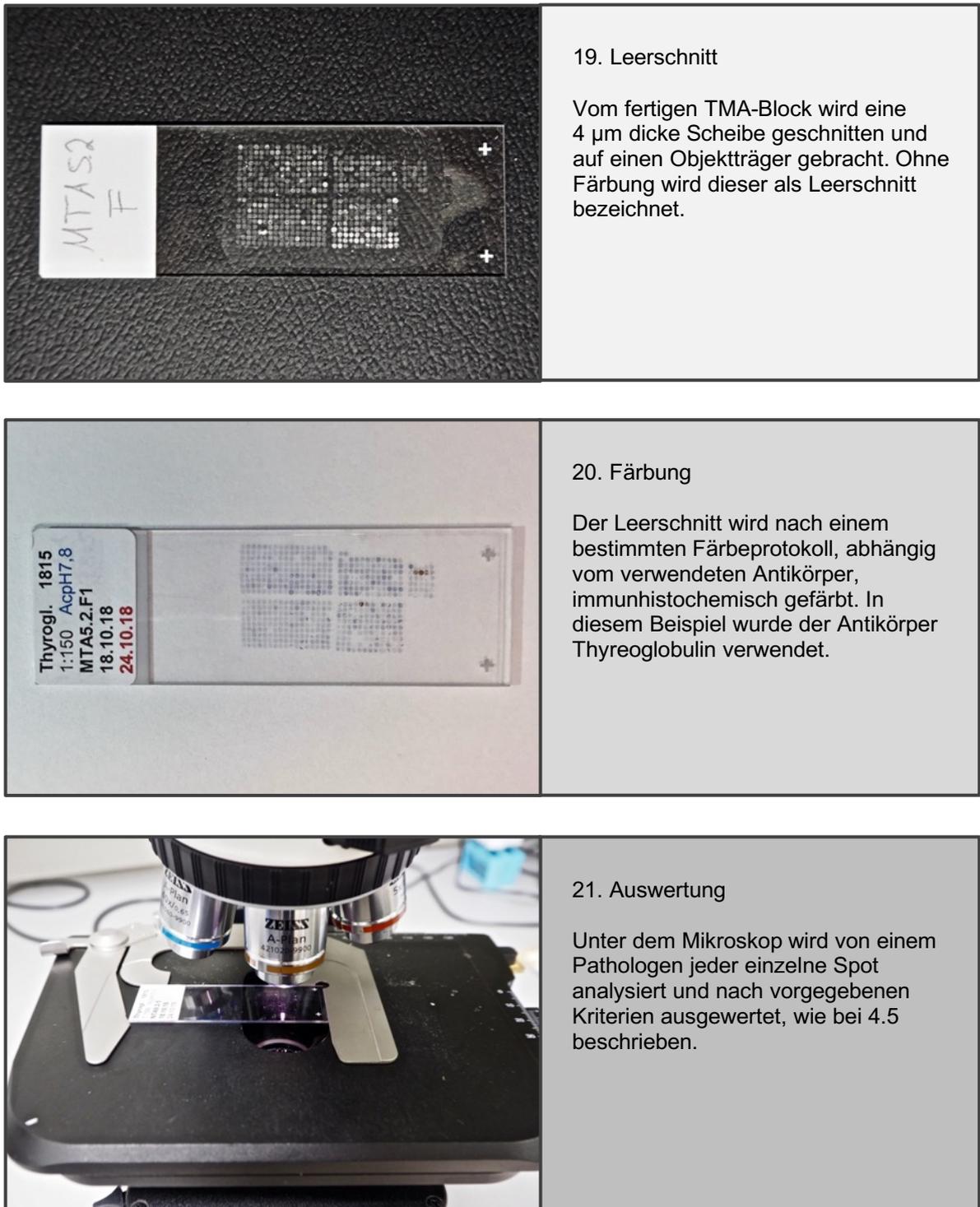


Abbildung 13: Arbeitsschritte der TMA-Bearbeitung (19. – 21.)

Die Arbeitsschritte der TMA-Bearbeitung bestehen aus Leerschnitt anfertigen, Färbung und Auswertung.

3.3 Normalgewebe- / Multitumor-Array

Für dieses Projekt wurden zwei verschiedene Array-Typen hergestellt, ein Normalgewebe-Array (NTA) und ein Multitumor-Array (MTA). Die beiden TMAs sind nachfolgend im Detail dargestellt.

3.3.1 Normalgewebe-Array

Der NTA beinhaltete jeweils acht verschiedene Gewebeproben von 76 verschiedenen Normalgewebetypen, wobei die Gewebe jeweils von acht verschiedenen Patienten stammten, um mögliche interindividuelle Unterschiede in dem Genexpressionsprofil oder aber auch der Gewebefixation auszugleichen. Die verwendeten Gewebetypen waren:

- Analkanal, Haut
- Analkanal, Schleimhaut der Übergangszone
- Aorta, Endothel
- Aorta, Tunica Media
- Appendix, Mucosa
- Appendix, muskuläre Schicht
- Bronchus, Drüsen
- Bronchus, Mucosa
- Colon descendens, Mucosa
- Colon descendens, muskuläre Schicht
- Duodenum, Brunnerdrüsen
- Duodenum, Mukosa
- Eileiter, Mucosa
- Ektozervix
- Endometrium, Proliferationsphase
- Endometrium, Sekretionsphase
- Endozervix
- Fett
- Gallenblase, Epithel
- Glandula sublingualis
- Glandula submandibularis
- Cerebrum, graue Substanz
- Cerebrum, weiße Substanz
- Harnblase, muskuläre Schicht
- Harnblase, Urothel
- Haut
- Haut, Haarfollikel mit Talgdrüse
- Herz
- Hoden
- Hypophyse, Hinterlappen, Hypophysenstiel
- Hypophyse, Vorderlappen
- Ileum, Mukosa
- Ileum, Muskularis
- Cerebellum, Cortex (Stratum moleculare)
- Cerebellum, graue Substanz (Stratum neuronorum))
- Knochenmark
- Leber
- Lippe, Mundschleimhaut
- Lunge
- Lymphknoten
- Magen, Antrum
- Magen, Corpus
- Magen, muskuläre Schicht
- Mamma
- Milz

-
- Mundhöhle
 - Nebenhoden
 - Nebenniere
 - Nebenschilddrüse
 - Niere, Cortex
 - Niere, Medulla
 - Nierenbecken, muskuläre Schicht
 - Nierenbecken, Urothel
 - Ösophagus, muskuläre Schicht
 - Ovar, Corpus luteum
 - Ovar, folliculäre Zyste
 - Ovar, Stroma
 - Pankreas
 - Parotis
 - Penis, Corpus spongiosum
 - Plazenta, Anfangsstadium
 - Plazenta, Anfangsstadium, Decidua
 - Plazenta, Endstadium
 - Plazenta, Endstadium, Amnion und Chorion
 - Prostata
 - Quergestreifte Muskulatur
 - Rectum, Mucosa
 - Samenblase
 - Schilddrüse
 - Sinus paranasales
 - Thymus
 - Tonsille
 - Tonsille, Oberflächenepithel
 - Uterus, Myometrium
 - Zunge, Muskulatur

3.3.2 Multitumor-Array

Der Multitumor-Array besteht aus einem System von sieben Gewebeblöcken, welche jeweils 416-597 Proben (einschließlich Kontrollen) beinhalten. Insgesamt sind auf den TMA-Blöcken des Multitumor-Arrays 210 Kontrollgewebe und 3448 Tumorgewebe eingebracht worden. Die genaue Zusammensetzung ist in Kapitel 4 Ergebnisse dargestellt.

3.4 Immunhistochemische Färbung

Für die IHC-Färbung wurden an einem Tag acht Schnitte hergestellt (1x NTA, 7x MTA). Alle Schnitte wurden innerhalb einer Woche am gleichen Tag im identischen Set an Reagenzien gefärbt.

3.4.1 Verwendeter Antikörper

- Name: **Thyroglobulin** (vgl. Abbildung 18)
- Hersteller: GenomeMe™
- Klon: IHC674
- Klonart: mouse / monoklonal
- Verdünnung: 1:150

3.4.2 Verwendete Reagenzien:

- Aqua dest. (*Aqua destillata*; dt. destilliertes Wasser)
- Alkoholreihe (2x 100%ig, 2x 96%ig, 2x 80%ig)
- DAB-Chromogen (Dako K5007)
- EnVision™ rabbit/mouse (Dako K5007)
- H₂O₂ (Dako S2023 “ready to use”)
- Hämatoxylin
- Leitungswasser
- TBS-T-Puffer (Tris-buffered saline with Tween20)
→ Ansatz: 500 ml TBS-T (Dako, K8007) + 9500 ml Aqua dest.
- TEC Puffer pH 7,8 (Tris-EDTA-Citrat)
→ Ansatz: 50 ml Stammlösung + 950 ml Aqua dest.
- Verdünner (Dako Antibody Diluent)
- Xylol

3.4.3 Verwendete Geräte:

- Autoklav
- Inkubationsschale
- Brutschrank

3.4.4 Immunohistochemisches Färbeprotokoll Thyreoglobulin:

1. Vorbereitung der Objektträger

- | | | |
|--|----|--------|
| a) Objektträger mit TMA-Schnitt in Xylol tauchen | 2x | 10 min |
| b) Absteigende Alkoholreihe bis Aqua dest. | | |

2. Vorbehandlung

- | | | | |
|--------------------------------------|----|-------|--------|
| a) Mit TEC-Puffer pH 7,8 im Autoklav | 1x | 5 min | 121 °C |
| b) Mit Aqua dest. kurz spülen | 1x | | |
| c) Mit TBS-T-Puffer | 2x | 5 min | |

3. Peroxidase-Block

- | | | |
|---|----|--------|
| a) Mit H ₂ O ₂ in Inkubationsschale | 1x | 10 min |
| b) TBS-T-Puffer | 2x | 5 min |
-

4. Antikörper-Inkubation

a) Thyroglobulin-AK + Verdünner (1:150) im Brutschrank	1x	60 min	37 °C
b) Mit TBS-T-Puffer im Brutschrank	2x	5 min	
c) EnVision™ rabbit/mouse	1x	30 min	37 °C
d) Mit TBS-T-Puffer im Brutschrank	2x	5 min	

5. Chromogen-Prozess

a) DAB-Chromogen	1x	10 min	RT
b) Aquadest			
c) Hämatoxylin	1x	3 min	
d) Mit Leitungswasser bläuen	1x	5 min	
e) Aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol			
f) Eindeckeln			

3.5 Auswertung der Immunhistochemie

Alle gefärbten Gewebeproben wurden an einem Tag von einem Pathologen beurteilt. Im Falle einer positiven Anfärbung wurde der prozentuale Anteil positiver Tumorzellen (TZ) und die Färbeintensität (INT) quantifiziert. Aus dem Prozentsatz positiver Zellen und der Färbeintensität wurde nach einem vorher festgelegten Verfahren die Färbung in vier Kategorien (negativ, schwach positiv, mäßig stark positiv, stark positiv) eingeteilt. Die hierfür verwendeten Kriterien wurden wie folgt eingeteilt:

- **Negativ:** Keine Färbung
- **Schwach positiv:** 1+ INT in $\leq 70\%$ der TZ oder
2+ INT in $\leq 30\%$ der TZ
- **Mäßiggradig positiv:** 1+ INT in $> 70\%$ der TZ oder
2+ INT in 30-70% der TZ oder
3+ INT in $\leq 30\%$ der TZ
- **Stark positiv:** 2+ INT in $> 70\%$ der TZ oder
3+ INT in $> 30\%$ der TZ

4 ERGEBNISSE

4.1 Normalgewebe-Array

Alle acht Schilddrüsengewebe des Normalgewebe-Arrays zeigten eine kräftige Färbung für Tg. Die übrigen Gewebe waren Tg-negativ (vgl. Abbildung 19).

4.2 Multitumor-Array

Insgesamt waren 2594 von 3448 Tumoren des Multitumor-Arrays auswertbar (vgl. Abbildung 19). Ursache für die Nichtauswertbarkeit von 856 Fällen (24,8%) war entweder das Fehlen von Gewebe an dem entsprechenden Gewebespot oder der fehlende Nachweis eindeutiger Tumorzellen im Gewebe. Das Fehlen von Gewebespots auf einzelnen Positionen eines TMAs kann beispielsweise durch Abschwimmen einzelner Gewebestücke im Rahmen des Färbeprozesses bedingt sein. Die Untersuchung des Multitumor-Arrays ergab lediglich bei Adenomen und Karzinomen der Schilddrüse positive Anfärbungen. Alle positiven Anfärbungen wurden, je nach Stärkegrad, in entsprechende Kategorien eingeteilt (vgl. Abbildung 14).

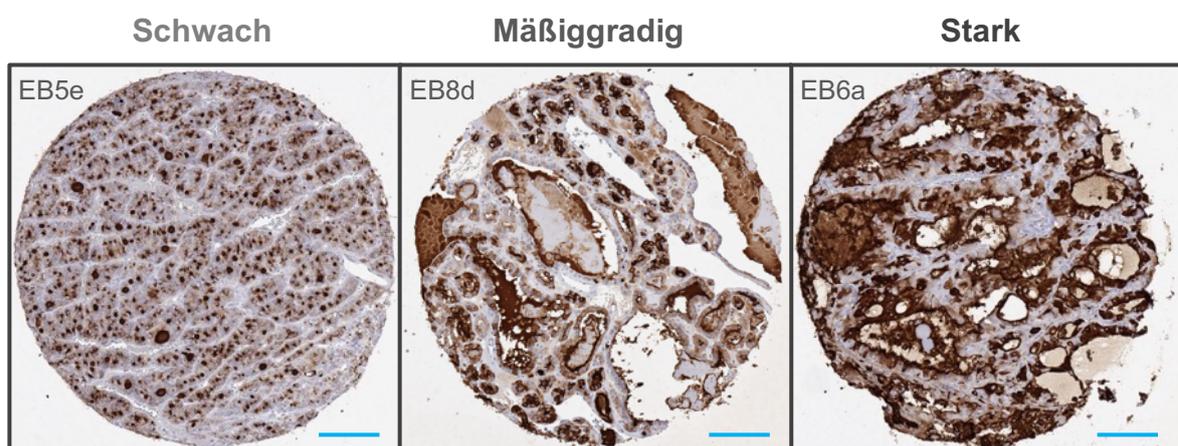


Abbildung 14: Schilddrüsentumoren mit unterschiedlich starker Anfärbung

Alle Tumorproben mit einer Thyreoglobulin (Tg) -Positivität weisen eine unterschiedlich starke immunohistochemische (IHC) -Anfärbung auf.

EB5e: Schwache IHC-Anfärbung eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms mit überwiegend luminaler Tg-Positivität.

EB8d: Mäßiggradige IHC-Anfärbung eines papillären Schilddrüsenkarzinoms mit luminaler und schwacher zytoplasmatischer Tg-Positivität

EB6a: Starke IHC-Anfärbung eines follikuläres Schilddrüsenkarzinom mit luminaler und zytoplasmatischer Tg-Positivität;

Maßstableiste: — 100 µm

Die Färbemuster unterschieden sich teilweise zwischen den Tumoren. Wo vorhanden, färbte sich insbesondere follikuläres Kolloid stark mit dem Tg-Antikörper an. Die Tumorzellen selbst zeigten eine variable zytoplasmatische Anfärbung, von schwach bis stark ausgeprägt. Immer wieder zeigte sich eine Betonung der Färbung im apikalen Zellbereich, bzw. im Bereich der Membran, welche an die Follikel angrenzt. Bei einzelnen Tumoren zeigte sich eine eigenartige mosaikartige Färbung. Neben leicht und mäßiggradig gefärbten Zellen waren immer wieder stark Tg-positive Zellen eingestreut (vgl. Abbildung 15).

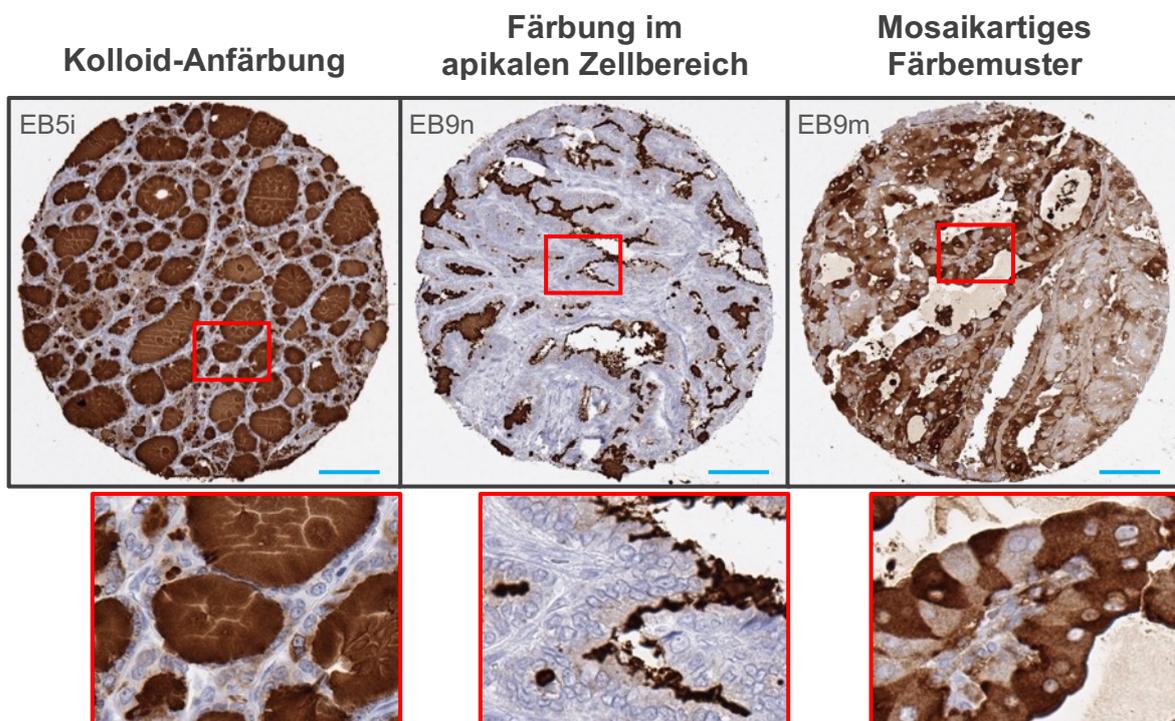


Abbildung 15: Schilddrüsentumoren mit unterschiedlichen Färbemustern

Die Tumorzellen zeigen eine variable, immunhistochemische Thyreoglobulin (Tg) -Anfärbung mit zytoplasmatischer Positivität von schwach bis stark ausgeprägt.

EB5i: Follikuläres Schilddrüsenkarzinom mit einer Akkumulation stark gefärbter luminaler Sekrete und schwacher zytoplasmatischer Anfärbung

EB9n: Papilläres Schilddrüsenkarzinom mit kräftiger zytoplasmatischer Tg-Anfärbung, die überwiegend am apikalen Zellpol lokalisiert ist

EB9m: Papilläres Schilddrüsenkarzinom mit mosaikartiger zytoplasmatischer Anfärbung. Neben leicht und mäßiggradig angefärbten Zellen sind immer wieder stark Tg-positive Zellen eingestreut

Maßstabsleiste: — 100 µm.

