

Aus dem Bereich Klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Quantitative Expressionsanalyse von TTF-1 in NSCLC und pulmonalen Metastasen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2018

vorgelegt von: Veit Bertram

geb. am: 25.04.1990 in Pirna

Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
1.1. Zusammenfassung.....	1
1.2 Abstract	3
2. Einleitung	5
2.1. Medizinische Entwicklung.....	5
2.2. TTF-1	10
2.2.1. Rolle und Expression	10
2.2.2. TTF-1 Protein- und Genstruktur.....	11
2.2.3. TTF-1 Promoter- und Gen-Regulation.....	11
2.2.4. Klinische Anwendung von TTF-1.....	12
2.2.5. TTF-1 Defizienz.....	13
2.2.6. TTF-1 in Lungenkrebs	14
2.3. Ziel dieser Arbeit.....	17
3. Material und Methoden	18
3.1. Untersuchungsmaterial.....	18
3.2. Auswahl Tumorgewebe.....	19
3.3. RNA-Isolierung.....	20
3.3.1. Hintergrund	20
3.3.2. Durchführung	20
3.4. Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	22
3.5. Reverse Transkription	23
3.6. Auswahl interne Kontrolle	24
3.7. Auswahl Kalibrator	25
3.8. Quantitative Real-time PCR.....	26
3.8.1. Hintergrund	26
3.8.2. Durchführung	27
3.9. Methodik der Quantifizierung.....	29
3.10. Immunhistochemie.....	30
3.10.1. Hintergrund	30
3.10.2. Durchführung	30
3.10.3. Beurteilung Reaktionsmuster	31
3.11. Statistische Analyse.....	34
4. Ergebnisse	36
4.1. Patientenkollektiv.....	36
4.2. Einteilung nach Stadium	38

4.3. Überleben	40
4.4. Übersicht klinisch-pathologischer Charakteristika	42
4.5. Ergebnisse der Immunhistologie	43
4.6. Ergebnisse der ▲▲C _T -Werte	49
4.7. ROC-Kurve zur Prädiktoren-Analyse	51
4.7.1. ROC-Kurve azinärer und solider pulmonaler Adenokarzinome	51
4.7.2. ROC-Kurve azinärer pulmonaler Adenokarzinome	52
4.7.3. ROC-Kurve solider pulmonaler Adenokarzinome	53
4.8. Berechnung des ▲▲C _T -Schwellenwert mittels Youden-Index.....	54
4.9. Vergleich der diagnostischen Techniken: qRT-PCR und Immunhistologie	58
4.9.1. Anwendung des ▲▲C _T -Schwellenwert für azinäre und solide pulmonale Adenokarzinome	58
4.9.1.1. Gegenüberstellung der Resultate aus qRT-PCR (Schwellenwert 300,14) und Immunhistologie.....	59
4.9.2. Anwendung des ▲▲C _T -Schwellenwert für azinäre pulmonale Adenokarzinome..	60
4.9.2.1. Gegenüberstellung der Resultate aus qRT-PCR (Schwellenwert 238,25) und Immunhistologie.....	61
4.9.3. Anwendung des ▲▲C _T -Schwellenwert für solide pulmonale Adenokarzinome ...	62
4.9.3.1. Gegenüberstellung der Resultate aus qRT-PCR (Schwellenwert 825,75) und Immunhistologie.....	63
4.9.4. Übersicht der Ergebnisse zur Unterscheidung zwischen TTF-1 positiv/negativ mittels der verschiedenen ▲▲C _T -Schwellenwerte	64
4.10. Überleben und Tumorstadium.....	65
4.10.1. Azinäre pulmonale Adenokarzinome	65
4.10.2. Solide pulmonale Adenokarzinome	65
4.10.3. Pulmonale Plattenepithelkarzinome	65
4.10.4. Pulmonale Metastasen eines colorektalen Adenokarzinoms	65
4.11. Überleben und Immunhistologie	66
4.11.1. Azinäre pulmonale Adenokarzinome	66
4.11.2. Solide pulmonale Adenokarzinome	67
4.11.3. Pulmonale Plattenepithelkarzinome und pulmonale Metastasen	68
4.12. Tumorstadium und TTF-1 Status anhand der Immunhistologie	69
4.12.1. Azinäre pulmonale Adenokarzinome	69
4.12.2. Solide pulmonale Adenokarzinome	69
4.12.3. Pulmonale Plattenepithelkarzinome und pulmonale Metastasen colorektaler Adenokarzinome	69
4.13. Tumorstadium und TTF-1 Status anhand der ▲▲C _T -Schwellenwerte	70

4.13.1. ▲▲C _T -Schwellenwert azinärer und solider pulmonaler Adenokarzinome (Schwellenwert 300,14)	70
4.13.2. ▲▲C _T -Schwellenwert azinärer pulmonaler Adenokarzinome (Schwellenwert 238,25)	70
4.13.3. ▲▲C _T -Schwellenwert solider pulmonaler Adenokarzinome (Schwellenwert 825,75)	71
4.14. Überleben und TTF-1 Status anhand der ▲▲C _T -Schwellenwerte.....	72
4.14.1. ▲▲C _T -Schwellenwert azinärer und solider pulmonaler Adenokarzinome (Schwellenwert 300,14)	72
4.14.2. ▲▲C _T -Schwellenwert azinärer pulmonaler Adenokarzinome (Schwellenwert 238,25)	76
4.14.3. ▲▲C _T -Schwellenwert solider pulmonaler Adenokarzinome (Schwellenwert 825,75)	78
4.15. Zusammenhang TTF-1 mRNA und Protein.....	81
4.15.1. Azinäre und solide pulmonale Adenokarzinome	81
4.15.2. Azinäre pulmonale Adenokarzinome	81
4.15.3. Solide pulmonale Adenokarzinome	81
4.16. Korrelationsanalyse zwischen klinischen und histopathologischen Parametern.....	82
5. Diskussion	83
5.1. Klinisch-pathologische Eigenschaften	88
5.1.1. Auswahl der Gewebeproben	88
5.1.2. Geschlechtsverteilung	88
5.1.3. Erkrankungsalter	88
5.1.4. Tumorstadium anhand der IASLC-Kriterien	89
5.1.5. Überleben	90
5.2. Immunhistologie	92
5.3. qRT-PCR.....	94
5.4. Diagnostische Gegenüberstellung von Adenokarzinomen und Nicht-Adenokarzinomen in der Lunge	95
5.5. Diagnostische Gegenüberstellung azinärer pulmonaler Adenokarzinome und pulmonaler Metastasen.....	97
5.6. Diagnostische Gegenüberstellung solider pulmonaler Adenokarzinome und pulmonaler Plattenepithelkarzinome	99
5.7. Prognostische Rolle von TTF-1	101
5.8. TTF-1 als Stadien-abhängiger Marker	102
5.9. Zusammenhang zwischen TTF-1 mRNA und TTF-1 Protein.....	103
5.10. Schlussfolgerungen	105
5.11. Ausblick in die Zukunft.....	107

5.12. Limitationen der Arbeit.....	109
6. Literaturverzeichnis.....	111
7. Abkürzungsverzeichnis	126
8. Abbildungsverzeichnis	130
9. Tabellenverzeichnis.....	133
10. Anhang	135
11. Danksagung.....	141

1. Zusammenfassung

1.1. Zusammenfassung

Hintergrund:

TTF-1 stellt einen sensitiven als auch hoch spezifischen Marker zur Diagnose von pulmonalen Adenokarzinomen und Schilddrüsenkarzinomen dar. (Boggaram 2009) In pulmonalen Adenokarzinomen wird TTF-1 in 62,5-90% der Fälle exprimiert. (Myong 2003; Moldvay et al. 2004) In der Routinediagnostik gibt es allerdings immer wieder Probleme bei der Differenzialdiagnose von TTF-1 negativen Fällen. Durch immunhistochemische TTF-1 Analyse pulmonaler Adenokarzinome konnte nachgewiesen werden, dass sich abhängig vom Differenzierungsgrad TTF-1 Expression und 5-Jahres-Überleben in den histologischen Untergruppen unterscheiden. (Sterlacci et al. 2012; Sousa et al. 2015)

Ziel:

Ziel der Studie war die diagnostische Sensitivität zur Erkennung pulmonaler Adenokarzinome zu steigern und mögliche Zusammenhänge zwischen TTF-1 mRNA- und Proteinebene zu korrelieren. Dazu untersuchten wir die TTF-1 mRNA mittels qRT-PCR anhand von 199 Feinnadel-mikrodissezierter Fälle.

Methoden:

Die Untersuchung von TTF-1 mRNA und Protein erfolgte mittels qRT-PCR und Immunhistologie (Klon: 8G7G3/1) in Formalin-fixiertem Paraffin-eingebetteten Tumorgewebe. Insgesamt untersuchten wir 51 azinäre (AC) und 50 solide (SOL) pulmonale Adenokarzinome. 49 pulmonale Plattenepithelkarzinome (SQCC) und 49 pulmonale Metastasen eines colorektalen Adenokarzinoms (pCRC) dienten als Kontrolle. Wir nutzten β 2M als Haushaltsgen und die qPCR Human Reference Total RNA von Agilent als Kalibrator. Der spezifische Primer (Hs00968940_m1, ThermoFisher Scientific) wurde zur Reversen Transkription der TTF-1 RNA in cDNA angewandt. Der TTF-1 Status wurde anhand eines $\Delta\Delta C_T$ -Schwellenwert in der ROC-Kurve bestimmt.

Resultate:

TTF-1 mRNA Expression ist am höchsten in AC und SOL. Die $\Delta\Delta C_T$ -Werte belaufen sich auf bis 23×10^3 . SQCC und pCRC zeigen signifikant niedrigere Werte auf. TTF-1 mRNA kann mit einer Sensitivität bzw. Spezifität von 82,2%/92,9% in pulmonalen Adenokarzinomen (Schwellenwert 300,14), 90%/85,7% in azinären Adenokarzinomen (Schwellenwert 238,25)

und 58%/98% in soliden Adenokarzinomen (Schwellenwert 825,75) nachgewiesen werden. 64,7% der AC und 60% der SOL stellen sich auf Proteinebene als TTF-1 positiv dar. In 21,8% der AC und SOL (Schwellenwert 300,14), 25,5% der AC (Schwellenwert 238,25) und 10% der SOL (Schwellenwert 825,75) ist TTF-1 Protein neg./mRNA pos.

TTF-1 mRNA und Protein lässt sich in AC und SOL signifikant korrelieren, sowie einen starken bzw. mittleren positiven Effekt nachweisen ($p_{\text{Gesamtkohorte}} = 0,00$; $r_{S; \text{Gesamtkohorte}} = 0,49$; $p_{\text{azinäre Adenokarzinome}} = 0,001$; $r_{S; \text{azinäre Adenokarzinome}} = 0,45$; $p_{\text{solide Adenokarzinoma}} = 0,00$; $r_{S; \text{solide Adenokarzinoma}} = 0,55$). Es konnte zwischen azinären und soliden pulmonalen Adenokarzinomen kein Zusammenhang zwischen der Abnahme des Differenzierungsgrad und dem Abfall der TTF-1 Expression auf Protein- und mRNA-Ebene nachgewiesen werden ($p_{\text{mRNA}} = 0,123$; $p_{\text{Protein}} = 0,684$).

Schlussfolgerung:

Abhängig vom verwendeten Schwellenwert erlaubt die Quantifizierung von TTF-1 mRNA den Gewinn zusätzlich tumorspezifischer Informationen in 21,8%, 25,5% und 10% der TTF-1 negativen pulmonalen Adenokarzinome. Die Quantifizierung der TTF-1mRNA aus Formalinfixiertem Paraffin-eingebettetem Gewebe kann als wertvolles diagnostisches Handwerkzeug zur möglichen Beschleunigung des klinischen Ablauf genutzt werden. Eine Zunahme der TTF-1 mRNA geht in pulmonalen Adenokarzinomen mit einer gesteigerten TTF-1 Proteinproduktion einher - und umgekehrt. Ein Zusammenhang zwischen der Abnahme des Differenzierungsgrad und dem Abfall der TTF-1 Expression ist nicht nachweisbar.

1.2 Abstract

Background:

TTF-1 is a sensitive and highly specific marker for the diagnosis of pulmonary adenocarcinoma and thyroid carcinoma. (Boggaram 2009) In pulmonary adenocarcinomas TTF-1 is expressed in 62,5-90% of the cases. (Myong 2003; Moldvay et al. 2004) Routine diagnostics frequently troubles with the differential diagnosis of TTF-1 negative cases. Grading according to predominant histologic architecture of pulmonary adenocarcinoma not only revealed different TTF-1 expression, but also distinct 5 year-survival. (Sousa et al. 2015; Sterlacci et al. 2012)

Objective:

The aim of this study was to enhance diagnostic sensitivity for the detection of primary pulmonary adenocarcinomas and to correlate possible links between TTF-1 mRNA and protein levels in pulmonary adenocarcinoma. Therefore we analysed TTF-1mRNA by qRT-PCR and needle microdissection in 199 cases.

Methods:

TTF-1 mRNA and protein were detected by qRT-PCR and immunohistochemistry (Clone: 8G7G3/1) in FFPE tumour tissues. Overall 51 acinar (AC) and 50 solid (SOL) pulmonary adenocarcinomas were analysed. 49 pulmonary squamous cell carcinomas (SQCC) and 49 pulmonary metastasis of colorectal adenocarcinomas (pCRC) served as controls. β 2M served as housekeeping gene, qPCR human reference total RNA from Agilent as the calibrator. TTF-1 RNA was reverse transcribed into cDNA using a specific reverse primer (Hs00968940_m1, ThermoFisher Scientific). TTF-1 status was determined by ROC-curve calculating a $\Delta\Delta C_T$ threshold.

Results:

TTF-1 mRNA expression is highest in AC and SOL. The $\Delta\Delta C_T$ values amount up to 23×10^3 . SCC and pCRC show significantly lower values. TTF-1 mRNA shows a sensitivity and specificity of 82,2%/92,9% in pulmonary adenocarcinoma (threshold 300,14), 90%/85,7% in acinar adenocarcinoma (threshold 238,25) and 58%/98% in solid adenocarcinoma (threshold 825,75). TTF-1 protein is positive in 64,7% of the AC's and in 60% of the SOL's. 21,8% of AC and SOL (threshold 300,14), 25,5% of AC (threshold 238,25) and 10% of SOL (threshold 825,75) are TTF-1 protein neg./mRNA pos.

In AC and SOL was a correlation between TTF-1 mRNA and protein by use of Spearman-rank-correlation exposed and a strong and intermediate positive effect calculated ($p_{\text{total cohort}} = 0,00$; r_S ;

total cohort= 0,49; $p_{\text{acinar adenocarcinoma}}=0,001$; $r_{S; \text{acinar adenocarcinoma}}=0,45$; $p_{\text{solid adenocarcinoma}}=0,00$; $r_{S; \text{solid adenocarcinoma}}=0,55$). There is no correlation between less differentiated adenocarcinoma and decrease of TTF-1 expression in acinar and solid adenocarcinoma ($p_{\text{mRNA}}=0,123$; $p_{\text{protein}}=0,684$).

Conclusion:

Depending on the threshold used, the quantification of TTF-1 mRNA gives additional tumour specific information in 21,8%, 25,5% or 10% of the TTF-1 negative pulmonary adenocarcinomas. Thus, TTF-1 transcript quantification from FFPE tumour tissue can be considered as a valuable diagnostic tool, potentially accelerating clinical procedures. An increase of TTF-1 mRNA in pulmonary adenocarcinoma is associated with a raising TTF-1 protein production - and vice versa. The consistent TTF-1 expression in moderate-differentiated and less-differentiated pulmonary adenocarcinoma indicates that expression is not affected by the differentiation state.

2. Einleitung

2.1. Medizinische Entwicklung

Seit Jahrzehnten haben sich medizinische Studien zur Entwicklung neuer Medikamente, Therapieansätze und der Diagnostik hauptsächlich auf die Proteine und DNA im menschlichen Körper konzentriert. Während die DNA als Träger der Erbinformationen den Bauplan der Zelle verwirklicht, üben Proteine vielfältige Funktionen im Stoffwechsel der Zelle aus. Die Erforschung beider hat zu den medizinischen Fortschritten und Entwicklungen geführt, wie wir sie bis dato kennen. Möglichkeiten für zukünftige Anwendungsbereiche der RNA hat man dabei lange vernachlässigt. Um die zahlreichen Zellabläufe zwischen DNA und der Bildung des einzelnen Proteins noch besser zu verstehen und Limitierungen der bisherigen Forschung zu überwinden, wird sich seit einiger Zeit vermehrt auf die Erforschung der RNA konzentriert.

Durch die Entdeckung der RNA in den 1950er und 1960er Jahren hat eine Gruppe von Wissenschaftlern um James E. Darnell die Grundlagen der Molekularbiologie gelegt. Anfangs ist die mRNA nur als eine Art Dienstbotenmolekül betrachtet worden, die mittels Basenabfolge der DNA eine verschlüsselte Kopie der genetischen Information der Zelle anfertigt und für die anschließende Übersetzung in die Aminosäuresequenz der Proteine bereit steht. Durch den Nachweis der verschiedenen RNA-Typen im Jahre 1971 (siehe Abb.1) ist dem einzelsträngigen RNA-Molekül als wichtiges Bindeglied zwischen den zahlreichen Signalkaskaden von Transkription und Translation letztendlich die Aufmerksamkeit zu teil geworden, die es verdient. (Scherrer 2003)

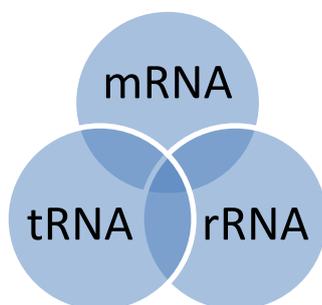


Abbildung 1: 1971 von James E. Darnell entdeckte RNA-Typen.

Überleben, Wachstum und Differenzierung sind zelluläre Entscheidungen, die sich auf ständig ändernde Genexpressionsmuster zurückführen lassen. Die Fähigkeit diese zu quantifizieren erlaubt einen Einblick ins Innere der Zelle, deren momentane Arbeitsabläufe und Zellaktivitäten. Dabei gibt es unterschiedliche Techniken, um mRNA zu quantifizieren: Northern Blotting, in situ Hybridisierung, RNase Protection Assays, cDNA Arrays und die Reverse Transkriptase-PCR. (Bustin 2000)

Seit Einführung der "quantitativen Real-time Polymerase-Kettenreaktion" (qPCR) hat sich die Technik zur Quantifizierung von Nukleinsäuren immens vereinfacht und verbessert und ist dadurch ein unschätzbare Werkzeug für viele Wissenschaftler in den verschiedensten Disziplinen geworden. Vorteile der qPCR sind eine hohe technische Sensitivität (<5 Kopien) und eine hohe Genauigkeit (<2% Standardabweichung). Nachträgliche post-PCR Schritte fallen weg und verhindern dadurch die Möglichkeit einer Kreuzkontamination. Dieser Vorteil hat insbesondere in den diagnostischen Feldern vermehrtes Interesse hervorgerufen. Kombiniert mit einer Verringerung der Wiederholungszeiten und den fallenden Kosten hat die Molekular Diagnostik eine Revolution erfahren. Wichtige Anwendungsbereiche sind heute die klinische Mikrobiologie, Onkologie und Genexpressionsanalyse. Die qPCR hat dieselbe Sensitivität wie die klassische Methode, ist aber weniger zeit- und arbeitsintensiv. Im Gegensatz zu den klassischen mikrobiologischen Untersuchung, kann die qPCR Nukleinsäuren von lebenden und toten Pathogenen erkennen und quantifizieren. Insbesondere der Befall durch Viren, Bakterien, Pilze und deren Nachweis sind heutige Anwendungsbereiche. In der Onkologie nutzt man die qPCR zur Detektion und Quantifizierung von chromosomalen Translokationen, um so MRD (minimal residual-disease) und Remissionsraten zu überwachen oder um Graft-versus-Host-Reaktionen in Lymphompatienten nachzuweisen. Vorausschauende Genanalysen und der Nachweis von relevanten Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNP's) sind ein weiterer Anwendungsbereich mit zukünftigem Potenzial. Der dritte große Anwendungsbereich der qPCR stellt die Quantifizierung von Genexpressionen dar (siehe Abb.2). (Klein 2002; Bustin 2000)

Die Einführung der qPCR in die Molekularbiologie hat den Nachweis von Nukleinsäuren vereinfacht und beschleunigt. Heute können enorme Mengen von Datensätzen in kürzester Zeit analysiert und ausgewertet werden. Diese zunehmend hochtechnisierte Medizin kommt durch eine beschleunigte Diagnostik auch dem Patienten entgegen. (Klein 2002; Bustin 2000)

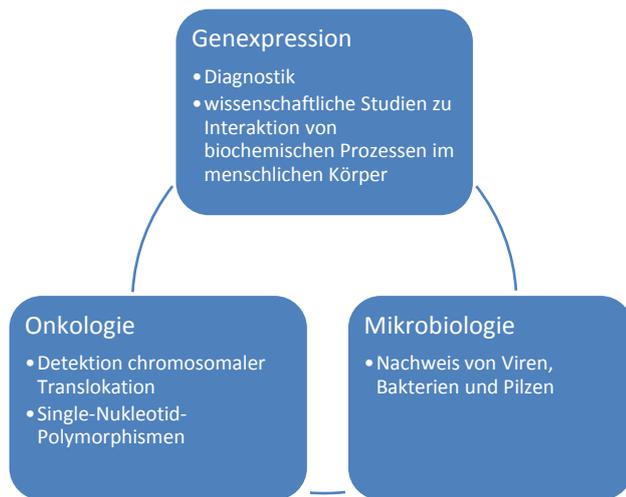


Abbildung 2: Wichtigste Anwendungsbereiche der qPCR.

Während wir mit der qRT-PCR die posttranskriptionelle Regulation der mRNA nachweisen, dient die immunhistologische Untersuchung der Suche nach zell- oder gewebespezifischen Antigenen, die von Aminosäuren und Proteinen bis zu mikrobiologischen Erregern und spezifischen Zellpopulationen reichen können. (Brandtzaeg 1998) Auf diese Weise lassen sich die Produkte aus Transkription (TTF-1 mRNA) und Translation (TTF-1 Protein) und deren Zusammenhang darstellen.

Prinzipiell besteht die Technik der Immunhistologie aus zwei Phasen: In der Vorbereitungsphase werden die Proben auf dem Objektträger präpariert und anschließend nach verschiedenen Zwischenstufen mit primären und sekundären Antikörpern inkubiert. In der zweiten Phase erfolgt die Interpretation und Quantifizierung. (de Matos et al. 2010) Dabei stellt die Immunohistochemie einen recht weitläufigen Begriff dar, der verschiedenste Methoden zur gewebespezifischen Färbung von Antigenen durch Gebrauch von spezifischen Antikörpern darstellt. Die immunhistologische Untersuchung erlaubt uns, nicht nur den histologischen Ursprungsort der Zellen zu determinieren, sondern bei Gebrauch der richtigen Antikörper auch deren funktionelle Bedeutung *in vivo* zu bestimmen. Die Immunhistologie gehört, neben verschiedenen anderen Techniken, zu den Methoden die *in vitro* und *in situ* durchgeführt werden und *in vivo* Momentaufnahmen der intrazellulären biochemischen Abläufe darstellen. Damit bilden sie eines der fundamentalen Säulen der biomedizinischen Forschung. Die Immunohistochemie stellt nicht nur eine deskriptive Methode dar, sondern weist bei richtigem Gebrauch und standardisierter Analytik eine hohe Genauigkeit zur Semiquantifizierung auf. (Brandtzaeg 1998; Haines and West 2005) Sie ist sowohl ein wichtiges Werkzeug zur wissenschaftlichen Forschung, als auch ein Hilfsmittel zur Differentialdiagnose bei

unzureichendem Informationsgewinn durch konventionelle histologische Färbungen (z.B. H.E.). (Taylor and Kledzik 1981; Bodey 2002) Die wichtigsten Anwendungsbereiche in Forschungs- und Pathologielaboren sind die histogenetische Diagnose von morphologisch nicht-differenzierbaren Neoplasien, Subtypisierung von Neoplasien, Darstellung des Ursprungsort von malignen Neoplasien, Suche nach Prognosefaktoren und Therapieindikationen von Erkrankungen, Unterscheidung zwischen benignen und malignen Neoplasien und die Identifizierung von gewebespezifischen Strukturen und Organismen. (Bodey 2002; Leong and Wright 1987; Werner et al. 2000) Die Immunhistologie stellt in 95% der Fälle eine hilfreiche diagnostische Methode dar und steuert zur geeigneten chirurgischen und therapeutischen Entscheidungsfähigkeit mit geringen Kosten, aber hohem Nutzen bei. Die Auswertung der immunhistologischen Expressionsresultaten basiert meist auf qualitativer und subjektiver Einschätzung, während die Semiquantifizierung seltener eine Rolle spielt. (de Matos et al. 2010)

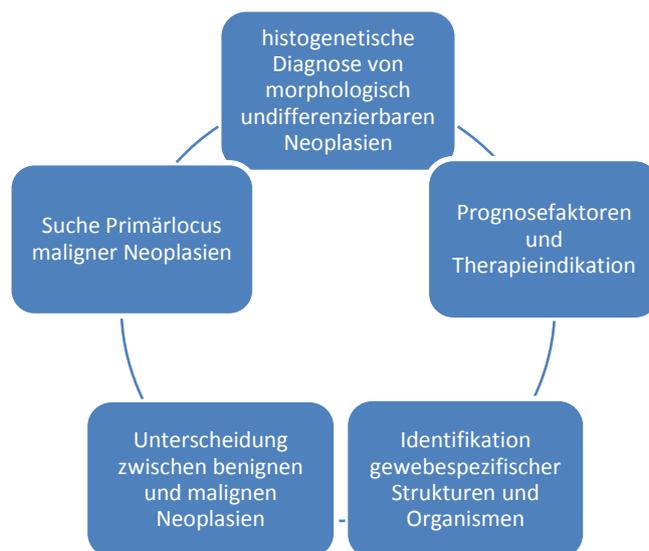


Abbildung 3: Anwendungsbereiche der Immunhistologie.

Nach dem Einzug der Immunhistochemie in die Labore der Pathologie-Institute ist versucht worden mittels Immunhistochemie Proteinexpression zu quantifizieren. Durch zahlreiche Studien ist ein Nachweis für die Korrelation zwischen den Resultaten der immunhistologischen Anfärbbarkeit und der Antigenkonzentration geliefert worden. (Elias 1990; True 1988; Becker 1993) Immunhistologische Anfärbbarkeit lässt sich bezüglich der Färbungsintensität in der

Regel schlechter kontrollieren. Daher sind Vergleiche zwischen unterschiedlichen Zellen innerhalb eines Schnittes als auch zwischen verschiedenen Schnitten schwierig. Nutzt man einen vollautomatisierten Färbeautomat verringern sich diese Probleme. Die Reagenzien, die in immunhistologischen Untersuchungen genutzt werden, haben das Potential korrekte quantitative Resultate zu erzielen. Es sind dieselben Reagenzien, die zur Durchführung eines Serum-ELISA notwendig sind. Während allerdings die immunologischen Grundsätze und Reagenzien in einer ELISA-Untersuchung als quantitativ ausgewertet werden können, dient die Immunhistochemie überwiegend als semiquantitativer Nachweis. (Taylor and Levenson 2006) Dabei sind durchaus statistisch signifikante Korrelationen zwischen immunhistochemischen Reaktionen und Proteinexpression u.a. durch Western Blotting nachgewiesen worden. (Venter et al. 1987; Brey et al. 2003)

Fortschritte in Molekularbiologie und Entwicklung von neuen Krebstherapien bedürfen verlässlicher Resultate im Nachweis von Zielgenen oder neuen Molekülen, um Patienten für eine spezifische Therapie zu selektieren. Ein Beispiel stellt die Trastuzumab-Therapie in Mammakarzinomen bei einer Anfärbbarkeit für das Onkogen HER2 dar. (Baselga et al. 2006) Zahlreiche quantitative Bestimmungen basierend auf visuellen Scores wurden entwickelt, um die Semiquantifizierung zu verbessern. (Heyderman et al. 1989) Wenn analysiert durch erfahrene Hände, lässt sich für visuelle Scores bezüglich klinischer Variablen eine statistische Signifikanz darstellen. (de Matos et al. 2010)

2.2. TTF-1

Wachstum und Untergang der Zelle und die damit einhergehende Entwicklung des gesamten menschlichen Organismus hängen an einem Netzwerk von Signalen, die in den verschiedensten Mustern von Genexpression resultieren. Unter den zahlreichen Elementen, die die Genexpression beeinflussen, haben Enhancer und Transkriptionsfaktoren den größten Einfluss auf die Initiation der Genexpression. (Spitz and Furlong 2012)

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die durch die Bindung spezifischer Promoter oder Enhancer-Sequenzen fähig sind, die Initiation und Regulation von Transkription-spezifischer Gene zu steuern. (Lemon and Tjian 2000)

Die Expression von ausgewählten Genen in Schilddrüse, Lunge und limitierten Regionen des Gehirns wird durch den Thyroidalen Transkriptionsfaktor-1, kurz TTF-1, auch bekannt als Nkx2-1, aktiviert. (Bingle 1997) TTF-1 gehört zu den Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren, die eine Schlüsselrolle in der Kontrolle der Embryogenese und -differenzierung von Lunge, Schilddrüse und Teilen des ZNS spielen. Proteine, die Homöodomänen besitzen, kontrollieren die Aktivierung der Transkription durch spezifische Bindung an DNA-Sequenzen mittels der Homöodomäne. (Gehring 1987; Scott et al. 1989).

2.2.1. Rolle und Expression

TTF-1 agiert als eine Art Masterregulierende und kontrolliert die Expression zahlreicher Schilddrüsen- und Lungen-spezifischen Gene. In der Schilddrüse überwacht TTF-1 die Expression von Thyreoglobulin-, Thyreoperoxidase-, Thyreotropinrezeptor- und den Natrium-Iod-Symporter- Genen, während in der Lunge TTF-1 essentiell für die Expression von SP (surfactant-protein) -A, -B, -C, CCSP (Clara cell secretory protein) und ABCA3 (ATP-binding-cassette transporter A3) -Genen ist. (Civitareale et al. 1989; Mizuno et al. 1991; Civitareale et al. 1993; Endo et al. 1997; Bruno et al. 1995; Bohinski et al. 1994; Liu et al. 2002; Toonen et al. 1996; Besnard et al. 2007) In Pneumozyten Typ 2 wird TTF-1 benötigt um Gene wie LAMP3 (lysosomal-associated membrane protein 3) und CEACAM6 (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6) zu bilden. (Kolla et al. 2007)

2.2.2 TTF-1 Protein- und Genstruktur

Das TTF-1 Gen ist auf dem Chromosom 14q13.3 lokalisiert und besteht aus 3 Exons und 2 Introns. (Lonigro et al. 1996; Hamdan et al. 1998) Die im Menschen am weitesten verbreitete TTF-1 Proteinisoform besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette aus 371-378 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht zwischen 38 und 42 kDa. (Guazzi et al. 1990; Mizuno et al. 1991; Oguchi et al. 1995; Ikeda et al. 1995) Bei Säugetieren gibt es eine zweite, weniger häufigere Variante des TTF-1 Transkripts, das an der N-Endstelle für eine Verlängerung um 30 Aminosäuren kodiert. (Hamdan et al. 1998) Dadurch wird das in-vitro translatierte Protein 44 kDa schwer und besitzt 401 Aminosäuren. In Mäusen werden die beiden Transkripte, während der fetalen Lungenentwicklung, unterschiedlich stark expressioniert. Das längere TTF-1 Transkript erscheint deutlich später in der Entwicklung, während die kürzere Version zu Beginn eine große Rolle spielt. Allerdings zeigen beide TTF-1 Transkripte in Co-Transfektions-Experimenten unterschiedliche Fähigkeiten den SP-C Promoter zu aktivieren, was darauf hinweist das funktionelle Unterschiede zu bestehen scheinen. (C Li et al. 2000) Die 42-kDa Proteinisoform wird durch mRNAs kodiert, die ihre Informationen von Exon 2 und 3 ablesen, während die 44-kDa Isoform durch alle 3 Exons kodiert wird. (Yamaguchi et al. 2013) Menschliche Lungenclara-H441-Zellen und Typ II Pneumozyten bilden nur die 42 kDa TTF-1 Form, während die längere Version bisher noch nicht in der menschlichen Lunge detektiert worden ist. (Kolla et al. 2007)

2.2.3. TTF-1 Promoter- und Gen-Regulation

Die Existenz von multiplen TTF-1 Transkripten deutet auf das Vorhandensein von mehreren Promotoren und das Auftreten von alternativem Splicen hin. Das TTF-1 Gen des Menschen besitzt zwei Promoterregionen. (Hamdan et al. 1998; Oguchi et al. 1995; Lonigro et al. 1996) Der proximale Promoter liegt im ersten Intron, während der distale Promoter oberhalb des ersten Exons liegt. Der proximale Promoter besitzt zwei DNA-Elemente in unmittelbarer Nähe, die FOXA1 und FOXA2 binden und so den Promoter aktivieren. (Ikeda et al. 1995) Der distale Promotor enthält eine GC-reiche Sequenz, die die Transkriptionsfaktoren SP1 und SP3 bindet und auf diese Weise die TTF-1 Promoteraktivität reguliert. (Changgong Li et al. 2000)

Das Regulationskonstrukt um TTF-1 lässt sich wie folgt zusammenfassen: TTF-1 wird durch zwei verschiedene Promotoren transkribiert, die wiederum durch zahlreiche Transkriptionsfaktoren aktiviert werden und damit abhängig von diesen sind. Durch den Nachweis mehrerer Startpunkte existieren auch multiple TTF-1 mRNA's, die wiederum die

zwei bekannten TTF-1 Proteinisoformen bilden. (Lonigro et al. 1996; Hamdan et al. 1998; Oguchi et al. 1995) Nachdem eine der beiden TTF-1 Isoformen gebildet ist, wird das TTF-1 Protein biologisch aktiv. Dabei werden dessen Fähigkeiten als Transkriptionsregulator an die jeweiligen Anforderung angepasst, indem mit anderen Transkriptionsfaktoren kooperiert wird oder Proteine posttranslational durch u.a. Acetylierung und Phosphorylierung modifiziert werden. Proteinmodifizierung und der Einfluss der Transkriptionsfaktoren können das TTF-1 Protein entweder positiv oder negativ regulieren, wodurch es kontextabhängig zu einer Repression oder Aktivierung des Zielgens kommt. (Yamaguchi et al. 2013)

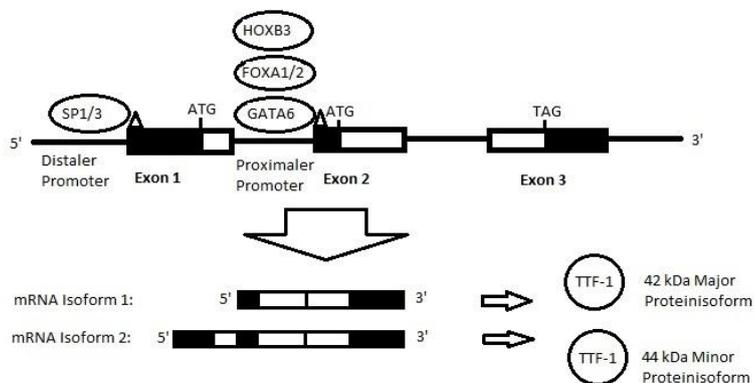


Abbildung 4: Regulationskonstrukt zur Bildung von TTF-1.

Im oberen Bereich stellt sich eine schematische Darstellung der Struktur des menschlichen TTF-1 Gens dar. Exons werden durch Rechtecke und Introns sowie 5'- und 3'-Endregionen durch Linien repräsentiert. Die gefüllten Rechtecke repräsentieren untranslatierte Regionen während ungefüllte Rechtecke translatierte Regionen der Exons darstellen. Die Dreiecke zeigen die Lokalisation der Transkriptionsstartpunkte. Außerdem werden die Codons der Translationsstartpunkte (ATG) und des Translationsendpunkt (TAG) sowie wichtige Punkte zur Bindung anderer Transkriptionsfaktoren abgebildet. Es werden 2 verschiedene mRNA Isoformen unter dem Einfluss 2 unterschiedlicher Promotoren und verschiedener Transkriptionsfaktoren transkribiert. Es entstehen eine Major- und Minor Proteinisoform. (Hamdan et al. 1998; Boggaram 2009)

2.2.4. Klinische Anwendung von TTF-1

Studien an Säugetieren zeigen, dass die TTF-1 Expression bereits in den frühesten Entwicklungsstufen von Schilddrüse, Lunge und Gehirn und noch weit vor der Expression von

dessen Zielgenen beginnt. Daher spielt TTF-1 eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Differenzierung dieser Organe. (Boggaram 2009)

In der Schilddrüse spielt TTF-1 eine entscheidende Rolle in der Expression von Thyreoglobulin und TPO. TTF-1 kann bereits am 10.5 Tag p.c. in der Schilddrüsenanlage nachgewiesen werden und stellt daher einen der frühesten Marker für die Erkennung von Schilddrüsenzellen dar. Die Expression von TTF-1 im Gehirn, ist im Bereich des Diencephalons und spezifischen Teilen des Telencephalons nachweisbar. Im sich entwickelnden Diencephalon sind TTF-1 Transkripte auf den Bereich des Hypothalamus und des Infundibulums limitiert. (Lazzaro et al. 1991; Trueba et al. 2005)

Während der ersten Entwicklungsstufen wird die TTF-1 Expression als erstes im ventralen embryonalen Kopfdarm detektiert. Nachdem sich die Vorläufertrachea aus der Lungenanlage gebildet hat, ist TTF-1 dort in nahezu allen Zellen reichlich nachweisbar. In der weiteren Lungenentwicklung verlagert sich die TTF-1 Expression auf die Zellen der distalen Luftwege bis sie schließlich auf die Epithelzellen der TRU (terminal respiratory unit) begrenzt ist. (Yamaguchi et al. 2013) Nach der Geburt wird TTF-1 in Pneumozyten Typ 2, den Clara-Zellen und Bronchialbasalzellen gebildet. In normal entwickelten Lungenepithelzellen wird TTF-1 im Zytoplasma synthetisiert und anschließend in den Zellkern transportiert. (Yang et al. 2012)

2.2.5. TTF-1 Defizienz

Zum Nachweis der TTF-1 Expression auf die Organentwicklung von Lunge, Schilddrüse und Teilen des Gehirns, hat man „TTF-1 null mutierte“ Mäuse untersucht. TTF-1 homozygote Mäuse sind direkt nach der Geburt an respiratorischer Insuffizienz gestorben. Der postnatale Tod ist durch Fehlbildungen der Lunge, Trachea und des Ösophagus eingetreten. (Minoo et al. 1999) Alle homozygoten Mäuse hatten kein normales Lungenparenchym mit Bronchiolen und Alveolen. Die Resultate legen dar, dass eine Verzweigung des tiefen Bronchialbaums nicht ohne TTF-1 Expression stattfindet. Die Lungenentwicklung scheint daher in einem bestimmten Stadium gestoppt zu haben. Die homozygoten Mäuse hatten bei der histologischen Untersuchung normale Nebenschilddrüsen, allerdings kein Schilddrüsenepithel. Außerdem haben sich ausgedehnte Defekte im Bereich des ventralen Prosencephalon vom Septum vorne bis zum Corpus mamillare vom Hypothalamus hinten gezeigt. Hypophysenvorderlappen, Hypophysenzwischenlappen und Neurohypophyse haben komplett in TTF-1 homozygoten Mäusen gefehlt. Heterozygote Mäuse sind problemlos geboren worden und haben sich normal entwickelt. (Kimura et al. 1996)

Das klinische Interesse am TTF-1 Gen des Menschen wächst, seitdem es als mögliche Ursache für die kongenitale Hypothyreose und die benigne hereditäre Chorea erkannt worden ist. Die Patienten präsentieren sich hauptsächlich mit den Symptomen von Choreoathetose, Hypothyreose und respiratorischen Problemen. Genetische Untersuchungen zeigen eine Veränderungen auf dem 14q Chromosom, eine heterozygote TTF-1 Mutation. Dieser Symptomkomplex wird unter dem Namen BTL-Syndrom (brain-thyroid-lung-syndrom) zusammengefasst. (Krude et al. 2002; Breedveld et al. 2002)

Die Fehlentwicklung im Gehirn betreffen u.a. das Pallidum und erklären die neurologischen Symptome der Choreoathetose. Patienten weisen im MRT keine Veränderungen auf. Wenn diese Patienten das Erwachsenenalter erreichen, schwächen sich neurologische Symptome ab oder verschwinden komplett. TTF-1 scheint wichtig für die Regulierung der Entwicklung, aber nicht dessen Funktion zu sein. (Breedveld et al. 2002; Krude et al. 2002)

Das Spektrum der Schilddrüsenveränderungen in TTF-1 mutierten Patienten reicht von funktionellen bis strukturellen Defekten. Eine TSH-Erhöhung mit normaler Produktion der T₃/T₄-Hormone zeigt funktionelle Veränderungen auf, während die Fehlentwicklung der Schilddrüse strukturelle Probleme reflektiert. Die funktionellen Veränderungen in der Schilddrüse lassen sich durch die reduzierte Aktivierung von TTF-1 Zielgenen, wie TSH-Rezeptoren, TPO und Thyreoglobulin, in den Schilddrüsenfollikelzellen erklären. (Breedveld et al. 2002)

In allen Patienten sind zahlreiche Lungenprobleme gefunden worden, darunter Entwicklungsdefekte in Form von Lungensequestern, die in den ersten Lebensjahren reseziert worden sind. Außerdem wurde das neonatale ARDS und verschiedenste pulmonale Infektionen gehäuft in den ersten Lebensjahren nachgewiesen. In Zusammenschau mit den Studien zu Mäusen scheint das keinerlei überraschend, denn während unzureichendes SP-B den Alveolarwiderstand reduzieren kann und so ein ARDS induziert, spielen SP-A/D eine wichtige Rolle in der Immunabwehr. (Krude et al. 2002)

2.2.6. TTF-1 in Lungenkrebs

Aufgrund der gewebelimitierten Expression von TTF-1, wird er weitestgehend als Marker zur Diagnose von primären und metastasierenden Lungenkrebs und malignen Neoplasien der Schilddrüse genutzt. Dabei steht vor allem die Differenzierung zwischen pulmonalem Primärlocus und metastasiertem Adenokarzinom im Mittelpunkt. (Ordóñez 2000)

TTF-1 ist das häufigste amplifizierte Gen in Lungenadenokarzinomen, spielt aber auch eine komplexe Rolle in der Regulation der Tumorgenese. (Watanabe et al. 2013) Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass TTF-1 zu einer Gruppe von Tumorgenen gehört, die sowohl pro- als auch anti-onkogene Fähigkeiten besitzt.

