

Aus dem Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Claudia Wickenhauser)

**Vergleichende immunhistochemische Untersuchungen zum Vorkommen von
Matrixbestandteilen in Schilddrüsenkarzinomen**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Andrea Halm
geboren am 23.09.1981 in Lutherstadt Wittenberg

Betreuer: PD Dr. rer. nat. Frank Bartel

Gutachter: 1. PD Dr. rer. nat. Frank Bartel
2. apl. Prof. Dr. rer. nat. Cuong Hoang-Vu
3. Prof. Dr. med. Ralf Paschke (Calgary)

12.12.2017

20.05.2019

Referat

Schilddrüsenkarzinome lassen sich in verschiedene histologische Typen einteilen, die sich hinsichtlich ihrer Prognose unterscheiden. Der genauen Typisierung kommt daher zur Therapieplanung eine entscheidende Rolle zu. Die histologische Diagnose gestaltet sich jedoch mitunter äußerst schwierig, da die zytologischen und histologischen Kriterien manchmal überlappend sind. Mithin wäre es wünschenswert, wenn immunhistochemische Untersuchungen zu einer Verbesserung der Differentialdiagnostik beitragen.

Zielstellung: In der vorliegenden Arbeit wurden drei histologische Typen des Schilddrüsenkarzinoms dahingehend untersucht, ob sie Unterschiede hinsichtlich des Vorkommens von Matrixmolekülen in Tumorzellen und Stroma aufweisen.

Methoden: Es wurden Schnittpräparate von 82 Tumoren angefertigt und mittels immunhistochemischer Färbung auf das Vorhandensein von Tenascin (TN), Thrombospondin (TSP), Osteopontin (OPN), Vitronektin (VN) und Keratansulfat (KS) hin untersucht. Die Gewebeproben stammten von papillären (PTC), follikulären (FTC) und undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen (UTC). Dabei wurden die Lokalisation des nachgewiesenen Moleküls (intra-/extrazellulär) und dessen Verteilung (fokal/diffus) ermittelt.

Ergebnisse: Bei allen drei untersuchten Tumorentitäten kam OPN häufig in den Tumorzellen und TN häufig im Stroma vor. PTC exprimierten dabei signifikant häufiger OPN in den Zellen als UTC und signifikant häufiger TN im Stroma als FTC. Darüber hinaus enthielten PTC signifikant häufiger KS im Stroma als FTC und UTC. In FTC wurde in den Tumorzellen im Vergleich zu den anderen Karzinomtypen am häufigsten TSP exprimiert, allerdings ohne dass signifikante Unterschiede bestanden. UTC enthielten signifikant häufiger TSP im Stroma als die anderen Tumorentitäten. KS kam nicht im Stroma der UTC vor.

In Abhängigkeit vom Karzinomtyp traten bestimmte Kombinationen von Matrixmolekülen auf, unter anderem bestand bei PTC und FTC ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von TSP und TN in den Tumorzellen.

Schlussfolgerungen: Die Analyse des Vorkommens von Matrixbestandteilen in Tumorzellen und Stroma kann zur histologischen Typisierung von Schilddrüsenkarzinomen beitragen. In PTC und UTC sind typischerweise KS und TSP im Stroma enthalten. PTC lassen sich von FTC nur durch die häufigere Expression von TN im Stroma abgrenzen, aber von UTC auch durch das häufigere Vorkommen von OPN in den Tumorzellen.

Inhaltsverzeichnis		Seite
1	Einleitung	1
1.1	Einteilung und Epidemiologie der Schilddrüsenkarzinome	1
1.2	Histologie der Schilddrüsenkarzinome	4
1.3	Bedeutung und Funktion der extrazellulären Matrix	6
1.3.1	Die extrazelluläre Matrix in gesunden Geweben	6
1.3.2	Die extrazelluläre Matrix und die Entstehung von Karzinomen	7
1.4	Bestandteile der extrazellulären Matrix	8
1.4.1	Tenascin	9
1.4.2	Thrombospondin	11
1.4.3	Vitronektin	13
1.4.4	Osteopontin	14
1.4.5	Keratansulfat	15
2	Zielstellung	17
3	Material und Methodik	18
3.1	Herkunft der Präparate	18
3.2	Immunhistochemische Färbung	18
3.2.1	Verwendete Antikörper	18
3.2.2	Anfertigung und Vorbehandlung der Schnitte	19
3.2.3	Inkubation (Primär- und Sekundärantikörper)	19
3.2.4	Färbung (Detektion)	19
3.3	Histologische Auswertung	20
3.4	Statistische Auswertung	21
4	Ergebnisse	22
4.1	Auswertung der Kollektivdaten	22
4.1.1	Geschlechterverteilung	22
4.1.2	Altersverteilung	23
4.1.3	Verteilung der TNM-Stadien	24
4.2	Vorkommen von Matrixbestandteilen in Strumae nodosae	26
4.3	Vorkommen von Matrixbestandteilen in UTC	28
4.3.1	Beobachtungsdaten	28

Inhaltsverzeichnis	Seite
4.3.2 Analyse der Beobachtungsdaten	32
4.4. Vorkommen von Matrixbestandteilen in FTC	34
4.4.1 Beobachtungsdaten	34
4.4.2 Analyse der Beobachtungsdaten	39
4.5 Vorkommen von Matrixbestandteilen in PTC	41
4.5.1 Beobachtungsdaten	41
4.5.2 Analyse der Beobachtungsdaten	46
4.6 Vergleich des Vorkommens von Matrixbestandteilen in UTC, FTC und PTC	49
4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse	52
5 Diskussion	53
5.1 Das Patientenkollektiv	53
5.2 Karzinomspezifische Zusammensetzung der extrazellulären Matrix	53
5.3 Evaluation der Methodik	59
5.4 Zusammenfassung	61
6 Literaturverzeichnis	62
7 Thesen	76
8 Tabellenanhang	77
Selbstständigkeitserklärung	
Erklärung über frühere Promotionsversuche	
Tabellarischer Lebenslauf	
Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

bFGF	b asic f ibroblast g rowth f actor
CD	c luster of d ifferentiation
COMP	c artilage o ligomeric m atrix p rotein
ECM	e xtracellular m atrix (extrazelluläre Matrix)
EGF	e pidermal g rowth f actor
EMT	e pithelial- m esenchymale T ransition
FGF	f ibroblast g rowth f actor
FTC	f ollicular t hyroid c arcinoma (follikuläres Schilddrüsenkarzinom)
GAG	G lykosaminoglykan
HBME-1	H ector B attifora m esothelial e pitope-1 (monoklonaler Antikörper gegen Mesotheliomzellen)
HPF	h igh p ower f ield
IL	I nterleukin
kDa	k ilo D alton
KS	K eratansulfat
min	Minuten
MMP	M atrix- M etalloproteinase
mRNA	m essenger r ibonucleic a cid (Boten-RNA)
n	Anzahl
OPN	O steopontin
PBS	p hosphate b uffered s aline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	p olymerase c hain r eaction
PDGF	p latelet- d erived g rowth f actor
PDTC	p oorly d ifferentiated t hyroid c arcinoma (gering differenziertes Schilddrüsenkarzinom)
ras	r at s arcoma (Protoonkogen)
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
PTC	p apillary t hyroid c arcinoma (papilläres Schilddrüsenkarzinom)
RET	r earranged d uring t ransfection (Rezeptor-Tyrosinkinase, Protoonkogen)
SIBLINGS	s mall i ntergrin b inding l igands
SLRP	s mall l eucine- r ich p roteoglycane
SPARC	s ecreted p rotein, a cidic and r ich in c ysteine
TAF	t umorassozierte F ibroblasten
TGF-β	t ransforming g rowth f actor-β
TIMP	t issue i nhibitor of m etalloproteinases

TN	Tenascin
TSP	Thrombospondin
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UTC	undifferentiated thyroid carcinoma (undifferenziertes Schilddrüsenkarzinom)
VEGF	vascular endothelial growth factor
VN	Vitronektin
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Veränderungen der Schilddrüse kommen relativ häufig vor. Bei ca. einem Drittel der deutschen Bevölkerung können mittels Sonografie der Schilddrüse Auffälligkeiten in Form von Knoten oder einer Struma gefunden werden. Die Häufigkeit asymptomatischer Schilddrüsenknoten über 5 mm Durchmesser beträgt 23 %, wobei diese vergleichsweise selten Ausdruck eines malignen Prozesses sind (Reiners et al., 2003). Da jedoch das Schilddrüsenkarzinom erst im fortgeschrittenen Stadium durch Verdrängung oder Infiltration der umgebenden Strukturen zu eindeutigen Symptomen führt, ist es notwendig, Schilddrüsenknoten stets sorgfältig abzuklären (Raue und Frank-Raue, 2005). Dabei können klinische Untersuchung, Sonografie und Szintigrafie aber lediglich Hinweise auf ein malignes Geschehen geben oder den Verdacht erhärten. Um die Diagnose zu sichern und eine genaue Typisierung vorzunehmen, ist eine histologische Untersuchung die einzige Möglichkeit (Pfannenstiel und Saller, 1991). Die verschiedenen Typen des Schilddrüsenkarzinoms unterscheiden sich deutlich in ihrem biologischen Verhalten. Papilläre und follikuläre Schilddrüsenkarzinome sind prognostisch günstig, bevorzugen aber verschiedene Metastasierungswege. Während PTC hauptsächlich lymphogen metastasieren, kommen bei FTC eher Fernmetastasen vor. Das undifferenzierte Schilddrüsenkarzinom hingegen gilt gewöhnlich als unheilbar und ist durch eine frühe Ausbreitung gekennzeichnet (Galliano und Frishberg, 2012).

1.1 Einteilung und Epidemiologie der Schilddrüsenkarzinome

Bei den malignen Tumoren der Schilddrüse handelt es sich überwiegend um Karzinome. Diese lassen sich nach ihren Ursprungszellen in Karzinome, die von den Follikelzellen ausgehen, und in medulläre Karzinome, die sich von parafollikulären C-Zellen ableiten, einteilen. Zu den thyreozytisch differenzierten Typen gehören nach dem histologischen Bild papilläre, follikuläre, gering differenzierte und undifferenzierte Karzinome (Mann, 2002). Deutlich seltener kommen Plattenepithelkarzinome, Sarkome, maligne Hämangioendotheliome, maligne Lymphome und Teratome sowie Metastasen extrathyreoidaler Tumoren vor (Pfannenstiel und Saller, 1991). Nach der Einteilung der WHO können Schilddrüsenkarzinome in weitere histopathologische Subtypen untergliedert werden (Tabelle 1).

In Deutschland treten pro Jahr etwa 5000 Neuerkrankungen auf. Papilläre Karzinome sind dabei der häufigste histologische Typ und machen 50 % der Fälle aus, gefolgt von follikulären Karzinomen mit 20-30 % und undifferenzierten Karzinomen mit ca. 10 % (Batzler et al., 2008). Die Gesamtinzidenz und die Häufigkeit der einzelnen Subtypen variiert geografisch. Zusätzlich beeinflussen Alter und Geschlecht das Vorkommen des Schilddrüsenkarzinoms, wobei Frauen häufiger betroffen sind als Männer und die höchsten Inzidenzraten zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr auftreten (Batzler et al. 2008; Scheiden et al., 2006).

Tabelle 1: Einteilung der Schilddrüsenkarzinome, nach Eszlinger et al., 2008 und Schmid, 2008

Karzinomtyp	Histopathologische Varianten
Papilläres Karzinom	Klassisches PTC Mikrofollikuläre Variante Makrofollikuläre Variante Onkozytische Variante Klarzellige Variante Diffus sklerosierende Variante Solide Variante Kribriforme Variante PTC mit fokal insulärer Komponente PTC mit Plattenepithel- oder Mukodermoidkarzinom PTC mit Spindel- und Riesenzellkarzinom Kombiniertes papilläres und medulläres Karzinom Papilläres Mikrokarzinom
Follikuläres Karzinom	a) Minimal invasive Variante Onkozytäre Variante Klarzellige Variante <hr/> b) Grob invasive Variante Onkozytäre Variante Klarzellige Variante
Gering differenziertes Karzinom	
Undifferenziertes Karzinom	Variante mit osteoklastären Riesenzellen Karzinomvariante Paucizelluläre Variante Lymphoepitheliale karzinomähnliche Variante
Medulläres Karzinom	

Die Stadieneinteilung der Schilddrüsenkarzinome erfolgt nach der international gebräuchlichen TNM-Klassifikation der UICC. Entsprechend ihrer 6. Auflage von 2002 inklusive der 2005 erfolgten Modifikationen (Tabelle 2) werden multifokale Tumore zusätzlich mit m bezeichnet, wobei der größte Einzeltumor die pT-Kategorie bestimmt. Undifferenzierte (anaplastische) Karzinome werden generell als Stadium pT4 eingestuft und in intrathyreoidale Neoplasien, die

als chirurgisch resezierbar gelten, und inoperable Karzinome mit extrathyreoidaler Ausbreitung unterteilt (Schmid et al., 2005). Auch die 7. Auflage der TNM-Klassifikation sieht für Schilddrüsenkarzinome eine entsprechende Stadieneinteilung vor (Wittekind und Meyer, 2010). In der aktuellen 8. Auflage werden undifferenzierte Karzinome allerdings genauso eingestuft wie differenzierte. Das Stadium pT3b bezieht sich nunmehr auf alle Karzinomtypen und gilt für Tumore jeder Größe mit einer auf die gerade Halsmuskulatur beschränkten Infiltration (Tuttle et al., 2017).

Tabelle 2: 6. Auflage der TNM-Klassifikation der Schilddrüsenkarzinome (Schmid et al., 2005)

pT1	a	Tumor < 1 cm, auf die Schilddrüse beschränkt
	b	Tumor 1 bis 2 cm, auf die Schilddrüse beschränkt
pT2		Tumor > 2cm bis 4 cm, auf die Schilddrüse beschränkt
pT3	a	Tumor > 4 cm, auf die Schilddrüse beschränkt
	b	Alle differenzierten/gering differenzierten Tumoren mit organüberschreitendem Wachstum in den M.sternocleidomastoideus und/oder das perithyreoidale Weichgewebe
pT4	a	Tumorausbreitung über die Schilddrüsenkapsel hinaus mit Invasion der folgenden Strukturen: subkutanes Weichgewebe, Larynx, Trachea, Ösophagus, N.laryngeus recurrens
	b	Tumordinvasion in die prävertebrale Faszie, mediastinale Gefäße, oder Einschluss der A.carotis
	a^a	nur anaplastisches Karzinom: Tumor (jeder Größe) auf die Schilddrüse begrenzt
	b^a	nur anaplastisches Karzinom: Tumor (jeder Größe), der über die Schilddrüsenkapsel hinauswächst
pN0		Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
pN1	a	Metastasen in zervikalen Lymphknoten des Levels VI (prätracheal und paratracheal)
	b	Metastasen in anderen unilateralen, bilateralen, oder kontralateralen zervikalen Lymphknoten oder in superioren mediastinalen Lymphknoten
pM0		Keine Fernmetastasen
pM1		Fernmetastasen

1.2 Histologie der Schilddrüsenkarzinome

Für papilläre Schilddrüsenkarzinome (Abbildung 1) ist nach der WHO-Klassifikation das bestimmende Charakteristikum ihre typische Kernmorphologie mit vergrößerten ovalären Kernen, die einander dachziegelartig überlappen. Zusätzlich sind die Kerne aufgehellert (Milchglaskerne) und besitzen eine unregelmäßige Kontur mit Eindellungen, Einkerbungen und Pseudoeinschlüssen (Schmid et al., 2005). Außerdem können Psammomkörper (konzentrisch lamellenartig angeordnete Kalziumablagerungen) auftreten (Baloch und LiVolsi, 2002). Häufig zeigt das PTC ein multifokales Wachstumsmuster und alle Varianten kommen sowohl gekapselt als auch infiltrierend vor. Die Metastasierung erfolgt hauptsächlich lymphogen, wenngleich invasiv wachsende PTC auch hämatogen metastasieren können (Pfannenstiel et al., 1997).

Das follikuläre Schilddrüsenkarzinom (Abbildung 1) hingegen stellt sich in seinem histologischen Wachstumsmuster sehr unterschiedlich dar. Die Ausbildung hochdifferenzierter Follikel ist genauso möglich wie eher solider Strukturen (Mann, 2002). Das Tumorgewebe setzt sich aber in der Regel aus kolloidhaltigen Follikeln verschiedener Größe zusammen, wobei nebeneinander follikuläre, trabekuläre und solide Gewebemuster auftreten. Histologisch kann man minimal invasive von grob invasiven FTC unterscheiden (Klöppel et al., 2004). Sobald aber neben follikulären auch papilläre Anteile gefunden werden, rechnet man den Tumor den PTC zu (Pfannenstiel et al., 1997). Aufgrund der großen Ähnlichkeit gestaltet sich die differentialdiagnostische Abgrenzung zwischen follikulären Adenomen und minimal invasiven FTC oft schwierig. Letztlich kann nur die Invasion von Gefäßen und Kapsel die Malignität beweisen (Ito und Miyauchi, 2009). Auch hier wäre eine Verbesserung der Differentialdiagnostik wünschenswert.

Undifferenzierte Schilddrüsenkarzinome (Abbildung 1) gelten aufgrund ihres schnellen Wachstums und ihrer frühzeitigen Metastasierung als hochmaligne Tumoren (Pfannenstiel et al., 1997). Bei der histologischen Untersuchung der UTC treten verschiedene Zelltypen in Erscheinung, wie pleomorphe, spindelige und epitheloide Zellen oder Riesenzellen (Schmid, 2008). Mitunter kann mikroskopisch auch der Eindruck eines Sarkoms oder Lymphoms entstehen (Schmid et al., 2003). Ausgedehnte nekrotische Areale und Einblutungen innerhalb des Tumors, eine hohe mitotische Aktivität und eine niedrige Apoptoserate sind jedoch gemeinsame Merkmale aller histologischen Subtypen der UTC (Are und Shaha, 2006). Man nimmt an, dass sie zum Teil aus differenzierten Schilddrüsenkarzinomen hervorgehen, aber auch de novo entstehen können. Bei etwa einem Viertel der Patienten mit UTC finden sich bei der histologischen Analyse zusätzlich residuelle differenzierte Karzinomanteile (Carcangiu et al., 1984; McIver et al., 2001).

Davon abzugrenzen sind gering differenzierte Schilddrüsenkarzinome (PDTC), die sowohl histologisch als auch in ihrem klinischen Verhalten zwischen den differenzierten und undifferen-

zierten Karzinomen angesiedelt sind (Sakamoto et al., 1983). Die genauen histologischen Kriterien, wonach ein Karzinom der Schilddrüse als gering differenziert eingestuft wird, sind jedoch umstritten (Albores-Saavedra und Carrick, 2004; Schmid, 2008). PDTC können morphologisch sehr unterschiedlich in Erscheinung treten und ein solides, trabekuläres und/oder insuläres Wachstumsmuster aufweisen, aber auch aus oxyphilen Zellen bestehen oder diese zumindest enthalten (Volante et al., 2004). Um einen Tumor als PDTC einzuordnen, müssen noch weitere Bedingungen erfüllt sein. Dazu gehören der fehlende Nachweis der Kernkriterien des PTC, das Vorkommen sogenannter „convoluted nuclei“ (kleine, runde chromatin-reiche Kerne mit gewundener Kernmembran) und/oder eine Mitoserate von mindestens 3/10 HPF und/oder Nekrosen (Volante et al., 2007).

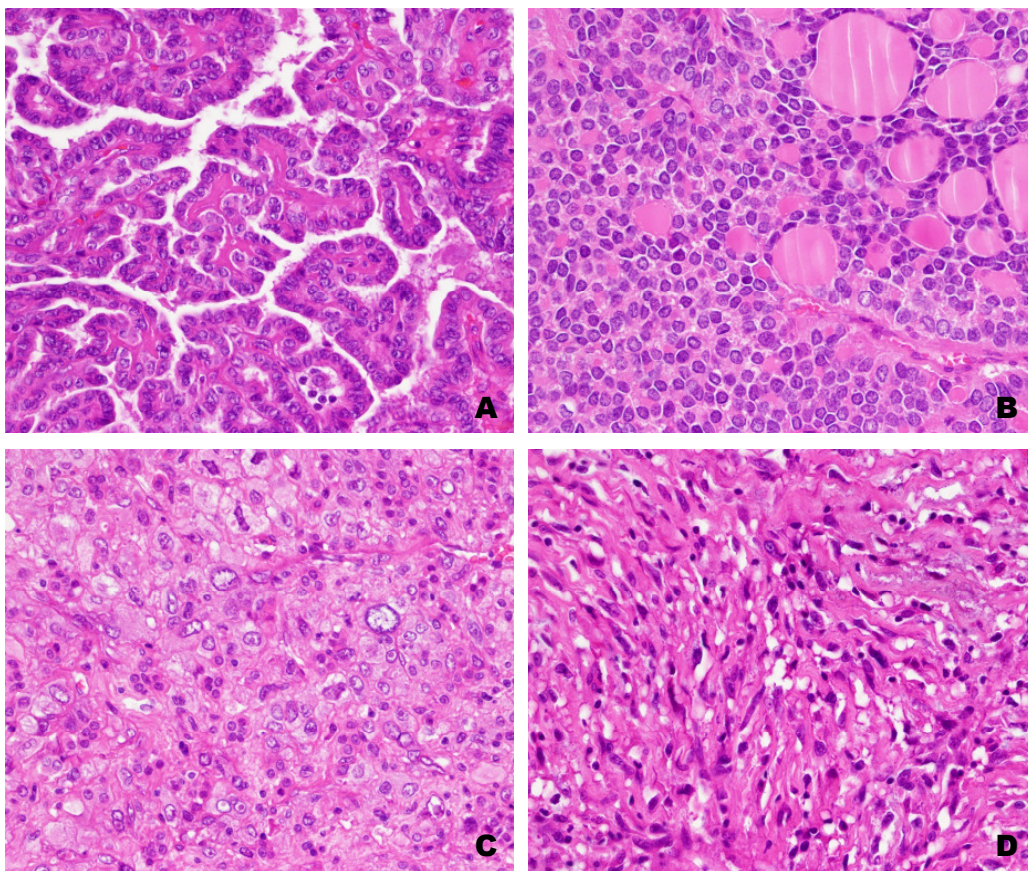


Abbildung 1: Schilddrüsenkarzinome, HE-Färbung, jeweils 200fach vergrößert

- A papilläres Schilddrüsenkarzinom
- B follikuläres Schilddrüsenkarzinom
- C undifferenziertes Schilddrüsenkarzinom (epitheloid)
- D undifferenziertes Schilddrüsenkarzinom (sarkomatoid)

1.3 Bedeutung und Funktion der extrazellulären Matrix

1.3.1 Die extrazelluläre Matrix in gesunden Geweben

Als extrazelluläre Matrix bezeichnet man die Gesamtheit der Makromoleküle, die den extrazellulären Raum einnehmen. Sie werden vor allem von den in sie eingebetteten Zellen hergestellt, die sich je nach Gewebe unterscheiden. Fibro-, Chondro- und Osteoblasten synthetisieren ECM-Moleküle im Bindegewebe, aber auch Epithel- und Endothelzellen können Matrixmoleküle produzieren (Hamacher et al., 2004). Die Makromoleküle der ECM lassen sich hauptsächlich in Faserproteine, Glykosaminoglykane und Proteine, die der Signalübermittlung dienen, einteilen (Alberts et al., 1990; Christen und Jaussi, 2005). Die Fähigkeit der Zellen zur Adhäsion an die extrazelluläre Matrix ist Voraussetzung für die Organisation des Zytoskeletts und somit der Morphologie der Zelle. Einerseits stehen die Oberflächenrezeptoren benachbarter Zellen miteinander in Kontakt, andererseits binden Zellen direkt an Komponenten der kollagenreichen extrazellulären Matrix oder an die Basalmembran. Letztere ist als Sonderform der ECM zu verstehen, die eine Vielzahl von adhäsiven Glykoproteinen enthält und die Grundlage nahezu aller Epithelgewebe bildet (Gumbiner, 1996). Lange Zeit wurde der ECM allein die Rolle einer Stützsubstanz zugeschrieben, die den Raum zwischen den Zellen ausfüllt und die mechanischen und strukturellen Eigenschaften der Gewebe bestimmt (Sid et al., 2004). Heute weiß man, dass die Bedeutung der ECM weit darüber hinausgeht, da sie wesentlichen Einfluss auf intrazelluläre Vorgänge ausübt. Über die Interaktion mit speziellen Rezeptoren an der Zelloberfläche, den Integrinen, reguliert sie die Genexpression in den Zellen (Gjorevski und Nelson, 2009).

Ob das Wachstum einer Zelle gefördert oder gehemmt wird, hängt u.a. davon ab, wie Matrixmoleküle Zellzyklusmediatoren stimulieren oder inhibieren (Rana et al., 1994; Zhu und Assoian, 1995; Dike und Ingber, 1996). Die extrazelluläre Matrix ist wesentlich an der Regulation der funktionellen Differenzierung von Zellen beteiligt. Ein Beispiel ist die Differenzierung von Alveolarepithelzellen vom Typ II in der Lunge, die sich bei Fehlen bestimmter Moleküle in der umgebenden ECM in Alveolarepithelzellen vom Typ I differenzieren (Leiner et al., 2006). Auch die Gene, die mit der Apoptose von Zellen assoziiert sind, werden durch die ECM beeinflusst (Boudreau et al., 1995; Shi et al., 1998).

Die Zusammensetzung der ECM und die exprimierten Integrinrezeptoren unterscheiden sich je nach Gewebetyp (Boudreau and Jones, 1999). Wann ein bestimmtes Matrixmolekül von Zellen exprimiert bzw. dessen Gen transkribiert wird, ist abhängig von äußeren Faktoren wie dem Zelltyp oder der Phase des Zellzyklus. Dabei wird mit Hilfe von Transkriptionsfaktoren reguliert, ob und in welchem Umfang die entsprechenden Gene abgelesen werden. Man unterscheidet allgemeine Transkriptionsfaktoren, die für das Ablesen jedes Gens notwendig sind, und spezifische Transkriptionsfaktoren, deren Einfluss sich auf bestimmte Gene beschränkt (Renkawitz und

Leers, 2008). Einer der wichtigsten Regulatoren ist TGF- β , der die Produktion verschiedener Matrixbestandteile wie Kollagene, Fibronectin, Thrombospondin, Osteopontin und Osteonektin steigert (Ignatz et al., 1987; Noda und Rodan, 1987; Varga et al., 1987; Penttinen et al., 1988; Noda et al., 1988; Liau und Chan, 1989).

Um die Zusammensetzung der ECM zu verändern, muss diese auch abgebaut werden. Der Abbau erfolgt durch vier verschiedene Gruppen von Proteasen, die als Serin/Threonin-, Cystein, Aspartat- und Metalloproteinasen bezeichnet werden (Woessner, 2004). Die größte Bedeutung kommt dabei den Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) zu, bei denen es sich überwiegend um zinkbindende Endopeptidasen handelt. Es wurden die Gene von mindestens 26 MMPs identifiziert (Hamacher et al., 2004), die entsprechend ihrer Substratspezifität nochmals in Kollagenasen, Stromelysine, Gelatinasen, sogenannte Membrane-Type-MMPs und andere MMPs unterteilt werden (Woessner, 2004). Die MMPs werden vielfältig in ihrer Funktion reguliert, wobei inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone und bestimmte ECM-Komponenten die Transkription der Proteasen steigern, aber Glukokortikoide und Retinsäure ihre Produktion hemmen können (Sternlicht und Werb, 2001). Darüber hinaus sind endogene Inhibitoren der MMPs bekannt, die mindestens vier Proteine umfassen und als TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) bezeichnet werden (Gomez et al., 1997; Sternlicht und Werb, 2001).

1.3.2 Die extrazelluläre Matrix und die Entstehung von Karzinomen

Tumore entstehen in einem vielschichtigen Prozess, der durch genetische Mutationen gekennzeichnet ist, die zu Störungen in der Regulation des Zellzyklus und damit zur unkontrollierten Zellteilung und -vermehrung führen. Zu den Charakteristika eines malignen Phänotyps gehören die Unabhängigkeit der Zellen von wachstumsregulierenden Faktoren, die Unterdrückung der Apoptose, die unbegrenzte Zellproliferation, eine verstärkte Angiogenese sowie die Fähigkeit zur Gewebsinfiltration und Metastasierung (Hanahan und Weinberg, 2000). Darüber hinaus ist in malignen Tumoren die Produktion von Matrixmolekülen erheblich gesteigert (Marsh et al., 2013).

Die Veränderungen der Zellphysiologie laufen während der Karzinogenese schrittweise ab und aus ehemals polarisierten epithelialen Zellen, die an eine Basalmembran gebunden sind, können sich Zellen mit einem mesenchymalen Phänotyp entwickeln. Dieser Prozess wird daher als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet, der auch unter physiologischen Bedingungen abläuft wie bei der Implantation des Embryos, der Organogenese oder auch der Wundheilung und Regeneration von Geweben. Im Rahmen der Krebsentstehung können Zellen entweder nur partiell mesenchymale Eigenschaften erwerben oder sich vollständig in mesen-

chymale Zellen umwandeln, wobei das Potential zur Invasion und Metastasierung mit zunehmenden mesenchymalen Eigenschaften der Zellen steigt (Kalluri and Weinberg, 2009).

Die Zusammensetzung der ECM verändert sich während der Karzinogenese deutlich. Dabei kommt es zu vielfältigen Wechselwirkungen zwischen epithelialen Tumorzellen, den sie umgebenden Stromazellen und der extrazellulären Matrix (Bhowmick und Moses, 2005). Die Tumorzellen produzieren vermehrt Wachstumsfaktoren wie VEGF, PDGF, EGF und FGF (Mueller und Fusenig, 2004). Unter dem Einfluss der Wachstumsfaktoren entsteht ein aktiviertes Tumorstroma, das u.a. auch sogenannte aktivierte oder tumorassoziierte Fibroblasten (TAF) enthält. Diese Zellen produzieren ihrerseits weitere Wachstumsfaktoren und Zytokine, die die Angiogenese und das Tumorwachstum steigern sowie die Invasivität erhöhen (Allen und Louise Jones, 2011; Marsh et al., 2013). Außerdem bilden TAF verstärkt Matrixmoleküle, die wiederum das Überleben und die Proliferation der Tumorzellen unterstützen. Andererseits synthetisieren sie Matrix-Metalloproteinasen, die die ECM in der direkten Umgebung der Krebszellen abbauen und so eine Invasion in das umgebende Gewebe ermöglichen (Bhowmick und Moses, 2005; Marsh et al., 2013).