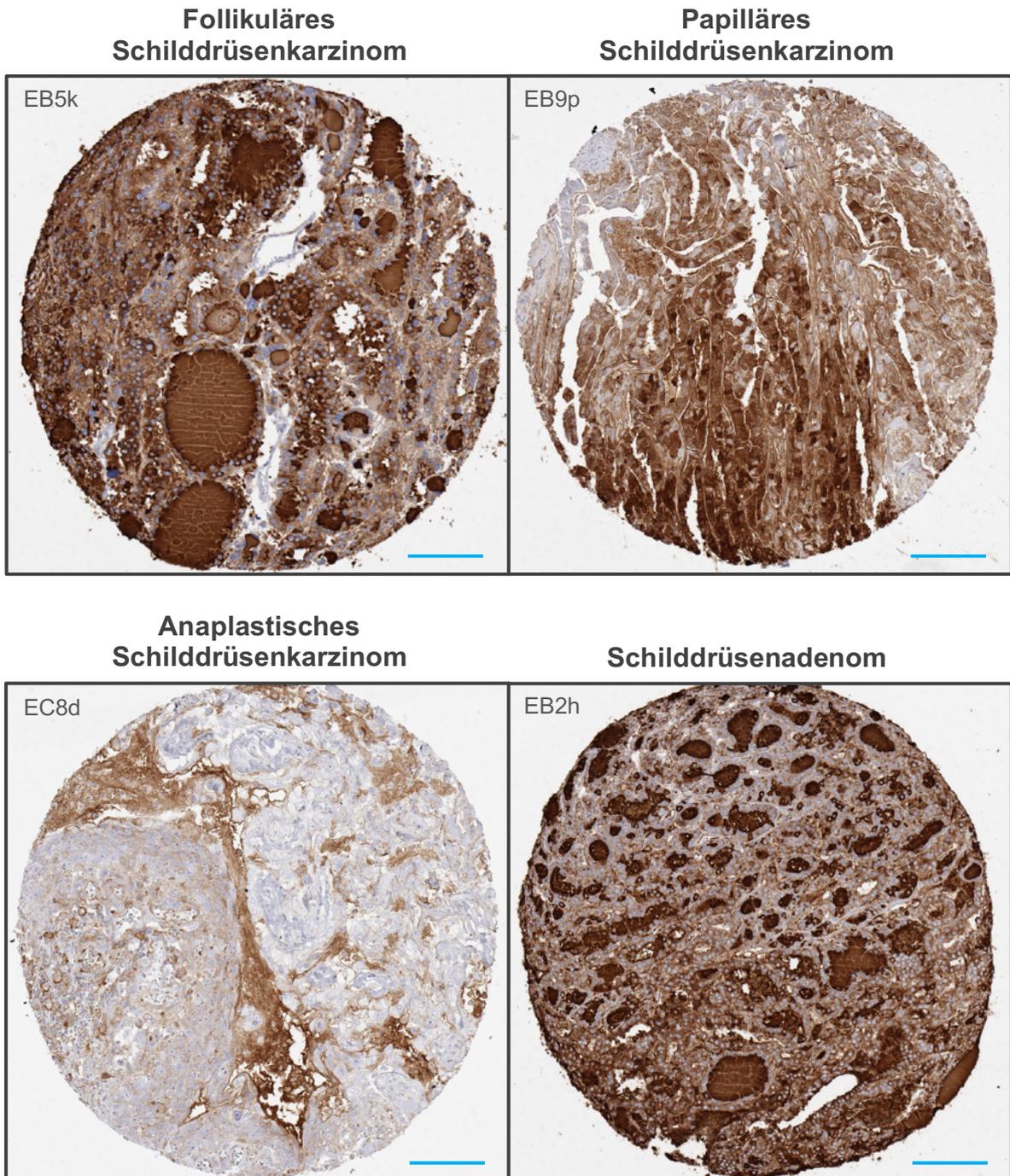


Abbildung 16: Schilddrüsentumoren mit positiver Thyreoglobulin (Tg) -Anfärbung

Immunhistochemische Färbungen von verschiedenen Schilddrüsentumoren mit Tg-positivem Ergebnis.

EB5k: Follikuläres Schilddrüsenkarzinom mit kräftiger zytoplasmatischer Tg-Anfärbung

EB9p: Papilläres Schilddrüsenkarzinom mit mosaikartiger zytoplasmatischer Tg-Anfärbung

EC8d: Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom mit schwacher Tg-Färbung bei einer Intensität von 1 und einem prozentualen Anteil gefärbter Tumorzellen von 50%

EB2h: Schilddrüsenadenom mit kräftiger zytoplasmatischer Tg-Anfärbung

Maßstabsleiste:  100 µm

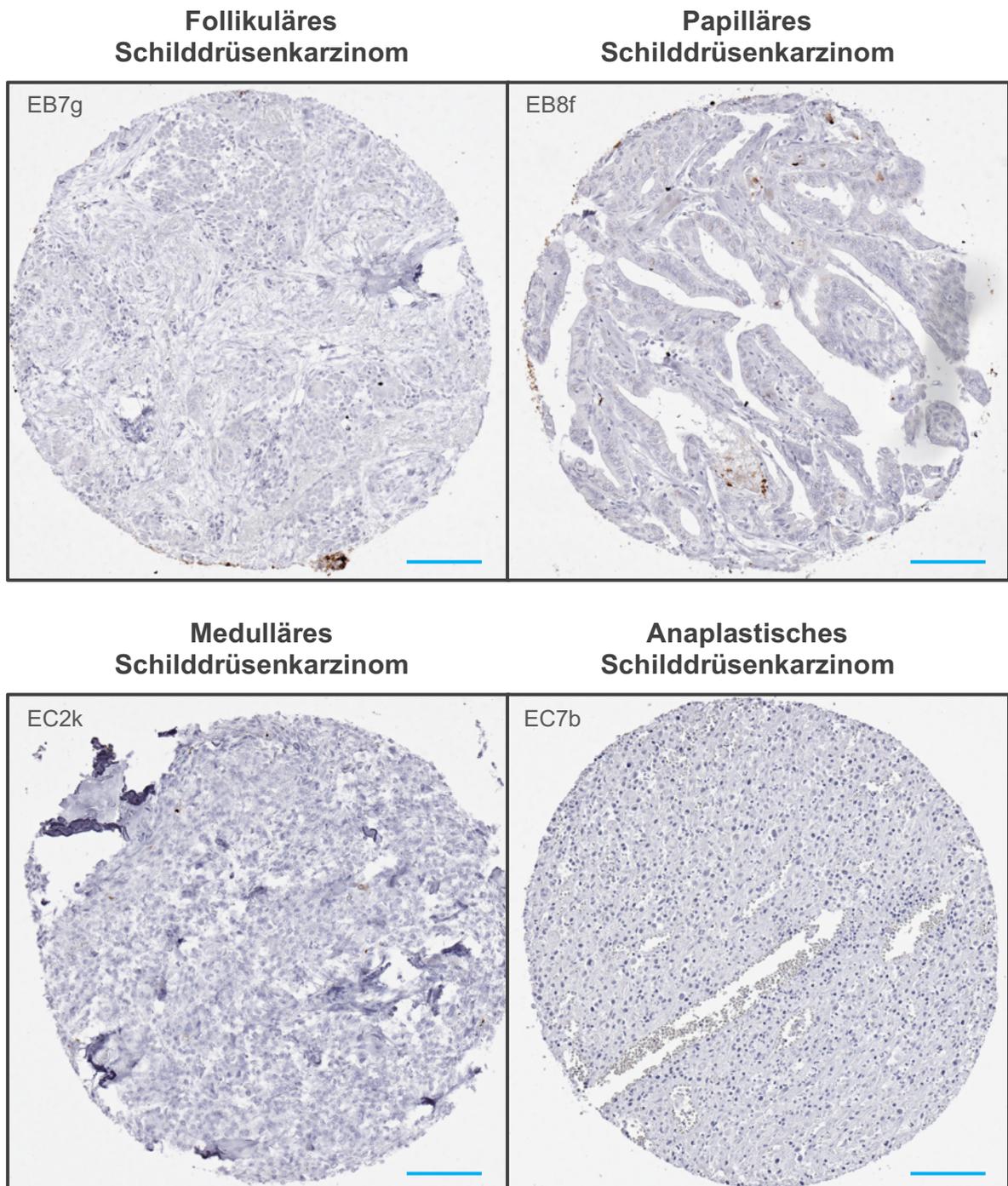


Abbildung 17: Schilddrüsentumoren mit negativer Thyreoglobulin (Tg) -Anfärbung

Immunhistochemische Färbungen von verschiedenen Schilddrüsentumoren mit Tg-negativem Ergebnis.

EB7g: Follikuläres Schilddrüsenkarzinom ohne Tg-Anfärbung

EB8f: Papilläres Schilddrüsenkarzinom ohne Tg-Anfärbung

EC2k: Medulläres Schilddrüsenkarzinom ohne Tg-Anfärbung

EC7b: Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom ohne Tg-Anfärbung

Maßstabsleiste: — 100 µm

In Tabelle 2 sind die Färbeergebnisse für alle Schilddrüsentumoren zusammenfassend dargestellt. Nur bei Schilddrüsenadenomen waren 100% der Tumoren Tg-positiv. Im Gegensatz dazu waren alle medullären Schilddrüsenkarzinome Tg-negativ. Die papillären und follikulären Schilddrüsenkarzinome waren meistens Tg-positiv. Anaplastische Schilddrüsenkarzinome waren überwiegend Tg-negativ. Lediglich ein einziger Fall zeigte eine schwache Anfärbung von Tg (vgl. Abbildung 16)

Alle anderen Tumoren zeigten keinerlei Tg-Anfärbungen. Die auswertbaren Tg-negativen Tumorproben wurden in Tabelle 3 zusammengefasst und nach Tumorentitäten geordnet.

Tabelle 2: Ergebnisse der Auswertung von immunhistochemisch gefärbten Schilddrüsentumoren mit dem Antikörper Thyreoglobulin.

	n	negativ [%]	schwach [%]	mäßiggradig [%]	stark [%]	gesamt positiv [%]
Schilddrüsenkarzinom, medullär	27	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Schilddrüsenkarzinom, anaplastisch	23	95,7	4,3	0,0	0,0	4,3
Schilddrüsenkarzinom, papillär	46	17,4	45,7	26,1	10,9	82,6
Schilddrüsenkarzinom, follikulär	42	9,5	31,0	47,6	11,9	90,5
Schilddrüsenadenom	37	0,0	10,8	64,9	24,3	100,0

Tabelle 3: Ergebnisse der Auswertung von immunhistochemisch gefärbten Gewebeproben mit dem Antikörper Threoglobulin, geordnet nach Tumorentitäten.

Tumorentitäten	n	negativ	schwach	mäßiggradig	stark
Analkarzinom	24	24	0	0	0
Angiosarkom	25	25	0	0	0
Basaliom	42	42	0	0	0
Basalzelladenom	15	15	0	0	0
Benigner Naevus	16	16	0	0	0
Cholangiozelluläres Karzinom	30	30	0	0	0
Chondrosarkom	5	5	0	0	0
Kolon, Adenokarzinom	32	32	0	0	0
Kolonadenom, high grade	26	26	0	0	0

Kolonadenom, low grade	28	28	0	0	0
Dottersacktumor	33	33	0	0	0
Dünndarm, Adenokarzinom	5	5	0	0	0
Embryonales Hodenkarzinom	41	41	0	0	0
Endometrioides Endometriumkarzinom	44	44	0	0	0
Seröses Endometriumkarzinom	37	37	0	0	0
Gastrointestinale Stromatumoren	37	37	0	0	0
Granularzelltumor	23	23	0	0	0
Grosszelliges Bronchialkarzinom	20	20	0	0	0
Harnblasenkarzinom, kleinzellig	18	18	0	0	0
Haut, Plattenepithelkarzinom	43	43	0	0	0
Hepatozelluläres Karzinom	46	46	0	0	0
Hodgkin-Lymphom	35	35	0	0	0
Neuroendokriner Tumor	28	28	0	0	0
Karzinom	48	48	0	0	0
Larynx, Plattenepithelkarzinom	42	42	0	0	0
Leiomyom	49	49	0	0	0
Leiomyosarkom	48	48	0	0	0
Liposarkom	33	33	0	0	0
Lunge, Adenokarzinom	35	35	0	0	0
Lunge, kleinzelliges Karzinom	15	15	0	0	0
Lunge, bronchioalveoläres Karzinom	5	5	0	0	0
Lunge, Plattenepithelkarzinom	26	26	0	0	0
Magen, Adenokarzinom, diffuser Typ	28	28	0	0	0
Magen, Adenokarzinom, intestinaler Typ	31	31	0	0	0
Malignes Melanom	42	42	0	0	0
Malignes Mesotheliom	34	34	0	0	0
Mammakarzinom, duktal	29	29	0	0	0
Mammakarzinom, lobulär	33	33	0	0	0
Mammakarzinom, medullär	13	13	0	0	0
Mammakarzinom, muzinös	15	15	0	0	0
Mammakarzinom, phylloid	44	44	0	0	0
Mammakarzinom, tubulär	13	13	0	0	0
Merkelzell Karzinom	41	41	0	0	0
Mundboden, Plattenepithelkarzinom	46	46	0	0	0

Nierenkarzinom, chromophob	45	45	0	0	0
Nierenkarzinom, klarzellig	44	44	0	0	0
Nierenkarzinom, papillär	39	39	0	0	0
Nebennierenrinde, Karzinom	15	15	0	0	0
Nebennierenrinde, Adenom	47	47	0	0	0
Non Hodgkin-Lymphom	44	44	0	0	0
Niere, Onkozytom	43	43	0	0	0
Ösophagus, Adenokarzinom	30	30	0	0	0
Ösophagus, Plattenepithelkarzinom	30	30	0	0	0
Osteosarkom	15	15	0	0	0
Ovar, Brennertumor	7	7	0	0	0
Ovar, endometrioides Karzinom	30	30	0	0	0
Ovarialkarzinom, muzinös	21	21	0	0	0
Ovarialkarzinom, serös	43	43	0	0	0
Pankreas, Adenokarzinom, Papille	17	17	0	0	0
Pankreas, duktales Adenokarzinom	25	25	0	0	0
Pankreas, Neuroendokriner Tumor	31	31	0	0	0
Phäochromozytom	34	34	0	0	0
Pilomatrixom	27	27	0	0	0
Pleomorphes Adenom, Parotis	41	41	0	0	0
Prostata, kleinzelliges Karzinom	8	8	0	0	0
Prostata Adenokarzinom	46	46	0	0	0
Riesenzell Tumor der Sehnenscheiden	42	42	0	0	0
Hoden, Seminom	46	46	0	0	0
Stromasarkom Uterus	12	12	0	0	0
Hoden, Teratom	23	23	0	0	0
Thymom	28	28	0	0	0
Urothelkarzinom, pTa	39	39	0	0	0
Urothelkarzinom, T2-4	44	44	0	0	0
Vagina, Plattenepithelkarzinom	29	29	0	0	0
Vulva, Plattenepithelkarzinom	34	34	0	0	0
Warthin Tumor	47	47	0	0	0
Zervix, Adenokarzinom	33	33	0	0	0
Zervix, Plattenepithelkarzinom	37	37	0	0	0

5 DISKUSSION

Die vorliegende Studie ist die größte jemals durchgeführte Studie zum IHC-Nachweis von Tg in extrathyreoidalen Tumoren. Alle von uns identifizierten sieben Studien, die zwischen 1999 und 2016 Tg-Antikörper an Nichtschilddrüsentumoren angewendet haben, berichteten insgesamt über 1000 untersuchte Fälle. Der ungewöhnliche Umfang unserer Studie wurde durch die Anwendung der TMA-Technik ermöglicht. Als wesentliche Vorteile der TMA-Technik gelten die geringen Kosten der Untersuchung und die hohe Geschwindigkeit der Prozesse (Kononen et al. 1998; Schraml et al. 1999; Sauter et al. 2003). Tatsächlich war der Zeitaufwand für die eigentliche IHC-Untersuchung sehr gering. Die Färbung dauerte wenige Stunden und auch die Auswertungen nahmen nicht mehr als zwei Stunden in Anspruch. Die Reagenzienkosten für die Untersuchung waren gering. Es wurden lediglich 800 µl Antikörper-Lösung bei einer Verdünnung von 1:150 verwendet. Die Kosten beliefen sich auf deutlich weniger als 100,00 €. Diese Fakten täuschen allerdings über den tatsächlichen Aufwand von TMA-Studien hinweg. Die Herausforderung liegt in der Herstellung der TMAs, die außerordentlich aufwändig ist und für die umfangreiche Voraussetzungen erfüllt werden müssen. Gerade für die Herstellung von Multitumor-TMAs, die nicht nur die häufigsten, sondern auch seltenere Tumorarten beinhalten, ist es wichtig, dass eine große Gewebebank zur Verfügung steht. Das Institut für Pathologie des UKEs ist hierfür geeignet. Mit Gewebeuntersuchungen bei beinahe hunderttausend Patienten jährlich ist dieses pathologische Institut eines der größten Deutschlands. Das Vorhandensein von Gewebe allein ist allerdings marginal. Wichtig ist, dass für ein TMA-Projekt geeignete Tumoren auch zuverlässig identifiziert werden können. Hierfür wird eine Datenbank mit einer angemessenen Suchfunktion benötigt. Mit der Möglichkeit einer Volltextsuche in der Patientendatenbank des UKEs ist diese Anforderung erfüllt. Aus der Kombination von Tumortypen und Organkategorien lassen sich auch seltenere Tumorarten identifiziert werden.

Das Expertenwissen eines Pathologen ist für die TMA-Herstellung ebenfalls essentiell. Die Qualität eines TMAs hängt wesentlich von der Auswahl optimaler Fälle ab. Optimal sind Tumoren, die im Block so gelegen sind, dass sie für den Stanzer leicht identifizierbar sind, z.B. in einer Ecke des Blockes. Außerdem ist es

wichtig, dass die Ratio Tumor zu Stroma bzw. Nekrosen, so ist, dass auch bei einer suboptimalen Platzierung der Stanznadel zur Probenentnahme eine hohe Chance besteht, eine immer noch ausreichende Menge an Tumorzellen im Zylinder zu haben. Die Herstellung von TMAs ist insbesondere für Großprojekte, wie die Herstellung eines Multitumor-Arrays, sehr personalintensiv. Derartige Projekte werden daher nie von nur einer Person, sondern von einer ganzen Gruppe von Wissenschaftlern gemeinsam in Angriff genommen. Zudem sind logistische Kompetenz und große räumliche Ressourcen notwendig, da immense Mengen von Schnitten und Blöcken transportiert oder sortiert werden müssen (Simon and Sauter 2003). Eine logistische Schwierigkeit besteht beispielsweise darin, Pathologen mit der richtigen Menge von Fällen zu beliefern und diese, nach Bearbeitung, dem weiteren Prozess der TMA-Herstellung wieder bereit zu stellen. Eine zu schnelle Lieferung von Schnitten an den Pathologen oder ein verzögerter Abtransport können schnell zum „Volllaufen“ eines Assistentenbüros mit Tumorfällen für ein TMA-Projekt führen. Der Dienst des Pathologen zur Befundung von Gewebeproben in der Routinediagnostik kann dadurch beeinträchtigt werden.

Die TMA-Methode wurde 1997/1998 von den Arbeitsgruppen von Olli-P. Kallionemie am National Human Genome Research Institute (NHGRI) in Bethesda/Maryland-USA und Guido Sauter in Basel/Schweiz entwickelt (Kononen et al. 1998). Mehrere der bei der Entwicklung der Methode involvierten Schlüsselpersonen sind heute am UKE beschäftigt. Neben einer hohen Kompetenz in allen Prozessen der TMA-Herstellung verfügt das UKE-Team auch über einen selbst gebauten Tissue-Arrayer, der allen Konkurrenzprodukten überlegen ist (G. Sauter, persönliche Mitteilung). Der Vorteil des UKE-Gerätes besteht darin, dass die Löcher im Empfängerblock nicht, wie bei den meisten Konkurrenzprodukten üblich, mit einer Nadel hergestellt werden (Vogel 2014; Beecher Instruments 2019), sondern mit einem Bohrer. Während die Herstellung von Löchern durch Stanznadeln zu einer Verdrängung des umliegenden Gewebes führt, ermöglicht die Bohrer-Technologie, in Kombination mit einem Schrittmotor zur automatischen Einstellung von Koordinaten, eine deutlich regelmäßiger Anordnung der Gewebeproben, als dies mit den verbreiteten Geräten der Firma Beecher möglich wäre.