Die onkogenen Fähigkeiten von TTF-1 werden durch ein Netzwerk an Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren aktiviert. Darunter gehören ROR1 (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1), das in die TTF-1 abhängige Proliferation in Lungenadenokarzinomen involviert ist und LMO3, das zur Familie der LMO Onkogenen gehört und in T-ALL transloziert sein kann. (Yamaguchi et al. 2012; Watanabe et al. 2013) Das onkogene Potential von TTF-1 zeigt sich in der Schilddrüse als eine Missense-Mutation von TTF-1 in der Keimbahn, bei der im Codon 339 Alanin durch Valin ersetzt ist und zu einem erhöhten Risiko für multinodales Struma und papilläres Schilddrüsenkarzinom führt. (Ngan et al. 2009) In T-ALL Patienten führen nachgewiesene TTF-1 Rearrangements von T-Zell-Rezeptorgenen zur ektopischen TTF-1 Genüberexpression und unterstreichen dessen onkogenen Charakter. (Homminga et al. 2011)

In amplifizierten Lungenadenokarzinomen führt eine Abnahme der TTF-1 Konzentration zu einer niedrigeren Zellproliferationsaktivität und Zellzyklusprogression, sowie zu einer erhöhten Apoptoserate. Hohe TTF-1 Level sind Voraussetzung für das Wachstum der Tumorzellen und deren Überleben. Eine Amplifikation des TTF-1 Gens liegt in 2-12% der analysierten Lungentumore und Lungenkrebszelllinien vor. TTF-1 Genamplifikationen sind im metastasierten Gewebe stärker als im primären Lokus ausgeprägt. (Tanaka et al. 2007; Kwei et al. 2008; Weir et al. 2007)

Im Gegensatz dazu besitzt TTF-1 auch zahlreiche anti-onkogene Eigenschaften. So zeigt die durch Kras-Mutation und p53 Deletion initiierte Lungenadenokarzinombildung, dass die TTF-1 Expression in metastasierten Lungenkarzinomen niedriger ist als in primären Lungenkarzinomen. Durch die Suppression von Hmga2 hält TTF-1 Tumore vom metastasieren ab. (Winslow et al. 2011)

In untersuchten transgenen Mäusen führt eine TTF-1 Haploinsuffizienz und Kras^{G12D}-Mutation zu erhöhter Lungentumorzahl und Lungentumorvolumen, während die Kombination aus TTF-1 Haploinsuffizienz und EGFR^{L858R}-Mutation Tumorzahl und Lungentumorvolumen reduziert. TTF-1 Haploinsuffizienz verstärkt die Kras^{G12D}-vermittelte Tumorprogression, aber reduziert die EGFR^{L858R}-vermittelte Progression. (Maeda et al. 2012) Dass die Inaktivierung von TTF-1 zu einer KRAS-induzierten Tumoregenese und -progression führt, wurde ebenfalls durch KRAS-mutierte- und TTF-1 Deletion-induzierte Lungentumorentwicklung bestätigt. Die Zellproliferation zeigt ein signifikantes Wachstum und erhöht die Tumorlast auf das Vierfache. (Snyder et al. 2013)

Auch in Verbindung mit anderen Molekülen sind anti-onkogene Aktivitäten von TTF-1 nachgewiesen worden. MYBPH (myosin-binding protein H), ein direktes Transkriptionsziel von TTF-1, verringert über die veränderte Regulierung der Actomyosinanordnung die Zellbeweglichkeit, erhöht die Zellmigration und resultiert damit in einer geringeren Tumorinvasion und Metastasenbildung. (Hosono et al. 2012) Die epithelialen Tight Junction-Proteine OCLN, CLDN1 und CLDN18 werden ebenfalls durch TTF-1 aktiviert. (Niimi et al. 2001; Runkle et al. 2012) Außerdem hemmt TTF-1 die TGF- β vermittelte EMT (epithelial-to-mesenchymal transition), ein Prozess in dem Tumorzellen ihre invasiven und metastastierenden Eigenschaften erlangen, und stellt so den epithelialen Phänotyp in Lungenadenokarzinomzellen wieder her. (Saito et al. 2009)

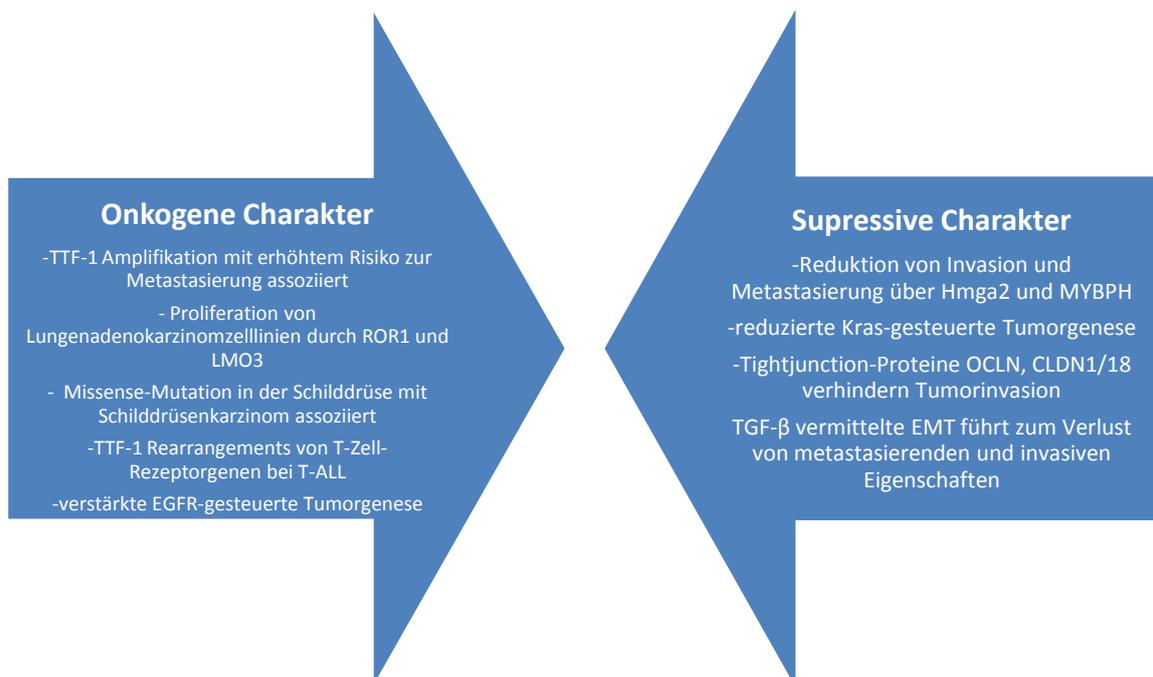


Abbildung 5: Zusammenfassung der onkogenen und nicht-onkogenen Eigenschaften von TTF-1.

2.3. Ziel dieser Arbeit

Als bedeutendster Faktor für die Patientenprognose im Lungenkarzinom gilt das Tumorstadium. Dass Tumorarchitektur pulmonaler Adenokarzinome das biologische Verhalten dieser Tumore vorhersagen kann und auch mit dem Auftreten gängiger molekularer Alterationen korreliert, wird seit einigen Jahren zur Gewissheit. Die WHO-Klassifikation von 2015 trägt diesem Fakt Rechnung. (Warth et al. 2013) Sterlacci et al hat eine Korrelation zwischen schlechter werdender Differenzierung der Tumorarchitektur pulmonaler Adenokarzinome (lepidisch>azinär>papillär>mikropapillär>solide) und einem Absinken der TTF-1 Expression hergestellt. In selbiger Studie ist nachgewiesen worden, dass sich mit schlechter werdender Differenzierung auch das mediane Überleben reduziert. Ein Zusammenhang zwischen TTF-1 und medianem Überleben ist nicht überprüft worden. (Sterlacci et al. 2012)

Die folgende Arbeit beschäftigt sich mit der Expressionsanalyse von TTF-1 bei Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen und pulmonalen Metastasen.

1. Mittels qRT-PCR und Immunhistochemie sollen mögliche Zusammenhänge zwischen TTF-1 Protein und TTF-1 mRNA untersucht werden, insbesondere am Beispiel der Adenokarzinome.
2. Es soll geklärt werden, ob TTF-1 mRNA bzw. Protein ein geeigneter Prognosemarker bzw. ein stadienabhängiger Marker ist.
3. Das Vorkommen von TTF-1 mRNA in anderen NSCLC und pulmonalen Metastasen soll eruiert werden und geklärt werden, ob sich diese anhand der genutzten Techniken sicher von Adenokarzinomen unterscheiden lassen.
4. Azinäre pulmonale Adenokarzinome und pulmonale Metastasen colorektaler Adenokarzinome sowie solide pulmonale Adenokarzinome und pulmonale Plattenepithelkarzinome sollen bezüglich der Resultate von TTF-1 mRNA und Proteinen verglichen werden, um Aussagen zur diagnostischen Sensitivität und Spezifität der verwendeten Techniken treffen zu können.

3. Material und Methoden

3.1. Untersuchungsmaterial

Untersucht wurden Gewebeprobe von 199 Patienten, bei denen in den Jahren 2000-2014 die histopathologische Diagnose eines Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms oder einer pulmonalen Metastase durch das Pathologische Institut der Universitätsklinik Homburg gestellt wurde. Gegenstand der Untersuchung war Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes (FFPE) Resektatmaterial aus 51 azinären und 50 soliden pulmonalen Adenokarzinomen, die mit 49 pulmonalen Plattenepithelkarzinomen und 49 pulmonalen Metastasen colorektaler Adenokarzinome verglichen wurden.

Die Unterteilung der Primärkarzinome der Lunge erfolgte anhand der histologischen Klassifikation nach WHO/IARC 2015.

Die verwendeten Materialien und Geräte zur Untersuchung des Gewebes sind dargestellt (siehe Anhang Tab.9).

3.2. Auswahl Tumorgewebe

Von den formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeblöcken wurden am Rotationsmikrotom mit der Einstellung "2µm" Schnitte angefertigt und anschließend mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Da ein Großteil der Adenokarzinome keine homogenen azinären oder soliden Tumoranteile hatten, entschieden wir uns für die Anteile in denen keine Mischformen vorlagen. Bei den Plattenepithelkarzinomen wurden ebenfalls keine Mischtypen verwandt. Die zur RNA-Extraktion nutzbaren Tumoranteile, wurden von einem qualifizierten Pathologen ausgewählt und auf dem Objektträger markiert.

3.3. RNA-Isolierung

3.3.1. Hintergrund

Bei der Isolierung von RNA ist es wichtig darauf zu achten, dass die einzelsträngige RNA nicht durch RNasen abgebaut oder degradiert wird. RNasen sind sehr stabil, auf nahezu allen Oberflächen nachweisbar und benötigen keine Kofaktoren für den enzymatischen Abbau von Ribonukleinsäuren. (Sela et al. 1957) Daher soll man bei der Isolation zügig arbeiten und Kontamination vermeiden, um die RNA vor Abbau zu schützen. (Green and Sambrook 2012)

Um die Arbeit mit RNA zu ermöglichen und die RNA vor RNAsen zu schützen, wurden für die RNA-Isolierung gesonderte, RNase-freie Lösungen, Reaktionsgefäße und Pipetten verwendet. Sämtliche Objektträger wurden mit 3% Wasserstoffperoxid für 10min vorbehandelt, danach für 2 Stunden in DEPC-Wasser bei 37°C inkubiert und als letztes im Wärmeschrank bei 100°C für 15min erhitzt. (Leica Microsystems 2011)

Aufgrund des Fixierens und Einbettens von Gewebe, werden Nukleinsäuren in FFPE Proben häufig stark fragmentiert und chemisch durch Formaldehyd modifiziert. (Werner et al. 2000) Um die Modifikationen durch Formaldehyd rückgängig zu machen, ohne die RNA-Qualität weiter zu verschlechtern, wurde der "RNeasy FFPE Kit" der Firma Qiagen benutzt. Als erstes wurde das Paraffin aus der frisch geschnittenen FFPE Probe entfernt, indem wir es mit Xylol-Lösung behandelten. Danach erfolgte die Inkubation in dem optimierten Lyse-Puffer, der Proteinase K zum Herauslösen der RNA enthält. Eine kurze Inkubation bei höherer Temperatur kehrt teilweise das Formalin-Crosslinking der gelösten Nukleinsäuren um und verbessert damit die RNA Ausbeute und Qualität, als auch die RNA Performance in den folgenden Expressionsanalysen. Die anschließende DNase-Behandlung hat die Aufgabe sämtliche genomische DNA zu eliminieren. Danach wurde zum Lysat mit RBC Puffer Ethanol hinzugefügt. Das Ethanol soll passende Bindungsbedingungen für die RNA schaffen. Nun bindet die gesamte RNA an die Membran der "RNeasy MinElute Spin"-Säule und sämtliche Kontamination wird effizient gewaschen. Im letzten Schritt wurde die erhaltene RNA durch RNase-freies Wasser ausgewaschen. (Qiagen 2014)

3.3.2. Durchführung

Für die Extraktion der RNA wurden zunächst 2-3 jeweils 10µm dicke Leerschnitte der Paraffinblöcke angefertigt. Anhand des markierten H.E.-Schnittes wurde dann das Tumorgewebe makrodisseziert und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 1ml Xylol hinzugefügt und für 10s gevortext. Anschließend wurde der Mix für 2min bei 14.000rpm

zentrifugiert, der Überstand verworfen, 1ml absoluter Ethanol hinzugefügt und im Vortex vermischt. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Das verbliebene Ethanol wurde vorsichtig abpipettiert und das Gewebepellet 15min bei 37°C auf dem Heizblock getrocknet. Während der Extraktion von Nukleinsäuren sind zahlreiche kontaminierende Proteine und Nukleasen anwesend, welche beseitigt werden müssen. Die Proteinase K lysiert Kontamination bzw. macht Nukleasen unschädlich und schützt so die Nukleinsäuren vor weiterem Schaden. Für die Lyse wurden 240µl PKD-Puffer und 10µL Proteinase K mit dem Gewebepellet vermischt und bei 56°C und 80°C für jeweils 15min inkubiert. Die Temperatur von 56°C führt zur Entfaltung der kontaminierenden Proteine und hilft der Proteinase K diese zu abzubauen. Bei 80°C wird die Proteinase K inaktiviert und kehrt die Formalin-induzierten "Crosslinks" teilweise um. Danach kam das Gemisch für 3min in einen Kühlblock und wurde anschließend für 15min bei 13.500rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß übertragen, 25µL DNase Booster Puffer und 10µL DNase I hinzugefügt, um alle genomische DNA zu eliminieren. Es folgte eine Inkubation von 15min bei Raumtemperatur. Schließlich wurden 500µL RBC-Puffer und 1200µL Ethanol dazu pipettiert und vermischt. Von diesem Gemisch wurden 700µL auf eine "RNeasy MinElute Spin"-Säule gegeben. Nach der ersten Zentrifugation von 15s bei mindestens 10.000rpm, wurde der Durchfluß verworfen. Diese Schritte wurden solange wiederholt bis das gesamte Gemisch durch die Säulen gespült war. Anschließend wurde die Probe mit 500µL RPE-Puffer (alkoholischer Waschpuffer) gewaschen und 15s bei mindestens 10.000rpm zentrifugiert. Abermals wurden 500µL des RPE Puffer hinzugefügt, zentrifugiert und verworfen. Anschließend wurde die "RNeasy"-Säule auf ein neues 2ml Reaktionsgefäß gesetzt und für 5min bei 13000 rpm zentrifugiert bis die Membran der Säule getrocknet war. Als letztes folgte die Elution. Zum Erhalt der finalen RNA wurde die Säule in ein sauberes 1,5ml Eppi platziert, 30µL RNase-freies Wasser in das Zentrum der Membran pipettiert und anschließend für 1min zentrifugiert. (Qiagen 2014)

3.4. Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration und die Reinheit der isolierten Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des Spektralphotometer "Thermoscientific Nanodrop 1000" gemessen.

Die RNA Proben wurden gegen einen Leerwert (RNAse freies Wasser) gemessen und deren Konzentration sowie A260/A280-Quotient dokumentiert. Die gewonnenen RNA-Mengen lagen dabei in einem Bereich zwischen 1,57 und 2,09 ng/ μ l.

3.5. Reverse Transkription

Der spezifische Primer (Hs00968940_m1, ThermoFisher Scientific) wurde zur Reversen Transkription der TTF-1 RNA in cDNA genutzt. Zur cDNA-Synthese wurde das "High Capacity RNA-to-cDNA Kit" der Firma Applied Biosystems verwendet. 1µg RNA wurde mit 10µL 2X RT-Puffer und 1µL 20X Enzyme Mix versetzt und mit RNase-freiem Wasser zu einem Gesamtvolumen von 20µL aufgefüllt. Der Reverse-Transkriptase-Mix wurde gut vermischt und die Reaktion bei 37°C für 60min im Wasserbad inkubiert. Danach wurde die Probe auf einen 95°C heißen Heizblock überführt, um die Reaktion zu stoppen. Die so hergestellte cDNA konnte nun in den folgenden PCR-Ansätzen verwendet werden. (Applied Biosystems 2007)

3.6. Auswahl interne Kontrolle

Mit Hilfe der "TaqMaN® Array Plates 96-Well Plates" wurde über ein Versuchsexperiment die passende interne Kontrolle ausgesucht. In diesen 96 "Wells" bzw. Vertiefungen der Platte befinden sich in 3 identischen Gruppen angeordnet, 32 interne Kontrollgene. Dadurch ließen sich pro Platte 3 verschiedene Proben analysieren. Auf Platte 1 wurde zu den 32 internen Kontrollen, Templates von azinären und soliden pulmonalen Adenokarzinomen, als auch des Calibrators (Kontroll-RNA) von Agilent hinzugegeben. Auf Platte 2 wurden die 3 Gruppen durch die pulmonalen Metastasen eines colorektalen Adenokarzinoms, der pulmonalen Plattenepithelkarzinome und wiederum des Calibrators gebildet. Zu 1µL cDNA wurde noch 9µL DEPC-Wasser und 10µL Mastermix hinzugegeben. Auf Grund der Ergebnisse und der breiten Anwendung von β 2M in der Wissenschaft, entschieden wir uns für diese interne Kontrolle (siehe Anhang Tab.10).

3.7. Auswahl Kalibrator

In dieser Arbeit wurde die "qPCR Human Reference Total RNA" von Agilent ausgewählt. Dieser RNA-Pool besteht aus 10 Menschenzelllinien, bei der die RNA-Konzentration komprimierter als in den individuellen Zelllinien vorliegt, um Gentranskripte in unterschiedlicher Menge noch besser repräsentieren zu können. Dieses Produkt als Referenzkontrolle zu verwenden erlaubt es, Daten von multiplen Experimenten zwischen verschiedenen Plattformen und Laboren zu vergleichen. (Livak and Schmittgen 2001; Agilent Technologies 2015)

3.8. Quantitative Real-time PCR

3.8.1. Hintergrund

Die quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion, kurz qRT-PCR, stellt eine in vitro Methode zur enzymatischen Amplifikation definierter RNA bzw. DNA-Sequenzen dar und kann mehrere Proben gleichzeitig im selben Experiment analysieren. Man unterscheidet die "One-Step Real-time RT-PCR", bei der Reverse Transkriptase und Polymerase-Kettenreaktion nacheinander ohne Reaktionsunterbrechung im Thermocycler ablaufen, von der "Two Step Real-time RT-PCR", bei der in einer separaten Reaktion cDNA gewonnen wird und erst dann die PCR Reaktion gestartet werden kann. Prinzipiell existieren 4 verschiedene Methoden der Real-time Reverse Transkriptase-PCR, die alle auf der Messung von Fluoreszenz basieren. Die Menge an ausgesandten Farbstoff ist proportional zur Anzahl der PCR Produkte und macht es daher möglich die PCR-Reaktion zu überwachen. Aus der entstehenden PCR-Kurve kann die exponentielle Phase abgelesen werden, um eine präzise Berechnung der DNA-Kopien am Anfang der Reaktion zu gewährleisten. Die einfachste und billigste Methode basiert auf dem Nutzen von DNA-Farbstoffen, die sich an die DNA binden und dadurch vermehrt Fluoreszenz emittieren. Nachteil ist, dass spezifische und unspezifische PCR-Produkte detektiert werden. Die anderen 3 Methoden beruhen auf dem Einsatz eines zusätzlichen Fluoreszenz-markierten Oligonukleotid und werden als FRET-Sonden bezeichnet. Man unterscheidet diese Sonden, je nachdem ob sie Fluoreszenz durch Hydrolyse der Sonde (Taqman-Sonden) oder Hybridisierung von einem (Molecular Beacons) oder zwei (Lightcycler-Sonden) Oligonukleotiden an das Amplikon freisetzen. FRET-Sonden zeichnen sich vor allem durch eine bessere Spezifität aus. Neben diesen 4 Methoden werden heutzutage auch noch andere spezifische Techniken wie z.B. Scorpion-Primer eingesetzt. (Klein 2002)

In der vorliegenden Arbeit wurde das Prinzip der FRET-Sonde angewendet, bei der Energie von einem angeregten Farbstoff, dem Donor, auf einen zweiten Farbstoff, dem Akzeptor, übertragen wird. Die hier verwendete TaqMan-Sonde von lifetechnologies, platziert sich spezifisch zur komplementären Sequenz zwischen den entgegengesetzt arbeitenden Primern. Der "TaqMan Gene Expression Assay" enthielt neben dem genspezifischen Primern, auch die passenden Taq-Sonden. Diese ist am 3'-Ende mit einem Quencher und am 5'-Ende mit einem Reporter ausgestattet. Auf Grund der räumlichen Nähe der beiden, wird der Reporter-Farbstoff nicht aktiv. Neben der eigentlichen Polymeraseaktivität besitzt die Taq-Polymerase noch eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität, der die Sonde am 5'-Ende und somit den Reporter abbaut. Quencher und Reporter verlieren ihre Nähe und der Farbstoff des Reporters wird aktiviert (Abb.6). Daher nimmt der Fluoreszenzfarbstoff während der PCR mit jedem Zyklus proportional zum PCR-Produkt zu. Diese in der exponentiellen Phase emittierten Fluoreszenzsignale werden am Ende

eines abgeschlossenen Zyklus registriert und zur Quantifizierung der PCR benutzt. (Applied Biosystems 2008)

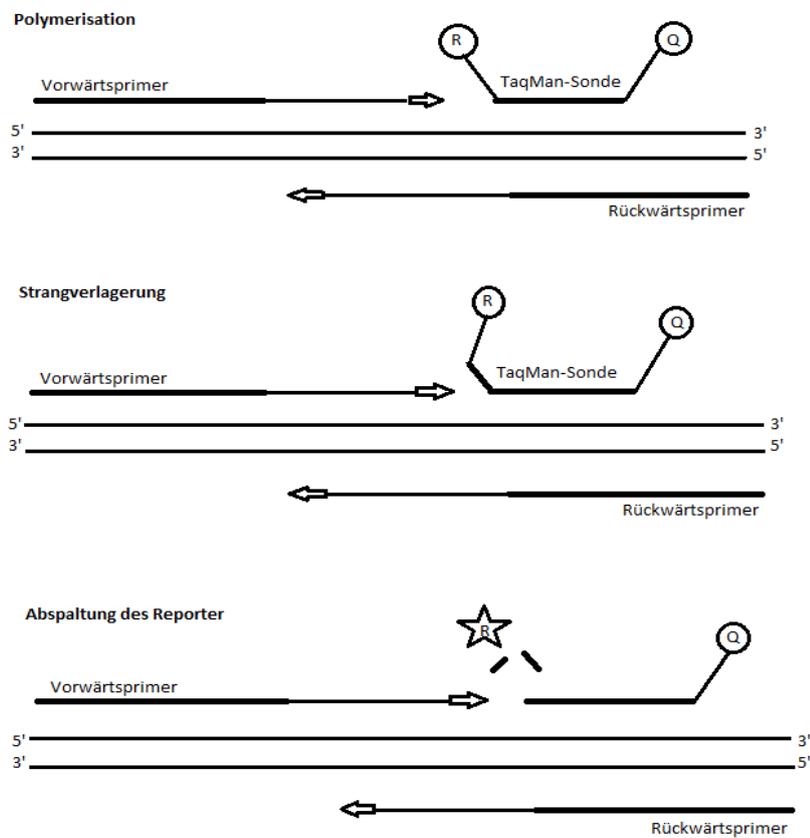


Abbildung 6: Der dargestellte Nuklease-Assay-Prozess findet während PCR Amplifikation in jedem Zyklus statt (R=Reporter, Q=Quencher).

3.8.2. Durchführung

Für die Durchführung der Real-time qRT-PCR wurde das "7900 HT Fast-Real-Time PCR-System" von Applied Biosystems verwendet. Als Reaktionsgefäße dienten 96-Well-Platten der Firma Applied Biosystems. Die PCR Ansätze erfolgten in Dreifachbestimmungen, um Ungenauigkeiten durch Pipettierfehler zu minimieren.

Der 20µL Reaktionsansatz pro Well bestand aus 10µL "TaqMan® Gene Expression Master Mix", 6µL destilliertem Wasser, 1µL TTF-1 oder β2M-Assay und 3µL (150ng) cDNA.

Die verschiedenen PCR Bedingungen der qRT-PCR werden in der Tabelle gezeigt:

Tabelle 1: Ablauf des automatisierten 2-Schritt-RT-PCR zur Amplifikation der bereits erhaltenen cDNA. (Applied Biosystems 2010)

Ablauf des automatisieren PCR-Prozesses

Ersten Schritte		40 Zyklen der Polymerase-Ketten-Reaktion	
Verwendung der AmpErase UNG zur Reinigung der PCR-Produkte von dUTP aus vorhergehenden PCR-Amplifikationen	Beginn anfängliche Erhitzungsphase zur Aktivierung der Hot-Start-Polymerase (AmpliTaq Gold® DNA Polymerase)	Denaturierung	Primerhybridisierung und Elongation
Wartevorgang	Wartevorgang	Alternierender Zyklusablauf	
2min bei 50°C	10min bei 95°C	15s bei 95°C	1min bei 60°C

Die C_T-Werte des Amplifikationsplots wurden mit der "SDS 2.0 Software" bestimmt.

3.9. Methodik der Quantifizierung

Für die Quantifizierung von DNA oder RNA, existieren generell zwei Möglichkeiten Datenanalyse zu betreiben: die absolute und relative Quantifizierung. (Schmittgen 2001) In dieser Studie wurde die relative Quantifizierung zur Analyse der Daten benutzt. Relative Quantifizierung zeigt Expressionsänderungen zu einer anderen Probe, wie z.B. einer unbehandelten Kontrolle, relativ auf. Die gewonnenen Daten präsentieren sich als ein Vielfaches des ursprünglichen Expressionslevels. Als Messwerte während der exponentiellen Phase gelten die sog. C_T -Werte. Dieser ist ein einheitsloser Wert und beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über den Threshold, ein normiertes Level an Reporter-Fluoreszenz, ansteigt. Der C_T -Wert der Zielsequenz ist direkt proportional zur absoluten Konzentration, wenn man ihn mit dem C_T -Wert des Referenzgenes vergleicht. Der Faktor X ist die Menge, um die sich das Gen verändert hat und kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$X = 2^{\Delta\Delta C_T}$$

dabei ist $\Delta\Delta C_T = (C_{T, \text{Ziel}} - C_{T, \text{Referenz}})_{\text{sample}} - (C_{T, \text{Ziel}} - C_{T, \text{Referenz}})_{\text{normal}}$.

In dieser Arbeit stellte TTF-1 das Zielgen und $\beta 2m$ das Referenzgen dar. Die Effizienz der PCR wird durch die TaqMan Assays gewährleistet. Die konstante Expression des Haushaltsgen in Normalgewebe und Untersuchungsmaterial wurde in Vorversuchen ermittelt. Sobald diese Bedingungen erfüllt sind, stellt die relative Quantifizierung nicht nur eine einfachere, sondern auch ökonomischere Methode, als die absolute Quantifizierung dar und erlaubt eine deutlich zuverlässigere und exaktere Analyse von Nukleinsäuren aus extrahierten FFPE-Material. (Lehmann and Kreipe 2001)

3.10. Immunhistochemie

3.10.1. Hintergrund

In dieser Arbeit wurde eine immunhistochemische Färbung der Präparate durch den monoklonalen TTF-1 Antikörper Clone 8G7G3/1 der Firma Dako vorgenommen. Grundsätzlich werden bei der vorgenommenen Immunhistochemie Proteinstrukturen über spezifische Epitope visualisiert, indem ein primärer Antikörper auf das Antigen aufgetragen und dieser sichtbar gemacht wird.

Der vollautomatische "Ventana Benchmark Ultra" nutzt die indirekte Methode der Immunhistochemie zum Nachweis der Bindung des Antikörpers an das Antigen. Bei dieser am häufigsten verwendeten Methode wird ein gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichteter Sekundärantikörper sowie ein Enzym mit einem entsprechenden Substrat-Chromogen-System verwendet. Durch diese Kombination entsteht ein farbiges Präzipitat an der Stelle der spezifischen Antikörperbindung.

3.10.2. Durchführung

1µm dicke Paraffinschnitte wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern aufgezogen und über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C getrocknet. Analog des manuellen Ablaufs arbeitet der "Ventana Benchmark Ultra IHC/ISH Staining" die Schritte vollautomatisch ab. Dabei wurden die Gewebeschnitte als erstes mit Hilfe von Hitze, einer milden Detergenzlösung (EZ Prep) und eines Wirbelmixers entparaffiniert. Der Ultra CC1 ist ein Tris-basierter Puffer mit einem leicht erhöhten pH-Wert, der bei höheren Temperaturen die Formalin-induzierten kovalenten Bindungen im Gewebe hydrolysiert. Das Entfernen erhöht die Aufnahmefähigkeit für Antikörper. Dieses Prozedere nennt man "heat-induced epitope retrieval" (HIER) und ist notwendig, da die Formalinfixierung zu Proteincrosslinking geführt hat und daher manche Proteinepitope unmöglich die komplementären Antikörper binden. Durch das Entfernen erhöht HIER die Aufnahmefähigkeit der Epitope für Antikörper und verbessert damit die Immunreaktivität. Nach Inkubation des TTF-1-Antikörpers für 1 Stunde bei 36°C wurde das Ultra LCS (Predilute), eine Eindecklösung, dazugegeben, die als Barriere zwischen den wässrigen Reagenzien und der Luft verwendet wird und so Evaporation verhindert. Zwischen den Färbeprozessen wurde immer wieder eine Tris-basierte Pufferlösung (Reaction Buffer Concentrate) zum Reinigen der Objektträger, eingesetzt. Zur Detektion des TTF-1 Primärantikörpers wurde der "ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection"-Kit für 12min inkubiert, ein indirektes biotin-freies Detektionssystem zum Nachweis von Antikörpern. Das Kit verwendet einen Cocktail aus enzymmarkierten Sekundärantikörpern zum Nachweis

von TTF-1 am Antigen. Der gebildete Komplex wurde durch 8-minütige Inkubation mit Naphtol und Fast Red Chromogen dargestellt, wodurch die positiven Zellkerne unter Lichtmikroskopie rötlich erscheinen. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin II für 12min und Bluing Reagent für 4min. (Ventana Medical Systems 2011)

3.10.3. Beurteilung Reaktionsmuster

Der von Remmele und Stegner 1987 veröffentlichte "Vorschlag zur einheitlichen Definition eines immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe" hatte den Ansatz immunhistochemische Resultate zu objektivieren und vergleichbar zu machen. Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate in unserer Studie erfolgte mit Hilfe des Immunreaktiven Scores nach den Richtlinien von Remmele und Stegner und der IASLC/ATS/ERS (Tab. 2). Die repräsentativen Bilder wurden durch eine dem Mikroskop aufsetzende Kamera aufgenommen und zeigen exemplarisch die Intensitäten der untersuchten Schnittpräparate.

In der mikroskopischen Untersuchung wurden hierbei zuerst die Farbintensität und der Prozentsatz der gefärbten Zellen bestimmt. Farbintensität bzw. Anzahl gefärbter Zellen wurden dabei in 4 bzw. 5 Gruppen eingeteilt und jeweils ganze Zahlen zugeordnet. Um pro immunhistochemisch gefärbten Schnittpräparat letztlich einen Score zu erhalten, wurden die ganzen Zahlen aus Intensität und gefärbten Zellen miteinander multipliziert. Ein IRS-Score ≥ 2 gilt als positiv, eine Score größer als 4 zeigt eine stark positive TTF-1 Immunreaktion. Bei Anfärbbarkeit von <10% der Tumorzellen bzw. einer nicht nachweisbaren Farbintensität wurde die Probe als TTF-1 negativ gewertet (Tab. 3).

Tabelle 2: Immunreaktive Scores zur Quantifizierung der immunhistochemischen Resultate.

Farbintensität/ Prozentsatz TTF-1 positiver Zellen	Keine TTF-1 positive Farbreaktion = 0 Punkte	Schwache TTF- 1 positive Farbreaktion = 1 Punkt	Mäßige TTF-1 positive Farbreaktion = 2 Punkte	Starke TTF-1 positive Farbreaktion = 3 Punkte
Keine TTF-1 positiven Zellkerne =0 Punkte	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0
<10% TTF-1 positive Zellkerne =1 Punkt	IRS = 0	IRS = 1	IRS = 2	IRS = 3
10-50% TTF-1 positive Zellkerne =2 Punkte	IRS = 0	IRS = 2	IRS = 4	IRS = 6
50-80% TTF-1 positive Zellkerne =3 Punkte	IRS = 0	IRS = 3	IRS = 6	IRS = 9
>80% TTF-1 positive Zellkerne =4 Punkte	IRS = 0	IRS = 4	IRS = 8	IRS = 12

Tabelle 3: Vereinfachte Zusammenfassung des Scoring-Systems in TTF-1 negativ, schwach positiv und stark positiv.

IRS <2	Keine TTF-1 positive Immunreaktion
IRS 2-4	Schwach TTF-1 positive Immunreaktion
IRS > 4	Stark TTF-1 positive Immunreaktion

Für die Analyse der Immunhistologie wurden lediglich gut erhaltene Zellen der Schnittpräparate berücksichtigt. Anfärbungen von nekrotischen oder extrazellulären Bereiche sind unspezifisch und flossen nicht in die Bewertung ein. Um Intensität und Anzahl der angefärbten Zellen vergleichbar zu machen, wurde der IRS-Score in modifizierter Art von Remmele und Stegner angewandt. Da bei der Bewertung der Anfärbbarkeit der Tumorzellen nicht alle Zellen eindeutig positiv reagierten und somit eine Verwechslung zwischen Tumorzelle und falsch positiv

erkannter Zelle möglich ist, wurde durch einen zweiten erfahrenen Pathologen die Quantifizierung versucht zu objektivieren.

Um eine einheitliche Qualität zu gewährleisten und Unterschiede bezüglich der verwendeten Materialien zu vermeiden, wurden alle immunhistologischen Schnitte neu angefertigt.

3.11. Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse wurde die Software SPSS (Version 22, IBM, Corp., Armonk, NY, USA) benutzt. Zur Veranschaulichung der gewonnenen klinischen Parametern wurde der Median ermittelt. Ordinal- bzw. Nominaldaten zweier Gruppen wurden mittels Chi-Quadrat-Test bzw. Fischer-Test (2x2 Tabelle) verglichen. Der exakte Test nach Fischer wurde dem Chi-Quadrat-Test vorgezogen, falls die erwartete Häufigkeit in einer oder mehrerer Zelle(n) kleiner 5 betrug. Bestand eine Tabelle aus mehr als vier Feldern, wurde die Modifikation des exakten Test nach Fisher, der sog. exakte Test nach Fisher-Freeman-Halton angewandt. In der vorliegenden Arbeit wurde die 2-seitige Signifikanz verwendet, wobei die exakte Signifikanz der Asymptomatischen bevorzugt wurde. Um Verbindungen zwischen Überleben und klinischen Parametern herzustellen, wurden die Kaplan-Meier-Kurve oder Cox-Regression verwendet. Unverbundene, nicht normalverteilte Gruppen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test auf Signifikanz untersucht. Da es sich gezeigt hat, dass Protein- und mRNA-Level nicht normalverteilt sind, nutzten wir den Spearman-Rank-Test zur Korrelationsanalyse. (Maier et al. 2009) Die Interpretation der Effektstärke des Spearman-Rank-Korrelationskoeffizienten wurde entsprechend Cohen vorgenommen (Cohen 1992)

Zur Veranschaulichung der statistischen Analysen wurden gruppierte und gestapelte Säulendiagramme, sowie Boxplots verwendet. In den Boxplots wurden Ausreißer als Kreise, extreme Werte als Sterne gekennzeichnet. Ausreißer sind Werte, deren Abstand vom 25%-Perzentil nach unten bzw. vom 75%-Perzentil nach oben zwischen dem 1,5fachen und dem 3fachen der Boxhöhe liegen. Die Boxhöhe gibt den Abstand zwischen dem 25%- und dem 75%-Perzentil wieder. Bei extremen Werten beträgt der Abstand von dem 25%- oder dem 75%-Perzentil mehr als das Dreifache der Boxhöhe. (SPSS GmbH Software 1999)

Da der Unterscheidung zwischen pulmonalen Adenokarzinomen und Nicht-Adenokarzinomen anhand von $\Delta\Delta C_T$ -Werten der TTF-1 mRNA eines der primären Ziele unserer Studie ist, kommt der Ermittlung des Schwellenwertes eine zentrale Bedeutung zu. Da die ermittelten $\Delta\Delta C_T$ -Werte für sich genommen, noch nicht verwertbar sind, mussten Cut-Off-Werte ermittelt werden, die die Neoplasien in TTF-1 positiv und negativ unterscheiden. "Receiver-Operating-Characteristic"-Analysen (ROC) werden in der klinischen Epidemiologie genutzt, um zu quantifizieren wie genau medizinische Tests zwischen zwei verschiedenen Patientenstatus unterscheiden können. Typischerweise lässt sich messen, ab welcher Konzentration eines bestimmten Moleküls der Patient als krank bzw. gesund gilt. (Hajian-Tilaki 2013)

An der ROC-Kurve wurde die "Area Under the Curve" (AUC) mit ihrem 95%-Konfidenzintervall berechnet. In unserer Studie soll die ROC-Kurve und der damit

korrespondierende AUC-Wert zeigen, dass TTF-1 mRNA in Form des $\Delta\Delta C_T$ -Wertes als Marker eine Voraussage zur Unterscheidung zwischen Adeno- und Nichtadenokarzinomen in der Lunge ermöglicht.

Zur Ermittlung des optimalen Schwellenwertes der $\Delta\Delta C_T$ -Werte zur Vorhersage einer TTF-1 positiven immunhistologischen Untersuchung wurde der Youden-Index ermittelt, um eine perfekte Spezifität-Sensitivität-Balance zu erhalten. Der Youden-Index maximiert die Differenz zwischen Richtig-positiv (TPF) und Falsch-Positiv (FPF): Youden-Index = TPF- FPF= Sensitivität+ Spezifität- 1. Durch das Aufsuchen der maximalen Spezifität und Sensitivität an verschiedenen Cut-off-Punkten entlang der Kurve, wurde der optimale Cut-off-Wert berechnet. Da bei diesem Wert die Summe aus Sensitivität und Spezifität am größten ist, trennt dieser TTF-1 positive von TTF-1 negativen immunhistologischen Schnittpräparaten am optimalsten. Mit höherem Schwellenwert sinkt die Sensitivität, während die Spezifität ansteigt. Bei niedrigerem Schwellenwert verhalten sich Sensitivität und Spezifität umgekehrt. (Hajian-Tilaki 2013)

Es wurden ROC-Kurven für die pulmonalen Adenokarzinome, sowie für die spezifischen Untergruppen der Adenokarzinome (azinär, solide) ermittelt. Daraus resultieren 3 verschiedene Cut-Off-Werte. Anhand der Cut-off-Werte ließen sich die Neoplasien mittels der $\Delta\Delta C_T$ -Werte in TTF-1 positiv und negativ unterscheiden und konnten auf ihren Zusammenhang mit anderen klinischen Parametern untersucht werden. Mithilfe von Vierfeldertafeln wurden Schwellenwert-abhängige Resultate analysiert und folgend klassische Parameter wie Spezifität, Sensitivität, positiv und negativ prädiktiver Wert berechnet. Um den diagnostischen Nutzen zu vergleichen, wurden die Resultate der Immunhistologie ebenfalls analysiert.

Ein Probabilitätswert $p < 0,05$ wurde in allen verwendeten Testverfahren als statistisch signifikant eingestuft. Sämtliche Tests wurden auf maximal drei Stellen nach dem Komma gerundet. Diese Arbeit stellt die p-Werte (p) dar.

4. Ergebnisse

4.1. Patientenkollektiv

In dieser Studie wurden Gewebeproben von 191 Patienten eingeschlossen. Von 8 Patienten lagen Gewebeproben für azinäre und solide pulmonale Adenokarzinome vor. Nach initialer Untersuchung des gesamten Kollektivs, mussten nach Durchführung von qRT-PCR und Immunhistologie zwei Proben aus der Gruppe der pulmonalen Plattenepithelkarzinome und eine Probe aus der Gruppe der pulmonalen Metastasen colorektaler Adenokarzinome ausgeschlossen werden. Nach Ausschluss dieser 3 Patientenproben wurden insgesamt 199 Proben analysiert.

Das Alter der Patienten wurde anhand des Geburtsdatums und des Erstdiagnosedatums berechnet. Die Altersverteilung wurde in Abhängigkeit der histologischen Gruppen in absoluten Werten angegeben (siehe Abb.7). Das mediane Alter aller Patienten lag bei 63 Jahren. Der jüngste Patient in diesem Kollektiv war 35 und der Älteste 83 Jahre alt. Bei den azinären Adenokarzinomen betrug das mediane Lebensalter 62 Jahre, bei den soliden Adenokarzinomen 62,5 Jahre, bei den Plattenepithelkarzinomen 67 Jahre und bei den pulmonalen Metastasen eines colorektalen Adenokarzinoms 59 Jahre. Adenokarzinome zu Nicht-Adenokarzinomen der Lunge unterschieden sich bezüglich des Alters nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,558$).

Die Geschlechtsverteilung ist in Abhängigkeit der histologischen Gruppen angegeben (siehe Abb.8). Im Gesamtkollektiv waren 116 (60,7%) der 191 Patienten männlich, während 75 (39,3%) der 191 Patienten weiblich waren. In der Gruppe der azinären Adenokarzinome waren 27 (52,9%) männlich und 24 (47,1%) weiblich. Von den 50 Patienten der soliden Adenokarzinome waren 29 (58%) männlich und 21 (42%) weiblich. Bei den Plattenepithelkarzinomen waren 41 männlich (83,7%) und 8 weiblich (16,3%). Von den 49 Patienten der pulmonalen Metastasen waren 23 (46,9%) männlich und 26 (53,1%) weiblich. Adenokarzinome zu Nicht-Adenokarzinomen der Lunge unterschieden sich bezüglich des Geschlechts nicht signifikant (Chi-Quadrat-Test, $p=0,236$).

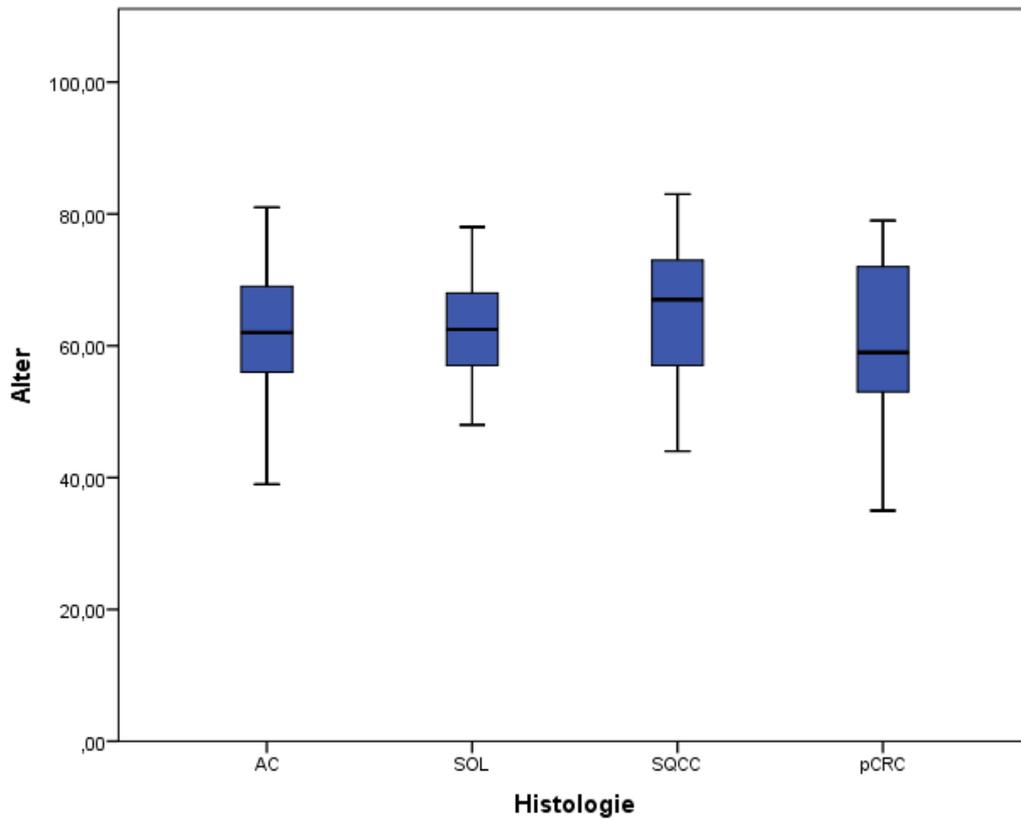


Abbildung 7: Boxplot der Altersverteilung in Abhängigkeit der histologischen Gruppen.