Entzündungszellen gehören ebenfalls zum aktivierten Tumorstroma (Bhowmick und Moses, 2005). Sie geben Zytokine, Wachstumsfaktoren sowie Chemokine ab und produzieren reaktive Sauerstoffspezies, wodurch sie die Proliferation der Tumorzellen stimulieren, die Apoptose verhindern, die Morphogenese induzieren oder zu DNA-Schäden in den epithelialen Zellen führen (Coussens und Werb, 2002).

1.4 Bestandteile der extrazellulären Matrix

Die Bestandteile der extrazellulären Matrix können in vier Gruppen eingeteilt werden, zu denen Kollagene, Elastine, Proteoglykane und nicht-kollagene Glykoproteine gehören. Die Kollagene stellen im Organismus quantitativ die größte Gruppe der Proteine dar (Deutzmann et al., 2007). Sie sind hauptsächlicher Bestandteil der Sehnen und Bänder, des Knorpels, der Knochen und der Haut. Bisher sind 28 verschiedene Kollagene identifiziert worden, die in fibrilläre und nicht-fibrilläre Kollagene unterteilt werden können. Sie bestehen jeweils aus drei Polypeptidketten, die sich zu einer Tripelhelix verbinden (Kadler et al., 2007). Elastin bildet den Kern der elastischen Fasern, der von einem Mantel aus Mikrofibrillen umgeben ist (Kielty et al., 2002). Die Proteoglykane sind eine sehr heterogene Gruppe von Molekülen, die durch ihren Kohlenhydratanteil gekennzeichnet sind. Sie bestehen aus einem Proteingerüst, das mit Glykosaminoglykanketten verknüpft ist. Je nach Grundbaustein unterscheidet man Chondroitinsulfat, Keratansulfat, Dermatansulfat und Heparansulfat. Während Kollagene, Elastine und Proteoglykane vor allem strukturbildende Eigenschaften aufweisen, regulieren viele nicht-kollagene Glykoproteine vorrangig Zellfunktionen und Zell-Matrix-Interaktionen (Deutzmann et al.,

2007). Man unterteilt sie in adhäsive Proteine einerseits, zu denen Fibronectin, Laminin und Vitronectin gehören, und matrizelluläre Proteine andererseits (Murphy-Ullrich, 2001). Letztere treten mit anderen Matrixproteinen, spezifischen Zelloberflächenrezeptoren (Integrinen), Wachstumsfaktoren und Zytokinen in Kontakt. Die Wirkungen der matrizellulären Proteine können zum Teil gegensätzlich sein, da sie hauptsächlich von ihren jeweiligen Bindungspartnern abhängen (Bornstein, 2009). Zu den matrizellulären Proteinen gehören u.a. Tenascin-C, Thrombospondin-1 und -2, SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteine) und Osteopontin, die zusätzlich zu der kleinen Gruppe der SIBLINGS (small integrin binding ligands) gerechnet werden (Sangaletti und Colombo, 2008). Sie werden bei der Embryonalentwicklung, nach Gewebsverletzungen sowie beim Wachstum von Tumoren verstärkt exprimiert (Bornstein und Sage, 2002).

Allerdings kann nicht immer klar zwischen rein strukturellen und regulierenden Proteinen unterschieden werden, da viele Strukturproteine auch Liganden von Zelloberflächenrezeptoren sind und so Signalkaskaden aktivieren können (Bornstein, 2001). Daher gibt es gewisse Überschneidungen zwischen den einzelnen Gruppen. Zu den wichtigsten adhäsiven Makromolekülen gehören Fibronectin, Vitronectin, Laminin und Entactin, aber auch die fibrillären Kollagene der Typen I-III, V und XI sowie Typ IV in der Basalmembran (Sage und Bornstein, 1991). Diese Moleküle können ebenfalls regulatorische Funktionen aufweisen. Vitronectin unterdrückt z.B. die Apoptose neutrophiler Granulozyten über die Interaktion mit den Integrinuntereinheiten $\beta 1$, $\beta 3$ und $\beta 5$ (Bae et al., 2012).

Da Tumorzellen die extrazelluläre Matrix direkt beeinflussen, können aus der Zusammensetzung der ECM auch Rückschlüsse auf den funktionellen Zustand der Zellen gezogen werden. Für diese Studie wurden dementsprechend Matrixbestandteile ausgewählt, für die bekannt ist, dass sie häufig in der ECM von Karzinomen zu finden sind bzw. aufgrund ihrer zellbiologischen Funktionen karzinomspezifische Unterschiede in ihrem Vorkommen in der ECM vermutet werden können. Nachfolgend sollen die in dieser Studie untersuchten Matrixmoleküle Tenascin-C, Thrombospondin-1, Vitronectin, Osteopontin und Keratansulfat näher betrachtet werden.

1.4.1 Tenascin

In den Bindegeweben der Wirbeltiere wurden vier verschiedene Tenascine nachgewiesen, die Tenascin-C, -R, -X und -W genannt werden (Chiquet-Ehrismann, 2004). Die Bezeichnungen beziehen sich zum Teil auf die ursprüngliche Nomenklatur der Tenascintypen, die zunächst in unterschiedlichen Geweben isoliert und nicht als Tenascin identifiziert wurden. Tenascin-C war anfänglich als Cytotactin bekannt (Grumet et al., 1985; Erickson, 1993), Tenascin-R als Restrict-

tin (Rathjen et al., 1991) und Tenascin-X als Flexilin (Lethias et al., 1996). Tenascin-W wurde erstmals 1998 im Gewebe des Zebrafisches gefunden (Weber et al., 1998).

Bei Tenascin-C handelt es sich um ein Makromolekül, das in der monomeren Form bis zu 300 kDa groß ist (Jones und Jones, 2000). Strukturell besteht es aus repetitiven EGF-ähnlichen Abschnitten und ebenfalls repetitiven Fibronectin-Typ-III-homologen Domänen, die wegen ihrer Ähnlichkeit zu den Domänen des Fibronectin so bezeichnet werden (Nies et al., 1991). Aufgrund alternativer Splicingvarianten dieser Fibronectin-Typ-III-ähnlichen Domänen auf prä-mRNA-Niveau variiert die Größe der Tenascinmonomere zwischen 180 kDa und 250 kDa (Jones et al., 1992; Sriramarao und Bourdon, 1993). Die genaue Struktur der Isoformen bestimmt letztlich den Effekt des Proteins (Adams et al., 2002). Die beiden häufigsten Formen sind die „small form“ und die „large form“, die keines der möglichen Exons bzw. alle Exons der repetitiven FN-III-Domäne enthalten. Bei Karzinomen unterschiedlichen Ursprungs wurde im Vergleich zum gesunden Gewebe ein Wechsel der Dominanz von der „small“- zur „large“-Form nachgewiesen, z.B. bei Karzinomen der Mamma (Borsi et al., 1992), der Mundschleimhaut (Hindermann et al., 1999) und auch beim kolorektalen Karzinom (Dueck et al., 1999). Beim Mammakarzinom geht die Umwandlung vom präinvasiven zum invasiven Phänotyp ebenfalls mit einer veränderten Expression von Tenascin-C-Isoformen einher (Adams et al., 2002).

Die adhäsive Wirkung von Tenascin wird über eine Zelladhäsionsdomäne vermittelt, die die Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure enthält, die entsprechend dem Einbuchstaben-Code für Aminosäuren auch als RGD-Sequenz bezeichnet wird (Leahy et al., 1992). Tenascin-C interagiert durch seine Multidomänenstruktur mit den in die ECM eingebetteten Zellen und mit anderen Matrixbestandteilen (Mackie und Ramsey, 1996). Durch Wechselbeziehungen mit verschiedenen Rezeptoren und alternatives Splicing können sich die biologischen Funktionen des Proteins unterscheiden und auch gegensätzlich sein, z.B. kann es die Zellproliferation sowohl stimulieren als auch hemmen (End et al., 1992). Tenascin wurde aber auch als Molekül mit antiadhäsiven Eigenschaften beschrieben, das nur geringfügig zur Adhäsion und Ausbreitung von Zellen beiträgt (Lotz et al., 1989; Orend und Chiquet-Ehrismann, 2000). Mögliche Bindungspartner sind Integrine wie $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$ und $\alpha v\beta 2$ (Orend und Chiquet-Ehrismann, 2006).

Tenascin wird sowohl unter physiologischen, als auch unter pathologischen Bedingungen produziert. Beim Embryo wird es stark exprimiert, in erwachsenen Organismen hingegen nur in sehr geringem Umfang. Während der embryonalen bzw. fetalen Entwicklung bilden vor allem die Anteile des Mesenchyms Tenascin, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft von sich entwickelndem Epithel befinden. Bei Erwachsenen wird es in solchen Geweben stark exprimiert, in denen unter physiologischen Bedingungen proliferierende Zellen vorkommen wie z.B. in der Haut. Während der embryonalen Entwicklung der Niere von Mäusen wurde beobachtet, dass wachsendes Epithelgewebe Faktoren bildet, die die Expression von Tenascin-C fördern (Auf-

derheide et al., 1987). Darüber hinaus wird die Tenascin-Produktion im Rahmen reaktiver, entzündlicher oder neoplastischer Veränderungen induziert (Erickson und Bourdon, 1989; Talts et al., 1995). In den meisten soliden malignen Tumoren wird es daher stark exprimiert und soll die Tumorzellinvasion begünstigen (Orend und Chiquet-Ehrismann, 2006). Es wurde beispielsweise im Stroma des Magenkarzinoms (Ikeda et al., 1995), des Mammakarzinoms (Ishihara et al., 1995) und des Kolonkarzinoms detektiert (Sakai et al., 1993). In Tumorzellen wurde Tenascin bereits beim Harnblasenkarzinom (Brunner et al., 2004) und beim Larynxkarzinom (Yoshida et al., 1999) gefunden.

Die Expression von Tenascin-C wird durch TGF- β erhöht (Pearson et al., 1988; Sakai et al., 1994). Auch bFGF, TNF- α (Tucker et al., 1993; Rettig et al. 1994), Angiotensin-II (Mackie et al., 1992; Sharifi et al., 1992), Interleukin-I (McCachren und Lightner, 1992) und andere pro- und antiinflammatorische Zytokine stimulieren die Tenascin-C-Produktion (Rüegg et al., 1989). Glukokortikoide hingegen hemmen die Expression, wie *in vitro* in Fibroblasten und in Kulturen von Knochenmarksstromazellen nachgewiesen wurde (Ekblom et al., 1993).

1.4.2 Thrombospondin

Zur Familie der Thrombospondine gehören fünf Proteine, die in die Subgruppen A (bestehend aus TSP-1 und -2) und B (bestehend aus TSP-3, -4 und -5) unterteilt werden. Bei den Proteinen der Subgruppe A handelt es sich um Trimere, während die Proteine der Subgruppe B als Pentamere vorliegen (Lawler et al., 1993; Adams, 2001). Ihr Molekulargewicht liegt je nach Subtyp zwischen 420 und 520 kDa (Sid et al., 2004; Kazerounian et al., 2008).

Thrombospondin-1 war das erste bekannte Thrombospondin und wurde primär in Thrombozyten, später auch in anderen Zellen wie Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten und Makrophagen gefunden (Jaffe et al., 1983; Ioachim et al., 2006). Es unterdrückt die Angiogenese, wodurch das Tumorwachstum gebremst wird. In frühen Tumorstadien wurde nachgewiesen, dass das umgebende gesunde Gewebe TSP-1 und -2 produziert, um so der Angiogenese des Tumors entgegen zu wirken (Kazerounian et al., 2008). Zudem gilt TSP-1 als Aktivator von TGF- β (Young und Murphy-Ullrich, 2004). Darüber hinaus hemmt es die Adhäsion (Murphy-Ullrich und Hook, 1989), die Motilität und das Wachstum endothelialer Zellen. Neben inhibitorischen sind aber auch stimulierende Effekte auf die Zelladhäsion und -motilität bekannt (Tara-boletti et al., 1990). Die zum Teil gegensätzlichen Wirkungen beruhen darauf, dass Thrombospondin-1 eine Vielzahl von Bindungsstellen für unterschiedliche Liganden besitzt. Dadurch kann es ebenso wie Tenascin gleichzeitig mit mehreren Rezeptoren eines Zelltyps interagieren und in Abhängigkeit von der Rezeptorexpression unterschiedliche Effekte hervorrufen. Als TSP-1-Rezeptoren wurden unter anderem die Integrine $\alpha v \beta 3$, $\alpha 3 \beta 1$, $\alpha 4 \beta 1$, $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha I I b \beta 3$ und $\alpha 2 \beta 1$ sowie CD36 identifiziert (Sid et al., 2004). Binden TSP-1 oder TSP-1- Frag-

mente an CD36, wird die Apoptose endothelialer Zellen induziert (Guo et al., 1997; Jimenez et al., 2000; Nor et al., 2000).

Die Expression von Thrombospondin-1 ist wie bei Tenascin in proliferierenden Zellen gegenüber ruhenden gesteigert (Mumby et al., 1984). Eine starke Expression des Proteins fand sich daher in verschiedenen Malignomen wie z.B. in den desmoplastischen Anteilen invasiver Mammakarzinome (Horiguchi et al., 2013), in Pankreaskarzinomen (Kasper et al., 2001) und Ovarialzellkarzinomen (Alvarez et al., 2001).

Einige Faktoren, die die TSP-Synthese regulieren, sind bereits identifiziert worden. Hepatocyte growth factor vermindert die Expression von Thrombospondin-1 in PTC (Scarpino et al., 2005). EGF und TGF- β fördern dagegen seine Synthese in menschlichen Tumorzellen, u.a. der Leber und des Pankreas (Okamoto et al., 2002). Einflüsse auf die TSP-Produktion durch Östrogene beim Mammakarzinom (Hyder et al., 2009), durch p53 beim Harnblasenkarzinom (Grossfeld et al., 1997) und die Zelldichte bei Glioblastomen (Naganuma et al., 2003) sind ebenfalls beschrieben worden.

Thrombospondin-2 wirkt wie Thrombospondin-1 antiangiogen. Zudem spielt es eine Rolle bei der Zelladhäsion, -migration und -proliferation sowie der Regulation der Matrix-Metalloproteinasen (Bornstein 2001). Im Gegensatz zu TSP-1 blockiert TSP-2 allerdings die Aktivierung von TGF- β , da es das Signalmolekül zwar binden, aber eben nicht aktivieren kann (Daniel et al., 2009).

Die Funktionen der Thrombospondine der Subgruppe B sind bisher weniger bekannt. Sie unterscheiden sich von der Subgruppe A durch das Fehlen der sogenannten Type-1-Repeats, die für deren antiangiogene Wirkung verantwortlich sind. Daher unterdrücken Thrombospondine der Subgruppe B die Angiogenese wahrscheinlich nicht (Kazerounian et al., 2008). TSP-3-mRNA wurde in endokrinen und fetalen Geweben sowie in der Muskulatur nachgewiesen (Adolph, 1999). Beim Osteosarkom stimuliert Thrombospondin-3 das Tumorwachstum (Dalla-Torre et al., 2006). Ein hoher Gehalt an TSP-4-mRNA wurde in der Herz- und Skelettmuskulatur entdeckt sowie in menschlichen Endothelzellen und in der Gefäßwandmuskulatur zerebraler Gefäße. In Neuronen vermittelt Thrombospondin-4 das Auswachsen von Neuriten und es akkumuliert an der neuromuskulären Endplatte (Misenheimer und Mosher, 2005). Nach einer Studie wird TSP-4 in invasiven lobulären Mammakarzinomen stärker exprimiert als in duktalem (Korkola et al., 2003). Thrombospondin-5, auch bekannt als kartilaginäres oligomeres Matrixprotein (COMP), kommt in muskuloskeletalen Geweben vor, stimuliert vermutlich die Proliferation von Chondrozyten (Xu et al., 2007) und wird bei Osteoarthritis verstärkt exprimiert (Koelling et al., 2006).

1.4.3 Vitronektin

Das aus 459 Aminosäuren bestehende Glykoprotein kommt im Blut und in der extrazellulären Matrix vor (Schvartz et al., 1999). Es liegt im Blutkreislauf sowohl als Monomer mit 75 kDa vor, als auch als Dimer bestehend aus zwei Ketten mit 65 kDa bzw. 10 kDa, die durch eine Disulfidbrücke verbunden sind (Barnes et al., 1983). Vitronektin vermittelt seine adhäsiven Eigenschaften ebenfalls über eine Domäne, die die RGD-Sequenz enthält (Suzuki et al., 1985).

Auch bei Vitronektin handelt es sich um ein multifunktionelles Protein. Durch die Interaktion mit Integrinen aktiviert es Signalkaskaden und reguliert die Organisation des Zytoskeletts, wodurch es die Anheftung, Ausbreitung und Migration von Zellen unterstützt. Zu den Bindungspartnern von Vitronektin gehören die Integrine $\alpha\text{v}\beta\text{1}$, $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, $\alpha\text{v}\beta\text{5}$, $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ und $\alpha\text{v}\beta\text{8}$, mit denen es über seine kollagen- und heparinbindenden Domänen kommuniziert (Meredith et al., 1996). Darüber hinaus trägt Vitronektin auch über die Bindung an den Urokinase-Rezeptor (uPAR) zur Zelladhäsion bei. Dieser Mechanismus wird wiederum durch den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI) gehemmt, der an Vitronektin bindet und damit die Adhäsion über uPAR blockiert (Waltz et al., 1997).

Vitronectin ist identisch mit Protein S, das zuerst in Thrombozyten entdeckt wurde. Es fördert die Blutgerinnung, indem es an Heparin bindet und dieses neutralisiert. Zudem interagiert Vitronectin nicht nur mit PAI, sondern auch mit Plasminogen und Thrombin-Antithrombin-III-Komplexen (Preissner et al., 1985). Bindet Vitronectin an PAI, wird dieser stabilisiert und seine Halbwertszeit deutlich verlängert, wodurch die Fibrinolyse gehemmt wird (Ehrlich et al., 1990). Vitronectin besitzt auch Funktionen im Immunsystem, z.B. unterdrückt es zytolytische Komplementreaktionen durch Bindung an den Komplementfaktor C5b-7 (Podack et al., 1984). Es bindet ebenfalls an grampositive und gramnegative Bakterien, wodurch deren Phagozytose durch Makrophagen erleichtert wird (Chhatwal et al., 1987; Vassallo et al., 2001).

In malignen Tumoren wurde eine gesteigerte Expression bzw. eine Neuexpression von Vitronectin beobachtet, z.B. nimmt bei Astrozytomen die Vitronectinsynthese mit steigendem Malignitätsgrad zu, während in gesundem Hirngewebe das Protein nicht exprimiert wird (Gladson und Cheresch, 1991). Auch Mammakarzinome enthalten im Vergleich zu gesundem Brustgewebe deutlich mehr Vitronectin (Aaboe et al., 2003). Im Ovar wird es in gesundem Gewebe und in höher differenzierten Karzinomen exprimiert, aber nicht in niedrig differenzierten Karzinomen (Carreiras et al., 1996). Andere Untersuchungen zeigen hingegen, dass Vitronectin in Ovarialzellkarzinomen die Zellproliferation und -motilität steigert (Hapke et al., 2003; Heyman et al., 2010). Auch in Gliomen (Gladson et al., 1995) und Mammakarzinomen (Pola et al., 2013) nehmen unter dem Einfluss von Vitronectin Motilität und Invasivität der Tumorzellen zu. Des Weiteren kommt das Protein im Stroma des kolorektalen Karzinoms (Tomasini-Johansson et al., 1994) und des hepatozellulären Karzinoms (Jaskiewicz et al., 1993) vor.

Die Vitronektin-Expression wird durch verschiedene Faktoren reguliert. In Lebertumorzellen wird die Biosynthese des Proteins durch TGF- β induziert sowie durch EGF und PDGF stimuliert (Koli et al., 1991). Beim Ovarialzellkarzinom induziert die Signalgebung über Integrin $\alpha\beta 3$ seine Expression (Reuning, 2011), in Maus-Neuroblastom-Zellen der Transkriptionsfaktor foxa (Shimizu et al., 2002).

1.4.4 Osteopontin

Osteopontin ist ein säurehaltiges phosphoryliertes Glykoprotein, das aus einer Kette von 264 bis 333 Aminosäuren besteht, darunter, wie bei den zuvor beschriebenen Proteinen, eine RGD-Sequenz, die über die Interaktion mit Integrinen die adhäsiven Eigenschaften des Proteins vermittelt (Sodek et al., 2000). Sein Molekulargewicht liegt in Abhängigkeit von posttranslationalen Veränderungen zwischen 41 und 75 kD. Osteopontin kommt in verschiedenen Splicing-Varianten vor. Bisher sind drei Isoformen bekannt, die als Osteopontin -a, -b und -c bezeichnet werden und sich in ihrer Domänenstruktur sowie vermutlich auch in ihren Funktionen unterscheiden. Während OPN-a aus sieben Exons besteht, fehlt den beiden anderen Varianten jeweils ein Exon, wobei in OPN-b das fünfte Exon und in OPN-c das vierte Exon nicht enthalten ist (Anborgh et al., 2011, Kahles et al., 2014).

Unter physiologischen Bedingungen wird Osteopontin hauptsächlich von Osteoklasten produziert (Dodds et al., 1995), wurde jedoch z.B. auch im Epithel der Gallenblase, des Dünndarms und distalen Nierentubulus nachgewiesen (Brown et al., 1992). Zudem ist es in einer Vielzahl anderer Zellen, Gewebe und Organe zu finden, darunter Chondrozyten, Fibroblasten, T-Zellen, Skelettmuskulatur, Gehirn, Innenohr, Plazenta und Brustdrüsen (Sodek et al., 2000; Kahles et al., 2014). Im Rahmen der Zelladhäsion interagiert Osteopontin sowohl mit Integrinen, z.B. $\alpha\beta 1$, $\alpha\beta 3$ und $\alpha\beta 5$ (Furger et al., 2003), als auch mit CD44 (Chellaiah et al., 2003; Teramoto et al., 2005).

Es ist seit Längerem bekannt, dass die maligne Transformation von Zellen mit einer erhöhten OPN-Expression einhergeht (Denhardt und Guo, 1993). Indem Osteopontin die Aktivität matrixabbauender Proteine reguliert, z.B. die Expression der Matrix-Metalloproteinase-2 erhöht, trägt es zur Tumordinvasion bei (Philip et al., 2001). Osteopontin stimuliert außerdem die Zelladhäsion, -migration und -proliferation (Denhardt und Guo, 1993). So wurde es bereits in einer Vielzahl von Malignomen gefunden, darunter in Karzinomen der Mamma (Tuck et al., 1998), des Kolon (Agrawal et al., 2002) und der Prostata (Hotte et al., 2002) sowie in Osteosarkomen (Sulzbacher et al., 2002) und multiplen Myelomen (Saeki et al., 2003).

Die Expression von Osteopontin wird unter anderem durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone reguliert, z.B. steigern Interleukin-1- β (Serlin et al., 2006), TGF- β (Noda et al., 1988), EGF, PDGF (Denhardt und Noda, 1998), Vitamin D3 (Noda et al., 1990; Chang und Prince,

1993), Vitamin-A (Retinsäure) und Kortikosteroide (Kasugai et al., 1991) die Osteopontin-Expression. Auch in Zellen mit aktivierten Onkogenen z.B. in ras-transformierten Zellen (Denhardt et al., 2003) oder in RET/PTC-transformierten Schilddrüsenzellen (Castellone et al., 2004) zeigte sich eine erhöhte Expression von Osteopontin.

1.4.5 Keratansulfat

Das Glykosaminoglykan (GAG) Keratansulfat ist vorwiegend in der Cornea, im Knorpel und im Gehirn zu finden. Es ist regulärer Bestandteil von Proteoglykanen, die in der extrazellulären Matrix epithelialer und neuraler Gewebe vorkommen. Mögliche keratansulfathaltige Proteoglykane sind SLRPs in der interstitiellen Matrix, Aggrecan im Gelenkknorpel sowie zerebrale und zellassozierte Proteoglykane. Es tritt in Verbindung mit bestimmten Proteinen auf, die Keratansulfat als posttranslationale Modifikation tragen. Bisher sind mindestens 16 verschiedene Moleküle identifiziert worden, die Keratansulfat enthalten (Funderburgh, 2000; Funderburgh, 2002). Ursprünglich ging man aufgrund ihrer Lokalisation in der Cornea oder im Knorpel von zwei Keratansulfattypen aus. Später fand man heraus, dass sich nicht nur die Lokalisation, sondern auch die Bindungsstruktur des Keratansulfats an das Core-Protein des Proteoglykans unterscheidet. Drei verschiedene Bindungstypen sind bekannt. Demnach bezieht sich Keratansulfat-I auf alle Moleküle, die über Stickstoffbindungen an Asparaginreste eines Core-Proteins gebunden sind, wie z.B. in Lumican, Keratocan und Mimecan in der Cornea. Keratansulfat-II liegt hingegen im Knorpel vor und korrespondiert über Sauerstoffbrückenbindungen mit Serin oder Threoninresten des Core-Proteins. Hauptsächlich ist es hier als Bestandteil des Proteoglykans Aggrecan zu finden (Bray et al., 1967; Nieduszynski et al., 1990), wobei etwa 30 KS-Ketten im reifen Aggrecanmolekül gebunden sind (Kiani et al., 2002). Keratansulfat-II kann nochmals eingeteilt werden in Keratansulfat-II A, das im Gelenkknorpel vorkommt, und Keratansulfat-II B, das in der Trachea und im Nasenseptum enthalten ist. Auch diese weisen strukturelle Unterschiede auf, wobei KS-II-A-Moleküle Fucose und Acetylneuraminsäure enthalten, während diese Bestandteile in KS-II-B-Molekülen fehlen (Nieduszynski et al., 1990). Zusätzlich wurde im Gehirn ein dritter Bindungstyp identifiziert, bei dem das Molekül über eine Sauerstoffbrückenbindung zwischen Mannose und Serin an das Core-Protein gebunden ist. In diesem Fall spricht man von Keratansulfat-III (Krusius et al., 1986).

In der Cornea dient Keratansulfat dem Erhalt einer ausreichenden Hydratation, die notwendig für die Transparenz des Gewebes ist (Bettelheim und Plessy, 1975). Darüber hinaus beeinflusst es bei der Wundheilung in der Cornea die Motilität wandernder Endothelzellen, deren Keratansulfatgehalt während der Migration sinkt und danach wieder ansteigt (Fullwood et al., 1996; Davies et al., 1999). Auch als Bestandteil des Proteoglykans Aggrecan im Gelenkknorpel bindet Keratansulfat Wasser und trägt somit zur besonderen Druckfestigkeit des Gewebes bei (Kiani et

al., 2002). Zudem ermöglicht erst die Bindung von Chondroitin- und Keratansulfatketten an das Core-Protein die Sekretion von Aggrecan in die ECM. Nicht mit GAG-Ketten modifizierte Core-Proteine werden hingegen nicht in die ECM abgegeben (Kiani et al., 2001). Im Endometrium erleichtert Keratansulfat die Invasion des Trophoblasten (Aplin et al., 1998). Bei Patienten mit Autoimmunarthritis wurde beobachtet, dass es die Entstehung einer Immunantwort im Gelenkknorpel blockiert (Guerassimov et al., 1999).

Im ZNS wurden ebenfalls verschiedene Proteoglykane identifiziert, die Keratansulfat enthalten, u.a. Claustrin (Burg und Cole, 1994) und Phosphocan-KS (Margolis et al., 1996), die die Adhäsion von Nervenzellen und das Wachstum von Axonen hemmen und dadurch auch regulieren können. Eine erhöhte Biosynthese von Keratansulfat wurde in einer Studie nach Hirnverletzungen bei Mäusen beobachtet (Yin et al., 2009). Auch in Astrozytomen ist die Synthese von Keratansulfat gesteigert (Hayatsu et al., 2008; Kato et al., 2008). Außerhalb von Cornea, ZNS und Knorpelgewebes fand sich das Glykosaminoglykan beispielsweise in Zelllinien des Kolonkarzinoms. Bei hohem Metastasierungspotential der Zellen war Keratansulfat hier häufiger an den Zelloberflächenrezeptor CD44 gebunden als bei geringem Metastasierungspotential, da Keratansulfat die Bindung von CD44 an Hyaluronat blockiert und damit anti-adhäsiv wirkt (Takahashi et al., 1996). An Mausmakrophagen, die einen hochaffinen Rezeptor für Lumican (ein SLRP, das typischerweise KS einhält) besitzen, wurde ebenfalls ein anti-adhäsiver Effekt von Keratansulfat nachgewiesen. Solange das Molekül an Lumican gebunden war, konnte dieses *in vitro* nicht an den Rezeptor der Makrophagen binden. Erst nachdem Keratansulfat entfernt wurde, hefteten sich die Makrophagen an Oberflächen, die mit Lumican bedeckt waren (Funderburgh et al., 1997).

Die Biosynthese von Keratansulfat in Geweben variiert in Abhängigkeit von metabolischen und pathologischen Veränderungen sowie während der Embryonalentwicklung. Bei der Wundheilung und *in vitro* wird typischerweise kein KS produziert. Auch bei Entzündungen in der Cornea wird seine Synthese gehemmt. In kultivierten Keratozyten konnte gezeigt werden, dass die KS-Synthese durch TGF- β gehemmt (Funderburgh et al., 2001) und durch FGF-2 stimuliert wird (Long et al., 2000). In der oben erwähnten Studie an Mäusen mit Hirnverletzungen hingegen steigerte TGF- β die Produktion des Glykosaminoglykans (Yin et al., 2009). Während der embryonalen und fetalen Entwicklung wurde Keratansulfat in den Bereichen nachgewiesen, in denen Axone wachsen, z.B. im embryonalen Rückenmark der Ratte (Snow et al., 1990) oder bei neugeborenen Ratten in den Grenzbereichen zwischen verschiedenen funktionellen Einheiten des Gehirns, z.B. zwischen den Kernen des Thalamus (Geisert und Bidanset, 1993).

2 Zielstellung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mithilfe einer retrospektiven immunhistochemischen Studie papilläre, follikuläre und undifferenzierte Schilddrüsenkarzinome untersucht.