Der erste Multitumor TMA mit 397 Gewebeproben von 17 unterschiedlichen Tumortypen wurde 1999 in Basel hergestellt (Schraml et al. 1999), genau wie der erste große Multitumor TMA 2003, damals mit 5233 Gewebeproben, davon 4379 Tumorgewebe von mehr als 100 Tumortypen und Subtypen (Lugli et al. 2003). Analog zum aktuellen Hamburger-TMA, beinhaltete dieser erste große Basel-TMA bis zu 50 Gewebeproben pro Tumor. Der Hamburger Multitumor-TMA ist kleiner als der Basler Multitumor-TMA, weil auf seltene benigne mesenchymale Tumoren ebenso verzichtet wurde, wie auf Tumormetastasen. Für Tumormetastasen stehen in Hamburg andere separate TMAs zur Verfügung. Es ist bemerkenswert, dass heute, 16 Jahre nach der Publikation des ersten großen Multitumor-TMAs, ähnliche TMAs nur selten publiziert worden sind. Der größte bekannte Multitumor-TMA mit 5134 Tumorgeweben stammt von Miettinen et al. und beinhaltet v.a. eine große Menge mesenchymaler Tumoren (Miettinen et al. 2015). Wahrscheinlich ist der hohe logistische Aufwand der Erstellung eines großen Multitumor-TMAs, verbunden mit der Notwendigkeit eines verhältnismäßig großen Teams, die Ursache dafür, dass dieses nützliche Forschungsinstrument nur an wenigen Orten verfügbar ist.

Die größte Limitierung der TMA-Technik besteht in der geringen Gewebemenge, die pro Tumor zur Untersuchung gelangt. Dementsprechend wurde die Repräsentativität von TMAs in einigen Studien in Frage gestellt (Camp et al. 2000; Hoos et al. 2001; Rimm et al. 2001; Gancberg et al. 2002; Rubin et al. 2002). Verschiedene Autoren hatten gezeigt, dass die Entnahme von mehreren Zylindern aus einem Gewebeblock zu einer besseren Übereinstimmung mit Daten führen, die anhand eines Großschnittes des „Spender-Gewebeblocks“ erhoben werden (Camp et al. 2000; Mucci et al. 2000; Engellau et al. 2001; Hoos et al. 2001; Fernebro et al. 2002; Rubin et al. 2002). Dies ist zu erwarten, denn je größer die Teilmenge ist, die von einem Gewebeblock untersucht wird, desto wahrscheinlicher wird die Teilmenge auch den Befund der Gesamtmenge repräsentieren. Die relevante Frage ist daher, ob die Untersuchung eines gesamten Großschnittes oder einer möglichst großen Teilmenge dieses Großschnittes tatsächlich klinisch relevantere Befunde ergibt, als die Untersuchung von nur einem TMA-Spot. Diese Frage kann nur durch den Vergleich von Großschnitt-Daten und TMA-Daten mit etwas Objektivem, wie beispielsweise der Prognose von Tumoren, geklärt werden. Die größte Studie zur Frage, ob TMA-Daten ähnliche prognostische Informationen erzielen können wie

Großschnitt-Daten, stammt von Torhorst et al.. In dieser Studie wurde eine Serie von 553 Mammakarzinomen untersucht, von denen vier unabhängige TMAs hergestellt wurden. Dabei wurden 0,6 mm große Zylinder vom Tumorzentrum und drei möglichst weit voneinander entfernte Areale der Tumor-Peripherie entnommen. Die TMAs wurden mit dem identischen Protokoll gefärbt, wie die konventionellen Großschnitte aller 553 Fälle. Die Untersuchung umfasste zwei etablierte Prognosemarker (Östrogen-Rezeptor, Progesteron-Rezeptor) und das p53-Protein, das von vielen Autoren ebenfalls als prognoserelevant bei Mammakarzinomen gefunden wurde (Thor et al. 1992; Bergh et al. 1995; Peller 1998; Allred et al. 1998; Miller et al. 2005). Für Östrogen-Rezeptor und Progesteron-Rezeptor ergab sich an Großschnitten und TMAs eine analoge Prognoserelevanz der Färbungen. Unerwartet fiel hingegen das Resultat für p53 aus. Die p53-Färbung war an Großschnitten fast doppelt so häufig positiv wie an TMA-Schnitten, doch ergab die Großschnittuntersuchung keine prognostische Relevanz für die p53-Färbung. Hingegen erwiesen sich die p53-Färbungen der vier verschiedenen TMAs als hochsignifikant mit der Prognose assoziiert. Wären für diese Studie keine Prognosedaten vorhanden gewesen, hätten die Befunde so interpretiert werden können, dass fast die Hälfte der p53-positiven Fälle am TMA „verpasst“ worden wären. Angesichts der Prognosedaten zeigt sich aber, dass offenbar irrelevante fokale p53-Färbungen am Großschnitt überinterpretiert worden waren, sodass die Prognoserelevanz des p53-Status „verpasst“ worden war (Torhorst et al. 2001).

Die Torhorst-Studie macht deutlich, dass Untersuchungen an TMAs gegenüber klassischen Großschnittuntersuchungen auch Vorteile aufweisen, die über die Geschwindigkeit der Untersuchung und die Reagenzienkosten hinaus gehen. Ein Vorteil ist die maximale Standardisierung der Untersuchung. Alle Schnitte einer TMA-Studie können, in der Regel an einem Tag, in einem identischen Satz von Reagenzien, bei absolut identischen Raum- und Reagenzientemperaturen, durchgeführt werden (Bubendorf et al. 1999; Sauter et al. 2003). Auch das Schnittalter (Zeitspanne zwischen der Herstellung eines Gewebeschnittes und dessen Färbung) ist in einer TMA-Studie absolut identisch. Studien haben gezeigt, dass die Lagerung von Gewebeschnitten bereits nach zwei Wochen zu einer markanten Abnahme vieler IHC-Färbungen führt (Jacobs et al. 1996; Bertheau et al. 1998; Mirlacher et al. 2004). Ein weiterer offensichtlicher Vorteil der TMA-Technik

ist, dass von jedem Tumor die gleiche kleine Gewebemenge zur Untersuchung gelangt. Ist ein Tumor für einen bestimmten Marker homogen kräftig positiv, wird auch eine kleine Gewebeprobe immer zur Identifizierung dieser Positivität führen. Ist ein Tumor für einen Marker negativ, ist dies auch an einer kleinen Tumormenge zu finden. Eindeutige Befunde sollten also auch in einem TMA identifiziert werden können. Die geringe Größe der Gewebeproben hat zudem den Vorteil, dass das Risiko eines Färbeartefaktes kleiner ist, als bei Großschnitten (Torhorst et al. 2001).

Tatsächlich hat sich die TMA-Methode als außerordentlich wertvoll erwiesen. Alle Studien, die bereits etablierte Prognosemarker an TMAs untersuchten, haben die prognostische Bedeutung dieser Marker am TMA auch reproduzieren können. So wurden beim Mammakarzinom die vorher bereits bekannte Prognoserelevanz von Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor, HER2-Amplifikation, p53-Status oder Ki-67-Labeling-Index eindeutig reproduziert (Camp et al. 2000; Torhorst et al. 2001; Ginestier et al. 2002; Ruiz et al. 2006; Muftah et al. 2017). Beim Harnblasenkarzinom konnte die Prognoserelevanz des histologischen Grades und des Ki-67-Labeling-Index am TMA reproduziert werden (Nocito et al. 2001). Beim Nierenzellkarzinom wurde die Prognoserelevanz Vimentin-Expression validiert (Moch et al. 1999) und beim Prostatakarzinom die prognostische Bedeutung des p53-Status oder von Phosphatase and Tensin homolog (PTEN) -Deletionen (Schlomm et al. 2008; Krohn et al. 2012). Der „Weltrekord-TMA“ des UKE mit mehr als 10.000 Prostatakarzinomen, von denen klinische Verlaufsdaten vorliegen, hatte darüber hinaus zur Identifikation von mindestens 30 prognoserelevanten Biomarkern bei diesem Tumor geführt (Burdelski et al. 2014). Dazu zählen u.a. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) (Grupp et al. 2013), Enhancer Zeste Homolog 2 (EZH2) (Melling et al. 2015) und Microtubule-Associated Protein Tau (MAPT) (Schroeder et al. 2019). Bei letzterem ist die Untersuchung bereits auf mehr als 17.000 Gewebeproben des Prostatakarzinoms erweitert worden.

Multitumor-Arrays, die zahlreiche Tumoren verschiedener Typen enthalten, sind eine weitere wichtige Anwendung der TMA-Methode. Die systematische Untersuchung sämtlicher existierender menschlicher Tumortypen erlaubt eine finale Klärung der diagnostischen Bedeutung bestimmter Antikörper oder eine Abschätzung, inwieweit bestimmte Therapieziele bei unterschiedlichen Tumortypen relevant sein könnten. Beispiele von früher durchgeführten Studien an Multitumor-

Arrays beinhalten die Therapieziele Tyrosinkinase KIT (auch c-Kit), HER2 und Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN, auch genannt Basigin), den Diagnosemarker Calretinin oder den in verschiedenen Tumortypen prognoserelevanten Marker Tubulin Beta 3 Class III (TUBB3). TMA-Untersuchungen hatten bei allen drei Therapiezielen relevante Ergebnisse erzielt. Für c-Kit konnte gezeigt werden, dass das Therapieziel für Imatinib (Glivec®) nicht nur bei gastrointestinalen Stromatumoren, sondern auch bei Seminomen, Melanomen, Speicheldrüsentumoren und anderen Tumortypen vorkommt (Went et al. 2004). Für HER2 wurde gezeigt, dass Amplifikationen und Überexpressionen nicht nur beim Mammakarzinom, sondern auch bei verschiedenen anderen Tumortypen, darunter dem Magenkarzinom und Urothelkarzinom, vorkommen (Tapia et al. 2007). EMMPRIN ist ein Glykoprotein der Zellmembran, das zur Tumorinvasion und -metastasierung beiträgt. In einer Multitumor-TMA-Studie ist nachgewiesen worden, dass die EMMPRIN-Expression bei zahlreichen verschiedenen Tumorarten vorkommt, und das deutlich häufiger als bei Normalgeweben. Damit kann diese TMA-Studie zur Bestimmung der Verwendbarkeit von EMMPRIN als Therapieziel beitragen und sie ermöglicht zudem das Vorhersehen negativer Nebenwirkungen (Riethdorf et al. 2006). Calretinin ist ein Protein, welches bei malignen Mesotheliomen häufig überexprimiert wird. Die Studie von Lugli et al. hatte gezeigt, dass zahlreiche andere Tumorarten eine ausgeprägte Calretinin-Expression aufweisen (Lugli et al. 2003). TUBB3 ist ein Bestandteil des Zellskeletts, welches in verschiedenen epithelialen Geweben vorkommt und bei mehreren Tumoren, einschließlich Prostata- und Mammakarzinom, als prognoserelevant gilt und möglicherweise prädiktiv ist, für das Ansprechen auf eine Chemotherapie (Person et al. 2017). Die Untersuchung von Person et al. ergab auch für dieses Protein eine Expression in zahlreichen verschiedenen Tumorarten.

Die Daten dieser Studie belegen, dass der immunhistochemische Tg-Nachweis, zumindest unter Verwendung des in dieser Studie verwendeten Antikörpers, hochspezifisch für die Diagnose eines Schilddrüsentumors ist. Eine Anfärbung mit dem Antikörper wurde bei keinem der 2419 untersuchten und auswertbaren Nichtschilddrüsentumoren gefunden. Eine derartige Gewebespezifität ist ungewöhnlich. Selbst für PSA war am Institut für Pathologie des UKE in einer

kürzlich durchgeführten Studie neben der Expression in Prostatakarzinomen eine Expression in mehreren Endometriumkarzinomen nachgewiesen worden (Dissertation Soekeland, unveröffentlicht). Eine unerwartete Expression von gewebespezifischen Proteinen in Tumoren, die aus anderen Geweben entstanden sind, wäre somit nicht überraschend. Denn in jedem Tumor wird die Expression zahlreicher Gene dysreguliert, sodass nach dem Zufallsprinzip mit einer gelegentlichen Überexpression von Tg auch in Nichtschilddrüsentumoren gerechnet werden könnte. Auch die früher durchgeführten Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, unter Verwendung anderer Antikörper, hatten nie eine Tg-Expression in Nichtschilddrüsentumoren ergeben (vgl. Tabelle 1). Die Gründe für die besonders hohe Spezifität der Tg-Expression könnten in der Komplexität der Herstellung des Proteins liegen, welche auch daran gebunden ist, dass das hergestellte Tg sofort in das Follikellumen abgegeben wird (Carvalho and Dupuy 2017).

Das Ergebnis der vorliegenden Untersuchung spricht auch für die Qualität des verwendeten Antikörpers. Antikörper sind nämlich nicht immer absolut spezifisch. Sie binden sich nicht selten auch an Gewebestrukturen, die nicht dem eigentlichen Ziel-Epitop entsprechen. Die Sensitivität der Tg-Untersuchung für den Nachweis von Schilddrüsenkarzinomen ist allerdings nicht hundertprozentig. Außer bei benignen Schilddrüsenadenomen war in jeder untersuchten Tumorkategorie mindestens ein Tumor vollständig Tg-negativ (vgl. Abbildung 17). Diese Befunde entsprechen im Wesentlichen der Literatur, laut der die Mehrzahl der papillären und follikulären Schilddrüsenkarzinome positiv waren, aber immer wieder auch einzelne Fälle keine nachweisbare Tg-Expression aufwiesen (Harach and Franssila 1988; Bejarano et al. 2000; Evans et al. 2012). Die in dieser Studie erhöhte Rate an negativen Fällen ist möglicherweise methodisch bedingt.

Die Untersuchung von Schilddrüsenpräparaten erfolgt unter einem besonderen Zeitdruck, denn die im Falle einer Karzinomdiagnose notwendige Nachoperation, inklusive kompletter Thyreoidektomie und Lymphknotenentfernung, sollte zur Erzielung optimaler Ergebnisse innerhalb von weniger als fünf Tagen erfolgen. Andernfalls kann die Zweitoperation durch die bereits einsetzende Narbenbildung einer Voroperation behindert werden. Der Zeitumfang der Schilddrüsendiagnostik am UKE ist außergewöhnlich gering. Im Durchschnitt beträgt die Dauer zwischen

Eingang eines Schilddrüsenpräparates und der fertigen Diagnose ca. 20 Stunden (Prof. G. Sauter, persönliche Mitteilung). Diese schnelle Diagnostik birgt allerdings die Gefahr, dass die Fixation der Präparate nicht immer optimal erfolgt. Nicht optimal fixierte Präparate sind eine häufige Ursache für falsch-negative oder schwache IHC-Anfärbungen (Werner et al. 2000). Angesichts der kräftigen Färbung der Tg-positiven Schilddrüsenkarzinome ist es unwahrscheinlich, dass die negativen Färbungen einzelner Tumoren durch einen ungewöhnlich schwachen Antikörper bedingt sind. Es ist nicht überraschend, dass nur ein anaplastisches Schilddrüsenkarzinom eine schwache Tg-Expression aufwies (vgl. Abbildung 16). Für anaplastische Schilddrüsenkarzinome wurden auch in anderen Untersuchungen ähnlich geringe Positivitätswerte dokumentiert (vgl. Tabelle 4, Fall-Nr. 11 – 14). Die Zuverlässigkeit, mit der die Tg-Expression in entdifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen verloren geht, ist bemerkenswert (Park et al. 2014). Bei anderen Tumortypen gehen gewebespezifische Gewebemuster weniger schnell verloren. Beispielsweise ist die PSA-Expression auch in entdifferenzierten 5+5 Karzinomen (Gleason Score) in ca. >80% erhalten (Dissertation Soekeland, unveröffentlicht). Möglicherweise liegt die zuverlässige Einstellung der Tg-Produktion in entdifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen ebenfalls in der komplexen Biosynthese des Proteins begründet. Auch sind bei anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen die für die Herstellung benötigten Follikel nicht mehr nachweisbar. Eine Zusammenstellung der Häufigkeit einer nachweisbaren Tg-Expression in verschiedenen Subtypen des Schilddrüsenkarzinoms aus Publikationen anderer Autoren ist in Tabelle 4 dargestellt. Wie erwartet zeigen alle Studien, ebenso wie die vorliegenden Befunde, keinen Nachweis von Tg in den von den C-Zellen abgeleiteten medullären Schilddrüsenkarzinomen (vgl. Tabelle 4, Fall-Nr. 15 -18). Die Positivitäten bei Fall-Nr. 16 resultieren laut Micco et. al. möglicherweise von Tg-Molekülen aus Normalgewebe, das von Tumorzellen phagozytiert wurde (de Micco et al. 1993).

Zusammengefasst erlaubte die vorliegende Studie unter Verwendung der TMA-Technik die Analyse von 818 Normalgeweben (die jeweiligen Kontrollgruppen der MTAs mit inbegriffen) und 2594 Tumoren, davon 175 Schilddrüsentumoren und 2419 extrathyreoidaler Neoplasien. Die Untersuchung zeigt eine uneingeschränkte Gewebespezifität der Tg-Expression. Das Tg-Protein ließ sich in acht von acht

Schilddrüsen-Normalgeweben, 37 von 37 Schilddrüsenadenomen, 38 von 42 follikulären Schilddrüsenkarzinomen, 38 von 46 papillären Schilddrüsenkarzinomen und in 1 von 23 anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen nachweisen (vgl. Tabelle 2). Keine der 2419 erfolgreich untersuchten nichtthyreoidalen Neoplasien war Tg-positiv (vgl. Tabelle 3).

Die Untersuchung zeigt, dass, zumindest unter Verwendung der in diesem Projekt etablierten Reagenzien und Färbeprotokolle, der Nachweis einer Tg-Anfärbung mit praktischer Sicherheit diagnostisch ist für des Vorliegen von thyreoidalem Gewebe.

Tabelle 4: Zusammenstellung von Publikationen mit immunhistochemischen Tg-Färbungen von Schilddrüsentumoren

Nr.	Referenz	Organ	Tumortyp	Klon	Wirt	Name (Firma)	Verdünnung	Fallzahl	Tg-Positiv positiv	Tg-Positiv [%]
1	(Harach and Franssila 1988)	Schilddrüse	FTC ¹	N/A	N/A	(Dako)	N/A	47	45	96%
2	(Bejarano et al. 2000)	Schilddrüse	FTC	Monoklonal	Mouse	DAK-Tg6 (Dako)	1:20	4	3	75%
3	(Albores-Saavedra et al. 1983)	Schilddrüse	FTC	N/A	Rabbit	N/A	N/A	16	16	100%
4	(Burt et al. 1985)	Schilddrüse	FTC	Polyklonal	Rabbit	N/A	N/A	5	5	100%
5	(Keen et al. 1999)	Schilddrüse	PTC ²	Monoklonal	Mouse	DAK-Tg6 (Dako)	1:800	9	9	100%
6	(Bejarano et al. 2000)	Schilddrüse	PTC	Monoklonal	Mouse	DAK-Tg6 (Dako)	1:20	8	8	100%
7	(Albores-Saavedra et al. 1983)	Schilddrüse	PTC	N/A	Rabbit	N/A	N/A	7	7	100%
8	(Burt et al. 1985)	Schilddrüse	PTC	Polyklonal	Rabbit	N/A	N/A	5	5	100%
9	(Gremel et al. 2014)	Schilddrüse	PTC	Polyklonal	N/A	N/A	1:20000	18	18	100%
10	(Evans et al. 2012)	Schilddrüse	PTC	Monoklonal	Mouse	DAK-Tg6 (Dako)	1:800	21	20	95%
11	(Deeken-Draisey et al. 2018)	Schilddrüse	ATC ³	N/A	Rabbit	N/A (Dako)	1:600	11	0	0%
12	(Albores-Saavedra et al. 1983)	Schilddrüse	ATC	Monoklonal	Mouse	MoAb (Medica)	1:10	32	4	13%
13	(Burt et al. 1985)	Schilddrüse	ATC	Polyklonal	Rabbit	N/A	N/A	13	0	0%
14	(Evans et al. 2012)	Schilddrüse	ATC	Monoklonal	Mouse	DAK-Tg6 (Dako)	1:800	19	4	21%
15	(Krisch et al. 1985)	Schilddrüse	MTC ⁴	N/A	N/A	(Dako)	1:1800	30	0	0%
16	(de Micco et al. 1993)	Schilddrüse	MTC	Monoklonal	Mouse	MoAb1 (Immunotech)	1:500	19	2	11%
17	(Singh et al. 2008)	Schilddrüse	MTC	N/A	N/A	(Dako)	1:50	1	0	0%
18	(Wang et al. 2018)	Schilddrüse	MTC	Monoklonal	Mouse	N/A	1:300	1	0	0%
19	(Pomorski et al. 2005)	Lymphknoten	Metastasen des PTC	N/A	N/A	(Dako)	N/A	21	7	33%
20	(Bejarano et al. 2000)	Lymphknoten	Metastasen des PTC	Monoklonal	Mouse	N/A	1:20	8	8	100%
21	(Bejarano et al. 2000)	Lymphknoten	Metastasen des ATC	Monoklonal	Mouse	N/A	1:20	1	0	0%
22	(de Micco et al. 1993)	Lymphknoten	Metastasen des MTC	Polyklonal	Rabbit	PoAb (Ortho)	1:100	15	1	7%
23	(Venkatraman et al. 2001)	Lymphknoten Histiozyten	Metastasen von Schilddrüsen Malignitäten	Monoklonal	Mouse	DAK-Tg6 (Dako)	N/A	21	15	71%

¹ dt. Follikuläres Schilddrüsenkarzinom; ² dt. Papilläres Schilddrüsenkarzinom; ³ dt. Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom; ⁴ dt. Medulläres Schilddrüsenkarzinom

6 ZUSAMMENFASSUNG

Tg ist ein Glykoprotein, das in den Thyreozyten der Schilddrüse gebildet wird und über Exozytose direkt in die Follikel sezerniert wird. Der IHC-Nachweis des Tg-Proteins gilt als spezifisch für Schilddrüsengewebe und wird deshalb bei der Diagnostik von Metastasen unklarer Primärtumoren angewendet. Bisherige Studien hatten nur wenige Nichtschilddrüsenkarzinome auf die Expression von Tg untersucht.