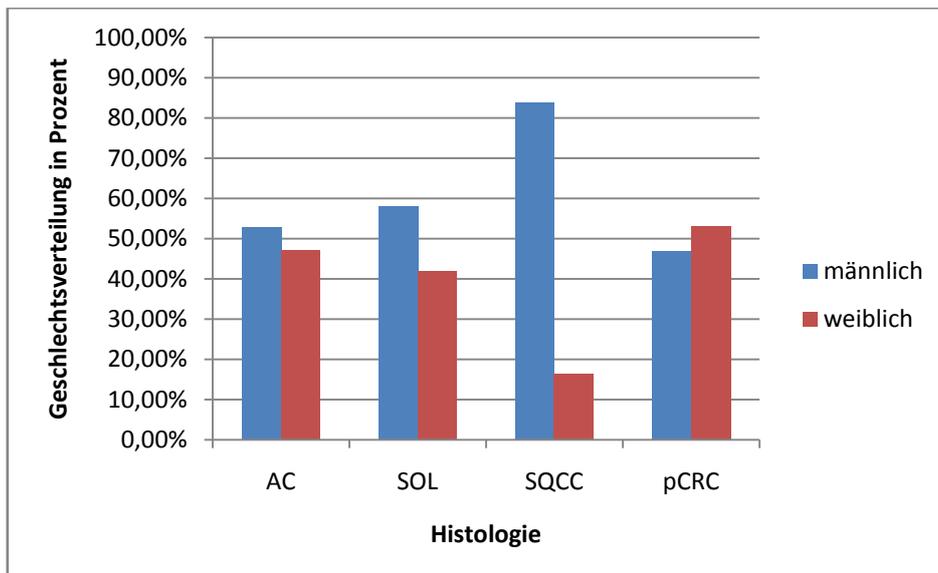


Abbildung 8: Geschlechtsverteilung in Abhängigkeit der histologischen Gruppen.

4.2. Einteilung nach Stadium

Die Stadieneinteilung erfolgte entsprechend der UICC-Kriterien nach den aktuellen Richtlinien der WHO-Klassifikation 2015 und richtete sich nach histopathologischen als auch klinischen Befunden.

Die Stadienverteilung ist in Abhängigkeit der histologischen Gruppen angegeben (siehe Abb.9). Von den insgesamt 143 gestagten Patienten waren 26 (18,3%) im Stadium Ia, 29 (20,4%) im Stadium Ib, 20 (14,1%) im Stadium IIa, 12 (8,5%) im Stadium IIb, 38 (26,8%) im Stadium IIIa, 6 (4,2%) im Stadium IIIb und 11 (7,7%) im Stadium IV verteilt.

In der Gruppe der azinären Adenokarzinome konnten von insgesamt 51 Patienten 12 (23,5%) dem Stadium Ia, 14 (27,5%) dem Stadium Ib, 7 (13,7%) dem Stadium IIa, 3 (5,9%) dem Stadium IIb, 5 (9,8%) dem Stadium IIIa, 3 (5,9%) dem Stadium IIIb und 7 (13,7%) dem Stadium IV zugeordnet werden.

Bei den insgesamt 50 soliden Adenokarzinomen waren die Tumorstadien wie folgt verteilt: 10 (20%) Stadium Ia, 9 (18%) im Stadium Ib, 8 (16%) im Stadium IIa, 5 (10%) im Stadium IIb, 14 (28%) im Stadium IIIa, 1 (2%) im Stadium IIIb und 3 (6%) im Stadium IV.

Die Tumorstadien der 49 Plattenepithelkarzinome stellten sich wie folgt dar: 6 (12,2%) im Stadium Ia, 10 (20,4%) im Stadium Ib, 5 (10,2%) im Stadium IIa, 4 (8,1%) im Stadium IIb, 20 (40,8%) im Stadium IIIa, 3 (6,1%) im Stadium IIIb und 1 (2%) im Stadium IV.

Die pulmonalen Metastasen bei colorektalem Adenokarzinom wurden entsprechend ihrem metastasiertem Verhalten ausschließlich in Stadium IV (100%) des UICC-Stadiums der colorektalen Karzinome eingeschlossen.

Adenokarzinome zu Nicht-Adenokarzinomen der Lunge unterschieden sich bezüglich der Stadienverteilung nicht statistisch signifikant (Fisher-Freeman-Halton, $p=0,071$). Azinäre und solide pulmonale Adenokarzinome unterschieden sich nicht statistisch signifikant (Fisher-Freeman-Halton, $p=0,194$). Solide pulmonale Adenokarzinome und pulmonale Plattenepithelkarzinome unterschieden sich nicht statistisch signifikant (Fisher-Freeman-Halton, $p=0,591$). Azinäre pulmonale Adenokarzinome und pulmonale Plattenepithelkarzinome unterschieden sich statistisch signifikant (Fisher-Freeman-Halton, $p = 0,007$). Pulmonale Metastasen colorektaler Adenokarzinome unterschieden sich von azinären und soliden pulmonalen Adenokarzinomen, sowie von pulmonalen Plattenepithelkarzinomen statistisch signifikant (Fisher-Freeman-Halton, $p_{AC/pCRC}=0,000$, $p_{SOL/pCRC}=0,000$, $p_{SQCC/pCRC}=0,000$).

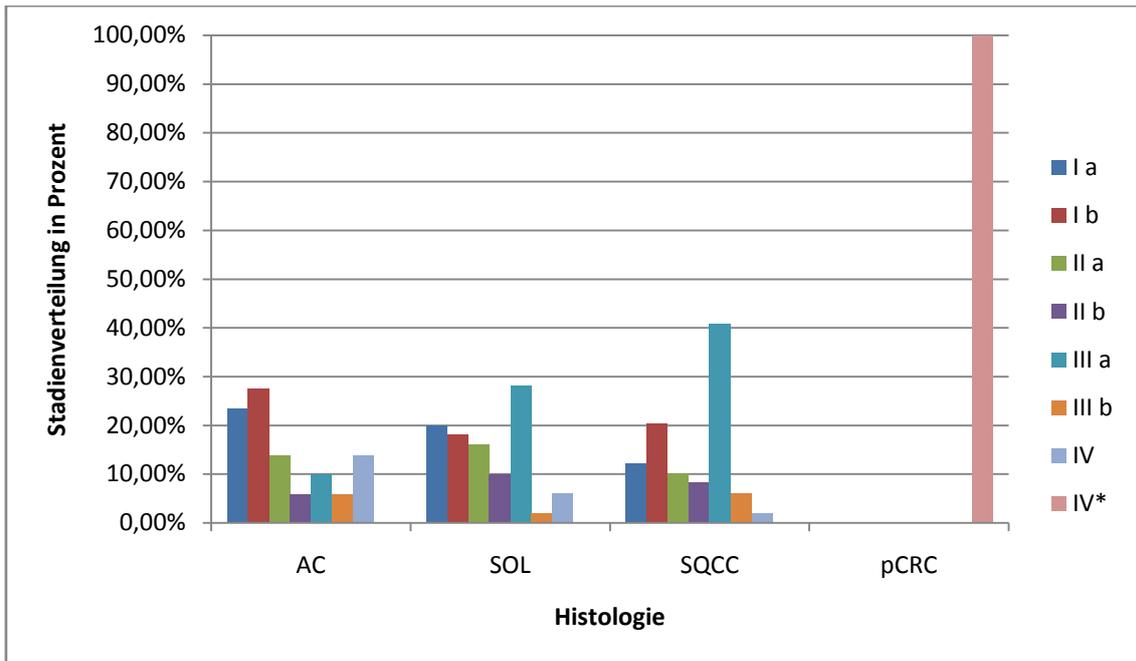


Abbildung 9: Stadienverteilung in Abhängigkeit der histologischen Gruppen (* entspricht dem UICC-Stadium IV der colorektalen Karzinome).

4.3. Überleben

Als Überlebenszeit wurde die Zeit zwischen Datum der histologischen Erstdiagnose und dem Todesdatum bzw. dem Datum des letzten Follow-up definiert. Die Daten wurden durch das Klinisch-epidemiologische Krebsregister Rheinland-Pfalz gGmbH, das Epidemiologische Krebsregister Saarland und das Klinische Krebsregister des Tumorzentrums der Universitätsklinik des Saarlandes bereitgestellt. Als Datum der Datenerhebung diente der 24.05.2015.

Die Überlebenszeit ist in Abhängigkeit der histologischen Gruppen in absoluten Werten angegeben (siehe Abb.10). Von den insgesamt 191 Patienten der 4 histologischen Gruppen überlebten 107 Patienten, die restlichen 84 verstarben an ihrer Tumorerkrankung oder dessen Folgen. Das mediane Überleben aller histologischen Gruppen betrug 52 Monate. Das kürzeste Überleben lag bei unter einem Monat, das längste bei 203 Monaten.

In der Gruppe der azinären Adenokarzinome überlebten 25 der 51 Patienten. Das mediane Überleben betrug 55 Monate. Das minimale Überleben lag bei unter einem Monat, das Längste bei 132 Monaten.

Bei den soliden Adenokarzinomen verstarben 19 Patienten, während 31 zum Zeitpunkt der Datenerhebung noch lebten. Das mediane Überleben betrug hier 54,5 Monate. Auch hier lag das kürzeste Überleben bei weniger als einem Monat und das Längste bei 132 Monaten.

Von den 49 Patienten in der Gruppe der Plattenepithelkarzinome verstarben 20. 29 überlebten bis zum Datum der Datenerhebung. Das mediane Überleben betrug 38 Monate. Das kürzeste Überleben wurde mit 2 Monaten und das längste mit 203 Monaten ermittelt.

22 der 49 Patienten in der Gruppe der pulmonalen Metastasen colorektaler Adenokarzinome verstarben. 27 überlebten bis zum Datum der Datenerhebung. Das mediane Überleben betrug 61 Monate. Das kürzeste Überleben wurde mit 1 Monat und das längste mit 184 Monaten ermittelt.

Adenokarzinome zu Nicht-Adenokarzinomen der Lunge unterschieden sich bezüglich des Überlebens nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,695$). Azinäre und solide pulmonale Adenokarzinome unterschieden sich nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,959$). Solide pulmonale Adenokarzinome und pulmonale Plattenepithelkarzinome unterschieden sich nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,216$). Azinäre pulmonale Adenokarzinome und pulmonale Plattenepithelkarzinome unterschieden sich nicht statistisch signifikant (Mann-

Whitney-U-Test, $p=0,224$). Azinäre pulmonale Adenokarzinome und pulmonale Metastasen unterschieden sich nicht statistisch signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,073$). Solide pulmonale Adenokarzinome und pulmonale Metastasen unterschieden sich nicht statistisch signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,072$). Pulmonale Plattenepithelkarzinome und pulmonale Metastasen unterschieden sich statistisch signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,002$).

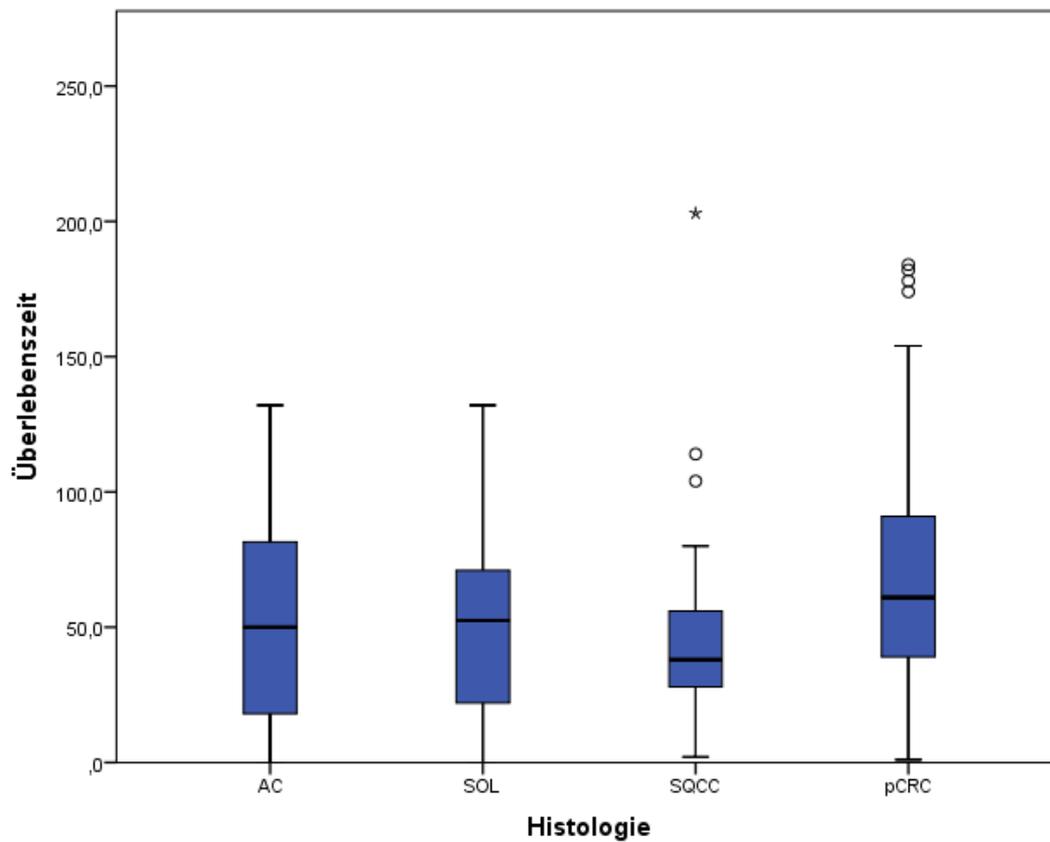


Abbildung 10: Boxplot der Überlebenszeit in Abhängigkeit der histologischen Gruppen (Kreis= Ausreißer, Stern= extremer Wert).

4.4. Übersicht klinisch-pathologischer Charakteristika

Tabelle 4: Übersicht der gesammelten klinisch-pathologischen Charakteristika anhand primärer azinärer und solider Adenokarzinome (Azinäre/Solide AD) und Plattenepithelkarzinome (SQCC) der Lunge sowie pulmonaler Metastasen eines colorektalen Adenokarzinoms (pCRC) (* entspricht dem UICC-Stadium IV der colorektalen Karzinome).

Parameter	<u>Alle Subtypen</u>	<u>Azinäre AD</u>	<u>Solide AD</u>	<u>SQCC</u>	<u>pCRC</u>
Geschlecht					
M	116(60,7%)	27(52,9%)	29(58%)	41(83,7%)	23(46,9%)
W	75(39,3%)	24(47,1%)	21(42%)	8(16,3%)	26(53,1%)
Alter(Jahre)					
Median	63	62	62,5	67	59
Stadium					
Ia	26(18,3%)	12(23,5%)	10(20%)	6(12,2%)	-
Ib	29(20,4%)	14(27,5%)	9(18%)	10(20,4%)	-
IIa	20(14,1%)	7(13,7%)	8(16%)	5(10,2%)	-
IIb	12(8,5%)	3(5,9%)	5(10%)	4(8,2%)	-
IIIa	38(26,8%)	5(9,8%)	14(28%)	20(40,8%)	-
IIIb	6(4,2%)	3(5,9%)	1(2%)	3(6,1%)	-
IV	11(7,7%)	7(13,7%)	3(6%)	1(2%)	-
IV*	-	-	-	-	49(100%)
Überleben (in Monaten)					
Median	52	55	54,5	38	61
5-Jahres-Überlebensrate	41,9%	47,1%	46%	22,4%	53,1%

4.5. Ergebnisse der Immunhistologie

Insgesamt wurden 199 neue immunhistochemische Färbungen der 191 Patienten durchgeführt. Durch die Zusammenführung von qRT-PCR und Immunhistologie fielen in der Gruppe der pulmonalen Plattenepithelkarzinome und pulmonalen Metastasen Ergebnisse auf, die weiterer Abklärung benötigten: In der Gruppe der Plattenepithelkarzinome zeigte sich ein Fall, der eine TTF-1 Positivität für 40% der Tumorzellen aufwies. Der ▲▲C_T-Wert der qRT-PCR war mit 2111,42 stark erhöht. Nachdem initial die Morphologie für die Diagnose eines Plattenepithelkarzinoms sprach, zeigte sich in der weiteren immunhistologischen Abklärung eine schwache Positivität für CK5/6, während p63 und p40 negativ waren. Daraufhin konnte der Fall nicht länger der Gruppe der Plattenepithelkarzinome zugeordnet werden und musste aus der Studie ausgeschlossen werden.

Der zweite Fall bei den pulmonalen Plattenepithelkarzinomen war mit einem ▲▲C_T-Wert von 1953,71 in der qRT-PCR ebenfalls auffällig und führte nach Nachweis von Muzinproduzierenden Zellen in der PAS-Diastase Färbung und der Diagnose eines adenosquamösen Karzinoms zum Ausschluss aus der Studie.

In einem weiteren Fall legten radiologische Befundgebung, histomorphologische Interpretation eines Adenokarzinoms und wenige Monate zuvor diagnostiziertes colorektales Adenokarzinom die Diagnose eines pulmonal metastasierten colorektalen Adenokarzinom nahe. Die starke TTF-1 Positivität in 90% der Tumorzellen, der ebenfalls stark erhöhte C_T-Wert von 3119,29 in der qRT-PCR waren Anlass zu weiteren Untersuchungen. Dabei zeigte sich, dass CK7 positiv, CK20 negativ und CDX-2 negativ waren. Da eine pulmonale Metastase eines colorektalen Adenokarzinoms entsprechend der Befunde auszuschließen war, wurde der Fall aus der Gruppe entfernt und auf Grund der histomorphologischen Heterogenität aus der Studie ausgeschlossen.

Bei weiteren Fällen, die ebenfalls auffällige immunhistologische Befunde oder ungewöhnliche ▲▲C_T-Werte aufwiesen, wurden auch weitere Untersuchungen vorgenommen. Dabei kam es zu keinen Abweichungen von den typischen immunhistologischen Resultaten der jeweiligen Gruppen.

Die Ergebnisse der Immunhistologie sind in Abhängigkeit der histologischen Gruppen in Prozent angegeben (siehe Abb.11). Exemplarisch sind die verschiedenen immunhistologischen Resultate abgebildet (siehe Abb.12-14).

Von den 51 Fällen der azinären pulmonalen Adenokarzinome zeigten 18 (35,3%) eine TTF-1 Negativität, 19 (37,3%) eine schwache und 14 (27,4%) eine starke Anfärbbarkeit für TTF-1.

Bei den soliden pulmonalen Adenokarzinomen waren wiederum 20 von 50 (40%) TTF-1 negativ, 24 (48%) schwach und 6 (12%) stark TTF-1 positiv .

In der Gruppe der pulmonalen Plattenepithelkarzinome und der pulmonalen Metastasen zeigten sich nach Ausschluss der beiden TTF-1 positiven Fälle ausschließlich TTF-1 negative Präparate.

Die Sensitivität und Spezifität bei der Abgrenzung von Adenokarzinomen und Nicht-Adenokarzinomen der Lunge betrug 62,4% bzw. 100% für die Erkennung eines pulmonalen Adenokarzinoms durch eine TTF-1 positive Immunreaktion. Der positive bzw. negative prädiktive Wert lag bei 100% bzw. 72,1%.

Bei der separaten Betrachtung von azinären Adenokarzinomen und pulmonalen Metastasen erreichte die Immunhistologie eine Sensitivität von 64,7% und eine Spezifität von 100%. Der positive bzw. negative prädiktive Wert lag hier bei 100% bzw. 73,1%.

Bei der separaten Untersuchung von soliden Adenokarzinomen und Plattenepithelkarzinomen in der Immunhistologie betrug die Sensitivität 60% und die Spezifität 100%. Der positive bzw. negative prädiktive Wert lag bei 100% bzw. 71,4%.

Die Resultate der Immunhistologie sind ausführlich dargestellt (Tab.5) .

Adenokarzinome zu Nicht-Adenokarzinomen der Lunge unterschieden sich bezüglich des TTF-1 Status statistisch signifikant (Chi-Quadrat-Test, $p=0,000$).

Azinäre und solide Adenokarzinome unterschieden sich bezüglich des TTF-Status schwach positiv, stark positiv und negativ nicht signifikant (Chi-Quadrat-Test, $p=0,151$).

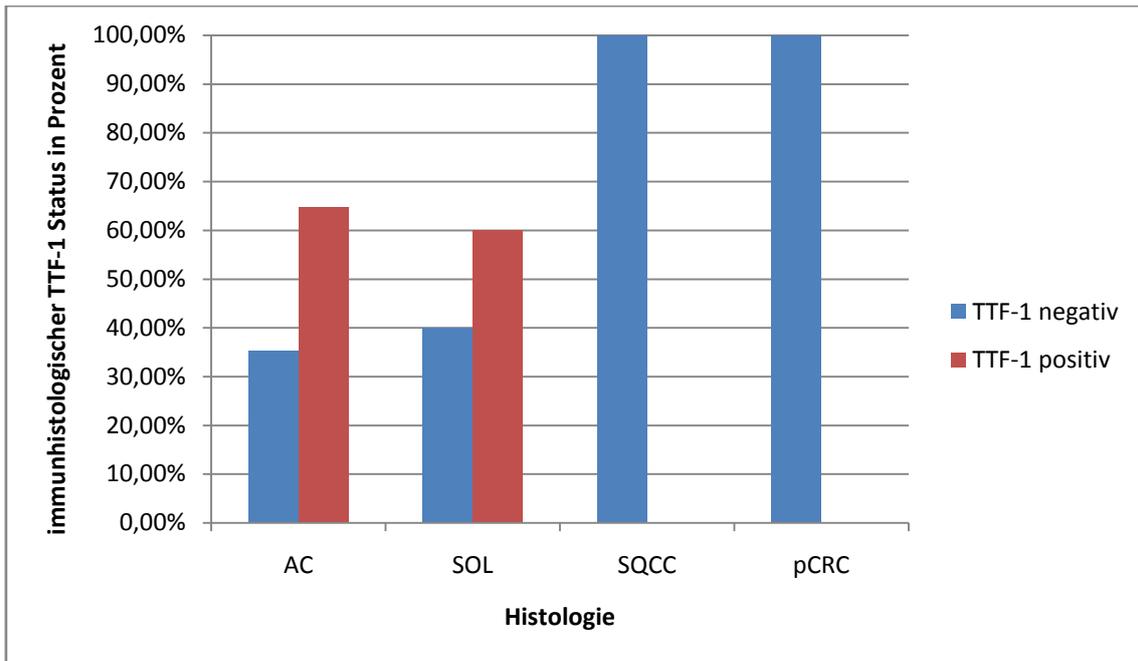


Abbildung 11: Immunhistologischer TT-1 Status der histologischen Gruppen in Prozent.

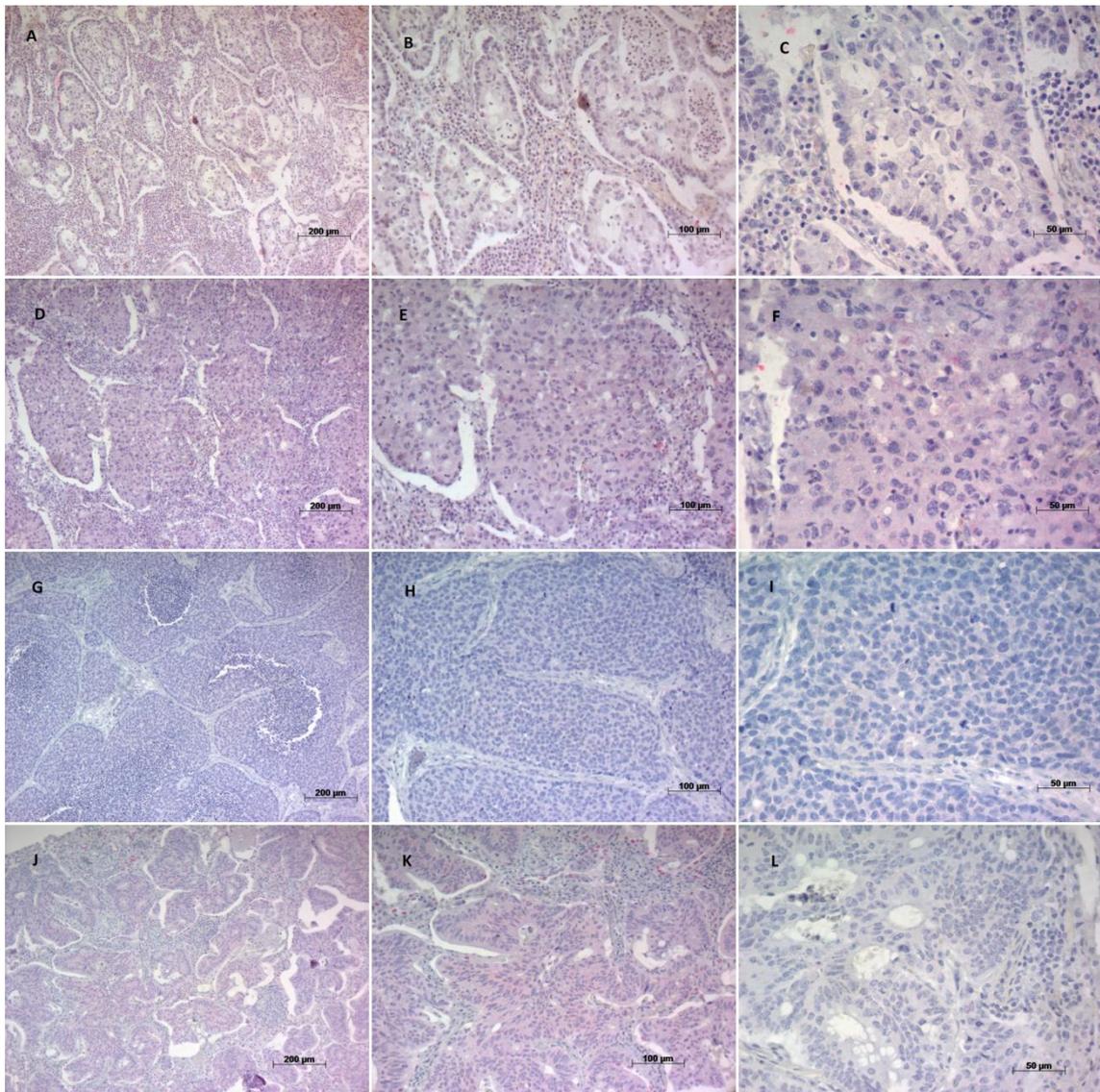


Abbildung 12: TTF-1 negativ immunhistochemische Expression in A),B),C) azinären pulmonalen Adenokarzinomen, Originalvergrößerung 10x/20x/40x; D),E),F) soliden pulmonalen Adenokarzinomen, Originalvergrößerung 10x/20x/40x; G),H),I) pulmonalen Plattenepithelkarzinomen, Originalvergrößerung 10x/20x/40x; J),K),L) pulmonalen Metastasen eines colorektalen Adenokarzinom, Originalvergrößerung 10x/20x/40x.

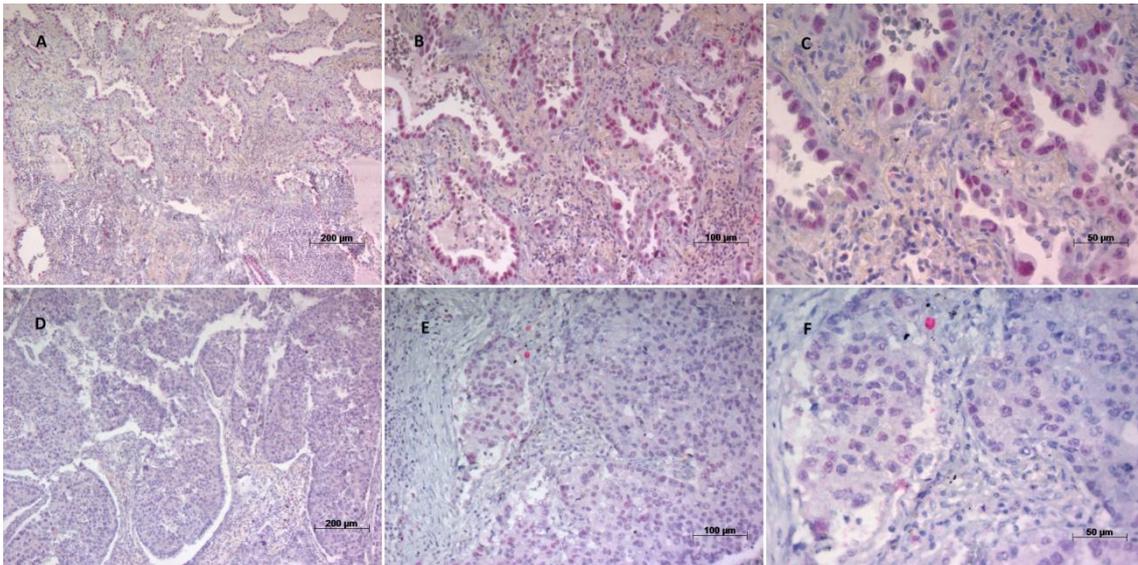


Abbildung 13: TTF-1 schwach positive immunhistochemische Expression in A),B),C) azinären pulmonalen Adenokarzinomen, Originalvergrößerung 10x/20x/40x; D),E),F) soliden pulmonalen Adenokarzinomen, Originalvergrößerung 10x/20x/40x.

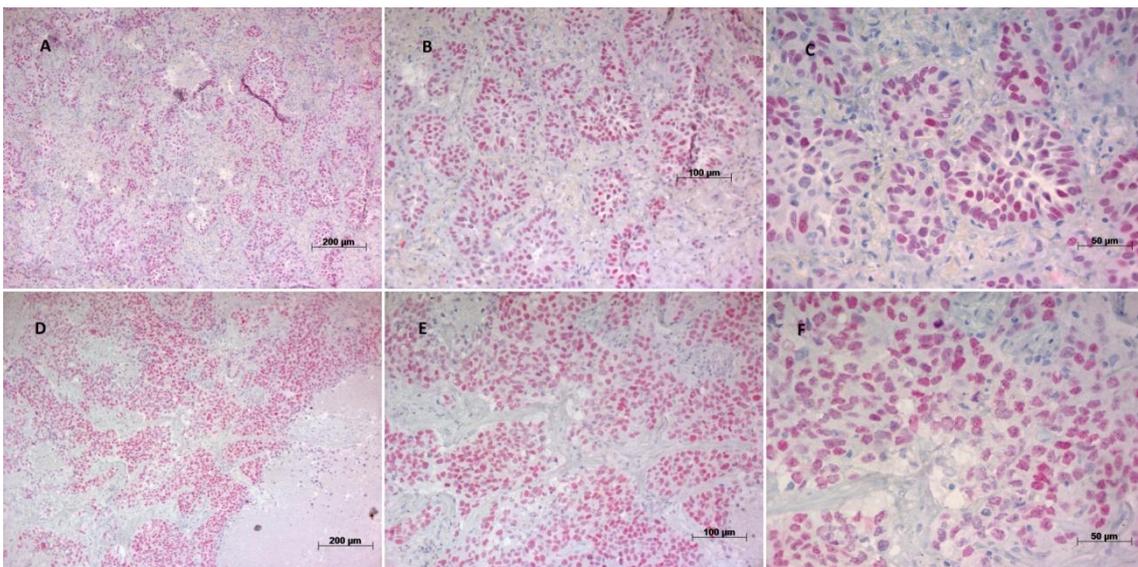


Abbildung 14: TTF-1 stark positive immunhistochemische Expression in A),B),C) azinären pulmonalen Adenokarzinomen, Originalvergrößerung 10x/20x/40x; D),E),F) soliden pulmonalen Adenokarzinomen, Originalvergrößerung 10x/20x/40x.

Tabelle 5: Übersicht der immunhistologischen Resultate der histologischen Gruppen.

Immun-histologie	Azinäre Adenokarzinome	Solide Adenokarzinome	Plattenepithelkarzinome	Pulmonale Metastasen
TTF-1 schwach positiv	19 (37,3%)	24 (48%)	0 (0%)	0 (0%)
TTF-1 stark positiv	14 (27,4%)	6 (12%)	0 (0%)	0 (0%)
TTF-1 negativ	18 (35,3%)	20 (40%)	49 (100%)	49 (100%)
Summe	51	50	49	49
Sensitivität, Spezifität und ppW	Se/Sp _{AC+SOL} : 62,4%/100% ppW: 100% Se/Sp _{AC} : 64,7%/100% ppW: 100% Se/Sp _{SOL} : 60%/100% ppW: 100%			

4.6. Ergebnisse der $\Delta\Delta C_T$ -Werte

Die $\Delta\Delta C_T$ -Werte wurden für die 4 verschiedenen histologischen Gruppen errechnet.

Von den azinären Adenokarzinomen wurde der Median der $\Delta\Delta C_T$ -Werte mit 1339,1 errechnet. Minimum betrug 0,2, während das Maximum bei 23380,2 lag.

Der Median des $\Delta\Delta C_T$ -Werts solider Adenokarzinome lag bei 1083,4. Minimum und Maximum betragen 2,2 bzw. 9051,9.

In der Gruppe der Plattenepithelkarzinome stellte sich der Median des $\Delta\Delta C_T$ -Werts mit 73,2 dar. Minimum und Maximum waren 0,3 bzw. 1696,1.

Der Median des $\Delta\Delta C_T$ -Werts pulmonaler Metastasen eines colorektalen Adenokarzinoms betrug 78,3. Minimum und Maximum waren 0,1 bzw. 2842,6.

Die Ergebnisse der statistischen Kenngrößen der $\Delta\Delta C_T$ -Werte in der Gesamtkohorte sind detailliert angegeben (siehe Tab.6). Die Ergebnisse der $\Delta\Delta C_T$ -Werten sind in Abhängigkeit der histologischen Gruppen absolut angegeben (siehe Abb.15).

Zwischen Adenokarzinomen und Nicht-Adenokarzinomen der Lunge ließ sich ein statistisch signifikanter Unterschied der $\Delta\Delta C_T$ -Werte nachweisen (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,000$).

Eine Analyse zwischen azinären Adenokarzinomen und pulmonalen Metastasen eines colorektalen Adenokarzinoms konnte einen statistisch signifikanten Unterschied der $\Delta\Delta C_T$ -Werte nachweisen (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,000$).

Zwischen soliden Adenokarzinomen und Plattenepithelkarzinomen konnte ebenfalls ein statistisch signifikanter Unterschied der $\Delta\Delta C_T$ -Werte nachgewiesen werden (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,000$).

Eine Analyse zwischen azinären Adenokarzinomen und soliden Adenokarzinomen zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied der $\Delta\Delta C_T$ -Werte (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,123$).

Eine Analyse zwischen Plattenepithelkarzinomen und pulmonalen Metastasen eines colorektalen Adenokarzinoms zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied der $\Delta\Delta C_T$ -Werte (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,123$).

Tabelle 6: Darstellung statistischer Kenngrößen der $\Delta\Delta C_T$ -Werte in der Gesamtkohorte.

Histologische Gruppen	AC	SOL	SQCC	pCRC
N	51	50	49	49
	Gültig			
	Fehlend	0	0	0
Mittelwert	2539,7	1439,2	128,9	170,6
Standardfehler des Mittelwertes	566,9	237,7	35,6	59,0
Median	1339,1	1083,4	73,2	78,3
Modus	,23	2,2	,3	,1
Standardabweichung	4048,7	1680,7	249,1	413,1
Varianz	16391631	2824742,1	62075,1	170660,9
Minimum	,2	2,2	,3	,1
Maximum	23380,2	9051,9	1696,1	2842,6
Perzentile				
	25	595,5	348,7	12,1
	50	1339,1	1083,4	73,2
	75	2577,9	1765,9	166,2

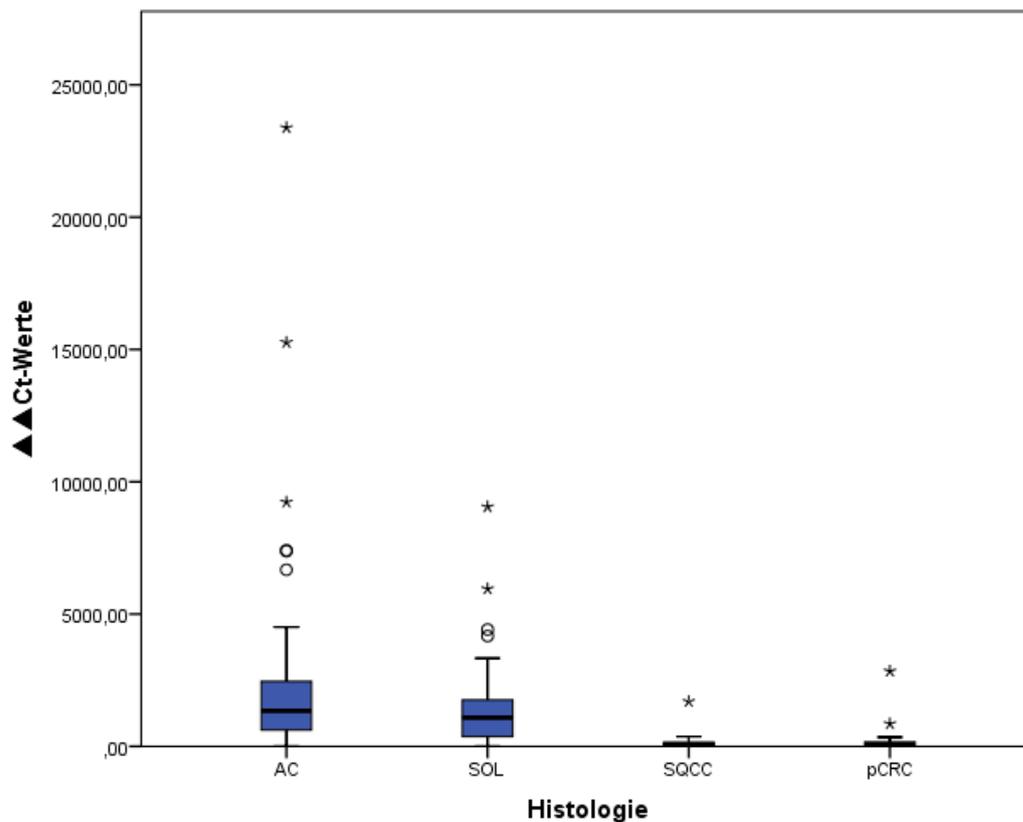


Abbildung 15: Boxplot der $\Delta\Delta C_T$ -Werte von TTF-1 mRNA in Abhängigkeit der histologischen Gruppen (Kreis=Ausreißer, Stern=extreme Werte).

4.7. ROC-Kurve zur Prädiktoren-Analyse

Ziel der folgenden ROC-Analysen war es, anhand eines über die ROC-Kurve bzw. Youden-Index ermittelten $\Delta \Delta C_T$ -Schwellenwert eine Voraussage über die in der qRT-PCR gewonnenen $\Delta \Delta C_T$ -Werte in TTF-1 positiv/negativ zu treffen.

Dazu wurde im ersten Schritt die ROC-Kurve gebildet:

4.7.1. ROC-Kurve azinärer und solider pulmonaler Adenokarzinome

Bei der Betrachtung der azinären und soliden pulmonalen Adenokarzinomen zeigte sich bei der ROC-Analyse (Abb.16) für die Vorhersage einer TTF-1 positiven bzw. negativen Immunhistologie eine statistische Signifikanz. Die AUC lag bei 0,678 mit einem p-Wert von 0,003 (95% -KI 0,559-0,796).

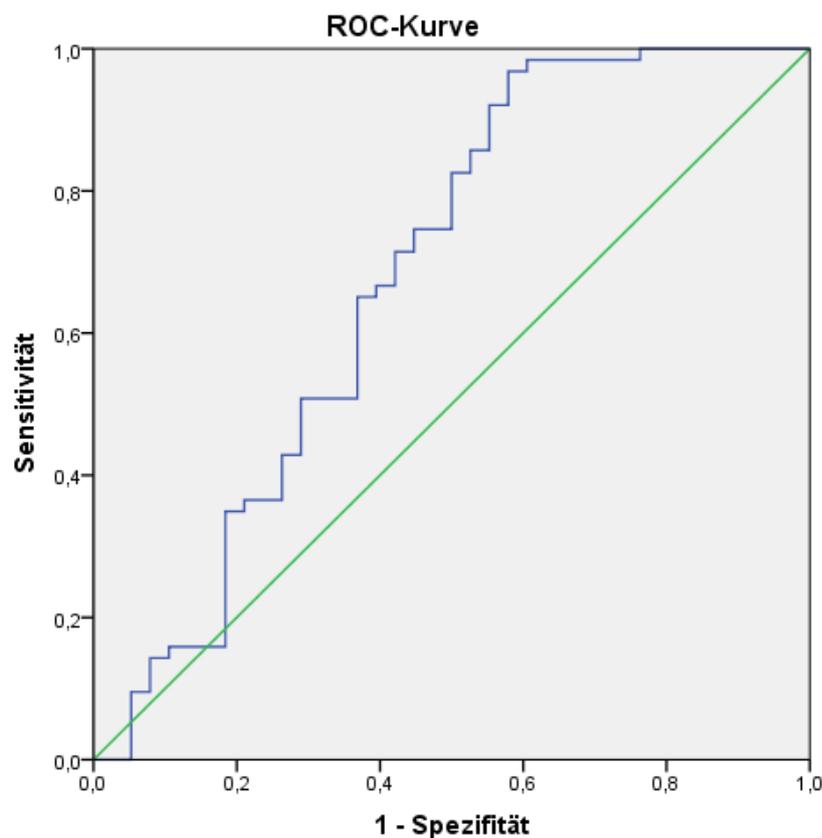


Abbildung 16: ROC-Kurve azinärer und solider pulmonaler Adenokarzinome.

4.7.2. ROC-Kurve azinärer pulmonaler Adenokarzinome

In der Gruppe der azinären pulmonalen Adenokarzinome konnte in der ROC-Kurve (Abb.17) zur Vorhersage einer TTF-1 positiven bzw. negativen Immunhistologie keine statistische Signifikanz gefunden werden. Die AUC stellte sich mit 0,552 und einem p-Wert von 0,541 dar (95% -KI 0,370-0,734).

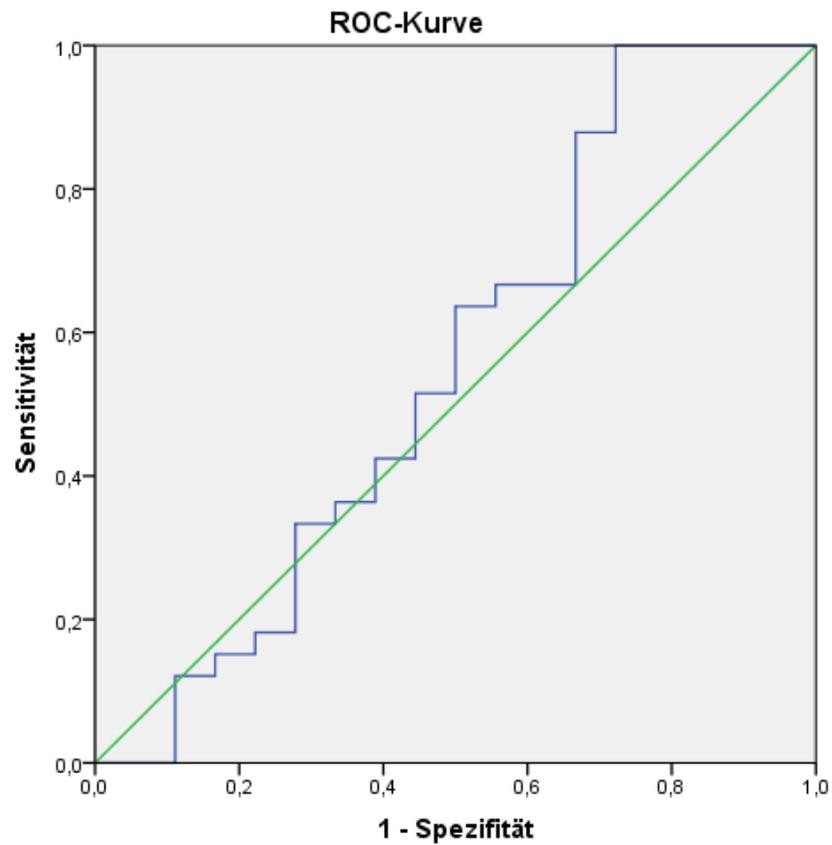


Abbildung 17: ROC-Kurve azinärer pulmonaler Adenokarzinome.