Folgende Fragestellungen sollten bearbeitet werden:

1. Unterscheiden sich die verschiedenen Schilddrüsenkarzinomtypen hinsichtlich des Vorkommens von Tenascin-C, Thrombospondin-1, Vitronektin, Osteopontin und Keratansulfat im Stroma und in den Tumorzellen?
2. Welche Unterschiede bestehen hinsichtlich des Vorkommens der Matrixbestandteile zwischen Stroma und Tumorzellen?

3 Material und Methodik

3.1 Herkunft der Präparate

Die untersuchten Präparate entstammten Resektaten aus der chirurgischen Universitätsklinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. med. H. Dralle) aus den Jahren 1995 bis 2006. Es standen Präparate von 82 Karzinomen zur Verfügung, die im Institut für Pathologie der MLU Halle-Wittenberg angefertigt, untersucht und befundet wurden. Es erfolgte die Reklassifizierung der Gewebeproben durch Prof. Dr. med. Hauptmann. Nach Anfertigung von Schnittpräparaten wurden diese immunhistochemisch angefärbt und lichtmikroskopisch beurteilt. Die Ermittlung der Patientendaten erfolgte retrospektiv aus dem Befundsystem (PAS, Computersystem Paschmann). Eine Übersicht über das Patientenkollektiv geben die Tabellen 3 bis 5 im Anhang. Als Kontrollgewebe wurden Präparate von fünf Knotenstrumen untersucht.

3.2 Immunhistochemische Färbung

3.2.1 Verwendete Antikörper

Zur immunhistochemischen Färbung der Präparate (Abbildung 2) und damit zum Nachweis der untersuchten Proteine wurden folgende Antikörper verwendet (Tabelle 6):

Tabelle 6: Verwendete Primärantikörper zur immunhistochemischen Färbung

Primärantikörper	Clone	Hersteller	Konzentration	Positivkontrolle
Monoklonal Maus anti-human Tenascin-C	49	novocastra	1:100	Tonsille, hochendotheliale Venolen und lobuläre Trabeculae
Monoklonal Maus anti-human Thrombospondin-1	8A6b	novocastra	1:50	Plazenta, Basalmembran des Synzytiotrophoblasten
Monoklonal Maus anti-human Vitronektin	BV2	Chemicon	1:2000	Hepatozyten
Monoklonal Maus anti-human Osteopontin	OP3N	novocastra	1:50	Gallenblase, Epithel
Monoklonal Maus anti-human Keratansulfat	5D4	Seikagaku Corporation	1:1000	Cornea, Epithel und Basalmembran

3.2.2 Anfertigung und Vorbehandlung der Schnitte

Das Ausgangsmaterial stellten Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebe dar. Aus diesen wurden mit Hilfe eines Mikrotoms 5 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Adhäsiv-Objektträger aufgebracht und anschließend bei 60 °C im Brutschrank getrocknet. Es folgte die Entparaffinierung der Präparate mittels Xylol und die Rehydratation in einer absteigenden Alkoholreihe (96 %, 70 %, 50 %) bis zum Aqua destillata. Danach wurden die Präparate zur Antigen-demaskierung vorbehandelt. Die Methoden unterschieden sich hier je nach Antikörper:

- 1) Die Präparate, die auf das Vorhandensein von Thrombospondin-1 (nachfolgend als Thrombospondin oder TSP bezeichnet), Vitronektin und Osteopontin untersucht wurden, erhielten mit Natriumzitat bei pH 6 eine Hitzebehandlung im 94°C heißen Wasserbad für 30 min, gefolgt von einer 20-minütigen Abkühlzeit.
- 2) Die zur Detektion von Keratansulfat vorgesehenen Schnitte wurden ebenso im Wasserbad erhitzt, jedoch bei pH 9.
- 3) Eine Enzymbehandlung der Präparate wurde zum Nachweis von Tenascin-C (nachfolgend als Tenascin oder TN bezeichnet) durchgeführt. Diese wurden für 10 min bei 37°C mit 0,5 %iger Pronase-E in Tris-Puffer mit HCl und CaCl₂ vorbehandelt.

3.2.3 Inkubation (Primär- und Sekundärantikörper)

Die immunhistochemische Färbung erfolgte nach der indirekten Avidin-Biotin-Komplexmethode. Zunächst wurden die Gewebsschnitte zur Blockierung der endogenen Peroxidase für 10 min mit 3 %igem Wasserstoffperoxid versetzt. Nach fünfminütigem Spülen mit PBS erfolgte die Proteinblockierung mit 100 µl Blocking Solution (Zytochem plus HRP Kit), um falsch positive Reaktionen zu vermeiden. Anschließend wurden die Primärantikörper mit jeweils 100 µl Antibody Diluent (Zytomed Systems) verdünnt und die Gewebsschnitte für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Präparate erneut mit PBS gewaschen und dann 15 min mit dem biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit PBS wurde für die Dauer von 15 min der Streptavidin-Biotin-Komplex hinzugegeben. Zum Abschluss erfolgte die nochmalige Spülung der Schnitte mit PBS sowie die Zugabe von Pufferlösung.

3.3.4 Färbung (Detektion)

Die Färbung der Präparate wurde durch Zugabe von Zwei-Komponenten-Farbe erzielt. Dazu kam ein Amino-Ethyl-Carbazol-Substrat-System (Labvision, Fremont, CA, USA) zum Einsatz, das für 10 min einwirkte. Nach Spülen in Wasser wurden abschließend die Zellkerne mit Hämalaun-Blau nach Mayer gegengefärbt und die Schnitte nach Spülen mit lauwarmem Wasser in Glycerin-Gelatine eingebettet.

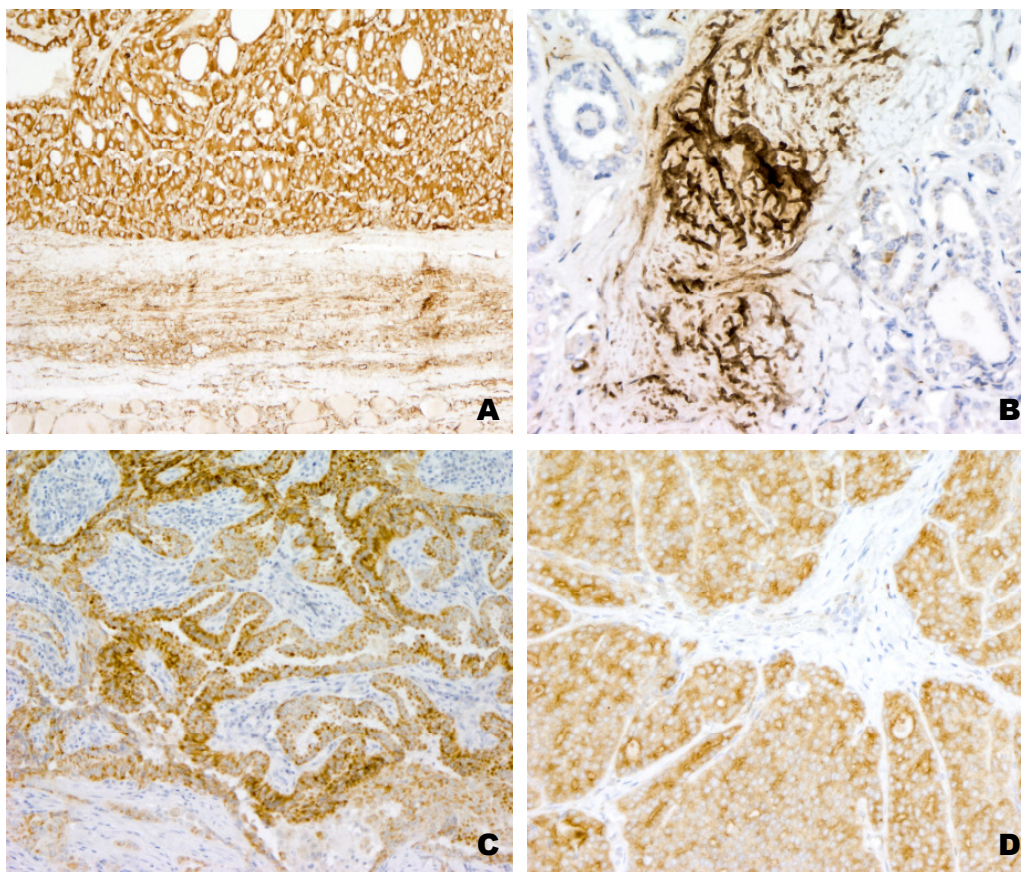


Abbildung 2: Exemplarische Abbildungen zur Reaktivität der verwendeten Antikörper

A Monoklonaler Maus-anti-human Tenascin-C-Antikörper, PTC, 100fach vergrößert
 B Monoklonaler Maus-anti-human Thrombospondin-1-Antikörper, PTC, 200fach vergrößert

C Monoklonaler Maus-anti-human-Vitronektin-Antikörper, PTC, 100fach vergrößert
 D Monoklonaler Maus-anti-human-Osteopontin-Antikörper, FTC, 200fach vergrößert

3.4 Histologische Auswertung

Die Färbungsintensität der Tumorzellen und des Stromas im Tumorbereich wurde lichtmikroskopisch beurteilt, wobei die Einteilung in die Färbegrade „keine“, „geringe“ und „starke Färbung“ erfolgte. Zusätzlich wurde die Verteilung der gefärbten Zellen bzw. Stromabereiche untersucht. Waren bis 50 % des Tumorgewebes gefärbt, entsprach dies der Verteilung „fokal“, bei 50 % und mehr der Verteilung „diffus“. Die Gruppen „keine Färbung“ und „fokal geringe“ Färbung wurden zur Gruppe „Nachweis negativ“, die übrigen Färb- und Verteilungsmuster „stark/fokal“, „gering/diffus“ und „stark/diffus“ zur Gruppe „Nachweis positiv“ zusammengefasst.

3.5 Statistische Auswertung

Die ermittelten Daten wurden mit Hilfe des Statistik-Programms SPSS 20 erfasst und ausgewertet. Die Beobachtungs- und Kollektivdaten wurden mittels diskriptiver Statistik analysiert. Zudem kamen statistische Tests zum Einsatz, wobei ein p-Wert $\leq 0,05$ als signifikant galt (wenn nicht anders angegeben).

Vor dem Vergleich der Mediane des Patientenalters in den Karzinomgruppen wurde zunächst die Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test und die Varianzhomogenität mit dem Levene-Test überprüft (Köhler et al., 2012). Bei Nachweis der Normalverteilung ($p > 0,05$, Kolmogorov-Smirnov-Test), aber fehlender Varianzhomogenität ($p = 0,001$, Levene-Test) wurde für die weitere Analyse ein nicht-parametrischer Test, der H-Test nach Kruskal und Wallis, eingesetzt. Damit war ein Vergleich der mittleren Ränge (Mediane) der drei Patientengruppen möglich. Um bei signifikantem Ergebnis die Unterschiede genauer zu spezifizieren, wurden anschließend paarweise Vergleiche der Gruppen mit dem U-Test nach Mann und Whitney durchgeführt (Weiß und Rzany, 2010). Da es sich hier um multiple Tests handelt und damit die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines α -Fehlers zunimmt, war eine Anpassung des Signifikanzniveaus mittels Bonferroni-Korrektur notwendig (Weiß und Rzany, 2013). Dazu wird α durch die Anzahl der durchgeführten paarweisen Vergleiche geteilt. Als signifikant galt hier dementsprechend ein p-Wert $\leq 0,0167$.

Um die Karzinomtypen hinsichtlich des Vorkommens eines Matrixmoleküls zu vergleichen, wurde der Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest angewendet bzw. in den Fällen, in denen die Testvoraussetzungen nicht erfüllt waren (in der zugrunde liegenden Kreuztabelle lag in mehr als 20 % der Zellen die erwartete Häufigkeit < 5) der Freeman-Halton-Test, eine Erweiterung des Exakten Tests nach Fisher für $k \times 2$ Kreuztabellen. Der Exakte Test nach Fisher ist nur für 2×2 Kreuztabellen anwendbar. Bei einem signifikanten Ergebnis erfolgte bei einer Fallzahl von $n < 60$ der paarweise Vergleich der Karzinomgruppen mit dem Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest mit Kontinuitätskorrektur (Bortz et al., 2008) bzw. mit dem Exakten Test nach Fisher (wenn in der zugrunde liegenden Kreuztabelle in mehr als 20 % der Zellen die erwartete Häufigkeit < 5 lag). Auch hier wurde das Signifikanzniveau durch die Bonferroni-Korrektur angepasst (Weiß und Rzany, 2013), so dass ein p-Wert $\leq 0,0167$ als signifikant galt.

Außerdem wurde untersucht, ob innerhalb einer Karzinomgruppe das Vorkommen zweier Matrixmoleküle voneinander abhängt. Dies erfolgte mit dem Exakten Test nach Fisher.

4 Ergebnisse

4.1 Auswertung der Kollektivdaten

4.1.1 Geschlechterverteilung

Zum untersuchten Kollektiv gehörten insgesamt 32 männliche (39 %) und 50 weibliche (61 %) Patienten. In allen Karzinomgruppen waren die Geschlechter ähnlich verteilt. Der höchste Frauenanteil lag jedoch in der Gruppe der PTC mit 63,3 % vor. Den höchsten Anteil männlicher Patienten wiesen die FTC mit 40,7 % auf (Tabelle 7).

Tabelle 7: Geschlechterverteilung nach Karzinomtypen

	Männlich		Weiblich	
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
UTC	10	40 %	15	60 %
FTC	11	40,7 %	16	59,3 %
PTC	11	36,7 %	19	63,3 %
Gesamt	32	39 %	50	61 %

4.1.2 Altersverteilung

Die Patienten, von denen die Karzinompräparate stammten, waren zum Diagnosezeitpunkt 7 bis 89 Jahre alt (Mittelwert: 59 Jahre, Median: 62,5 Jahre), meistens aber zwischen 45 und 75 Jahre. UTC-Patienten wiesen mit 67,6 Jahren den höchsten Altersdurchschnitt auf, PTC-Patienten, zu denen auch Kinder gehörten, den niedrigsten (49,1 Jahre).

Das Alter der Männer betrug im Mittel 59,2 Jahre. Davon waren die an einem UTC Erkrankten mit durchschnittlich 61,7 Jahren am ältesten, die an einem PTC Erkrankten mit im Mittel 55,2 Jahren am jüngsten. Bei Frauen lag das Durchschnittsalter mit 58,8 Jahren nur geringfügig unter dem der Männer, die Karzinomgruppen unterschieden sich bei ihnen jedoch stärker. So waren UTC-Patientinnen mit im Mittel 71,5 Jahren am ältesten, PTC-Patientinnen mit durchschnittlich 44,7 Jahren am jüngsten (Tabelle 8, Abbildung 3).

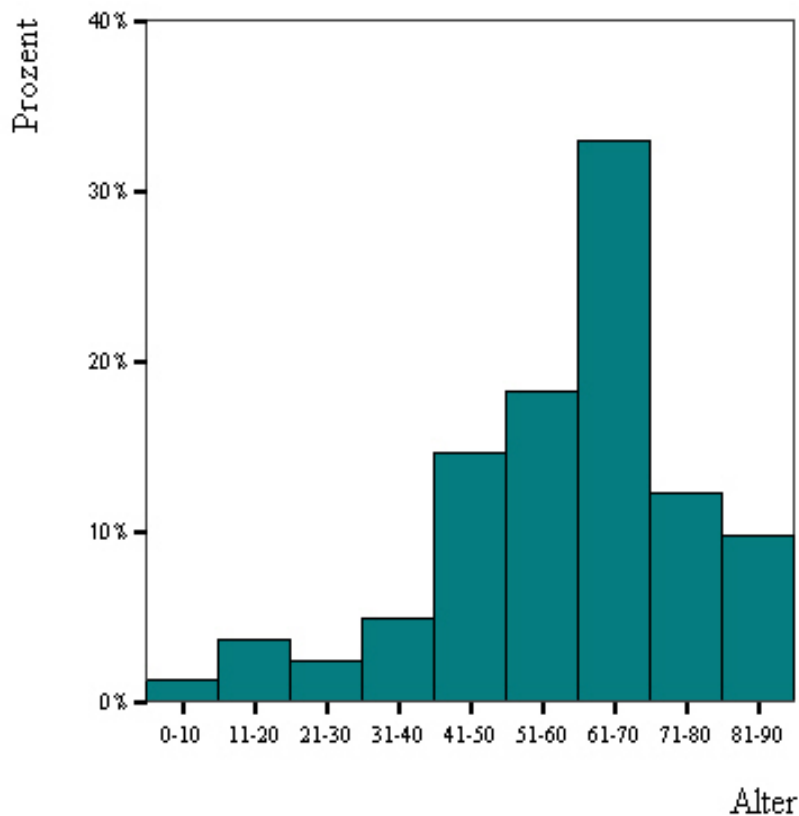


Abbildung 3: Altersverteilung der Patienten im Kollektiv

Das mediane Patientenalter unterschied sich signifikant zwischen den Karzinomgruppen ($p < 0,001$, Kruskal-Wallis-Test). Der paarweise Vergleich zeigte, dass die Patienten in der Gruppe der PTC im Median signifikant jünger waren als in der Gruppe der UTC ($p < 0,001$, Mann-Whitney-Test) und der FTC ($p = 0,010$, Mann-Whitney-Test). Die Mediane des Patientenalters der UTC und FTC unterschieden sich hingegen nicht signifikant ($p = 0,140$, Mann-Whitney-Test).

Tabelle 8: Altersverteilung nach Karzinomtypen und Geschlecht

	Mittelwert (Jahre)			Median (Jahre)
	Gesamt	Männer	Frauen	
UTC	67,6	61,7	71,5	68
FTC	62,4	61	63,6	61,5
PTC	49,1	55,2	44,7	52
Gesamt	59	59,2	58,8	62,5

4.1.3 Verteilung der TNM-Stadien

Da die untersuchten Karzinompräparate aus den Jahren 1995 bis 2006 stammten, kamen je nach Diagnosezeitpunkt unterschiedliche Auflagen der TNM-Klassifikation nach UICC zur Anwendung. Um eine Einheitlichkeit der Daten zu gewährleisten, wurden für diese Arbeit die TNM-Stadien anhand der 6. Auflage der Klassifikation (Tabelle 2) bestimmt.

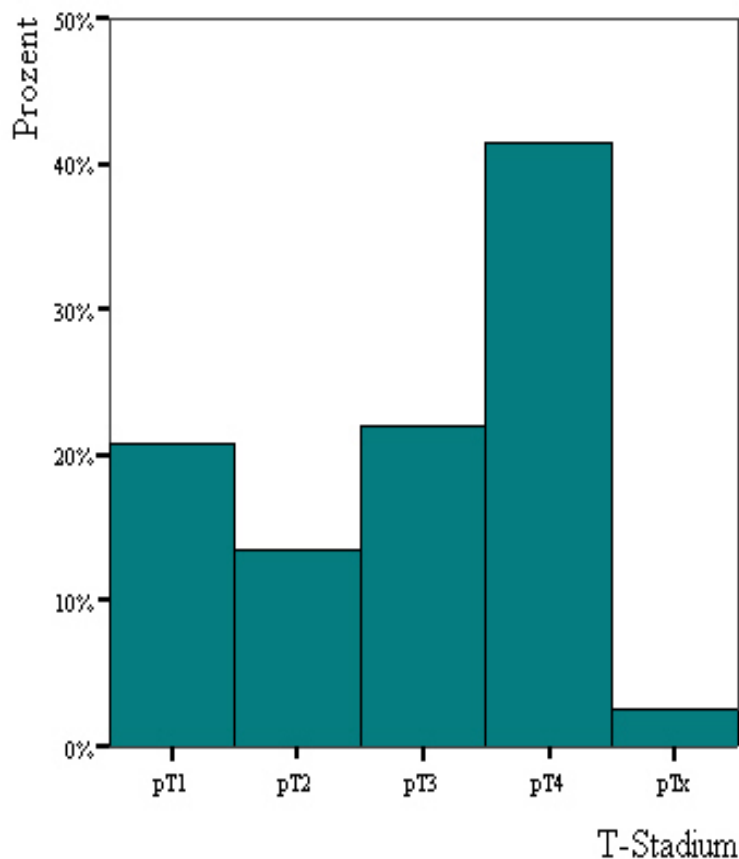


Abbildung 4: Verteilung der T-Stadien im Tumorkollektiv

Da UTC anhand dieser Klassifikation stets als pT4 eingestuft werden (Abbildung 4), befand sich die Mehrheit der Karzinome des Tumorkollektivs im Stadium pT4 (41,4 %). Am seltensten lag das Stadium pT2 vor (13,4 %). Die Stadien pT1 und pT3 kamen etwa gleich häufig vor (20,7 % bzw. 22 %). Die N- und M-Stadien waren außer bei den PTC zum Diagnosezeitpunkt meist unklar. Die Häufigkeit der TNM-Stadien unterschied sich zwischen den einzelnen Karzinomtypen (Tabelle 9).

Tabelle 9: Verteilung der TNM-Stadien im Tumorkollektiv

Stadium		UTC		FTC		PTC	
		Häufigkeit		Häufigkeit		Häufigkeit	
		absolut	relativ	absolut	relativ	absolut	relativ
T	pT1	0	0 %	5	18,5 %	12	40 %
	pT2	0	0 %	6	22,2 %	5	16,7 %
	pT3	0	0 %	10	37 %	8	26,7 %
	pT4	25	100 %	5	22,2 %	3	10 %
	unbekannt	0	0 %	0	0 %	2	6,7 %
N	N0	6	24 %	6	22,2 %	3	10 %
	N1	6	24 %	5	18,5 %	17	65,7 %
	Nx	13	52 %	16	59,3 %	8	26,7 %
	unbekannt	0	0 %	0	0 %	2	6,7 %
M	M0	1	4 %	1	3,7 %		
	M1	1	4 %	1	3,7 %		
	Mx	23	92 %	25	92,6 %	28	93,3 %
	unbekannt	0	0 %	0	0 %	2	6,7 %

Alle UTC wurden, wie bereits erwähnt, als Stadium pT4 eingestuft. Lymphknotenmetastasen waren bei 24 % bekannt, bei 24 % nicht. Bei der Mehrheit der UTC (52 %) lag zum Diagnosezeitpunkt jedoch ein unklares N-Stadium vor. Nur in einem Fall waren Fernmetastasen bekannt. FTC befanden sich am häufigsten (37 %) im Stadium pT3. Die übrigen T-Stadien waren mit 18,5 % bzw. 22,2 % etwa gleich häufig bei diesem Karzinomtyp vertreten. Bei mehr als der Hälfte der FTC war zum Diagnosezeitpunkt unklar, ob eine lymphogene Metastasierung vorliegt. Etwa ein Viertel wies keine Lymphknotenmetastasen auf. Nur bei zwei FTC war eine Fernmetastasierung bekannt. Die papillären Karzinome befanden sich zum Diagnosezeitpunkt am häufigsten im Stadium pT1 (40 %) und zu etwa einem Viertel im Stadium pT3. Nur drei Fälle entsprachen dem Stadium pT4. In der Mehrzahl der PTC (65,7 %) konnten lymphonodale Metastasen nachgewiesen werden, aber bei etwa einem Viertel war der N-Status unklar. Bei keinem PTC war zum Diagnosezeitpunkt eine Fernmetastasierung gesichert. Bei zwei der PTC konnten retrospektiv keine Angaben zum TNM-Stadium ermittelt werden.

Demnach lagen im untersuchten Tumorkollektiv FTC am häufigsten im Stadium pT3 und PTC am häufigsten im Stadium pT1 vor. UTC wurden stets als pT4 klassifiziert. Lymphknotenmetastasen waren am häufigsten bei PTC gesichert. Der M-Status war nur in Einzelfällen bekannt.

4.2 Vorkommen von Matrixbestandteilen in Strumae nodosae

Zunächst wurden Strumae nodosae (5 Fälle) untersucht, um einen allgemeinen Eindruck über das Vorkommen der ausgewählten Matrixbestandteile in benignen Veränderungen der Schilddrüse zu erlangen.

Thrombospondin und Keratansulfat waren in Knotenstrumen nicht nachzuweisen. Tenascin kam nicht in Thyreozyten vor, jedoch im Stroma in 3 von 5 Fällen (60 %), jeweils fokal verteilt mit starker Expression. Vitronektin konnte in denselben drei Präparaten im Stroma nachgewiesen werden, davon in zwei Fällen in diffuser Verteilung. In den Schilddrüsenzellen kam Vitronektin nicht vor. Osteopontin war hingegen in den Zellen eines Präparates enthalten (Tabelle 10).

Tabelle 10: Vorkommen von Matrixbestandteilen in Strumae nodosae

		Gesamtfallzahl n = 5	Nachweis negativ		Nachweis positiv		
		Intensität	keine	gering		stark	
		Verteilung		fokal	diffus	fokal	diffus
TN	Tumorzellen	Fallzahl	5	0	0	0	0
		Prozent	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
			100 %		0 %		
	Stroma	Fallzahl	2	0	0	3	0
		Prozent	40 %	0 %	0 %	60 %	0 %
			40 %		60 %		
TSP	Tumorzellen	Fallzahl	5	0	0	0	0
		Prozent	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
			100 %		0 %		
	Stroma	Fallzahl	5	0	0	0	0
		Prozent	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
			100 %		0 %		
VN	Tumorzellen	Fallzahl	5	0	0	0	0
		Prozent	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
			100 %		0 %		
	Stroma	Fallzahl	1	1	1	1	1
		Prozent	20 %	20 %	20 %	20 %	20 %
			40 %		60 %		
OPN	Tumorzellen	Fallzahl	3	1	1	0	0
		Prozent	60 %	20 %	20 %	0 %	0 %
			80 %		20 %		
	Stroma	Fallzahl	5	0	0	0	0
		Prozent	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
			100 %		0 %		
KS	Tumorzellen	Fallzahl	5	0	0	0	0
		Prozent	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
			100 %		0 %		
	Stroma	Fallzahl	5	0	0	0	0
		Prozent	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
			100 %		0 %		

4.3 Vorkommen von Matrixbestandteilen in UTC

4.3.1 Beobachtungsdaten

Die Tumorzellen der UTC enthielten am häufigsten Tenascin (Abbildung 5) und Osteopontin (Abbildung 7). Osteopontin war hier in 15 von 25 Fällen (60 %) nachweisbar, davon in 11 Fällen mit starker Expression, meist in fokaler Verteilung (9 von 11). Tenascin kam in 10 von 25 Fällen (40 %) in den Zellen vor. Auch hier war überwiegend fokal eine starke Expression zu verzeichnen (8 von 10). Etwas weniger häufig als Tenascin waren Thrombospondin und Vitronektin (Abbildung 6) zu finden, etwa in jedem dritten Präparat intrazellulär (9 bzw. 8 von 25), bei Thrombospondin stets, bei Vitronektin meist in fokaler Verteilung. In 7 von 25 Fällen (28 %) konnten fokal keratansulfathaltige Tumorzellen detektiert werden.

Die Mehrheit der UTC-Präparate enthielten Tenascin im Stroma (22 von 25, 88 %), bei etwa einem Viertel der Fälle diffus verteilt (6 von 25). In 14 von 25 Fällen (56 %) war Thrombospondin im Stroma zu finden. Vitronektin kam in 12 von 25 Fällen (48 %) extrazellulär vor. Osteopontin war nur in 1 von 25 Fällen (4 %) im Stroma enthalten. Keratansulfat kam dort nicht vor (Tabelle 11, Abbildung 8).