Zur Klärung der Frage, ob eine ektopische Tg-Produktion auch in anderen Tumortypen vorkommen kann, wurden in dieser Studie 3448 verschiedene Tumoren von 83 verschiedenen Tumorkategorien und -unterkategorien untersucht. Zusätzlich wurden 76 verschiedene Normalgewebstypen von jeweils acht verschiedenen Patienten analysiert. Alle Untersuchungen erfolgten in einem TMA-Format.

Die Färbungen ergaben eine absolute Spezifität der Tg-Expression für Schilddrüsengewebe. Eine Tg-Positivität fand sich in acht von acht normalen Schilddrüsengeweben (100%), 37 von 37 Schilddrüsenadenomen (100%), 38 von 42 follikulären Schilddrüsenkarzinomen (90,5%), 38 von 46 papillären Schilddrüsenkarzinomen (82,6%) und in einem von 23 anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen (4,3%). Keine Tg-Anfärbung fand sich in den 27 untersuchten, von C-Zellen der Schilddrüse abgeleiteten, medullären Schilddrüsenkarzinomen. Auch in 2419 extrathyreoidalen Karzinomen konnte keine Tg-Anfärbung beobachtet werden.

Zusammenfassend unterstreicht die Untersuchung die hohe Nützlichkeit von TMAs für die Evaluation diagnostischer Marker. Die vorliegenden Daten ergeben, dass der Tg-Nachweis mit dem verwendeten experimentellen Setup dieser Studie einhundertprozentig spezifisch für Schilddrüsengewebe ist. Der fehlende Nachweis einer Tg-Expression in einzelnen follikulären und papillären Karzinomen könnte einerseits durch die Entdifferenzierung dieser Tumoren bedingt sein. Andererseits könnte die Methodik, die Fixation im Speziellen, zu einer reduzierten Immunreaktivität der untersuchten Gewebe geführt haben.

7 SUMMARY

Thyroglobulin (Tg) is a large glycoprotein produced exclusively by the thyroid follicular cells, the thyrocytes. As a precursor of the thyroid hormones Tg is transported directly into the follicular lumen by exocytosis, where iodination of Tg is able to take place. The immunohistochemical detection of Tg is known to be highly specific for thyroid tissue. Therefore, Tg-immunostaining is used as a diagnostic tool for metastatic carcinoma of unknown primary. Nevertheless, only a few non-thyroid carcinomas were examined for Tg-expression until now.

The question is whether it is possible for other tumor types to produce ectopic Tg. Therefore, the aim of the study is to make a precise statement of the specificity of Tg-expression for thyroid tissue.

This study contains a total of 3448 tumor samples within 83 different tumor categories and subcategories as well as 76 different normal tissue types from eight different people. All samples were analyzed by immunohistochemistry using the technique of tissue microarrays (TMA).

The results of immunostaining revealed Tg-expression to be highly specific for thyroid tissue. Tg-positivity was found in eight out of eight normal thyroid tissues (100%), in 37 out of 37 thyroid adenomas (100%), in 38 out of 42 follicular thyroid carcinomas (90.5%), in 38 out of 46 papillary thyroid carcinomas (82.6%) and in one out of 23 anaplastic thyroid carcinomas (4.3%). The 27 medullary thyroid carcinomas, derived from the C-cells of the thyroid gland, showed no Tg-expression at all. Equally, no positive staining was observed in 2419 extrathyroidal carcinomas.

In conclusion this study highlights the high utility and benefit of TMAs for the evaluation of diagnostic markers. In this case, Tg-detection is one hundred percent specific for thyroid tissue considering that the given experimental setup of this study is used. Missing detection of Tg-expression within a few of the follicular and papillary thyroid carcinomas may refer to poor differentiation of these tumors. Aside from that the method, the fixation in particular, might have reduced the immunoreactivity of the analyzed samples.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Albers, P., Albrecht, W., Algaba, F., Bokemeyer, C., Cohn-Cedermark, G., Horwich, A., Klepp, O., Laguna, M. P. & Pizzocaro, G. 2005. Guidelines on testicular cancer. *Eur Urol*, 48, 885-94.
- Albores-Saavedra, J., Nadji, M., Civantos, F. & Morales, A. R. 1983. Thyroglobulin in carcinoma of the thyroid: an immunohistochemical study. *Hum Pathol*, 14, 62-6.
- Alexandrov, L. B., Ju, Y. S., Haase, K., Van Loo, P., Martincorena, I., Nik-Zainal, S., Totoki, Y., Fujimoto, A., Nakagawa, H., Shibata, T., Campbell, P. J., Vineis, P., Phillips, D. H. & Stratton, M. R. 2016. Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *Science*, 354, 618-622.
- Allred, D. C., Harvey, J. M., Berardo, M. & Clark, G. M. 1998. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*, 11, 155-68.
- Ames, B. N. 1989. Mutagenesis and carcinogenesis: endogenous and exogenous factors. *Environ Mol Mutagen*, 14 Suppl 16, 66-77.
- Axon, A. 2006. Symptoms and diagnosis of gastric cancer at early curable stage. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 20, 697-708.
- Baselga, J., Norton, L., Albanell, J., Kim, Y. M. & Mendelsohn, J. 1998. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res*, 58, 2825-31.
- Beecher Instruments. 2019. *Manual Tissue Arrayer MTA-1* [Online]. Estigen OÜ,. Available: <https://estigen.com/products/manual-tissue-arrayer/> [Accessed 14.03. 2019].
- Bejarano, P. A., Nikiforov, Y. E., Swenson, E. S. & Biddinger, P. W. 2000. Thyroid transcription factor-1, thyroglobulin, cytokeratin 7, and cytokeratin 20 in thyroid neoplasms. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 8, 189-94.
- Bergh, J., Norberg, T., Sjogren, S., Lindgren, A. & Holmberg, L. 1995. Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nat Med*, 1, 1029-34.
- Bernacki, K. D., Fields, K. L. & Roh, M. H. 2014. The utility of PSMA and PSA immunohistochemistry in the cytologic diagnosis of metastatic prostate carcinoma. *Diagn Cytopathol*, 42, 570-5.
- Bertheau, P., Cazals-Hatem, D., Meignin, V., de Roquancourt, A., Verola, O., Lesourd, A., Sene, C., Brocheriou, C. & Janin, A. 1998. Variability of immunohistochemical reactivity on stored paraffin slides. *J Clin Pathol*, 51, 370-4.
- Bubendorf, L., Kononen, J., Koivisto, P., Schraml, P., Moch, H., Gasser, T. C., Willi, N., Mihatsch, M. J., Sauter, G. & Kallioniemi, O. P. 1999. Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res*, 59, 803-6.
- Burdelski, C., Matuszewska, A., Kluth, M., Koop, C., Grupp, K., Steurer, S., Wittmer, C., Minner, S., Tsourlakis, M. C., Sauter, G., Schlomm, T. & Simon, R. 2014. Qualitative and Quantitative Requirements for Assessing Prognostic Markers in Prostate Cancer. *Microarrays (Basel)*, 3, 137-58.
- Burt, A. D., Kerr, D. J., Brown, I. L. & Boyle, P. 1985. Lymphoid and epithelial markers in small cell anaplastic thyroid tumours. *J Clin Pathol*, 38, 893-6.
- Camp, R. L., Charette, L. A. & Rimm, D. L. 2000. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest*, 80, 1943-9.
- Cappell, M. S. 2008. Pathophysiology, clinical presentation, and management of colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am*, 37, 1-24, v.

- Carter, P., Presta, L., Gorman, C. M., Ridgway, J. B., Henner, D., Wong, W. L., Rowland, A. M., Kotts, C., Carver, M. E. & Shepard, H. M. 1992. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 4285-9.
- Carvalho, D. P. & Dupuy, C. 2017. Thyroid hormone biosynthesis and release. *Mol Cell Endocrinol*, 458, 6-15.
- Conner, J. R. & Hornick, J. L. 2015. Metastatic carcinoma of unknown primary: diagnostic approach using immunohistochemistry. *Adv Anat Pathol*, 22, 149-67.
- Dai, G., Levy, O. & Carrasco, N. 1996. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature*, 379, 458-60.
- Dawane, R., Grindstaff, A., Parwani, A. V., Brock, T., White, W. M. & Nodit, L. 2015. Thyroid-like follicular carcinoma of the kidney: one case report and review of the literature. *Am J Clin Pathol*, 144, 796-804.
- de Micco, C., Chapel, F., Dor, A. M., Garcia, S., Ruf, J., Carayon, P., Henry, J. F. & Lebreuil, G. 1993. Thyroglobulin in medullary thyroid carcinoma: immunohistochemical study with polyclonal and monoclonal antibodies. *Hum Pathol*, 24, 256-62.
- de Micco, C., Ruf, J., Carayon, P., Chrestian, M. A., Henry, J. F. & Toga, M. 1987. Immunohistochemical study of thyroglobulin in thyroid carcinomas with monoclonal antibodies. *Cancer*, 59, 471-6.
- Deeken-Draisey, A., Yang, G. Y., Gao, J. & Alexiev, B. A. 2018. Anaplastic thyroid carcinoma: an epidemiologic, histologic, immunohistochemical, and molecular single-institution study. *Hum Pathol*, 82, 140-148.
- Delange, F. 1994. The disorders induced by iodine deficiency. *Thyroid*, 4, 107-28.
- Di Cosmo, C., Liao, X. H., Dumitrescu, A. M., Philp, N. J., Weiss, R. E. & Refetoff, S. 2010. Mice deficient in MCT8 reveal a mechanism regulating thyroid hormone secretion. *J Clin Invest*, 120, 3377-88.
- Di Palma, T., Nitsch, R., Mascia, A., Nitsch, L., Di Lauro, R. & Zannini, M. 2003. The paired domain-containing factor Pax8 and the homeodomain-containing factor TTF-1 directly interact and synergistically activate transcription. *J Biol Chem*, 278, 3395-402.
- Dietlein, M., Dressler, J., Eschner, W., Grunwald, F., Lassmann, M., Leisner, B., Luster, M., Moser, E., Reiners, C., Schicha, H. & Schober, O. 2007. [Procedure guidelines for radioiodine therapy of differentiated thyroid cancer (version 3)]. *Nuklearmedizin*, 46, 213-9.
- Dunn, J. T. & Dunn, A. D. 2001. Update on intrathyroidal iodine metabolism. *Thyroid*, 11, 407-14.
- Engellau, J., Akerman, M., Anderson, H., Domanski, H. A., Rambech, E., Alvegard, T. A. & Nilbert, M. 2001. Tissue microarray technique in soft tissue sarcoma: immunohistochemical Ki-67 expression in malignant fibrous histiocytoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 9, 358-63.
- Enzinger, P. C. & Mayer, R. J. 2003. Esophageal cancer. *N Engl J Med*, 349, 2241-52.
- Evans, J. J., Crist, H. S., Durvesh, S., Bruggeman, R. D. & Goldenberg, D. 2012. A comparative study of cell cycle mediator protein expression patterns in anaplastic and papillary thyroid carcinoma. *Cancer Biol Ther*, 13, 776-81.
- Fearon, K. C., Glass, D. J. & Guttridge, D. C. 2012. Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways. *Cell Metab*, 16, 153-66.
- Fernald, K. & Kurokawa, M. 2013. Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol*, 23, 620-33.
- Fernebro, E., Dictor, M., Bendahl, P. O., Ferno, M. & Nilbert, M. 2002. Evaluation of the tissue microarray technique for immunohistochemical analysis in rectal cancer. *Arch Pathol Lab Med*, 126, 702-5.
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., Horton, H. F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M. R., Carreno, B. M., Collins, M., Wood, C. R. & Honjo, T. 2000. Engagement

- of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*, 192, 1027-34.
- Galluzzi, L., Buque, A., Kepp, O., Zitvogel, L. & Kroemer, G. 2015. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell*, 28, 690-714.
- Gancberg, D., Di Leo, A., Rouas, G., Jarvinen, T., Verhest, A., Isola, J., Piccart, M. J. & Larsimont, D. 2002. Reliability of the tissue microarray based FISH for evaluation of the HER-2 oncogene in breast carcinoma. *J Clin Pathol*, 55, 315-7.
- GenomeMe Canada. 2019. *GeneAb Thyroglobulin Antibody (IHC674)* [Online]. Available: <http://www.genomeme.ca/molecular-pathology/Thyroglobulin.html> [Accessed 06.04.2019].
- Gerard, C. M., Lefort, A., Christophe, D., Libert, F., Van Sande, J., Dumont, J. E. & Vassart, G. 1989. Control of thyroperoxidase and thyroglobulin transcription by cAMP: evidence for distinct regulatory mechanisms. *Mol Endocrinol*, 3, 2110-8.
- Ginestier, C., Charafe-Jauffret, E., Bertucci, F., Eisinger, F., Geneix, J., Bechlian, D., Conte, N., Adelaide, J., Toiron, Y., Nguyen, C., Viens, P., Mozziconacci, M. J., Houlgatte, R., Birnbaum, D. & Jacquemier, J. 2002. Distinct and complementary information provided by use of tissue and DNA microarrays in the study of breast tumor markers. *Am J Pathol*, 161, 1223-33.
- Grasberger, H., Ringkananont, U., Lefrancois, P., Abramowicz, M., Vassart, G. & Refetoff, S. 2005. Thyroid transcription factor 1 rescues PAX8/p300 synergism impaired by a natural PAX8 paired domain mutation with dominant negative activity. *Mol Endocrinol*, 19, 1779-91.
- Gremel, G., Bergman, J., Djureinovic, D., Edqvist, P. H., Maindad, V., Bharambe, B. M., Khan, W. A., Navani, S., Elebro, J., Jirstrom, K., Hellberg, D., Uhlen, M., Micke, P. & Ponten, F. 2014. A systematic analysis of commonly used antibodies in cancer diagnostics. *Histopathology*, 64, 293-305.
- Grupp, K., Sanader, S., Sirma, H., Simon, R., Koop, C., Prien, K., Hube-Magg, C., Salomon, G., Graefen, M., Heinzer, H., Minner, S., Izbicki, J. R., Sauter, G., Schlom, T. & Tsourlakis, M. C. 2013. High lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 expression independently predicts high risk for biochemical recurrence in prostate cancers. *Mol Oncol*, 7, 1001-11.
- Guan, J., Lim, K. S., Mekhail, T. & Chang, C. C. 2017. Programmed Death Ligand-1 (PD-L1) Expression in the Programmed Death Receptor-1 (PD-1)/PD-L1 Blockade: A Key Player Against Various Cancers. *Arch Pathol Lab Med*, 141, 851-861.
- Hamilton, W., Peters, T. J., Round, A. & Sharp, D. 2005. What are the clinical features of lung cancer before the diagnosis is made? A population based case-control study. *Thorax*, 60, 1059-65.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- Harach, H. R. & Franssila, K. O. 1988. Thyroglobulin immunostaining in follicular thyroid carcinoma: relationship to the degree of differentiation and cell type. *Histopathology*, 13, 43-54.
- He, S., Roberts, P. J., Sorrentino, J. A., Bisi, J. E., Storie-White, H., Tiessen, R. G., Makhuli, K. M., Wargin, W. A., Tadema, H., van Hoogdalem, E. J., Strum, J. C., Malik, R. & Sharpless, N. E. 2017. Transient CDK4/6 inhibition protects hematopoietic stem cells from chemotherapy-induced exhaustion. *Sci Transl Med*, 9.
- Hoos, A., Urist, M. J., Stojadinovic, A., Mastorides, S., Dudas, M. E., Leung, D. H., Kuo, D., Brennan, M. F., Lewis, J. J. & Cordon-Cardo, C. 2001. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *Am J Pathol*, 158, 1245-51.
- Hudis, C. A. 2007. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med*, 357, 39-51.
- Jacobs, T. W., Prioleau, J. E., Stillman, I. E. & Schnitt, S. J. 1996. Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 88, 1054-9.