4.7.3. ROC-Kurve solider pulmonaler Adenokarzinome

Bei den soliden pulmonalen Adenokarzinomen konnte in der ROC-Kurve (Abb.18) eine statistische Signifikanz für die Vorhersage einer TTF-1 positiven bzw. negativen Immunhistologie bestimmt werden. Die AUC betrug 0,793 bei einem p-Wert von 0,000 (95% - KI 0,655-0,932).

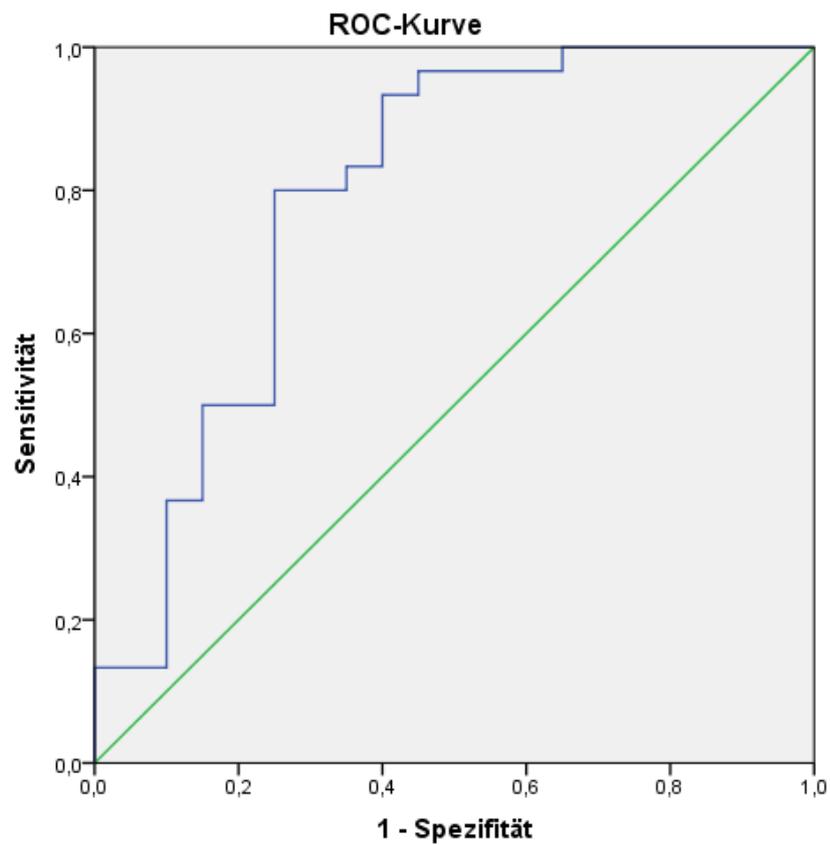


Abbildung 18: ROC-Kurve solider pulmonaler Adenokarzinome.

4.8. Berechnung des $\Delta\Delta C_T$ -Schwellenwert mittels Youden-Index

Mittels Berechnung des Youden-Index sollte ein Cut-off-Wert bestimmt werden, der es ermöglicht anhand von $\Delta\Delta C_T$ -Werten der qRT-PCR TTF-1 positive von TTF-1 negativen Karzinomen zu unterscheiden.

Berechnet man den maximalen Youden-Index in der ROC-Kurve für die azinären und soliden Adenokarzinome (Abb.19), stellte er sich mit einer Sensitivität von 0,968 (96,8%) und einer Spezifität von 0,421 (42,1%) dar. Der Cut-off- $\Delta\Delta C_T$ -Wert wurde mit 300,14 errechnet. Der Youden-Index lag bei 0,389.

Bei den azinären Adenokarzinomen wurde der maximale Youden-Index-Punkt in der ROC-Kurve (Abb.20) bei einer Sensitivität von 1 (100%) und einer Spezifität von 0,278 (27,8%) ermittelt. Der $\Delta\Delta C_T$ -Schwellenwert zur Prädiktion einer TTF-1 positiven Immunhistologie wurde daher bei 238,25 kalkuliert. Der Youden-Index wurde mit 0,278 berechnet.

Die ROC-Kurve der soliden Adenokarzinome (Abb. 21) stellte den maximalen Youden-Index-Punkt mit einer Sensitivität von 0,8 (80%) und einer Spezifität von 0,75 (75%) dar. Der bei diesem Punkt zur Prädiktion einer TTF-1 positiven Immunhistologie ermittelte $\Delta\Delta C_T$ -Schwellenwert lag bei 825,73. Der Youden-Index betrug 0,55.

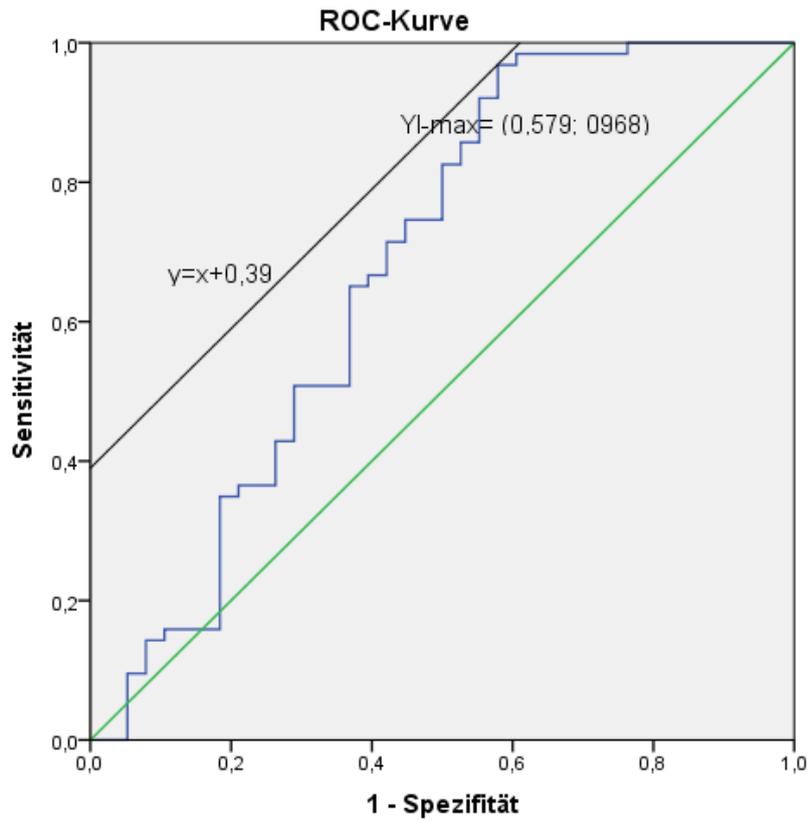


Abbildung 19: Ermittlung des maximalen Youden-Index (YI-max) azinärer und solider pulmonaler Adenokarzinome.

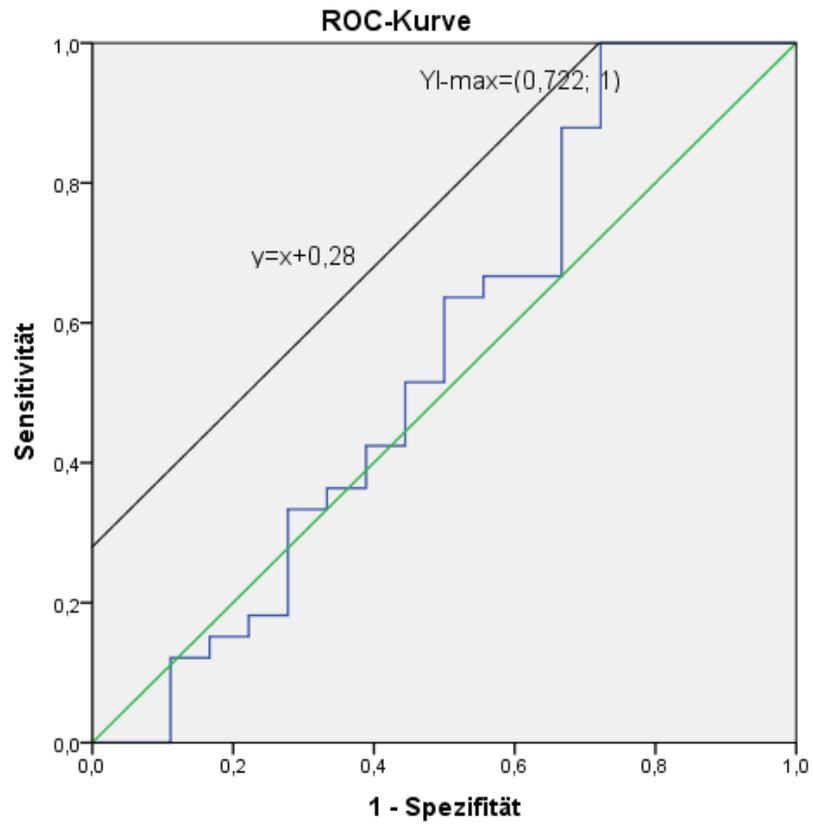


Abbildung 20: Ermittlung des maximalen Youden-Index (YI-max) azinärer pulmonaler Adenokarzinome.

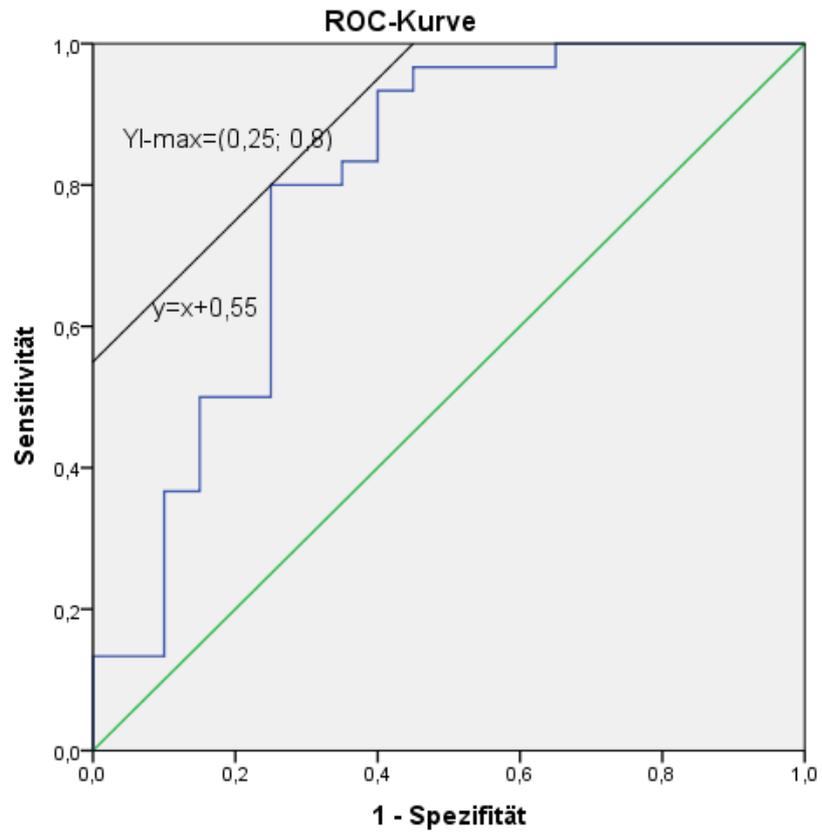


Abbildung 21: Ermittlung des maximalen Youden-Index (YI-max) solider pulmonaler Adenokarzinome.

4.9. Vergleich der diagnostischen Techniken: qRT-PCR und Immunhistologie

4.9.1. Anwendung des $\Delta\Delta C_T$ -Schwellenwert für azinäre und solide pulmonalen Adenokarzinome

Nach der Bestimmung des $\Delta\Delta C_T$ -Schwellenwertes in der ROC-Analyse, wurden die histologischen Gruppen hinsichtlich TTF-1 positiver und negativer $\Delta\Delta C_T$ -Werte unterschieden. Es wurde der Cut-off-Wert von 300,14 verwandt. In der Gruppe der azinären pulmonalen Adenokarzinome waren 45 von 51 (88,2%) Fällen TTF-1 positiv und 6 von 51 Fällen (11,8%) TTF-1 negativ. Bei den soliden pulmonalen Adenokarzinomen waren 38 (76%) TTF-1 positiv und 12 (24%) TTF-1 negativ. Bei den pulmonalen Plattenepithelkarzinomen und pulmonalen Metastasen waren jeweils 3 bzw. 4 Fälle (6,5% bzw. 8,2%) TTF-1 positiv und 46 bzw. 45 (93,5%; 91,8%) der Proben TTF-1 negativ. Die Sensitivität und Spezifität bei der Abgrenzung von Adenokarzinomen und Nicht-Adenokarzinomen der Lunge betrug 82,2% Sensitivität und 92,9 % Spezifität für die Erkennung eines pulmonalen Adenokarzinoms durch eine positive qRT-PCR. Der positive bzw. negative prädiktive Wert lag bei 92,2% bzw. 83,5%. Eine Übersicht der Resultate ist angegeben (Abb.22).

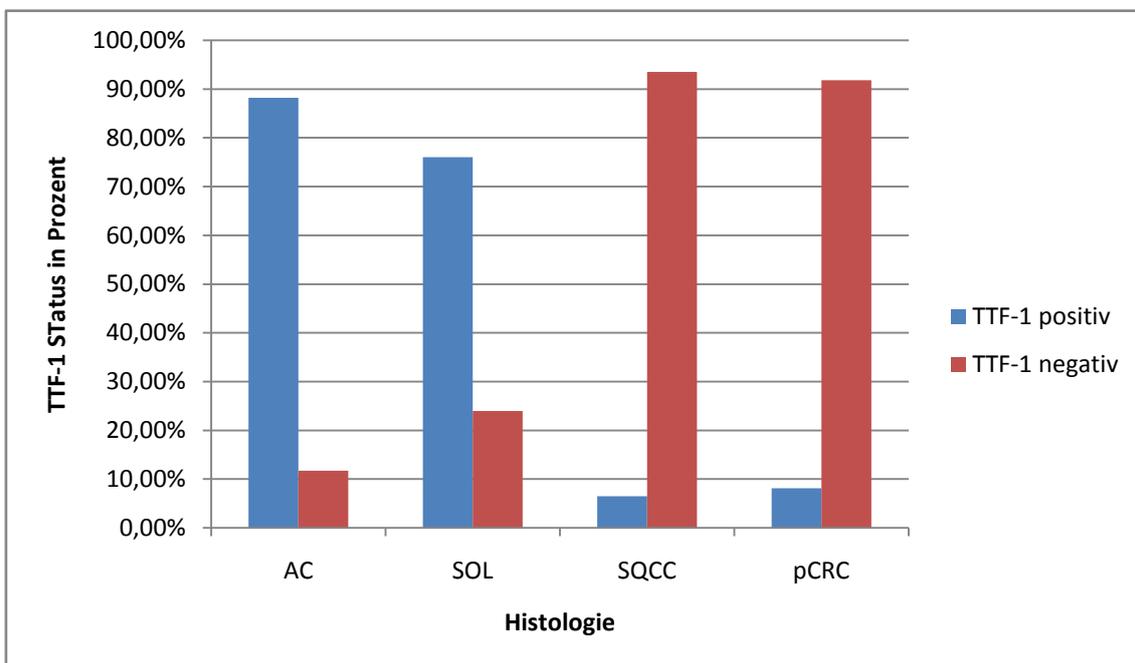


Abbildung 22: Übersicht der Resultate aus qRT-PCR nach Anwendung des $\Delta\Delta C_T$ -Schwellenwertes von 300,14; in Prozent.

4.9.1.1. Gegenüberstellung der Resultate aus qRT-PCR (Schwellenwert 300,14) und Immunhistologie

Die Ergebnisse von Immunhistologie und qRT-PCR sind in Abb. 23 gegenübergestellt. Immunhistologie und qRT-PCR detektierten 32 (62,7%) der azinären pulmonalen Adenokarzinome und 29 (58%) der soliden pulmonalen Adenokarzinome als TTF-1 positiv. 46 (93,9%) der pulmonalen Plattenepithelkarzinome und 45 (91,8%) der pulmonalen Metastasen wurden von beiden Methoden als TTF-1 negativ erkannt. Die qRT-PCR konnte mittels des $\Delta\Delta C_T$ -Schwellenwertes von 300,14 im Vergleich zur Immunhistologie bei den azinären Adenokarzinomen 13 von 51 (25,4%) Gewebeproben und bei den soliden Adenokarzinomen 9 von 50 (18%) Gewebeproben zusätzlich detektieren. 3 von 49 (6,1%) Gewebeproben der Plattenepithelkarzinome und 4 von 49 (8,2%) Gewebeproben der pulmonalen Metastasen bestimmte die qRT-PCR als Falsch-positiv. Die Immunhistologie konnte gegenüber der qRT-PCR in der Gruppe der azinären und soliden Adenokarzinome 1 von 51 (1,9%) bzw. 1 von 50 (2%) Gewebeproben zusätzlich detektieren. 5 (9,8%) Gewebeproben der azinären Adenokarzinomen und 11 (22%) Gewebeproben der soliden Adenokarzinome konnten weder durch qRT-PCR noch Immunhistologie erkannt werden.

Die detaillierten Ergebnisse sind tabellarisch veranschaulicht (siehe Anhang Tab.11-14).

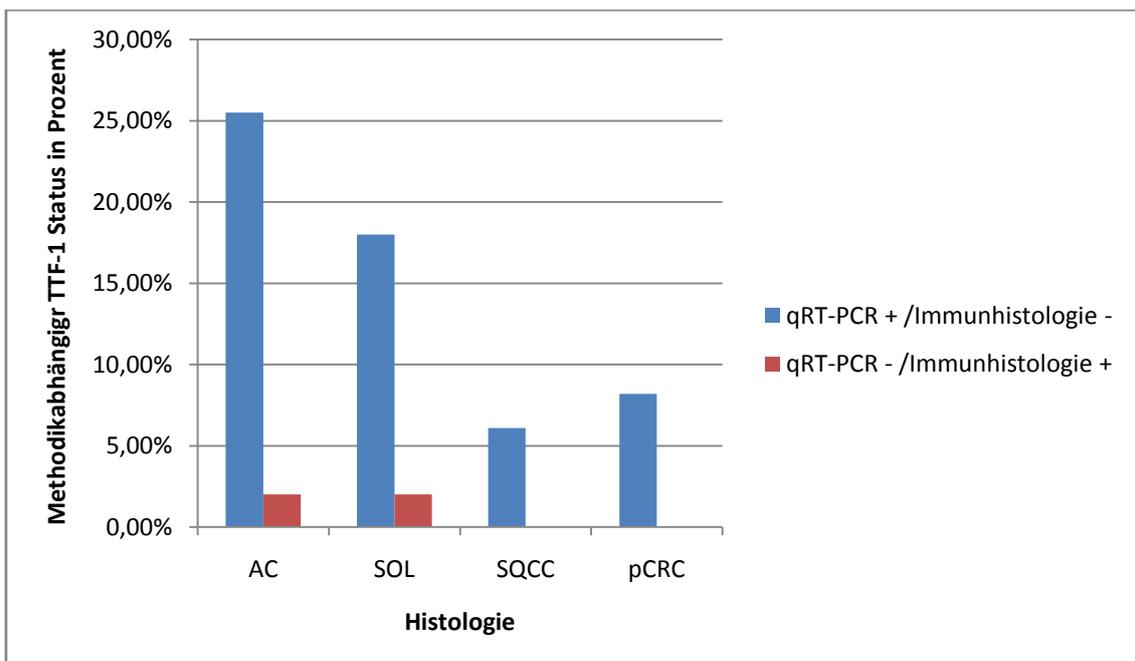


Abbildung 23: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Immunhistologie und qRT-PCR (Schwellenwert 300,14) in den histologischen Gruppen; in Prozent.

4.9.2. Anwendung des $\Delta\Delta C_T$ -Schwellenwert für azinäre pulmonale Adenokarzinome

Der Cut-off-Wert in Höhe von 238,25 trennte die mittels qRT-PCR erhaltenen $\Delta\Delta C_T$ -Werte in TTF-1 positiv bzw. negativ. Dabei wurde den azinären pulmonalen Adenokarzinomen die pulmonalen Metastasen eines colorektalen Adenokarzinoms gegenübergestellt. In der Gruppe der azinären Adenokarzinome waren 46 von 51 (90,2%) Fällen TTF-1 positiv und 5 von 51 (9,8%) Fällen TTF-1 negativ. Bei den pulmonalen Metastasen eines colorektalen Adenokarzinoms stellten sich 7 (14,3%) Gewebeproben TTF-1 positiv und 42 (85,7%) Proben TTF-1 negativ dar. Nach Anwendung des o.g. Cut-Off-Wertes auf beide Tumorentitäten wurde eine Sensitivität von 90% und eine Spezifität von 85,7% in der qRT-PCR errechnet. Der positive bzw. negative prädiktive Wert betrug 86,8% bzw. 89,4%. Die Ergebnisse sind übersichtlich dargestellt (Abb.24).

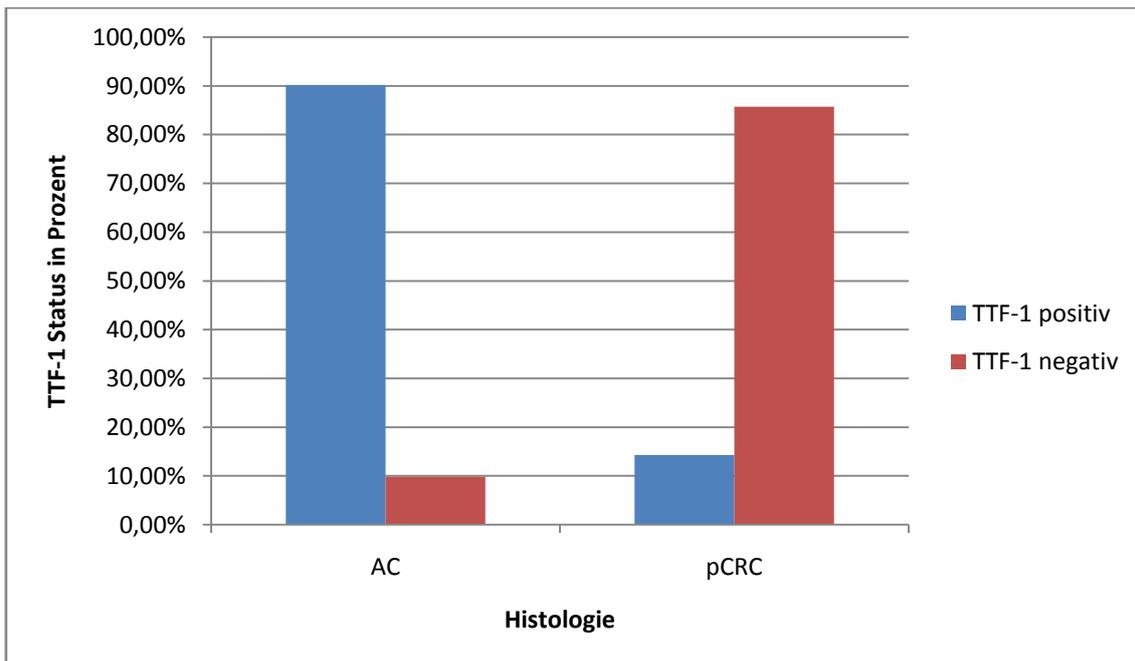


Abbildung 24: Übersicht der Resultate aus qRT-PCR nach Anwendung des $\Delta\Delta C_T$ -Schwellenwertes von 238,25; in Prozent.

4.9.2.1. Gegenüberstellung der Resultate aus qRT-PCR (Schwellenwert 238,25) und Immunhistologie

Die Ergebnisse von Immunhistologie und qRT-PCR sind in Abb. 25 gegenübergestellt. Immunhistologie und qRT-PCR detektierten 33 (64,7%) Proben der azinären pulmonalen Adenokarzinome als TTF-1 positiv. 42 (85,7%) Gewebeproben der pulmonalen Metastasen wurden von beiden Methoden als TTF-1 negativ erkannt. Die qRT-PCR konnte im Vergleich zur Immunhistologie mittels des $\Delta\Delta C_T$ -Schwellenwertes von 238,25 13 von 51 (25,5%) Fällen der azinären Adenokarzinome zusätzlich detektieren. 7 von 49 (14,3%) Gewebeproben der pulmonalen Metastasen bestimmte die qRT-PCR als Falsch-positiv. Die Immunhistologie konnte gegenüber der qRT-PCR in der Gruppe der azinären Adenokarzinome keine Gewebeproben zusätzlich detektieren. 5 (9,8%) Gewebeproben der azinären Adenokarzinome konnten weder durch qRT-PCR, noch Immunhistologie erkannt werden.

Die detaillierten Ergebnisse sind tabellarisch veranschaulicht (siehe Anhang Tab.15-16).

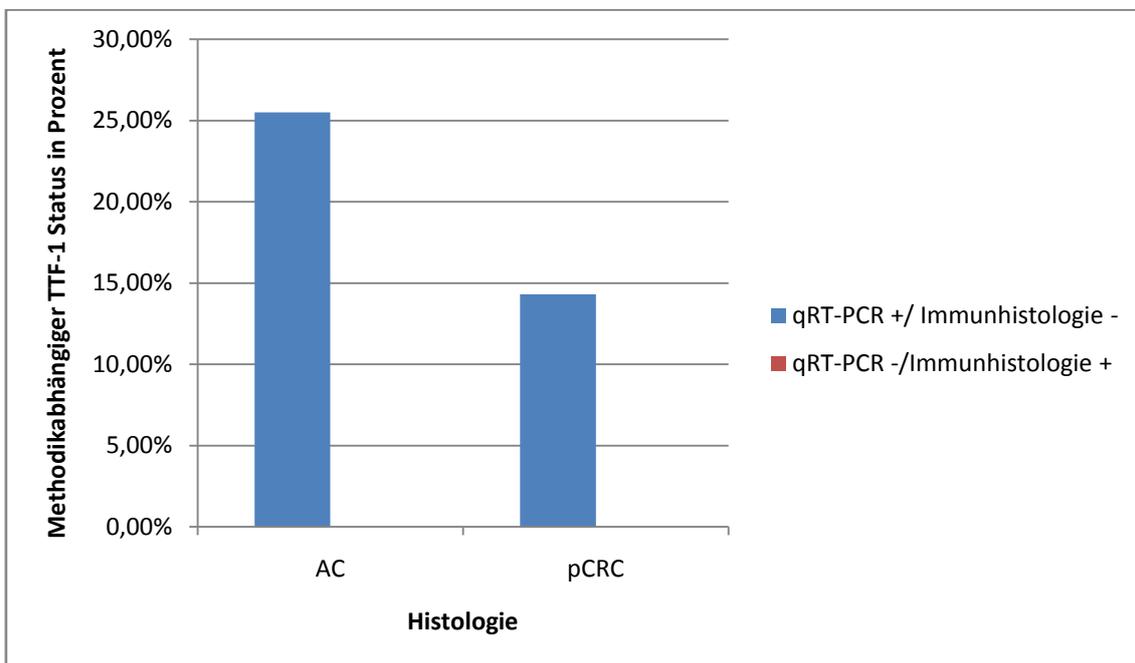


Abbildung 25: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Immunhistologie und qRT-PCR (Schwellenwert 238,25) in azinären pulmonalen Adenokarzinomen und pulmonalen Metastasen; in Prozent.

4.9.3. Anwendung des $\Delta\Delta C_T$ -Schwellenwert für solide pulmonale Adenokarzinome

Der Cut-off-Wert in Höhe von 825,75 trennte die mittels qRT-PCR erhaltenen $\Delta\Delta C_T$ -Werte in TTF-1 positiv bzw. negativ. Dabei wurde den soliden pulmonalen Adenokarzinomen die pulmonalen Plattenepithelkarzinome gegenübergestellt. In der Gruppe der soliden Adenokarzinome waren 29 von 50 (58%) Fällen TTF-1 positiv und 21 von 50 (42%) Fällen TTF-1 negativ. Bei den Plattenepithelkarzinomen stellte sich 1 (2%) Probe TTF-1 positiv und 48 (98%) Proben TTF-1 negativ dar. Nach Anwendung des o.g. Cut-Off-Wertes auf beide Tumorentitäten wurde eine Sensitivität von 58% und eine Spezifität von 98% in der qRT-PCR errechnet. Der positive bzw. negative prädiktive Wert lag bei 96,7% bzw. 69,7%. Die Ergebnisse sind übersichtlich dargestellt (Abb.26).

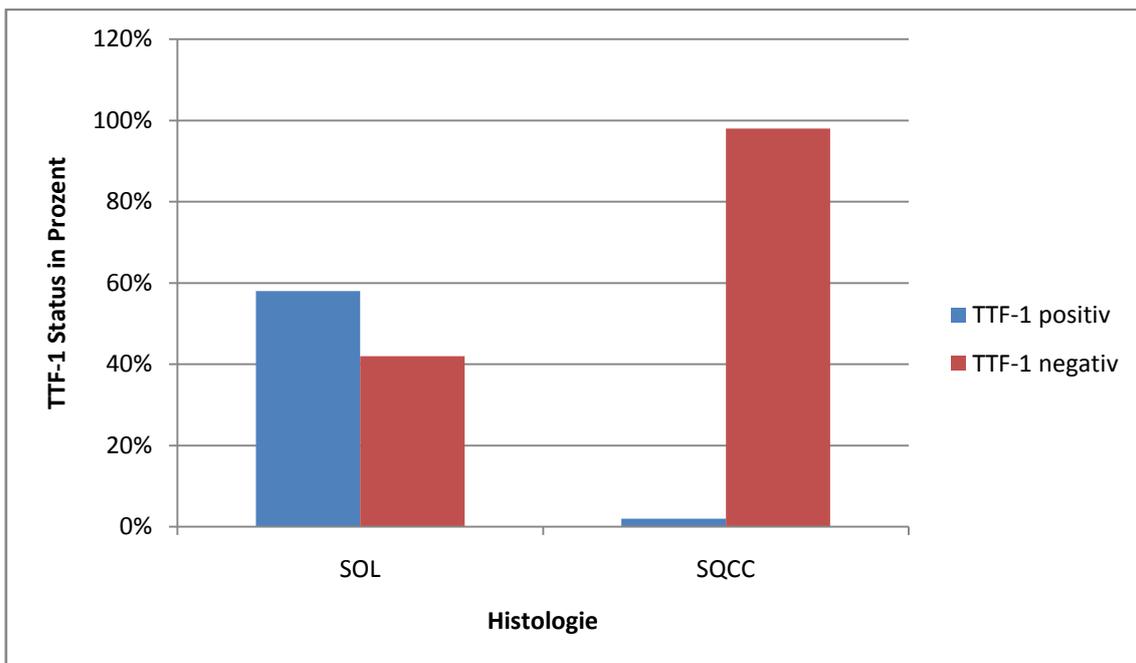


Abbildung 26: Übersicht der Resultate aus qRT-PCR nach Anwendung des $\Delta\Delta C_T$ -Schwellenwertes von 825,75; in Prozent.

4.9.3.1. Gegenüberstellung der Resultate aus qRT-PCR (Schwellenwert 825,75) und Immunhistologie

Die Ergebnisse von Immunhistologie und qRT-PCR sind in Abb. 27 gegenübergestellt. Immunhistologie und qRT-PCR detektierten 24 (48%) Proben der soliden pulmonalen Adenokarzinome als TTF-1 positiv. 48 (97,9%) Proben der pulmonalen Plattenepithelkarzinome wurden von beiden Methoden als TTF-1 negativ erkannt. Die qRT-PCR konnte im Vergleich zur Immunhistologie 5 von 50 (10%) Fällen der soliden Adenokarzinome zusätzlich detektieren. 1 von 49 (2,1%) Gewebeproben der Plattenepithelkarzinome bestimmte die qRT-PCR als Falsch-positiv. Die Immunhistologie konnte gegenüber der qRT-PCR 6 von 50 (12%) Gewebeproben der soliden Adenokarzinome zusätzlich detektieren. 15 (30%) Gewebeproben der soliden Adenokarzinome wurden weder durch qRT-PCR, noch Immunhistologie erkannt.

Die detaillierten Ergebnisse sind tabellarisch veranschaulicht (siehe Anhang Tab.17-18).

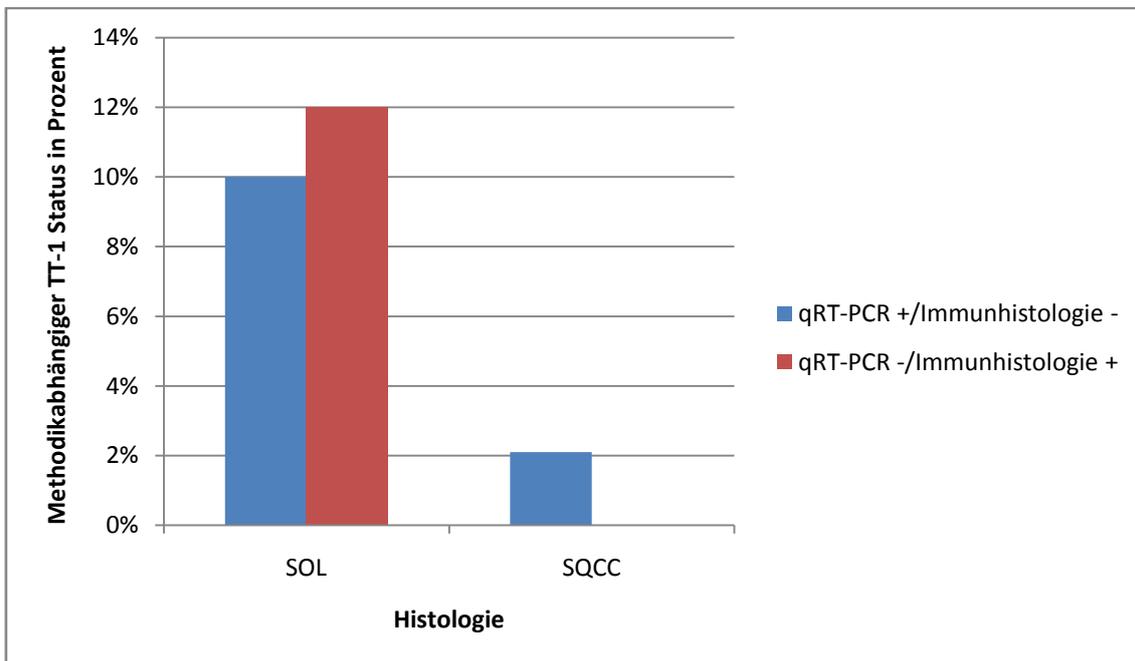


Abbildung 27: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Immunhistologie und qRT-PCR (Schwellenwert 825,75) in soliden pulmonalen Adenokarzinomen und pulmonalen Plattenepithelkarzinomen; in Prozent.

4.9.4. Übersicht der Ergebnisse zur Unterscheidung zwischen TTF-1 positiv/negativ mittels der verschiedenen ▲▲C_T-Schwellenwerte

In der folgenden Tabelle werden die mittels der unterschiedlichen ▲▲C_T-Schwellenwerte erbrachten Ergebnisse zur Unterscheidung zwischen TTF-1 positiv und negativ übersichtlich zusammengefasst (Tab.7).

Tabelle 7: Ergebnisse der verschiedenen ▲▲C_T-Schwellenwerte zur Unterscheidung zwischen TTF-1 positiv/negativ.

Histologie	▲▲C _T - Schwellenwert	qRT-PCR TTF-1 positiv (>▲▲C _T - Schwellenwert)	qRT-PCR TTF-1 negativ (<▲▲C _T - Schwellenwert)	Summe	Sensitivität, Spezifität, PPW
AC	300,14	45 (88,2%)	6 (11,8%)	51	Se/Sp _{AC+SOL} :
	238,25	46 (90,2%)	5 (9,8%)		82,2%/ 92,9%
	825,75	-	-		PPW: 92,2%
SOL	300,14	38 (76%)	12 (24%)	50	Se/Sp _{AC} :
	238,25	-	-		90%/ 85,7%
	825,75	29 (58%)	21 (42%)		PPW: 86,8%
SQCC	300,14	3 (6,5%)	46 (93,5%)	49	Se/Sp _{SOL} :
	238,25	-	-		58%/ 98%
	825,75	1 (2%)	48 (98%)		PPW: 96,7%
pCRC	300,14	4 (8,2%)	45 (91,8%)	49	
	238,25	7 (14,3%)	42 (85,7%)		
	825,75	-	-		

4.10. Überleben und Tumorstadium

4.10.1. Azinäre pulmonale Adenokarzinome

Bei den azinären Adenokarzinomen bestand kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Überleben und Tumorstadium (Kaplan-Meier-Kurve, $p_{\text{Log-Rank}}=0,014$). Obwohl Log-Rank kleiner $p=0,05$ war, lässt sich keine statistische Signifikanz ermitteln, der Test darf nicht ausgeführt werden, da die Voraussetzungen für valide Ergebnisse nicht gegeben sind.

4.10.2. Solide pulmonale Adenokarzinome

Die soliden Adenokarzinome wiesen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Überleben und Tumorstadium auf (Kaplan-Meier-Kurve, $p_{\text{Log-Rank}}=0,038$). Es werden keine Mediane angegeben, da die Überlebenschance der Gruppe nicht kleiner 50% betrug. Außerdem war der Großteil der Fälle zensiert, wodurch keine Signifikanz berechnet werden konnte.

4.10.3. Pulmonale Plattenepithelkarzinome

Die Plattenepithelkarzinome wiesen auf Grund der Zensierung der Fälle ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Überleben und Tumorstadium auf (Kaplan-Meier-Kurve, $p_{\text{Log-Rank}}=0,286$).

4.10.4. Pulmonale Metastasen eines colorektalen Adenokarzinoms

Für pulmonalen Metastasen colorektaler Adenokarzinome konnte keine Kaplan-Meier-Kurve berechnet werden, da die pulmonalen Metastasen ausschließlich als Faktorvariable Stadium IV* vorhanden sind.

4.11. Überleben und Immunhistologie

4.11.1. Azinäre pulmonale Adenokarzinome

Bei den azinären Adenokarzinomen besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Überleben und Immunhistologie (Kaplan-Meier-Kurve, $p_{\text{Log-Rank}}=0,524$, pHO). Siehe Abb. 28.

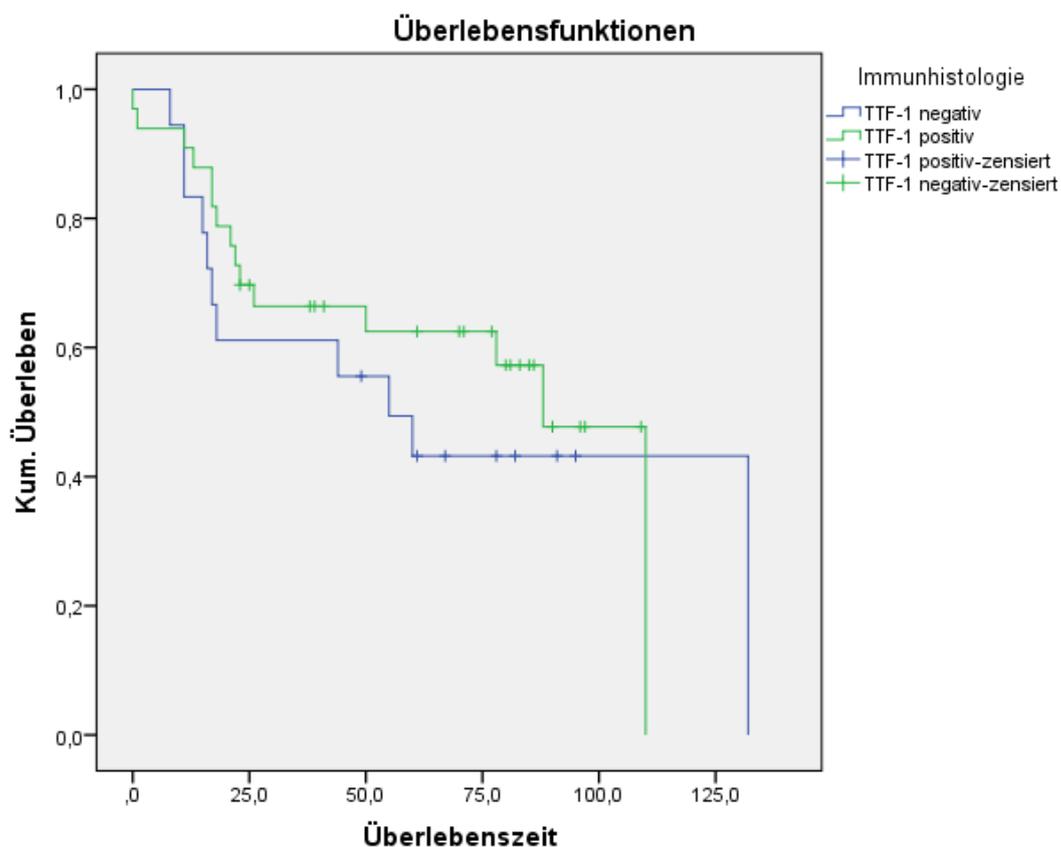


Abbildung 28: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelationsanalyse zwischen Überlebenszeit und TTF-1 Immunhistologie für azinäre pulmonale Adenokarzinome.

Die Unterteilung in TTF-1 negativ bzw. TTF-1 schwach und stark positiv konnte ebenfalls keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Überleben und Histologie liefern (Kaplan-Meier-Kurve, $p_{\text{Log-Rank}}=0,635$).

4.11.2. Solide pulmonale Adenokarzinome

Bei den soliden Adenokarzinomen besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Überleben und Immunhistologie (Kaplan-Meier-Kurve, $p_{\text{Log-Rank}}=0,453$). Siehe Abb. 29.

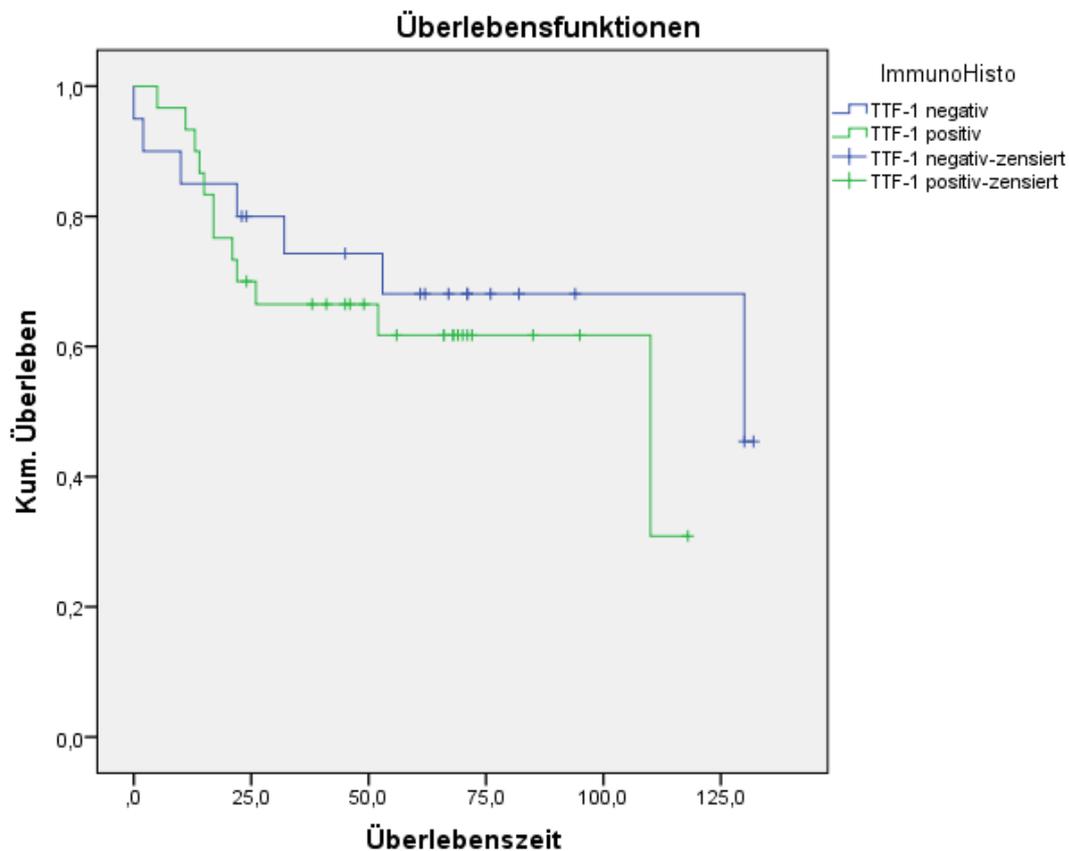


Abbildung 29: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelationsanalyse zwischen Überlebenszeit und TTF-1 Immunhistologie für solide pulmonale Adenokarzinome.