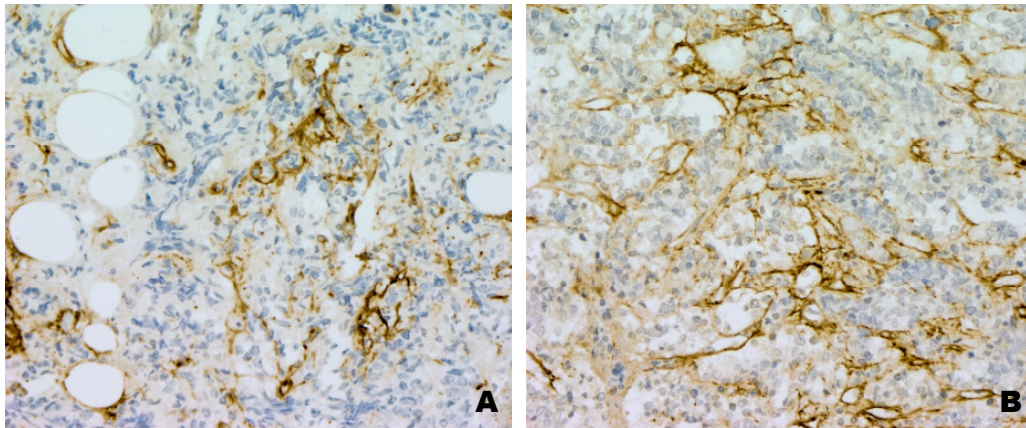


Abbildung 5: Exemplarische Abbildungen der Tenascin-Expression in UTC
 A diffus starke Expression im Stroma, diffus geringe Expression in Tumorzellen, 200fach vergrößert
 B diffus starke Expression im Stroma, diffus geringe Expression in Tumorzellen, 200fach vergrößert

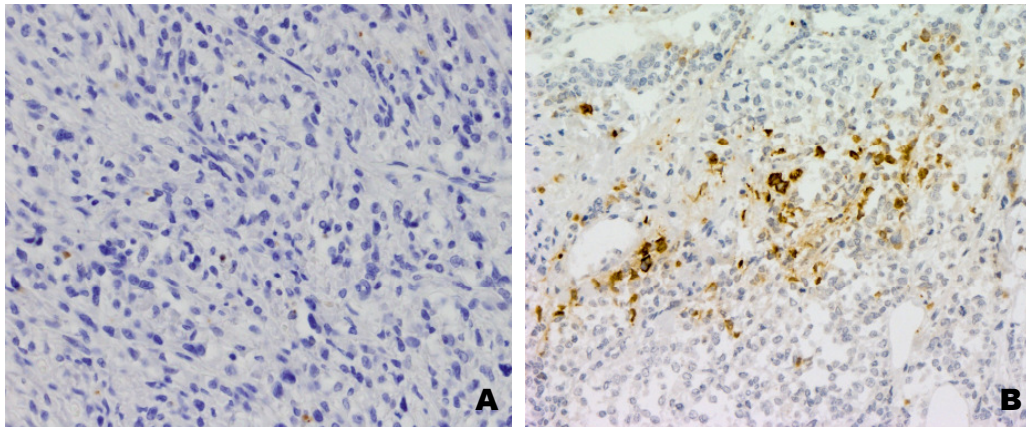


Abbildung 6: Exemplarische Abbildungen der Vitronectin-Expression in UTC
 A fehlende Expression, 200fach vergrößert
 B fokal starke Expression in Tumorzellen, 200fach vergrößert

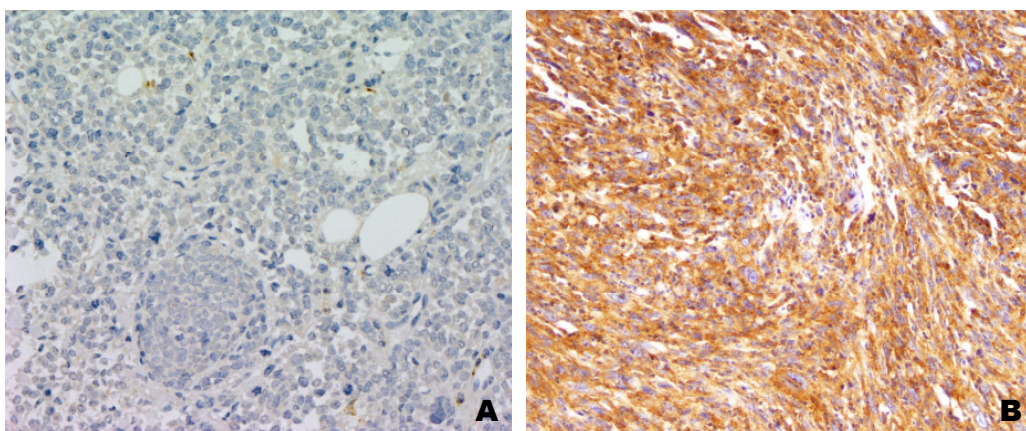


Abbildung 7: Exemplarische Abbildungen der Osteopontin-Expression in UTC
 A fehlende Expression, 200fach vergrößert
 B diffus starke Expression in Stroma und Tumorzellen, 200fach vergrößert

Tabelle 11: Vorkommen von Matrixbestandteilen in UTC

UTC	Gesamtfallzahl n = 25		Nachweis negativ		Nachweis positiv		
	Intensität		keine	gering		stark	
	Verteilung			fokal	diffus	fokal	diffus
TN	Tumorzellen	Fallzahl	9	6	0	8	2
		Prozent	36 %	24 %	0 %	32 %	8 %
			60 %		40 %		
	Stroma	Fallzahl	0	3	0	16	6
		Prozent	0 %	12 %	0 %	64 %	24 %
			12 %		88 %		
TSP	Tumorzellen	Fallzahl	12	4	0	9	0
		Prozent	48 %	16 %	0 %	36 %	0 %
			64 %		36 %		
	Stroma	Fallzahl	9	2	1	12	1
		Prozent	36 %	8 %	4 %	48 %	4 %
			44 %		56 %		
VN	Tumorzellen	Fallzahl	12	5	1	7	0
		Prozent	48 %	20 %	4 %	28 %	0 %
			68 %		32 %		
	Stroma	Fallzahl	12	1	0	12	0
		Prozent	48 %	4 %	0 %	48 %	0 %
			52 %		48 %		
OPN	Tumorzellen	Fallzahl	7	3	4	9	2
		Prozent	28 %	12 %	16 %	36 %	8 %
			40 %		60 %		
	Stroma	Fallzahl	23	1	0	1	0
		Prozent	92 %	4 %	0 %	4 %	0 %
			96 %		4 %		
KS	Tumorzellen	Fallzahl	18	0	0	7	0
		Prozent	72 %	0 %	0 %	28 %	0 %
			72 %		28 %		
	Stroma	Fallzahl	24	1	0	0	0
		Prozent	96 %	4 %	0 %	0 %	0 %
			100 %		0 %		

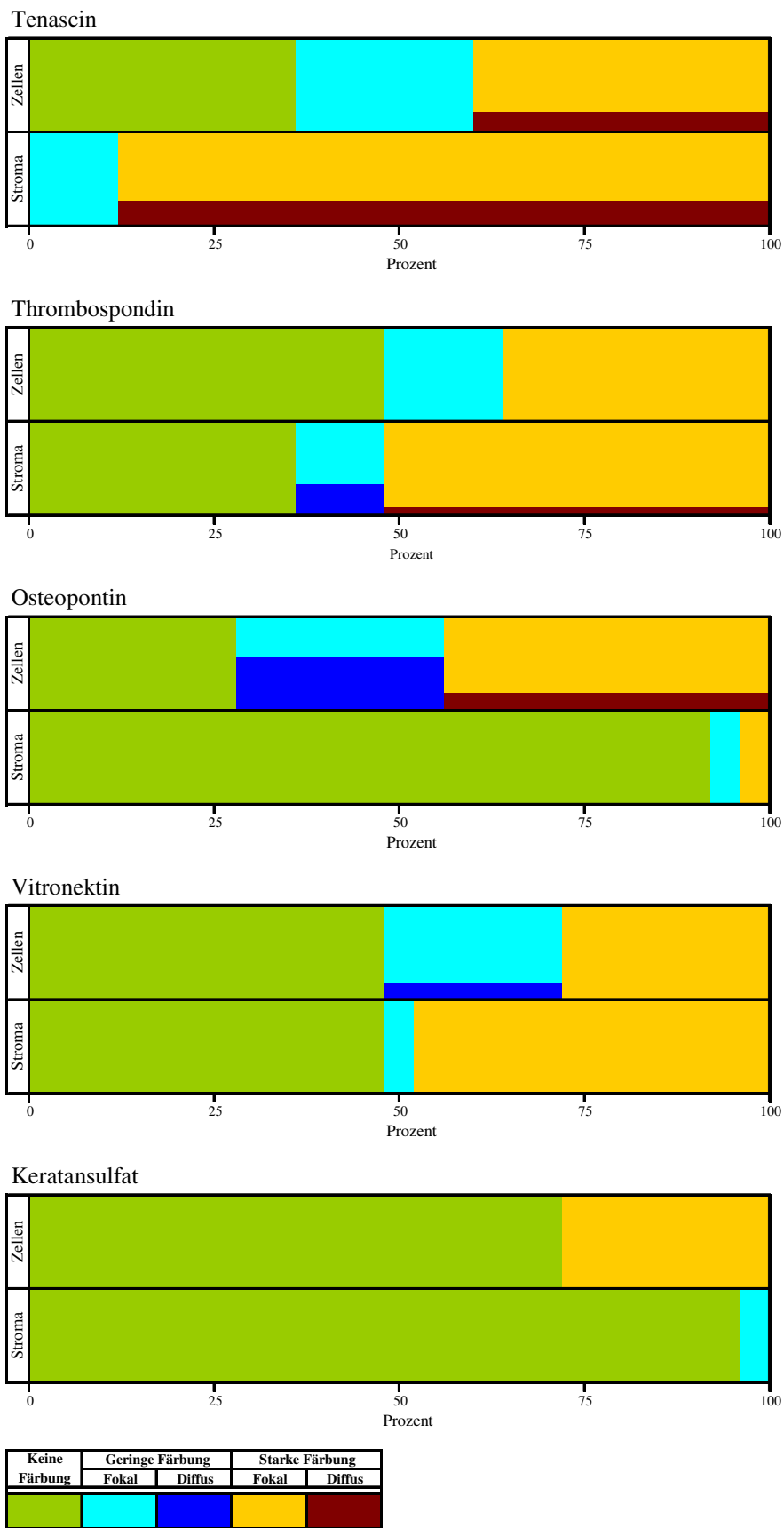


Abbildung 8 : Vorkommen von Matrixbestandteilen in UTC

4.3.2 Analyse der Beobachtungsdaten

a) Zusammenhänge zwischen intra- und extrazellulärem Vorkommen von Matrixbestandteilen

Bei UTC fanden sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen intra- und extrazellulärem Vorkommen von Matrixbestandteilen. Tenascin war in 10 Fällen in den Tumorzellen und in 22 im Stroma enthalten, wobei in 10 Fällen das Protein gleichzeitig intrazellulär und im Stroma exprimiert wurde ($p = 0,250$, Exakter Test nach Fisher). Thrombospondin kam in 9 Fällen in den Tumorzellen und in 14 extrazellulär vor, gleichzeitig in beiden Lokalisationen in 5 Fällen ($p = 1,000$, Exakter Test nach Fisher). Vitronektin war in 9 Präparaten in den Tumorzellen und in 12 im Stroma nachzuweisen. Eine paralleles Vorkommen intra- und extrazellulär lag jedoch lediglich in 3 Fällen vor ($p = 0,673$, Exakter Test nach Fisher). Osteopontin wurde bei 15 Fällen mit Expression in den Tumorzellen nur in einem Fall gleichzeitig im Stroma gefunden, dem einzigen mit extrazellulärem Nachweis des Proteins ($p = 1,000$, Exakter Test nach Fisher). Keratansulfat kam im Stroma nicht vor.

b) Gemeinsames Vorkommen verschiedener Matrixbestandteile in UTC

Auffällig war das gleichzeitige Vorkommen von Tenascin und Osteopontin in den Tumorzellen (Tabelle 12): In 10 Fällen wurde Tenascin und in 15 Osteopontin intrazellulär nachgewiesen, wobei in 9 beide Proteine gleichzeitig in den Zellen enthalten waren. Andererseits fehlte in 15 Präparaten Tenascin und in 10 Osteopontin in den Zellen. Beide Proteine waren in 9 Präparaten nicht intrazellulär zu finden. Dieser Zusammenhang war statistisch signifikant ($p = 0,018$, Exakter Test nach Fisher).

Tabelle 12: Zusammenhang der intrazellulären Expression von TN und OPN in UTC

UTC	OPN-Nachweis Zellen			Exakter Test nach Fisher	
		-	+		gesamt
TN-Nachweis Zellen	-	9	6	15	p = 0,018
	+	1	9	10	
	gesamt	10	15	25	

- = Nachweis negativ, + = Nachweis positiv

Darüber hinaus bestanden keine signifikanten Zusammenhänge, auch wenn bestimmte Kombinationen von Matrixbestandteilen jeweils mindestens in etwa einem Drittel der Fälle ($n = 8$) auftraten. Gleichzeitig nachgewiesen wurden:

-OPN in den Tumorzellen (Gesamtzahl positiver Fälle: $n = 15$) und TN im Stroma ($n = 22$) in 14 Fällen ($p = 0,543$, Exakter Test nach Fisher)

-OPN in den Tumorzellen ($n = 15$) und TSP im Stroma ($n = 14$) in 10 Fällen ($p = 0,241$, Exakter Test nach Fisher)

-TN in den Tumorzellen ($n = 10$) und TSP im Stroma ($n = 14$) in 8 Fällen ($p = 0,099$, Exakter Test nach Fisher)

-TSP in den Tumorzellen ($n = 9$) und TN im Stroma ($n = 22$) in 8 Fällen ($p = 1,000$, Exakter Test nach Fisher)

-VN in den Tumorzellen ($n = 8$) und TN im Stroma ($n = 22$) in 8 Fällen ($p = 0,527$, Exakter Test nach Fisher).

Die übrigen Kombinationen waren in weniger als einem Drittel der Fälle zu finden.

4.4 Vorkommen von Matrixbestandteilen in FTC

4.4.1 Beobachtungsdaten

Osteopontin (Abbildung 12) konnte, auch im Vergleich mit den anderen untersuchten Matrixbestandteilen, in den Tumorzellen der FTC am häufigsten nachgewiesen werden (22 von 27, 81,5 %). Insgesamt 18 Fälle zeigten dabei eine diffuse Verteilung der OPN-positiven Zellen, wobei in 10 Fällen (37 %) eine geringe Expression, in 8 Fällen (29,6 %) eine starke Expression bestand. Vitronektin (Abbildung 11) war intrazellulär das zweithäufigste Molekül und wurde in 11 von 27 Fällen (40,7 %) exprimiert. Jeweils in etwa der Hälfte der Fälle zeigte sich hier eine diffuse bzw. fokale Verteilung der VN-positiven Tumorzellen. Thrombospondin (Abbildung 10) kam in 10 von 27 Fällen (37 %) intrazellulär vor, Tenascin (Abbildung 9) in 8 von 27 Fällen (29,6 %) und Keratansulfat in 5 von 27 Fällen (18,5 %).

Das Stroma der FTC enthielt am häufigsten Tenascin (18 von 27, 66,7 %), wobei eine starke Expression in fokaler Verteilung in 15 von 27 Fällen (55,6 %), in diffuser Verteilung in 3 von 27 Fällen (11,1 %) zu finden war. Vitronektin war im Stroma am zweithäufigsten nachweisbar (14 von 27, 51,9 %), stets in fokaler Verteilung. Keratansulfat kam hier häufiger vor (8 von 27, 29,6 %) als Thrombospondin (5 von 27, 18,5 %). Osteopontin war im Stroma der FTC mit Ausnahme eines Präparates nicht nachzuweisen (Tabelle 13, Abbildung 13).

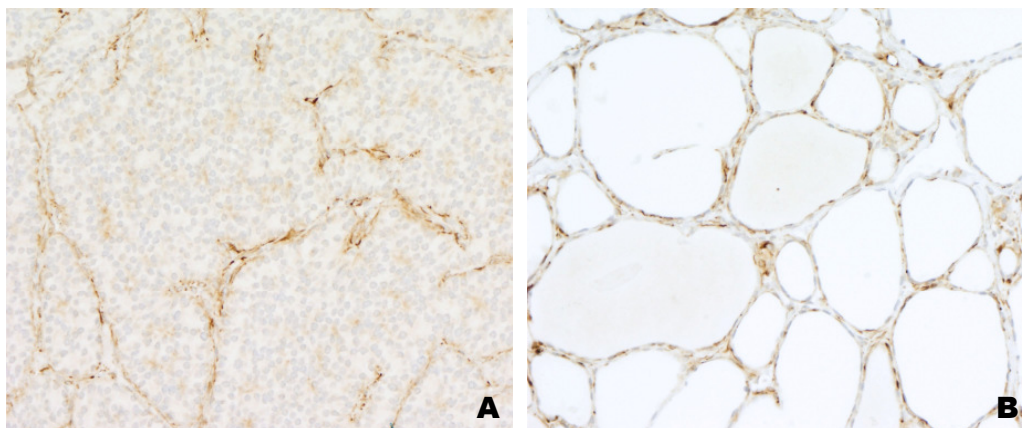


Abbildung 9: Exemplarische Abbildungen der Tenascin-Expression in FTC
 A diffus starke Expression im Stroma, diffus geringe Expression in Tumorzellen, 200fach vergrößert
 B diffus starke Expression in Tumorzellen, 200fach vergrößert

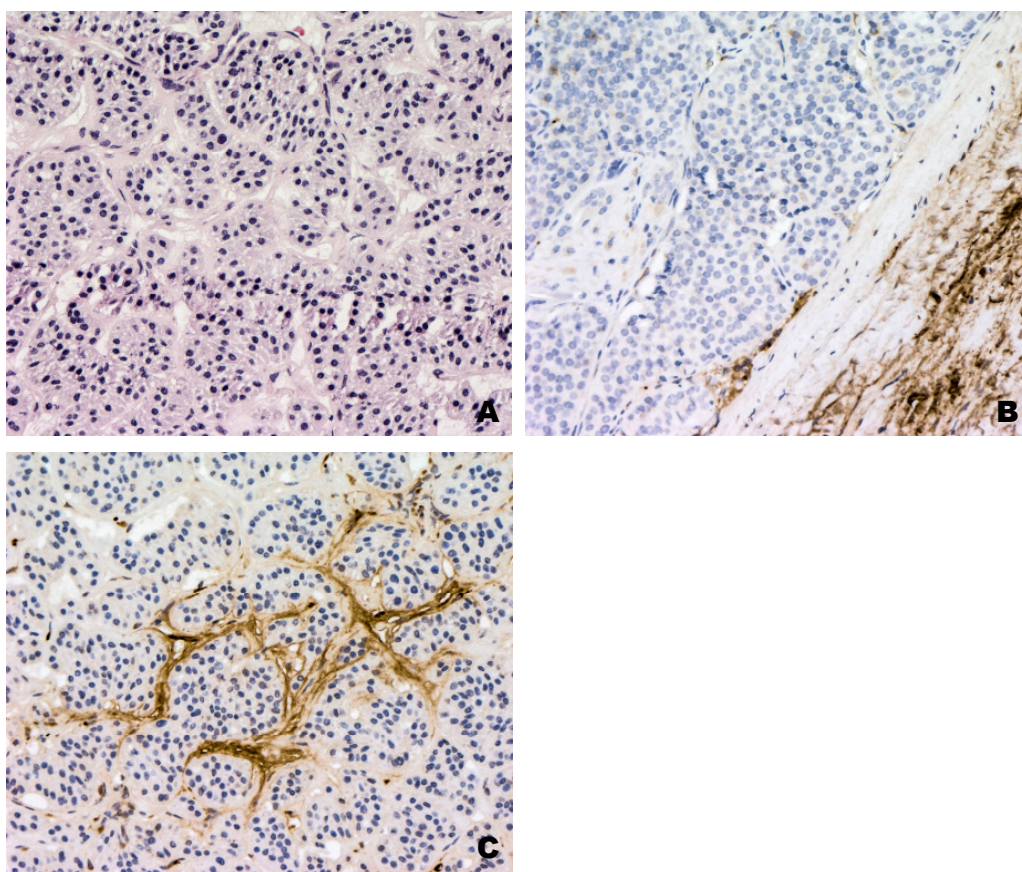


Abbildung 10: Exemplarische Abbildungen der Thrombospondin-Expression in FTC
 A fehlende Expression, 200fach vergrößert
 B fokale geringe Expression in Tumorzellen, 200fach vergrößert
 C fokale starke Expression im Stroma, diffus geringe Expression in Tumorzellen, 200fach vergrößert

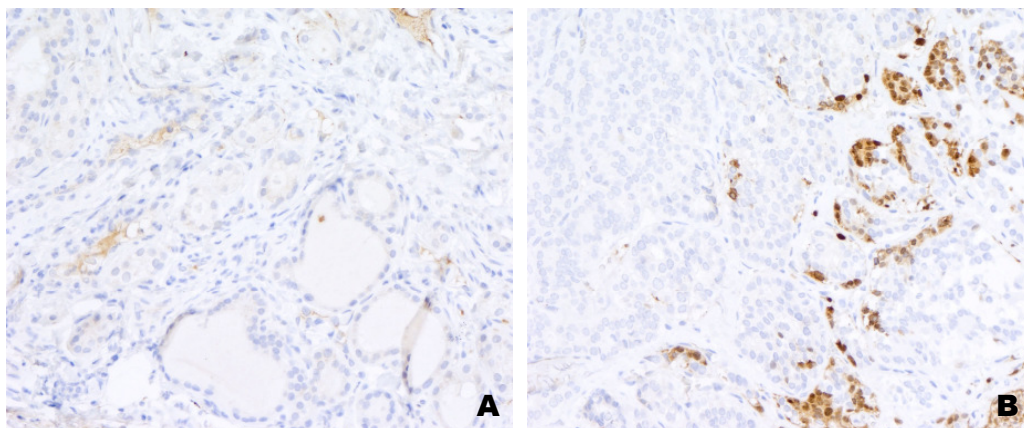


Abbildung 11: Exemplarische Abbildungen der Vitronectin-Expression in FTC
A fokal geringe Expression im Stroma, 200fach vergrößert
B fokal starke Expression in Tumorzellen, 200fach vergrößert

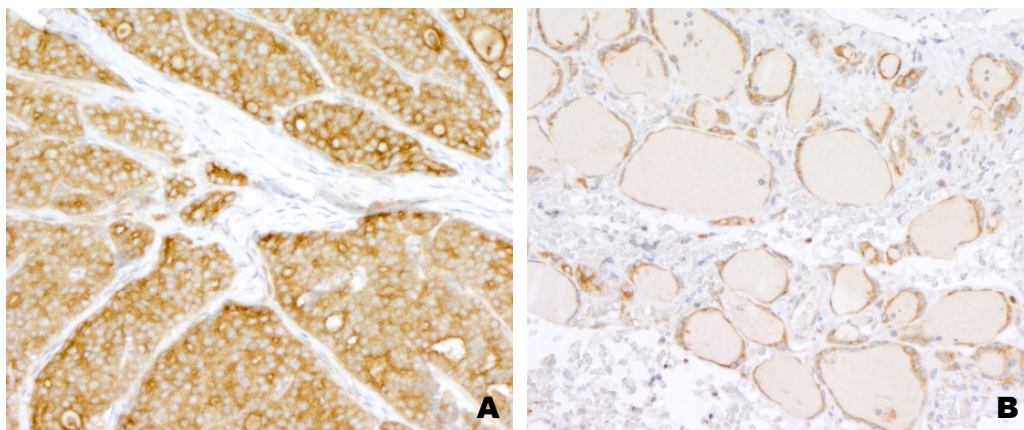


Abbildung 12: Exemplarische Abbildungen der Osteopontin-Expression in FTC
A diffus starke Expression in Tumorzellen, 200fach vergrößert
B diffus starke Expression in Tumorzellen, 200fach vergrößert

Tabelle 13: Vorkommen von Matrixbestandteilen in FTC

FTC	Gesamtfallzahl n = 27		Nachweis negativ		Nachweis positiv		
	Intensität		keine	gering		stark	
	Verteilung			fokal	diffus	fokal	diffus
TN	Tumorzellen	Fallzahl	12	7	6	0	2
		Prozent	44,4 %	25,9 %	22,2 %	0%	7,4 %
			70,4 %		29,6 %		
	Stroma	Fallzahl	6	3	0	15	3
		Prozent	22,2 %	11,1 %	0 %	55,6 %	11,1 %
			33,3 %		66,7 %		
TSP	Tumorzellen	Fallzahl	12	5	6	1	3
		Prozent	44,4 %	18,5 %	22,2 %	3,7 %	11,1 %
			63 %		37 %		
	Stroma	Fallzahl	21	1	0	5	0
		Prozent	77,8 %	3,7 %	0 %	18,5 %	0 %
			81,5 %		18,5 %		
VN	Tumorzellen	Fallzahl	10	6	4	6	1
		Prozent	37 %	22,2 %	14,8 %	22,2 %	3,7 %
			59,3 %		40,7 %		
	Stroma	Fallzahl	8	5	0	14	0
		Prozent	29,6 %	18,5 %	0 %	51,9 %	0 %
			48,1 %		51,9 %		
OPN	Tumorzellen	Fallzahl	2	3	10	4	8
		Prozent	7,4 %	11,1 %	37 %	14,8 %	29,6 %
			18,5 %		81,5 %		
	Stroma	Fallzahl	26	0	0	1	0
		Prozent	96,3 %	0 %	0 %	3,7 %	0 %
			96,3 %		3,7 %		
KS	Tumorzellen	Fallzahl	19	3	1	3	1
		Prozent	70,4 %	11,1 %	3,7 %	11,1 %	3,7 %
			81,5 %		18,5 %		
	Stroma	Fallzahl	17	2	0	8	0
		Prozent	63 %	7,4 %	0 %	29,6 %	0 %
			70,4 %		29,6 %		

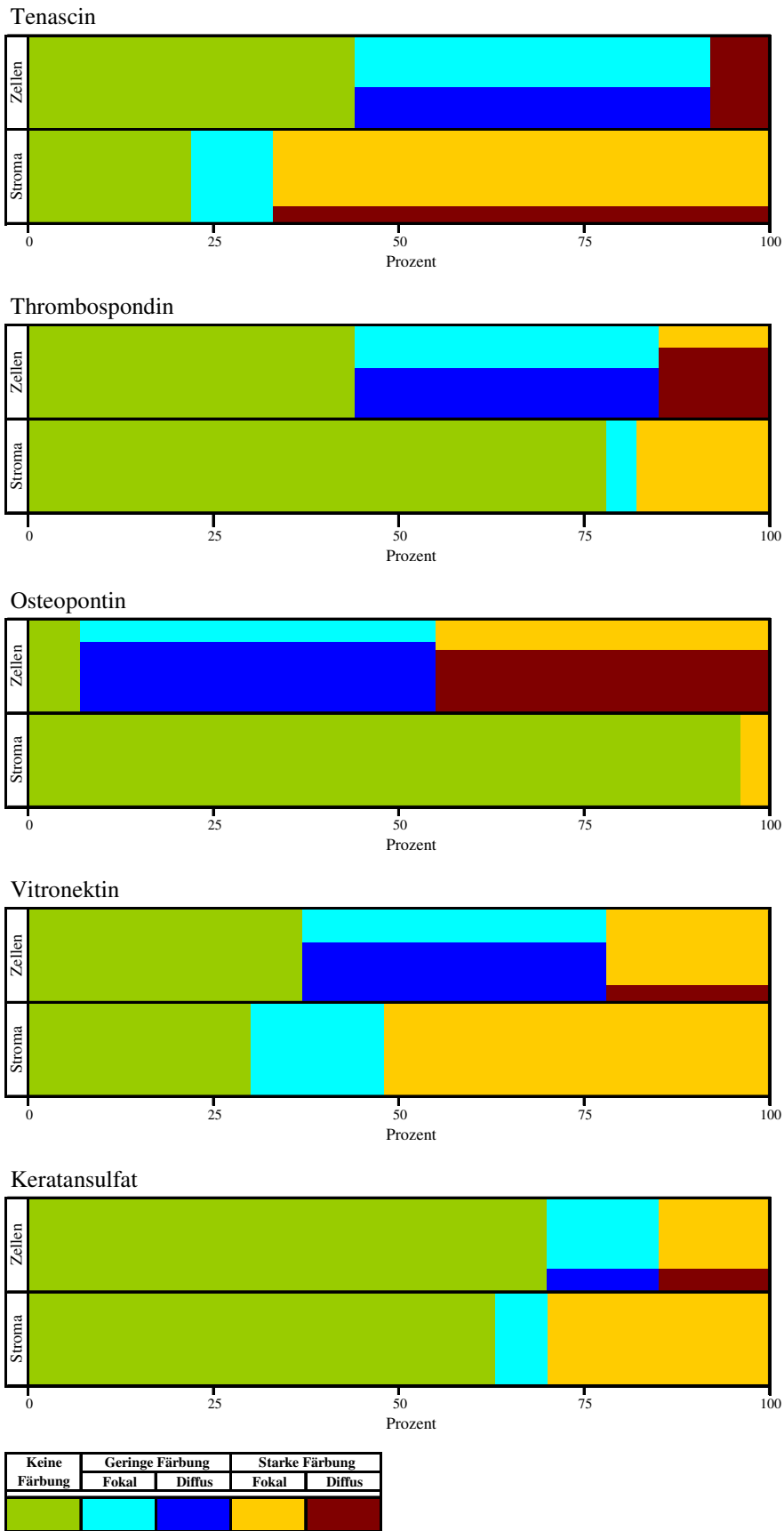


Abbildung 13: Vorkommen von Matrixbestandteilen in FTC

4.4.2 Analyse der Beobachtungsdaten

a) Zusammenhänge zwischen intra- und extrazellulärem Vorkommen von Matrixbestandteilen

Im Vergleich von intra- und extrazellulärem Vorkommen von Matrixbestandteilen wurde für Keratansulfat ein signifikanter Zusammenhang ermittelt (Tabelle 14): In 5 Fällen kam es in den Tumorzellen und in 8 im Stroma vor, in 4 sowohl intra- als auch extrazellulär. Umgekehrt fehlte Keratansulfat in den Tumorzellen in 22 und im Stroma in 19 Präparaten, wobei es in 18 weder intra- noch extrazellulär nachweisbar war ($p = 0,017$, Exakter Test nach Fisher). Keratansulfat fehlte also meist in den Tumorzellen und im Stroma.

Tabelle 14: Zusammenhang zwischen intra- und extrazellulärem Vorkommen von KS in FTC

FTC	KS-Nachweis Stroma			Exakter Test nach Fisher
	-	+	gesamt	
KS-Nachweis Zellen	-	18	4	22
	+	1	4	5
	gesamt	19	8	27

- = Nachweis negativ, + = Nachweis positiv

Für die übrigen Matrixbestandteile ergab sich keine signifikanter Zusammenhang zwischen ihrem intra- und extrazellulären Vorkommen. Tenascin war in 8 Fällen in den Tumorzellen und in 18 im Stroma enthalten, davon in 4 gleichzeitig in beiden Lokalisationen ($p = 0,375$, Exakter Test nach Fisher). Thrombospondin war in 10 Fällen intra- und in 5 extrazellulär nachweisbar, aber nur in einem gleichzeitig in den Zellen und im Stroma ($p = 0,621$, Exakter Test nach Fisher). Vitronektin wurde in Tumorzellen in 11 und im Stroma in 14 Präparaten exprimiert, parallel intra- und extrazellulär in 5 Fällen ($p = 0,704$, Exakter Test nach Fisher). Osteopontin kam in 22 Fällen in den Zellen und in einem Fall im Stroma vor, hier aber auch gleichzeitig intrazellulär ($p = 1,000$, Exakter Test nach Fisher).

b) Gemeinsames Vorkommen verschiedener Matrixbestandteile

Hinsichtlich des Vorkommens verschiedener Matrixbestandteile konnten bei FTC statistisch signifikante Zusammenhänge ermittelt werden. Es bestand eine Assoziation zwischen dem intrazellulären Nachweis von Tenascin und Vitronektin (Tabelle 15): 11 Fälle enthielten Vitronektin und 8 Tenascin in den Tumorzellen, wobei in 6 beide Proteine gleichzeitig intrazellulär

vorkamen. Tenascin fehlte hingegen in 19 und Vitronektin in 16 Fällen, beide Proteine in 14 Fällen ($p = 0,033$, Exakter Test nach Fisher).

Tabelle 15: Zusammenhang der intrazellulären Expression von TN und VN in FTC

FTC	VN-Nachweis Zellen			Exakter Test nach Fisher	
		-	+		gesamt
TN-Nachweis Zellen	-	14	5	19	p = 0,033
	+	2	6	8	
	gesamt	16	11	27	

- = Nachweis negativ, + = Nachweis positiv

Auch das Vorkommen von Tenascin und Thrombospondin in den Tumorzellen hing bei follikulären Schilddrüsenkarzinomen zusammen (Tabelle 16): Bei 8 TN-positiven und 10 TSP-positiven Präparaten wurden beide Proteine in 7 Fällen parallel in den Tumorzellen exprimiert. 17 Präparate enthielten intrazellulär kein Thrombospondin und 19 kein Tenascin, wobei in 16 beide Proteine in den Tumorzellen fehlten ($p = 0,001$, Exakter Test nach Fisher).

Tabelle 16: Zusammenhang der intrazellulären Expression von TN und TSP in FTC

FTC	TSP-Nachweis Zellen			Exakter Test nach Fisher	
		-	+		gesamt
TN-Nachweis Zellen	-	16	3	19	p = 0,001
	+	1	7	8	
	gesamt	17	10	27	

- = Nachweis negativ, + = Nachweis positiv

Weitere statistisch signifikante Zusammenhänge ergaben sich bei FTC nicht. Analog zu den UTC traten aber bestimmte Kombinationen von Matrixbestandteilen jeweils mindestens in etwa einem Drittel der Fälle ($n = 9$) auf. Gleichzeitig nachgewiesen wurden:

-OPN in den Tumorzellen (Gesamtzahl positiver Fälle: $n = 22$) und TN im Stroma ($n = 18$) in 14 Fällen ($p = 0,636$, Exakter Test nach Fisher)

-TSP in den Tumorzellen ($n = 10$) und OPN in den Tumorzellen ($n = 22$) in 10 Fällen ($p = 0,124$, Exakter Test nach Fisher)

-OPN in den Tumorzellen ($n = 22$) und VN im Stroma ($n = 14$) in 10 Fällen ($p = 0,326$, Exakter Test nach Fisher)

-VN in den Tumorzellen ($n = 11$) und OPN in den Tumorzellen ($n = 22$) in 9 Fällen ($p = 1,000$, Exakter Test nach Fisher)

Die übrigen Kombinationen machten jeweils weniger als ein Drittel der Fälle aus.

4.5 Vorkommen von Matrixbestandteilen in PTC

4.5.1 Beobachtungsdaten

Wie bei den zuvor beschriebenen Karzinomtypen kam Osteopontin (Abbildung 17) am häufigsten in den Tumorzellen vor (28 von 30, 93,3 %). In 20 von 28 Fällen wurde Osteopontin stark in den Zellen exprimiert, jeweils in 10 Präparaten fokal bzw. diffus verteilt. Eine Besonderheit der PTC war im Vergleich zu den anderen Entitäten das häufigere Vorkommen von Keratansulfat in den Tumorzellen (14 von 30, 46,7 %), überwiegend fokal verteilt mit starker Expression (9 Fälle). Vitronektin (Abbildung 16) war hier in 13 von 30 Fällen (43,3%) nachweisbar. Tenascin (Abbildung 14) und Thrombospondin (Abbildung 15) kamen jeweils bei weniger als einem Drittel der PTC in den Tumorzellen vor (9 bzw. 6 von 30).

29 von 30 Fällen enthielten Tenascin im Stroma (96,7 %), wobei stets eine starke Expression zu verzeichnen war. Die TN-positiven Areale waren in 22 Fällen fokal verteilt, in 7 Fällen diffus. Keratansulfat konnte im Stroma der PTC in 23 von 30 Fällen (76,7 %) nachgewiesen werden, meist in fokaler Verteilung (17 Fälle). Vitronektin kam in weniger als der Hälfte der Fälle im Stroma vor (11 von 30, 36,7 %). Thrombospondin und Osteopontin wurden nur in sehr wenigen Fällen im Stroma exprimiert, Thrombospondin in 1 von 30 Fällen (3,3 %), Osteopontin in 2 von 30 Fällen (6,7 %; Tabelle 17, Abbildung 18).

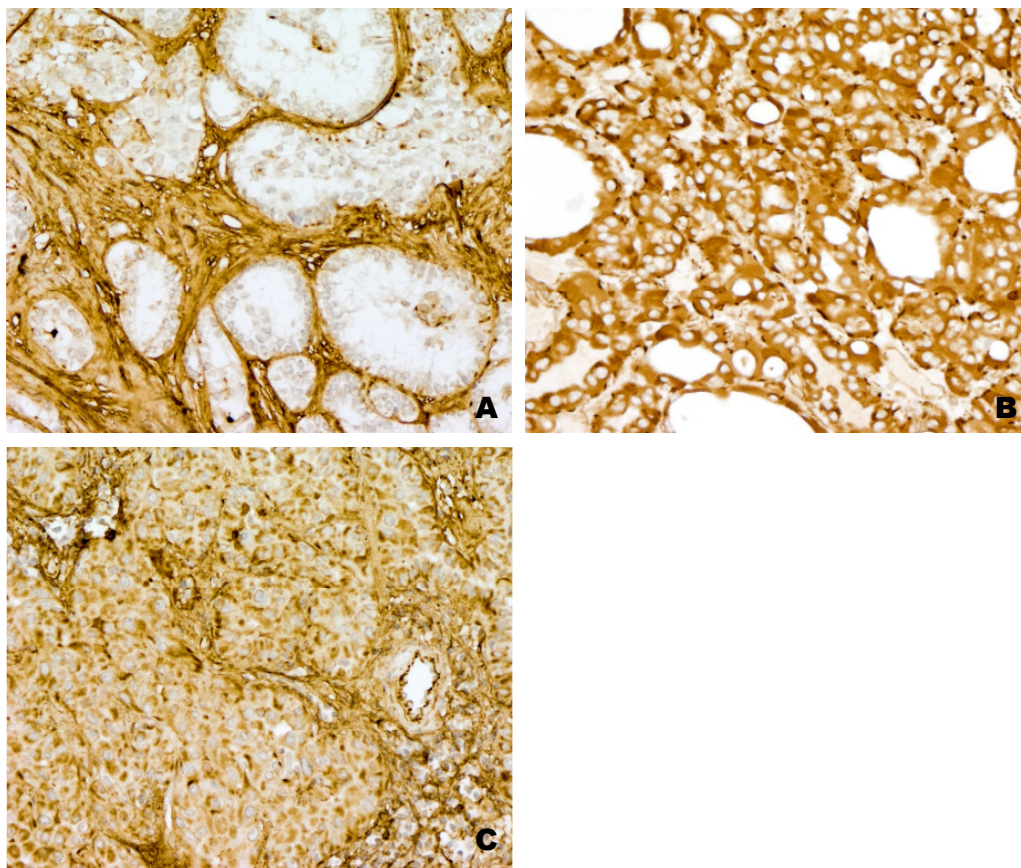


Abbildung 14: Exemplarische Abbildungen der Tenascin-Expression in PTC
 A diffus starke Expression im Stroma, 200fach vergrößert
 B diffus starke Expression in Tumorzellen, 200fach vergrößert
 C diffus starke Expression in Stroma und Tumorzellen, 200fach vergrößert

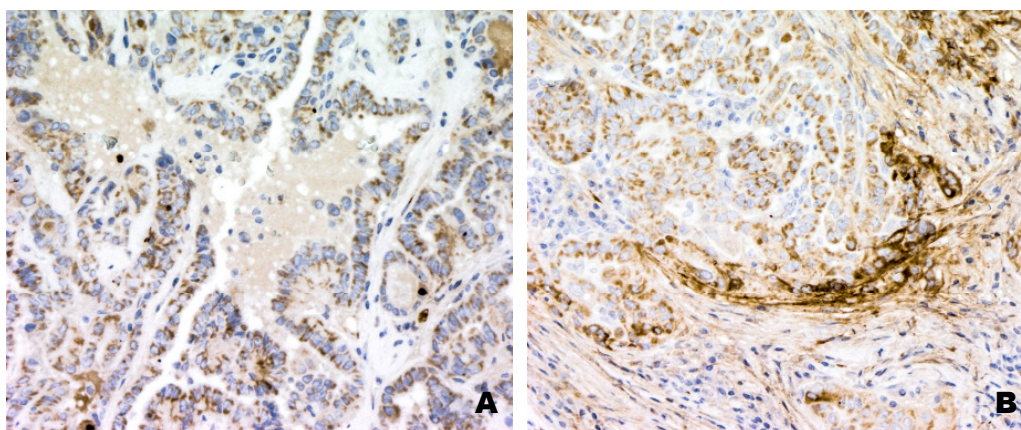


Abbildung 15: Exemplarische Abbildungen der Thrombospondin-Expression in PTC
 A diffus starke Expression in Tumorzellen, 200fach vergrößert
 B diffus geringe und fokale starke Expression im Stroma, diffuse starke Expression in Tumorzellen, 200fach vergrößert

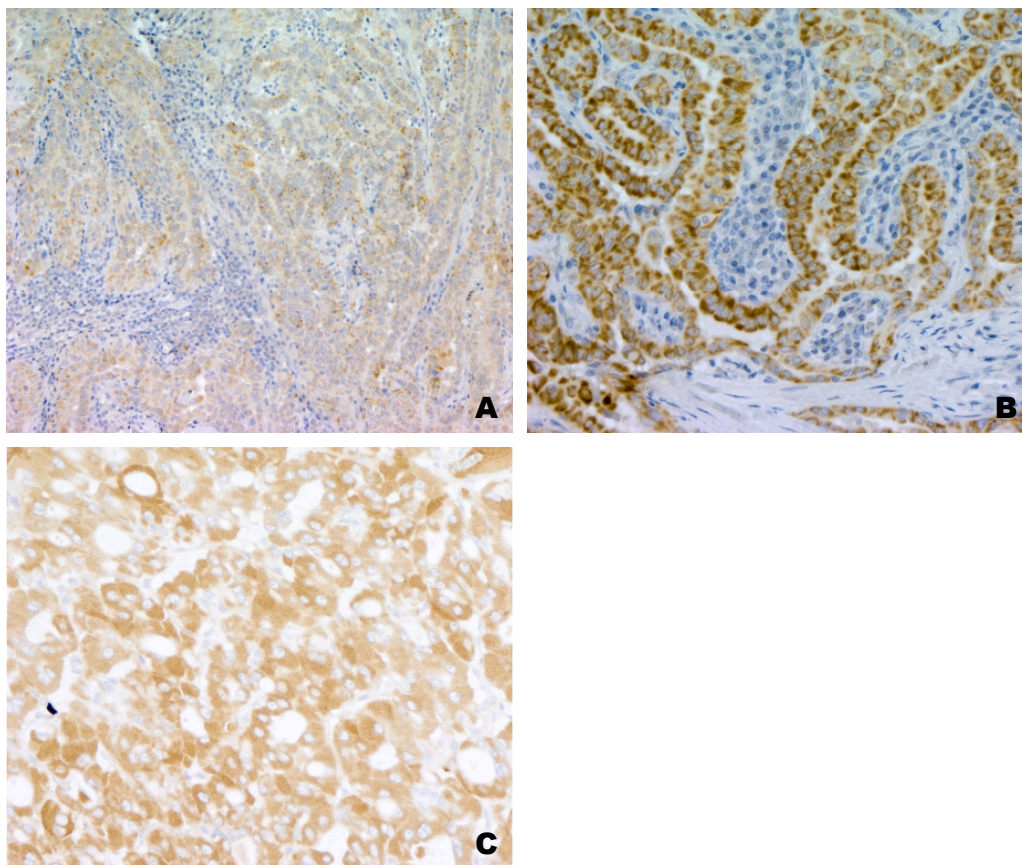


Abbildung 16: Exemplarische Abbildungen der Vitronektin-Expression in PTC
 A diffus geringe Expression in Tumorzellen, 100fach vergrößert
 B diffus starke Expression in Tumorzellen, 200fach vergrößert
 C diffus starke Expression in Tumorzellen, 200fach vergrößert

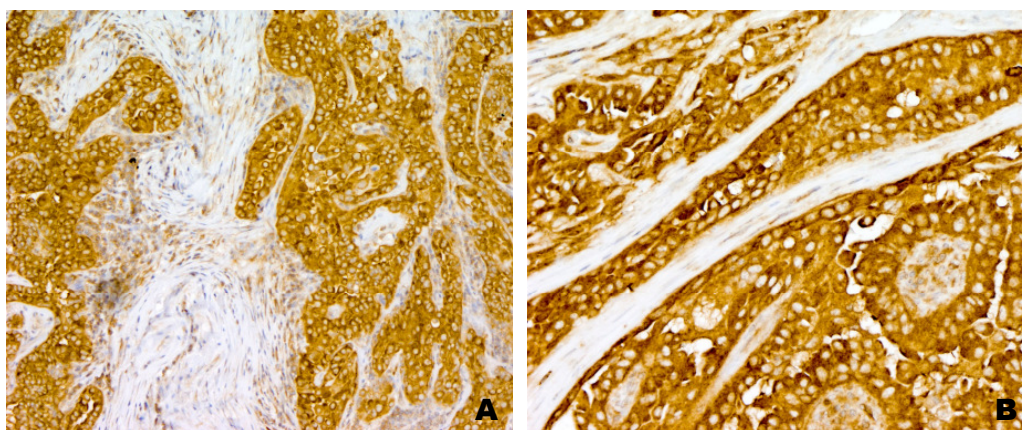


Abbildung 17: Exemplarische Abbildungen der Osteopontin-Expression in PTC
 A diffus geringe Expression im Stroma, diffus starke Expression in Tumorzellen, 100fach vergrößert
 B diffus starke Expression in Tumorzellen, 200fach vergrößert

Tabelle 17: Vorkommen von Matrixbestandteilen in PTC

PTC	Gesamtfallzahl n = 30		Nachweis negativ		Nachweis positiv		
	Intensität		keine	gering		stark	
	Verteilung			fokal	diffus	fokal	diffus
TN	Tumorzellen	Fallzahl	20	1	5	1	3
		Prozent	66,7 %	3,3 %	16,7 %	3,3 %	10 %
			70 %		30 %		
	Stroma	Fallzahl	1	0	0	22	7
		Prozent	3,3 %	0 %	0 %	73,3 %	23,3 %
			3,3 %		96,7 %		
TSP	Tumorzellen	Fallzahl	21	3	5	1	0
		Prozent	70 %	10 %	16,7 %	3,3 %	0 %
			80 %		20 %		
	Stroma	Fallzahl	26	3	0	1	0
		Prozent	86,7 %	10 %	0 %	3,3 %	0 %
			96,7 %		3,3 %		
VN	Tumorzellen	Fallzahl	15	2	2	9	2
		Prozent	50 %	6,7 %	6,7 %	30 %	6,7 %
			56,7 %		43,3 %		
	Stroma	Fallzahl	14	5	0	10	1
		Prozent	46,7 %	16,7 %	0 %	33,3 %	3,3 %
			63,3 %		36,7 %		
OPN	Tumorzellen	Fallzahl	0	2	8	10	10
		Prozent	0 %	6,7 %	26,7 %	33,3 %	33,3 %
			6,7 %		93,3 %		
	Stroma	Fallzahl	26	2	0	2	0
		Prozent	86,7 %	6,7 %	0 %	6,7 %	0 %
			93,3 %		6,7 %		
KS	Tumorzellen	Fallzahl	8	8	3	9	2
		Prozent	26,7 %	26,7 %	10 %	30 %	6,7 %
			53,3 %		46,7 %		
	Stroma	Fallzahl	7	0	1	17	5
		Prozent	23,3 %	0 %	3,3 %	56,7 %	16,7 %
			23,3 %		76,7 %		

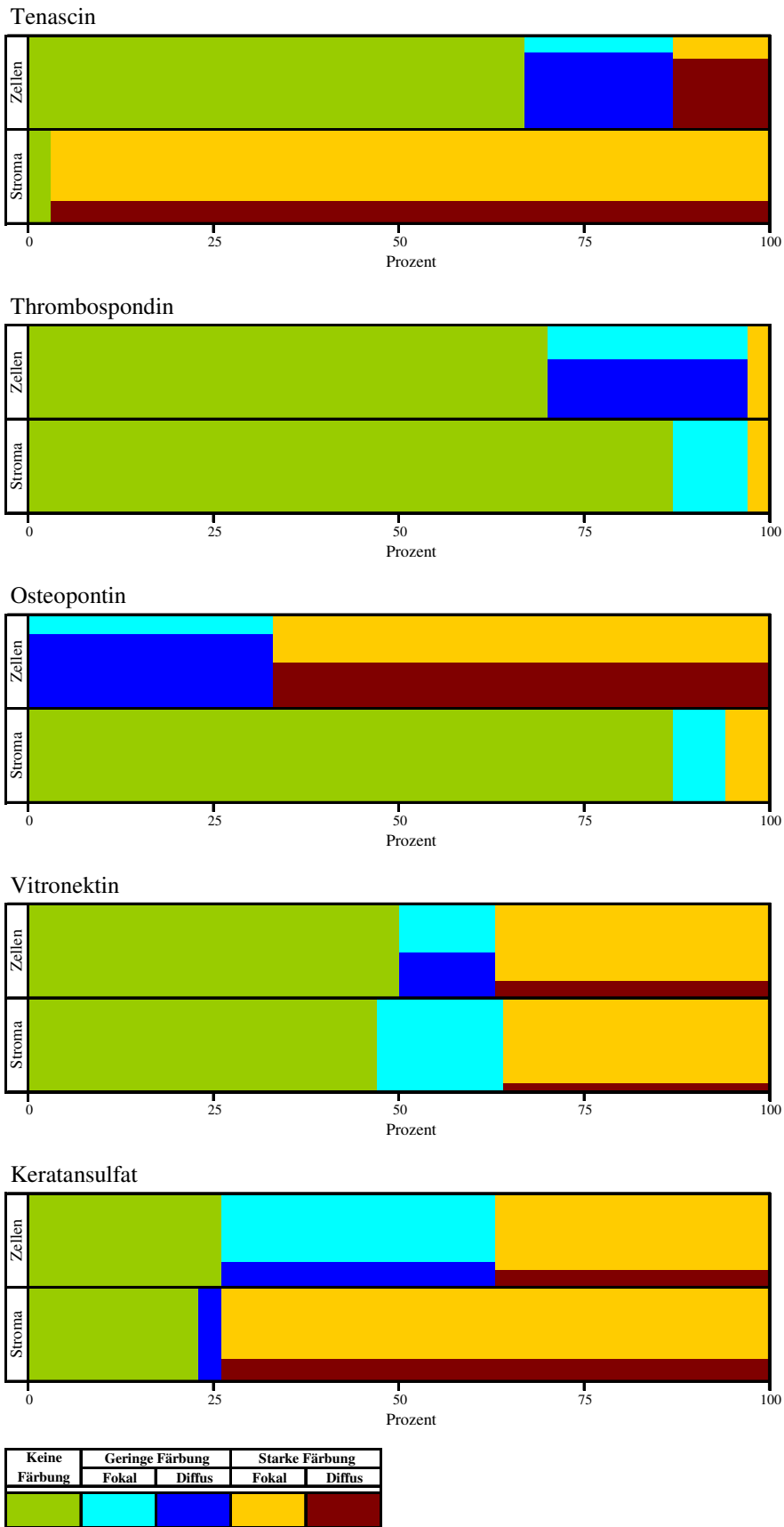


Abbildung 18: Vorkommen von Matrixbestandteilen in PTC

4.5.2 Analyse der Beobachtungsdaten

a) Zusammenhänge zwischen intra- und extrazellulärem Vorkommen von Matrixbestandteilen

Bei PTC bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem intra- und extrazellulären Nachweis eines Matrixbestandteils. Tenascin kam in 9 Präparaten in den Tumorzellen und in 29 im Stroma vor, davon in 9 gleichzeitig in beiden Lokalisationen ($p = 1,000$, Exakter Test nach Fisher). Thrombospondin war in 6 Fällen intrazellulär enthalten, aber nur in einem (dem einzigen mit extrazellulärem Nachweis) gleichzeitig in den Zellen und im Stroma ($p = 0,200$, Exakter Test nach Fisher). Vitronektin ließ sich in 13 Präparaten intra- und in 11 extrazellulär nachweisen, wovon 7 das Protein gleichzeitig in beiden Lokalisationen enthielten ($p = 0,132$, Exakter Test nach Fisher). Osteopontin war in 22 Fällen in den Tumorzellen und in 2 im Stroma zu finden, wobei es in diesen beiden parallel intra- und extrazellulär exprimiert wurde ($p = 1,000$, Exakter Test nach Fisher). Keratansulfat kam in 14 Fällen intra- und in 23 extrazellulär vor, davon in 12 gleichzeitig in den Tumorzellen und im Stroma ($p = 0,399$, Exakter Test nach Fisher).

b) Gemeinsames Vorkommen verschiedener Matrixbestandteile in PTC

Wie schon bei den FTC bestand ein Zusammenhang zwischen der Expression von Tenascin und Thrombospondin in den Tumorzellen (Tabelle 18): 9 Präparate enthielten TN-positive und 6 TSP-positive Zellen, wobei in 5 beide Proteine gleichzeitig intrazellulär vorkamen. In 21 Fällen wurde intrazellulär kein Tenascin und in 24 kein Thrombospondin nachgewiesen. In 20 Fällen waren beide Proteine nicht in den Tumorzellen enthalten ($p = 0,005$, Exakter Test nach Fisher).

Tabelle 18: Zusammenhang der intrazellulären Expression von TN und TSP in PTC

PTC	TSP-Nachweis Zellen			Exakter Test nach Fisher	
	-	+	gesamt		
TN-Nachweis Zellen	-	20	1	21	p = 0,005
	+	4	5	9	
	gesamt	24	6	30	

- = Nachweis negativ, + = Nachweis positiv

Auch das Vorkommen von Osteopontin in den Tumorzellen und von Tenascin im Stroma war miteinander assoziiert (Tabelle 19), wenngleich statistische Signifikanz verfehlt wurde. Die Proteine waren allerdings in fast allen Fällen intra- bzw. extrazellulär zu finden (in 29 TN im Stroma, in 28 OPN in den Zellen) und kamen in 28 Fällen gleichzeitig in den genannten Lokalisationen vor ($p = 0,067$, Exakter Test nach Fisher).

Tabelle 19: Zusammenhang der Expression von OPN in den Zellen und TN im Stroma in PTC

PTC	TN-Nachweis Stroma			Exakter Test nach Fisher
	-	+	gesamt	
OPN-Nachweis Zellen	-	1	1	2
	+	0	28	28
	gesamt	1	29	30

p = 0,067

- = Nachweis negativ, + = Nachweis positiv

Einen signifikanten Zusammenhang wies das Vorkommen von Thrombospondin in den Tumorzellen und Osteopontin im Stroma auf (Tabelle 20). In 6 Fällen enthielten die Zellen Thrombospondin und in 2 das Stroma Osteopontin. In 2 Fällen waren gleichzeitig beide Proteine intra- bzw. extrazellulär nachweisbar. In 29 Fällen fehlte Thrombospondin in den Zellen und in 28 Osteopontin im Stroma, beide intra- bzw. extrazellulär in 24 Fällen ($p = 0,034$, Exakter Test nach Fisher). Die Proteine wurden somit in den genannten Lokalisationen meist nicht exprimiert.

Tabelle 20: Zusammenhang der Expression von TSP in den Zellen und OPN im Stroma in PTC

PTC	OPN-Nachweis Stroma			Exakter Test nach Fisher
	-	+	gesamt	
TSP-Nachweis Zellen	-	24	0	24
	+	4	2	6
	gesamt	28	2	30

p = 0,034

- = Nachweis negativ, + = Nachweis positiv

Ähnliches gilt für den Nachweis von Tenascin in den Tumorzellen und Osteopontin im Stroma (Tabelle 21), allerdings ohne dass eine statistisch signifikante Korrelation bestand. Tenascin wurde in 9 Fällen intrazellulär und Osteopontin in 2 extrazellulär nachgewiesen, wobei in 2 Fällen gleichzeitig Tenascin in den Zellen und Osteopontin im Stroma enthalten waren. Die Proteine fehlten intra- bzw. extrazellulär in 21 bzw. 28 Präparaten, davon in 21 beide in den genannten Lokalisationen ($p = 0,083$, Exakter Test nach Fischer).

Tabelle 21: Zusammenhang der Expression von TN in den Zellen und OPN im Stroma in PTC

PTC	OPN-Nachweis Stroma			Exakter Test nach Fisher	
	-	+	gesamt		
TN-Nachweis Zellen	-	21	0	21	p = 0,083
	+	7	2	9	
	gesamt	28	2	30	

- = Nachweis negativ, + = Nachweis positiv

Wie bei den anderen Tumorentitäten traten weitere Kombinationen von Matrixbestandteilen in jeweils mindestens einem Drittel der Fälle (n = 10) auf, aber ohne dass signifikante Zusammenhänge bestanden. Gleichzeitig nachgewiesen wurden:

-OPN in den Tumorzellen (Gesamtzahl positiver Fälle: n = 28) und KS im Stroma (n = 23) in 21 Fällen (p = 1,000, Exakter Test nach Fisher).

-OPN in den Tumorzellen (n = 28) und KS in den Tumorzellen (n = 14) in 14 Fällen (p = 0,485, Exakter Test nach Fisher)

-KS in den Tumorzellen (n = 14) und TN im Stroma (n = 29) in 14 Fällen (p = 1,000, Exakter Test nach Fisher).

-VN in den Tumorzellen (n = 13) und TN im Stroma (n = 29) in 13 Fällen (p = 1,000, Exakter Test nach Fisher)

-VN in den Tumorzellen (n = 13) und OPN in den Tumorzellen (n = 28) in 12 Fällen (p = 1,000, Exakter Test nach Fisher)

-VN in den Tumorzellen (n = 13) und KS im Stroma (n = 23) in 10 Fällen (p = 1,000, Exakter Test nach Fisher)

-OPN in den Tumorzellen (n = 28) und VN im Stroma (n = 11) in 10 Fällen (p = 1,000, Exakter Test nach Fisher)

Hier ist zu beachten, dass in nahezu allen Präparaten Osteopontin in den Tumorzellen und Tenascin im Stroma vorkamen (28 bzw. 29 von 30 Fällen). Aus diesem Grund lässt sich im Vergleich mit den beiden anderen Karzinomtypen in PTC häufiger ein paralleles Vorkommen von Matrixbestandteilen beobachten.

4.6 Vergleich des Vorkommens von Matrixbestandteilen in UTC, FTC und PTC

a) Tenascin

Die Häufigkeiten der Tenascin-Expression unterschieden sich nur wenig zwischen den untersuchten Karzinomtypen. In UTC war Tenascin in 10 von 25 Fällen (40 %) in den Tumorzellen enthalten, in FTC in 8 von 27 Fällen (29,6 %) und in PTC in 9 von 30 Fällen (30 %). Statistisch signifikante Unterschiede konnten hier nicht nachgewiesen werden ($p = 0,665$, Chi-Quadrat-Test).

Im Stroma wurde Tenascin in UTC in 22 von 25 Fällen (88 %) exprimiert, in FTC in 18 von 27 Fällen (66,7 %) und in PTC in 29 von 30 Fällen (96,7 %). Damit lag die Häufigkeit des Tenascin-Vorkommens im Stroma bei allen drei Entitäten deutlich über 50 %. In der statistischen Auswertung ergaben sich aber signifikante Unterschiede ($p = 0,010$, Freeman-Halton-Test). In den paarweisen Vergleichen der Karzinomgruppen zeigte sich, dass PTC signifikant häufiger Tenascin im Stroma enthalten als FTC ($p = 0,004$, Exakter Test nach Fisher), während im Vergleich zu UTC kein signifikanter Unterschied bestand ($p = 0,320$, Exakter Test nach Fisher). Auch UTC und FTC unterschieden sich hinsichtlich der Tenascin-Expression im Stroma nicht signifikant ($p = 0,135$, Chi-Quadrat-Test).

b) Thrombospondin

Thrombospondin kam in UTC in 9 von 25 Fällen (36 %) in den Tumorzellen vor, in FTC in 10 von 27 Fällen (37 %) und in PTC in 6 von 30 Fällen (20 %). Die Häufigkeiten unterschieden sich nicht signifikant ($p = 0,292$, Chi-Quadrat-Test).

Im Gegensatz dazu konnten extrazellulär signifikante Unterschiede ermittelt werden ($p < 0,001$, Chi-Quadrat-Test). Bei einer Expression von Thrombospondin im Stroma der UTC in 14 von 25 Fällen (56 %), in FTC in 5 von 27 Fällen (18,5 %) und in PTC in 1 von 30 Fällen (3,3 %) enthielten UTC in den paarweisen Vergleichen signifikant häufiger Thrombospondin im Stroma als PTC ($p < 0,001$, Chi-Quadrat-Test) und FTC ($p = 0,012$, Chi-Quadrat-Test). Zwischen FTC und PTC bestand hingegen kein signifikanter Unterschied ($p = 0,091$, Exakter Test nach Fisher).

c) Vitronektin

In den Tumorzellen wurde Vitronektin bei UTC in 8 von 25 Fällen (32 %), bei FTC in 11 von 27 Fällen (40,7 %) und bei PTC in 13 von 30 Fällen (43,3 %) nachgewiesen. Die ermittelten Häufigkeiten unterschieden sich nicht signifikant ($p = 0,675$, Chi-Quadrat-Test).

Extrazellulär kam Vitronektin bei UTC in 12 von 25 Fällen (48 %), bei FTC in 14 von 27 Fällen (51,9 %) und bei PTC in 11 von 30 Fällen (36,7 %) vor. Auch hier waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Tumorentitäten festzustellen ($p = 0,486$, Chi-Quadrat-Test).

d) Osteopontin

In den Tumorzellen war Osteopontin bei UTC in 15 von 25 Fällen (60 %), bei FTC in 22 von 27 Fällen (81,5 %) und bei PTC in 28 von 30 Fällen (93,3 %) enthalten. Statistisch wurden in den Zellen signifikante Unterschiede bei der Osteopontin-Expression nachgewiesen ($p = 0,009$, Chi-Quadrat-Test). Im Einzelnen enthielten PTC signifikant häufiger Osteopontin in den Tumorzellen als UTC ($p = 0,008$, Chi-Quadrat-Test), aber nicht als FTC ($p = 0,238$, Exakter Test nach Fisher). Auch zwischen UTC und FTC lag hier kein signifikanter Unterschied vor ($p = 0,161$, Chi-Quadrat-Test).

Im Stroma wurde Osteopontin bei allen untersuchten Karzinomtypen nur in geringem Umfang exprimiert, bei UTC in 1 von 25 Fällen (4 %), bei FTC in 1 von 27 Fällen (3,7 %) und bei PTC in 2 von 30 Fällen (6,7 %). Signifikante Unterschiede bestanden dabei nicht ($p = 1,000$, Freeman-Halton-Test).

e) Keratansulfat

In den Tumorzellen kam Keratansulfat bei UTC in 7 von 25 Fällen (28 %), bei FTC in 5 von 27 Fällen (18,5 %) und bei PTC in 14 von 30 Fällen (46,7 %) vor. Statistisch ergab sich hier kein signifikanter Unterschied zwischen den Tumorentitäten ($p = 0,066$, Chi-Quadrat-Test).

Im Stroma wurde Keratansulfat bei UTC nicht nachgewiesen, bei FTC in 8 von 27 Fällen (29,6 %) und bei PTC in 23 von 30 Fällen (76,7 %). Diese Unterschiede waren signifikant ($p < 0,001$, Chi-Quadrat-Test). In den paarweisen Vergleichen zeigte sich, dass PTC signifikant häufiger Keratansulfat im Stroma enthalten als FTC ($p = 0,001$, Chi-Quadrat-Test) und UTC ($p < 0,001$, Chi-Quadrat-Test) sowie FTC signifikant häufiger als UTC ($p = 0,004$, Exakter Test nach Fisher).

Einen Überblick über die ermittelten p-Werte im Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest bzw. im Freeman-Halton-Test gibt Tabelle 22.

Tabelle 22: Vergleich des Vorkommens von Matrixbestandteilen in Schilddrüsenkarzinomen

Protein	Lokalisation	UTC (n=25)		FTC (n=27)		PTC (n=30)		Chi- Quadrat- Test	Freeman- Halton- Test
		Anzahl							
		-	+	-	+	-	+		
TN	Zellen	15	10	19	8	21	9	p = 0,665	p = 0,010
	Stroma	3	22	9	18	1	29		
TSP	Zellen	16	9	17	10	24	6	p = 0,292	p < 0,001
	Stroma	11	14	22	5	29	1		
VN	Zellen	17	8	16	11	17	13	p = 0,675	p = 0,486
	Stroma	13	12	13	14	19	11		
OPN	Zellen	10	15	5	22	2	28	p = 0,009	p = 1,000
	Stroma	24	1	26	1	28	2		
KS	Zellen	18	7	22	5	16	14	p = 0,066	p < 0,001
	Stroma	25	0	19	8	7	23		

- = Nachweis negativ, + = Nachweis positiv

4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Osteopontin kam in den Tumorzellen aller Karzinomtypen am häufigsten vor, wobei PTC die meisten positiven Fälle aufwies. Extrazellulär konnte Osteopontin hingegen nur in geringem Umfang oder gar nicht nachgewiesen werden. Tenascin war bei allen Tumorentitäten häufig im Stroma zu finden, am häufigsten bei PTC. Die Vitronektin-Expression unterschied sich weder in den Tumorzellen noch im Stroma wesentlich zwischen den Tumortypen.

Typisch für **UTC** war das gegenüber den anderen Tumorentitäten häufigere Vorkommen von Thrombospondin im Stroma. Dies war statistisch signifikant. Darüber hinaus enthielten sie im Gegensatz zu den anderen Karzinomtypen extrazellulär kein Keratansulfat. Bei **FTC** kam im Vergleich mit den anderen Entitäten Thrombospondin am häufigsten in den Tumorzellen und Vitronektin am häufigsten extrazellulär vor, wenngleich dies statistisch nicht signifikant war. Keratansulfat kam am häufigsten in **PTC** vor, insbesondere im Stroma, wobei hier signifikante Unterschiede zwischen den Tumortypen bestanden. Zudem enthielten **PTC** signifikant häufiger Osteopontin in den Tumorzellen als **UTC** und signifikant häufiger Tenascin im Stroma als **FTC**.

Bei **FTC** bestand eine Korrelation zwischen dem intra- und extrazellulären Vorkommen von Keratansulfat. Bei **FTC und PTC** wurden Thrombospondin und Tenascin häufig gemeinsam in den Tumorzellen exprimiert. Zusätzlich korrespondierten bei **FTC** das intrazelluläre Vorkommen von Tenascin und Vitronektin. Bei **UTC** bestand ein Zusammenhang zwischen der Expression von Tenascin und Osteopontin in den Tumorzellen.

Bei allen Karzinomtypen fiel auf, dass Tenascin im Stroma häufiger vorkam als in den Tumorzellen. Dies traf auf Thrombospondin nur bei den **UTC** zu, wohingegen es in den anderen Karzinomgruppen häufiger intrazellulär zu finden war. Vitronektin wurde bei **UTC** und **FTC** häufiger im Stroma exprimiert als intrazellulär, bei **PTC** häufiger in den Tumorzellen. Osteopontin war bei allen Entitäten deutlich stärker intrazellulär vertreten als extrazellulär. Keratansulfat kam nur bei **PTC** und **FTC** häufiger im Stroma vor als in den Tumorzellen und bei **UTC** nur in den Tumorzellen.

5 Diskussion

5.1 Das Patientenkollektiv

Das Risiko, an einem Schilddrüsenkarzinom zu erkranken, wird nicht nur durch Umweltfaktoren wie die Strahlenexposition, sondern auch durch Alter und Geschlecht beeinflusst. Im untersuchten Patientenkollektiv befanden sich deutlich mehr weibliche als männliche Patienten (61 % versus 39 %). Dies bestätigt die Ergebnisse großer epidemiologischer Studien, wenngleich eine geringe Abweichung zu den in der Literatur beschriebenen Daten bestand, wonach ca. 70 % der Patienten mit Schilddrüsenkarzinom Frauen sind (Scheiden et al., 2006; Batzler et al., 2008; Sprague et al., 2008; Enewold et al., 2009). Es ist zudem bekannt, dass bei Frauen häufiger differenzierte Schilddrüsenkarzinome auftreten und bei Männern häufiger aggressivere Varianten, d.h. undifferenzierte und medulläre Karzinome. Frauen erkranken am häufigsten zwischen dem 40. und 49. Lebensjahr, Männer zwischen dem 60. und 69. Lebensjahr (Rahbari et al., 2010). Im untersuchten Kollektiv waren beide Geschlechter hingegen im Durchschnitt ähnlich alt (58,8 Jahre versus 59,2 Jahre). In der Gruppe der PTC waren Frauen allerdings im Mittel etwa 10 Jahre jünger als Männer (44,7 Jahre versus 55,2 Jahre), in der Gruppe der UTC im Mittel etwa 10 Jahre älter (71,5 Jahre versus 61,7 Jahre). Das Geschlechterverhältnis lag bei allen Karzinomtypen bei etwa 3 : 2 (Frauen : Männer).

Verschiedene Studien zeigen, dass papilläre Schilddrüsenkarzinome häufiger bei jüngeren und undifferenzierte häufiger bei älteren Patienten auftreten (Hundahl et al., 1998; Hundahl et al., 2000; Enewold et al., 2009). Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen dieser Arbeit wider, in der Patienten mit UTC durchschnittlich am ältesten waren und Patienten mit PTC am jüngsten. Statistisch war bei den papillären Karzinomen der Median des Patientenalters signifikant niedriger als bei den undifferenzierten und follikulären.

UTC entsprechen nach der 6. Auflage der TNM-Klassifikation stets dem Stadium pT4. Bei den differenzierten Karzinomen kamen die Stadien pT1 bis pT3 insgesamt etwa gleich häufig vor, PTC lagen aber häufiger im Stadium pT1, FTC häufiger im Stadium pT3 vor. Auch andere Studien gelangen zu ähnlichen Ergebnissen, wobei unter den PTC kleinere Tumorgrößen im Stadium pT1 überwiegen, unter den FTC auch Tumoren mittlerer Größe im Stadium pT2 oder pT3 häufiger vorkommen. UTC bilden meist größere Tumore aus (Hundahl et al., 2000; Aschebrook-Kilfoy et al., 2011).

5.2 Karzinomspezifische Zusammensetzung der extrazellulären Matrix

Die histologischen Typen des Schilddrüsenkarzinoms unterscheiden sich deutlich in der Zusammensetzung ihres Stromas und in ihrem biologischen Verhalten. PTC sind Tumore mit desmoplastischer Stromareaktion (Produktion kollagenreichen Bindegewebes) und der Tendenz zur

Ausbildung von Lymphknotenmetastasen. FTC hingegen sind normalerweise nicht desmoplastisch und metastasieren bevorzugt hämatogen in weiter entfernte Organe. UTC haben eine sehr variable Morphologie, die zwischen epitheloiden Wachstumsformen ohne wesentliche Stromabildung und stromareichen, sarkomatoiden Tumoren liegt, und die immer eine schnell fortschreitende, meist tödliche Erkrankung darstellen (Galliano und Frishberg, 2012). Der Differentialdiagnostik der Schilddrüsenkarzinome kommt daher eine wichtige Rolle zu. In verschiedenen Studien wurden bereits karzinomtypische Charakteristika ermittelt. In PTC kommen gemäß einer Studie beispielsweise Cytokeratin-19, Galectin-3 und HBME-1 häufiger vor als in follikulären Adenomen und Karzinomen (Saggiorato et al., 2005) oder papillären Hyperplasien (Casey et al., 2003). Zudem wird CD44 in PTC häufig exprimiert, während CD56 und E-Cadherin nur in geringem Umfang nachweisbar sind (Pazaitou-Panayiotou et al., 2010). Dennoch kann es weiterhin schwierig oder sehr aufwendig sein, die Karzinome, die ihren Ursprung in den Thyreozyten haben, zu unterscheiden (Albores-Saavedra et al., 2004; Hommell-Fontaine et al., 2010). Weitere Untersuchungen sind daher notwendig, damit eine leichtere bzw. effizientere Differentialdiagnostik möglich wird.

Es konnten in dieser Arbeit sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede zwischen den verschiedenen Schilddrüsenkarzinomtypen ermittelt werden. Bei allen drei untersuchten Entitäten kam Osteopontin häufig in den Tumorzellen und Tenascin häufig im Stroma vor, wobei PTC jeweils den größten Anteil positiver Fälle aufwies. In PTC konnte Keratansulfat in den Tumorzellen und im Stroma häufiger nachgewiesen werden als bei den anderen untersuchten Karzinomtypen. FTC enthielten nach Tenascin am zweithäufigsten Vitronektin im Stroma. In UTC kam Thrombospondin häufig im Stroma vor, während Keratansulfat dort fehlte.

Tenascin wurde in einer Studie in PTC und medullären Schilddrüsenkarzinomen, jedoch weder in FTC und UTC noch in normalem Schilddrüsengewebe und Knotenstrumen gefunden (Tseleni-Balafouta et al., 2006). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit. Die unterschiedlichen Beobachtungen können in erster Linie durch die Verwendung eines anderen Antikörpers (TN2, Dako M636; Verdünnung 1:50) in der genannten Studie erklärbar sein. Auch die Vorbehandlung der Präparate unterschied sich. Außerdem wurden deutlich weniger Fälle (n=48) untersucht. Eine andere Studie mit insgesamt 76 Fällen konnte Tenascin hingegen ebenfalls bei papillären, follikulären und undifferenzierten Karzinomen nachweisen, aber nicht in benignen Veränderungen der Schilddrüse. Das Protein wurde hier - wie in dieser Promotionsarbeit - vorrangig im Stroma gefunden (Guo et al., 2014).

Thrombospondin war in Strumen nicht nachweisbar. Im Stroma der UTC wurde das Protein hingegen stark bzw. häufig exprimiert, während es im Stroma der FTC und PTC sowie in den Tumorzellen aller Entitäten deutlich seltener vorkam. Diese Beobachtungen unterscheiden sich von den Ergebnissen einer Studie, in der ein hoher Gehalt an Thrombospondin im Stroma der PTC beschrieben wird und in geringem Umfang auch im Bereich der Gefäße bei Strumen. In

den Tumorzellen wurde hier kein Thrombospondin gefunden (Patey et al., 1999). Auch in dieser Studie wurde ein anderer Antikörper (monoklonaler anti-Thrombospondin-1-Antikörper, Sigma) verwendet, der zudem stärker verdünnt war (1:1000), so dass dies in erster Linie der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse sein kann. Die Fallzahl (n=40) ist ebenfalls deutlich geringer. Beim Urothelkarzinom konnte hingegen die vorwiegende Expression von Thrombospondin in gut differenzierten Karzinomen gezeigt werden, wobei das Molekül sowohl im Stroma als auch in den Tumorzellen vorkam (Ioachim et al., 2006). Beim invasiven Vulvakarzinom ist einer Studie zufolge eine gesteigerte TSP-1-Expression mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium assoziiert (Tringler et al., 2005), ebenso beim Leberzell- (Poon et al., 2004) und Gallenblasenkarzinom (Ohtani et al., 1999). Im Gegensatz dazu geht beim klarzelligen Nierenzellkarzinom ein fortgeschrittenes Tumorstadium mit einer geringen Expression des Proteins einher (Zubac et al., 2009).

Bei einem Teil der untersuchten Schilddrüsenkarzinome kam Thrombospondin, wie oben beschrieben, in den Tumorzellen vor, wenngleich sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den differenzierten und den undifferenzierten Karzinomen ergab. Im Stroma war es am häufigsten in UTC nachweisbar, d.h. in der aggressivsten Form des Schilddrüsenkarzinoms, obwohl Thrombospondin im Allgemeinen die Neovaskularisation und das Wachstum von Tumoren hemmen soll. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass seine Wirkung von den vorhandenen Bindungspartnern abhängt. Dies können andere Moleküle in der ECM oder Zelloberflächenrezeptoren sein, die sich je nach Stadium, Invasivität und Metastasierungsgrad eines Tumors unterscheiden. Man kann die Wirkung von Thrombospondin-1 in Karzinomen in zwei Phasen einteilen. In der ersten Phase (Ruhephase) produzieren die Stromazellen große Mengen des Proteins, das die Neovaskularisation hemmt und das Tumorwachstum kontrolliert. In der zweiten Phase hingegen wirkt Thrombospondin-1 als Adhäsionsprotein und Modulator extrazellulärer Proteasen, um die Invasion des Tumors zu fördern (Kazerounian et al., 2008). Für PTC und FTC gibt es Studien, die belegen, dass Thrombospondin-1 die Zellinvasion steigert (Sid et al., 2004; Nucera et al., 2010). Für UTC liegen solche Studien nicht vor. Dennoch kann man vermuten, dass möglicherweise gerade die höhere Invasivität der UTC die Ursache für die gesteigerte Expression des Matrixmoleküls im Vergleich zu den weniger invasiven differenzierten Karzinomen ist. Auch unterschiedliche Integrinrezeptoren in differenzierten und undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen könnten einen Einfluss auf die Wirkung von Thrombospondin haben. Nach einer anderen Studie exprimieren FTC, PTC und UTC zum Teil unterschiedliche Integrinrezeptoren, wobei die $\alpha 6$ -Rezeptor-Untereinheit nur bei UTC gefunden wurde (Hoffmann et al., 2005). Für diese Untereinheit ist bekannt, dass sie beim Brustkrebs durch die Bindung von Thrombospondin-1 die Zelladhäsion und Tumorzellinvasion steigert (John et al., 2010). Dies könnte auch auf UTC zutreffen.

Vitronectin kam sowohl im Stroma der Strumen als auch der malignen Neoplasien vor. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangt eine immunhistochemische Untersuchung mit 27 Fällen. Vitronectin wurde hier einerseits in der Mehrzahl der Gewebeproben von follikulären Adenomen sowie follikulären und papillären Karzinomen der Schilddrüse gefunden, andererseits auch in den an Tumorgewebe angrenzenden Bereichen mit normalem und chronisch entzündlich verändertem Gewebe. Darüber hinaus wurde es in geringem Umfang in den Zellen des entzündlich veränderten Gewebes sowie der FTC und PTC nachgewiesen. Insgesamt enthielten follikuläre Karzinome und chronisch entzündetes Gewebe aber signifikant mehr Vitronectin als papilläre Karzinome (Yamakawa et al., 1994). Wir haben hingegen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Vitronectin-Expression in verschiedenen Schilddrüsenkarzinomen gefunden, allerdings auch die Verteilung der VN-positiven Gewebsareale in die Beurteilung einbezogen. Außerdem kam in der Studie von Yamakawa et al. ein anderer Antikörper (Maus IgG1 Anti-Vitronectin, Boehringer Mannheim GmbH, 8E6 [LJ8]) zum Einsatz. Vitronectin wurde hier vor allem im Bereich der subepithelialen und vaskulären Basalmembran und im Stroma um Tumorzellen detektiert, in einem ähnlichen Verteilungsmuster wie die Komplementfaktoren C3d und C5b-9 (Yamakawa et al., 1994). Es ist bekannt, dass Krebszellen Komplementfaktoren produzieren, um durch autocrine Stimulation ihre Proliferation, Migration und Invasivität zu fördern. Andererseits entwickeln sie Mechanismen, um einer komplementvermittelten Zytolyse zu entgehen (Merle et al., 2015). Da Vitronectin einer der Regulationsfaktoren ist, die Zellen vor einer durch Komplementfaktoren ausgelösten Lyse schützen können (Podack et al., 1984; Milis et al., 1993), könnte dies auch die erhöhte Vitronectin-Expression in Schilddrüsenkarzinomen erklären. Eine andere Studie belegt ebenfalls einen Zusammenhang zwischen Komplementaktivierung und Vitronectinexpression in der Schilddrüse und weist in chronisch entzündetem Gewebe das Protein perifollikulär und im Interstitium bei allen untersuchten Fällen mit Morbus Basedow (n=9) und in einem von zwei Fällen mit Hashimoto-Thyreoiditis nach (Tandon et al., 1994).

Osteopontin war fast ausschließlich in den Tumorzellen zu finden und kam am häufigsten in PTC vor, am seltensten in UTC und fehlte in den Zellen der Knotenstrumen. Diese Ergebnisse bestätigen auch andere Studien (Guarino et al., 2005; Briese et al., 2010; Kang, 2013; Ferreira et al., 2016). Die starke Osteopontinexpression in PTC ist wahrscheinlich auf die für diese Tumorentität typische Aktivierung des RET/PTC-Onkogens zurückzuführen (Grieco et al., 1990), das als einer der stärksten Induktoren der Osteopontin-Expression gilt (Castellone et al., 2004). Obwohl in unserer Studie bei allen Tumorentitäten Osteopontin häufig in den Zellen vorkam (60 % bis 93,3 % der Fälle), ergab hier die statistische Analyse, dass PTC das Protein signifikant häufiger in den Tumorzellen enthalten als UTC ($p = 0,008$, Chi-Quadrat-Test). Da der p-Wert aber lediglich der Wahrscheinlichkeit entspricht, mit der das ermittelte Ergebnis auftritt, wenn die Nullhypothese richtig ist, besteht bei einem Signifikanzniveau von 5 % auch eine Wahrscheinlichkeit von 5 %, dass die Nullhypothese abgelehnt wird, obwohl sie richtig ist (Do-

rey, 2010). Daher lässt sich von dem statistisch signifikanten Ergebnis allein nicht ableiten, dass der Osteopontin-Gehalt im Stroma als Merkmal zur Differenzierung der Schilddrüsenkarzinome geeignet ist.

Keratansulfat kommt mehreren Studien zufolge in benignem Schilddrüsengewebe nicht vor, ist aber in PTC häufig nachzuweisen (Ito et al., 1996; Magro et al., 2003; Saggiorato et al., 2005). Dies stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein, wobei PTC in den Zellen und im Stroma deutlich häufiger Keratansulfat enthielten als die anderen Tumorentitäten. Einerseits ist Keratansulfat in PTC an Thyreoglobulin und Transferrin gebunden (Magro et al., 2003). Andererseits besitzt es eine hohe Affinität zu CD44, das bei diesem Karzinomtyp stark exprimiert wird und durch Keratansulfat-Ketten modifiziert sein kann (Takahashi et al., 1996; Pazaitou-Panayiotou et al., 2010). Die Akkumulation des Moleküls in PTC könnte daher nach Bindung an CD44 auch das Ergebnis einer verstärkten Aufnahme in die Matrix sein.

Die bisher beschriebenen Studienergebnisse belegen die unterschiedliche Zusammensetzung der extrazellulären Matrix in verschiedenen Typen des Schilddrüsenkarzinoms. Es ist somit anzunehmen, dass auch unterschiedliche Faktoren die Synthese der Matrixbestandteile regulieren. Im Allgemeinen steigern Tumorzellen die Produktion von Wachstumsfaktoren wie VEGF, PDGF TGF und FGF (Mueller und Fusenig, 2004), die tumorassoziierte Fibroblasten aktivieren. Diese produzieren wiederum selbst Matrixmoleküle (Bhowmick und Moses, 2005), Wachstumsfaktoren und Zytokine, die die Angiogenese, das Tumorwachstum und die Tumordinvasion steigern (Allen und Louise Jones, 2011).

Matrixmoleküle werden zwar hauptsächlich durch Fibroblasten im Stroma produziert (Marsh et al., 2013), Osteopontin war in unserer Studie aber fast ausschließlich in Tumorzellen zu finden. Es ist daher unwahrscheinlich, dass Zellen im Stroma das Protein synthetisiert haben. Tenascin kam hingegen deutlich häufiger im Stroma vor als in Tumorzellen. Dies spricht eher für eine Expression durch Fibroblasten. Im Allgemeinen könnten jedoch auch die Tumorzellen die Quelle von Matrixmolekülen sein, die sie dann nach außen abgeben. Andererseits könnten von Zellen im Stroma synthetisierte Matrixbestandteile von den Tumorzellen aufgenommen werden. Abgesehen von Osteopontin und Tenascin lassen die Daten dieser Arbeit daher keine genauere Aussage zum Produktionsort der Matrixmoleküle zu. Denkbar wäre zudem, dass Ihre Synthese durch unterschiedliche Mediatoren induziert wird und somit unabhängig voneinander in den Tumorzellen und im Stroma stattfindet. Möglicherweise liegen intra- und extrazellulär auch unterschiedliche Proteinvarianten vor, die durch alternatives Splicing oder durch posttranslationale Modifikationen entstanden sind. Weiterführende Untersuchungen mit geeigneten Methoden, beispielsweise mittels PCR, könnten hier Aufschluss geben.

In FTC bestand eine signifikante Korrelation zwischen dem Vorkommen von Keratansulfat im Stroma und in den Tumorzellen. Dies deutet womöglich darauf hin, dass Keratansulfat hier unter dem Einfluss der gleichen Regulationsfaktoren parallel in den Tumorzellen und den

Fibroblasten im Stroma produziert wurde. Weitere Korrelationen zeigten sich zwischen verschiedenen Matrixmolekülen. So weisen unsere Ergebnisse auf eine parallele Regulation der Tenascin- und Thrombospondin-Expression in den Tumorzellen der PTC und FTC hin. Hier könnte TGF- β eine wichtige Rolle spielen, da es sowohl die Thrombospondin- als auch die Tenascin-Synthese stimulieren kann (Pearson et al., 1988; Okamoto et al., 2002). Zwei Studien haben allerdings gezeigt, dass TGF- β nicht nur in differenzierten, sondern auch in undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen vorkommt (Jasani et al., 1990; Imamura et al., 1998). Es ist also anzunehmen, dass weitere Regulationsfaktoren eine Rolle spielen. In Frage kommt beispielsweise Interleukin-6, das in Fibroblasten die Tenascin- und Thrombospondin-Expression anregt (Kim et al., 2001; Chiquet-Ehrismann, 2004). Darüber hinaus enthalten nach einer Studie differenzierte Schilddrüsenkarzinome mehr Interleukin-6 als UTC (Basolo et al., 1998). Es wurde außerdem nachgewiesen, dass das Zytokin die Produktion von TGF- β anregen kann und umgekehrt (Zhou et al., 1991; Seong et al., 2009). Beide Signalmoleküle könnten somit wichtige Regulatoren der Matrixsynthese in PTC und FTC sein.

In FTC bestand des Weiteren ein Zusammenhang zwischen der intrazellulären Expression von Tenascin und Vitronektin. Während TGF- β auch die Vitronektin-Synthese steigern kann (Koli et al., 1991), hat IL-6 jedoch keinen signifikanten Effekt auf den Promotor des humanen Vitronektins (Seiffert et al., 1996). Es sind daher wahrscheinlich auch hier noch andere Mediatoren involviert, die ebenfalls die Vitronektin-Produktion anregen wie EGF oder PDGF (Koli et al., 1991). Da EGF in einer Studie *in vitro* auch die Expression von Tenascin-C induziert (Sakai et al., 1995), könnte dieser Faktor von spezieller Bedeutung in FTC sein. Eine immunhistochemische Untersuchung belegt zwar eine diffuse Expression von EGF und des EGF-Rezeptors (EGFR) in Schilddrüsenkarzinomen, aber unabhängig vom histologischen Subtyp (van der Laan et al., 1995). In einer anderen Studie unterschieden sich die Karzinomtypen jedoch hinsichtlich des Vorkommens von EGF in den Zellkernen. Während die Kerne follikulärer Adenome und Karzinome den Wachstumsfaktor und zum Teil auch dessen Rezeptor enthielten, kamen EGF und EGFR bei papillären Karzinomen fast nicht in den Zellkernen vor. Die Rolle, die EGF bei der Wachstumsregulation spielt, unterscheidet sich also möglicherweise zwischen follikulären und papillären Karzinomen (Marti et al., 2001). Dies könnte sich auch auf die Vitronektin-Expression auswirken.

PTC exprimierten in nahezu allen Fällen gleichzeitig Tenascin im Stroma und Osteopontin in den Tumorzellen, UTC in rund zwei Fünftel der Fälle Tenascin und Osteopontin gleichzeitig in den Zellen. Da die Produktion von Osteopontin ebenfalls durch TGF- β angeregt wird (Noda et al. 1988; Georges et al, 2010), könnte das Signalmolekül auch hier relevant sein. In papillären Karzinomen könnte zudem IL-6 die Expression des Proteins anregen. In einer Untersuchung steigerte das Zytokin die Osteopontin-Synthese in Zelllinien des Leberzellkarzinoms. Außerdem

korrelierten in der selben Studie im Blut von 353 Patienten mit hepatozellärem Karzinom die Spiegel von IL-6 und Osteopontin signifikant (Wang et al., 2016). Darüber hinaus stimuliert Interleukin-1 die Tenascin- und Osteopontin-Synthese (Chevalier et al., 1996; Serlin et al., 2006). Insbesondere bei UTC, die entsprechend der oben erwähnten Studie von Basolo et al. weniger IL-6 enthalten als die differenzierten Karzinome, könnte dies von Belang sein. Zwei Studien haben in UTC eine gesteigerte IL-1-Expression nachgewiesen (Yoshida et al., 1994; Asakawa and Kobayashi, 1999).

5.3 Evaluation der Methodik

Ziel dieser Arbeit war es Unterschiede zwischen den Tumorentitäten zu ermitteln und mögliche Kriterien zur Verbesserung der histologischen Differentialdiagnostik der Schilddrüsenkarzinome herauszuarbeiten. Es konnte gezeigt werden, dass entsprechende Unterschiede bestehen, wobei aber mögliche Fehlerquellen beachtet werden müssen.

Bereits bei der Herstellung der Präparate konnten Fehler auftreten. Von jedem der ausgewählten Karzinome lag ein in Paraffin eingebetteter Gewebsblock vor, von dem jeweils fünf Schnitte mit Hilfe eines Mikrotoms angefertigt wurden. Diese Schnitte können sich minimal unterscheiden. Darüber hinaus sind bei immunhistochemischen Färbungen falsch positive Ergebnisse nicht auszuschließen, deren Ursache in den verwendeten Antikörpern liegen könnte.

Bei der lichtmikroskopischen Beurteilung der Präparate wurde das Verhältnis der gefärbten Zellen bzw. Stromaareale zu den nicht gefärbten Zellen bzw. Arealen semiquantitativ durch zwei Untersucher (Prof. Dr. Hauptmann, Andrea Halm) bewertet, so dass hier aufgrund einer gewissen Subjektivität der Einschätzung eine mögliche Fehlerquelle in Betracht gezogen werden muss. In einigen Fällen kamen die Untersucher zu unterschiedlichen Urteilen, so dass gemeinsam ein Ergebnis festgelegt werden musste.

Auch der geringe Stichprobenumfang mindert die Aussagekraft der Untersuchung, da eine Repräsentativität der Fälle nicht unbedingt gegeben ist. Der Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest konnte im Fall der Tenascin- und Osteopontin-Expression im Stroma nicht angewendet werden, da in beiden Fällen in der dem Test zugrunde liegenden Kreuztabelle in drei Zellen (50 % der Zellen) die erwartete Häufigkeit < 5 lag. Damit ist eine der Voraussetzungen des Tests nicht erfüllt, die höchstens in 20 % der Zellen eine erwartete Häufigkeit < 5 erlaubt. Aus diesem Grund wurde hier der Freeman-Halton-Test eingesetzt, der eine Erweiterung des Exakten Tests nach Fisher für $k \times 2$ Kreuztabellen darstellt und zur Analyse bei geringen Fallzahlen an Stelle des Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstests geeignet ist (Bortz et al., 2008).

Beim statistischen Vergleich des Vorkommens von Matrixbestandteilen in den drei Karzinomgruppen konnten der Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest bzw. der Freeman-Halton-Test bei einem signifikanten Ergebnis zwar das Vorhandensein von Unterschieden nachweisen, ohne

jedoch genauer zu spezifizieren, wo diese lagen. Dasselbe galt für den H-Test nach Kruskal und Wallis, der bei Normalverteilung, aber fehlender Varianzhomogenität als nicht-parametrischer Test beim Vergleich der Mediane des Patientenalters zum Einsatz kam. Um zu ermitteln, wo genau die Unterschiede lagen, erfolgten paarweise Vergleiche der Karzinomgruppen. Dazu wurden zur Untersuchung der Matrixzusammensetzung entweder der Chi-Quadrat-Unabhängigkeits-Test mit Kontinuitätskorrektur oder der Exakte Test nach Fisher verwendet. Die Kontinuitätskorrektur war bei einer Fallzahl von $n < 60$ in den Einzeltests einzusetzen. Beim Medianvergleich des Patientenalters erfolgten die paarweisen Vergleiche mit dem U-Test nach Mann und Whitney. Das Signifikanzniveau in diesen Tests musste jeweils mittels Bonferroni-Korrektur angepasst werden, da bei mehrmaligem Testen die Wahrscheinlichkeit eines α -Fehlers (Nullhypothese ist korrekt, Alternativhypothese wird fälschlicherweise angenommen) deutlich ansteigt. Um dem entgegenzuwirken wird nach der Bonferroni-Korrektur ein Ergebnis erst dann als signifikant gewertet, wenn der p-Wert kleiner als $\alpha / \text{Anzahl der durchgeführten Tests}$ ist. Nachteilig ist allerdings, dass durch dieses Verfahren die Wahrscheinlichkeit eines β -Fehlers erhöht wird, d.h. die Alternativhypothese wäre korrekt und die Nullhypothese würde fälschlicherweise beibehalten (Weiß und Randy, 2013).

5.4 Zusammenfassung

Immunhistochemische Analysen können zur Differentialdiagnostik von Karzinomen beitragen. Die Untersuchung der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix spielt dabei eine wichtige Rolle.

Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand darin festzustellen, ob bei drei verschiedenen Typen des Schilddrüsenkarzinoms Unterschiede im Vorkommen von Tenascin, Thrombospondin, Osteopontin, Vitronektin und Keratansulfat in den Tumorzellen und im Stroma bestehen.

UTC enthielten im Vergleich zu den anderen Karzinomtypen signifikant häufiger Thrombospondin im Stroma. Keratansulfat kam hingegen dort nicht vor. Vitronektin wurde am häufigsten im Stroma der FTC exprimiert, wenngleich keine signifikanten Unterschiede bestanden. PTC enthielten signifikant häufiger Keratansulfat im Stroma als FTC und UTC. Zudem exprimierten PTC signifikant häufiger Osteopontin in den Tumorzellen als UTC und häufiger Tenascin im Stroma als FTC. Osteopontin und Tenascin kamen allerdings bei allen untersuchten Karzinomtypen häufig in den Tumorzellen bzw. im Stroma vor.

Bestimmte Proteinkombinationen waren charakteristisch für einzelne Tumorentitäten. Bei FTC und PTC kamen Thrombospondin und Tenascin häufig gemeinsam in den Tumorzellen vor. Zusätzlich korrespondierten bei FTC die intrazelluläre Expression von Tenascin und Vitronektin sowie das intra- und extrazelluläre Vorkommen von Keratansulfat miteinander. Bei PTC hingen die Expression von Thrombospondin in den Tumorzellen und von Osteopontin im Stroma zusammen. Bei UTC korrelierten die Expression von Tenascin und Osteopontin in den Tumorzellen.

Die Ergebnisse bestätigen, dass verschiedene Entitäten der Schilddrüsenkarzinome sich hinsichtlich des Vorkommens von Matrixbestandteilen in Tumorzellen und Stroma unterscheiden. Wenn allein morphologisch keine sichere Aussage möglich ist, können die gewonnenen Erkenntnisse daher weitere diagnostische Kriterien liefern und so die Unterscheidung von Schilddrüsenkarzinomen durch immunhistochemische Untersuchungen erleichtern.

6 Literaturverzeichnis

- Aaboe M, Offersen BV, Christensen A, Andreasen PA (2003) Vitronectin in human breast carcinomas. *Biochim Biophys Acta* 1638:72-82.
- Adams JC (2001) Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 25-51.
- Adams M, Jones JL, Walker RA, Pringle JH, Bell SC (2002) Changes in tenascin-C isoform expression in invasive and preinvasive breast disease. *Cancer Res* 62:3289-3297.
- Adolph KW (1999) Relative abundance of thrombospondin 2 and thrombospondin 3 mRNAs in human tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 258:792-796.
- Agrawal D, Chen T, Irby R, Quackenbush J, Chambers AF, Szabo M, Cantor A, Coppola D, Yeatman TJ (2002) Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling. *J Natl Cancer Inst* 94:513-521.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD: *Molekularbiologie der Zelle*. 2. Aufl. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1990, S. 956-958.
- Albores-Saavedra J, Carrick K (2004) Where to set the threshold between well differentiated and poorly differentiated follicular carcinomas of the thyroid. *Endocr Pathol* 15:297-305.
- Allen M, Louise Jones J (2011) Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *J Pathol* 223:162-176.
- Alvarez AA, Axelrod JR, Whitaker RS, Isner PD, Bentley RC, Dodge RK, Rodriguez GC.M, Tanaka Y, Tsuchida T, Tokunaga T, Yamazaki H, Nakamura M, Ueyama Y, Tanaka M, Tajima T, Makuuchi H (2001) Thrombospondin-1 expression in epithelial ovarian carcinoma: association with p53 status, tumor angiogenesis, and survival in platinum-treated patients. *Gynecol Oncol* 82:273-278.
- Anborgh PH, Mutrie JC, Tuck AB, Chambers AF (2011) Pre- and post-translational regulation of osteopontin in cancer. *J Cell Commun Signal* 5:111-122.
- Aplin JD, Hey NA, Graham RA (1998) Human endometrial MUC1 carries keratan sulfate: characteristic glycoforms in the luminal epithelium at receptivity. *Glycobiology* 8:269-276.
- Are C, Shaha AR (2006) Anaplastic thyroid carcinoma: biology, pathogenesis, prognostic factors, and treatment approaches. *Ann Surg Oncol* 13:453-464.
- Asakawa H, Kobayashi T (1999) The secretion of cytokines and granulocyte colony stimulating factor by anaplastic and poorly differentiated thyroid carcinoma cell lines. *Anticancer Res* 19:761-764.
- Aschebrook-Kilfoy B, Ward MH, Sabra MM, Devesa SS (2011) Thyroid cancer incidence patterns in the United States by histologic type, 1992-2006. *Thyroid* 21:125-134.
- Aufderheide E, Chiquet-Ehrismann R, Ekblom P (1987) Epithelial-mesenchymal interactions in the developing kidney lead to expression of tenascin in the mesenchyme. *J Cell Biol* 105:599-608.
- Bae HB, Zmijewski JW, Deshane JS, Zhi D, Thompson LC, Peterson CB, Chaplin DD, Abraham E (2012) Vitronectin inhibits neutrophil apoptosis through activation of integrin-associated signaling pathways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 46:790-796.
- Baloch ZW, LiVolsi VA: *Pathology of Thyroid Gland*. In: LiVolsi VA, Asa SL (ed): *Endocrine Pathology*. Churchill Livingstone, New York-Edinburgh-London-Philadelphia, 2002, p. 70.
- Basolo F, Fiore L, Pollina L, Fontanini G, Conaldi PG, Toniolo A (1998) Reduced expression of interleukin 6 in undifferentiated thyroid carcinoma: in vitro and in vivo studies. *Clin Cancer Res* 4:381-387.

- Barnes DW, Silnutzer J, See C, Shaffer M (1983) Characterization of human serum spreading factor with monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:1362-1366.
- Batzler WU, Giersiepen K, Hentschel S, Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A, Kieschke J, Kraywinkel K, Meyer M, Stabenow R, Stegmaier C, Bertz J, Haberland J, Wolf U: Krebs in Deutschland 2003-3004. Häufigkeiten und Trends. 6. Aufl. Robert-Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), Berlin, 2008, S. 86-89.
- Bettelheim FA, Plessy B (1975) The hydration of proteoglycans of bovine cornea. *Biochim Biophys Acta* 381:203-214.
- Bhowmick NA, Moses HL (2005) Tumor-stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev* 15:97-101.
- Bornstein P (2001) Thrombospondins as matricellular modulators auf cell function. *J Clin Invest* 107: 929-934.
- Bornstein P (2009) Matricellular proteins: an overview. *J Cell Commun Signal* 3:163-165.
- Bornstein P, Sage EH (2002) Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol* 14:608-616.
- Borsi L, Carnemolla B, Nicolò G, Spina B, Tanara G, Zardi L (1992) Expression of different tenascin isoforms in normal, hyperplastic and neoplastic human breast tissues. *Int J Cancer* 52:688-692.
- Bortz J, Lienert GA, Boehnke K: Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik. 3. Aufl. Springer, Heidelberg, 2008, S. 87-190.
- Boudreau NJ, Jones PL (1999) Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem J* 339:481-488.
- Boudreau N, Sympson CJ, Werb Z, Bissell MJ (1995) Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 267:891-893.
- Bray BA, Lieberman R, Meyer K (1967) Structure of human skeletal keratosulfate. The linkage region. *J Biol Chem* 242:3373-3380.
- Briese J, Cheng S, Ezzat S, Liu W, Winer D, Wagener C, Bamberger AM, Asa SL (2010) Osteopontin (OPN) expression in thyroid carcinoma. *Anticancer Res* 30:1681-1688.
- Brunner A, Mayerl C, Tzankov A, Verdorfer I, Tschörner I, Rogatsch H, Mikuz G (2004) Prognostic significance of tenascin-C expression in superficial and invasive bladder cancer. *J Clin Pathol* 57:927-931.
- Brown LF, Berse B, Van de Water L, Papadopoulos-Sergiou A, Perruzzi CA, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR (1992) Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell* 3:1169-1180.
- Burg MA, Cole GJ (1994) Claustrin, an antiadhesive neural keratan sulfate proteoglycan, is structurally related to MAP1B. *J Neurobiol* 25:1-22.
- Carcangiu ML, Zampi G, Rosai J (1984) Poorly differentiated ("insular") thyroid carcinoma. A reinterpretation of Langhans' "wuchernde Struma". *Am J Surg Pathol* 8:655-668.
- Carreiras F, Denoux Y, Staedel C, Lehmann M, Sichel F, Gauduchon P (1996) Expression and localization of alpha v integrins and their ligand vitronectin in normal ovarian epithelium and in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 62:260-267.
- Casey MB, Lohse CM, Lloyd RV (2003) Distinction between papillary thyroid hyperplasia and papillary thyroid carcinoma by immunohistochemical staining for cytokeratin 19, galectin-3, and HBME-1. *Endocr Pathol* 14:55-60.

- Castellone MD, Celetti A, Guarino V, Cirafici AM, Basolo F, Giannini R, Medico E, Kruhoffer M, Orntoft TF, Curcio F, Fusco A, Melillo RM, Santoro M (2004) Autocrine stimulation by osteopontin plays a pivotal role in the expression of the mitogenic and invasive phenotype of RET/PTC-transformed thyroid cells. *Oncogene* 23:2188-2196.
- Chellaiah MA, Kizer N, Biswas R, Alvarez U, Strauss-Schoenberger J, Rifas L, Rittling SR, Denhardt DT, Hruska KA (2003) Osteopontin deficiency produces osteoclast dysfunction due to reduced CD44 surface expression. *Mol Biol Cell* 14:173-189.
- Chang PL, Prince CW (1993) 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 enhances 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- induced tumorigenic transformation and osteopontin expression in mouse JB6 epidermal cells. *Cancer Res* 53:2217-2220.
- Chevalier X, Claudepierre P, Groult N, Godeau GJ (1996) Influence of interleukin 1 beta on tenascin distribution in human normal and osteoarthritic cartilage: a quantitative immunohistochemical study. *Ann Rheum Dis* 55:772-775.
- Chhatwal GS, Preissner KT, Müller-Berghaus G, Blobel H (1987) Specific binding of the human S protein (vitronectin) to streptococci, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. *Infect Immun* 55:1878-1883.
- Chiquet-Ehrismann R (2004) Tenascins. *IJBCB* 36:986-990.
- Christen P, Jaussi R: *Biochemie – Eine Einführung mit 40 Lerneinheiten*. 1. Aufl. Springer, Heidelberg, 2005, S. 379-387.
- Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420:860-867.
- Dalla-Torre CA, Yoshimoto M, Lee CH, Joshua AM, de Toledo SR, Petrilli AS, Andrade JA, Chilton-MacNeill S, Zielenska M, Squire JA (2006) Effects of THBS3, SPARC and SPP1 expression on biological behavior and survival in patients with osteosarcoma. *BMC Cancer* 6:237.
- Daniel C, Wagner A, Hohenstein B, Hugo C (2009) Thrombospondin-2 therapy ameliorates experimental glomerulonephritis via inhibition of cell proliferation, inflammation, and TGF-beta activation. *Am J Physiol Renal Physiol* 297:F1299-1309.
- Davies Y, Lewis D, Fullwood NJ, Nieduszynski IA, Marcyniuk B, Albon J, Tullo A (1999) Proteoglycans on normal and migrating human corneal endothelium. *Exp Eye Res* 68:303-311.
- Denhardt DT, Guo X (1993) Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* 7:1475-1482.
- Denhardt DT, Mistretta D, Chambers AF, Krishna S, Porter JF, Raghuram S, Rittling SR (2003) Transcriptional regulation of osteopontin and the metastatic phenotype: evidence for a Ras-activated enhancer in the human OPN promoter. *Clin Exp Metastasis* 20:77-84.
- Denhardt DT, Noda M (1998) Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J Cell Biochem Suppl* 30-31:92-102.
- Deutzmann R, Bruckner-Tuderman L, Bruckner P: *Binde- und Stützgewebe* In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (Hrsg): *Biochemie und Pathobiochemie*, 8. Aufl., Springer, Heidelberg, 2007, S. 715-754.
- Dike LE, Ingber DE (1996) Integrin-dependent induction of early growth response genes in capillary endothelial cells. *J Cell Sci* 109:2855-2863.
- Dodds RA, Connor JR, James IE, Rykaczewski EL, Appelbaum E, Dul E, Gowen M (1995) Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces: an in vitro and ex vivo study of remodeling bone. *J Bone Miner Res* 10:1666-1680.
- Dorey F (2010) The p value: what is it and what does it tell you? *Clin Orthop Relat Res* 468:2297-2298.

- Dueck M, Riedl S, Hinz U, Tandara A, Möller P, Herfarth C, Faissner A (1999) Detection of tenascin-C isoforms in colorectal mucosa, ulcerative colitis, carcinomas and liver metastases. *Int J Cancer* 82:477-483.
- Ehrlich HJ, Gebbink RK, Keijer J, Linders M, Preissner KT, Pannekoek H (1990) Alteration of serpin specificity by a protein cofactor. Vitronectin endows plasminogen activator inhibitor 1 with thrombin inhibitory properties. *J Biol Chem* 265:13029-13035.
- Eklblom M, Fässler R, Tomasini-Johansson B, Nilsson K, Eklblom P (1993) Downregulation of tenascin expression by glucocorticoids in bone marrow stromal cells and in fibroblasts. *J Cell Biol* 123:1037-1045.
- End P, Panayotou G, Entwistle A, Waterfield MD, Chiquet M (1992) Tenascin: a modulator of cell growth. *Eur J Biochem* 209:1041-1051.
- Enewold L, Zhu K, Ron E, Marrogi AJ, Stojadinovic A, Peoples GE, Devesa SS (2009) Rising thyroid cancer incidence in the United States by demographic and tumor characteristics, 1980-2005. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18:784-791.
- Erickson HP (1993) Tenascin-C, tenascin-R and tenascin-X: a family of talented proteins in search of functions. *Curr Opin Cell Biol* 5:869-876.
- Erickson HP, Bourdon MA (1989) Tenascin: An extracellular protein prominent in specialized embryonic tissues and tumors. *Ann Rev Cell Biol* 5:71-92.
- Eszlinger M, Krohn K, Hauptmann S, Dralle H, Giordano TJ, Paschke R (2008) Perspectives for improved and more accurate classification of thyroid epithelial tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 93:3286-3294.
- Ferreira LB, Tavares C, Pestana A, Pereira CL, Eloy C, Pinto MT, Castro P, Batista R, Rios E, Sobrinho-Simões M, Gimba ER, Soares P (2016) Osteopontin-a splice variant is overexpressed in papillary thyroid carcinoma and modulates invasive behavior. *Oncotarget* 7:52003-52016.
- Fullwood NJ, Davies Y, Nieduszynski IA, Marcyniuk B, Ridgway AE, Quantock AJ (1996) Cell surface-associated keratan sulfate on normal and migrating corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:1256-1270.
- Funderburgh JL (2000) Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology* 10:951-958.
- Funderburgh JL (2002) Keratan sulfate biosynthesis. *IUBMB Life* 54:187-194.
- Funderburgh JL, Funderburgh ML, Mann MM, Corpuz L, Roth MR (2001) Proteoglycan expression during transforming growth factor beta-induced keratocyte-myofibroblast transdifferentiation. *J Biol Chem* 276:44173-44178.
- Funderburgh JL, Mitschler RR, Funderburgh ML, Roth MR, Chapes SK, Conrad GW (1997) Macrophage receptors for lumican. A corneal keratan sulfate proteoglycan. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:1159-1167.
- Furger KA, Allan AL, Wilson SM, Hota C, Vantyqhem SA, Postenka CO, Al-Katib W, Chambers AF, Tuck AB (2003) Beta(3) integrin expression increases breast carcinoma cell responsiveness to the malignancy-enhancing effects of osteopontin. *Mol Cancer Res* 1:810-819.
- Galliano GE, Frishberg DP: Pathology and Classification of Thyroid Tumors. In: Braunstein GD (ed): *Thyroid Cancer*. Springer, New York-Dordrecht-Heidelberg-London, 2012, pp. 1-33.
- Geisert EE Jr, Bidanset DJ (1993) A central nervous system keratan sulfate proteoglycan: localization to boundaries in the neonatal rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 75:163-173.
- Georges R, Adwan H, Zhivkova M, Eyol E, Bergmann F, Berger MR (2010) Regulation of osteopontin and related proteins in rat CC531 colorectal cancer cells. *Int J Oncol* 37:249-256.

- Gjorevski N, Nelson CM (2009) Bidirectional extracellular matrix signaling during tissue morphogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 20:459-465.
- Gladson CL, Cheresch DA (1991) Glioblastoma expression of vitronectin and the alpha v beta 3 integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells. *J Clin Invest* 88:1924-1932.
- Gladson CL, Wilcox JN, Sanders L, Gillespie GY, Cheresch DA (1995) Cerebral microenvironment influences expression of the vitronectin gene in astrocytic tumors. *J Cell Sci* 108:947-956.
- Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74:111-122.
- Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Melillo RM, Donghi R, Bongarzone I, Pierotti MA, Della Porta G, Fusco A, Vecchio G (1990) PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human papillary carcinomas. *Cell* 60:557-563.
- Grossfeld GD, Ginsberg DA, Stein JP, Bochner BH, Esrig D, Groshen S, Dunn M, Nichols PW, Taylor CR, Skinner DG, Cote RJ (1997) Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: Association with p53 alterations, tumor angiogenesis and tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 89:219-227.
- Grumet M, Hoffman S, Crossin KL, Edelman GM (1985) Cytotactin, an extracellular matrix protein of neural and non-neural tissues that mediates glia-neuron interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:8075-8079.
- Guarino V, Faviana P, Salvatore G, Castellone MD, Cirafici AM, De Falco V, Celetti A, Giannini R, Basolo F, Melillo RM, Santoro M (2005) Osteopontin is overexpressed in human papillary thyroid carcinomas and enhances thyroid carcinoma cell invasiveness. *J Clin Endocrinol Metab* 90:5270-5278.
- Guerassimov A, Zhang Y, Cartman A, Rosenberg LC, Esdaile J, Fitzcharles MA, Poole AR (1999) Immune responses to cartilage link protein and the G1 domain of proteoglycan aggrecan in patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 42:527-533.
- Gumbiner BM (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84:345-357.
- Guo M, Liu C, Qi FJ, Zhang XM, Ren LL, Liu YM, Meng ZC, Zhu ZT, Xiao JY (2014) Elevated expression of nuclear protein kinase CK2 α as a poor prognosis indicator in lymph node cancerous metastases of human thyroid cancers. *Asian Pac J Cancer Prev* 15:7425-7432.
- Guo N, Krutzsch HC, Inman JK, Roberts DD (1997) Thrombospondin I and Type I Repeat Peptides of Thrombospondin 1 specifically induce apoptosis of endothelial cells. *Cancer Res* 57:1735-1742.
- Hamacher S, Matern S, Roeb E (2004) Extrazelluläre Matrix - von der Grundlagenforschung zur klinischen Bedeutung. Eine Übersicht unter besonderer Berücksichtigung der Matrix-Metalloproteinasen. *Dtsch Med Wochenschr* 129:1976-1980.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
- Hapke S, Kessler H, Lubber B, Bengel A, Hutzler P, Höfler H, Schmitt M, Reuning U (2003) Ovarian cancer cell proliferation and motility is induced by engagement of integrin alpha(v)beta3/Vitronectin interaction. *Biol Chem* 384:1073-1083.
- Hayatsu N, Ogasawara S, Kaneko MK, Kato Y, Narimatsu H (2008) Expression of highly sulfated keratan sulfate synthesized in human glioblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 368:217-222.
- Heyman L, Leroy-Dudal J, Fernandes J, Seyer D, Dutoit S, Carreiras F (2010) Mesothelial vitronectin stimulates migration of ovarian cancer cells. *Cell Biol Int* 34:493-502.

- Hindermann W, Berndt A, Borsi L, Luo X, Hyckel P, Katenkamp D, Kosmehl H (1999) Synthesis and protein distribution of the unspliced large tenascin-C isoform in oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 189:475-480.
- Hoffmann S, Maschuw K, Hassan I, Reckzeh B, Wunderlich A, Lingelbach S, Zielke A (2005) Differential pattern of integrin receptor expression in differentiated and anaplastic thyroid cancer cell lines. *Thyroid* 15:1011-1020.
- Hommell-Fontaine J, Borda A, Ragage F, Berger N, Decaussin-Petrucci M (2010) Nonconventional papillary thyroid carcinomas with pleomorphic tumor giant cells: a diagnostic pitfall with anaplastic carcinoma. *Virchows Arch* 456:661-670.
- Horiguchi H, Yamagata S, Rong Qian Z, Kagawa S, Sakashita N (2013) Thrombospondin-1 is highly expressed in desmoplastic components of invasive ductal carcinoma of the breast and associated with lymph node metastasis. *J Med Invest* 60:91-96.
- Hotte SJ, Winqvist EW, Stitt L, Wilson SM, Chambers AF (2002) Plasma osteopontin: associations with survival and metastasis to bone in men with hormone-refractory prostate carcinoma. *Cancer* 95:506-512.
- Hundahl SA, Cady B, Cunningham MP, Mazzaferri E, McKee RF, Rosai J, Shah JP, Fremgen AM, Stewart AK, Hölzer S (2000) Initial results from a prospective cohort study of 5583 cases of thyroid carcinoma treated in the united states during 1996. U.S. and German Thyroid Cancer Study Group. An American College of Surgeons Commission on Cancer Patient Care Evaluation study. *Cancer* 89:202-217.
- Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR (1998) A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995. *Cancer* 83:2638-2648.
- Hyder SM, Liang Y, Wu J (2009) Estrogen regulation of thrombospondin-1 in human breast cancer cells. *Int J Cancer* 125:1045-1053.
- Ignatz RA, Endo T, Massagui J (1987) Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 262:6443-6446.
- Ikeda Y, Mori M, Kajiyama K, Haraguchi Y, Sasaki O, Sugimachi K (1995) Immunohistochemical expression of tenascin in normal stomach tissue, gastric carcinomas and gastric carcinoma in lymph nodes. *Br J Cancer* 72:189-192.
- Imamura Y, Jin L, Grande JP, Li CY, Zheng TR, Erickson LA, Lloyd RV (1998) Analysis of TGF-B and TGF-B-RII in Thyroid Neoplasms from the United States, Japan, and China. *Endocr Pathol* 9:209-216.
- Ioachim E, Michael MC, Salmas M, Damala K, Tsanou E, Michael MM, Malamou-Mitsi V, Stavropoulos NE (2006) Thrombospondin-1 expression in urothelial carcinoma: prognostic significance and association with p53 alterations, tumor angiogenesis and extracellular matrix components. *BMC Cancer* 6:140.
- Ishihara A, Yoshida T, Tamaki H, Sakakura T (1995) Tenascin expression in cancer cells and stroma of human breast cancer and its prognostic significance. *Clin Cancer Res* 1:1035-1041.
- Ito N, Yokota M, Nagaike C, Morimura Y, Hatake K, Tanaka O, Matsunaga T (1996) Simultaneous expression of keratan sulphate epitope (a sulphated poly-N-acetyllactosamine) and blood group ABH antigens in papillary carcinomas of the human thyroid gland. *Histochem J* 28:613-623.
- Ito Y, Miyauchi A (2009) Prognostic factors and therapeutic strategies for differentiated carcinomas of the thyroid. *Endocr J* 56:177-192.
- Jaffe EA, Ruggiero JT, Leung LK, Doyle MJ, McKeown-Longo PJ, Mosher DF (1983) Cultured human fibroblasts synthesize and secrete thrombospondin and incorporate it into extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:998-1002.

- Jasani B, Wyllie FS, Wright PA, Lemoine NR, Williams ED, Wynford-Thomas D (1990) Immunocytochemically detectable TGF-beta associated with malignancy in thyroid epithelial neoplasia. *Growth Factors* 2:149-155.
- Jaskiewicz K, Chasen MR, Robson SC (1993) Differential expression of extracellular matrix proteins and integrins in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease. *Anticancer Res* 13:2229-2237.
- Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL, Bouck N (2000) Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med* 6:41-48.
- John AS, Rothman VL, Tuszynski GP (2010) Thrombospondin-1 (TSP-1) stimulates expression of integrin alpha6 in human breast carcinoma cells: A downstream modulator of TSP-1-induced cellular adhesion. *J Oncol* 2010:645376.
- Jones FS, Jones PL (2000) The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn* 218:235-259.
- Jones JL, Critchley DR, Walker RA (1992) Alteration of stromal protein and integrin expression in breast—a marker of premalignant change? *J Pathol* 167:399-406.
- Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP (2007) Collagens at a glance. *J Cell Sci* 120:1955-1958.
- Kahles F, Findeisen HM, Bruemmer D (2014) Osteopontin: A novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes. *Mol Metab* 3:384-393.
- Kalluri R, Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119:1420-1428.
- Kang KH (2013) Osteopontin expression in papillary thyroid carcinoma and its relationship with the BRAF mutation and tumor characteristics. *J Korean Surg Soc* 84:9-17.
- Kasper HU, Ebert M, Malferteiner P, Roessner A, Kirkpatrick CJ, Wolf HK (2001) Expression of thrombospondin-1 in pancreatic carcinoma: correlation with microvessel density. *Virchows Arch* 438:116-120.
- Kasugai S, Zhang Q, Overall CM, Wrana JL, Butler WT, Sodek J (1991) Differential regulation of the 55 and 44 kDa forms of secreted phosphoprotein 1 (SPP-1, osteopontin) in normal and transformed rat bone cells by osteotropic hormones, growth factors and a tumor promoter. *Bone Miner* 13:235-250.
- Kato Y, Hayatsu N, Kaneko MK, Ogasawara S, Hamano T, Takahashi S, Nishikawa R, Matsutani M, Mishima K, Narimatsu H (2008) Increased expression of highly sulfated keratan sulfate synthesized in malignant astrocytic tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 369:1041-1046.
- Kazerounian S, Yee KO, Lawler J (2008) Thrombospondins in cancer. *Cell Mol Life Sci* 65700-65712.
- Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB (2002) Structure and function of aggrecan. *Cell Res* 12:19-32.
- Kiani C, Lee V, Cao L, Chen L, Wu Y, Zhang Y, Adams ME, Yang BB (2001) Roles of aggrecan domains in biosynthesis, modification by glycosaminoglycans and product secretion. *Biochem J* 354:199-207.
- Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA (2002) Elastic fibres. *J Cell Sci* 115:2817-2828.
- Kim SA, Kang JH, Cho I, Bae SW, Hong KJ (2001) Cell-type specific regulation of thrombospondin-1 expression and its promoter activity by regulatory agents. *Exp Mol Med* 33:117-123.

Klöppel G, Saeger W, Böhm N, Oberholzer MJ, Riede UN: Endokrines System. In: Riede UN, Werner M, Schäfer HE (Hrsg): Allgemeine und spezielle Pathologie, 5. Aufl. Thieme, Stuttgart, 2004, S. 1018-1022.

Koelling S, Clauditz TS, Kaste M, Miosge N (2006) Cartilage oligomeric matrix protein is involved in human limb development and in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 8:R56.

Köhler W, Schachtel G, Voleske P: Biostatistik-eine Einführung für Biologen und Agrarwissenschaftler. 5. Aufl. Springer, Berlin-Heidelberg, 2012, S.137.

Koli K, Lohi J, Hautanen A, Keski-Oja J (1991) Enhancement of vitronectin expression in human HepG2 hepatoma cells by transforming growth factor-beta 1. *Eur J Biochem* 199:337-345.

Korkola JE, DeVries S, Fridlyand J, Hwang ES, Estep AL, Chen YY, Chew KL, Dairkee SH, Jensen RM, Waldman FM (2003) Differentiation of lobular versus ductal breast carcinomas by expression microarray analysis. *Cancer Res* 63:7167-7175.

Krusius T, Finne J, Margolis RK, Margolis RU (1986) Identification of an O-glycosidic mannose-linkend sialylated tetrasaccharide and keratan sulfate oligosaccharides in the chondroitin-proteoglycan of brain. *J Biol Chem* 261:8237-8242.

Lawler J, Duquette M, Urry L, McHenry K, Smith TF (1993) The evolution of the thrombospondin gene family. *J Mol Evol* 36:509-516.

Leahy DJ, Hendrickson WA, Aukhil I, Erickson HP (1992) Structure of a fibronectin type III domain from tenascin phased by MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Science* 258:987-991.

Leiner KA, Newman D, Li CM, Walsh E, Khosla J, Sannes PL (2006) Heparin and fibroblast growth factors affect surfactant protein gene expression in type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35:611-618.

Lethias C, Descollonges Y, Boutillon MM, Garrone R (1996) Flexilin: a new extracellular matrix glycoprotein localized on collagen fibrils. *Matrix Biol* 15:11-19.

Liau G, Chan LM (1989) Regulation of extracellular matrix RNA levels in cultured smooth muscle cells. Relationship to cellular quiescence. *J Biol Chem* 264:10315-10320.

Long CJ, Roth MR, Tasheva ES, Funderburgh M, Smit R, Conrad GW, Funderburgh JL (2000) Fibroblast growth factor-2 promotes keratan sulfate proteoglycan expression by keratocytes in vitro. *J Biol Chem* 275:13918-13923.

Lotz MM, Burdsal CA, Erickson HP, McClay DR (1989) Cell adhesion to fibronectin and tenascin: quantitative measurements of initial binding and subsequent strengthening response. *J Cell Biol* 109:1795-1805.

Mackie EJ, Scott-Burden T, Hahn AW, Kern F, Bernhardt J, Regenass S, Weller A, Bühler FR (1992) Expression of tenascin by vascular smooth muscle cells. Alterations in hypertensive rats and stimulation by angiotensin II. *Am J Pathol* 141:377-388.

Mackie EJ, Ramsey S (1996) Expression of tenascin in joint-associated tissues during development and postnatal growth. *J Anat* 188:157-165.

Magro G, Perissinotto D, Schiappacassi M, Goletz S, Otto A, Müller EC, Bisceglia M, Brown G, Ellis T, Grasso S, Colombatti A, Perris R (2003) Proteomic and postproteomic characterization of keratan sulfate-glycanated isoforms of thyroglobulin and transferrin uniquely elaborated by papillary thyroid carcinomas. *Am J Pathol* 163:183-196.

Mann K (2002) Diagnostik und Therapie differenzierter Schilddrüsenkarzinome. *Internist* 43:174-185.

- Margolis RK, Rauch U, Maurel P, Margolis RU (1996) Neurocan and phosphacan: two major nervous tissue-specific chondroitin sulfate proteoglycans. *Perspect Dev Neurobiol* 3:273-290.
- Marsh T, Pietras K, McAllister SS (2013) Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1832:1070-1078.
- Marti U, Ruchti C, Kämpf J, Thomas GA, Williams ED, Peter HJ, Gerber H, Bürgi U (2001) Nuclear localization of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptors in human thyroid tissues. *Thyroid* 11:137-145.
- McCachren SS, Lightner VA (1992) Expression of human tenascin in synovitis and its regulation by interleukin-1. *Arthritis Rheum* 35:1185-1196.
- McIver B, Hay IA, Giuffrida DF, Dvorak CE, Grant CS, Thompson GB, van Heerden JA, Goellner JR (2001) Anaplastic thyroid carcinoma: A 50 year experience at a single institution. *Surgery* 130:1028-1034.
- Meredith JE, Winitz F, Lewis JM, Hess S, Ren XD, Renshaw MW, Schwartz MA (1996) The regulation of growth and intracellular signaling by integrins. *Endocr Rev* 17:207-220.
- Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT (2015) Complement system part II: role in immunity. *Front Immunol* 6:257.
- Milis L, Morris CA, Sheehan MC, Charlesworth JA, Pussell BA (1993) Vitronectin-mediated inhibition of complement: evidence for different binding sites for C5b-7 and C9. *Clin Exp Immunol* 92:114-119.
- Misenheimer TM, Mosher DF (2005) Biophysical characterization of the signature domains of thrombospondin-4 and thrombospondin-2. *J Biol Chem* 280:41229-41235.
- Mueller MM, Fusenig NE (2004) Friends or foes-bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 4:839-849.
- Mumby SM, Abbott-Brown D, Raugi GJ, Bornstein P (1984) Regulation of thrombospondin secretion by cells in culture. *J Cell Physiol* 120:280-288.
- Murphy-Ullrich JE (2001) The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *J Clin Invest* 107:785-790.
- Murphy-Ullrich JE, Hook M (1989) Thrombospondin modulates focal adhesions in endothelial cells. *J Cell Biol* 109:1309-1319.
- Naganuma H, Satoh E, Kawataki T, Amagasaki K, Satoh H, Nukui H (2003) Cell density regulates thrombospondin-1 production in malignant glioma cells. *J Neurooncol* 63:147-153.
- Nieduszynski IA, Huckerby TN, Dickenson JM, Brown GM, Tai GH, Morris HG, Eady S (1990) There are two major types of skeletal keratan sulphates. *Biochem J* 271:243-245.
- Nies DE, Hemesath TJ, Kim J, Gulcher JR, Stefansson K (1991) The complete cDNA sequence of human hexabrachion (tenascin). *J Biol Chem* 266:2818-2823.
- Noda M, Rodan GA (1987) Type beta transforming growth factor (TGF beta) regulation of alkaline phosphatase expression and other phenotype-related mRNAs in osteoblastic rat osteosarcoma cells. *J Cell Physiol* 133:426-437.
- Noda M, Vogel RL, Craig AM, Prah J, DeLuca HF, Denhardt DT (1990) Identification of a DNA sequence responsible for binding of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor and 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhancement of mouse secreted phosphoprotein 1 (SPP-1 or osteopontin) gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:9995-9999.
- Noda M, Yoon K, Prince CW, Butler WT, Rodan GA (1988) Transcriptional regulation of osteopontin production in rat osteosarcoma cells by type beta transforming growth factor. *J Biol Chem* 263:13916-13921.

- Nor JE, Mitra RS, Sutorik MM, Mooney DJ, Castle VP, Polverini PJ (2000) Thrombospondin-1 induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis by activating the caspase death pathway. *J Vasc Res* 37:209-218.
- Nucera C, Porrello A, Antonello ZA, Mekel M, Nehs MA, Giordano TJ, Gerald D, Benjamin LE, Priolo C, Puxeddu E, Finn S, Jarzab B, Hodin RA, Pontecorvi A, Nose V, Lawler J, Parangi S (2010) B-Raf(V600E) and thrombospondin-1 promote thyroid cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:10649-10654.
- Ohtani Y, Kijima H, Dowaki S, Kashiwagi H, Tobita K, Tsukui M, Tanaka Y, Tsuchida T, Tokunaga T, Yamazaki H, Nakamura M, Ueyama Y, Tanaka M, Tajima T, Makuuchi H (1999) Stromal expression of thrombospondin-1 is correlated with growth and metastasis of human gallbladder carcinoma. *Int J Oncol* 15:453-457.
- Okamoto M, Ono M, Uchiumi T, Ueno H, Kohno K, Sugimachi K, Kuwano M (2002) Up-regulation of thrombospondin-1 gene by epidermal growth factor and transforming growth factor beta in human cancer cells-transcriptional activation and messenger RNA stabilization. *Biochim Biophys Acta* 1574:24-34.
- Orend G, Chiquet-Ehrismann R (2000) Adhesion modulation by antiadhesive molecules of the extracellular matrix. *Exp Cell Res* 261:104-110.
- Orend G, Chiquet-Ehrismann R (2006) Tenascin-C induced signaling in cancer. *Cancer Letters* 244:143-163.
- Patey M, Delemer B, Bellon G, Martiny L, Pluot M, Haye B (1999) Immunohistochemical study of thrombospondin and its receptors alpha root of beta 3 and CD36 in normal thyroid and in thyroid tumours. *J Clin Pathol* 52:895-900.
- Pazaitou-Panayiotou K, Mygdakos N, Boglou K, Kiziridou A, Chrisoulidou A, Destouni C (2010) The immunocytochemistry is a valuable tool in the diagnosis of papillary thyroid cancer in FNA's using liquid-based cytology. *J Oncol* 2010:963926.
- Pearson CA, Pearson D, Shibahara S, Hofsteenge J, Chiquet-Ehrismann R (1988) Tenascin: cDNA cloning and induction by TGF- β . *EMBO J* 7:2977-2981.
- Penttinen RP, Kobayashi S, Bornstein P (1988) Transforming growth factor beta increases mRNA for matrix proteins both in the presence and in the absence of changes in mRNA stability. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:1105-1108.
- Pfannenstiel P, Saller B: *Schilddrüsenkrankheiten-Diagnose und Therapie*. 2. Aufl. Berliner Medizinische Verlagsanstalt, Berlin, 1991, S. 182-183.
- Pfannenstiel P, Saller B, Hotze LA: *Schilddrüsenkrankheiten - Diagnose und Therapie*. 3. Aufl. Berliner Medizinische Verlagsanstalt, Berlin, 1997, S. 268-270.
- Philip S, Bulbule A, Kundu GC (2001) Osteopontin stimulates tumor growth and activation of promatrix metalloproteinase-2 through nuclear factor-kappa B-mediated induction of membrane type 1 matrix metalloproteinase in murine melanoma cells. *J Biol Chem* 276:44926-44935.
- Podack ER, Preissner KT, Müller-Eberhard HJ (1984) Inhibition of C9-Polymerization within the SC5b-9 complex of complement by S-protein. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Suppl* 284:89-96.
- Pola C, Formenti SC, Schneider RJ (2013) Vitronectin- $\alpha\beta 3$ integrin engagement directs hypoxia-resistant mTOR activity and sustained protein synthesis linked to invasion by breast cancer cells. *Cancer Res* 73:4571-4578.
- Poon RT, Chung KK, Cheung ST, Lau CP, Tong SW, Leung KL, Yu WC, Tuszynski GP, Fan ST (2004) Clinical significance of thrombospondin 1 expression in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 10:4150-4157.

- Preissner KT, Wassmuth R, Müller-Berghaus G (1985) Physicochemical characterization of human S-protein and its function in the blood coagulation system. *Biochem J* 231:349-355.
- Rana B, Mischoulon D, Xie Y, Bucher NL, Farmer SR (1994) Cell-extracellular matrix interactions can regulate the switch between growth and differentiation in rat hepatocytes: reciprocal expression of C/EBP alpha and immediate-early growth response transcription factors. *Mol Cell Biol* 14:5858-5869.
- Rathjen FG, Wolff JM, Chiquet-Ehrismann R (1991) Restrictin: a chick neural extracellular matrix protein involved in cell attachment co-purifies with the cell recognition molecule F11. *Development* 113:151-164.
- Raue F, Frank-Raue F (2005) Diagnostik des Schilddrüsenkarzinoms. *Onkologe* 11:50-57.
- Reiners C, Schumm-Draeger PM, Geling M, Mastbaum C, Schönberg J, Laue-Savic A, Hackethal K, Hampel R, Heinken U, Kullak W, Linke R, Uhde W (2003) Schilddrüsenultraschallscreening (Initiative Papillon). *Internist* 44:412-419.
- Renkawitz R, Leers J: Regulationsmechanismen der Transkription in Eukaryonten. In: Ganten D, Ruckpaul K (Hrsg): *Grundlagen der Molekularen Medizin*, 3. Aufl. Springer 2008, Heidelberg, S. 121-138.
- Rettig WJ, Erickson HP, Albino AP, Garin-Chesa P (1994) Induction of human tenascin (neuronectin) by growth factors and cytokines: cell type-specific signals and signalling pathways. *J Cell Sci* 107:487-497.
- Reuning U (2011) Integrin $\alpha\beta 3$ promotes vitronectin gene expression in human ovarian cancer cells by implicating rel transcription factors. *J Cell Biochem* 112:1909-1919.
- Rahbari R, Zhang L, Kebebew E (2010) Thyroid cancer gender disparity. *Future Oncol* 6:1771-1779.
- Rüegg CR, Chiquet-Ehrismann R, Alkan SS (1989) Tenascin, an extracellular matrix protein, exerts immunomodulatory activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7437-7441.
- Saeki Y, Mima T, Ishii T, Ogata A, Kobayashi H, Ohshima S, Ishida T, Tabunoki Y, Kitayama H, Mizuki M, Katada Y, Asaoku H, Kitano M, Nishimoto N, Yoshizaki K, Maeda M, Kon S, Kinoshita N, Uede T, Kawase I (2003) Enhanced production of osteopontin in multiple myeloma: clinical and pathogenic implications. *Br J Haematol* 123:263-270.
- Sage EH, Bornstein P (1991) Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. SPARC, tenascin, and thrombospondin. *J Biol Chem* 266:14831-14834.
- Saggiorato E, De Pompa R, Volante M, Cappia S, Arecco F, Dei Tos AP, Orlandi F, Papotti M (2005) Characterization of thyroid 'follicular neoplasms' in fine-needle aspiration cytological specimens using a panel of immunohistochemical markers: a proposal for clinical application. *Endocr Relat Cancer* 12:305-317.
- Sakai T, Kawakatsu H, Hirota N, Yokoyama T, Sakakura T, Saito M (1993) Specific expression of tenascin in human colonic neoplasms. *Br J Cancer* 67:1058-1064.
- Sakai T, Kawakatsu H, Ohta M, Saito M (1994) Tenascin induction in tenascin nonproducing carcinoma cell lines in vivo and by TGF-beta 1 in vitro. *J Cell Physiol* 159:561-572.
- Sakai T, Ohta M, Furukawa Y, Saga Y, Aizawa S, Kawakatsu H, Saito M (1995) Tenascin-C induction by the diffusible factor epidermal growth factor in stromal-epithelial interactions. *J Cell Physiol* 165:18-29.
- Sakamoto A, Kasai N, Sugano H (1983) Poorly differentiated carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic entity for a high risk group of papillary and follicular carcinomas. *Cancer* 52:1849-1855.
- Sangaletti S, Colombo MP (2008) Matricellular proteins at the crossroad of inflammation and cancer. *Cancer Lett* 267:245-253.

- Scarpino S, Di Napoli A, Taraboletti G, Cancrini A, Ruco LP (2005) Hepatocyte growth factor (HGF) downregulates thrombospondin 1 (TSP-1) expression in thyroid papillary carcinoma cells. *J Pathol* 205:50-56.
- Scheiden R, Keipes M, Bock C, Dippel W, Kieffer N, Capesius C (2006) Thyroid cancer in Luxembourg: a national population based data report (1983-1999). *BMC Cancer* 6:102.
- Schmid KW (2008) Knoten in der Schilddrüse-histologische und zytologische Diagnostik. *Nuklearmedizin* 31:203-208.
- Schmid KW, Sheu SY, Görges R, Ensinger C, Tötsch M (2003) Tumoren der Schilddrüse. *Pathologie* 24:357-372.
- Schmid KW, Sheu SY, Tötsch M, Görges R, Bockisch A, Mann A (2005) Pathologie des Schilddrüsenkarzinoms. *Onkologie* 11:29-39.
- Schwartz I, Seger D, Shaltiel S (1999) Vitronectin. *IJBCB* 31:539-544.
- Seiffert D, Curriden SA, Jenne D, Binder BR, Loskutoff DJ (1996) Differential regulation of vitronectin in mice and humans in vitro. *J Biol Chem* 271:5474-5480.
- Seong GJ, Hong S, Jung SA, Lee JJ, Lim E, Kim SJ, Lee JH (2009) TGF-beta-induced interleukin-6 participates in transdifferentiation of human Tenon's fibroblasts to myofibroblasts. *Mol Vis* 15:2123-2128.
- Serlin DM, Kuang PP, Subramanian M, O'Regan A, Li X, Berman JS, Goldstein RH (2006) Interleukin-1beta induces osteopontin expression in pulmonary fibroblasts. *J Cell Biochem* 97:519-529.
- Sharifi BG, LaFleur DW, Pirola CJ, Forrester JS, Fagin JA (1992) Angiotensin II regulates tenascin gene expression in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 267:23910-23915.
- Shi YB, Li Q, Damjanovski S, Amano T, Ishizuya-Oka A (1998) Regulation of apoptosis during development: input from the extracellular matrix. *Int J Mol Med* 2:273-282.
- Shimizu S, Miyamoto Y, Hayashi M (2002) Cell-type dependency of two Foxa/HNF3 sites in the regulation of vitronectin promoter activity. *Biochim Biophys Acta* 1574:337-344.
- Sid B, Sartelet H, Bellon G, El Btaouri H, Rath G, Delorme N, Haye B, Martiny L (2004) Thrombospondin 1: a multifunctional protein implicated in the regulation of tumor growth. *Crit Rev Oncol Hematol* 49:245-258.
- Snow DM, Steindler DA, Silver J (1990) Molecular and cellular characterization of the glial roof plate of the spinal cord and optic tectum: a possible role for a proteoglycan in the development of an axon barrier. *Dev Biol* 138:359-376.
- Sodek J, Ganss B, McKee MD (2000) Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 11:279-303.
- Sprague BL, Warren Andersen S, Trentham-Dietz A (2008) Thyroid cancer incidence and socioeconomic indicators of health care access. *Cancer Causes Control* 19:585-593.
- Sriramarao P, Bourdon MA (1993) A novel tenascin type III repeat is part of a complex of tenascin mRNA alternative splices. *Nucleic Acids Res* 21:163-168.
- Sternlicht MD, Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:463-516.
- Suzuki S, Oldberg A, Hayman EG, Pierschbacher MD, Ruoslahti E (1985) Complete amino acid sequence of human vitronectin deduced from cDNA. Similarity of cell attachment sites in vitronectin and fibronectin. *EMBO J.* 1985 4:2519-2524.
- Takahashi K, Stamenkovic I, Cutler M, Dasgupta A, Tanabe KK (1996) Keratan sulfate modification of CD44 modulates adhesion to hyaluronate. *J Biol Chem* 271:9490-9496.

- Talts JF, Weller A, Timpl R, Ekblom M, Ekblom P (1995) Regulation of mesenchymal extracellular matrix protein synthesis by transforming growth factor- β and glucocorticoids in tumor stroma. *J Cell Sci* 108:2153-2162.
- Tandon N, Yan SL, Morgan BP, Weetman AP (1994) Expression and function of multiple regulators of complement activation in autoimmune thyroid disease. *Immunology* 81:643-647.
- Taraboletti G, Roberts D, Liotta LA, Giavazzi R (1990) Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility and growth: a potential angiogenesis regulatory factor. *J Cell Biol* 111:765-772.
- Teramoto H, Castellone MD, Malek RL, Letwin N, Frank B, Gutkind JS, Lee NH (2005) Autocrine activation of an osteopontin-CD44-Rac pathway enhances invasion and transformation by H-RasV12. *Oncogene* 24:489-501.
- Tomasini-Johansson BR, Sundberg C, Lindmark G, Gailit JO, Rubin K (1994) Vitronectin in colorectal adenocarcinoma-synthesis by stromal cells in culture. *Exp Cell Res* 214:303-312.
- Tringler B, Grimm C, Sliutz G, Leodolter S, Speiser P, Reinthaller A, Hefler LA (2005) Immunohistochemical expression of thrombospondin-1 in invasive vulvar squamous cell carcinoma. *Gynecol Oncol* 99:80-83.
- Tseleni-Balafouta S, Gakiopoulou H, Fanourakis G, Voutsinas G, Balafoutas D, Patsouris E (2006) Tenascin-C protein expression and mRNA splice variants in thyroid carcinoma. *Exp Mol Pathol* 80:177-182.
- Tuck AB, O'Malley FP, Singhal H, Harris JF, Tonkin KS, Kerkvliet N, Saad Z, Doig GS, Chambers AF (1998) Osteopontin expression in a group of lymph node negative breast cancer patients. *Int J Cancer* 79:502-508.
- Tucker RP, Hammarback JA, Jenrath DA, Mackie EJ, Xu Y (1993) Tenascin expression in the mouse: in situ localization and induction in vitro by bFGF. *J Cell Sci* 104:69-76.
- Tuttle RM, Haugen B, Perrier ND (2017) Updated American Joint Committee on Cancer/Tumor-Node-Metastasis Staging System for Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancer (Eighth Edition): What Changed and Why? *Thyroid* 27:751-756.
- van der Laan BF, Freeman JL, Asa SL (1995) Expression of growth factors and growth factor receptors in normal and tumorous human thyroid tissues. *Thyroid* 5:67-73.
- Varga J, Rosenbloom J, Jimenez SA (1987) Transforming growth factor beta (TGF beta) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem J* 247:597-604.
- Vassallo R, Kottom TJ, Standing JE, Limper AH (2001) Vitronectin and fibronectin function as glucan binding proteins augmenting macrophage responses to *Pneumocystis carinii*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25:203-211.
- Volante M, Collini P, Nikiforov YE, Sakamoto A, Kakudo K, Katoh R, Lloyd RV, LiVolsi VA, Papotti M, Sobrinho-Simoes M, Bussolatti G, Rosai J (2007) Poorly differentiated thyroid carcinoma: the Turin proposal for the use of uniform diagnostic criteria and an algorithmic diagnostic approach. *Am J Surg Pathol* 31:1256-1264.
- Volante M, Landolfi S, Chiusa L, Palestini N, Motta M, Codegone A, Torchio B, Papotti MG (2004) Poorly differentiated carcinomas of the thyroid with trabecular, insular and solid patterns: a clinicopathologic study of 183 patients. *Cancer* 100:950-957.
- Waltz DA, Natkin LR, Fujita RM, Wei Y, Chapman HA (1997) Plasmin and plasminogen activator inhibitor type 1 promote cellular motility by regulating the interaction between the urokinase receptor and vitronectin. *J Clin Invest* 100:58-67.

- Wang CQ, Sun HT, Gao XM, Ren N, Sheng YY, Wang Z, Zheng Y, Wei JW, Zhang KL, Yu XX, Zhu Y, Luo Q, Yang LY, Dong QZ, Qin LX (2016) Interleukin-6 enhances cancer stemness and promotes metastasis of hepatocellular carcinoma via up-regulating osteopontin expression. *Am J Cancer Res* 6:1873-1889.
- Weber P, Montag D, Schachner M, Bernhardt RR(1998) Zebrafish tenascin-W, a new member of the tenascin family. *J Neurobiol* 35:1-16.
- Weiß C, Rzany B: Basiswissen medizinische Statistik. 5. Aufl. Springer, Heidelberg, 2010, S. 213-214.
- Weiß C, Rzany B: Basiswissen medizinische Statistik. 6. Aufl. Springer, Berlin-Heidelberg, 2013, S. 162-174.
- Wittekind C, Meyer H: TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 7. Aufl. Wiley-VCH, Weinheim, 2010, S. 58-62.
- Woessner JF: The Matrix Metalloproteinase Family. In: Parks WC, Mecham RP (ed): *Matrix Metalloproteinases*. Academic Press, San Diego, 2004, pp. 1-14.
- Xu K, Zhang Y, Ilalov K, Carlson CS, Feng JQ, Di Cesare PE, Liu CJ (2007) Cartilage oligomeric matrix protein associates with granulin-epithelin precursor (GEP) and potentiates GEP-stimulated chondrocyte proliferation. *J Biol Chem* 282:11347-11355.
- Yamakawa M, Yamada K, Tsuge T, Ohru H, Ogata T, Dobashi M, Imai Y (1994) Protection of thyroid cancer cells by complement-regulatory factors. *Cancer* 73:2808-2817.
- Yin J, Sakamoto K, Zhang H, Ito Z, Imagama S, Kishida S, Natori T, Sawada M, Matsuyama Y, Kadomatsu K (2009) Transforming growth factor-beta1 upregulates keratan sulfate and chondroitin sulfate biosynthesis in microglia after brain injury. *Brain Res* 1263:10-22.
- Yoshida A, Asaga T, Masuzawa C, Kawahara S, Yanoma S, Harada M, Okamoto T (1994) Production of cytokines by thyroid carcinoma cell lines. *J Surg Oncol* 55:104-107.
- Yoshida T, Yoshimura E, Numata H, Sakakura Y, Sakakura T (1999) Involvement of tenascin-C in proliferation and migration of laryngeal carcinoma cells. *Virchows Arch* 435:496-500.
- Young GD, Murphy-Ullrich JE (2004) The tryptophan-rich motifs of the thrombospondin type 1 repeats bind VLAL motifs in the latent transforming growth factor-beta complex. *J Biol Chem* 279:47633-47642.
- Zhou D, Munster A, Winchurch RA (1991) Pathologic concentrations of interleukin 6 inhibit T cell responses via induction of activation of TGF-beta. *FASEB J* 5:2582-2585.
- Zhu X, Assoian RK (1995) Integrin-dependent activation of MAP kinase: a link to shape-dependent cell proliferation. *Mol Biol Cell* 6:273-282.
- Zubac DP, Bostad L, Kihl B, Seidal T, Wentzel-Larsen T, Haukaas SA (2009) The expression of thrombospondin-1 and p53 in clear cell renal cell carcinoma: its relationship to angiogenesis, cell proliferation and cancer specific survival. *J Urol* 182:2144-2149.

7 Thesen

1. Die histologische Differenzierung der Schilddrüsenkarzinome wird durch einander zum Teil überlappende histologische und zytologische Kriterien erschwert. Die Differentialdiagnostik kann durch immunhistochemische Untersuchungen verbessert werden.
2. Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix unterscheidet sich in Abhängigkeit vom Tumortyp. Ihre Analyse kann Rückschlüsse auf den Tumortyp ermöglichen.
3. Follikuläre, papilläre und undifferenzierte Schilddrüsenkarzinome unterscheiden sich hinsichtlich des Vorkommens von fünf Matrixbestandteilen, die typischerweise in Karzinomen enthalten sind.
4. Das Stroma der undifferenzierten Schilddrüsenkarzinome ist durch die Expression von Thrombospondin und das Fehlen von Keratansulfat gekennzeichnet.
5. In papillären Schilddrüsenkarzinomen kommt Keratansulfat häufiger im Stroma vor als in den anderen untersuchten histologischen Typen. Zudem enthalten sie Osteopontin häufiger in den Tumorzellen als undifferenzierte und Tenascin häufiger im Stroma als follikuläre Karzinome.
6. Die Expression von Tenascin in Tumorzellen, von Osteopontin im Stroma sowie von Vitronektin eignet sich nicht als Unterscheidungskriterium zwischen den histologischen Typen des Schilddrüsenkarzinoms.
7. Differenzierte Schilddrüsenkarzinome enthalten Tenascin und Thrombospondin häufig gleichzeitig in den Tumorzellen.
8. Undifferenzierte Schilddrüsenkarzinome enthalten Osteopontin und Tenascin häufig gleichzeitig in den Tumorzellen.

8 Tabellenanhang

Tabelle 3: Patientenkollektiv UTC

Fall-Nr.	Geschlecht	Alter	Karzinomtyp	TNM-Stadium
1	m	63	UTC	pT4, N0, M0
2	w	62	UTC	pT4, Nx, Mx
3	w	72	UTC	pT4, N1, Mx
4	w	69	UTC	pT4, Nx, Mx
5	w	81	UTC	pT4, Nx, Mx
6	m	52	UTC	pT4, N1, M1
7	w	68	UTC	pT4, Nx, Mx
8	w	70	UTC	pT4, N0, Mx
9	m	66	UTC	pT4, N0, Mx
10	w	85	UTC	pT4, Nx, Mx
11	m	55	UTC	pT4, Nx, Mx
12	w	79	UTC	pT4, N1, Mx
13	w	49	UTC	pT4, N0, Mx
14	m	64	UTC	pT4, Nx, Mx
15	w	68	UTC	pT4, N0, Mx
16	w	69	UTC	pT4, Nx, Mx
17	m	65	UTC	pT4, N1, Mx
18	m	67	UTC	pT4, Nx, Mx
19	m	68	UTC	pT4, Nx, Mx
20	w	72	UTC	pT4, Nx, Mx
21	w	70	UTC	pT4, N1, Mx
22	m	68	UTC	pT4, Nx, Mx
23	m	49	UTC	pT4, N1, Mx
24	w	89	UTC	pT4, N0, Mx
25	w	70	UTC	pT4, Nx, Mx

Tabelle 4: Patientenkollektiv FTC

Fall-Nr.	Geschlecht	Alter	Karzinomtyp	TNM-Stadium
26	m	72	FTC	pT3, Nx, Mx
27	w	77	FTC	pT2, Nx, Mx
28	m	58	FTC	pT3, Nx, Mx
29	m	49	FTC	pT2, N0, Mx
30	m	60	FTC	pT3, N0, Mx
31	m	46	FTC	pT4, N1, Mx
32	w	61	FTC	pT4, Nx, Mx
33	w	60	FTC	pT3, Nx, Mx
34	w	48	FTC	pT1, Nx, Mx
35	w	74	FTC	pT2, Nx, Mx
36	w	79	FTC	pT3, Nx, Mx
37	w	59	FTC	pT1, Nx, Mx
38	m	74	FTC	pT3, Nx, Mx
39	w	46	FTC	pT2, Nx, Mx
40	m	68	FTC	pT2, Nx, Mx
41	w	74	FTC	pT4, Nx, Mx
42	m	50	FTC	pT4, N1, Mx
43	w	85	FTC	pT3, N1, Mx
44	w	41	FTC	pT4, N1, Mx
45	w	40	FTC	pT1, N0, Mx
46	w	62	FTC	pT3, Nx, Mx
47	m	57	FTC	pT3, N0, Mx
48	w	66	FTC	pT2, Nx, Mx
49	w	82	FTC	pT4, Nx, M1
50	w	63	FTC	pT1, N0, M0
51	m	66	FTC	pT1, N1, Mx
52	m	71	FTC	pT3, N0, Mx

Tabelle 5: Patientenkollektiv PTC

Fall-Nr.	Geschlecht	Alter	Karzinomtyp	TNM-Stadium
53	w	40	PTC	pT1, N1, Mx
54	w	69	PTC	pT1, Nx, Mx
55	w	11	PTC	pT4, N1, Mx
56	m	60	PTC	pT1, Nx, Mx
57	w	52	PTC	unbekannt
58	m	56	PTC	pT1, Nx, Mx
59	w	81	PTC	pT3, N1, Mx
60	m	12	PTC	pT2, N1, Mx
61	w	25	PTC	pT4, N1, Mx
62	m	58	PTC	pT1, N1, Mx
63	m	35	PTC	pT2, N1, Mx
64	w	48	PTC	pT2, N0, Mx
65	w	7	PTC	pT4, N1, Mx
66	w	21	PTC	pT3, N1, Mx
67	w	86	PTC	pT3, N1, Mx
68	m	64	PTC	pT2, N1, Mx
69	w	53	PTC	pT3, N1, Mx
70	w	35	PTC	pT1, N0, Mx
71	m	67	PTC	pT1, Nx, Mx
72	w	57	PTC	pT2, Nx., Mx
73	w	42	PTC	pT1, Nx, Mx
74	m	51	PTC	pT3, N1, Mx
75	w	44	PTC	pT1, N1, Mx
76	m	63	PTC	unbekannt
77	w	12	PTC	pT1, N1, Mx
78	w	63	PTC	pT3, Nx, Mx
79	w	61	PTC	pT1, Nx, Mx
80	w	43	PTC	pT1, N0, Mx
81	m	52	PTC	pT3, N1, Mx
82	m	89	PTC	pT3, N1, Mx

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich, Andrea Halm, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt habe. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt. Das verwendete Schrifttum, sowie die Quellen anderer direkt und indirekt übernommener Daten und Konzepte sind vollständig erwähnt.

Berlin,

Andrea Halm

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich versichere, dass von mir, Andrea Halm, keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation erfolgt sind. Es wurde nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht.

Berlin,

Andrea Halm

Tabellarischer Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

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

Herrn Professor Dr. med. Steffen Hauptmann danke ich für die Überlassung des Themas, die freundliche Unterstützung bei der histologischen Auswertung und der Erstellung der Arbeit sowie für die Anfertigung exemplarischer Abbildungen der HE-Präparate und der UTC.

Ich danke Frau Prof. Dr. med. Claudia Wickenhauser, die den Abschluss der Arbeit ermöglicht hat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. rer. nat. Frank Bartel für die vielen hilfreichen Anregungen beim Schreiben der Arbeit, die stets schnelle und zuverlässige Durchsicht des Manuskripts sowie für sein Engagement bei der Erstellung der Fotos.

Ich bedanke mich des Weiteren herzlich bei Jana Beer, stellvertretend für alle MTAs, für ihre fachkundige Arbeit im Labor.

Mein größter Dank gebührt Alexander, der mir mit seinem Rat, seiner Geduld und seinem unermüdlichen Einsatz immer zur Seite stand.