- Karow, T. & Lang-Roth, R. 2018. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis : 2019* Pulheim, Thomas Karow.
- Kaufmann, O., Fietze, E. & Dietel, M. J. D. P. 2002. Immunohistochemical diagnosis in cancer metastasis of unknown primary tumor. *23*, 183-197.
- Keen, C. E., Szakacs, S., Okon, E., Rubin, J. S. & Bryant, B. M. 1999. CA125 and thyroglobulin staining in papillary carcinomas of thyroid and ovarian origin is not completely specific for site of origin. *Histopathology*, *34*, 113-7.
- Kim, M. J., Oh, S. W., Youn, H., Na, J., Kang, K. W., Park, D. J., Park, Y. J., Jang, J. J., Lee, K. E., Jung, K. C. & Chung, J. K. 2017. Thyroid-Related Protein Expression in the Human Thymus. *Int J Endocrinol*, 2017, 8159892.
- Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., Barlund, M., Schraml, P., Leighton, S., Torhorst, J., Mihatsch, M. J., Sauter, G. & Kallioniemi, O. P. 1998. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, *4*, 844-7.
- Krisch, K., Krisch, I., Horvat, G., Neuhold, N. & Ulrich, W. 1985. The value of immunohistochemistry in medullary thyroid carcinoma: a systematic study of 30 cases. *Histopathology*, *9*, 1077-89.
- Krohn, A., Diedler, T., Burkhardt, L., Mayer, P. S., De Silva, C., Meyer-Kornblum, M., Kotschau, D., Tennstedt, P., Huang, J., Gerhauser, C., Mader, M., Kurtz, S., Sirma, H., Saad, F., Steuber, T., Graefen, M., Plass, C., Sauter, G., Simon, R., Minner, S. & Schlomm, T. 2012. Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. *Am J Pathol*, *181*, 401-12.
- Lazzaro, D., Price, M., de Felice, M. & Di Lauro, R. 1991. The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development*, *113*, 1093-104.
- Lugli, A., Forster, Y., Haas, P., Nocito, A., Bucher, C., Bissig, H., Mirlacher, M., Storz, M., Mihatsch, M. J. & Sauter, G. 2003. Calretinin expression in human normal and neoplastic tissues: a tissue microarray analysis on 5233 tissue samples. *Hum Pathol*, *34*, 994-1000.
- Magklara, A., Cheung, C. C., Asa, S. L. & Diamandis, E. P. 2000. Expression of prostate-specific antigen and human glandular kallikrein 2 in the thyroid gland. *Clin Chim Acta*, *300*, 171-80.
- Malthiery, Y. & Lissitzky, S. 1987. Primary structure of human thyroglobulin deduced from the sequence of its 8448-base complementary DNA. *Eur J Biochem*, *165*, 491-8.
- Marinò, M. & McCluskey, R. T. J. A. J. o. P.-C. P. 2000. Role of thyroglobulin endocytic pathways in the control of thyroid hormone release. *279*, C1295-C1306.
- Marino, M., Zheng, G., Chiovato, L., Pinchera, A., Brown, D., Andrews, D. & McCluskey, R. T. 2000. Role of megalin (gp330) in transcytosis of thyroglobulin by thyroid cells. A novel function in the control of thyroid hormone release. *J Biol Chem*, *275*, 7125-37.
- Maxon, H. R., 3rd, Englaro, E. E., Thomas, S. R., Hertzberg, V. S., Hinnefeld, J. D., Chen, L. S., Smith, H., Cummings, D. & Aden, M. D. 1992. Radioiodine-131 therapy for well-differentiated thyroid cancer--a quantitative radiation dosimetric approach: outcome and validation in 85 patients. *J Nucl Med*, *33*, 1132-6.
- McCluggage, W. G. & Young, R. H. 2005. Immunohistochemistry as a diagnostic aid in the evaluation of ovarian tumors. *Semin Diagn Pathol*, *22*, 3-32.
- Melling, N., Thomsen, E., Tsourlakis, M. C., Kluth, M., Hube-Magg, C., Minner, S., Koop, C., Graefen, M., Heinzer, H., Wittmer, C., Sauter, G., Wilczak, W., Huland, H., Simon, R., Schlomm, T., Steurer, S. & Krech, T. 2015. Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) characterizes an aggressive subset of prostate cancers and predicts patient prognosis independently from pre- and postoperatively assessed clinicopathological parameters. *Carcinogenesis*, *36*, 1333-40.
- Miettinen, M., McCue, P. A., Sarlomo-Rikala, M., Biernat, W., Czapiewski, P., Kopczyński, J., Thompson, L. D., Lasota, J., Wang, Z. & Fetsch, J. F. 2015. Sox10--a marker for not only

- schwannian and melanocytic neoplasms but also myoepithelial cell tumors of soft tissue: a systematic analysis of 5134 tumors. *Am J Surg Pathol*, 39, 826-35.
- Miller, L. D., Smeds, J., George, J., Vega, V. B., Vergara, L., Ploner, A., Pawitan, Y., Hall, P., Klaar, S., Liu, E. T. & Bergh, J. 2005. An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 13550-5.
- Mirlacher, M., Kasper, M., Storz, M., Knecht, Y., Durmuller, U., Simon, R., Mihatsch, M. J. & Sauter, G. 2004. Influence of slide aging on results of translational research studies using immunohistochemistry. *Mod Pathol*, 17, 1414-20.
- Moch, H., Schraml, P., Bubendorf, L., Mirlacher, M., Kononen, J., Gasser, T., Mihatsch, M. J., Kallioniemi, O. P. & Sauter, G. 1999. High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol*, 154, 981-6.
- Mucci, N. R., Akdas, G., Manely, S. & Rubin, M. A. 2000. Neuroendocrine expression in metastatic prostate cancer: evaluation of high throughput tissue microarrays to detect heterogeneous protein expression. *Hum Pathol*, 31, 406-14.
- Muftah, A. A., Aleskandarany, M. A., Al-Kaabi, M. M., Sonbul, S. N., Diez-Rodriguez, M., Nolan, C. C., Caldas, C., Ellis, I. O., Rakha, E. A. & Green, A. R. 2017. Ki67 expression in invasive breast cancer: the use of tissue microarrays compared with whole tissue sections. *Breast Cancer Res Treat*, 164, 341-348.
- Negrini, S., Gorgoulis, V. G. & Halazonetis, T. D. 2010. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 220-8.
- Nocito, A., Bubendorf, L., Tinner, E. M., Suess, K., Wagner, U., Forster, T., Kononen, J., Fijan, A., Bruderer, J., Schmid, U., Ackermann, D., Maurer, R., Alund, G., Knonagel, H., Rist, M., Anabitarte, M., Hering, F., Hardmeier, T., Schoenenberger, A. J., Flury, R., Jager, P., Fehr, J. L., Schraml, P., Moch, H., Mihatsch, M. J., Gasser, T. & Sauter, G. 2001. Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. *J Pathol*, 194, 349-57.
- Oesterling, J. E. 1991. Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. *J Urol*, 145, 907-23.
- Oien, K. A. 2009. Pathologic evaluation of unknown primary cancer. *Semin Oncol*, 36, 8-37.
- Oishi, N., Kondo, T., Nakazawa, T., Mochizuki, K., Kasai, K., Inoue, T., Yamamoto, T., Watanabe, H., Hatsushika, K., Masuyama, K. & Katoh, R. 2014. Thyroid-like low-grade nasopharyngeal papillary adenocarcinoma: case report and literature review. *Pathol Res Pract*, 210, 1142-5.
- Olsson, A. Y., Bjartell, A., Lilja, H. & Lundwall, A. 2005. Expression of prostate-specific antigen (PSA) and human glandular kallikrein 2 (hK2) in ileum and other extraprostatic tissues. *Int J Cancer*, 113, 290-7.
- Owens, M. A., Horten, B. C. & Da Silva, M. M. 2004. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin Breast Cancer*, 5, 63-9.
- Park, J. H., Kwon, H. J., Park, C. S. & Hong, S. 2014. Anaplastic Transformation of Papillary Thyroid Carcinoma in a Young Man: A Case Study with Immunohistochemical and BRAF Analysis. *Korean J Pathol*, 48, 234-40.
- Peller, S. 1998. Clinical implications of p53: effect on prognosis, tumor progression and chemotherapy response. *Semin Cancer Biol*, 8, 379-87.
- Perez-Ibave, D. C., Burciaga-Flores, C. H. & Elizondo-Riojas, M. A. 2018. Prostate-specific antigen (PSA) as a possible biomarker in non-prostatic cancer: A review. *Cancer Epidemiol*, 54, 48-55.
- Person, F., Wilczak, W., Hube-Magg, C., Burdelski, C., Moller-Koop, C., Simon, R., Noriega, M., Sauter, G., Steurer, S., Burdak-Rothkamm, S. & Jacobsen, F. 2017. Prevalence of betaIII-

- tubulin (TUBB3) expression in human normal tissues and cancers. *Tumour Biol*, 39, 1010428317712166.
- Petraki, C. D. & Sfikas, C. P. 2007. Histopathological changes induced by therapies in the benign prostate and prostate adenocarcinoma. *Histol Histopathol*, 22, 107-18.
- Pineda-Daboin, K., Neto, A., Ochoa-Perez, V. & Luna, M. A. 2006. Nasopharyngeal adenocarcinomas: a clinicopathologic study of 44 cases including immunohistochemical features of 18 papillary phenotypes. *Ann Diagn Pathol*, 10, 215-21.
- Pomorski, L., Kaczka, K., Piaskowski, S., Wojcik, I., Rieske, P., Matejkowska, M. & Kuzdak, K. 2005. Detection of lymph node metastases of papillary thyroid cancer-comparison of the results of histopathology, immunohistochemistry and reverse transcription-polymerase chain reaction-a preliminary report. *Langenbecks Arch Surg*, 390, 209-15.
- Postiglione, M. P., Parlato, R., Rodriguez-Mallon, A., Rosica, A., Mithbaokar, P., Maresca, M., Mariani, R. C., Davies, T. F., Zannini, M. S., De Felice, M. & Di Lauro, R. 2002. Role of the thyroid-stimulating hormone receptor signaling in development and differentiation of the thyroid gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 15462-7.
- Ricci, F., Buzzatti, G., Rubagotti, A. & Boccardo, F. 2014. Safety of antiandrogen therapy for treating prostate cancer. *Expert Opin Drug Saf*, 13, 1483-99.
- Riethdorf, S., Reimers, N., Assmann, V., Kornfeld, J. W., Terracciano, L., Sauter, G. & Pantel, K. 2006. High incidence of EMMPRIN expression in human tumors. *Int J Cancer*, 119, 1800-10.
- Rimm, D. L., Camp, R. L., Charette, L. A., Costa, J., Olsen, D. A. & Reiss, M. 2001. Tissue microarray: a new technology for amplification of tissue resources. *Cancer J*, 7, 24-31.
- Risom, L., Moller, P. & Loft, S. 2005. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res*, 592, 119-37.
- Robert Koch-Institut. 2017. *Krebs in Deutschland für 2013/2014* [Online]. Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Available: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/krebs_in_deutschland_2017.pdf?__blob=publicationFile [Accessed 16.02. 2019].
- Royaux, I. E., Suzuki, K., Mori, A., Katoh, R., Everett, L. A., Kohn, L. D. & Green, E. D. 2000. Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology*, 141, 839-45.
- Rubin, M. A., Dunn, R., Strawderman, M. & Pienta, K. J. 2002. Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis. *Am J Surg Pathol*, 26, 312-9.
- Ruf, J. & Carayon, P. 2006. Structural and functional aspects of thyroid peroxidase. *Arch Biochem Biophys*, 445, 269-77.
- Ruiz, C., Seibt, S., Al Kuraya, K., Siraj, A. K., Mirlacher, M., Schraml, P., Maurer, R., Spichtin, H., Torhorst, J., Popovska, S., Simon, R. & Sauter, G. 2006. Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. *Int J Cancer*, 118, 2190-4.
- Sauter, G., Simon, R. & Hillan, K. 2003. Tissue microarrays in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2, 962-72.
- Schlomm, T., Iwers, L., Kirstein, P., Jessen, B., Kollermann, J., Minner, S., Passow-Drolet, A., Mirlacher, M., Milde-Langosch, K., Graefen, M., Haese, A., Steuber, T., Simon, R., Huland, H., Sauter, G. & Erbersdobler, A. 2008. Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. *Mod Pathol*, 21, 1371-8.
- Schraml, P., Kononen, J., Bubendorf, L., Moch, H., Bissig, H., Nocito, A., Mihatsch, M. J., Kallioniemi, O. P. & Sauter, G. 1999. Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res*, 5, 1966-75.
- Schroeder, C., Grell, J., Hube-Magg, C., Kluth, M., Lang, D., Simon, R., Hoflmayer, D., Minner, S., Burandt, E., Clauditz, T. S., Buscheck, F., Jacobsen, F., Huland, H., Graefen, M., Schlomm, T., Sauter, G. & Steurer, S. 2019. Aberrant expression of the microtubule-associated protein tau is an independent prognostic feature in prostate cancer. *BMC Cancer*, 19, 193.

- Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. 2019. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*, 69, 7-34.
- Silver, D. A., Pellicer, I., Fair, W. R., Heston, W. D. & Cordon-Cardo, C. 1997. Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clin Cancer Res*, 3, 81-5.
- Simon, R. & Sauter, G. 2003. Tissue microarray (TMA) applications: implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med*, 5, 1-12.
- Singh, K., Sharma, M. C., Jain, D. & Kumar, R. 2008. Melanotic medullary carcinoma of thyroid--report of a rare case with brief review of literature. *Diagn Pathol*, 3, 2.
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A. & McGuire, W. L. 1987. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235, 177-82.
- Soekeland, Greta: Die Sensitivität, Spezifität und Prognoserelevanz der PSA-Immunhistochemie bei Prostatakarzinomen, *unveröffentlichte Dissertation*, Universität Hamburg
- Steeg, P. S. 2006. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med*, 12, 895-904.
- Stratton, M. R., Campbell, P. J. & Futreal, P. A. 2009. The cancer genome. *Nature*, 458, 719-24.
- Suzuki, K. & Kohn, L. D. 2006. Differential regulation of apical and basal iodide transporters in the thyroid by thyroglobulin. *J Endocrinol*, 189, 247-55.
- Suzuki, K., Lavaroni, S., Mori, A., Ohta, M., Saito, J., Pietrarello, M., Singer, D. S., Kimura, S., Katoh, R., Kawaoi, A. & Kohn, L. D. 1998. Autoregulation of thyroid-specific gene transcription by thyroglobulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 8251-6.
- Tapia, C., Glatz, K., Novotny, H., Lugli, A., Horcic, M., Seemayer, C. A., Tornillo, L., Terracciano, L., Spichtin, H., Mirlacher, M., Simon, R. & Sauter, G. 2007. Close association between HER-2 amplification and overexpression in human tumors of non-breast origin. *Mod Pathol*, 20, 192-8.
- Thor, A. D., Moore, D. H., II, Edgerton, S. M., Kawasaki, E. S., Reihnsaus, E., Lynch, H. T., Marcus, J. N., Schwartz, L., Chen, L. C., Mayall, B. H. & et al. 1992. Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. *J Natl Cancer Inst*, 84, 845-55.
- Topalian, S. L., Hodi, F. S., Brahmer, J. R., Gettinger, S. N., Smith, D. C., McDermott, D. F., Powderly, J. D., Carvajal, R. D., Sosman, J. A., Atkins, M. B., Leming, P. D., Spigel, D. R., Antonia, S. J., Horn, L., Drake, C. G., Pardoll, D. M., Chen, L., Sharfman, W. H., Anders, R. A., Taube, J. M., McMiller, T. L., Xu, H., Korman, A. J., Jure-Kunkel, M., Agrawal, S., McDonald, D., Kollia, G. D., Gupta, A., Wigginton, J. M. & Szolc, M. 2012. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*, 366, 2443-54.
- Torhorst, J., Bucher, C., Kononen, J., Haas, P., Zuber, M., Kochli, O. R., Mross, F., Dieterich, H., Moch, H., Mihatsch, M., Kallioniemi, O. P. & Sauter, G. 2001. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol*, 159, 2249-56.
- van de Graaf, S. A., Ris-Stalpers, C., Pauws, E., Mendive, F. M., Targovnik, H. M. & de Vijlder, J. J. 2001. Up to date with human thyroglobulin. *J Endocrinol*, 170, 307-21.
- Van Herle, A. J., Vassart, G. & Dumont, J. E. 1979a. Control of thyroglobulin synthesis and secretion (second of two parts). *N Engl J Med*, 301, 307-14.
- Van Herle, A. J., Vassart, G. & Dumont, J. E. 1979b. Control of thyroglobulin synthesis and secretion. (First of two parts). *N Engl J Med*, 301, 239-49.
- Van Heuverswyn, B., Streydio, C., Brocas, H., Refetoff, S., Dumont, J. & Vassart, G. 1984. Thyrotropin controls transcription of the thyroglobulin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 5941-5.
- Venkatraman, L., Maxwell, P. & McCluggage, W. G. 2001. Thyroglobulin immunoreactivity in lymph node histiocytes: a potential diagnostic pitfall. *J Clin Pathol*, 54, 314-6.

- Vogel, U. 2014. Overview on Techniques to Construct Tissue Arrays with Special Emphasis on Tissue Microarrays. *Microarrays (Basel)*, 3, 103-36.
- Vu, T. & Claret, F. X. 2012. Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Front Oncol*, 2, 62.
- Wang, C., Yun, T., Wang, Z., Meng, N., Fan, N., Lv, X. & Li, F. 2018. Pathological characteristics and genetic features of melanin-producing medullary thyroid carcinoma. *Diagn Pathol*, 13, 86.
- Wardle, J., Robb, K., Vernon, S. & Waller, J. 2015. Screening for prevention and early diagnosis of cancer. *Am Psychol*, 70, 119-33.
- Went, P. T., Dirnhofer, S., Bundi, M., Mirlacher, M., Schraml, P., Mangialaio, S., Dimitrijevic, S., Kononen, J., Lugli, A., Simon, R. & Sauter, G. 2004. Prevalence of KIT expression in human tumors. *J Clin Oncol*, 22, 4514-22.
- Werner, M., Chott, A., Fabiano, A. & Battifora, H. 2000. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol*, 24, 1016-9.
- WHO, W. H. O. 2014. *World Cancer Report*, Lyon, France, International Agency for Research on Cancer.
- Wu, S., Zhu, W., Thompson, P. & Hannun, Y. A. 2018. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. *Nat Commun*, 9, 3490.
- Xavier, A. C., Maciel, R. M., Vieira, J. G., Dias-da-Silva, M. R. & Martins, J. R. 2016. Insights into the posttranslational structural heterogeneity of thyroglobulin and its role in the development, diagnosis, and management of benign and malignant thyroid diseases. *Arch Endocrinol Metab*, 60, 66-75.
- Xu, J., Wu, R. C. & O'Malley, B. W. 2009. Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family. *Nat Rev Cancer*, 9, 615-30.
- Zannini, M., Avantaggiato, V., Biffali, E., Arnone, M. I., Sato, K., Pischetola, M., Taylor, B. A., Phillips, S. J., Simeone, A. & Di Lauro, R. 1997. TTF-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation. *Embo j*, 16, 3185-97.
- Zannini, M., Francis-Lang, H., Plachov, D. & Di Lauro, R. 1992. Pax-8, a paired domain-containing protein, binds to a sequence overlapping the recognition site of a homeodomain and activates transcription from two thyroid-specific promoters. *Mol Cell Biol*, 12, 4230-41.
- Zhu, Y. Z., Li, W. P., Wang, Z. Y., Yang, H. F., He, Q. L., Zhu, H. G. & Zheng, G. J. 2013. Primary pulmonary adenocarcinoma mimicking papillary thyroid carcinoma. *J Cardiothorac Surg*, 8, 131.
- Zimmermann, M. B. 2009. Iodine deficiency. *Endocr Rev*, 30, 376-408.