Die Unterteilung in TTF-1 negativ bzw. TTF-1 schwach und stark positiv konnte ebenfalls keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Überleben und Histologie liefern (Kaplan-Meier-Kurve, $p_{\text{Log-Rank}}=0,113$).

4.11.3. Pulmonale Plattenepithelkarzinome und pulmonale Metastasen

Bei den Plattenepithelkarzinomen und pulmonalen Metastasen colorektaler Adenokarzinome besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Überleben und Immunhistologie. Mangels TTF-1 positiver Werte konnten keine Kaplan-Meier-Kurven errechnet werden.

4.12. Tumorstadium und TTF-1 Status anhand der Immunhistologie

4.12.1. Azinäre pulmonale Adenokarzinome

In azinären Adenokarzinomen konnte zwischen Tumorstadium und TTF-1 Status (pos./neg.) ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden (Fisher-Freeman-Halton, $p=0,025$). Semiquantitativer TTF-1 Status (neg./schwach pos./stark pos.) und Tumorstadium unterschieden sich nicht statistisch signifikant (Fisher-Freeman-Halton, $p=0,137$).

4.12.2. Solide pulmonale Adenokarzinome

In soliden Adenokarzinomen konnte zwischen Tumorstadium und TTF-1 Status (pos./neg.) kein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden (Fisher-Freeman-Halton, $p=0,112$). Semiquantitativer TTF-1 Status (neg./schwach pos./stark pos.) und Tumorstadium unterschieden sich nicht statistisch signifikant (Fisher-Freeman-Halton, $p=0,099$).

4.12.3. Pulmonale Plattenepithelkarzinome und pulmonale Metastasen colorektaler Adenokarzinome

In Plattenepithelkarzinomen und pulmonalen Metastasen colorektaler Adenokarzinome konnte zwischen Tumorstadium und TTF-1 Status (pos./neg.) bzw. semiquantitativen TTF-1 Status (neg./schwach pos./stark pos.) kein Unterschied errechnet werden, da die Faktorvariable TTF-1 Status bei beiden Gruppen und die Faktorvariable Tumorstadium bei den pulmonalen Metastasen eine Konstante ist. Es konnten keine Kreuztabellen gebildet werden.

4.13. Tumorstadium und TTF-1 Status anhand der ▲▲C_T-Schwellenwerte

4.13.1. ▲▲C_T-Schwellenwert azinärer und solider pulmonaler Adenokarzinome (Schwellenwert 300,14)

Bei einem ▲▲C_T-Schwellenwert von 300,14 konnte bei den azinären Adenokarzinomen ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen TTF-1 Status und Tumorstadium gefunden werden (exakter Test nach Fisher, p=0,03).

Anhand des o.g. Schwellenwertes war bei den soliden Adenokarzinomen kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen TTF-1 Status und Tumorstadium zu erkennen (exakter Test nach Fisher, p=0,077).

Anhand des o.g. Schwellenwertes war bei den Plattenepithelkarzinomen ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen TTF-1 Status und Tumorstadium zu erkennen (exakter Test nach Fisher, p=0,02).

In der Gruppe der pulmonalen Metastasen colorektaler Adenokarzinome kann kein Zusammenhang anhand des o.g. Schwellenwertes berechnet werden, da die pulmonalen Metastasen ausschließlich als Faktorvariable Stadium IV* vorhanden sind.

4.13.2. ▲▲C_T-Schwellenwert azinärer pulmonaler Adenokarzinome (Schwellenwert 238,25)

Bei einem ▲▲C_T-Schwellenwert von 238,25 konnte bei den azinären Adenokarzinomen ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen TTF-1 Status und Tumorstadium gefunden werden (exakter Test nach Fisher, p=0,005).

Anhand des o.g. Schwellenwertes war bei den pulmonalen Metastasen kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen TTF-1 Status und Tumorstadium nachweisbar. Eine Kreuztabelle konnte auf Grund einer konstanten Faktorvariable Stadium IV* nicht gebildet werden.

4.13.3. ▲▲C_T-Schwellenwert solider pulmonaler Adenokarzinome (Schwellenwert 825,75)

Bei einem ▲▲C_T-Schwellenwert von 825,75 konnte bei den soliden Adenokarzinomen kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen TTF-1 Status und Tumorstadium gefunden werden (exakter Test nach Fisher, p=0,195).

Anhand des o.g. Schwellenwertes war bei den Plattenepithelkarzinomen kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen TTF-1 Status und Tumorstadium nachweisbar (exakter Test nach Fisher, p=0,082).

4.14. Überleben und TTF-1 Status anhand der ▲▲C_T-Schwellenwerte

4.14.1. ▲▲C_T-Schwellenwert azinärer und solider pulmonaler Adenokarzinome (Schwellenwert 300,14)

Bei dem ▲▲C_T-Schwellenwert von 300,14 konnte in der Gruppe der azinären Adenokarzinome ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Überlebenszeit und TTF-1 Status nachgewiesen werden (Kaplan-Meier-Kurve, $p_{\text{Log-Rank}}=0,017$). Die entsprechende Kaplan-Meier-Kurve ist in Abb. 30 dargestellt.

Anhand des o.g. Schwellenwertes war in der Gruppe der soliden Adenokarzinome kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Überlebenszeit und TTF-1 Status nachweisbar (Kaplan-Meier-Kurve, $p_{\text{Log-Rank}}=0,708$). Die entsprechende Kaplan-Meier-Kurve ist in Abb. 31 dargestellt.

Anhand des o.g. Schwellenwertes war in der Gruppe der Plattenepithelkarzinome kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Überlebenszeit und TTF-1 Status nachweisbar (Kaplan-Meier-Kurve, $p_{\text{Log-Rank}}=0,579$). Die entsprechende Kaplan-Meier-Kurve ist in Abb. 32 dargestellt.

Anhand des o.g. Schwellenwertes war in der Gruppe der pulmonalen Metastasen colorektaler Adenokarzinome kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Überlebenszeit und TTF-1 Status nachweisbar (Kaplan-Meier-Kurve, $p_{\text{Log-Rank}}=0,025$). Der Umfang der Gruppe (n=4) war zu klein, um eine statistische Signifikanz zu belegen. Die entsprechende Kaplan-Meier-Kurve ist in Abb. 33 dargestellt.

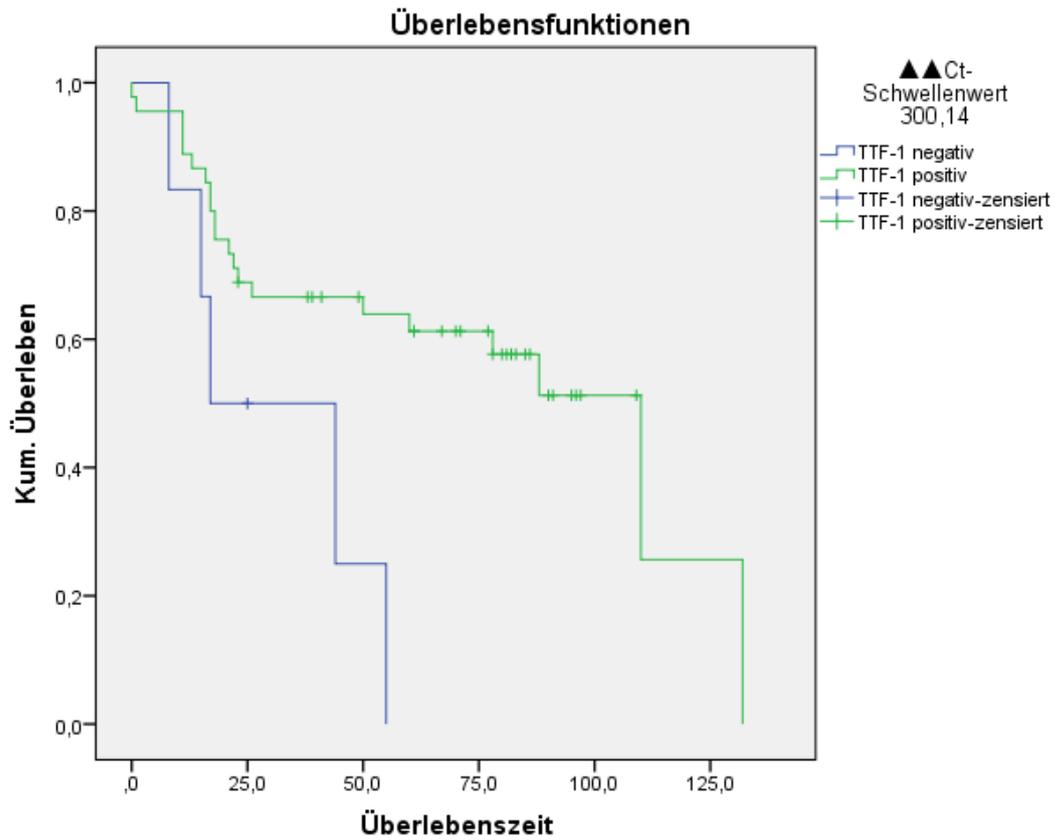


Abbildung 30: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelationsanalyse zwischen Überlebenszeit und TTF-1 positiven bzw. negativen PCR-Resultaten (Schwellenwert 300,14) für azinäre pulmonale Adenokarzinome.

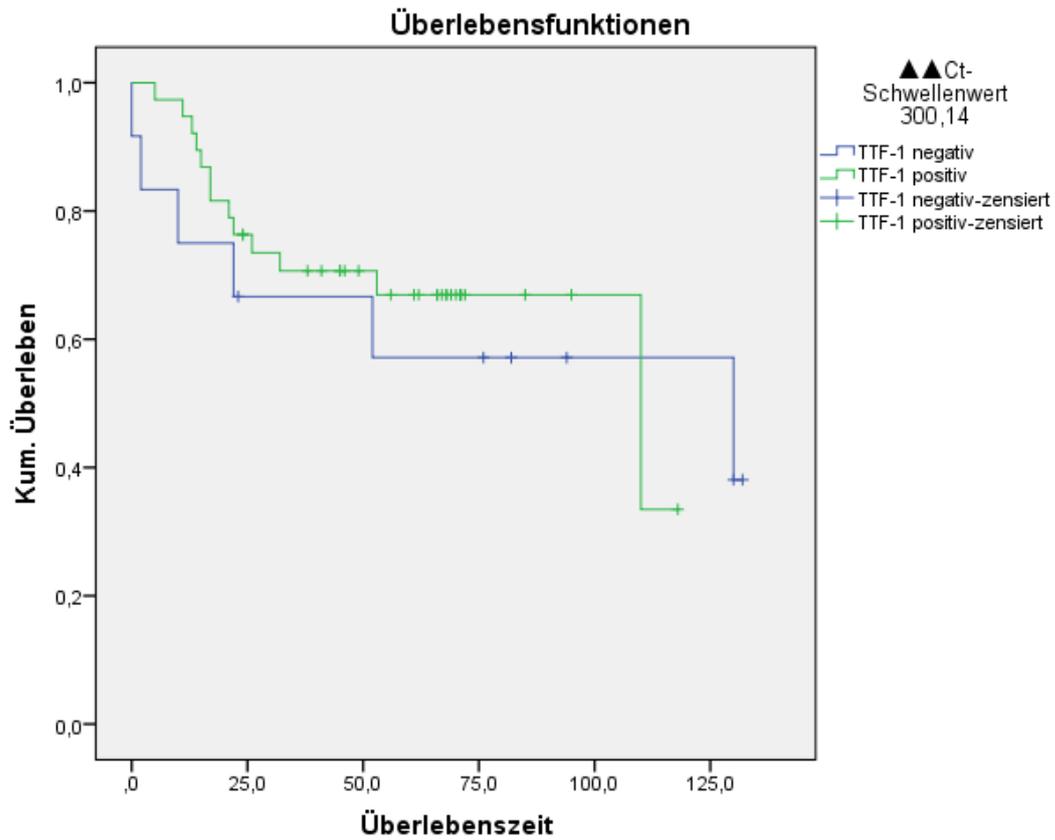


Abbildung 31: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelationsanalyse zwischen Überlebenszeit und TTF-1 positiven bzw. negativen PCR-Resultaten (Schwellenwert 300,14) für solide pulmonale Adenokarzinome.

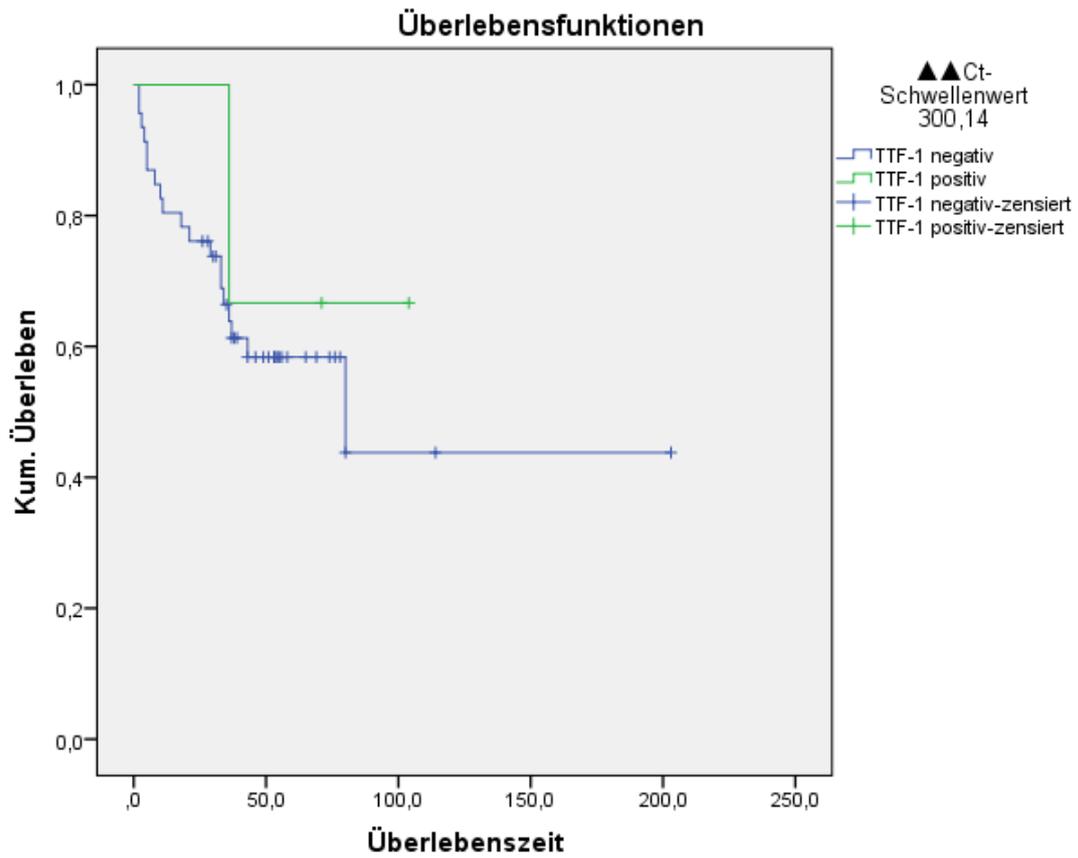


Abbildung 32: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelationsanalyse zwischen Überlebenszeit und TTF-1 positiven bzw. negativen PCR-Resultaten (Schwellenwert 300,14) für pulmonale Plattenepithelkarzinome.

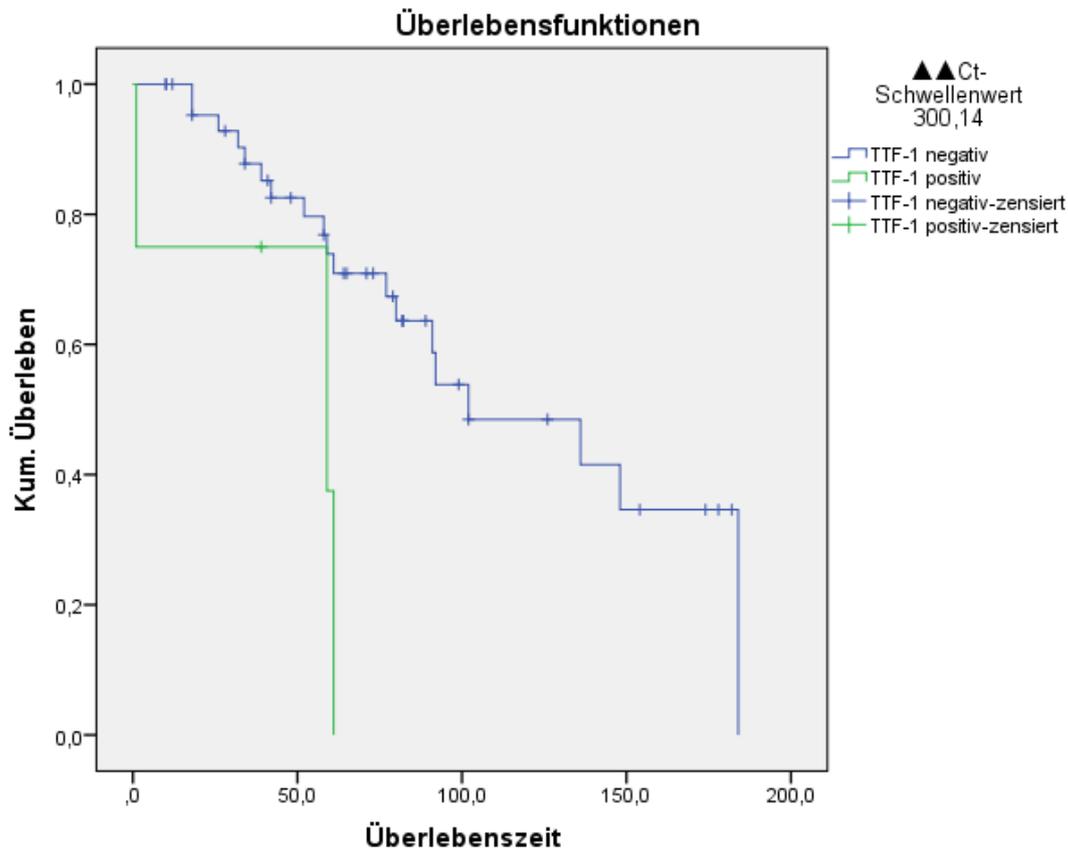


Abbildung 33: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelationsanalyse zwischen Überlebenszeit und TTF-1 positiven bzw. negativen PCR-Resultaten (Schwellenwert 300,14) für pulmonale Metastasen eines colorektalen Adenokarzinoms.

4.14.2. ▲▲C_T-Schwellenwert azinärer pulmonaler Adenokarzinome (Schwellenwert 238,25)

Mittels des ▲▲C_T-Schwellenwert von 238,25 konnte in der Gruppe der azinären Adenokarzinome ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Überlebenszeit und TTF-1 Status ermittelt werden (Kaplan-Meier-Kurve, $p_{\text{Log-Rank}}=0,003$). Die entsprechende Kaplan-Meier-Kurve ist in Abb. 34 dargestellt.

Anhand des o.g. Schwellenwertes war in der Gruppe der pulmonalen Metastasen colorektaler Adenokarzinome kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Überlebenszeit und TTF-1 Status nachweisbar (Kaplan-Meier-Kurve, $p_{\text{Log-Rank}}=0,061$). Die entsprechende Kaplan-Meier-Kurve ist in Abb. 35 dargestellt.

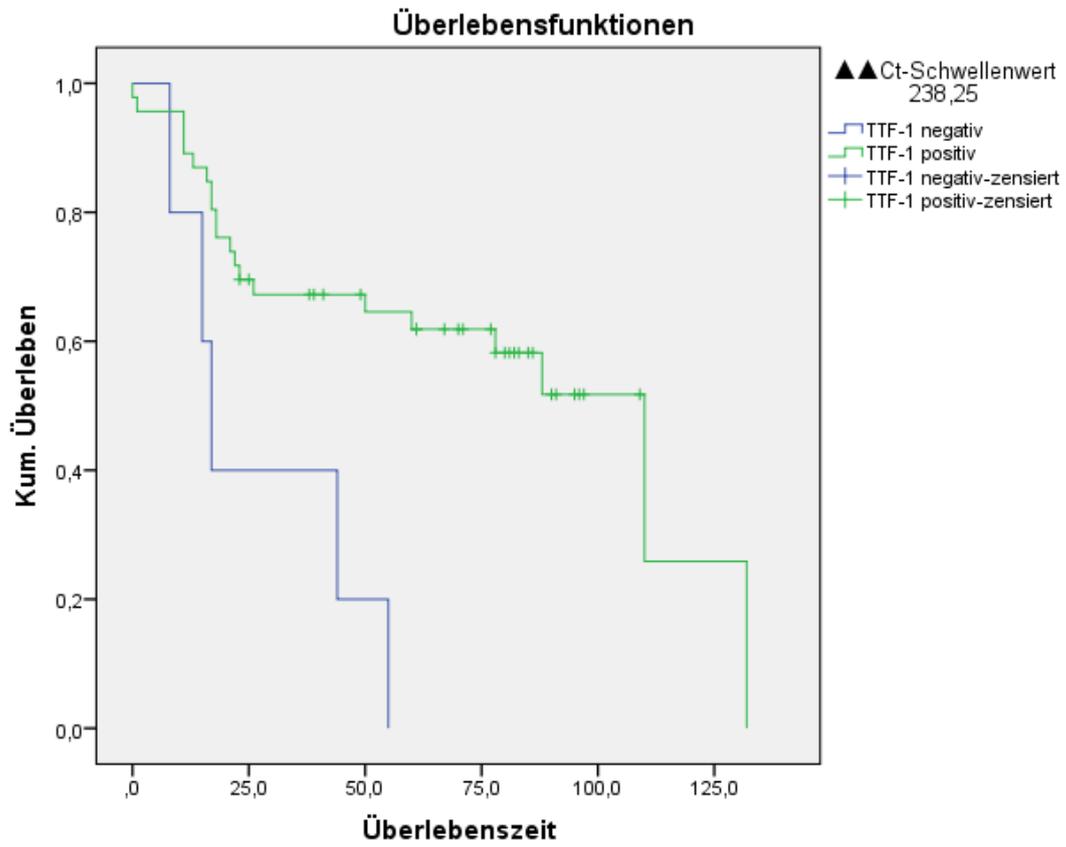


Abbildung 34: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelationsanalyse zwischen Überlebenszeit und TTF-1 positiven bzw. negativen PCR-Resultaten (Schwellenwert 238,25) für azinäre pulmonale Adenokarzinome.

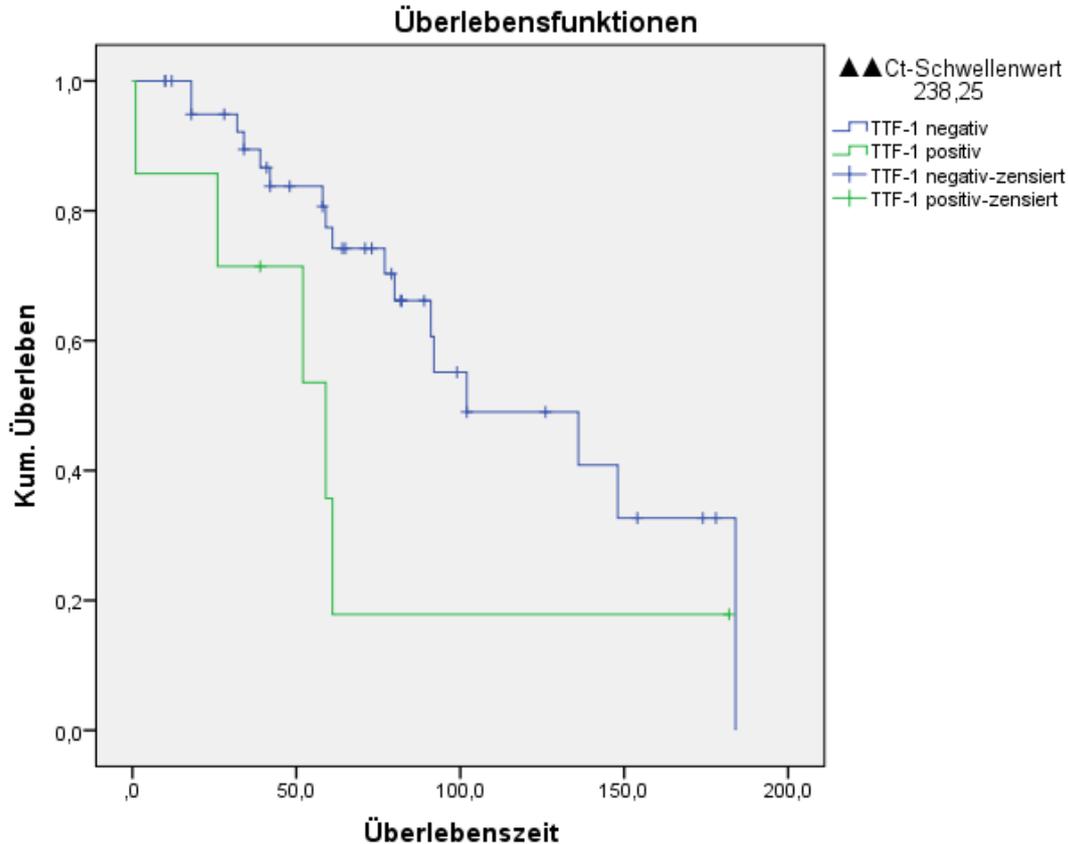


Abbildung 35: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelationsanalyse zwischen Überlebenszeit und TTF-1 positiven bzw. negativen PCR-Resultaten (Schwellenwert 238,25) für pulmonale Metastasen eines colorektalen Adenokarzinoms.

4.14.3. ▲▲ C_T -Schwellenwert solider pulmonaler Adenokarzinome (Schwellenwert 825,75)

Mittels des ▲▲ C_T -Schwellenwert von 825,75 konnte in der Gruppe der soliden Adenokarzinome kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Überlebenszeit und TTF-1 Status ermittelt werden (Kaplan-Meier-Kurve, $p_{\text{Log-Rank}}=0,384$). Die entsprechende Kaplan-Meier-Kurve ist in Abb. 36 dargestellt.

Anhand des o.g. Schwellenwertes war in der Gruppe der Plattenepithelkarzinome kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Überlebenszeit und TTF-1 Status nachweisbar (Kaplan-Meier-Kurve, $p_{\text{Log-Rank}}=0,461$). Die entsprechende Kaplan-Meier-Kurve ist in Abb. 37 dargestellt.

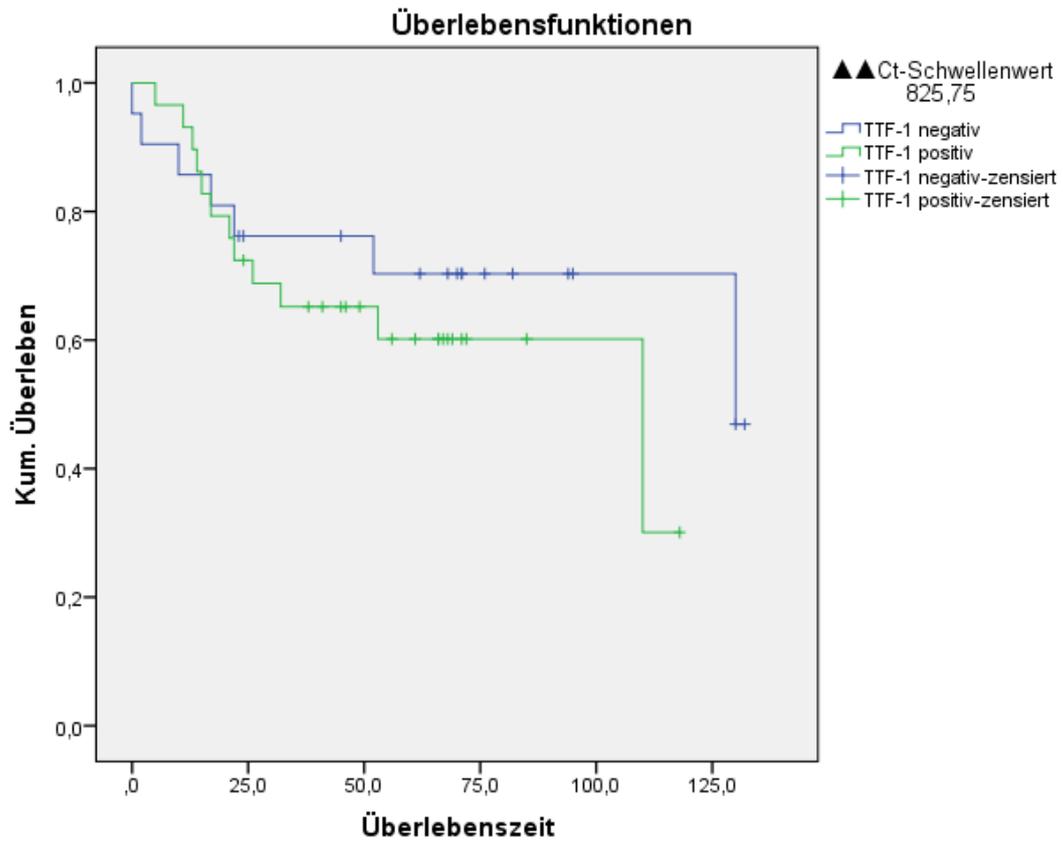


Abbildung 36: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelationsanalyse zwischen Überlebenszeit und TTF-1 positiven bzw. negativen PCR-Resultaten (Schwellenwert 825,75) für solide pulmonale Adenokarzinome.

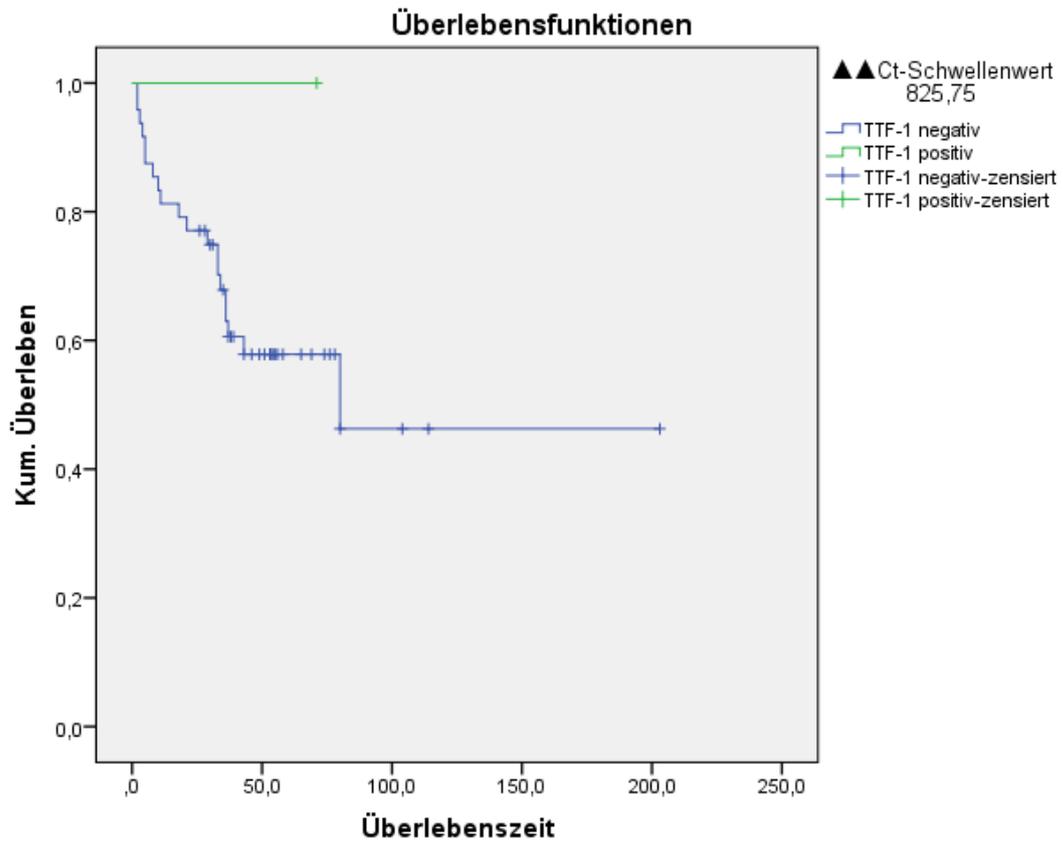


Abbildung 37: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelationsanalyse zwischen Überlebenszeit und TTF-1 positiven bzw. negativen PCR-Resultaten (Schwellenwert 825,75) für pulmonale Plattenepithelkarzinome.

4.15. Zusammenhang TTF-1 mRNA und Protein

4.15.1. Azinäre und solide pulmonale Adenokarzinome

Bei Anwendung des Schwellenwertes der pulmonalen azinären und soliden Adenokarzinome (300,14) korrelierten die mittels qRT-PCR erhaltenen TTF-1 mRNA Resultate signifikant mit den immunhistologischen Ergebnissen des TTF-1 Protein (Spearman-Rank-Korrelationskoeffizient, $p=0,000$, $r_s=0,493$). Dabei handelte es sich nach Cohen (Cohen 1992) um einen mittleren Effekt.

4.15.2. Azinäre pulmonale Adenokarzinome

Bei Anwendung des Schwellenwertes der azinären Adenokarzinome (238,25) korrelierten die mittels qRT-PCR erhaltenen TTF-1 mRNA Resultate signifikant mit den immunhistologischen Ergebnissen des TTF-1 Protein (Spearman-Rank-Korrelationskoeffizient, $p=0,001$, $r_s=0,45$). Dabei handelte es sich nach Cohen (Cohen 1992) um einen mittleren Effekt.

4.15.3. Solide pulmonale Adenokarzinome

Bei Anwendung des Schwellenwertes der soliden Adenokarzinome (825,75) korrelierten die mittels qRT-PCR erhaltenen TTF-1 mRNA Resultate signifikant mit den immunhistologischen Ergebnissen des TTF-1 Protein (Spearman-Rank-Korrelationskoeffizient, $p=0,000$, $r_s=0,546$). Dabei handelte es sich nach Cohen (Cohen 1992) um einen starken Effekt.

4.16. Korrelationsanalyse zwischen klinischen und histopathologischen Parametern

Tabelle 8: Übersicht der Korrelationsanalysen klinisch-histopathologischer Parameter (Azinäre pulmonale Adenokarzinome= Azinäre AD; Solide pulmonale Adenokarzinome= Solide AD; Pulmonale Plattenepithelkarzinome= SQCC; Pulmonale Metastasen eines colorektalen Karzinoms=pCRC).

Parameter	<u>Azinäre AD</u> p-Value	<u>Solide AD</u> p-Value	<u>SQCC</u> p-Value	<u>pCRC</u> p-Value
Tumorstadium-Geschlecht	0,286	0,432	0,288	-
Tumorstadium-Immunhistologie				
Pos./neg.	0,025	0,112	-	-
Semiquantitativ	0,137	0,099	-	-
Geschlecht-Immunhistologie	0,603	0,412	-	-
Überleben-Tumorstadium				
Log-Rank	0,014	0,038	0,286	-
Überleben-Immunhistologie (TTF-1 pos., neg.)				
Log-Rank	0,524	0,453	-	-
Überleben-Geschlecht				
Log-Rank	0,917	0,143	0,447	0,97
▲▲C_T-Werte-Tumorstadium				
C _T -Schwellenwert 300,14	0,03	0,077	0,02	-
C _T -Schwellenwert 238,25(AC/CRC)	0,005	-	-	-
C _T -Schwellenwert 825,75(SOL/SQCC)	0,195	-	0,082	-
▲▲C_T-Werte-Geschlecht				
C _T -Schwellenwert 300,14	1	0,526	1	0,612
C _T -Schwellenwert 238,25(AC/CRC)	1	-	-	0,103
C _T -Schwellenwert 825,75(SOL/SQCC)	-	0,387	1	-
▲▲C_T-Werte-Überleben				
C _T -Schwellenwert 300,14				
Log-Rank	0,017	0,708	0,579	0,025
C _T -Schwellenwert 238,25(AC/pCRC)				
Log-Rank	0,003	-	-	0,061
C _T -Schwellenwert 825,75(SOL/SQCC)				
Log-Rank	-	0,384	0,461	-

5. Diskussion

Vor der 2004 erschienen WHO-Klassifikation für maligne Erkrankungen der Lunge, gab es für die unterschiedlichen histologischen Subgruppen der Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome (NSCLC) keine verbindlichen therapeutischen Konsequenzen. Damals wurde lediglich zwischen Kleinzelligen und Nicht-kleinzelligen Karzinomen der Lunge unterschieden. Da keine therapeutischen Konsequenzen bestanden, wurden Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome in der Gruppe der NSCLC ohne weitere histologische Typisierung vorzunehmen, zusammengelegt. (Travis et al. 2015)

Das Vorhandensein von neuen Therapieoptionen mit unterschiedlichen Ansprechraten und damit einhergehender Toxizität für die verschiedenen histologischen Subgruppen, zeigt insbesondere bei den NSCLC die Wichtigkeit zur Bestimmung der Untergruppen. Die bisherigen Ergebnisse sind im Vergleich zum Fortschritt anderer onkologischer Erkrankungsentitäten bisweilen ernüchternd. Da die meisten fortgeschrittenen NSCLC inoperabel sind, muss die Diagnose anhand der Biopsie gestellt werden. Dies stellt insbesondere in der Praxis eine Herausforderung dar, da der Umfang des Gewebes und die Anzahl der Tumorzellen stark limitiert sein können. Zur benötigten präzisen histologischen Subtypisierung eines NSCLC und der bestmöglichen genetischen Analyse fehlt nicht selten ausreichendes Tumormaterial. Um dennoch zum Ziel zu kommen, wird eine standardisierte Handhabung des raren Gewebes angestrebt. Sollte im ersten Schritt die Subtypisierung mittels Lichtmikroskopie nicht erfolgreich sein, folgen gewöhnlich eine Muzin-Färbung und die Immunhistologie. Es werden verschiedene Antikörper genutzt, um zuverlässig zwischen Adenokarzinom und Plattenepithelkarzinom zu unterscheiden. Dabei muss darauf geachtet werden, die bestmöglichen Markerkombinationen auszuwählen, um möglichst wenig Tumorgewebe zu verbrauchen.

Primäre Karzinome von metastasierten Karzinomen unbekanntem Ursprungs, sowie von schlecht-differenzierten Karzinomen zu unterscheiden, stellt ein häufiges Problem in der klinischen und pathologischen Praxis dar. Aufgrund des kostbaren Gewebes besteht die Intention zur korrekten Diagnose inklusive Therapieempfehlung durch eine materialschonende Kombination aus Morphologie, Immunhistologie und molekularen Markern zu gelangen.

Trotz des häufig gering verfügbaren Gewebes muss die morphologische und prädiktive Klassifizierung der NSCLC mittels verbesserter Detektionsraten effektiver vorgenommen werden, um eine zuverlässige, Personen-spezifische Therapie zu gewährleisten und die Prognose des Patienten weiter zu verbessern. Dazu müssen die bisher verwendeten Methoden an Präzision und Geschwindigkeit gewinnen, aber vor allem technische Innovationen bzw.

alternative Techniken zur Lösung praktischer Probleme in der Routinediagnostik etabliert werden.

Die quantitative Detektion geeigneter Tumormarker stellt einen der möglichen Ansätze zur Lösung dieses Problems dar. Im Folgenden soll einer dieser vielversprechenden Marker, der thyroideale Transkriptionsfaktor 1 (TTF-1), der bereits heute einen hohen Stellenwert in der Routinediagnostik einnimmt, weiter untersucht werden. Das Konzept dahinter ist, dass Transkriptionsfaktoren, wie TTF-1, die durch Interaktion der gewebespezifischen Genexpression, mit einem weitreichenden Netzwerk an Wachstumsmodifikationen und Zelldifferenzierungen assoziiert sind und somit als geeignetes Werkzeug zur molekularbiologischen Analyse der Zelle und zur Diagnostik genutzt werden können.

Der Transkriptionsfaktor TTF-1 wird hauptsächlich in Schilddrüse, Lunge und dem zentralen Nervensystem immunhistologisch nachgewiesen und stellt einen der am meisten genutzten immunhistologischen Marker dar. Seine diagnostische Wichtigkeit liegt in der Tatsache begründet, dass er kaum außerhalb von Lunge und Schilddrüse anzufinden ist. Daher gilt TTF-1 in der Routinediagnostik als einer der zuverlässigsten Marker zur Diagnosefindung zwischen primären pulmonalen Adenokarzinomen und pulmonalen Metastasen oder zur Identifikation eines Schilddrüsenkarzinoms. (Ao et al. 2014)

Die immunhistologische Expression von TTF-1 ist in den verschiedenen histologischen Untergruppen der Lungenkarzinome unterschiedlich: in Adenokarzinomen und Kleinzelligen Lungenkarzinomen ist die Expression stark, dagegen ist sie in Großzelligen Lungenkarzinomen oder Plattenepithelkarzinomen entweder niedrig oder nicht vorhanden. Außerdem kann TTF-1 zur Unterscheidung zwischen malignen Pleuramesotheliomen und pulmonalen Adenokarzinomen genutzt werden. Trotz TTF-1 Positivität in einem Großteil der Kleinzelligen Lungenkarzinome, ist TTF-1 kein spezifischer Marker für Kleinzeller, da auch Kleinzellige Karzinome anderer Lokalisation häufig positiv auf TTF-1 reagieren. (Boggaram 2009; Yang et al. 2012)

TTF-1 kann auf Proteinebene durch immunhistologische Untersuchungen im Körper des Menschen in bisher unbekanntem Maße nachgewiesen werden und beschränkt sich nicht nur auf die Hauptwirkungsorte Lunge und Schilddrüse. In selteneren Fällen lässt sich TTF-1 auch in extrapulmonalen und -thyroidalen Lokalisation nachweisen: 1-4,8% der extrapulmonalen Adenokarzinome sind TTF-1 positiv. (Bejarano et al. 1996) Dabei stehen die gastroenterologischen und gynäkologischen Karzinome, als immunhistologische Nachweisorte von TTF-1, neben verschiedenen anderen Organsystemen im menschlichen Körper, besonders im Fokus.