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Die zehn prävalenten Tumortypen für die geschätzten neuen Krebsfälle und Krebstodesfälle, unterschieden im Geschlecht, United States, 2019.	2
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der Schilddrüsenhormon-Biosynthese	10
Abbildung 3:	Tissue Microarray (TMA)-Kordinatensystem	16
Abbildung 4:	Tissue Microarray (TMA)-Datenfile	16
Abbildung 5:	Ablauf der Tissue Microarray (TMA)-Herstellung	18
Abbildung 6:	Materialien zur Tissue Microarray (TMA)-Herstellung	18
Abbildung 7:	Arbeitsschritte der Schnittauswahl. (1. – 3.)	19
Abbildung 8:	Arbeitsschritte der Blockauswahl. (4. – 6.)	20
Abbildung 9:	Arbeitsschritte des Aufbaus. (7. – 9.).....	21
Abbildung 10:	Arbeitsschritte der Lochbohrung. (10. - 12.)	22
Abbildung 11:	Arbeitsschritte des Stanzprozesses. (13. - 15.).....	23
Abbildung 12:	Arbeitsschritte der Weiterführung. (16. - 18.).....	24
Abbildung 13:	Arbeitsschritte der TMA-Bearbeitung (19. – 21.)	25
Abbildung 14:	Schilddrüsentumoren mit unterschiedlich starker Anfärbung	30
Abbildung 15:	Schilddrüsentumoren mit unterschiedlichen Färbemustern.....	31
Abbildung 16:	Schilddrüsentumoren mit positiver Thyreoglobulin (Tg) - Anfärbung	32
Abbildung 17:	Schilddrüsentumoren mit negativer Thyreoglobulin (Tg) - Anfärbung	33
Abbildung 18:	Datenblatt für den Antikörper Thyreoglobulin	66
Abbildung 19:	Übersichten vom Multitumor-Array 5.2. (A-G) und Normaltissue-Array 9	68
Abbildung 20:	Schilddrüsenadenom (EB2h).....	69
Abbildung 21:	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom (EB5e).....	69
Abbildung 22:	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom (EB5k)	70
Abbildung 23:	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom (EB5i)	70
Abbildung 24:	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom (EB6a).....	71
Abbildung 25:	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom (EB7g).....	71

Abbildung 26: Papilläres Schilddrüsenkarzinom (EB8d)	72
Abbildung 27: Papilläres Schilddrüsenkarzinom (EB8f)	72
Abbildung 28: Papilläres Schilddrüsenkarzinom (EB9m)	73
Abbildung 29: Papilläres Schilddrüsenkarzinom (EB9n)	73
Abbildung 30: Papilläres Schilddrüsenkarzinom (EB9p)	74
Abbildung 31: Medulläres Schilddrüsenkarzinom (EC2k).....	74
Abbildung 32: Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom (EC7b).....	75
Abbildung 33: Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom (EC8d).....	75

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Zusammenstellung von Publikationen mit immunhistochemischen Tg-Färbungen von Nichtschilddrüsentumoren	13
Tabelle 2:	Ergebnisse der Auswertung von immunhistochemisch gefärbten Schilddrüsentumoren mit dem Antikörper Thyreoglobulin.	34
Tabelle 3:	Ergebnisse der Auswertung von immunhistochemisch gefärbten Gewebeproben mit dem Antikörper Thyreoglobulin, geordnet nach Tumorentitäten.....	34
Tabelle 4:	Zusammenstellung von Publikationen mit immunhistochemischen Tg-Färbungen von Schilddrüsentumoren.....	46

11 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK	Antikörper
Aqua dest.	dt. destilliertes Wasser (lt. <i>Aqua destillata</i>)
C	Celsius
c-Kit	Tyrosinkinase KIT
DAB	3,3'-Diaminobenzdin
DIT	Diiodotyrosine
DNA	dt. Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
dt.	Deutsch
DUOX2	Dual Oxidase 2
EDTA	dt. Ethylendiamintetraessigsäure (engl. Ethylendiamintetraacetat)
EMMPRIN	engl. Extracellular matrix metalloproteinase inducer
engl.	Englisch
EZH2	engl. Enhancer Zeste Homolog 2
FOXE1	Forkhead-Box-Protein E1
HER2	engl. Human epidermal growth factor receptor 2
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IHC	Immunhistochemisch
Ki	Kiel (von Ki-67)
MAPT	engl. Microtubule-Associated Protein Tau
MCT8	Monocarboxylate Transporter 8
min.	Minute
MIT	Monoiodotyrosine
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MTA	engl. Multitumor-Array
N/A	engl. not available
NIS	Natrium-Iodid-Syporter
NKX2-1	Hömoobox-Gen NK2 Homebox 2
Nr.	Nummer
NTA	dt. Normalgewebe-Array (engl. Normaltissue-Array)
PAX8	Paired-Box-Protein 8

pN	p=pathologisch, N= <i>Nodulus</i> (regionäre Lyphknoten)
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
pT	p=pathologisch, T=Primärtumor
PTEN	engl. Phosphatase and Tensin homolog
RT	Raumtemperatur
sog.	sogenannt
t	Tiefe [mm]
T3	Triiodthyronin
T4	Thyroxin
TBS	dt. Tris-gepufferte Kochsalzlösung (engl. tris-buffered saline)
TBS-T	TBS mit Tween20
TEC	Tris-EDTA-Citrat
Tg	dt. Thyreoglobulin / engl. Thyroglobulin
TMA	engl. Tissue Microarray
TPO	Thyroid Peroxidase
TSH	Thyreoid-stimulierendes Hormon
TUBB3	Tubulin Beta 3 Class III
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UV	Ultraviolett
µm	Mykrometer
vgl.	vergleiche

12 SYMBOLVERZEICHNIS

Ø	Durchmesser
®	dt. Registrierte Waren- oder Dienstleistungsmarke (engl. registered Trade Mark)
™	dt. unregistrierte Warenmarke (engl. unregistered Trade Mark)
x	Mal
%	Prozent
°	Grad
€	Euro

13 ANHANG

13.1 Datenblatt für den Antikörper Thyreoglobulin



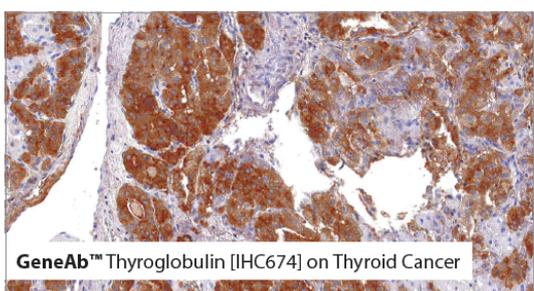
GeneAb™
Thyroglobulin



Clone: IHC674
Source: Mouse Monoclonal
Positive Control: Thyroid

Product Information

REF	Description
IHC674-100	0.1 ml, Concentrate
IHC674-1	1 ml, Concentrate
IHC674-7	7 ml, Predilute
IHC674-PC	3 Positive Control Slides



GeneAb™ Thyroglobulin [IHC674] on Thyroid Cancer

1. Intended Use

This antibody is intended for *in vitro* diagnostic (IVD) use.

The Thyroglobulin [IHC674] antibody is intended for qualified laboratories to qualitatively identify by light microscopy the presence of associated antigens in sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections using IHC test methods. Use of this antibody is indicated, subsequent to clinical differential diagnoses of diseases, as an aid in the identification of thyroid carcinomas within the context of antibody panels, the patient's clinical history and other diagnostic tests evaluated by a qualified pathologist.

2. Summary and Explanation

Thyroglobulin is a precursor to the thyroid hormones T4 and T3, and is present in the thyroid follicular cells. Nearly all thyroid follicular carcinomas stain for thyroglobulin and sometimes produce a focal staining pattern. Conversely, poorly differentiated carcinomas and non-thyroid adenocarcinomas do not stain for thyroglobulin, therefore Anti-Thyroglobulin is a useful diagnostic tool for recognizing papillary and follicular thyroid carcinomas. A panel of Anti-Thyroglobulin and Anti-Calcitonin is useful for identifying medullary thyroid carcinomas, whereas a panel of Anti-Thyroglobulin and Anti-TTF1 is useful for distinguishing between primary thyroid and lung neoplasms.

3. Principles and Procedures

Visualization of the antigen present in tissue sections is accomplished in a multi-step immunohistochemical staining process, in conjunction with a horseradish peroxidase (HRP) or alkaline phosphatase (AP) linked detection system. The process involves the addition of the stated antibody (primary antibody) to a tissue slide, followed by a secondary antibody (linked to an enzyme complex) which specifically binds to the primary antibody. A chromogenic substrate is then added which reacts with the enzyme complex, resulting in a colorimetric reaction at the site of the antigen. Results are interpreted using a light microscope.

4. Materials and Methods

Product Format	Optimized Buffer Composition
Predilute	Antibody Diluent Buffer
Concentrate	Tris Buffer, pH 7.3 - 7.7, with 1% BSA and <0.1% Sodium Azide

Note: The recommended working dilution range is 1:100 - 1:400.



GenomeMe® 1-604-244-9962 | info@GenomeMe.ca | www.GenomeMe.ca

Version 3 | [pg. 1](#)

Reconstitution, Mixing, Dilution, and Titration

The prediluted antibody does not require any mixing, dilution, reconstitution, or titration; the antibody is ready-to-use and optimized for staining.

The concentrated antibody requires dilution in the optimized buffer, to the recommended working dilution range (see table above).

Storage and Handling

Store at 2-8°C. Do not freeze.

When stored correctly, the antibody is stable until the date indicated on the label.

To ensure proper stability and delivery of the antibody after each run, replace the cap and immediately place the bottle in a refrigerator in an upright position.

Positive and negative controls should be simultaneously run with unknown specimens, as there are no conclusive characteristics to suggest instability of the antibody. If such an indication of instability is suspected, contact GenomeMe® Customer Service at info@GenomeMe.ca.

Specimen Collection and Preparation for Analysis

Each tissue section should be fixed with 10% neutral buffered formalin, cut to the applicable thickness (4µm), and placed on a glass slide that is positively charged. The prepared slide may then be baked for a minimum of 30 minutes in a 53-65°C oven (do not exceed 24 hours).

Note: Performance evaluation has been shown on human tissues only. Variable results may occur due to extended fixation time or special processes of specific tissue preparations.

5. Instructions For Use

Recommended Staining Protocols for the Thyroglobulin [IHC674] antibody:

Manual Use:

1. **Pretreatment:** Perform heat-induced epitope retrieval (HIER) at pH 9 for 10 to 30 minutes.
2. **Peroxide Block:** Block in peroxidase blocking solution for 5 minutes at room temperature. (Not required if using Alkaline Phosphatase System.)
3. **Primary Antibody:** Apply antibody directly (Predilute) or dilute antibody at 1:100-1:400 (Concentrate) before applying. Incubate antibody for 10 to 30 minutes at room temperature.
4. **Secondary Antibody:** Incubate for 20 to 30 minutes at room temperature.
5. **Substrate Development:** Incubate DAB or Fast Red for 5 to 10 minutes at room temperature.
6. **Counterstain:** Counterstain with hematoxylin for 0.5 to 5 minutes, depending on the hematoxylin used. Rinse with distilled water and blueing solution for 30 seconds.
7. Dehydrate and apply coverslip.

Automated Staining System:

The stated primary antibody has been optimized and validated using the BOND-MAX fully automated IHC & ISH stainer manufactured by Leica Biosystems, applying IHC Protocol F. The following edits are recommended for the protocol:

- a) Marker Incubation Time: 30 minutes
- b) Heat-induced epitope retrieval (HIER) is recommended using Leica Bond ER Solution 2 for 30 minutes.
- c) Move Peroxide Block step to after Polymer and before Mixed DAB Refine.

For all other automated IHC staining systems, refer to the corresponding user manual for specific instructions.

6. Quality Control Procedures and Interpretation of Results

The immunohistochemical staining process results in a colorimetric reaction at the site of the antigen, localized by the primary antibody. A qualified pathologist must interpret the patient results only once the positive and negative control tissues have been analyzed.

Positive Control Tissue

A positive control tissue must be run with each staining procedure, and must be prepared and fixed identically to the test sections in order to provide control for all test variables, including fixation and tissue processing. The positive control tissue should be fresh autopsy, biopsy, or surgical specimens. For optimal

quality control and to allow detection of lesser levels of reagent degradation, a tissue with weaker positive staining is advisable. Thyroid tissue can be used as positive control tissue for the Thyroglobulin [IHC674] antibody. Where applicable, tissue that contains cells or tissue components that stain both positively and negatively may serve as both the positive and negative control tissue.

Once stained, the positive control tissue should be analyzed to ensure appropriate positive staining is observed and all reagents are functioning properly. Positive reactivity requires the observation of an appropriate colorimetric reaction at the site of the antigen within the target cells. Counterstaining will result in a blue coloration, which may be pale to dark depending on the length of the incubation time and potency of the hematoxylin.

If positive staining as defined herein is not observed, the results obtained with the patient or tissue specimen must be treated as invalid. The positive control tissue should not be used as an aid in the diagnoses of patient samples, but rather solely as a measure of performance of the reagents and validity of obtained results.

Negative Control Tissue

The same tissue used for the positive control tissue may be used as the negative control tissue.

Most tissue sections offer internal negative control sites due to the diversity of cell types present, however this must be confirmed by the user. The components that do not stain should demonstrate the absence of specific staining, and provide an indication of non-specific background staining. If specific staining is observed, the negative control tissue must be deemed invalid and the results obtained with the patient or tissue specimen must also be treated as such.

Patient Tissue

Patient specimens should be analyzed only once the positive and negative control tissues have been deemed as valid. Negative staining indicates that the antigen was not detected; the use of a panel of antibodies may allow for recognition of false negative results, as negative staining in any one test does not confirm the absence of the antigen in question.

A tissue section stained with hematoxylin and eosin should be used to analyze the morphology of the patient tissue sample, as verified by a qualified pathologist.

7. Troubleshooting

1. If the tissue sections wash off the slide, this may be due to:
 - a) If the slides are not positively charged.
 - b) Inadequate drying of the tissue section prior to staining.
 - c) Inadequate neutral-buffering of the formalin used for the fixation process.
 - d) A thick tissue section.
2. If the positive control tissue exhibits negative staining, this may be due to:
 - a) The primary antibody or one of the secondary reagents.
 - b) Improper collection, fixation, or deparaffinization of the tissue section.
3. If the positive control tissue exhibits weaker staining than expected, this may be due to the primary antibody or one of the secondary reagents. Any other positive controls run simultaneously should be analyzed to determine the cause.
4. If non-specific staining occurs, this will have a diffuse appearance and may be due to:
 - a) Improper or suboptimal fixation of tissue sections which may result in sporadic light staining of connective tissue.
 - b) The use of necrotic or degenerated cells. Intact cells should be used for analysis of staining results.

For assistance with all other inquiries, contact GenomeMe® Customer Service at info@GenomeMe.ca.

8. Limitations

1. This antibody is intended for *in vitro* diagnostic (IVD) use by qualified laboratories only and is not intended for use in flow cytometry.
2. Due to inevitable variability in immunohistochemical procedures and variables, appropriate positive and negative controls must be used and documented, and the results are to be interpreted by a qualified pathologist. Staining must be conducted in a certified, licensed laboratory, under the supervision and responsibility of the qualified pathologist.

3. Improper handling and processing of tissue samples may compromise the validity and/or analysis of the results.
4. GenomeMe® provides prediluted antibodies in a ready-to-use, optimally diluted format for use explicitly as instructed. Improper handling and processing of tissue samples and reagents, and any deviation from the recommended procedures outlined herein, may compromise the validity and/or analysis of the results. Due to the potential for variation in tissue processing and fixation, it may be necessary to adjust incubation time for the primary antibody on specific tissue specimens.
5. GenomeMe® provides concentrated antibodies in a format that requires dilution in the optimized buffer, in the context of appropriate validation by the user. Any diluent different than that specified in the package insert must also be validated by the user to ensure proper compatibility with the antibody. Once diluted, any deviation from the recommended procedures outlined herein may compromise the validity and/or analysis of the results.
6. This antibody, when used with the appropriate detection systems and accessories, detects antigen(s) that remain intact through the tissue fixation, processing, and sectioning as described herein. Any deviations from these recommended procedures may compromise the validity and/or analysis of the results.
7. The clinical outcome indicated by staining results must be analyzed accurately by the qualified pathologist, and the patient's medical history and other histopathological criteria must be taken into account. The user is responsible for interpretation of the results in the context of the patient.
8. Any documented discrepancies or unexplainable results in controls or tissue specimens should be reported to GenomeMe® Customer Service at info@GenomeMe.ca. Patient results are invalid if analysis of the positive and negative control tissues yields results other than those approved and described herein. The Troubleshooting section of this insert may be referred to for unexplained discrepancies in control tissues.
9. The potential for unexpected results in patient tissue specimens cannot be eliminated due to inherent biological variability in the expression of certain antigens.
10. The potential for false positive results in patient tissue specimens cannot be eliminated due to the possibility of non-immunological binding of substrate reaction products or proteins. False positive results may also occur subject to the type of immunostaining technique used, or due to the activity of pseudoperoxidase, endogenous peroxidase, or endogenous biotin.
11. Due to the effect of autoantibodies or natural antibodies, normal sera from an animal source the same as the secondary antisera may result in false negative or false positive results when used in blocking steps.
12. Non-specific staining with horseradish peroxidase may be observed when using tissues containing hepatitis B surface antigen due to the patient's infection with the hepatitis B virus.

9. Warnings and Precautions

1. Ensure proper handling procedures are used with all reagents. Always wear laboratory coats, disposable gloves, and other appropriate laboratory equipment when handling reagents.
2. Do not ingest reagents, and avoid contact with eyes and mucous membranes. Wash eyes with copious amounts of water if contact occurs.
3. All incubation times and temperatures must be validated by the user, as must any storage conditions different than those specified in the package insert.
4. Prediluted antibody is provided in a ready-to-use, optimally diluted format, and any further dilution may result in loss of antigen staining.
5. Concentrated antibody requires dilution in the optimized buffer (refer to Materials and Methods), in the context of appropriate validation by the user.
6. Handle tissue sections, patient specimens, and all materials contacting them as biohazardous materials, using the appropriate precautions.
7. To ensure proper stability of the antibody and validity of results, use proper handling of the reagent and avoid microbial contamination.

10. References

1. Bellet D, et al. J Clin Endocrin Metab. 1983; 56:530-3.
2. Heffess CS, et al. Cancer. 2002; 95:1869-78.
3. Bejarano PA, et al. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2000; 8:189-94.
4. Judkins AR, et al. Hum Pathol. 1999; 30:1373-6.
5. Hammer SP. Hum Pathol. 1998; 29:1393-402.

 GenomeMe Lab Inc.®
1-3691 Viking Way, Richmond, BC, V6V 2J6, Canada



QARAD BVBA
Cipalstraat 3, B-2440 Geel, Belgium

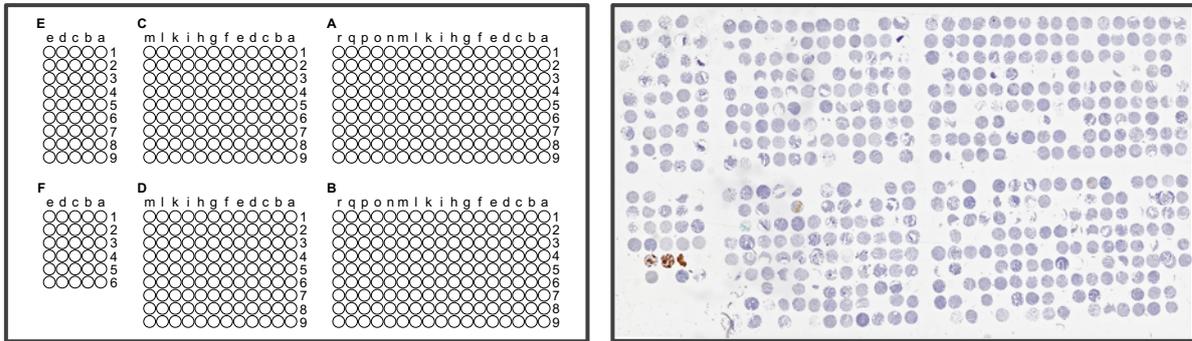
 GenomeMe® 1-604-244-9962 | info@GenomeMe.ca | www.GenomeMe.ca

Version 3 | [pg. 2](#)

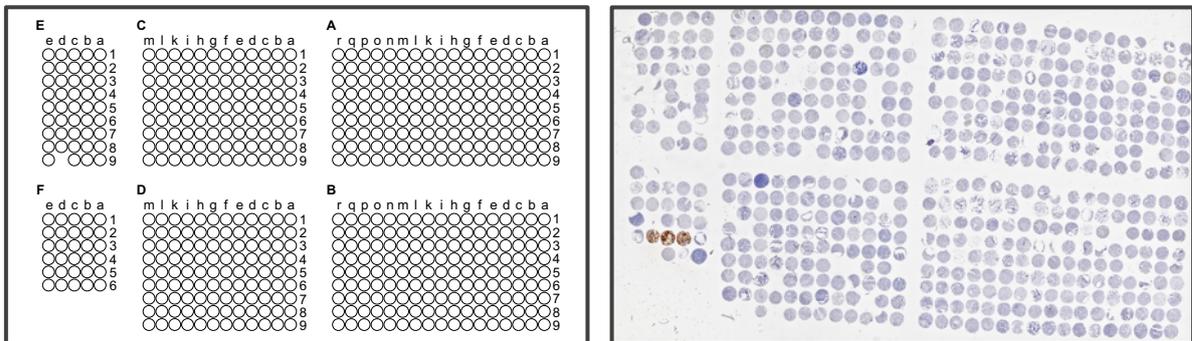
Abbildung 18: Datenblatt für den Antikörper Thyreoglobulin
(GenomeMe Canada 2019)

13.2 Übersichten vom MTA 5.2. und NTA 9

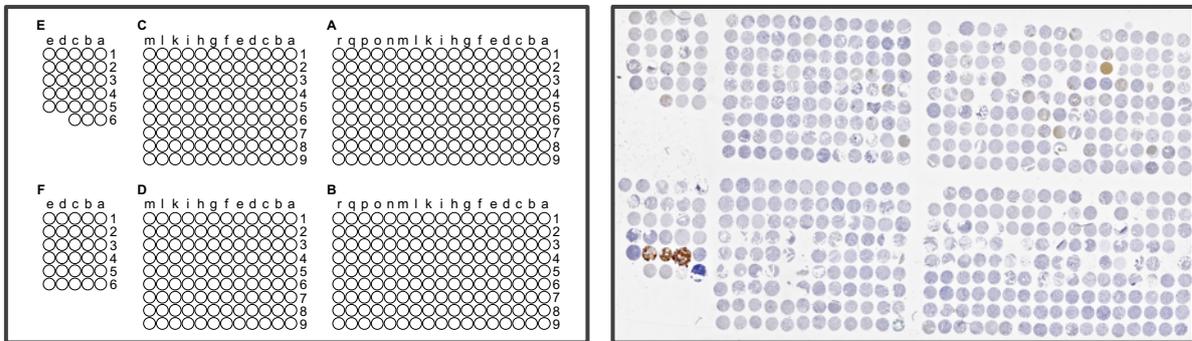
MTA 5.2. A



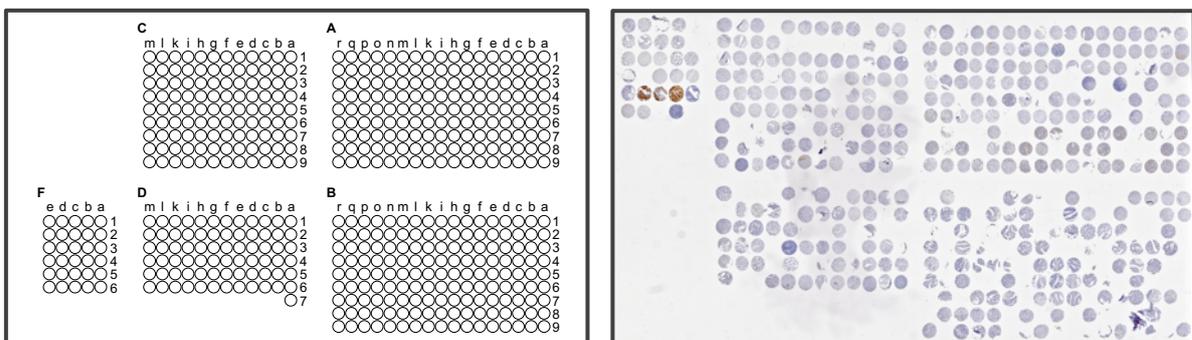
MTA 5.2. B



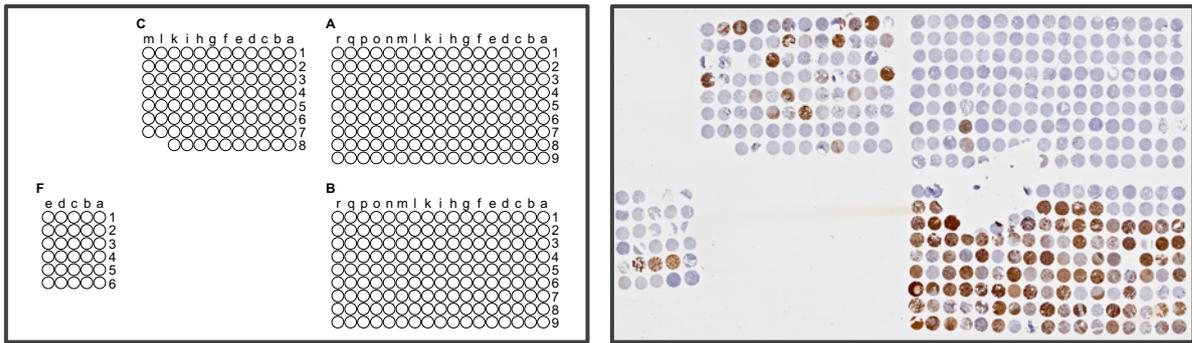
MTA 5.2. C



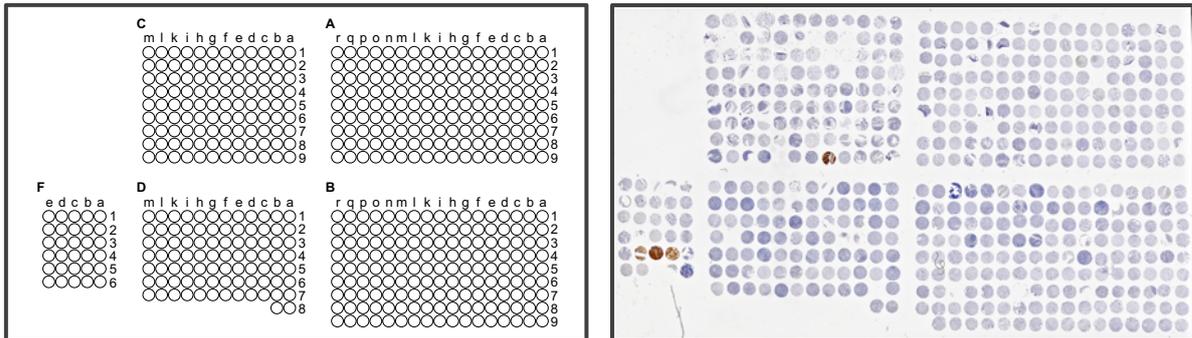
MTA 5.2. D



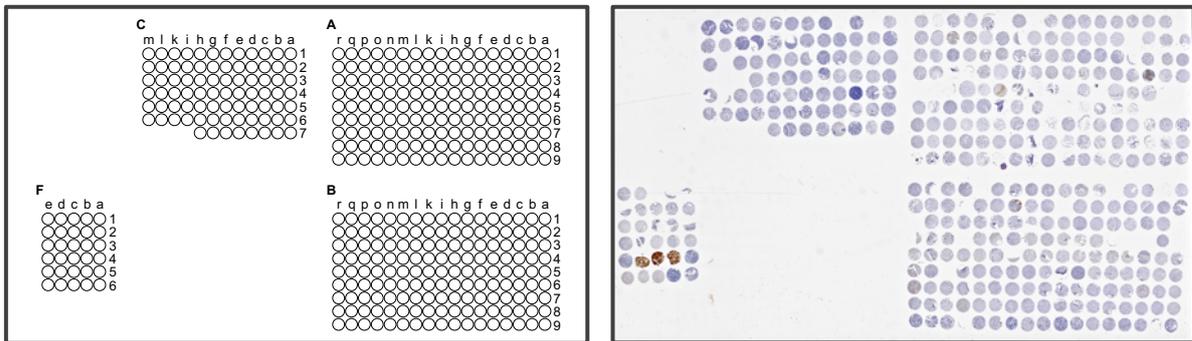
MTA 5.2. E



MTA 5.2. F



MTA 5.2. G



NTA 9

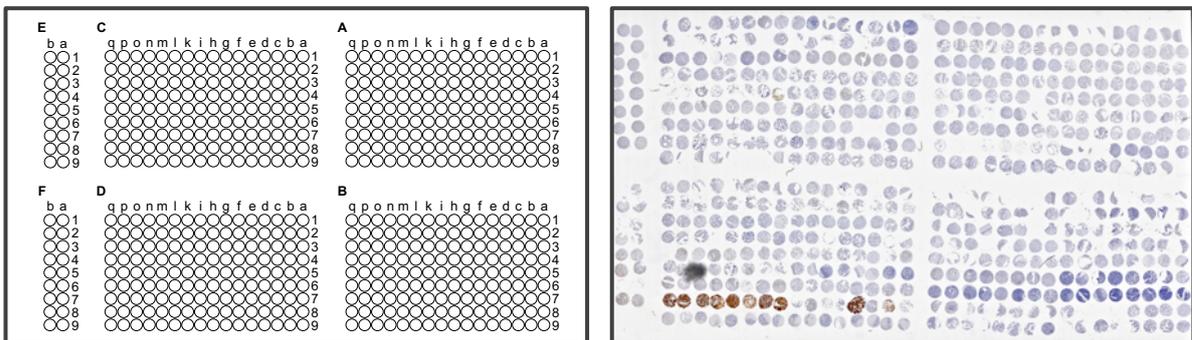


Abbildung 19: Übersichten vom Multitumor-Array 5.2. (A-G) und Normaltissue-Array 9

Links: Koordinatensystem

Rechts: Immunohistochemisch gefärbter Schnitt mit dem Antikörper Thyreoglobulin

13.3 Ausgewählte Ergebnisbilder

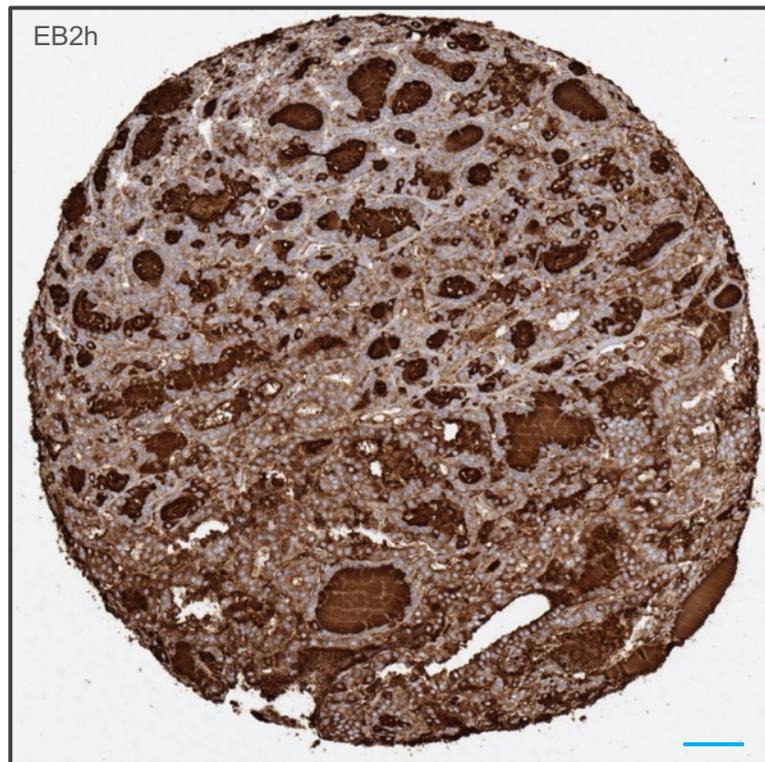


Abbildung 20: Schilddrüsenadenom (EB2h)

Schilddrüsenadenom mit kräftiger zytoplasmatischer Thyreoglobulin-Anfärbung. Maßstabsleiste: — 50 µm

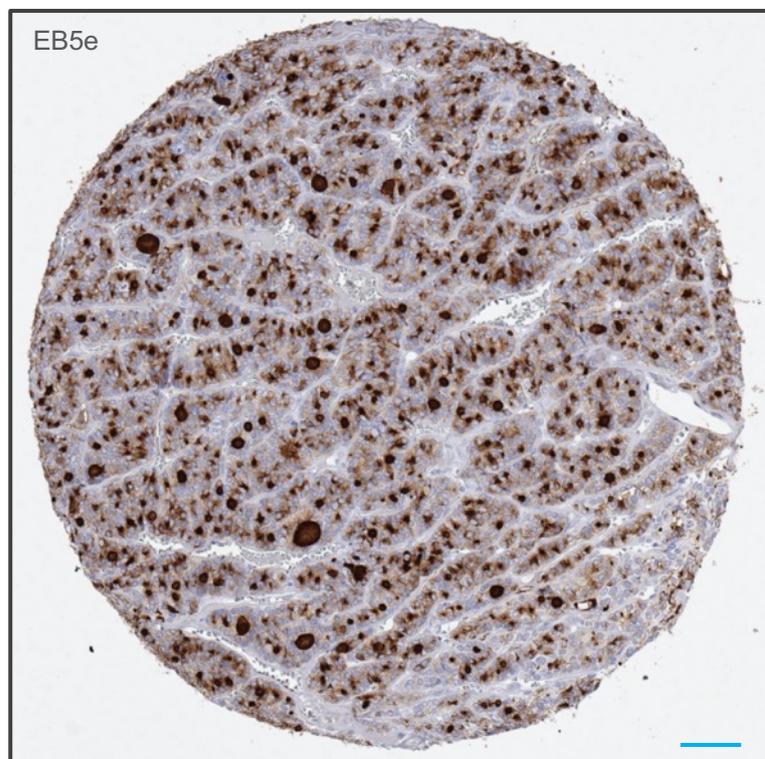


Abbildung 21: Follikuläres Schilddrüsenkarzinom (EB5e)

Follikuläres Schilddrüsenkarzinom mit überwiegend luminaler Thyreoglobulin-Anfärbung. Maßstabsleiste: — 50 µm

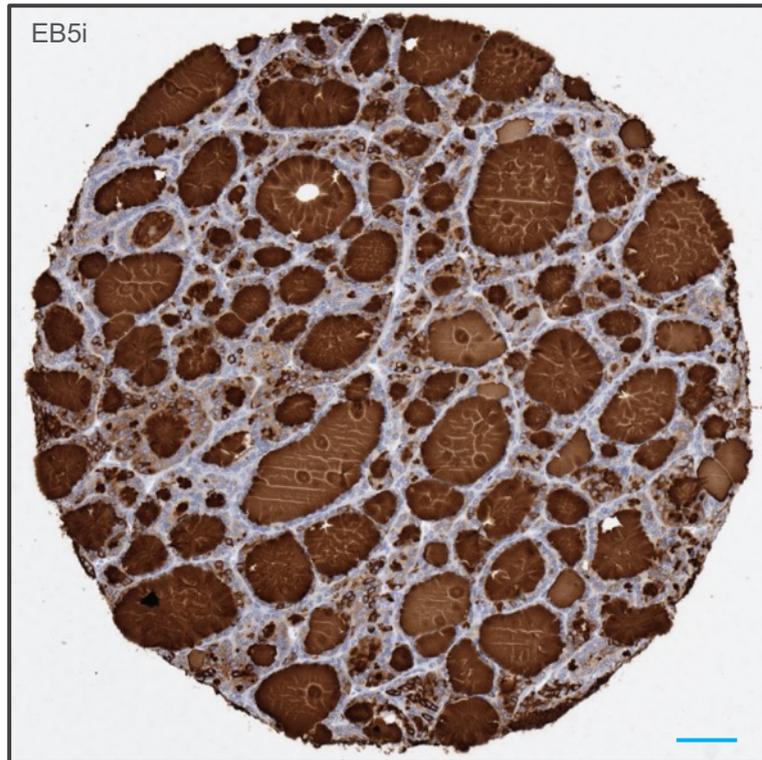


Abbildung 23: Follikuläres Schilddrüsenkarzinom (EB5i)

Follikuläres Schilddrüsenkarzinom mit einer Akkumulation stark gefärbter luminaler Sekrete und schwacher zytoplasmatischer Thyreoglobulin-Anfärbung. Maßstabsleiste: — 50 µm

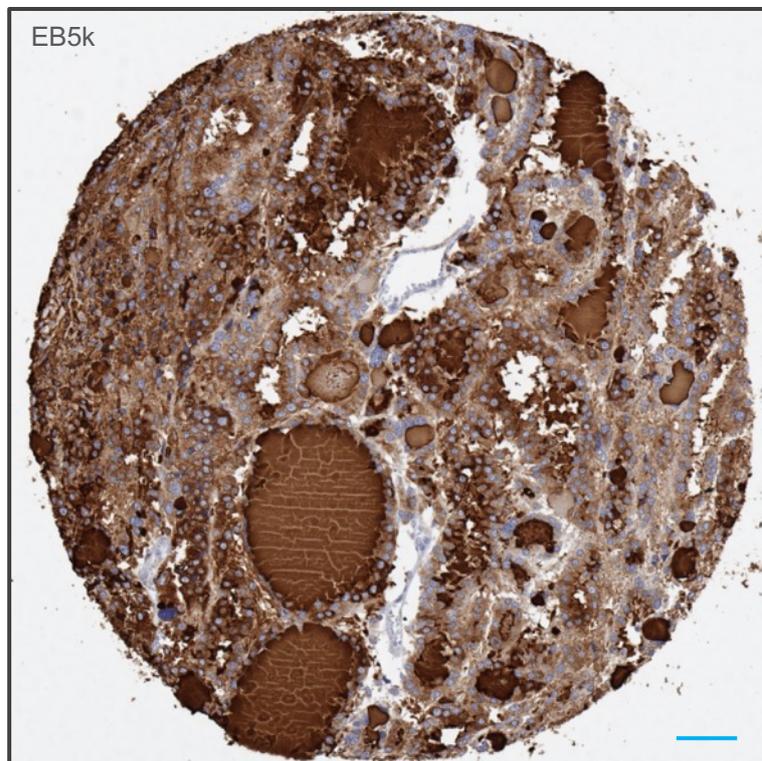


Abbildung 22: Follikuläres Schilddrüsenkarzinom (EB5k)

Follikuläres Schilddrüsenkarzinom mit kräftiger zytoplasmatischer Thyreoglobulin-Anfärbung. Maßstabsleiste: — 50 µm

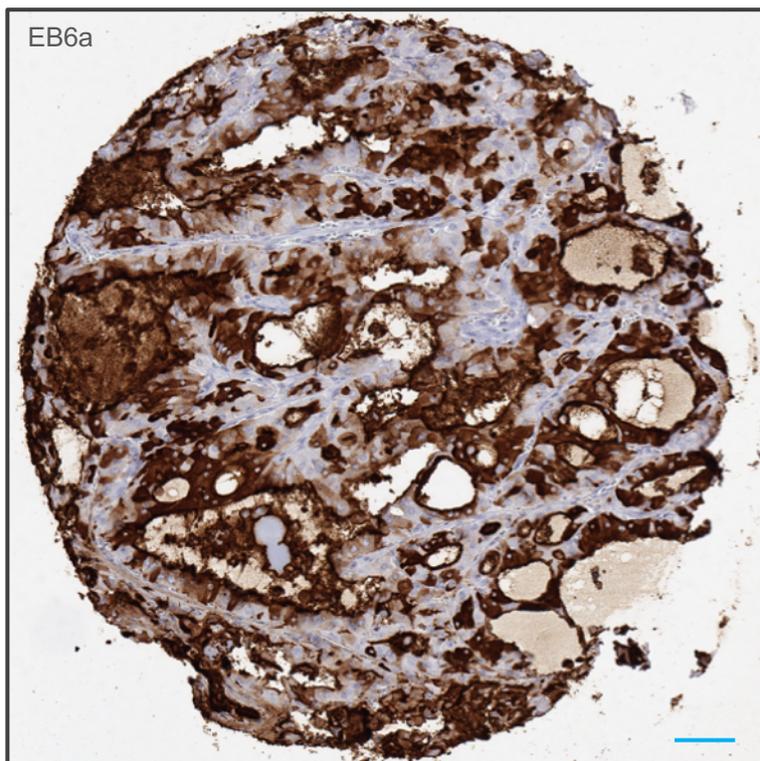


Abbildung 24: Follikuläres Schilddrüsenkarzinom (EB6a)
Follikuläres Schilddrüsenkarzinom mit kräftiger luminaler und zytoplasmatischer Thyreoglobulin-Anfärbung.
Maßstabsleiste: — 50 µm

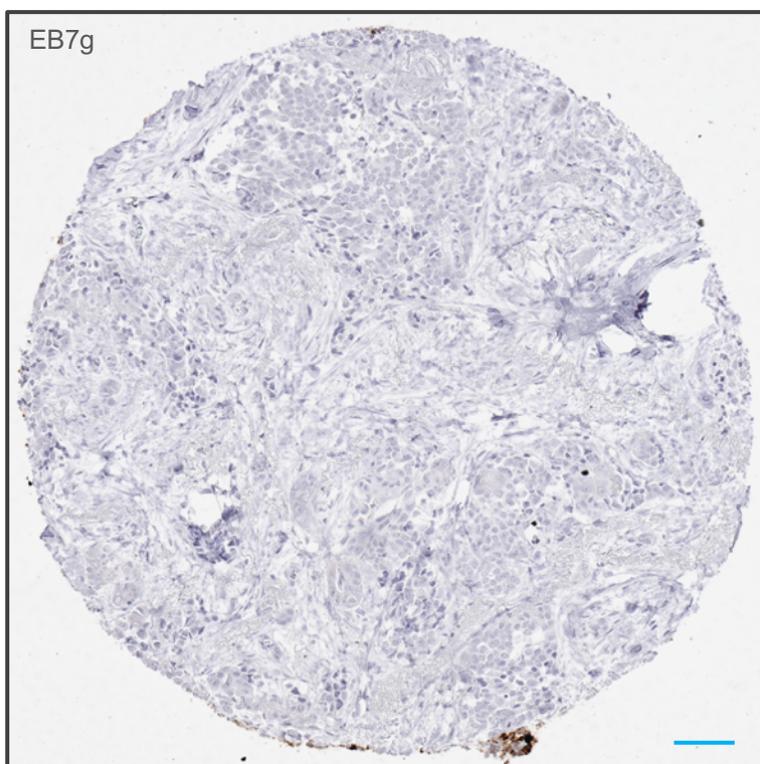


Abbildung 25: Follikuläres Schilddrüsenkarzinom (EB7g)
Follikuläres Schilddrüsenkarzinom ohne Thyreoglobulin-Anfärbung. Maßstabsleiste: — 50 µm