Gynäkologische Neoplasien mit TTF-1 positiven immunhistologischen Resultaten lassen sich vor allem in Mammakarzinomen und Adenokarzinomen von Endometrium, Ovar und Cervix nachweisen. (Hecht et al. 2001; Niu et al. 2009) Es wird geschätzt, dass zwischen 2,4% und 2,8% der primären Mammakarzinome TTF-1 schwach oder fokal exprimieren. (Klingen et al. 2013; Robens et al. 2010) Bei den endometrioiden Adenokarzinomen erfolgt die TTF-1 Expression in allen histologischen Untergruppen mit einer Häufigkeit zwischen 2 und 11%. (Ervine et al. 2014; Lau et al. 2006)

In immunhistologischen Untersuchungen des Gastrointestinaltrakts lassen sich TTF-1 positive Adenokarzinome des Ösophagus, Magens, Colorektums und der Gallenblase/Gallengänge nachweisen. (Aulakh et al. 2013; Pegolo et al. 2014; Penman et al. 2006) In 10% der colorektalen Metastasen bzw. in 5% der primären Adenokarzinome wird ein fokal nuklärer Nachweis von TTF-1 erbracht. (Compérat et al. 2005; Mazziotta et al. 2005; Penman et al. 2006) Primäre Gallengangskarzinome, wie auch deren Metastasen, sind in der Lage in seltenen Fällen TTF-1 und Napsin A zu exprimieren. Adenokarzinome der extrahepatischen Gallengänge sind in bis zu 13,3% der Fälle TTF-1 und Napsin A positiv. (Lino-Silva et al. 2016)

Weitere Neoplasien, die in seltenen Fällen immunhistologisch TTF-1 positiv sein können, sind das Nephroblastom, Ependymom und muzinöse Adenokarzinom der Prostata mit einer Häufigkeit von 16,6%, 7,4% und 6,9%. (Bisceglia et al. 2009; Zamecnik et al. 2004; Leite et al. 2008) Dagegen stellt die TTF-1 Expression in extrapulmonalen Klein- und Großzelligen neuroendokrinen Karzinomen, wie z.B. in Prostata und Harnblase, eher keine Besonderheit dar. (Jones et al. 2005; Wang and Epstein 2008)

Der TTF-1 Antikörper färbt charakteristisch die Kerne von Tumorzellen aus Lunge und Schilddrüse. (Holzinger et al. 1996) Abhängig vom verwendeten Antikörper sind auch zytoplasmatische Anfärbungen von TTF-1 in den verschiedensten Neoplasien beobachtet worden. Neben Adenokarzinomen von Lunge, Brust und Pankreas, sind zytoplasmatische TTF-1 Nachweise in Meningeomen, onkozytischen Schilddrüsentumoren, muzinösen Karzinomen des Ovars und Plattenepithelkarzinomen von Lunge, Kopf-Hals und Cervix möglich. (Bejarano and Mousavi 2003; Wieczorek et al. 2002; Kaufmann and Dietel 2000a; Kaufmann and Dietel 2000b; Hecht et al. 2001) Die positive zytoplasmatische TTF-1 Anfärbbarkeit in Lebergewebe spricht zwar für ein primäres oder metastasiertes HCC, sollte aber nur im Kontext von histologischer Morphologie und immunhistologischen Resultaten interpretiert werden, da TTF-1 kein spezifischer Marker für ein HCC ist. (Lei et al. 2006)

Der immunhistologische Nachweis von TTF-1 gelingt in zahlreichen Organsystemen des menschlichen Körpers und ist nicht nur auf Tumore beschränkt die in Lunge oder Schilddrüse entstehen. In anderen Tumorlokalisationen wie dem weiblichen Genitaltrakt,

Gastrointestinaltrakt, ZNS und der Brust sind positive Resultate erwiesenermaßen möglich. Da verschiedene TTF-1 Klone mit unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität zur Verfügung stehen, müssen kleine Gewebebiopsien mit fokaler Anfärbbarkeit für TTF-1 mit Bedacht ausgewertet werden. Trotz seiner hohen Spezifität bei der Diagnosefindung zwischen primären pulmonalen Adenokarzinomen und extrathyroidalen Metastasen, sollten die oben genannten Neoplasien differentialdiagnostisch einbezogen werden und im Kontext der restlichen Tumormarker, der histologischen Morphologie und Krankengeschichte evaluiert werden.

Ungeachtet der vielen ungewöhnlichen Lokalisationen immunhistologisch nachweisbarer TTF-1 Epitope, gibt es nur wenige Studien die sich der Untersuchung von TTF-1 mRNA an extrapulmonalen Schauplätzen widmen. Die übrigen vorhandenen Studien untersuchen größtenteils pulmonale Neoplasien.

Die Fistelgänge von tracheoösophagealen Fisteln stellen vom Respirationstrakt abgeleitete Strukturen dar, die nachweislich TTF-1 mRNA exprimieren. (Crisera et al. 2000) Außerdem lässt sich mittels FISH-Untersuchung TTF-1 mRNA im Hyphsenvorderlappen nachweisen und ein Zusammenhang zu Growth Hormon und Prolactin herstellen. (Lee et al. 2007) In gutartigen Schilddrüsentumoren zeigen TTF-1 mRNA-Level im Vergleich zum gesunden Gewebe keine Veränderungen. Dagegen ist in differenzierten Schilddrüsenkarzinomen ein geringfügiger Abfall, in einer anderen Studie keine Veränderung der TTF-1 Expression zu beobachten. (Batista et al. 2016; Lacroix et al. 2006)

An NSCLC-Patientenproben durchgeführte Real-time RT-PCR Untersuchungen auf TTF-1 mRNA im peripheren Blut zur Detektion zirkulierender Tumorzellen zeigen eine Sensitivität von 35,3%. In einem Panel bestehend aus Survivin, hTERT, CK7 und TTF-1 wird eine Sensitivität von 82,4% erreicht. In Kombination mit den restlichen Markern stellt TTF-1 mRNA ein mögliches Hilfsmittel zum Nachweis weniger Tumorzellen dar. Außerdem werden hohe Expressionsraten der Marker mit Fernmetastasen und Krankheitsprogression assoziiert. (Yu 2013) In Serumproben von Patienten mit NSCLC ist die TTF-1 Expression, im Vergleich zum gesunden Blutserum, signifikant erhöht. Hohe TTF-1 mRNA Expressionsraten sind mit geringer Differenzierung, fortgeschrittenem TNM-Stadium, positiven Lymphknotenmetastasen und verkürztem Gesamtüberleben assoziiert. Man vermutet, dass TTF-1 mRNA-Level ein Indikator für Tumoraggressivität in NSCLC sind. (Liu et al. 2015)

Zur Diagnose von Lungenkrebs und um zwischen primären pulmonalen Adenokarzinomen und pulmonal metastasierten Adenokarzinomen zu unterscheiden, sind die Zellen aus Pleuraergüssen im RT-PCR Analyseverfahren auf TTF-1 mRNA untersucht worden. In Pleuraergüssen von Patienten mit Lungenkrebs zeigt sich eine signifikant höhere TTF-1 mRNA Expression als in gutartigen Lungenerkrankungen. In den Untergruppen ist die TTF-1 mRNA

Expression in primären pulmonalen Adenokarzinomen größer, als in primären Plattenepithelkarzinomen und pulmonal metastasierten Adenokarzinomen. Primäre pulmonale Adenokarzinome werden mit einer Sensitivität von 93% und einer Spezifität von 100% diagnostiziert. (Jiang et al. 2008)

Der Einsatz von TTF-1 mRNA als weiteres molekularpathologisches Instrument zur Diagnose und gegebenenfalls Therapieentscheidung kann in NSCLC sowie extrapulmonalen Lokalisationen scheinbar verlässliche Resultate erzielen. Trotz spektakulärer Erfolge im Bereich der Onkologie durch konsequente Erweiterung des Methodenspektrums, scheint die Kenntnis über Labor-individuelle Schwellenwerte ("cut-off-Werte") und ein erhöhter Kostenaufwand die flächendeckende Etablierung dieser Technik bisher zu behindern.

TTF-1 stellt einen sensitiven als auch hochspezifischen Marker zur Diagnose von pulmonalen Adenokarzinomen und Schilddrüsenkarzinomen dar. (Boggaram 2009) In pulmonalen Adenokarzinomen wird TTF-1 Protein in 62,5-90% der Fälle exprimiert. (Myong 2003; Moldvay et al. 2004) In der Routinediagnostik gibt es allerdings immer wieder Probleme bei der Differenzialdiagnose von TTF-1 negativen Fällen.

In dieser Studie wurde die relative Quantifizierung mittels qRT-PCR von TTF-1 mRNA in azinären und soliden pulmonalen Adenokarzinomen, pulmonalen Plattenepithelkarzinomen und pulmonalen Metastasen colorektaler Adenokarzinome an FFPE-Material von Lungenresektaten durchgeführt. Ziel ist es, festzustellen, ob sich die qRT-PCR in Abhängigkeit unterschiedlicher Schwellenwerte zur Differenzierung zwischen primären azinären und soliden pulmonalen Adenokarzinomen, sowie Nicht-Adenokarzinomen eignet und ob eine Steigerung der Sensitivität gegenüber der Immunhistologie erreicht werden kann. Um einen Vergleich zur Routinediagnostik üblichen Immunhistologie herstellen zu können, wurden sämtliche Gruppen zusätzlich immunhistologisch auf TTF-1 untersucht. Abhängig vom Differenzierungsgrad zeigen die unterschiedlichen Subgruppen der Adenokarzinome nicht nur stark unterschiedliche 5-Jahres-Überlebensraten, sondern auch unterschiedliche TTF-1 Proteinexpression. Um diesen Ergebnissen nachzugehen und zu untersuchen, ob sich Zusammenhänge auf mRNA-Ebene herstellen lassen, führten wir die folgende Studie durch. (Sterlacci et al. 2012; Warth et al. 2013)

5.1. Klinisch-pathologische Eigenschaften

5.1.1. Auswahl der Gewebeproben

Wir untersuchten 199 Gewebeproben aus Lungenresektaten von 191 Patienten. Dabei wurde zwischen 51 azinären pulmonalen Adenokarzinomen, 50 soliden pulmonalen Adenokarzinomen, 49 pulmonalen Plattenepithelkarzinomen und 49 pulmonalen Metastasen bei colorektalem Adenokarzinom unterschieden. Da es sich in dieser Studie ausschließlich um untersuchte Lungenresektate handelt, müssen die klinisch-pathologischen Eigenschaften in diesem Zusammenhang betrachtet werden.

5.1.2. Geschlechtsverteilung

Weltweit werden 85% der Lungenkarzinome bei Männern und 47% der Lungenkarzinome bei Frauen durch Tabakrauchen verursacht. (Parkin et al. 2005) Obwohl Rauchen prinzipiell mit allen Lungenkarzinomen assoziiert ist, werden insbesondere Kleinzellige Karzinome und Plattenepithelkarzinome der Lunge mit Rauchen in Verbindungen gebracht. (Travis et al. 2015)

Die Geschlechtsverteilung (82% männlich, 18% weiblich) der pulmonalen Plattenepithelkarzinome in dieser randomisierten Studie unterlegt eindrucksvoll, dass auch heute noch ein Großteil der Raucher männlich sind.

Dagegen besteht in Adenokarzinomen der Lunge eine ausgewogene Geschlechtsverteilung. (Brownson et al. 1992) In dieser Studie ist die Geschlechtsverteilung in den azinären (52,9% männlich, 47,1% weiblich) und soliden (58% männlich, 42% weiblich) pulmonalen Adenokarzinomen, sowie pulmonalen Metastasen colorektaler Adenokarzinome (46,9% männlich, 53,1% weiblich) nahezu ausgeglichen. Allerdings bleibt in colorektalen Karzinomen und dessen Metastasen die Geschlechtsverteilung und dessen Rolle in der Tumorgenese bisher unklar. (Amersi et al. 2005)

5.1.3. Erkrankungsalter

Laut Statistischem Bundesamt liegt das durchschnittliche Sterbealter bei Männern für Lungenkrebs bei 70,9 Jahren in Deutschland. (Statistisches Bundesamt 2013) Ein Großteil der malignen Erkrankungen der Lunge ereignen sich zwischen dem 65. und 79. Lebensjahr. (Brown et al. 1996; Smith and Glynn 2000) In Studien zur Untersuchung des Erkrankungsalters, die

ebenfalls Lungenresektate verwendeten, zeigte sich ein medianes Erkrankungsalter zwischen dem 60,5. und 67. Lebensalter. (Barletta et al. 2009; Sterlacci et al. 2012; Lee et al. 2013)

In der vorliegenden Studie liegt das mediane Lebensalter zum Zeitpunkt der histopathologischen Diagnose aller Patienten bei 63 Jahren. Es besteht kein signifikanter Unterschied des Alters zwischen Adenokarzinomen und Nicht-Adenokarzinomen in dieser Studie. Azinäre und solide pulmonale Adenokarzinome sind mit einem medianen Lebensalter von 62 Jahren bzw. 62,5 Jahren geringfügig jünger als die Gesamtkohorte. Pulmonale Metastasen weisen mit 59 Jahren medianen Lebensalter einen deutlichen Unterschied zur Gesamtkohorte auf. Ebenso die pulmonalen Plattenepithelkarzinome, die mit jeweils 67 Jahren ein stark erhöhtes medianes Lebensalter im Vergleich zur Gesamtkohorte haben. Die Altersdaten entsprechen weitestgehend der Studienlage. Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass chirurgische Lungenresektionen eines Bronchialkarzinoms größtenteils nur bis zum IASLC Stadium IIIa vorgenommen werden. Patienten in dieser Kohorte sind meist jünger und in einer besseren klinischen Verfassung.

5.1.4. Tumorstadium anhand der IASLC-Kriterien

Laut einer Studie des Cancer Research UK von 2003-2006 war die Verteilung der IASLC-Stadien von 4013 gestagten Patienten mit Bronchialkarzinom folgende: Stadium I, 14,5%; Stadium II, 7,3%; Stadium III, 31,8%; Stadium IV, 35,8%; nicht gestagt 10,6%. (The National Cancer Registration Service UK 2007) Die Verteilung macht deutlich, dass auch heute noch ein Großteil der Patienten zum Diagnosezeitpunkt ein weit fortgeschrittenes Tumorleiden aufweisen.

In unserer Studie erfolgt die Verteilung des pathologischen Tumorstadiums nach den aktuellen Richtlinien der IASLC-Klassifikation. Danach befinden sich in der Gesamtkohorte im Stadium IA 18,3%, Stadium IB 20,4%, Stadium IIA 14,1%, Stadium IIB 8,5%, Stadium IIIA, 26,8%, Stadium IIIB 4,2% und Stadium IV 7,7%. Die pulmonalen Metastasen bei colorektalem Adenokarzinome können nach den UICC-Kriterien der colorektalen Adenokarzinome gestagt werden und haben ausschließlich Stadium IV (100%).

Operative Lungenresektionen finden formal ausschließlich bis Stadium IIIa statt, daher befindet sich der Großteil der Patienten im Stadium I-IIIa (88,1%). Die restlichen Patienten konnten durch klinisch-radiologische Untersuchungen nicht eindeutig klassifiziert werden und wurden postoperativ einem höheren Stadium zugeordnet oder erhielten eine neoadjuvante Chemotherapie mit anschließender chirurgischer Intervention (11,9%). Azinäre pulmonale

Adenokarzinome und pulmonale Plattenepithelkarzinome unterscheiden sich statistisch signifikant bezüglich der Stadienverteilung ($p = 0,007$). Während pulmonale Adenokarzinome ein eher langsames Wachstum und Metastasierungsverhalten aufweisen, stellen sich pulmonale Plattenepithelkarzinome eher in fortgeschrittenen Stadien zum Diagnosezeitpunkt dar. Die Stadienverteilung der schlecht-differenzierten soliden Adenokarzinome befindet sich zwischen den genannten Gruppen.

Die Untersuchung von chirurgisch resezierten Gewebeproben lässt das falsche Bild entstehen, dass ein Großteil der Patienten in Anfangsstadien des Tumorleidens diagnostiziert werden. Noch immer sind zum Diagnosezeitpunkt die Mehrheit der Patienten bereits inoperabel.

5.1.5. Überleben

Das Subtypisieren in Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen hat prognostische Aussagekraft. Generell haben prädominante lepidisch pulmonale Adenokarzinome die beste Prognose, gefolgt von azinären, papillären, soliden und schließlich mikropapillär prädominanten Adenokarzinomen. (Warth et al. 2013) Die Ergebnisse aus 371 untersuchten Lungenresektaten aus Patienten mit NSCLC zeigen bezüglich des medianen Überlebens: lepidische AD (72,5 Monate), azinäre AD (71 Monate), Plattenepithelkarzinome (59,3 Monate), papilläre AD (42,2 Monate), mikropapilläre AD (41,6 Monate), solide AD (34,3 Monate), muzinöse AD (8,1 Monate). (Sterlacci et al. 2012) Ähnliche Unterschiede im medianen Überleben zwischen azinären und soliden pulmonalen Adenokarzinomen können in weiteren Studien bestätigt werden: azinär (65,5 Monate), mikropapillär (27 Monate), solid (23,9 Monate), papillär (14 Monate). (Russell et al. 2013) In einer anderen Studie präsentieren sich die 5-Jahres-Überlebensraten von papillären Adenokarzinomen mit 71%, gefolgt von azinären Adenokarzinomen mit 68%, soliden Adenokarzinomen mit Muzinproduktion mit 39% und mikropapillären Adenokarzinomen mit 38%. (Russell et al. 2011)

In der vorliegenden Studie stellt sich das mediane Überleben aller histologischen Gruppen mit 52 Monaten dar. Die colorektalen Adenokarzinome haben zum Diagnosezeitpunkt der pulmonalen Metastasen noch ein medianes Überleben von 61 Monaten, eine 5-Jahres-Überlebensrate von 53,1% und zeigen damit das längste Überleben. Die azinären pulmonalen Adenokarzinome haben die zweitbeste Prognose mit einem medianen Überleben von 55 Monaten und einer 5-Jahres-Überlebensrate von 47,1%, gefolgt von den soliden pulmonalen Adenokarzinomen mit 54,5 Monaten und 46% und letztens den pulmonalen Plattenepithelkarzinomen mit 38 Monaten und 22,4%. Plattenepithelkarzinome und pulmonale Metastasen unterscheiden sich statistisch signifikant bezüglich der Überlebenszeit ($p = 0,002$).

Die Ergebnisse unserer Studie sind nur bedingt mit der derzeitigen Studienlage vereinbar. Adzinäre Adenokarzinome zeigen in unserer Studie innerhalb der NSCLC die beste Prognose, bleiben allerdings vom medianen Überleben vergleichbarer Studien weit entfernt. Im Vergleich zur Studienlage präsentieren sich die soliden Adenokarzinome mit einem deutlich besseren medianen Überleben. Der entscheidendste Faktor für die Patientenprognose stellt das Tumorstadium dar. (Warth et al. 2013) Bei den azinären Adenokarzinomen befinden sich 19,6% der Patienten, bei den soliden Adenokarzinomen 8% im IASLC Stadium IIIb und IV. Aufgrund des fortgeschrittenen Tumorleidens fast jedes 5. Patienten in der Gruppe der azinären Adenokarzinome, ist das mediane Überleben reduziert. Die soliden Adenokarzinome präsentieren sich größtenteils in den Anfangsstadien und zeigen daher ein besseres medianes Überleben. In der Gruppe der pulmonalen Plattenepithelkarzinome sind zwar nur 8,1% der Patienten in den IASLC-Stadien IIIb und IV, allerdings 40,8% im Stadium IIIa. Im IASLC-Stadium IIIa ist auf Grund der fortgeschrittenen Tumorausdehnung eine deutlich erweiterte Behandlungsplanung nötig, die sich auch in einem verringerten medianen Überleben widerspiegelt.

5.2. Immunhistologie

Im Rahmen der Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen Überleben, Differenzierungsgrad und TTF-1 Proteinexpression in pulmonalen Adenokarzinomen zeigt sich, dass die Abnahme des Differenzierungsgrades mit dem TTF-1 Expressionsverlust korreliert. (Sterlacci et al. 2012) Die immunhistologische TTF-1 Anfärbarkeit ist statistisch signifikant höher in moderat-differenzierten azinären Adenokarzinomen, als im gesunden Gewebe. Demgegenüber unterscheidet sich die TTF-1 Expression in gering-differenzierten soliden Adenokarzinomen nicht zum gesunden Gewebe. Die niedrigere TTF-1 Expression korreliert mit dem niedrigen Differenzierungsgrad und geht mit einem aggressiveren Tumorverhalten einher. (Sousa et al. 2015)

Azinäre und solide pulmonale Adenokarzinome stellen nicht nur repräsentativ unterschiedliche Differenzierungsgrade, sondern auch die häufigsten Histoarchitekturen in Lungenadenokarzinomen dar. (Warth et al. 2012)

Die immunhistologische Auswertung von TTF-1 in dieser Studie zeigt unter azinären Adenokarzinomen 35,3% negativ, 37,3% schwach und 27,4% stark positiv, während bei den soliden Adenokarzinomen 40% negativ, 48% schwach und 12% stark positiv sind. Plattenepithelkarzinome und pulmonale Metastasen reagieren ausschließlich TTF-1 negativ, ein Indiz für die hohe Spezifität des gewählten TTF-1 Klons. Eine statistisch signifikante Unterscheidung zwischen Adenokarzinomen und Nicht-Adenokarzinomen der Lunge kann bezüglich der immunhistologischen Resultate bewiesen werden ($p=0,000$). Obwohl die moderat-differenzierten azinären Adenokarzinome im Vergleich zu den schlechter differenzierten soliden Adenokarzinomen quantitativ als auch qualitativ stärker TTF-1 reagieren, kann keine statistische Signifikanz zwischen beiden nachgewiesen werden ($p=0,684$). Diese Ergebnisse stehen im Konflikt der kürzlich veröffentlichten Literatur. (Sterlacci et al. 2012; Warth et al. 2013) Unsere Ergebnisse spiegeln Yatabe's Vermutungen zur TTF-1 Expression wider, wonach sich die TTF-1 Expression in pulmonalen Adenokarzinomen unterschiedlicher Differenzierungsgrade nicht unterscheidet. (Yatabe et al. 2002) Der semi-quantitative immunhistologische Vergleich der TTF-1 Expression in moderat-differenzierten azinären pulmonalen Adenokarzinomen und schlecht-differenzierten soliden pulmonalen Adenokarzinomen ist in diesem Umfange unseres Wissens so noch nicht erfolgt.

Die Anwendung verschiedener Antikörper kann zu unterschiedlichen Resultaten führen. Zur immunhistologischen Untersuchung von TTF-1 sind derzeit zwei zuverlässige kommerziell erwerbbar Klone von monoklonalen Antikörpern, 8G7G1/1 und SPT24, im Handel. SPT24 hat eine hohe Sensitivität, während 8G7G1/1 eine bessere Spezifität aufweist. Die Abhängigkeit der

Resultate vom verwendeten TTF-1 Klon macht eine Interpretation von Resultaten mit unterschiedlichen Klonen zwischen verschiedenen Laboren schwierig. Wir nutzten zum Nachweis von TTF-1 den 8G7G1/1 Klon. Der Klon entsteht durch den Gebrauch von rekombinanter Ratten-TTF-1 als Immunogen, da sich TTF-1 zwischen Mensch und Ratte in 98% Homologie übereinstimmen. Dieser Umstand kann allerdings zu Cross-Reaktionen mit mitochondrialen Proteinen, wie in Hepatozyten nachweisbar, führen und muss bei der gewissenhaften Beurteilung der Resultate stets beachtet werden. (Ni et al. 2014; Surrey et al. 2014; Kligen et al. 2013; Compérat et al. 2005; Bisceglia et al. 2009)

5.3. qRT-PCR

Die Untersuchung der TTF-1 mRNA durch qRT-PCR zeigt folgende $\Delta\Delta C_T$ -Ergebnisse: die azinären pulmonalen Adenokarzinome zeigen die höchste Expression auf mRNA Ebene mit einem Median von 1339,06, gefolgt von den soliden pulmonalen Adenokarzinomen mit 1083,38. Deutlich niedrigere $\Delta\Delta C_T$ -Werte haben die pulmonalen Metastasen colorektaler Adenokarzinome mit 78,25 und die pulmonalen Plattenepithelkarzinome mit 73,21. Damit gelingt der Nachweis von TTF-1 mRNA in pulmonalen Metastasen sowie pulmonalen Plattenepithelkarzinomen. Die $\Delta\Delta C_T$ -Werte lassen sich zwischen pulmonalen Adenokarzinomen und Nicht-Adenokarzinomen statistisch signifikant ($p = 0,000$) und zwischen azinären und soliden Adenokarzinomen nicht statistisch signifikant ($p = 0,123$) unterscheiden. TTF-1 mRNA wird nicht nur bei der Umwandlung in Tumorzellen primärer NSCLC und deren Metastasierung in Lymphknoten durchgehend exprimiert, sondern auch die Metastasierung extrapulmonaler Karzinome in die Lunge lässt einen dauerhaften TTF-1 mRNA Nachweis zu. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Immunhistologie wird klar, dass die Menge an TTF-1 mRNA in Plattenepithelkarzinomen und pulmonalen Metastasen colorektaler Adenokarzinome nicht ausreicht, um Proteine zum immunhistologischen Nachweis von TTF-1 zu bilden. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen lässt sich in den azinären und soliden Adenokarzinomen mittels qRT-PCR eine erhöhte Transkriptionsarbeit durch erhöhte mRNA-Expressionen nachweisen, die in einer immunhistologischen Anfärbbarkeit resultiert.

In dieser Studie kann auf mRNA-Ebene kein Zusammenhang zwischen der Abnahme des Differenzierungsgrad und dem Abfall der TTF-1 Expression pulmonaler Adenokarzinome gezeigt werden ($p_{\text{mRNA}}=0,123$). Die nahezu übereinstimmende Expression von TTF-1 mRNA in pulmonalen Adenokarzinomen unterschiedlicher Differenzierung indiziert, dass die Expression nicht abhängig vom Differenzierungsgrad ist.

5.4. Diagnostische Gegenüberstellung von Adenokarzinomen und Nicht-Adenokarzinomen in der Lunge

Die Verfügbarkeit gezielter Krebstherapien (engl. targeted therapies) führt zu einem größeren Verlangen der behandelnden klinischen Ärzte eine genaue Subtypisierung der Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome vorzunehmen. Dabei spielt vor allem die Unterscheidung in Adenokarzinom oder Plattenepithelkarzinom der Lunge eine Therapie-entscheidende Rolle, da neue Behandlungen unterschiedliche oder sogar nachteilige Effekte abhängig vom histologischen Typ haben. Zum Beispiel der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-Hemmer, Gefitinib oder Erlotinib, zeigt deutlich bessere Erfolge in pulmonalen Adenokarzinomen, als in pulmonalen Plattenepithelkarzinomen. Obwohl der Großteil der NSCLC mittels H.E.-Schnitt allein subtypisiert werden kann, ist der Umgang mit schlecht-differenzierten Bronchialkarzinomen und pulmonalen Metastasen ein häufiges Problem. Daher kommt der Differenzierung von pulmonalen Adenokarzinomen in der pathologischen Routine der Lungenkarzinome eine besondere Rolle zu. (Mukhopadhyay and Katzenstein 2011; Hirsch et al. 2008)

Diese Studie präsentiert für die Unterscheidung zwischen pulmonalen Adenokarzinomen und Nicht-Adenokarzinomen mittels Immunhistologie eine Sensitivität von 62,4% und eine Spezifität von 100%. 37,6% der Fälle sind TTF-1 negative pulmonale Adenokarzinome. Positiver bzw. negativer prädiktiver Wert beträgt 100% bzw. 72,1%. Im Vergleich, die qRT-PCR hat bei Anwendung des Schwellenwertes der pulmonalen Adenokarzinome (300,14) eine Sensitivität von 82,2% und eine Spezifität von 92,9%. Positiver bzw. negativer prädiktiver Wert beträgt 92,2% bzw. 83,5%. Die qRT-PCR ist die deutlich sensitivere diagnostische Methode. Außerdem stellt sich die qRT-PCR in unserer Studie als hochspezifische Technik heraus, die allerdings der Immunhistologie mit einer Spezifität von 100% unterliegt.

In der Literatur wird TTF-1 als sensitiver Marker beschrieben, der in 62,5-90% der invasiven primären pulmonalen Adenokarzinome positiv ist. Unter den Subtypen sind vor allem lepidisch, papilläre und azinäre pulmonale Adenokarzinome TTF-1 positiv, wohingegen solide, muzinöse und mikropapilläre Wachstumsmuster prozentual weniger häufig positiv sind. Moderat differenzierte pulmonale Tumore sind häufiger TTF-1 positiv, als weniger differenzierte Adenokarzinome. (Rekhtman et al. 2011; Stenhouse et al. 2004; Myong 2003; Moldvay et al. 2004)

Gegenüber der überwiegenden Literatur erscheint die Sensitivität der immunhistologischen Resultate azinärer und solider pulmonaler Adenokarzinome in unserer Studie relativ niedrig. Jedoch sind Umfang und Anteil der schlecht-differenzierten soliden Adenokarzinome in

unserer Studie erheblich größer. Damit erklärt sich Reduktion der Sensitivität gegenüber vergleichbaren Studien.

Die Quantifizierung von TTF-1 mRNA mittels qRT-PCR (Schwellenwert 300,14) kann im Vergleich zur Immunhistologie in 21,8% der pulmonalen Adenokarzinome zusätzlich tumorspezifische Informationen und damit einen diagnostischen Nutzen liefern. Durch gemeinsamen Gebrauch von qRT-PCR oder Immunhistologie lassen sich 84,2% der pulmonalen Adenokarzinome als TTF-1 positiv erkennen. Wir erreichen eine drastische Reduktion von 37,6% der TTF-1 negativen Adenokarzinome bei alleinigem Gebrauch der Immunhistologie auf 15,8% bei Einsatz von qRT-PCR und Immunhistologie. Trotzdem bleibt ein nicht unerheblicher Anteil pulmonaler Adenokarzinome weiterhin TTF-1 negativ.

Der ermittelte $\Delta\Delta C_T$ -Schwellenwert von 300,14 ermöglicht eine ausgezeichnete Balance zwischen Sensitivität und Spezifität und ist zum diagnostischen Einsatz bei Verdacht auf ein Adenokarzinom gegenüber der Immunhistologie die deutlich sensitivere Technik.

5.5. Diagnostische Gegenüberstellung azinärer pulmonaler Adenokarzinome und pulmonaler Metastasen

Prädominant azinäre pulmonale Adenokarzinome zeigen ein moderat-differenziertes Wachstumsmuster und bestehen größtenteils aus Drüsen, die oval bis rund geformt sind und ein zentrales Lumen haben, das von Tumorzellen umgeben ist. (Travis et al. 2015) Die Lunge gilt generell als einer der häufigsten Metastasierungsorte, neben Lymphknoten und der Leber. Dabei sind vor allem Karzinome des gastrointestinal- und gynäkologischen Trakts, der Mamma, des Urothels, Kopf-Hals und Prostata der Ursprungsort der Metastasierung, gefolgt von Sarkomen, Melanomen und Keimzelltumoren. Am häufigsten metastasieren colorektale Adenokarzinome in die Lunge. (Casiraghi et al. 2011; Mitry et al. 2010)

Pulmonal metastasierte colorektale Adenokarzinome weisen für gewöhnlich ein Kranz-artiges Wachstumsmuster mit hochprismatischen Zellen und langgezogenen Zellkernen auf. (Travis et al. 2015) Diese Morphologie ähnelt sehr der Architektur des primären azinären Adenokarzinom der Lunge. Bei Nachweis glandulärer Strukturen in der H.E.-Färbung, stellt das pulmonal metastasierte colorektale Adenokarzinom eines der wichtigsten Differenzialdiagnosen des pulmonalen azinären Adenokarzinoms dar.

Die Gegenüberstellung azinärer pulmonaler Adenokarzinome und pulmonaler Metastasen eines colorektalen Adenokarzinoms erfolgt auf Grund histomorphologischer Gemeinsamkeiten und dem häufigen Vorliegen von pulmonalen Metastasen eines colorektalen Adenokarzinom in der Routine. Eine alleinige histomorphologische Analyse zwischen den beiden Tumorentitäten ist für gewöhnlich nicht ausreichend und erfordert eine weitere immunhistologische Abklärung.

In dieser Studie erreicht die immunhistologische Untersuchung in der Gruppe aus azinären Adenokarzinomen und pulmonalen Metastasen eine Sensitivität von 64,7% und eine Spezifität von 100%. 35,3% der azinären Adenokarzinome sind TTF-1 negativ. Positiver bzw. negativer prädiktiver Wert beträgt 100% bzw. 73,1%. Mittels qRT-PCR wird eine Sensitivität von 90% und eine Spezifität von 85,7% ermittelt. Positiver bzw. negativer prädiktiver Wert beträgt 86,8% bzw. 89,4%. Die Quantifizierung von TTF-1 mRNA mittels qRT-PCR (Schwellenwert 238,25) kann im Vergleich zur Immunhistologie in 25,5% der pulmonalen Adenokarzinome zusätzlich tumorspezifische Informationen liefern. Durch gemeinsamen Gebrauch von qRT-PCR oder Immunhistologie lassen sich 90,2% der pulmonalen Adenokarzinome als TTF-1 positiv erkennen. Es wird eine Reduktion von 35,3% der TTF-1 negativen Adenokarzinome bei alleinigem Gebrauch der Immunhistologie, auf 9,8% bei Anwendung von qRT-PCR und Immunhistologie erreicht.

Im Vergleich zum Schwellenwert von 300,14 führt der niedrigere Schwellenwert über den Anstieg der Sensitivität zu einem größeren zusätzlichen Informationsgewinn, aber auch zu einem Anstieg der Falsch-positiv-Rate. Eine Reduktion des positiv prädiktiven Wertes durch den $\Delta\Delta C_T$ -Schwellenwert der azinären Adenokarzinome zeigt, dass ein Gewinn von Sensitivität zu Lasten einer verringerten Spezifität geht.

Gründe für den hohen Anteil TTF-1 negativer immunhistologischer Resultate in der Gruppe der azinären Adenokarzinome lassen sich lediglich auf allgemeingültige Erklärungen widersprüchlicher immunhistologischer Resultate zurückführen. Dazu zählen: Fehler bei der Auswahl des geeigneten Tumorgewebes, geringe Menge an Tumormaterial bzw. zu große Anteile von Nekrose oder Fibrose, technische Probleme indem keine interne Kontrolle verfügbar ist bzw. keine Aussage über die angemessene Anwendung des Antikörpers getroffen werden kann und Schwierigkeiten bei der Fixierung des Gewebes.

5.6. Diagnostische Gegenüberstellung solider pulmonaler Adenokarzinome und pulmonaler Plattenepithelkarzinome

Schlecht-differenzierte solide Adenokarzinome bestehen meist aus vieleckigen Tumorzellen, die große Platten oder Nester bilden ohne typisches Wachstumsmuster eines Adenokarzinoms. Sie können zum Teil dichtes eosinophiles Zytoplasma aufweisen, das auch so in pulmonalen Plattenepithelkarzinomen vorkommen kann und auf diese Weise bereits bestehende morphologische Ähnlichkeiten zur Differenzierung weiter erschwert. (Travis et al. 2015) Daher gehören pulmonale Plattenepithelkarzinome unterschiedlicher Lokalisation zu den wichtigsten Differentialdiagnosen. Zur korrekten Diagnosefindung werden schlecht differenzierte Tumorsektate, bei denen trotz fehlender Verhornung und Interzellularbrücken ein Plattenepithelkarzinom vermutet wird, regulär immunhistologisch u.a. mit TTF-1 und p40/p63 untersucht. Bei TTF-1 Negativität und Detektion plattenepithelialer Marker in der Immunhistologie stellen die wahrscheinlichsten Differentialdiagnosen ein primäres pulmonales Plattenepithelkarzinom, oder eine pulmonale Metastase eines metastasierten Plattenepithelkarzinom aus Kopf-Hals, Ösophagus und Zervix dar. Aus histopathologischer Sicht bereitet eine Unterscheidung in der Praxis deutliche Schwierigkeiten. Bei entsprechender Vorgeschichte eines bekannten Plattenepithelkarzinom sind zur Unterscheidung p53,p16-Immunhistologie und HPV-Diagnostik richtungsweisend. Plattenepithelkarzinome aus dem Kopf-Hals-Bereich metastasieren mit 80% am häufigsten in die Lunge. Insbesondere die Hypopharynxkarzinome haben den größten Anteil. (Kotwall et al. 1987; Finley III et al. 1992) Bei unbekannter Vorgeschichte und unauffällig klinisch-radiologischer Untersuchung stellt das primäre pulmonale Plattenepithelkarzinom die wahrscheinlichste Diagnose dar.

In der vorliegenden Studie erreicht die immunhistologische Detektion in der Gruppe der soliden pulmonalen Adenokarzinome und pulmonalen Plattenepithelkarzinome eine Sensitivität von 60% und eine Spezifität von 100%. 40% der soliden pulmonalen Adenokarzinome sind TTF-1 negativ. Positiver bzw. negativer prädiktiver Wert beträgt 100% bzw. 71,4%. Sensitivität und Spezifität für die qRT-PCR liegen bei 58% bzw. 98%. Positiver bzw. negativer prädiktiver Wert beträgt 96,7% bzw. 69,7%. Die Quantifizierung von TTF-1 mRNA mittels qRT-PCR (Schwellenwert 825,75) kann im Vergleich zur Immunhistologie in 10% der pulmonalen Adenokarzinome zusätzlich tumorspezifische Informationen liefern. Durch gemeinsamen Gebrauch von qRT-PCR oder Immunhistologie lassen sich 70% der pulmonalen Adenokarzinome als TTF-1 positiv erkennen. Es wird eine Reduktion von 40% der TTF-1 negativen Adenokarzinome bei alleinigem Gebrauch der Immunhistologie auf 30% bei Anwendung von qRT-PCR und Immunhistologie erreicht.

In vorangegangenen Studien erreichen immunhistologische Subtypisierungen schlecht-differenzierter NSCLC an Biopsien und korrespondierenden Resektaten eine Sensitivität zwischen 54-80% (n=20; 11). (Mukhopadhyay and Katzenstein 2011; Loo et al. 2010)

In dieser Studie ist der Anteil von TTF-1 positiven, schlecht-differenzierten Adenokarzinomen gegenüber den TTF-1 positiven, moderat-differenzierten Adenokarzinomen niedriger und entspricht daher der gängigen Studienlage. Der prozentuale Anteil TTF-1 positiver Fälle liegt in beiden Gruppen im Vergleich zu anderen Studien zwar bei weniger als zwei Drittel positiver Fälle, aber die Anzahl der untersuchten Proben in den unterschiedlichen histomorphologischen Subgruppen ist in der vorliegenden Studie deutlich umfangreicher.

Der für die soliden pulmonalen Adenokarzinome errechnete Schwellenwert von 825,75 ist um ein Vielfaches größer und stellt den spezifischsten Schwellenwert dieser Studie dar. Da die statistischen Ergebnisse der Immunhistologie gegenüber der qRT-PCR nahezu identisch sind, scheint bei Anwendung des Schwellenwertes von 825,75 die Immunhistologie der qRT-PCR als diagnostische Methode gleichwertig. Der hochspezifische $\Delta\Delta C_T$ -Schwellenwert der soliden Adenokarzinome reduziert die Falsch-Positiv-Rate auf die Niedrigste der Studie und ermöglicht dabei einen ansehnlichen positiven prädiktiven Wert, damit eine hohe diagnostische Aussagekraft bei TTF-1 Positivität und somit eine zuverlässige, hochspezifische Alternative. Mittels dieses Schwellenwertes ist die qRT-PCR in der Lage die statistischen Resultate der Immunhistologie zu imitieren.

5.7. Prognostische Rolle von TTF-1

Seitdem TTF-1 im Fokus der Forschung ist, setzten sich verschiedene Studien zum Ziel die prognostische Rolle von TTF-1 in Lungenkrebspatienten zu untersuchen. Dabei variieren die Resultate. Während 7 Studien über eine positive Korrelation zwischen TTF-1 Proteinüberexpression und Überleben berichten, finden 2 eine negative Korrelation und 4 keine statistische Signifikanz. (Yoon et al. 2011; Martins et al. 2009; Barletta et al. 2009; Berghmans et al. 2006; Barlési et al. 2005; Stenhouse et al. 2004; Au et al. 2004; Shah et al. 2004; Saad et al. 2004; Myong 2003; Tan et al. 2003; Pelosi et al. 2001; Puglisi et al. 1999) Eine der Studien beschäftigt sich mit den Tumorstadien I-IIIa und weist Langzeitüberwachung auf. Sie zeigt, dass Patienten in inoperablen Tumorstadien bei TTF-1 Überexpression ein signifikantes besseres Überleben haben. (Tan et al. 2003) Eine Metaanalyse bestehend aus 10 Studien zu Lungenkarzinomen zeigt, dass TTF-1 Positivität in NSCLC-Patienten mit einem längeren Überleben korreliert. Vor allem aber haben lokal begrenzte und früh erkannte Tumore in geringeren Stadien und pulmonale Adenokarzinome einen Überlebensvorteil. (Berghmans et al. 2006) Die Untersuchung der TTF-1 mRNA Level im peripheren Blut von 79 NSCLC-Patienten vor und nach Operation legt dar, dass Patienten mit Nachweis von TTF-1 mRNA im Blut nach der OP ein kürzeres progressionsfreies Überleben haben. (Yoon et al. 2011) Trotz der Hypothese, dass TTF-1 Proteinexpression mit einem längeren Überleben verbunden wird, steht ein einheitlicher Konsens bisher aus.

In dieser Studie finden wir keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen immunhistologischen TTF-1 Status und Überleben ($p_{AC}=0,524$; $p_{SOL}=0,453$).

Auf mRNA-Ebene lässt sich für die pulmonalen azinären Adenokarzinome bei Anwendung des $\blacktriangle\blacktriangle C_T$ -Schwellenwert der Adenokarzinome (300,15) und der azinären pulmonalen Adenokarzinome (238,25) ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen $\blacktriangle\blacktriangle C_T$ -Werten und Überleben nachweisen ($p_{AC(300,14)}=0,017$; $p_{AC(238,25)}=0,003$). Damit stellt der Nachweis von TTF-1 mRNA-Level oberhalb des $\blacktriangle\blacktriangle C_T$ -Schwellenwert einen unabhängigen Prognosefaktor in azinären pulmonalen Adenokarzinomen dar.

Eine allumfassende Aussage zum Nutzen von TTF-1 als prognostischen Marker in pulmonalen Adenokarzinomen kann, unter Berücksichtigung des geringen Umfangs der Kohorte in dieser Studie, nicht getroffen werden. Dafür sind die Gründe für die enge Beziehung zwischen TTF-1 Expression und Überleben auch nicht vollends verstanden. In azinären pulmonalen Adenokarzinomen gelingt der Nachweis von TTF-1 mRNA oberhalb des Schwellenwertes als Prognosefaktor.

5.8. TTF-1 als Stadien-abhängiger Marker

In der Literatur wird TTF-1 auf Proteinebene mittels Immunhistologie als Stadien-abhängiger Marker identifiziert. Dabei zeigen sich in fortgeschrittenen Stadien, niedrigere TTF-1 Expressionslevel. (Sousa et al. 2015; Perner et al. 2009) In dieser Studie wird auf Proteinebene keine statistische Signifikanz nachgewiesen. Auf Proteinebene stellt TTF-1 einen Stadien-unabhängigen Marker dar ($p_{AC}=0,137$; $p_{SOL}=0,099$).

Auf mRNA-Ebene kann für die azinären pulmonalen Adenokarzinome und pulmonalen Plattenepithelkarzinome nach Anwendung des $\blacktriangle\blacktriangle C_T$ -Schwellenwertes der Adenokarzinome (300,14) ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Tumorstadium und TTF-1 Expression nachgewiesen werden ($p_{AC(300,14)}=0,03$; $p_{SQCC(300,14)}=0,02$). Auch die Anwendung des Schwellenwertes von 238,25 für die azinären pulmonalen Adenokarzinome weist eine statistische Signifikanz auf ($p_{AC(238,25)}=0,005$). Der Nachweis von TTF-1 mRNA als Stadien-abhängiger Marker in Abhängigkeit vom gewählten $\blacktriangle\blacktriangle C_T$ -Schwellenwert in azinären pulmonalen Adenokarzinomen und pulmonalen Plattenepithelkarzinomen wird so erstmals beschrieben.

5.9. Zusammenhang zwischen TTF-1 mRNA und TTF-1 Protein

Ein zentraler Baustein der Molekularbiologie ist die Informationsweiterleitung von DNA via mRNA zum Protein. Trotz unseres Verständnisses zur Transkription und Translation, kann ein Zusammenhang zwischen mRNA- und Proteinproduktion nur vereinzelt belegt werden.

In der vorliegenden Studie kann ein Zusammenhang zwischen TTF-1 mRNA und Protein anhand TTF-1 positiver bzw. negativer Resultate aus qRT-PCR und Immunhistologie dargestellt werden. Anhand der spezifischen Schwellenwerte der Gesamtkohorte (Schwellenwert 300,14), der azinären pulmonalen Adenokarzinome (Schwellenwert 238,25) und der soliden pulmonalen Adenokarzinome (825,75) wird ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen TTF-1 mRNA und Protein nachgewiesen ($p_{AC/SOL(300,14)}=0,000$; $p_{AC(238,25)}=0,001$; $p_{SOL(825,75)}=0,000$), sowie mittels Spearman-Korrelationskoeffizient ein starker bzw. mittlerer positiver Effekt errechnet ($r_{S; Adenokarzinome\ gesamt}=0,49$; $r_{S; azinäre\ Adenokarzinome}=0,45$; $r_{S; solide\ Adenokarzinome}=0,55$). Eine Zunahme der TTF-1 mRNA geht mit einer gesteigerten TTF-1 Proteinproduktion einher und umgekehrt.

Im Zusammenhang zwischen TTF-1 mRNA und Protein sind in dieser Studie 3 Besonderheiten aufgetreten. Erstens, sowohl in pulmonalen Adenokarzinomen als auch pulmonalen Plattenepithelkarzinomen und pulmonalen Metastasen gelingt der Nachweis von TTF-1 mRNA.

Zweitens, auf Grund eines reduzierten Anteils TTF-1 positiver, moderat- und schlecht-differenzierter pulmonaler Adenokarzinome, können wir anhand der spezifischen Schwellenwerte jeweils 21,8% der pulmonalen Adenokarzinome (300,14), 25,5% der azinären pulmonalen Adenokarzinome (238,25) und 10% der soliden pulmonalen Adenokarzinome (825,75) nachweisen, die in der qRT-PCR positiv aber immunhistologisch negativ sind. In diesen Fällen wird die TTF-1 mRNA nicht in das Protein translatiert.

Transkription und Translation besitzen keine lineare Beziehung. Verschiedenste Mechanismen bewirken durch eine Verzahnung des molekularbiologischen Systems eine Verstärkung oder Repression der Proteinsynthese durch verschiedenste Ausgangsmengen von mRNA-Molekülen. Mi-RNA's, siRNA's, spezifische Enhancer- oder Repressor-Proteine, unterschiedliche Translationseffizienzen verschiedener Moleküle die zur Bildung des Proteins benötigt werden, sekundäre RNA-Strukturen und Codon-Bias stellen nur einige der biologischen Faktoren dar, die eine Korrelation zwischen mRNA und Protein beeinflussen. So führte die Entdeckung des ersten miRNA-Regulators, miR-365, der TTF-1 unterdrückt, zu einer anhaltenden Neuorientierung, um das Zusammenspiel von Transkription und Translation durch verschiedenste interagierende Moleküle, u.a. miRNA, bei Lungenkrebs zu verstehen. (Qi et al. 2012) Wir wissen schon heute, dass einige dieser Faktoren enormen Einfluss auf die biologische

Synthese von TTF-1 haben, ein Großteil der Interaktion in diesem onkogenen Netzwerk bleiben uns allerdings weiterhin verborgen und erfordern zukünftiges wissenschaftliches Engagement.

Drittens, trotz der Anwendung von qRT-PCR oder Immunhistologie bleibt ein erheblicher Anteil der pulmonalen Adenokarzinome TTF-1 negativ. Eine mögliche Erklärung bietet Yatabe's These, dass sich die molekulare Pathogenese TTF-1 positiver pulmonaler Adenokarzinome von TTF-1 negativen Adenokarzinomen unterscheidet. Auf Grund vielfältiger zellulärer und anatomischer Eigenschaften unterscheiden sich die Empfindlichkeiten der Zelltypen auf bestimmte Karzinogene. Daraus ergeben sich unterschiedliche zugrundeliegende Mechanismen der Karzinogenese oder eine veränderte Signaltransduktion der ursprünglichen Zellen, die ein individuelles Expressionsprofil der Karzinome zur Folge hat. Unterstützt wird die Annahme durch einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Prävalenz in Frauen, Nichtraucher, negativer immunhistologischer Nachweis für p53, weniger häufiger RB Verlust und eine erhaltene Expression von p27 in TTF-1 positiven Adenokarzinomen. (Yatabe et al. 2002) Eine Bestätigung der Hypothese an der in dieser Studie verwendeten Kohorte, erfordert weitere Untersuchungen.

5.10. Schlussfolgerungen

Bronchialkarzinome zeigen die Komplexität von onkogenen Prozessen, die durch das Zusammenspiel verschiedenster Biomarker, somatischer Mutationen und der genetischen Anlage des Patienten, eine Neoplasie von enormen Umfang und Variabilität entwickelt. In der Routinediagnostik gibt es immer wieder Probleme bei der Diagnosefindung zwischen schlecht-differenzierten Bronchialkarzinomen oder pulmonalen Metastasen extrapulmonaler Karzinome.

1. Wir können einen Zusammenhang zwischen TTF-1 mRNA und Protein anhand der Ergebnisse aus qRT-PCR und Immunhistologie für azinäre und solide pulmonale Adenokarzinome nachweisen ($p_{AC/SOL(300,14)}=0,000$; $p_{AC(238,25)}=0,001$; $p_{SOL(825,75)}=0,000$), sowie mittels Spearman-Korrelationskoeffizient einen starken bzw. mittleren positiven Effekt errechnen ($r_{S; \text{Gesamtkohorte}}=0,49$; $r_{S; \text{azinäre Adenokarzinome}}=0,45$; $r_{S; \text{solide Adenokarzinoma}}=0,55$). Eine Zunahme der TTF-1 mRNA geht in pulmonalen Adenokarzinomen mit einer gesteigerten TTF-1 Proteinproduktion einher und umgekehrt. Eine Einschätzung durch welchen biologischen Faktor bzw. Translationseffizienz die Korrelation zwischen mRNA und Protein beeinflusst wird, bleibt aber offen.
2. TTF-1 mRNA stellt in azinären pulmonalen Adenokarzinomen und in pulmonalen Plattenepithelkarzinomen unter Berücksichtigung des $\blacktriangle\blacktriangle C_T$ -Schwellenwertes einen stadienabhängigen Marker dar.
Die zum Teil zwiespältigen Ergebnisse der Vergangenheit bezüglich des Zusammenhangs zwischen TTF-1 Proteinexpression und Überleben finden wohl auch nach dieser Studie kein befriedigendes Ergebnis: für die verwendeten pulmonalen Adenokarzinome in dieser Studie besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen TTF-1 Proteinexpression und Überleben. Auf mRNA-Ebene kann in azinären pulmonalen Adenokarzinomen ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen TTF-1 Status und Überleben nachgewiesen werden. In dieser Studie ist TTF-1 mRNA ein Prognosefaktor in azinären pulmonalen Adenokarzinomen.
3. In dieser Studie sind in Adenokarzinomen und Nicht-Adenokarzinomen der Lunge TTF-1 mRNA Expressionslevel nachweisbar. Dabei unterscheiden sich die $\blacktriangle\blacktriangle C_T$ -Werte auf mRNA-Ebene und die immunhistologischen Resultate der pulmonalen Adenokarzinome als signifikant größer gegenüber den der Nicht-Adenokarzinome. Azinäre und solide pulmonale Adenokarzinome unterscheiden sich nicht signifikant auf Protein- und mRNA-Ebene. Ein Zusammenhang zwischen der Abnahme des Differenzierungsgrad und dem Abfall der TTF-1 Expression, wie von Sterlacci propagiert, ist nicht nachweisbar.
4. Sowohl Immunhistologie als auch qRT-PCR zeigen hinsichtlich Sensitivität, Spezifität und positiv prädiktiven Wert gute Ergebnisse in dieser Studie. Mittels qRT-PCR

werden beim Schwellenwert von 300,14 pulmonale Adenokarzinome mit einer Sensitivität von 82,2%, einer Spezifität von 92,9% und einem PPV von 92,2% bestimmt. Beim sensitiven Schwellenwert von 238,25 lassen sich azinäre pulmonale Adenokarzinome mit einer Sensitivität von 90%, einer Spezifität von 85,71% und einem PPV von 86,8% ermitteln. Der spezifische Schwellenwert von 825,75 ermöglicht eine Detektion der soliden pulmonalen Adenokarzinome mit einer Sensitivität von 58%, einer Spezifität 97,95% und einem PPV von 96,7%. Die Quantifizierung von TTF-1 mRNA mittels qRT-PCR konnte im Vergleich zur Immunhistologie in 21,8% (Schwellenwert 300,14) , 25,5% (Schwellenwert 238,25) und 10% (Schwellenwert 825,75) der pulmonalen Adenokarzinome zusätzlich tumorspezifische Informationen liefern. Durch gemeinsamen Gebrauch von qRT-PCR oder Immunhistologie lassen sich 84,2% (Schwellenwert 300,14), 90,2% (Schwellenwert 238,25) und 70% (Schwellenwert 825,75) der pulmonalen Adenokarzinome als TTF-1 positiv erkennen. Die Anzahl TTF-1 negativer Adenokarzinome wird dadurch drastisch gesenkt.

In dieser Studie wird dargelegt, dass durch Auswahl eines geeigneten Schwellenwertes die Differenzierung zwischen pulmonalen Adenokarzinom und Nicht-Adenokarzinomen mittels qRT-PCR eine zuverlässige Alternative zur Immunhistologie darstellt. Dabei kommt der richtigen Wahl des Schwellenwert eine große Bedeutung zu. Der ▲▲ C_T -Schwellenwert von 300,14 hat in unserer Studie die größte Sensitivität-Spezifität-Balance und ermöglicht den größten zuverlässigen Informationsgewinn. Während der Schwellenwert von 825,75 eine hochspezifische Alternative zur Immunhistologie darstellt, ermöglicht der Schwellenwert von 238,25 die sensitivste Tumordiagnostik der Studie. Die Verwendung lediglich einer Methodik limitiert die Reliabilität. Die Anwendung beider Techniken führt zu einem Anstieg der Sensitivität von TTF-1 abhängig vom verwendeten Schwellenwert. Diese Studie soll zeigen, dass Morphologie, Immunhistochemie und Molekularpathologie bei der Erkennung und Klassifikation der Subtypen von NSCLC komplementär und nicht alternativ eingesetzt werden sollen. Erst die Kombination der Methoden ergibt in vielen Fällen den richtigen Subtyp und minimiert TTF-1 negative Fälle. Die Ausgangsmorphologie steuert dabei, welche immunhistochemischen und molekularpathologischen Verfahren in einem spezifischen Fall zweckmäßig sind. Die in dieser Studie entstandenen Ergebnisse unter Einsatz der qRT-PCR in pulmonalen Adenokarzinomen müssen an Biopsiematerial überprüft und gegebenenfalls reevaluiert werden, um Patienten mit fortgeschrittenem Bronchialkarzinom adäquat subtypisieren zu können.

5.11. Ausblick in die Zukunft

Die Mehrheit der NSCLC kann durch den routinemäßigen Einsatz von H.E.-Schnitten allein zuverlässig subtypisiert werden. Allerdings stellen schlecht-differenzierte Bronchialkarzinome oder pulmonale Metastasen extrapulmonaler Karzinome Pathologen nicht selten vor Schwierigkeiten. In dieser Studie führt die Anwendung von qRT-PCR oder Immunhistologie gegenüber dem alleinigen Gebrauch der Immunhistologie zu einem ansehnlichen Anstieg der Sensitivität und damit zu einer Reduktion der TTF-1 negativen pulmonalen Adenokarzinome. Zur Beurteilung verlässlicher Resultate wurden Resektate zur Diagnose als Goldstandard genutzt. Da immer noch ein Großteil der Lungenkarzinome bei Diagnose unresektabel sind und daher meist Biopsiematerial das einzige vorhandene Gewebe zur Diagnose darstellt, müssen die in dieser Studie entstandenen Ergebnisse unter Einsatz der qRT-PCR in pulmonalen Adenokarzinomen an Biopsiematerial überprüft und gegebenenfalls reevaluiert werden. Bei Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC, stellt die zuverlässige histologische Subtypisierung an minimalem Gewebematerial eine Notwendigkeit dar. In diesen Fällen sind der Einsatz der qRT-PCR zur Reduktion TTF-1 negativer Adenokarzinome und eine damit verbundene adäquate Therapieeinleitung anzustreben.

Die Immunhistologie gehört zu den wichtigsten Hilfsmitteln in der Routinediagnostik, ist aber limitiert, wenn zu wenig neoplastische Zellen auf Grund mangelnden Gewebes vorhanden sind oder durch Entzündungen verschleiert werden. Die qRT-PCR ist eine in-vitro Methode zur enzymatischen Amplifikation von definierten RNA-Zielsequenzen und erlaubt die Analyse von verschiedenen Proben und den Nachweis von lediglich einer Zelle im selben Experiment. Sie stellt die sensitivste und flexibelste Quantifizierungsmethode dar und kann benutzt werden, um verschiedene mRNA-Level in unterschiedlichen Proben zu vergleichen und so mRNA-Expressionsmuster zu charakterisieren. (Bustin 2000) Diese Studie zeigt den rasant steigenden Stellenwert der Molekularpathologie für die Subtypisierung des Bronchialkarzinoms. Auch wenn diese noch nicht Routine ist, zeigt die Subtypisierung mittels qRT-PCR an Mikrometastasen oder Laser-mikrodissezierten Gewebe eine möglichen Weg in eine hochtechnisierte, innovative und zukünftige Medizin in den Pathologischen Instituten auf. Ob es sich dabei um einen Blick in die Glaskugel handelt, bleibt abzuwarten. Unser Eindruck ist, dass die qRT-PCR die Morphologie, Immunhistochemie und bisherige Routine-Molekularpathologie ergänzen kann, aber nicht ersetzt. Die qRT-PCR Ergebnisse sollen daher nicht für sich betrachtet, sondern im Kontext von Morphologie, Immunhistochemie und Routine-Molekularpathologie in die erfolgreiche Subtypisierung einbezogen werden.

Fakt ist, dass das zunehmende Verständnis molekularer Grundlagen der Tumorbiologie gepaart mit technischen Fortschritten in der molekularbiologischen Diagnostik seit einigen Jahren zu

einem verstärkten Verständnis und Anwendung von molekularen Techniken führt, die es uns erlauben direkt an Gewebepreparaten tumorassoziierte Veränderungen auf molekularer Ebene zu diagnostizieren. Die Arbeit des Pathologen konzentriert sich dabei neben dem Nutzen von bewährten Methoden und Techniken, immer mehr auf die kritische Auswertung von histologischen und molekularen Resultaten. Seit dem anhaltenden Einzug von molekularen Methoden in die Routinediagnostik, entwickeln sich neue Möglichkeiten zur praktischen Anwendung. In der Zukunft werden sich durch die vermehrte Integration der Molekularbiologie in die Prozesse der Diagnosefindung Algorithmen der allgemeinen Diagnostik ändern, um spezifischere Diagnosen zu erhalten und eine optimal-personalisierte Behandlung des Patienten zu garantieren. Dafür ist detailliertes Wissen um veränderte Genmutationen, Proteinexpressionen und neuen molekularen Zielstrukturen unablässig.

Der zunehmende Einzug molekularbiologischer Methoden in die Pathologie-Institute verändert deren Gesicht nach und nach zu einer vollautomatisierten Zukunft. Die immer günstiger werdenden Techniken erlauben eine präzisere und materialsparende Diagnostik, um eine personalisierte Medizin zum Wohle des Patienten zu gewährleisten.

Trotz der Vorteile bei Anwendung zusätzlicher Techniken für den Patienten, bleibt eine ökonomische Mehrbelastung für die Krankenkassen bestehen.

Aus der Präsenz von diagnostischen Markern zwingend auf das entsprechende Krankheitsbild schließen zu müssen, stellt ein zukünftiges Problem bei zunehmender Sensitivität der Techniken dar. Gerade bei Markern, die beim Menschen lebenslang zu finden und an der Entwicklung beteiligt sind, ist der Nachweis an gewisse Schwellenwerte gebunden, die im Zusammenhang mit morphologisch- immunhistologischer Untersuchung sorgfältig betrachtet werden müssen.

5.12. Limitationen der Arbeit

Die Immunhistochemie wird schon seit langem nicht mehr nur für Forschungszwecke, sondern auch in der Routinediagnostik und zur Beurteilung von Biomarkern benutzt. Dabei erfolgt die Interpretation der Färbungen meist manuell, auf visuell-basierenden Informationen, in Form einer Schätzung der Intensität und Anzahl der positiven Zellen und ist abhängig von der Erfahrung und Aufmerksamkeit des Untersuchers. Automatisierte Bildanalysen sind seit den 1980er verfügbar und unterliegen nicht den Konsequenzen von Müdigkeit und Subjektivität und sind daher in Bezug auf Präzision und Reproduktion der Ergebnisse dem menschlichen Untersucher überlegen. Einfache und reproduzierbare Protokolle, wie die Überprüfung der Resultate durch einen 2. Facharzt, führen bereits zu einer größeren Standardisierung und Vergleichbarkeit zwischen Laboren. (Taylor and Levenson 2006; Walker 2006) Weitere Faktoren die sowohl in der Immunhistologie als auch in der qRT-PCR zur objektiven Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt werden sollten, sind Unterschiede in der Fixierung und Lagerung des Gewebes, Dauer und Art der Antikörperbehandlung, unterschiedliche Antikörperspezifitäten, die jeweilige Verdünnung des Antikörpers und ob die manuellen Tätigkeiten von erfahrenen Fachkräften oder sogar automatisiert durchgeführt werden. (Walker 2006)

Die Konservierung des Gewebes mittels Formalin stellt die gängige Praxis in der Pathologie dar. Formalin führt nicht nur zum Crosslinking von Proteinen und Aminosäuren, sondern es verändert durch Einfügen einer Monomethylolgruppe die RNA und blockiert damit die Reverse Transkription. Die Gewinnung amplifizierbarer RNA und DNA ist invers proportional zur Fixierungszeit und zeigt dass standardisierte Fixation eine Grundlage für zuverlässige Resultate bildet. (Bonin et al. 2010) Die verwendeten FFPE-Proben wurden nach standardisierten Protokollen fixiert und geeignete Kits zum Lösen des Formalin-induzierten Crosslinking verwendet. Doch diese Anwendungen ermöglichen trotzdem keine absolute Herstellung des Gewebes, wie vor der Fixierung.

Um eine möglich exakte Subtypisierung zu erreichen, sollen die Bronchialkarzinome nach ihrem prädominant befallenen Tumormuster klassifiziert werden, wobei vor allem Übergangsformen manchmal Schwierigkeiten bereiten können. Die Subtypisierung gelingt dann nicht, wenn entnahmebedingt oder limitiert durch die technischen Möglichkeiten die für die Diagnose wichtigen Veränderungen aufgrund von Sampling-Fehlern oder unerreichbaren Lokalisationen mikroskopisch nicht abgebildet werden.

Eine weitere wesentliche Limitation dieser Arbeit ist die kleine Anzahl der in die Studie eingeschlossenen Patienten bzw. Gewebeproben. Insbesondere stadienabhängige bzw. prognostische Aussagen sollten an deutlich größeren Kohorten überprüft werden.

Um die $\Delta\Delta C_T$ -Werte nutzbar zu machen, ist die Suche nach einem geeigneten Schwellenwert von zentraler Bedeutung. Im Unterschied zu früheren Studien, die in ihren mRNA-Analysen den höchsten $\Delta\Delta C_T$ -Wert im gesunden Gewebe als Cut-off-Wert auswählten, wählten wir den Weg der ROC-Analyse mittels des vorhandenen Tumorgewebes. (Tjensvoll et al. 2010; Yoon et al. 2011; Yu et al. 2013) Zur Schwellenwert-Bestimmung mittels ROC-Kurve ist ein vernünftiger Grad zwischen Sensitivität und Spezifität notwendig, um ein aussagekräftiges Ergebnis bezüglich der Prädiktion zu erzielen. Dabei muss immer das Risiko, Falsch-positive bzw. gesunde Patienten die fälschlicherweise als TTF-1 positiv detektiert werden, gegenüber dem Risiko, Falsch-negative bzw. TTF-1 positive Patienten, die der Test nicht detektiert, behutsam abgewogen werden.

Zur Berechnung eines Schwellenwertes mittels ROC-Kurve muss die AUC berücksichtigt werden. Die AUC fasst die Position der ROC-Kurve in seiner Gesamtheit zusammen und reproduziert nicht nur Koordinaten-spezifische Informationen. Damit stellt die AUC einen geeigneten Stellvertreter für Sensitivität und Spezifität zur Beschreibung der Validität eines diagnostischen Tests dar. Bei einer AUC von 1 gelingt dem Test eine perfekte Differenzierung zwischen Erkrankten und Nicht-Erkrankten. Bei einer AUC von 0,5 liegt die ROC-Kurve auf der diagonalen Linie und eine Diskrimination zwischen Erkrankten und Nicht-Erkrankten entspricht einem Münzwurf. (Hajian-Tilaki 2013)

ROC-Kurve und korrespondierender AUC-Wert sind für die pulmonalen Adenokarzinome und für dessen spezifische histologische Untergruppen separat berechnet worden. Bei Betrachtung der azinären und soliden Adenokarzinomen liegt der AUC-Wert bei 0,678, ein Hinweis für einen befriedigenden Test mit ordentlicher Genauigkeit und angemessener Diskrimination zur Bestimmung von TTF-1 positiven bzw. negativen Ergebnissen. Die errechnete AUC von 0,552 in der Gruppe der azinären Adenokarzinome erlaubt eine schlechte Diskrimination zur Bestimmung von TTF-1 positiven bzw. negativen Ergebnissen, während bei den soliden Adenokarzinomen die AUC mit 0,793 einen guten Test widerspiegelt. Trotz mangelhafter AUC-Werte einiger ROC-Kurven und der damit einhergehenden kombinierten Abnahme von Sensitivität und Spezifität, wurden TTF-1 Schwellenwerte bestimmt und dessen diagnostische Aussagekraft überprüft. Zur Verifizierung eines verlässlichen Schwellenwertes von TTF-1 mRNA zur Vorhersage TTF-1 Status sollten unsere gemessenen Daten an größeren Patientenkohorten verglichen werden.

6. Literaturverzeichnis

- Agilent Technologies, (2015) Stratagene QPCR Human Reference Total RNA: Instruction Manual. , 1–14.
- Amersi, F., Agustin, M. & Ko, C.Y., (2005) Colorectal cancer: epidemiology, risk factors, and health services. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, 18(3), 133–140.
- Ao, M.-H., Zhang, H., Sakowski, L., Sharma, R., Illei, P., Gabrielson, E., Askin, F. & Li, Q.K., (2014) The utility of a novel triple marker (combination of TTF1, napsin A, and p40) in the subclassification of non–small cell lung cancer. *Human Pathology*, 45(5), 926–934.
- Applied Biosystems, (2010) Absolute Quantitation Using Standard Curve Getting Started Guide. , 1–90.
- Applied Biosystems, (2008) Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR. , 1–60.
- Applied Biosystems, (2007) High Capacity RNA-to-cDNA. , 1–18.
- Au, N.H.C., Cheang, M., Huntsman, D.G., Yorida, E., Coldman, A., Elliott, W.M., Bebb, G., Flint, J., English, J., Gilks, C.B. & Grimes, H.L., (2004) Evaluation of immunohistochemical markers in non-small cell lung cancer by unsupervised hierarchical clustering analysis: A tissue microarray study of 284 cases and 18 markers. *Journal of Pathology*, 204, 101–109.
- Aulakh, K.S., Chisholm, C.D., Smith, D.A. & Speights, V.O., (2013) TTF-1 and napsin a do not differentiate metastatic lung adenocarcinomas from primary esophageal adenocarcinomas: Proposal of a novel staining panel. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 137(8), 1094–1098.
- Barlési, F., Pinot, D., LeGoffic, A., Doddoli, C., Chetaille, B., Torre, J.-P. & Astoul, P., (2005) Positive thyroid transcription factor 1 staining strongly correlates with survival of patients with adenocarcinoma of the lung. *British Journal of Cancer*, 93(4), 450–452.
- Barletta, J.A., Perner, S., Iafrate, A.J., Yeap, B.Y., Weir, B.A., Johnson, L.A., Johnson, B.E., Meyerson, M., Rubin, M.A., Travis, W.D., Loda, M. & Chirieac, L.R., (2009) Clinical significance of TTF-1 protein expression and TTF-1 gene amplification in lung adenocarcinoma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(8B), 1977–1986.
- Baselga, J., Perez, E.A., Pienkowski, T. & Bell, R., (2006) Adjuvant Trastuzumab: A Milestone in the Treatment of HER-2-Positive Early Breast Cancer. *The Oncologist*, 11(Supplement 1), 4–12.

- Batista, F. a, Ward, L.S., Marcello, M. a, Martins, M.B., Peres, K.C., Torricelli, C., Bufalo, N.E., Soares, F. a, da Silva, M.J. & Assumpcao, L. V, (2016) Gene expression of thyroid-specific transcription factors may help diagnose thyroid lesions but are not determinants of tumor progression. *Journal of Endocrinological Investigation*, 39, 423–429.
- Becker, R.L., (1993) Standardization and quality control of quantitative microscopy in pathology. *Journal of Cellular Biochemistry*, 17G, 199–204.
- Bejarano, P.A., Baughman, R.P., Biddinger, P.W., Miller, M.A., Fenoglio-Preiser, C., Al-Kafaji, B., Di Lauro, R. & Whitsett, J.A., (1996) Surfactant proteins and thyroid transcription factor-1 in pulmonary and breast carcinomas. *Modern Pathology*, 9(4), 445–452.
- Bejarano, P.A. & Mousavi, F., (2003) Incidence and Significance of Cytoplasmic Thyroid Transcription Factor-1 Immunoreactivity. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 127(2), 193–195.
- Berghmans, T., Paesmans, M., Mascaux, C., Martin, B., Meert, A.-P., Haller, A., Lafitte, J.-J. & Sculier, J.-P., (2006) Thyroid transcription factor 1-a new prognostic factor in lung cancer: a meta-analysis. *Annals of Oncology*, 17(11), 1673–1676.
- Besnard, V., Xu, Y. & Whitsett, J.A., (2007) Sterol response element binding protein and thyroid transcription factor-1 (Nkx2.1) regulate Abca3 gene expression. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 293(6), 1395–1405.
- Bingle, C.D., (1997) Thyroid transcription factor-1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29(12), 1471–1473.
- Bisceglia, M., Ragazzi, M., Galliani, C.A., Lastilla, G. & Rosai, J., (2009) TTF-1 expression in nephroblastoma. *American Journal of Surgical Pathology*, 33(3), 454–461.
- Bodey, B., (2002) The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2(4), 371–393.
- Boggaram, V., (2009) Thyroid transcription factor-1 (TTF-1/Nkx2.1/TTF1) gene regulation in the lung. *Clinical Science*, 116, 27–35.
- Bohinski, R.J., Di Lauro, R. & Whitsett, J. a, (1994) The Lung-Specific Surfactant Protein B Gene Promoter Is a Target for Thyroid Transcription Factor 1 and Hepatocyte Nuclear Factor 3, Indicating Common Factors for Organ-Specific Gene Expression along the Foregut Axis. *Molecular and Cellular Biology*, 14(9), 5671–5681.
- Bonin, S., Hlubek, F., Benhattar, J., Denkert, C., Dietel, M., Fernandez, P.L., Höfler, G.,

- Kothmaier, H., Kruslin, B., Mazzanti, C.M., Perren, A., Popper, H., Scarpa, A., Soares, P., Stanta, G. & Groenen, P.J.T.A., (2010) Multicentre validation study of nucleic acids extraction from FFPE tissues. *Virchows Archiv*, 457(3), 309–317.
- Brandtzaeg, P., (1998) The increasing power of immunohistochemistry and immunocytochemistry. *Journal of Immunological Methods*, 216, 49–67.
- Breedveld, G.J., van Dongen, J.W.F., Danesino, C., Guala, A., Percy, A.K., Dure, L.S., Harper, P., Lazarou, L.P., van der Linde, H., Joosse, M., Grütters, A., MacDonald, M.E., de Vries, B.B.A., Arts, W.F.M., Oostra, B.A., Krude, H. & Heutink, P., (2002) Mutations in TITF-1 are associated with benign hereditary chorea. *Human Molecular Genetics*, 11(8), 971–979.
- Brey, E.M., Lalani, Z., Johnston, C., Wong, M., McIntire, L. V, Duke, P.J. & Patrick, C.W., (2003) Automated Selection of DAB-labeled Tissue for Immunohistochemical Quantification. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 51(5), 575–584.
- Brown, J., Eraut, D., Trask, C. & Davison, A.G., (1996) Age and the treatment of lung cancer. *Thorax*, 51, 564–568.
- Brownson, R.C., Chang, J.C. & Davis, J.R., (1992) Gender and Histologic Type Variations in Smokin- Related Risk of Lung Cancer. *Epidemiology*, 3(1), 61–64.
- Bruno, M.D., Bohinski, R.J., Huelsman, K.M., Whitsett, J.A. & Korfhagen, T.R., (1995) Lung Cell- specific Expression of the Murine Surfactant Protein A (SP-A) Gene Is Mediated by Interactions between the SP-A Promoter and Thyroid Transcription Factor-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(12), 6531–6536.
- Bustin, S.A., (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25, 169–193.
- Casiraghi, M., Pas, T. De, Brambilla, D., Ciprandi, B., Galetta, D., Borri, A., Gasparri, R., Petrella, F., Tessitore, A., Guarize, J., Donghi, S.M., Veronesi, G., Solli, P. & Spaggiari, L., (2011) A 10-Year Single-Center Experience on 708 Lung Metastasectomies: The Evidence of the “International Registry of Lung Metastases.” *Journal of Thoracic Oncology*, 6(8), 1373–1378.
- Civitareale, D., Castelli, M.P., Falasca, P. & Saiardi, A., (1993) Thyroid transcription factor 1 activates the promoter of the thyrotropin receptor gene. *Molecular Endocrinology*, 7(12), 1589–1595.
- Civitareale, D., Lonigro, R., Sinclair, A.J. & Di Lauro, R., (1989) A thyroid-specific nuclear protein essential for tissue-specific expression of the thyroglobulin promoter. *The EMBO Journal*, 8(9), 2537–2542.

- Cohen, J., (1992) A Power Primer. *Psychological Bulletin*, 112(1), 155–159.
- Comp erat, E., Zhang, F., Perrotin, C., Molina, T., Magdeleinat, P., Marmey, B., R egnard, J.-F.F., Audouin, J. & Camilleri-Bro et, S., (2005) Variable sensitivity and specificity of TTF-1 antibodies in lung metastatic adenocarcinoma of colorectal origin. *Modern Pathology*, 18, 1371–1376.
- Crisera, C.A., Maldonado, T.S., Kadison, A.S., Li, M., Longaker, M.T. & Gittes, G.K., (2000) Patterning of the “Distal Esophagus” in Esophageal Atresia with Tracheo-esophageal Fistula: Is Thyroid Transcription Factor 1 a Player? *Journal of Surgical Research*, 92, 245–249.
- Elias, J.M. (ed), (1990) *Immunohistopathology- A practical Approach to Diagnosis.*, Chicago, USA: The American Society of Clinical Pathologists.
- Endo, T., Kaneshige, M., Nakazato, M., Ohmori, M., Harii, N. & Onaya, T., (1997) Thyroid Transcription Factor-1 Activates the Promoter Activity of Rat Thyroid Na⁺/I⁻ Symporter Gene. *Molecular Endocrinology*, 11(11), 1747–1755.
- Ervine, A., Leung, S., Gilks, C.B. & McCluggage, W.G., (2014) Thyroid transcription factor-1 (TTF-1) immunoreactivity is an adverse prognostic factor in endometrioid adenocarcinoma of the uterine corpus. *Histopathology*, 64, 840–846.
- Finley III, R.K., Verazin, G.T., Driscoll, D.L., Blumenson, L.E., Takita, H., Bakamjian, V., Sako, K., Hicks Jr., W., Petrelli, N.J. & Shedd, D.P., (1992) Results of Surgical Resection of Pulmonary Metastases of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *The American Journal of Surgery*, 164(December), 594–598.
- Gehring, W.J., (1987) Homeo Boxes in the Study of Development. *Science*, 236, 1245–1252.
- Green, M.R. & Sambrook, J. (eds), (2012) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Guazzi, S., Price, M., De Felice, M., Damante, G., Mattei, M.G. & Di Lauro, R., (1990) Thyroid nuclear factor 1 (TTF-1) contains a homeodomain and displays a novel DNA binding specificity. *The EMBO Journal*, 9(11), 3631–3639.
- Haines, D.M. & West, K.H., (2005) Immunohistochemistry: Forging the links between immunology and pathology. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108, 151–156.
- Hajian-Tilaki, K., (2013) Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian Journal of Internal Medicine*, 4(2), 627–635.
- Hamdan, H., Liu, H., Li, C., Jones, C., Lee, M., DeLemos, R. & Minoo, P., (1998) Structure of the human Nkx2.1 gene. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1396, 336–

348.

- Hecht, J.L., Pinkus, J.L., Weinstein, L.J. & Pinkus, G.S., (2001) The Value of Thyroid Transcription Factor-1 in Cytologic Preparations as a Marker for Metastatic Adenocarcinoma of Lung Origin. *American Journal of Clinical Pathology*, 116, 483–488.
- Heyderman, E., Warren, P.J. & Haines, A.M.R., (1989) Immunocytochemistry today-problems and practice. *Histopathology*, 15, 653–658.
- Hirsch, F.R., Spreafico, A., Novello, S., Wood, M.D., Simms, L. & Papotti, M., (2008) The Prognostic and Predictive Role of Histology in Advanced Non-small Cell Lung Cancer: A Literature Review. *Journal of Thoracic Oncology*, 3(12), 1468–1481.
- Holzinger, A., Dingle, S., Bejarano, P. a, Miller, M., Weaver, T.E., Dilauro, R. & Whitsett, J.A., (1996) Monoclonal Antibody to Thyroid Transcription Factor-1: Production, Characterization, and Usefulness in Tumor Tumor Diagnosis. *Hybridoma*, 15(1), 49–53.
- Homminga, I., Pieters, R., Langerak, A.W., de Rooi, J.J., Stubbs, A., Verstegen, M., Vuerhard, M., Buijs-Gladdines, J., Kooi, C., Klous, P., van Vlierberghe, P., Ferrando, A. a., Cayuela, J.M., Verhaaf, B., Beverloo, H.B., Horstmann, M., de Haas, V., Wiekmeijer, A.S., Pike-Overzet, K., Staal, F.J.T., de Laat, W., Soulier, J., Sigaux, F. & Meijerink, J.P.P., (2011) Integrated Transcript and Genome Analyses Reveal NKX2-1 and MEF2C as Potential Oncogenes in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*, 19, 484–497.
- Hosono, Y., Yamaguchi, T., Mizutani, E., Yanagisawa, K., Arima, C., Tomida, S., Shimada, Y., Hiraoka, M., Kato, S., Yokoi, K., Suzuki, M. & Takahashi, T., (2012) MYBPH, a transcriptional target of TTF-1, inhibits ROCK1, and reduces cell motility and metastasis. *The EMBO Journal*, 31(2), 481–493.
- Ikeda, K., Clark, J.C., Shaw-White, J.R., Stahlman, M.T., Boutell, C.J. & Whitsett, J.A., (1995) Gene Structure and Expression of Human Thyroid Transcription Factor-1 in Respiratory Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 270(14), 8108–8114.
- Jiang, B., Wu, G.P., Zhao, Y.J. & Wang, S.C., (2008) Transcription Expression and Clinical Significance of TTF-1 mRNA in Pleural Effusion of Patients With Lung Cancer. *Diagnostic Cytopathology*, 36(12), 849–854.
- Jones, T.D., Kernek, K.M., Yang, X.J., Lopez-Beltran, A., MacLennan, G.T., Eble, J.N., Lin, H., Pan, C.X., Tretiakova, M., Baldrige, L.A. & Cheng, L., (2005) Thyroid transcription factor 1 expression in small cell carcinoma of the urinary bladder: an immunohistochemical profile of 44 cases. *Human Pathology*, 36, 718–723.
- Kaufmann, O. & Dietel, M., (2000a) Expression of thyroid transcription factor-1 in

- pulmonary and extrapulmonary small cell carcinomas and other neuroendocrine carcinomas of various primary sites. *Histopathology*, 36, 415–420.
- Kaufmann, O. & Dietel, M., (2000b) Thyroid transcription factor-1 is the superior immunohistochemical marker for pulmonary adenocarcinomas and large cell carcinomas compared to surfactant proteins A and B. *Histopathology*, 36, 8–16.
- Kimura, S., Hara, Y., Pineau, T., Fernandez-Salguero, P., Fox, C.H., Ward, J.M. & Gonzalez, F.J., (1996) The T/ebp null mouse: Thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes and Development*, 10(1), 60–69.
- Klein, D., (2002) Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8(6), 257–260.
- Klingen, T.A., Chen, Y., Suhrke, P., Stefansson, I.M., Gundersen, M.D. & Akslen, L.A., (2013) Expression of thyroid transcription factor-1 is associated with a basal-like phenotype in breast carcinomas. *Diagnostic Pathology*, 8(80), 1–6.
- Kolla, V., Gonzales, L.W., Gonzales, J., Wang, P., Angampalli, S., Feinstein, S.I. & Ballard, P.L., (2007) Thyroid Transcription Factor in Differentiating Type II Cells: Regulation, Isoforms, and Target Genes. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 36, 213–225.
- Kotwall, C., Sako, K., Razack, M.S., Rao, U., Bakamjian, V. & Shedd, D.P., (1987) Metastatic Patterns in Squamous Cell Cancer of the Head and Neck. *American Journal of Surgery*, 154, 439–442.
- Krude, H., Schütz, B., Biebermann, H., Von Moers, A., Schnabel, D., Neitzel, H., Tönnies, H., Weise, D., Lafferty, A., Schwarz, S., Defelice, M., Von Deimling, A., Van Landeghem, F., Dilauro, R. & Grüters, A., (2002) Choreoathetosis, hypothyroidism, and pulmonary alterations due to human NKX2-1 haploinsufficiency. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(4), 475–480.
- Kwei, K.A., Kim, Y.H., Girard, L., Kao, J., Pacyna-Gengelbach, M., Salari, K., Lee, J., Choi, Y.-L., Sato, M., Wang, P., Hernandez-Boussard, T., Gazdar, A.F., Petersen, I., Minna, J.D. & Pollack, J.R., (2008) Genomic profiling identifies TTF1 as a lineage-specific oncogene amplified in lung cancer. *Oncogene*, 27(25), 3635–3640.
- Lacroix, L., Michiels, S., Mian, C., Arturi, F., Caillou, B., Filetti, S., Schlumberger, M. & Bidart, J.M., (2006) HEX, PAX-8 and TTF-1 gene expression in human thyroid tissues: A comparative analysis with other genes involved in iodide metabolism. *Clinical Endocrinology*, 64, 398–404.
- Lau, S.K., Chu, P.G. & Weiss, L.M., (2006) Immunohistochemical Expression of

- Estrogen Receptor in Pulmonary Adenocarcinoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 14(1), 83–87.
- Lazzaro, D., Price, M., De Felice, M. & Di Lauro, R., (1991) The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development*, 113, 1093–1104.
- Lee, J.S., Kim, H.R., Lee, C.Y., Shin, M. & Shim, H.S., (2013) EGFR and TTF-1 Gene Amplification in Surgically Resected Lung Adenocarcinomas: Clinicopathologic Significance and Effect on Response to EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors in Recurred Cases. *Annals of Surgical Oncology*, 20, 3015–22.
- Lee, N.O., Son, Y.J., Kim, J.G., Ha, C.M., Yun, C.H., Lim, H.L., Park, J.W., D'Elia, A.V., Damante, G. & Lee, B.J., (2007) TTF-1 regulates growth hormone and prolactin transcription in the anterior pituitary gland. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362, 193–199.
- Lehmann, U. & Kreipe, H., (2001) Real-Time PCR Analysis of DNA and RNA Extracted from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Biopsies. *Methods*, 25, 409–418.
- Lei, J.-Y., Bourne, P.A., DiSant'Agnes, P.A. & Huang, J., (2006) Cytoplasmic Staining of TTF-1 in the Differential Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma vs Cholangiocarcinoma and Metastatic Carcinoma of the Liver. *American Journal of Clinical Pathology*, 125, 519–525.
- Leica Microsystems, (2011) Sample Preparation For Laser Microdissection. , (Version 1.0), 1–42.
- Leite, K.R.M., Mitteldorf, C.A.T.S., Srougi, M., Dall'Oglio, M.F., Antunes, A.A., Pontes Jr., J. & Camara-Lopes, L.H., (2008) Cdx2, cytokeratin 20, thyroid transcription factor 1, and prostate-specific antigen expression in unusual subtypes of prostate cancer. *Annals of Diagnostic Pathology*, 12, 260–266.
- Lemon, B. & Tjian, R., (2000) Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes and Development*, 14, 2551–2569.
- Leong, A.S.-Y. & Wright, J., (1987) The contribution of immunohistochemical staining in tumour diagnosis. *Histopathology*, 11, 1295–1305.
- Li, C., Cai, J., Pan, Q. & Minoo, P., (2000) Two Functionally Distinct Forms of NKX2.1 Protein Are Expressed in the Pulmonary Epithelium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 270(2), 462–468.
- Li, C., Ling, X., Yuan, B. & Minoo, P., (2000) A novel DNA element mediates transcription of Nkx2.1 by Sp1 and Sp3 in pulmonary epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1490, 213–224.
- Lino-Silva, L.S., Salcedo-Hernandez, R.A., Garcia-Gomez, M.A., Ruiz-Garcia, E.B.,

- Aguilar-Romero, J.M., Dominguez-Rodriguez, J.A., Herrera-Gomez, A. & Maldonado-Martinez, H.A., (2016) Thyroid Transcription Factor-1 Expression in Adenocarcinomas of the Bile Duct. *International Journal of Surgical Pathology*, 24(1), 24–28.
- Liu, C., Glasser, S.W., Wan, H. & Whitsett, J.A., (2002) GATA-6 and Thyroid Transcription Factor-1 Directly Interact and Regulate Surfactant Protein-C Gene Expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(6), 4519–4525.
- Liu, Y., Zhang, G., Li, H., Han, L., Fu, A., Zhang, N. & Zheng, Y., (2015) Serum microRNA-365 in combination with its target gene TTF-1 as a non-invasive prognostic marker for non-small cell lung cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 75, 185–190.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D., (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2-^{-ΔΔCT} Method. *Methods*, 25, 402–408.
- Lonigro, R., De Felice, M., Biffali, E., Macchia, P.E., Damante, G., Asteria, C. & Di Lauro, R., (1996) Expression of Thyroid Transcription Factor 1 Gene Can Be Regulated at the Transcriptional and Posttranscriptional Levels. *Cell growth & Differentiation*, 7, 251–261.
- Loo, P.S., Thomas, S.C., Nicolson, M.C., Fyfe, M.N. & Kerr, K.M., (2010) Subtyping of Undifferentiated Non-small Cell Carcinomas in Bronchial Biopsy Specimens. *Journal of Thoracic Oncology*, 5(4), 442–447.
- Maeda, Y., Tsuchiya, T., Hao, H., Tompkins, D.H., Xu, Y., Mucenski, M.L., Du, L., Keiser, A.R., Fukazawa, T., Naomoto, Y., Nagayasu, T. & Whitsett, J.A., (2012) Kras ^{G12D} and Nkx2-1 haploinsufficiency induce mucinous adenocarcinoma of the lung. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(12), 4388–4400.
- Maier, T., Güell, M. & Serrano, L., (2009) Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Letters*, 583, 3966–3973.
- Martins, S.J., Takagaki, T.Y., Silva, A.G.P., Gallo, C.P., Silva, F.B.A. & Capelozzi, V.L., (2009) Prognostic relevance of TTF-1 and MMP-9 expression in advanced lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*, 64, 105–109.
- de Matos, L.L., Trufelli, D.C., de Matos, M.G.L. & Pinhal, M.A.D.S., (2010) Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice. *Biomarker Insights*, 5, 9–20.
- Mazziotta, R.M., Borczuk, A.C., Powell, C. a & Mansukhani, M., (2005) CDX2 immunostaining as a gastrointestinal marker: expression in lung carcinomas is a potential pitfall. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 13(1),

55–60.

- Minoo, P., Su, G., Drum, H., Bringas, P. & Kimura, S., (1999) Defects in Tracheoesophageal and Lung Morphogenesis in Nkx2.1(2/2) Mouse Embryos. *Developmental Biology*, 209, 60–71.
- Mitry, E., Guiu, B., Coscinea, S., Jooste, V., Faivre, J. & Bouvier, A.-M., (2010) Epidemiology, management and prognosis of colorectal cancer with lung metastases: a 30-year population-based study. *Gut*, 59, 1383–1388.
- Mizuno, K., Gonzalez, F.J. & Kimura, S., (1991) Thyroid-Specific Enhancer-Binding Protein (T/EBP): cDNA Cloning, Functional Characterization, and Structural Identity with Thyroid Transcription Factor TTF-1. *Molecular and Cellular Biology*, 11(10), 4927–4933.
- Moldvay, J., Jackel, M., Bogos, K., Soltész, I., Agócs, L., Kovács, G. & Schaff, Z., (2004) The Role of TTF-1 in Differentiating Primary and Metastatic Lung Adenocarcinomas. *Pathology Oncology Research*, 10(2), 85–88.
- Mukhopadhyay, S. & Katzenstein, A.-L.A., (2011) Subclassification of Non-small Cell Lung Carcinomas Lacking Morphologic Differentiation on Biopsy Specimens: Utility of an Immunohistochemical Panel Containing TTF-1, Napsin A, p63, and CK5/6. *The American Journal of Surgical Pathology*, 35(1), 15–25.
- Myong, N.H., (2003) Thyroid Transcription Factor-1 (TTF-1) Expression in Human Lung Carcinomas: Its Prognostic Implication and Relationship with Expressions of p53 and Ki-67 Proteins. *Journal of Korean Medical Science*, 18, 494–500.
- Ngan, E.S.W., Lang, B.H.H., Liu, T., Shum, C.K.Y., So, M.T., Lau, D.K.C., Leon, T.Y.Y., Cherny, S.S., Tsai, S.Y., Lo, C.Y., Khoo, U.S., Tam, P.K.H. & Garcia-Barceló, M.M., (2009) A Germline Mutation (A339V) in Thyroid Transcription Factor-1 (TTF-1/NKX2.1) in Patients With Multinodular Goiter and Papillary Thyroid Carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(3), 162–175.
- Ni, Y.B., Tsang, J.Y.S., Shao, M.M., Chan, S.K., Tong, J., To, K.F. & Tse, G.M., (2014) TTF-1 expression in breast carcinoma: An unusual but real phenomenon. *Histopathology*, 64, 504–511.
- Niimi, T., Nagashima, K., Ward, J.M., Minoo, P., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C. & Kimura, S., (2001) claudin-18, a Novel Downstream Target Gene for the T/EBP/NKX2.1 Homeodomain Transcription Factor, Encodes Lung- and Stomach-Specific Isoforms through Alternative Splicing. *Molecular and Cellular Biology*, 21(21), 7380–7390.
- Niu, H.L., Pasha, T.L., Pawel, B.R., LiVolsi, V.A. & Zhang, P.J., (2009) Thyroid Transcription Factor-1 Expression in Normal Gynecologic Tissues and its Potential

- Significance. *International Journal of Gynecological Pathology*, 28(4), 301–307.
- Oguchi, H., Pan, Y.-T. & Kimura, S., (1995) The complete nucleotide sequence of the mouse thyroid-specific enhancer-binding protein(T/EBP) gene: extensive identity of the deduced amino acid sequence with the human protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1261, 304–306.
- Ordóñez, N.G., (2000) Thyroid transcription factor-1 is a marker of lung and thyroid carcinomas. *Advances in Anatomic Pathology*, 7(2), 123–127.
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J. & Pisani, P., (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 55, 74–108.
- Pegolo, E., Machin, P., Damante, G. & Di Loreto, C., (2014) TTF-1 Positivity in 2 Cases of Adenocarcinoma of the Gastrointestinal Tract. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 22(7), e27–e31.
- Pelosi, G., Fraggetta, F., Pasini, F., Maisonneuve, P., Sonzogni, A., Iannucci, A., Terzi, A., Bresola, E., Valduga, F., Lupo, C. & Viale, G., (2001) Immunoreactivity for Thyroid Transcription Factor-1 in Stage I Non–Small Cell Carcinomas of the Lung. *The American Journal of Surgical Pathology*, 25(3), 363–372.
- Penman, D., Downie, I. & Roberts, F., (2006) Positive immunostaining for thyroid transcription factor-1 in primary and metastatic colonic adenocarcinoma: a note of caution. *Journal of Clinical Pathology*, 59, 663–664.
- Perner, S., Wagner, P.L., Soltermann, A., LaFargue, C., Tischler, V., Weir, B.A., Weder, W., Meyerson, M., Giordano, T.J., Moch, H. & Rubin, M.A., (2009) TTF1 expression in non-small cell lung carcinoma: association with TTF1 gene amplification and improved survival. *The Journal of Pathology*, 217, 65–72.
- Puglisi, F., Barbone, F., Damante, G., Bruckbauer, M., Di Lauro, V., Beltrami, C.A. & Di Loreto, C., (1999) Prognostic value of thyroid transcription factor-1 in primary, resected, non-small cell lung carcinoma. *Modern Pathology*, 12(3), 318–324.
- Qi, J., Rice, S.J., Salzberg, A.C., Runkle, E.A., Liao, J., Zander, D.S. & Mu, D., (2012) MiR-365 regulates lung cancer and developmental gene thyroid transcription factor 1. *Cell Cycle*, 11(1), 177–186.
- Qiagen, (2014) RNeasy ® FFPE Handbook: For purification of total RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. , 1–38.
- Rekhtman, N., Ang, D.C., Sima, C.S., Travis, W.D. & Moreira, A.L., (2011) Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Modern Pathology*, 24, 1348–1359.
- Robens, J., Goldstein, L., Gown, A.M. & Schnitt, S.J., (2010) Thyroid Transcription

- Factor-1 Expression in Breast Carcinomas. *The American Journal of Surgical Pathology*, 34(12), 1881–1885.
- Runkle, E.A., Rice, S.J., Qi, J., Masser, D., Antonetti, D.A., Winslow, M.M. & Mu, D., (2012) Occludin Is a Direct Target of Thyroid Transcription Factor-1 (TTF-1/NKX2-1). *Journal of Biological Chemistry*, 287(34), 28790–28801.
- Russell, P.A., Barnett, S.A., Walkiewicz, M., Wainer, Z., Conron, M., Wright, G.M., Gooi, J., Knight, S., Wynne, R., Liew, D. & John, T., (2013) Correlation of Mutation Status and Survival with Predominant Histologic Subtype According to the New IASLC/ATS/ERS Lung Adenocarcinoma Classification in Stage III (N2) Patients. *Journal of Thoracic Oncology*, 8(4), 461–468.
- Russell, P.A., Wainer, Z., Wright, G.M., Daniels, M., Conron, M. & Williams, R.A., (2011) Does Lung Adenocarcinoma Subtype Predict Patient Survival? A Clinicopathologic Study Based on the New International Association for the Study of Lung Cancer/ American Thoracic Society/ European Respiratory Society International Multidisciplinary Lung Aden. *Journal of Thoracic Oncology*, 6(9), 1496–1504.
- Saad, R.S., Liu, Y.L., Han, H., Landreneau, R.J. & Silverman, J.F., (2004) Prognostic Significance of Thyroid Transcription Factor-1 Expression in Both Early-Stage Conventional Adenocarcinoma and Bronchioloalveolar Carcinoma of the Lung. *Human Pathology*, 35(1), 3–7.
- Saito, R.-A., Watabe, T., Horiguchi, K., Kohyama, T., Saitoh, M., Nagase, T. & Miyazono, K., (2009) Thyroid Transcription Factor-1 Inhibits Transforming Growth Factor- β -Mediated Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Lung Adenocarcinoma Cells. *Cancer Research*, 69(7), 2783–2791.
- Scherrer, K., (2003) Historical review: The discovery of “giant” RNA and RNA processing: 40 Years of enigma. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(10), 566–571.
- Schmittgen, T.D., (2001) Real-Time Quantitative PCR. *Methods*, 25, 383–385.
- Scott, M.P., Tamkun, J.W. & Hartzell III, G.W., (1989) The structure and function of the homeodomain. *Biochimica et Biophysica Acta*, 989, 25–48.
- Sela, M., Anfinsen, C.B. & Harrington, W.F., (1957) The correlation of ribonuclease activity with specific aspects of tertiary structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 26, 502–512.
- Shah, L., Walter, K.L., Borczuk, A.C., Kawut, S.M., Sonett, J.R., Gorenstein, L.A., Ginsburg, M.E., Steinglass, K.M. & Powell, C.A., (2004) Expression of Syndecan-1 and Expression of Epidermal Growth Factor Receptor Are Associated with

- Survival in Patients with Nonsmall Cell Lung Carcinoma. *Cancer*, 101(7), 1632–1638.
- Smith, R.A. & Glynn, T.J., (2000) Epidemiology of lung cancer. *Radiologic Clinics of North America*, 38(3), 453–470.
- Snyder, E.L., Watanabe, H., Magendantz, M., Hoersch, S., Chen, T.A., Wang, D.G., Crowley, D., Whittaker, C.A., Meyerson, M., Kimura, S. & Jacks, T., (2013) Nkx2-1 Represses a Latent Gastric Differentiation Program in Lung Adenocarcinoma. *Molecular Cell*, 50(2), 185–199.
- Sousa, V., Bastos, B., Silva, M., Alarcão, A.M. & Carvalho, L., (2015) Bronchial-pulmonary adenocarcinoma subtyping relates with different molecular pathways. *Revista Portuguesa Pneumologia*, 21(5), 259–270.
- Spitz, F. & Furlong, E.E.M., (2012) Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nature Reviews Genetics*, 13(9), 613–626.
- SPSS GmbH Software, (1999) SPSS Interaktive Grafiken 9.0. In *SPSS Interaktive Grafiken 9.0*. München, Deutschland: SPSS Inc., p. 89.
- Statistisches Bundesamt, (2013) Krebs war 2013 die zweithäufigste Todesursache. , 34/15, 1.
- Stenhouse, G., Fyfe, N., King, G., Chapman, A. & Kerr, K.M., (2004) Thyroid transcription factor 1 in pulmonary adenocarcinoma. *Journal of Clinical Pathology*, 57, 383–387.
- Sterlacci, W., Savic, S., Schmid, T., Oberaigner, W., Auberger, J., Fiegl, M. & Tzankov, A., (2012) Tissue-sparing application of the newly proposed IASLC/ATS/ERS classification of adenocarcinoma of the lung shows practical diagnostic and prognostic impact. *American Journal of Clinical Pathology*, 137, 946–956.
- Surrey, L.F., Frank, R., Zhang, P.J. & Furth, E.E., (2014) TTF-1 and Napsin-A Are Expressed in a Subset of Cholangiocarcinomas Arising From the Gallbladder and Hepatic Ducts: Continued Caveats for Utilization of Immunohistochemistry Panels. *The American Journal of Surgical Pathology*, 38(2), 224–227.
- Tan, D., Li, Q., Deeb, G., Ramnath, N., Slocum, H.K., Brooks, J., Cheney, R., Wiseman, S., Anderson, T. & Loewen, G., (2003) Thyroid transcription factor-1 expression prevalence and its clinical implications in non-small cell lung cancer: A high-throughput tissue microarray and immunohistochemistry study. *Human Pathology*, 34(6), 597–604.
- Tanaka, H., Yanagisawa, K., Shinjo, K., Taguchi, A., Maeno, K., Tomida, S., Shimada, Y., Osada, H., Kosaka, T., Matsubara, H., Mitsudomi, T., Sekido, Y., Tanimoto, M., Yatabe, Y. & Takahashi, T., (2007) Lineage-Specific Dependency of Lung

- Adenocarcinomas on the Lung Development Regulator TTF-1. *Cancer Research*, 67(13), 6007–6011.
- Taylor, C.R. & Kledzik, G., (1981) Immunohistologic Techniques in Surgical Pathology- A Spectrum of “New” Special Stains. *Human Pathology*, 12(7), 590–596.
- Taylor, C.R. & Levenson, R.M., (2006) Quantification of immunohistochemistry- issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology*, 49, 406–410.
- The National Cancer Registration Service UK, (2007) Lung Cancer: 2003-2006 Five-Year Relative Survival (%) by Stage, Adults 15-99, Former Anglia Cancer Network. , 1.
- Tjensvoll, K., Oltedal, S., Farmen, R.K., Shammas, F. V, Heikkilä, R., Kvaløy, J.T., Gilje, B., Smaaland, R. & Nordgård, O., (2010) Disseminated Tumor Cells in Bone Marrow Assessed by TWIST1, Cytokeratin 19, and Mammaglobin A mRNA Predict Clinical Outcome in Operable Breast Cancer Patients. *Clinical Breast Cancer*, 10(5), 378–384.
- Toonen, R.F.G., Gowan, S. & Bingle, C.D., (1996) The lung enriched transcription factor TTF-1 and the ubiquitously expressed proteins Sp1 and Sp3 interact with elements located in the minimal promoter of the rat Clara cell secretory protein gene. *Biochemical Journal*, 316, 467–473.
- Travis, W.D., Brambilla, E., Burke, A.P., Marx, A. & Nicholson, A.G. (eds), (2015) *WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*, Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC).
- True, L.D., (1988) Quantitative Immunohistochemistry: A New Tool for Surgical Pathology? *American Journal of Clinical Pathology*, 90(3), 324–325.
- Trueba, S.S., Augé, J., Mattei, G., Etchevers, H., Martinovic, J., Czernichow, P., Vekemans, M., Polak, M. & Attié-Bitach, T., (2005) PAX8, TTF1, and FOXE1 Gene Expression Patterns during Human Development: New Insights into Human Thyroid Development and Thyroid Dysgenesis- Associated Malformations. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(1), 455–462.
- Ventana Medical Systems, (2011) *CONFIRM anti-Thyroid Transcription Factor-1 (8G7G3/1) Mouse Monoclonal Primary Antibody*, Tucson, USA.
- Venter, D.J., Kumar, S., Tuzi, N.L. & Gullick, W.J., (1987) Overexpression of the c-erbB-2 Oncoprotein in Human Breast Carcinomas: Immunohistological Assessment correlates with Gene Amplification. *The Lancet*, 2(8550), 69–72.
- Walker, R.A., (2006) Quantification of immunohistochemistry - Issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. *Histopathology*, 49, 406–410.

- Wang, W. & Epstein, J.I., (2008) Small Cell Carcinoma of the Prostate: A Morphologic and Immunohistochemical Study of 95 Cases. *American Journal of Surgical Pathology*, 32(1), 65–71.
- Warth, A., Stenzinger, A., Von Brünneck, A.C., Goepfert, B., Cortis, J., Petersen, I., Hoffmann, H., Schnabel, P.A. & Weichert, W., (2012) Interobserver variability in the application of the novel IASLC/ATS/ERS classification for pulmonary adenocarcinomas. *European Respiratory Journal*, 40(5), 1221–1227.
- Warth, A., Stenzinger, A. & Weichert, W., (2013) Neue morphologische und molekulare Aspekte des Lungenkarzinoms. *Der Pathologe*, 34(5), 419–428.
- Watanabe, H., Francis, J.M., Woo, M.S., Etemad, B., Lin, W., Fries, D.F., Peng, S., Snyder, E.L., Tata, P.R., Izzo, F., Schinzel, A.C., Cho, J., Hammerman, P.S., Verhaak, R.G., Hahn, W.C., Rajagopal, J., Jacks, T. & Meyerson, M., (2013) Integrated cisomic and expression analysis of amplified NKX2-1 in lung adenocarcinoma identifies LMO3 as a functional transcriptional target. *Genes & Development*, 27, 197–210.
- Weir, B.A., Woo, M.S., Getz, G., Perner, S., Ding, L., Lin, W.M., Province, M.A., Kraja, A., Johnson, L.A., Shah, K., Sato, M., Thomas, R.K., Barletta, J.A., B, I., Broderick, S., Chang, A.C., Chiang, D.Y., R, L., Cho, J., Fujii, Y., Meyerson, M., et al., (2007) Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature*, 450(7171), 893–898.
- Werner, M., Chott, A., Fabiano, A. & Battifora, H., (2000) Effect of Formalin Tissue Fixation and Processing on Immunohistochemistry. *The American Journal of Surgical Pathology*, 24(7), 1016–1019.
- Wieczorek, T.J., Pinkus, J.L., Glickman, J.N. & Pinkus, G.S., (2002) Comparison of Thyroid Transcription Factor-1 and Hepatocyte Antigen Immunohistochemical Analysis in the Differential Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma, Metastatic Adenocarcinoma, Renal Cell Carcinoma, and Adrenal Cortical Carcinoma. *American Journal of Clinical Pathology*, 118, 911–921.
- Winslow, M.M., Dayton, T.L., Verhaak, R.G.W., Kim-Kiselak, C., Snyder, E.L., Feldser, D.M., Hubbard, D.D., DuPage, M.J., Whittaker, C.A., Hoersch, S., Yoon, S., Crowley, D., Bronson, R.T., Chiang, D.Y., Meyerson, M. & Jacks, T., (2011) Suppression of lung adenocarcinoma progression by Nkx2-1. *Nature*, 473(7345), 101–104.
- Yamaguchi, T., Hosono, Y., Yanagisawa, K. & Takahashi, T., (2013) NKX2-1/TTF-1: An Enigmatic Oncogene that Functions as a Double-Edged Sword for Cancer Cell Survival and Progression. *Cancer Cell*, 23, 718–723.

- Yamaguchi, T., Yanagisawa, K., Sugiyama, R., Hosono, Y., Shimada, Y., Arima, C., Kato, S., Tomida, S., Suzuki, M., Osada, H. & Takahashi, T., (2012) NKX2-1/TTF1/TTF-1-Induced ROR1 Is Required to Sustain EGFR Survival Signaling in Lung Adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 21, 348–361.
- Yang, L., Lin, M., Ruan, W., Dong, L., Chen, E., Wu, X. & Ying, K., (2012) Nkx2-1: a novel tumor biomarker of lung cancer. *Journal of Zhejiang University- Science B*, 13(11), 855–866.
- Yatabe, Y., Mitsudomi, T. & Takahashi, T., (2002) TTF-1 expression in pulmonary adenocarcinomas. *The American Journal of Surgical Pathology*, 26(6), 767–773.
- Yoon, S.O., Kim, Y.T., Jung, K.C., Jeon, Y.K., Kim, B.H. & Kim, C.W., (2011) TTF-1 mRNA-positive circulating tumor cells in the peripheral blood predict poor prognosis in surgically resected non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*, 71(2), 209–216.
- Yu, Y., Xu, G., Cao, J., Jin, S., Man, Y. & Shang, L., (2013) Combination of four gene markers to detect circulating tumor cells in the peripheral blood of patients with advanced lung adenocarcinoma using real-time PCR. *Oncology Letters*, 5, 1400–1406.
- Zamecnik, J., Chanova, M. & Kodet, R., (2004) Expression of thyroid transcription factor 1 in primary brain tumours. *Journal of Clinical Pathology*, 57, 1111–1113.

7. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
A260/A280	Assessment of Nucleic Acid Purity
Abb.	Abbildung
ABCA3	ATP-binding-cassette transporter A3
AC	azinäre pulmonale Adenokarzinom
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
ATS	American Thoracic Society
AUC	Area Under the Curve
BTL-Syndrom	brain-thyroid-lung-syndrom
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCSP	Clara cell secretory protein
cDNA	complementary DNA
CDX-2	Homeobox protein CDX-2
CEACAM6	carcinoembryonic antigenrelated cell adhesion molecule 6
CK5/6/7/20	Cytokeratin 5/6/7/20
CLDN1/18	claudin-1/18
C _T	cycle threshold
d.h.	das heißt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	desoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	enzyme linked immunosorbant assay
EMT	epithelial-to-mesenchymal transition
ERS	European Respiratory Society
FFPE	Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettet
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FOXA1	Forkhead box protein A1, auch bekannt unter hepatocyte nuclear factor 3 alpha (HNF-3A)
FOXA2	Forkhead-Box-Protein A2, auch bekannt unter hepatocyte nuclear factor 3-beta (HNF-3B)
FPF	Falsch-Positiv
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
GC	Guanin und Cytosin

H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HER2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
HIER	heat-induced epitope retrieval
Hmga2	High-mobility group AT-hook 2
Hnf4 α	Hepatocyte nuclear factor 4 alpha
HPV	Humane Papillomviren
hTERT	Telomerase reverse transcriptase
IARC	International Agency for Research on Cancer
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancer
IHC	Immunhistologie
IRS	immunreaktiver Score
ISH	In-situ-Hybridisierung
kDA	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
l	Liter
LAMP3	lysosomal-associated membrane protein 3
LMO	LIM Domain Only
LMO3	LIM domain only protein 3
mg	Milligramm
min	Minuten
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
MRD	minimal residual-disease
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
MYBPH	myosin-binding protein H
N	Stickstoff
neg.	negativ
ng	Nanogramm
NSCLC	non small cell lung carcinoma; Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
°C	Grad Celsius
OCLN	occludin
o.g.	oben genannten
p	p-Werte
p.c.	post conceptionem MRT
PAS	Periodic acid-Schiff
PBS	phosphat buffered saline

PCR	polymerase chain reaction
pCRC	pulmonale Metastase colorektaler Adenokarzinome
PKD	Proteinase K Digestion
pos.	positiv
PPW	Positiv prädiktiver Wert
qPCR	quantitative Real-time Polymerase-Kettenreaktion
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RBC	red blood cell
RNA	ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
ROC	receiver operating characteristic
ROR1	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1
RPE-Puffer	RPE aus dem Extraktionskit RNeasy® der Firma Qiagen
rpm	rounds per minute
Se	Sensitivität
siRNA	small interfering RNA
SNP	Single-Nukleotid-Polymorphismen
sog.	sogenannte
SOL	solide pulmonale Adenokarzinom
Sp	Spezifität
SP1/3	specificity protein 1/3
SP-A,-B,-C,-D	surfactant-protein A,-B,-C,-D
SQCC	Plattenepithelkarzinom
T ₃	Trijodthyronin
T ₄	Thyroxin
Tab.	Tabelle
T-ALL	Akute lymphatische Leukämie der T-Lymphozyten
Taq	Thermus aquaticus
TGF-β	transforming growth factor beta
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
TPF	Richtig-positiv
TPO	Thyreoperoxidase
TRU	terminal respiratory unit
TTF-1	thyroidale Transkriptionsfaktor 1
u.a.	unter ander[e]m, unter ander[e]n
UICC	Union internationale contre le cancer
Ultra CC1	Ultra Cell Conditioning Solution 1

UNG	Uracil-N-glycosylase
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
β 2M	Beta-2 microglobulin
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: 1971 von James E. Darnell entdeckte RNA-Typen.	5
Abbildung 2: Wichtigste Anwendungsbereiche der qPCR.	7
Abbildung 3: Anwendungsbereiche der Immunhistologie.	8
Abbildung 4: Regulationskonstrukt zur Bildung von TTF-1.	12
Abbildung 5: Zusammenfassung der onkogenen und nicht-onkogenen Eigenschaften von TTF-1.	16
Abbildung 6: Der dargestellte Nuklease-Assay-Prozess findet während PCR Amplifikation in jedem Zyklus statt (R=Reporter, Q=Quencher).	27
Abbildung 7: Boxplot der Altersverteilung in Abhängigkeit der histologischen Gruppen.	37
Abbildung 8: Geschlechtsverteilung in Abhängigkeit der histologischen Gruppen.	37
Abbildung 9: Stadienverteilung in Abhängigkeit der histologischen Gruppen (* entspricht dem UICC-Stadium IV der colorektalen Karzinome).	39
Abbildung 10: Boxplot der Überlebenszeit in Abhängigkeit der histologischen Gruppen (Kreis= Ausreißer, Stern= extremer Wert).	41
Abbildung 11: Immunhistologischer TTF-1 Status der histologischen Gruppen in Prozent.	45
Abbildung 12: TTF-1 negativ immunhistochemische Expression in A),B),C) azinären pulmonalen Adenokarzinomen, Originalvergrößerung 10x/20x/40x; D),E),F) soliden pulmonalen Adenokarzinomen, Originalvergrößerung 10x/20x/40x; G),H),I) pulmonalen Plattenepithelkarzinomen, Originalvergrößerung 10x/20x/40x; J),K),L) pulmonale Metastasen eines colorektalen Adenokarzinom, Originalvergrößerung 10x/20x/40x.	46
Abbildung 13: TTF-1 schwach positive immunhistochemische Expression in A), B), C) azinären pulmonalen Adenokarzinomen, Originalvergrößerung 10x/20x/40x; D), E), F) soliden pulmonalen Adenokarzinomen, Originalvergrößerung 10x/20x/40x.	47
Abbildung 14: TTF-1 stark positive immunhistochemische Expression in A), B), C) azinären pulmonalen Adenokarzinomen, Originalvergrößerung 10x/20x/40x; D), E), F) soliden pulmonalen Adenokarzinomen, Originalvergrößerung 10x/20x/40x.	47

Abbildung 15: Boxplot der ▲ ▲ C _T -Werte von TTF-1 mRNA in Abhängigkeit der histologischen Gruppen (Kreis=Ausreißer, Stern=extreme Werte).	50
Abbildung 16: ROC-Kurve azinärer und solider pulmonaler Adenokarzinome.	51
Abbildung 17: ROC-Kurve azinärer pulmonaler Adenokarzinome.	52
Abbildung 18: ROC-Kurven solider pulmonaler Adenokarzinome.	53
Abbildung 19: Ermittlung des maximalen Youden-Index (YI-max) azinärer und solider pulmonaler Adenokarzinome.	55
Abbildung 20: Ermittlung des maximalen Youden-Index (YI-max) azinärer pulmonaler Adenokarzinome.	56
Abbildung 21: Ermittlung des maximalen Youden-Index (YI-max) solider pulmonaler Adenokarzinome.	57
Abbildung 22: Übersicht der Resultate aus qRT-PCR nach Anwendung des ▲ ▲ C _T -Schwellenwertes von 300,14; in Prozent.	58
Abbildung 23: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Immunhistologie und qRT-PCR (Schwellenwert 300,14) in den histologischen Gruppen; in Prozent.	59
Abbildung 24: Übersicht der Resultate aus qRT-PCR nach Anwendung des ▲ ▲ C _T -Schwellenwertes von 238,25; in Prozent.	60
Abbildung 25: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Immunhistologie und qRT-PCR (Schwellenwert 238,25) in azinären pulmonalen Adenokarzinomen und pulmonalen Metastasen; in Prozent.	61
Abbildung 26: Übersicht der Resultate aus qRT-PCR nach Anwendung des ▲ ▲ C _T -Schwellenwertes von 825,75; in Prozent.	62
Abbildung 27: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Immunhistologie und qRT-PCR (Schwellenwert 825,75) in soliden pulmonalen Adenokarzinomen und pulmonalen Plattenepithelkarzinomen; in Prozent.	63
Abbildung 28: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelationsanalyse zwischen Überlebenszeit und TTF-1 Immunhistologie für azinäre pulmonale Adenokarzinome.	66
Abbildung 29: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelationsanalyse zwischen Überlebenszeit und TTF-1 Immunhistologie für solide pulmonale Adenokarzinome.	67

Abbildung 30: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelationsanalyse zwischen Überlebenszeit und TTF-1 positiven bzw. negativen PCR-Resultaten (Schwellenwert 300,14) für azinäre pulmonale Adenokarzinome.	73
Abbildung 31: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelationsanalyse zwischen Überlebenszeit und TTF-1 positiven bzw. negativen PCR-Resultaten (Schwellenwert 300,14) für solide pulmonale Adenokarzinome.	74
Abbildung 32: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelationsanalyse zwischen Überlebenszeit und TTF-1 positiven bzw. negativen PCR-Resultaten (Schwellenwert 300,14) für pulmonale Plattenepithelkarzinome.....	75
Abbildung 33: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelationsanalyse zwischen Überlebenszeit und TTF-1 positiven bzw. negativen PCR-Resultaten (Schwellenwert 300,14) für pulmonale Metastasen eines colorektalen Adenokarzinom.	76
Abbildung 34: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelationsanalyse zwischen Überlebenszeit und TTF-1 positiven bzw. negativen PCR-Resultaten (Schwellenwert 238,25) für azinäre pulmonale Adenokarzinome.	77
Abbildung 35: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelationsanalyse zwischen Überlebenszeit und TTF-1 positiven bzw. negativen PCR-Resultaten (Schwellenwert 238,25) für pulmonale Metastasen eines colorektalen Adenokarzinoms.	78
Abbildung 36: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelationsanalyse zwischen Überlebenszeit und TTF-1 positiven bzw. negativen PCR-Resultaten (Schwellenwert 825,75) für solide pulmonale Adenokarzinome.	79
Abbildung 37: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelationsanalyse zwischen Überlebenszeit und TTF-1 positiven bzw. negativen PCR-Resultaten (Schwellenwert 825,75) für pulmonale Plattenepithelkarzinome.	80

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ablauf des automatisierten 2-Schritt-RT-PCR zur Amplifikation der bereits erhaltenen cDNA. (Applied Biosystems 2010).	28
Tabelle 2: Immunreaktive Scores zur Quantifizierung der immunhistochemischen Resultate. .	32
Tabelle 3: Vereinfachte Zusammenfassung des Scoring-Systems in TTF-1 negativ, schwach positiv und stark positiv.	32
Tabelle 4: Übersicht der gesammelten klinisch-pathologischen Charakteristika anhand primärer azinärer und solider Adenokarzinome (Azinäre/Solide AD) und Plattenepithelkarzinome (SQCC) der Lunge sowie pulmonaler Metastasen eines colorektalen Adenokarzinoms (pCRC) (* entspricht dem UICC-Stadium IV der colorektalen Karzinome).....	42
Tabelle 5: Übersicht der immunhistologischen Resultate der histologischen Gruppen.	48
Tabelle 6: Darstellung statistischer Kenngrößen der ▲▲C _T -Werte in der Gesamtkohorte.	50
Tabelle 7: Ergebnisse der verschiedenen ▲▲C _T -Schwellenwerte zur Unterscheidung zwischen TTF-1 positiv/negativ.	64
Tabelle 8: Übersicht der Korrelationsanalysen klinisch-histopathologischer Parameter (Pulmonale azinäre Adenokarzinome= Azinäre AD; Pulmonale solide Adenokarzinome= Solide AD; Pulmonale Plattenepithelkarzinome= SQCC; Pulmonale Metastasen eines colorektalen Karzinoms=pCRC).	82
Tabelle 9: Verwendete Materialien/Geräte und deren Hersteller.	135
Tabelle 10: Auswahl interne Kontrolle durch TaqMaN Array Plates 96-Well Plates.	137
Tabelle 11: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Immunhistologie und qRT-PCR azinärer pulmonaler Adenokarzinome (Schwellenwert 300,14).	137
Tabelle 12: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Immunhistologie und qRT-PCR solider pulmonaler Adenokarzinome (Schwellenwert 300,14).	138
Tabelle 13: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Immunhistologie und qRT-PCR von pulmonalen Plattenepithelkarzinomen (Schwellenwert 300,14).	138
Tabelle 14: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Immunhistologie und qRT-PCR pulmonaler Metastasen eines colorektalen Adenokarzinoms (Schwellenwert 300,14).	138

Tabelle 15: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Immunhistologie und qRT-PCR azinärer pulmonaler Adenokarzinome (Schwellenwert 238,25).	139
Tabelle 16: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Immunhistologie und qRT-PCR pulmonaler Metastasen eines colorektalen Adenokarzinoms (Schwellenwert 238,25).	139
Tabelle 17: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Immunhistologie und qRT-PCR solider pulmonaler Adenokarzinome (Schwellenwert 825,75).	139
Tabelle 18: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Immunhistologie und qRT-PCR von pulmonalen Plattenepithelkarzinomen (Schwellenwert 825,75).	140

10. Anhang

Tabelle 9: Verwendete Materialien/Geräte und deren Hersteller.

Materialien/Geräte	Hersteller
100% Ethanol absolute	Sigma Aldrich
7900HT Fast-Real-Time PCR-System	Applied Biosystems
96-Well-Zentrifuge	Hermle
Adhesive Clear PCR Seal Sheets	Biozym Scientific GmbH
Aqua dest.	Braun
Benchmark Ultra	Ventana
Biosphere plus safeseal Microtube 2ml/1,5ml	Sarstedt
DEPC-Wasser 1l	Carl Roth
Eisplatte Tissue-TekCryo Console	Miles Scientific
Heizschrank Loading Modell 100-800	Memmert
High Capacity RNA-to-cDNA Kit (50x 20µL reactions)	Applied Biosystems
Hitzebad SW21	Julabo
Hitzeblock Thriller	peqLab
Lichtmikroskop BH2	Olympus
Mikrocentrifuge	Sigma1K15
Mikrotom Rotary 3003	pfm
Monoclonal Mouse Antibody Thyroid Transcription Factor (TTF-1 Clone 8G7G3/1)	Dako
Multiply-Pro 0,5ml Biosphere	Sarstedt
NanoDropSpectrophotometerND-1000	peqLab
Objektträger geschnitten, Mattrand 50Stück	R. Langenbrinck
PCR-plates , 96-well	ThermoFisher Scientific
Pipetten 1000µL, 100µL, 10µL	Eppendorf
QPCR Human Reference Total RNA 25 µg	Agilent Technologies

RNase Away	Molecular BioProducts
RNeasy FFPE Kit	Qiagen
Sterile, RNase-freie Pipettenspitzen 10µL Multiguard Barrier	Sigma-Aldrich
Tips Sorenson	
Sterile, RNase-freie Pipettenspitzen 1000µL, 100µL	AvantGuard
TaqMan® Array Plate 96 20 µL reaction	ThermoFisher Scientific
TaqMan Gene Expression HS00968940_m1 NKX2-1	ThermoFisher Scientific
TaqMan Gene Expression HS999999_m1 β2M	ThermoFisher Scientific
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge Kinetic Energy 26joule	Labnet
Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation	peqLab
VortexVibrofix VF1 Electronic	Janken und Krunkel
Wärmebad	Medox
Xylol	

Tabelle 10: Auswahl interne Kontrolle durch TaqMaN Array Plates 96-Well Plates.

TaqMaN® Array Plates 96-Well Plates

Interne Kontr_	SQCC	RNA-Control :	SOL	AC	CRC	RNA 2
18S-Hs99999901_s1	36.991.352	9.116.409	3.577.284	18.285.204	3.693.273	8.584.487
ABL1-Hs00245445_m1	37.054.405	21.146.126	Undeterminer	34.968.525	Undeterminer	24.121.738
ACTB-Hs99999903_m1	Undeterminer	17.959.383	Undeterminer	32.974.274	Undeterminer	1.885.238
B2M-Hs99999907_m1	32.568.333	1.992.464	34.688.435	2.595.479	35.779.594	19.922.903
CASC3-Hs00201226_m1	36.054.115	22.371.351	3.699.904	27.809.175	37.036.785	21.368.034
CDKN1A-Hs00355782_m1	3.558.145	2.452.232	3.594.597	27.772.758	37.058.826	2.231.954
CDKN1B-Hs00153277_m1	35.672.115	24.368.656	36.932.777	28.653.551	36.971.287	22.901.852
EIF2B1-Hs00426752_m1	3.670.906	22.297.873	3.717.632	32.162.476	Undeterminer	25.947.151
ELF1-Hs00152844_m1	3.567.038	21.240.522	37.058.296	30.041.746	Undeterminer	23.937.855
GADD45A-Hs00169255_m1	Undeterminer	2.796.755	Undeterminer	3.696.196	Undeterminer	26.613.266
GAPDH-Hs99999905_m1	37.030.598	14.694.213	Undeterminer	30.691.368	Undeterminer	17.976.517
GUSB-Hs99999908_m1	Undeterminer	23.972.742	Undeterminer	28.399.181	37.060.703	21.218.645
HMBS-Hs00609297_m1	3.726.613	21.552.439	Undeterminer	32.404.636	Undeterminer	25.931.427
HPRT1-Hs99999909_m1	Undeterminer	23.972.544	Undeterminer	34.943.295	Undeterminer	23.421.206
IPO8-Hs00183533_m1	3.695.974	2.356.705	3.585.101	26.080.666	3.688.972	21.170.197
MRPL19-Hs00608519_m1	36.995.483	22.439.001	36.946.354	32.955.185	Undeterminer	24.770.681
MT-ATP6-Hs02596862_g1	34.000.504	17.961.939	35.657.677	27.945.984	36.891.586	17.092.897
PES1-Hs00362795_g1	3.631.948	22.301.653	37.021.755	25.504.839	37.174.225	20.679.893
PGK1-Hs99999906_m1	35.034.966	1.992.001	36.546.043	26.945.616	36.932.533	19.895.882
POLR2A-Hs00172187_m1	3.593.544	25.329.588	35.960.423	27.054.028	3.696.324	2.429.298
POP4-Hs00198357_m1	3.589.504	21.317.904	37.105.255	32.929.302	Undeterminer	25.604.788
PPIA-Hs99999904_m1	34.235.287	18.684.738	35.951.946	26.681.273	3.695.652	18.650.173
PSMC4-Hs00197826_m1	3.710.046	21.403.082	Undeterminer	3.308.247	Undeterminer	24.019.747
PUM1-Hs00206469_m1	Undeterminer	23.948.118	Undeterminer	3.031.985	Undeterminer	2.396.121
RPL30-Hs00265497_m1	32.569.183	18.386.076	36.930.367	3.292.491	3.590.871	1.885.744
RPL37A-Hs01102345_m1	32.974.422	17.144.487	36.947.117	26.181.288	3.693.218	18.389.864
RPLP0-Hs99999902_m1	34.817.562	14.919.909	3.726.202	24.026.928	36.987.495	1.422.859
RPS17-Hs00734303_g1	36.017.426	18.602.627	36.978.718	27.099.497	36.953.457	17.506.014
TBP-Hs99999910_m1	Undeterminer	25.956.656	Undeterminer	36.933.567	Undeterminer	24.944.372
TFRC-Hs99999911_m1	36.927.475	22.762.531	Undeterminer	28.489.414	37.185.505	19.596.403
UBC-Hs00824723_m1	3.573.287	20.733.065	3.694.175	2.780.972	37.101.593	18.855.568
YWHAZ-Hs00237047_m1	Unknown	21.518.383	Undeterminer	3.235.881	Undeterminer	24.934.992

Tabelle 11: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Immunhistologie und qRT-PCR azinärer pulmonaler Adenokarzinome (Schwellenwert 300,14).

	Immunhistochemisch TTF-1 positiv	Immunhistochemisch TTF-1 negativ
qRT-PCR TTF-1 positiv (>300,14▲▲C _T - Schwellenwert)	32 (62,7%)	13 (25,5%)
qRT-PCR TTF-1 negativ (<300,14▲▲C _T - Schwellenwert)	1 (2%)	5 (9,8%)

Tabelle 12: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Immunhistologie und qRT-PCR solider pulmonaler Adenokarzinome (Schwellenwert 300,14).

	Immunhistochemisch TTF-1 positiv	Immunhistochemisch TTF-1 negativ
qRT-PCR TTF-1 positiv (>300,14▲▲C _T -Schwellenwert)	29 (58%)	9 (18%)
qRT-PCR TTF-1 negativ (<300,14▲▲C _T -Schwellenwert)	1(2%)	11 (22%)

Tabelle 13: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Immunhistologie und qRT-PCR von pulmonalen Plattenepithelkarzinomen (Schwellenwert 300,14).

	Immunhistochemisch TTF-1 positiv	Immunhistochemisch TTF-1 negativ
qRT-PCR TTF-1 positiv (>300,14▲▲C _T -Schwellenwert)	0 (0%)	3 (6,1%)
qRT-PCR TTF-1 negativ (<300,14▲▲C _T -Schwellenwert)	0 (0%)	46 (93,9%)

Tabelle 14: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Immunhistologie und qRT-PCR pulmonaler Metastasen eines colorektalen Adenokarzinoms (Schwellenwert 300,14).

	Immunhistochemisch TTF-1 positiv	Immunhistochemisch TTF-1 negativ
qRT-PCR TTF-1 positiv (>300,14▲▲C _T -Schwellenwert)	0 (0%)	4 (8,2%)
qRT-PCR TTF-1 negativ (<300,14▲▲C _T -Schwellenwert)	0 (0%)	45 (91,8%)

Tabelle 15: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Immunhistologie und qRT-PCR pulmonaler azinärer pulmonaler Adenokarzinome (Schwellenwert 238,25).

	Immunhistochemisch TTF-1 positiv	Immunhistochemisch TTF-1 negativ
qRT-PCR TTF-1 positiv ($>238,25 \blacktriangle \blacktriangle C_T$ - Schwellenwert)	33 (64,7%)	13 (25,5%)
qRT-PCR TTF-1 negativ ($<238,25 \blacktriangle \blacktriangle C_T$ - Schwellenwert)	0 (0%)	5 (9,8%)

Tabelle 16: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Immunhistologie und qRT-PCR pulmonaler Metastasen eines colorektalen Adenokarzinoms (Schwellenwert 238,25).

	Immunhistochemisch TTF-1 positiv	Immunhistochemisch TTF-1 negativ
RT-PCR TTF-1 positiv ($238,25 > \blacktriangle \blacktriangle C_T$ - Schwellenwert)	0 (0%)	7 (14,3%)
RT-PCR TTF-1 negativ ($<238,25 \blacktriangle \blacktriangle C_T$ - Schwellenwert)	0 (0%)	42(85,7%)

Tabelle 17: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Immunhistologie und qRT-PCR solider pulmonaler Adenokarzinome (Schwellenwert 825,75).

	Immunhistochemisch TTF-1 positiv	Immunhistochemisch TTF-1 negativ
qRT-PCR TTF-1 positiv ($>825,75 \blacktriangle C_T$ -Schwellenwert)	24 (48%)	5 (10%)
qRT-PCR TTF-1 negativ ($<825,75 \blacktriangle C_T$ -Schwellenwert)	6 (12%)	15 (30%)

Tabelle 18: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Immunhistologie und qRT-PCR von pulmonalen Plattenepithelkarzinomen (Schwellenwert 825,75).

	Immunhistochemisch TTF-1 positiv	Immunhistochemisch TTF-1 negativ
qRT-PCR TTF-1 positiv ($>825,75 \Delta C_T$ -Schwellenwert)	0 (0%)	1 (2,1%)
qRT-PCR TTF-1 negativ ($<825,75 \Delta C_T$ -Schwellenwert)	0 (0%)	48(97,9%)

11. Danksagung

Ich würde mich gern bei Herrn Prof. Dr. med. R.M. Bohle, Direktor des Instituts der Allgemeinen und Speziellen Pathologie am UKS, bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen. Ich danke ihm ganz besonders für die intensive Betreuung und seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Herrn Jakob Schöpe, wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik (IMBEI) am UKS, danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Arbeit.

Ich möchte mich bei Frau J. Michaely, Leitende MTA des molekularpathologischen Labors und dem ganzen Team für die Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Versuche bedanken. Frau Michaely hat sich stets Zeit genommen, mich in die verschiedenen experimentellen Arbeitsabläufe einzuführen, mit mir Probleme, Methodiken und Resultate kritisch überprüft und Korrekturen vorgenommen, die mich immer wieder motiviert haben.

Meiner Familie, besonders meinen Eltern, möchte ich ganz herzlich für ihre uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung während meines Studiums danken, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.