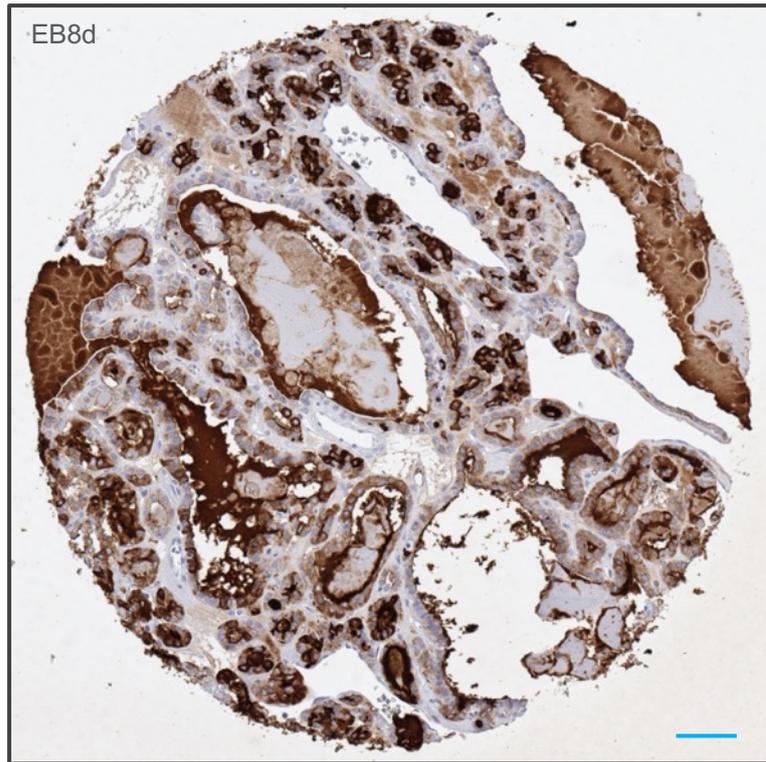


Abbildung 26: Papilläres Schilddrüsenkarzinom (EB8d)

Papilläres Schilddrüsenkarzinom mit luminaler und schwacher zytoplasmatischer Thyreoglobulin-Anfärbung.
Maßstabsleiste: — 50 µm

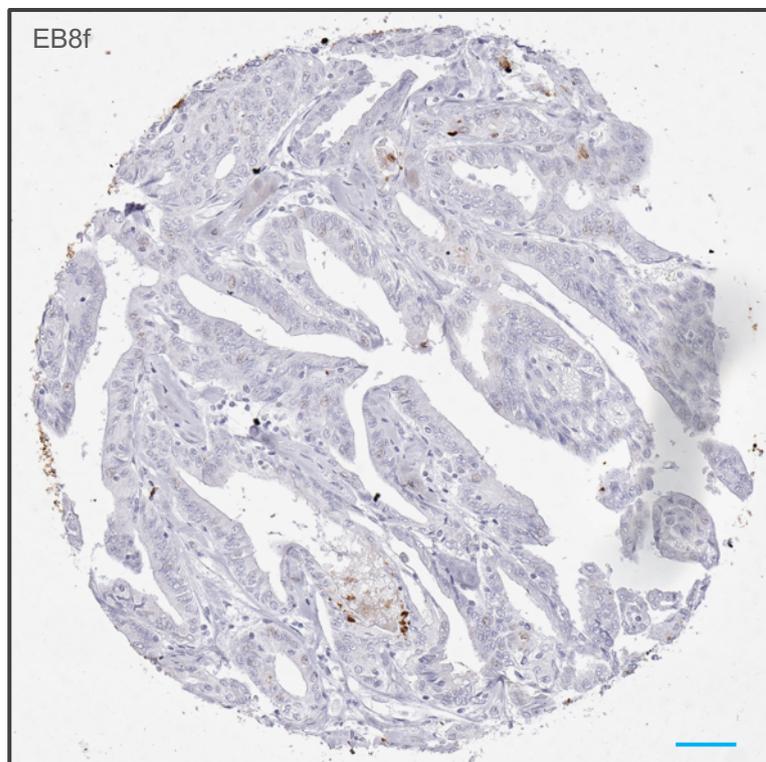


Abbildung 27: Papilläres Schilddrüsenkarzinom (EB8f)

Papilläres Schilddrüsenkarzinom ohne Thyreoglobulin-Anfärbung.
Maßstabsleiste: — 50 µm

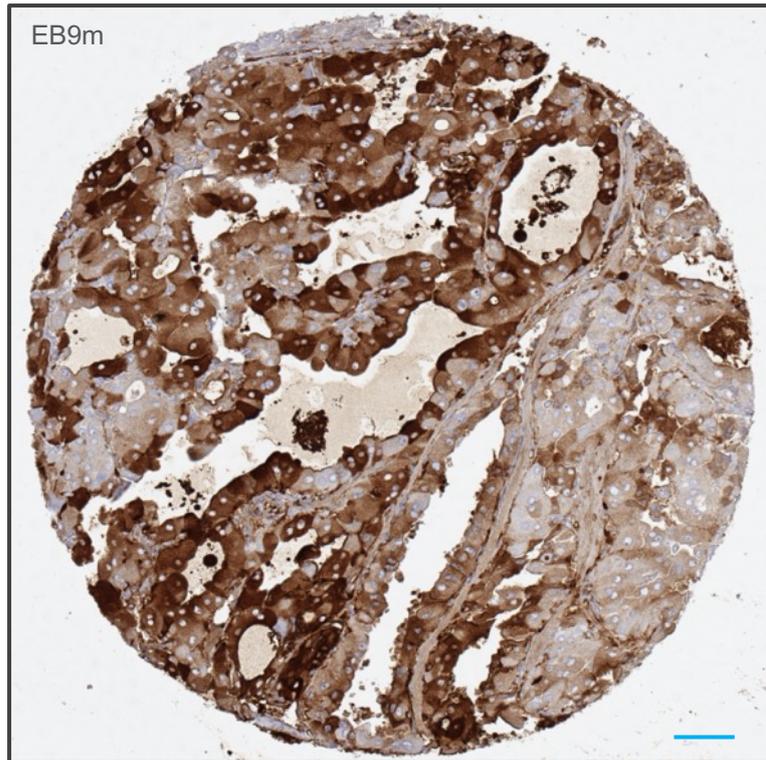


Abbildung 28: Papilläres Schilddrüsenkarzinom (EB9m)

Papilläres Schilddrüsenkarzinom mit mosaikartiger zytoplasmatischer Anfärbung. Neben leicht und mäßiggradig angefärbten Zellen sind immer wieder stark Thyreoglobulin-positive Zellen eingestreut. Maßstabsleiste: — 50 µm

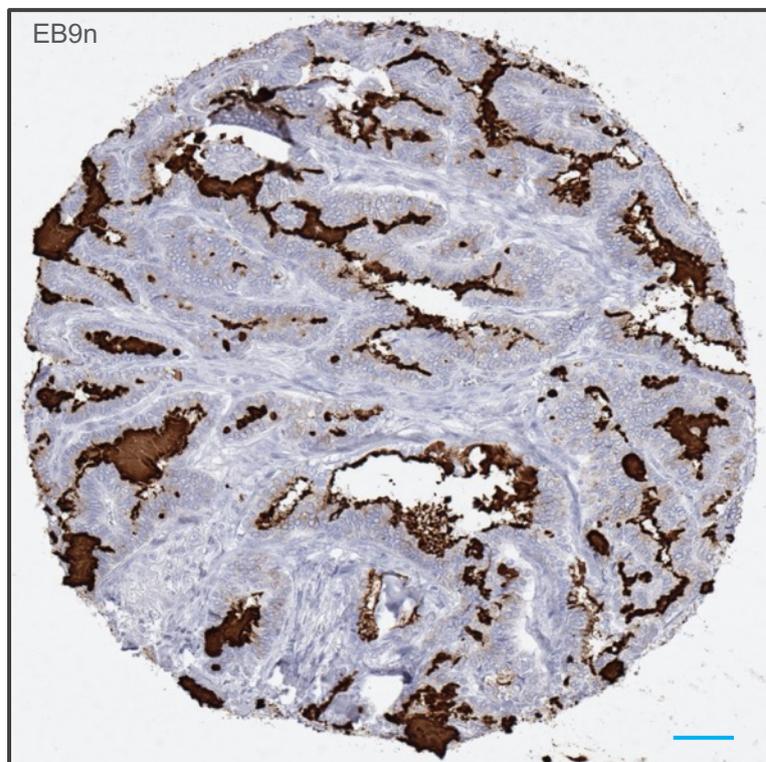


Abbildung 29: Papilläres Schilddrüsenkarzinom (EB9n)

Papilläres Schilddrüsenkarzinom mit kräftiger zytoplasmatischer Tg-Anfärbung, die überwiegend am apikalen Zellpol lokalisiert ist. Maßstabsleiste: — 50µm

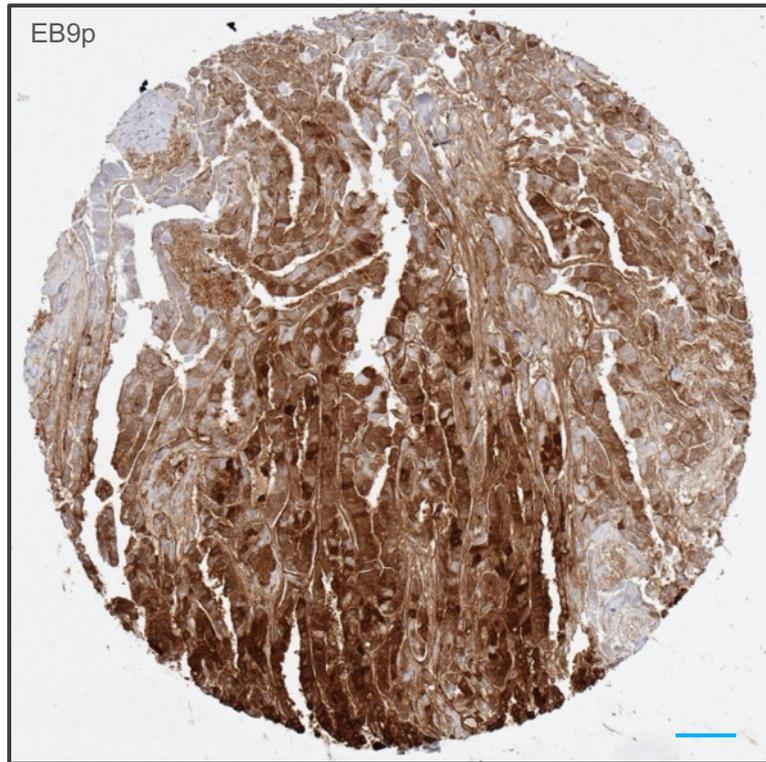


Abbildung 30: Papilläres Schilddrüsenkarzinom (EB9p)

Papilläres Schilddrüsenkarzinom mit mosaikartiger zytoplasmatischer Thyreoglobulin-Anfärbung.

Maßstabsleiste: — 50 µm

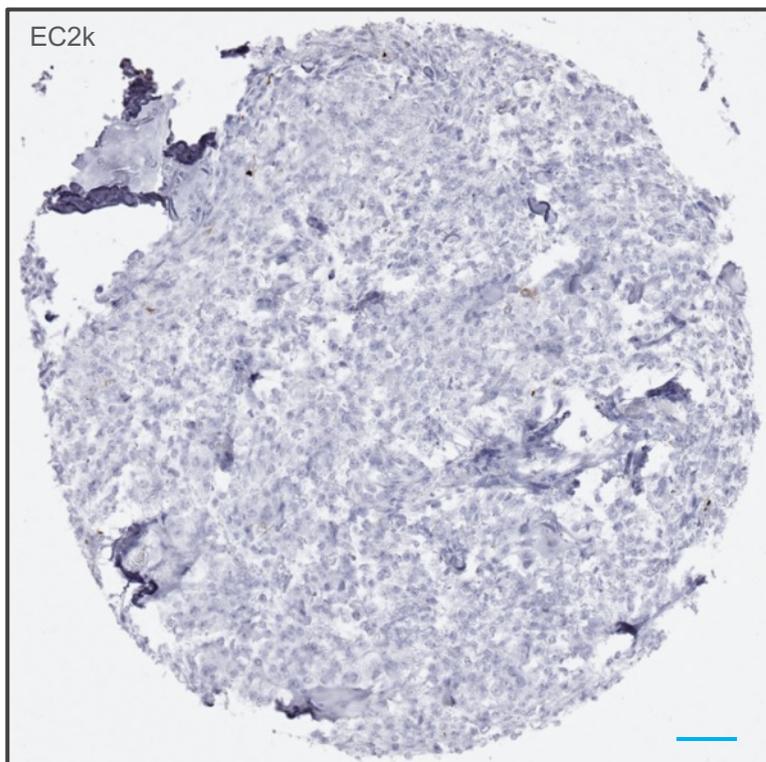


Abbildung 31: Medulläres Schilddrüsenkarzinom (EC2k)

Medulläres Schilddrüsenkarzinom ohne Thyreoglobulin-Anfärbung. Maßstabsleiste: — 50 µm

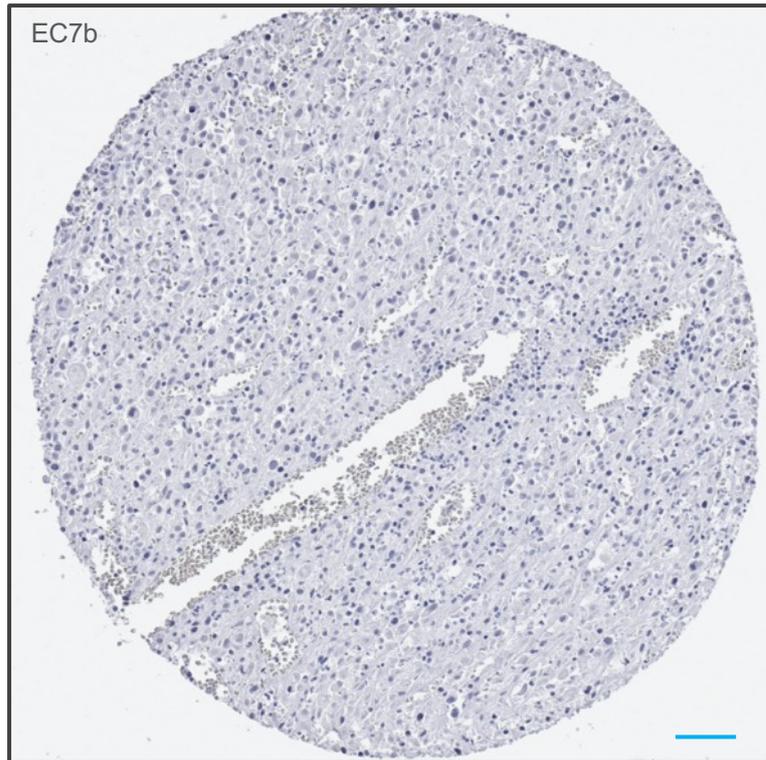


Abbildung 32: Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom (EC7b)
Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom ohne Thyreoglobulin-Anfärbung. Maßstabsleiste: — 50 µm

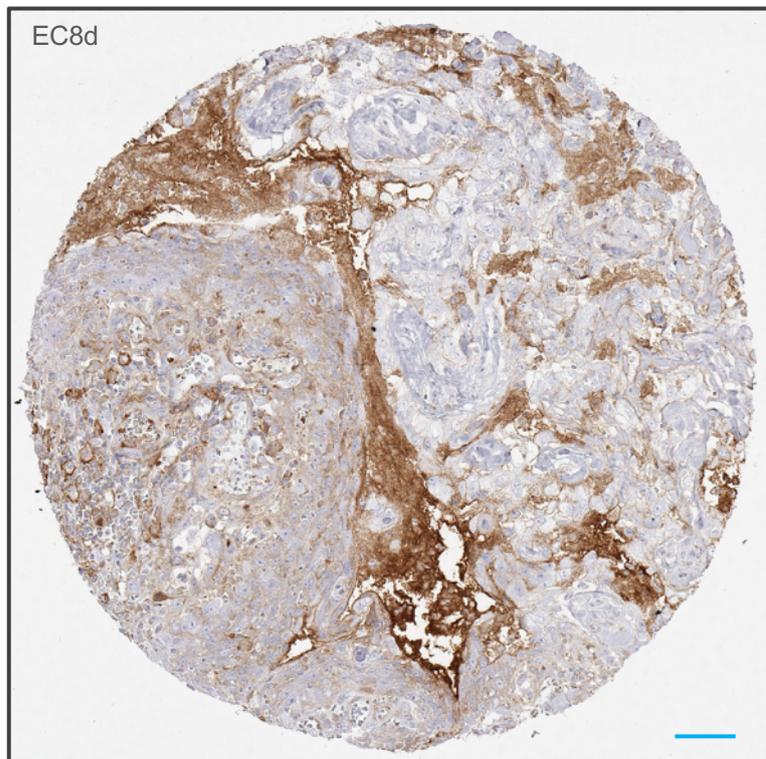


Abbildung 33: Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom (EC8d)
Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom mit schwacher Thyreoglobulin-Anfärbung bei einer Intensität von 1 und einem prozentualen Anteil gefärbter Tumorzellen von 50%. Maßstabsleiste: — 50 µm

14 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Mein Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Guido Sauter, für die Bereitstellung des Themas in diesem spannenden medizinischen Bereich und seine außerordentliche Unterstützung.

Vielen Dank an das gesamte Team des TMA-Labors. Vor allem danke ich Christina Möller-Koop für die umfassende Betreuung bei der Arbeit im Labor. Durch die Hilfsbereitschaft und die anhaltende gute Laune von Melanie Witt habe ich mich stets sehr wohl gefühlt. Ein spezieller Dank gilt Inge Brandt für ihre fachliche Hilfestellung genauso wie für anregende Gespräche, auch abseits der Laborarbeit. Zusätzlicher Dank gilt PD Dr. Ronald Simon und Dr. Claudia Hube-Magg, die unterstützend zu der Entstehung der Arbeit beigetragen haben.

Auch den anderen Doktoranden möchte ich meinen Dank aussprechen. Im Doktorandenbüro bin ich immer herzlich empfangen worden. Christina hat mir unglaublich geholfen beim Scannen der Schnitte. Manuel hat mich regelmäßig freudig als Mitfahrgelegenheit in die Heimat mitgenommen. Für diese kollegiale Zusammenarbeit, diese fortwährende Motivation und ein immer offenes Ohr bin ich sehr dankbar.

Kathi danke ich für all die guten Tipps beim Anfertigen der Dissertation und dafür, dass sie mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Außerdem waren unsere gemeinsamen Arbeitsunterbrechungen wertvolle Pausen am Tag.

Sei es „Don't worry, Supergirl“ oder „Oh my God...I can fly“, Steffis positive Art und ihr unnachgiebiger Optimismus haben mir in der gesamten Studienzeit immer wieder neuen Antrieb gegeben. Danke dafür, Steffi.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an meine Familie. Meine Eltern, Gaby und Berti, helfen mir mit ihrem uneingeschränkten Engagement immer wieder „Steine aus dem Weg zu räumen“ und bieten mir so einen unersetzbaren Rückhalt. Meinem

Bruder, Marvin, bin ich für seine ehrliche und konstruktive Kritik ebenso wie für seine stetigen Ermutigungen dankbar. Danke für eure unermüdliche Unterstützung.

Abschließend natürlich noch tausend Dank an Malte. Ohne seine Kochkünste wäre ich vermutlich verhungert und diese Arbeit hätte nicht fertiggestellt werden können. Aber viel wichtiger sind seine stete Geduld und sein enormes Maß an Verständnis für mich und diese Arbeit. Bereits mein gesamtes Studium lang hat er mich mit seiner entspannten, beruhigenden und liebevollen Art begleitet und mich aus so manchen Motivationstiefs herausgezogen und neu bestärkt. Danke, dass du immer für mich da bist.

15 LEBENS LAUF

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

16 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: