

Aus dem Institut für Humangenetik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin bzw. Leiterin: Univ.-Prof. Dr. Dagmar Wieczorek

**Systematische Analyse der Genexpression
eines seltenen ekkrinen Schweißdrüsenkarzinoms
(Ekkrines Porokarzinom)**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Svenja Kristin Holst

2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Silke Redler

Zweitgutachter: Prof. Dr. James Adjaye

Diese Arbeit beruht auf der folgenden Publikation:

Holst, S., Weber, A. K., Meier, F., Otte, J., Petzsch, P., Reifenberger, J., Wachtmeister, T., Westphal, D., Ziemer, M., Wruck, W., Adjaye, J., Betz, R. C., Rütten, A., Surowy, H. M., Redler, S.

Gene expression profiling in eccrine porocarcinoma indicates heterogeneous tumour development and substantiates poromas as likely precursor lesions.

JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft. 2024;22:1115–1124.

<https://doi.org/10.1111/ddg.15445>

Zusammenfassung

Schweißdrüsenkarzinome sind selten, wobei die häufigste Form das ekkrine Porokarzinom (EP) ist. Sein gutartiges Äquivalent ist das ekkrine Porom (EPO), welches ein mögliches Übergangsstadium in der EP-Entwicklung darstellt. Frühere Forschungsarbeiten haben erste Einblicke in das Genom des EP gegeben. Jedoch haben nur wenige Studien eine molekulare Charakterisierung anhand von Genexpressionsanalysen durchgeführt. Das fehlende Wissen über Genexpressionsprofile schränkt das Verständnis der EP-Biologie und möglicher Angriffspunkte für Präzisionstherapien ein. Ziel dieser Studie war es daher, durch Untersuchung der tumorspezifischen Genexpression tiefere Einblicke in die Biologie des EP zu gewinnen und potentielle Schlüsselfaktoren aufzudecken, die den malignen Übergang vom EPO zum EP vorantreiben. Eine Genexpressionsanalyse erfolgte an 23 formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Proben primärer EP und umgebender normaler Haut (NH). Die genomweite Transkriptomanalyse mittels *Microarray* wurde in einer Sondierungskohorte von 10 EP durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) in einer unabhängigen Kohorte von 13 EP validiert und die Ergebnisse aus den EP-Proben in 17 EPO getestet.

Die Transkriptomanalyse demonstrierte deutliche Unterschiede der Genexpression bei den 10 untersuchten EP. Durch hierarchisches Clustern wurden zwei EP-Tumorsubtypen mit deutlichen transkriptionellen Unterschieden identifiziert, was auf eine Tumorerheterogenität hindeutet. Zudem wurde bei EP im Vergleich zu NH eine weit verbreitete Herunterregulierung von Genen beobachtet. Zu den herunterregulierten Genen gehörten *Cluster of Differentiation 74 (CD74)*, *N-myc-downstream-regulated-gene-1 (NDGR1)*, *Serin/Arginin Repetitive Matrix 2 (SRRM2)*, *Cell Division Control Protein 42 (CDC42)*, *Annexin A2 (ANXA2)*, *Kruppel-like Factor 9 (KFL9)* und *Ribosome Biogenesis Factor 53 (NOP53)*. *CD74*, *NDGR1*, *SRRM2*, *ANXA2* und *NOP53* wiesen eine kontinuierliche Verringerung der Expression von NH über EPO zu EP auf. Dies bekräftigt die Annahme, dass EPO als Übergangszustand in der EP-Entwicklung fungiert. Die Ergebnisse legen zudem nahe, dass neben dem p53-Signalweg und dem Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-Weg weitere Mechanismen der Tumorgenese, wie die Beteiligung der Vascular Endothelial Growth Factor A/-Receptor 2 (VEGFA/VEGFR2)-Achse und des Endothelin-Weges, relevant sein könnten und potentielle Ansätze für Therapien bieten. Umfangreichere Studien mit einer größeren Probenanzahl sind nötig, um die Ergebnisse zu validieren und ein tieferes Verständnis der EP-Biologie zu erlangen.

Abstract

Sweat gland carcinomas are uncommon, with eccrine porocarcinoma (EP) being the most prevalent type. Its benign counterpart is the eccrine poroma (EPO), which represents a potential transitional state in EP development. Previous research has provided first in-depth insights into the genome of EP. However, only a few studies have performed molecular characterizations based on gene expression analysis. The lack of knowledge about gene expression profiles limits the understanding of EP biology, and possible targets for precision therapies. The aim of this study was therefore to gain further insights into the biology of EP by investigating tumour-specific gene expression and to uncover potential key factors that drive the malignant transition from EPO to EP.

A gene expression analysis of 23 formalin-fixed, paraffin-embedded samples of primary EP and surrounding normal skin (NH) was performed. Genome-wide transcriptome analysis by microarray was conducted in an exploratory cohort of 10 EP. The results were validated by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) in an independent cohort of 13 EPs and the results from the EP samples were tested in 17 EPO.

Transcriptome analysis demonstrated clear differences in gene expression in the 10 EPs analysed. Hierarchical clustering identified two EP tumour subtypes with distinct transcriptional differences, indicating tumour heterogeneity. In addition, widespread downregulation of genes was observed in EP compared to NH. Downregulated genes included *Cluster of Differentiation 74 (CD74)*, *N-myc-downstream-regulated-gene-1 (NDGR1)*, *Serine/Arginine Repetitive Matrix 2 (SRRM2)*, *Cell Division Control Protein 42 (CDC42)*, *Annexin A2 (ANXA2)*, *Kruppel-like Factor 9 (KFL9)* and *Ribosome Biogenesis Factor 53 (NOP53)*. *CD74*, *NDGR1*, *SRRM2*, *ANXA2* and *NOP53* showed a continuous decrease in expression from NH to EPO to EP. This provides additional evidence for the notion that EPO serves as an intermediate stage in the development of EP.

The results also suggest, that in addition to the p53 signaling pathway and the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) pathway, other mechanisms of tumour development, such as the involvement of the Vascular Endothelial Growth Factor A/- Receptor 2 (VEGFA/VEGFR2) axis and the endothelin pathway, may be relevant and offer potential approaches for therapies. More extensive studies with a larger number of samples are necessary to validate the findings and gain a deeper understanding of EP biology.

Abkürzungsverzeichnis

ABL1	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
ACTB	β-Aktin
ADPA	Aggressives digitales papilläres Adenokarzinom
ANXA2	Annexin A2
APC	Adenomatous Polyposis Coli
aRNA	Amplifizierte RNA
BCC	Basal Cell Carcinoma
CA	California
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CD117	Cluster of Differentiation 117
CD74	Cluster of Differentiation 74
CDC42	Cell Division Control Protein 42
CDH1	Cadherin 1
CDKN1A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
CDKN1B	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B
CDKN2B	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2B
cDNA	Complementary DNA
CK 19	Cytokeratin 19
cRNA	Complementary RNA
CL1EP	EP-Proben aus Cluster 1
CL2EP	EP-Proben aus Cluster 2
CL2NH	NH-Proben aus Cluster 2
Ct	Cycle Threshold
DEG	Differentially Expressed Genes
DGE	Differential Gene Expression
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTM	DNA-Methyltransferase
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMA	Epithelial Membran-Antigen
EP	Ekrines Porokarzinom
EPO	Ekrines Porom

FC	Fold Change
FHIT	Fragile Histidine Triad Protein
FFPE	Formalin-fixed, paraffin-embedded
FDR	False Discovery Rate
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HS	High Sensivity
HRAS	Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
IN	Indiana
IVT	In-vitro-Transkription
KFL9	Kruppel-like Factor 9
log₂	Logarithmus zur Basis 2
MA	Massachusetts
MAML2	Mastermind like transcriptional coactivator 2
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDM2	Murine Double Minute 2
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
MMS	Mohs Micrographic Surgery
mRNA	Messenger RNA
NDGR1	N-myc-downstream-regulated-gene-1
NGS	Next-Generation Sequencing
NH	Normale Haut
NHM	Normal Human Melanocytes
NOP53	Ribosome biogenesis factor 53
NUT	Nuclear in testis
NUTM	NUT Midline Carcinoma Family Member
P	Wahrscheinlichkeit
PAH	Pulmonale arterielle Hypertonie
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PAS	Periodic Acid-Schiff
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PI3K-AKT	Phosphatidylinositol-4,5-Biphosphat-3-Kinase Serin/Threonin-Kinase
PD1	Programmed Cell Death Protein 1
PD-L1	Programmed Death-Ligand 1

PDGFRA	Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha
PFKFB3	6-Phosphofructo-2-Kinase/Fruktose-2,6-Biphosphatase 3
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
P16	Protein 16
P53	Tumor Protein 53
RB	Retinoblastoma
RET	Rearranged during Transfection
RIN	RNA-Integritätsnummer
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
SCC	Squamous Cell Carcinoma
SRRM2	Serin/Arginin repetitive matrix 2
SLN	Sentinel lymph node
SYBR	Synthetic Bromide
TAC	Transcriptome Analysis Console
TEA	Transcriptional Enhancer Factor (TEF)-associated Domain
TEAD	TEA Domain Transcription Factor
TGF	Transforming Growth Factor
TP53	Tumor Protein 53-Gen
USA	United States of America
UV	Ultraviolett
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A
VEGFR2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
WES	Whole Exome Sequencing
WHO	World Health Organisation
WLE	Wide Local Excision
YAP1	Yes Associated Protein 1
ZPM	Zentrum für personalisierte Medizin
cm²	Quadratzentimeter
ng	Nanogramm
µm	Mikrogramm
°C	Grad Celsius
ΔCt	Delta-Cycle Threshold

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Abstract.....	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Schweißdrüsen und ihre Tumore.....	1
1.1.1 Schweißdrüsen.....	1
1.1.2 Schweißdrüsenkarzinome.....	3
1.2 Das ekkrine Porokarzinom.....	4
1.2.1 Epidemiologie.....	4
1.2.2 Klinisches Erscheinungsbild.....	4
1.2.3 Histologie.....	5
1.2.4 Immunohistochemie.....	6
1.2.5 Differentialdiagnosen.....	6
1.2.6 Prognose.....	6
1.2.7 Risikofaktoren und Pathogenese.....	7
1.2.8 Therapie.....	7
1.3 Das ekkrine Porom.....	8
1.3.1 Epidemiologie.....	9
1.3.2 Klinisches Erscheinungsbild.....	9
1.3.3 Histologie.....	9
1.3.4 Differentialdiagnosen.....	10
1.3.5 Risikofaktoren und Pathogenese.....	10
1.3.6 Therapie.....	11
1.4 Aktueller molekularer Forschungsstand zu EP und EPO.....	11
1.5 Ergänzung zur Methodik.....	13
1.5.1 Experimentelles Vorgehen.....	13
1.5.2 RNA-Isolierung.....	14
1.5.3 Transkriptom-Mikroarray.....	15
1.5.4 qPCR.....	16
1.6 Ethikvotum.....	17
1.7 Ziele der Arbeit.....	18
2 Holst et al. Gene expression profiling in porocarcinoma indicates heterogeneous tumour development and substantiates poromas as precursor lesion. <i>JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft.</i> 2024;22:1115–1124.	19
3 Diskussion.....	20
3.1 Ergebnis-Diskussion.....	20

3.1.1 Tumorheterogenität der EP-Kohorte	21
3.1.2 Herunterregulierung zahlreicher DEG in EP	24
3.1.3 EPO als potenzielles Übergangsstadium in der EP-Entwicklung.....	29
3.1.4 Dysregulation tumorrelevanter Signalwege	31
3.2 Limitationen.....	34
3.3 Schlussfolgerungen und Ausblick	35
4 Literatur- und Quellenverzeichnis.....	37
5 Danksagung	

1 Einleitung

1.1 Schweißdrüsen und ihre Tumore

1.1.1 Schweißdrüsen

Schweißdrüsen zählen neben den Haaren und Nägeln zu den Hautanhangsgebilden, den Adnexen. Sie werden in ekkrine und apokrine Drüsen unterteilt.[1, 2]

Der Mensch besitzt 1,6 bis 4 Millionen ekkrine Schweißdrüsen, die den Hauptanteil der Schweißdrüsen darstellen. Ihre Dichte ist an Händen und Fußsohlen am höchsten (600 – 700 pro cm²) und am Rücken am geringsten, etwa 60 pro cm². Sie sind fast am ganzen Körper zu finden, ausgespart sind z.B. die Lippen.[2]

Ekkrine Schweißdrüsen weisen ein sekretorisches Drüsenknäuel auf, welches sich in der tiefen Dermis an Cutis/Subcutis-Grenze befindet. Von hier steigt ein langer, sich durch die Dermis ziehender Gang auf, der teils gerade und teils geschwungen verläuft und in der Epidermis in das gewundene Akrosyngium, worüber der Schweiß nach außen abgegeben wird, mündet.[2-4] Das sekretorische Drüsenknäuel besteht aus drei verschiedenen Zelltypen, den dunklen Zellen, hellen Zellen sowie Myoepithelzellen. Die dunklen mucösen Zellen enthalten Mucingranula. Die Funktion dieser Zellen ist nicht eindeutig geklärt.[4] Die hellen Zellen sind reicher an Mitochondrien und speichern Glycogen, was im Lichtmikroskop durch periodic acid-Schiff (PAS) positive Granula erkennbar ist.[3] Die hohe Anzahl an Mitochondrien spricht für eine überwiegende Beteiligung dieser Zellen an der Schweißproduktion.[2, 4] Die Myoepithelzellen sind an der Entleerung der Endstücke durch Kontraktion beteiligt.[3] Der nach oben führende Gang weist ein zweischichtiges Epithel auf.[2] Eine luminale Kuticula hält den Gang auf. Das Akrosyngium als intraepidermaler Teil des Ganges ist gewunden und zeigt eine einsetzende Verhornung.[3]

Die Innervation der ekkrinen Schweißdrüse erfolgt sympathinerg über den Hypothalamus, wobei Acetylcholin als Neurotransmitter fungiert.[2, 4]

Der ekkrine Schweiß ist geruchslos und dient der Thermoregulation. Bei seiner Produktion im Drüsenknäuel entsteht zunächst der Primärschweiß, welcher pH-neutral ist. Durch die Reabsorption von Natrium-, Chlorid- und Hydrogencarbonat-Ionen im duktalem Drüsenabschnitt besitzt der Schweiß an der Hautoberfläche einen sauren pH-Wert zwischen 5 und 6.[1, 4]

Die apokrinen Schweißdrüsen findet man axillär und genitonal, ebenfalls gelegentlich um die Mamillen und um die Nabelregion. Erst in der Pubertät werden sie aktiviert.[1, 2, 4]

Apokrine Schweißdrüsen unterscheiden sich vor allem im Aufbau, durch die Art der Sezernierung und Innervation als auch durch die Zusammensetzung und die Bedeutung des Schweißes von den ekkrinen Schweißdrüsen. Sie zeigen eine erkennbare Sekretion der Drüsenendstücke, durch Abschnürung von Zytoplasma-Anteilen.

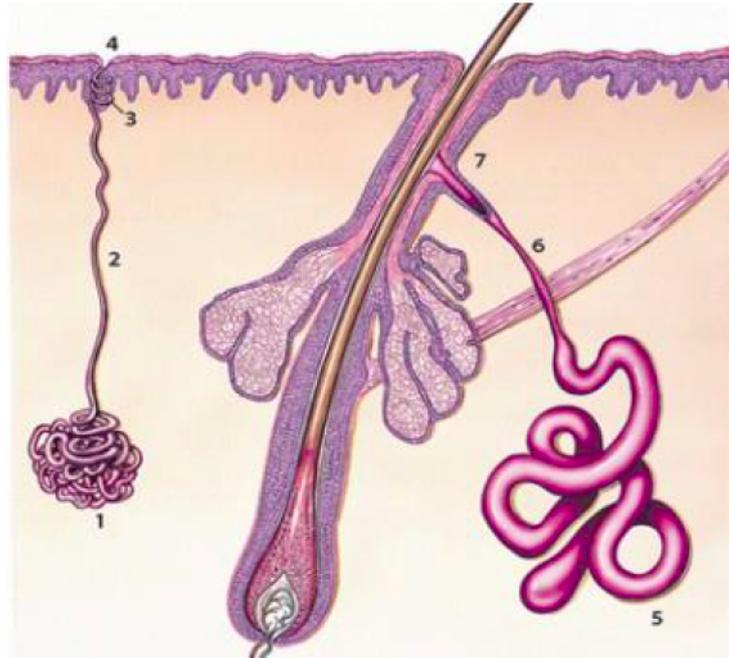


Abb. 1: Die Abbildung zeigt eine „schematische Darstellung der Schweißdrüsen in der Haut: Ekkrine Schweißdrüsenknäuel (1) münden über einen gestreckten dermalen Gang (2) und das Akrosyringium (3) an der Epidermisoberfläche (4), apokrine Schweißdrüsenknäuel (5) münden über einen kurzen Ausführungsgang (6) in den oberen Follikelabschnitt (7)".[1]

Das sekretorische Endstück weist zwei Zelltypen auf, sekretorische Zellen und Myoepithelzellen.[3, 4] Diese Drüsen enden in den Haarfollikel über den Talgdrüsen oder manchmal direkt in die Epidermis.[5] Eine schematische Darstellung der ekkrinen und apokrinen Schweißdrüsen ist in Abbildung 1 dargestellt.

Der apokrine Schweiß ist milchig und eine bakterielle Zersetzung an der Hautoberfläche führt zur Geruchsbildung. Er wird erst in der Pubertät gebildet, wenn die apokrinen Drüsen einen Entwicklungsschub erfahren.[1, 2, 4] Die freigesetzten chemischen Signale, die als Pheromone bezeichnet werden, enthalten u.a. Androgene. Sie sind wichtig für die Kommunikation und das Paarungsverhalten vieler Säugetiere, können jedoch aber auch Gefahr kommunizieren.[1] Die Innervation der apokrinen Schweißdrüsen erfolgt auch über den Sympathikus, jedoch adrenerg über Adrenalin und Noradrenalin.[4]

In der Axillarregion und anogenital können Mischformen, so genannte apoekkrine Schweißdrüsen auftreten, welche sowohl apokrine als auch ekkrine Eigenschaften aufweisen.[2, 6]

1.1.2 Schweißdrüsenkarzinome

Bösartige Schweißdrüsentumore sind eine vielfältige Gruppe der seltenen kutanen Adnex-Tumore, die sich in ihrem klinischen Verlauf und hinsichtlich der Prognose voneinander abgrenzen.[7, 8] Sie zählen zu den niedrig malignen Tumoren. Bei nicht ausreichender Exzision ist von einem hohen Rezidiv-Risiko auszugehen.[9]

Diagnostisch stellen diese Adnex-Tumore eine große Herausforderung dar. Dies liegt an der großen Anzahl an seltenen Entitäten, der verschiedenen Bezeichnungen für ein und dieselben Neoplasmen und ähnlichen histologischen Eigenschaften.[8, 10, 11] Die Abgrenzung der Schweißdrüsenkarzinome von viszeralen Metastasen wie z.B. eines Adenokarzinoms gestaltet sich oft schwierig.[8, 10]

Zu den eindeutig definierten Entitäten mit typischem klinischem Verlauf zählen neben dem Porokarzinom, auch das mikrozystische Adnexkarzinom, das muzinöse ekkrine Karzinom, das aggressive digitale papilläre Adenokarzinom (ADPA), das adenoidzystische Karzinom sowie Spiradeno-, Zylindro- und Hidradenokarzinom.[8]

Wie die Schweißdrüsen wurden auch die Schweißdrüsentumore klassischerweise in die Gruppen apokrin und ekkrin eingeteilt. Es hat sich jedoch gezeigt, dass diese Neoplasien sowohl apokrine als auch ekkrine Anteile aufzeigen können, was die traditionelle Einteilung herausfordert.[5, 11]

Schweißdrüsentumore können in einigen Fällen aus bestehenden gutartigen Äquivalenz-Tumoren entstehen. So kann aus einem Porom ein Porokarzinom oder einem Hidradenom zu einem Hidradenokarzinom evolvieren.[7, 10] Auf eine potenzielle Entwicklung vom Porom zum Porokarzinom wird im weiteren Verlauf eingegangen. Für manche Schweißdrüsenkarzinome wie das primär kutane muzinöse Karzinom und das ADPA sind keine benignen Vorläuferläsionen bislang beschrieben worden.[7, 10]

Eine Kenntnis des histologischen Aufbaus ist daher besonders wichtig, um eine Entwicklung zu einem bösartigen Schweißdrüsentumor zu detektieren. Folgende Malignitätskriterien sind bei bösartigen Schweißdrüsentumoren zu nennen: Zellatypien, Mitosen, Nekrosen, ein infiltrierendes Wachstumsmuster mit perineuraler und lymphatischer Invasion.[5]

1.2 Das ekkrine Porokarzinom

Das Porokarzinom ist die häufigste Form bösartiger Schweißdrüsentumore.[5, 8, 12, 13] Es wurde erstmalig im Jahre 1963 von Pinkus und Mehregan als epidermotropes ekkrines Karzinom dokumentiert.[14] Der Terminus „ekkrines Porokarzinom“ (EP) wurde im Jahre 1969 von Mishima und Morioka eingeführt.[15]

EP entsprechen einem Anteil von circa 0,005%-0,01% aller kutanen epithelialen Tumore.[13, 16]

Mit dem Begriff „ekkrines Porokarzinom" wurde dieses Schweißdrüsenkarzinom 2018 in die Klassifikation der Hauttumore der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aufgenommen.[17]

1.2.1 Epidemiologie

Die klinisch vielgestaltigen EP treten vor allem bei älteren Patienten auf. So weisen systematische Übersichtsarbeiten Mediane im Bereich der siebten und achten Lebensdekade auf.[16, 18-20] Einige wenige Fälle wurden auch bei Kindern beschrieben, so bei einem 12-jährigen Patienten, der an Xeroderma pigmentosum litt.[21]

Beide Geschlechter scheinen gleichermaßen betroffen zu sein.[16, 22]

Wie das Geschlechterverhältnis, so unterscheidet sich auch die Inzidenzrate in verschiedenen Studien. Sie liegt bei etwa 0,02 - 0,2 pro 100.000 Personenjahre.[23] Eine finnische Studie kam für die Jahre von 2007 bis 2017 für Männer auf eine Inzidenz von 0,04 für Frauen und 0,06 für Männer.[24] Eine in Ostengland zwischen 2004 und 2014 durchgeführte Studie wies mit 1,3 für Männer und 2,4 für Frauen deutlich höhere Inzidenzraten für das EP aus.[25]

1.2.2 Klinisches Erscheinungsbild

EP treten am häufigsten in Bereichen mit geringer Schweißdrüsendichte auf, z. B. an den unteren Extremitäten, gefolgt von Kopf und Hals.[16, 22] Salih et al. ermittelten in ihrer Metaanalyse zu 453 Fällen von EP eine Manifestation im Kopf-Hals-Bereich zu 39,9% und im Bereich der unteren Extremitäten zu 33,9%.[20] Im Rahmen ihrer Untersuchung von 69 Fällen berichteten Robson et al, dass mit 44% der Fälle die unteren Extremitäten am häufigsten betroffen waren.[18] EP können jedoch auch an den oberen Extremitäten, am Rücken, an der Brustwand, am Bauch oder im Genitalbereich auftreten.[20, 26, 27]

Hinsichtlich des klinischen Erscheinungsbildes zeigt sich große Variabilität. Das EP präsentiert sich meist als asymptomatischer, schmerzloser und solitärer Knoten, der aber auch Ulzerieren und Schmerzen verursachen kann.[13, 18, 20, 22] Neben den beiden letzteren Symptomen sind Juckreiz, spontane Blutungen sowie ein schnelles Wachstum mögliche Hinweise auf eine maligne Transformation.[27] Die Knoten sind erythematös bis violett gefärbt und zeigen eine Größe von etwa 0,4 cm bis 2 cm, wie Robson et al. zeigten. Invasive EP sind durchschnittlich 2 cm groß.[18] Das Karzinom kann sich auch als warzenähnlicher Plaque oder durch Pigmentanreicherung als Naevus präsentieren.[7, 20] Eine fortgeschrittene Tumorerkrankung erkennt man oft an einem Lymphödem und epidermotropen Metastasen.[5, 8]

Es werden Assoziationen mit dem extramammären M. Paget und weiteren Erkrankungen wie der Sarkoidose, chronischen lymphatischen Leukämie, perniziöser Anämie, Morbus Hodgkin, Naevus Sabaesus, HIV und Xeroderma Pigmentosum beschrieben.[27]

1.2.3 Histologie

Die histologische Begutachtung liefert die Grundlage für die Diagnosestellung.[13] Histologisch handelt es sich um einen bösartigen Tumor, der vom intraepidermalen Anteil der oberen Schweißdrüsenausführungsgänge, dem Akrosyngium ausgeht.[15] Er besteht aus poroiden Zellverbänden mit einer dukalen Differenzierung, welche Komedonekrosen, Zellatypien, Mitosen und Verbindungen zur Epidermis aufzeigen können.[8, 18, 28] Auch bei oberflächlicher Tumoreindringtiefe kann eine Lymphgefäßinvasion in Tumorumgebung sichtbar sein.[8, 18] Insgesamt zeigt sich ein nukleärer Pleomorphismus.[18] Es ist möglich, dass das EP ausschließlich intraepidermal als Carcinoma in situ oder z. B. neben einem Porom auftritt.[7, 8, 18, 28] Sekundär kann eine Verdickung der Epidermis sichtbar sein.[27] Neben den zuvor beschriebenen typischen histologischen Mustern kann eine klare, spindelförmige, muzinöse oder squamöse Zelldifferenzierung vorhanden sein oder auch eine Kolonisierung mit Melanozyten.[8, 18, 28]

Differentialdiagnostisch sollte das EP vor allem vom Plattenepithelkarzinom abgegrenzt werden, insbesondere das intraepitheliale Porokarzinom vom Squamos Cell Carcinoma (SCC) *in situ* (Morbus Bowen) oder auch vom gutartigen Porom.[5, 18]

Die histologischen Merkmale des EP werden in Abbildung 1e-h der Publikation von Holst et al. dargestellt und erläutert.[13]

1.2.4 Immunohistochemie

Immunohistochemische Eigenschaften können die Diagnosestellung unterstützen. Um die duktaalen Strukturen der bösartigen Tumore aufzudecken, wird z. B. die immunhistochemische Färbung für Carcinoembryonales Antigen (CEA) und Epithelial Membran-Antigen (EMA) verwendet.[18] Studien zeigen für das EP für EMA eine höhere Positivrate.[28, 29] Das Problem ist jedoch, dass auch die ekkrinen Gänge von SCC durch diese Tests nachgewiesen werden, sodass allein durch die Verwendung dieser Marker eine Diagnose des EP nicht möglich scheint.[30] Clusters of Differentiation 117 (CD117) und Cytokeratin 19 (CK 19) könnten hier eine Unterscheidung ermöglichen, da EP sich bezüglich dieser Marker häufiger positiv zeigen als SCC.[31, 32]

Die immunhistochemische abnormale Expression von Tumorprotein 53 (p53), Retinoblastom-Protein (RB), cyclinabhängiger Kinaseinhibitor 2A (p16) und wahrscheinlich auch von Nuclear in Testis (NUT) könnte zudem auf ein EP hinweisen und damit die Diagnose sichern (Vergleiche 1.4).[33-35]

1.2.5 Differentialdiagnosen

Mögliche Differentialdiagnosen sind zahlreich. So kann das EP z. B. als SCC, Basalzellkarzinom (BCC), Morbus Paget, pyogenes Granulom, amelanotisches Melanom, seborrhöische Keratose, Morbus Bowen, Fibrom, Verruca vulgaris oder metastatisches Adenokarzinom fehldiagnostiziert werden.[18, 27]

1.2.6 Prognose

Ebenso wie die Inzidenzen unterscheiden sich auch die Überlebensraten in den verschiedenen Studien. In frühen Stadien scheint die Prognose gut. Nicht immer enthalten die Studien alle nötigen Daten zum *Follow-up*. [20]

Die meisten Studien berichten über eine Lymphknoten-Metastasierung in ca. 20 % der Fälle. Zudem ergab sich nach Resektion für Lokalrezidive dieselbe Prozentzahl. Organmetastasen zeigten sich in 10% der Fälle.[18, 36] Salih et al. beobachteten in ihrer großen Studie mit 453 Fällen im Jahr 2017 sogar eine Metastasierungsrate von 31 %, wobei die Lymphknotenbeteiligung bei 57,7% lag.[20] Als zweithäufigster Ort wurde mit 12,8% die Lunge angegeben.

Andere Metastasierungsorte sind Leber, Gehirn, Haut, Knochen, Brust oder der Gastrointestinaltrakt sowie disseminierte Metastasierung.[20]

Scampa et al. kamen im Rahmen ihrer Studie zu 563 Fällen von EP der Kopf-Hals-Region auf eine Gesamtüberlebensrate nach 5 Jahren von 74,8 %, wobei die Prognose bei fortgeschrittenen Krankheitsstadien und Metastasierung schlecht war.[37] Autoren einer finnischen Studie, die die Informationen zu 69 Fällen von 2007 bis 2017 auswerteten, stellten fest, dass die 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit EP nicht schlechter war als die der übrigen Bevölkerung im selben Alter.[24] Bei Lymphknotenbeteiligung berichteten Robson et al. über Mortalitätsraten von bis zu 65 %.[18] Neben lymphvaskulärer Invasion sind eine Eindringtiefe ab 7 mm und eine hohe Anzahl an Mitosen mit einem schlechteren Outcome verbunden.[18]

1.2.7 Risikofaktoren und Pathogenese

Die Pathogenese des EP ist nicht eindeutig bekannt. Dieser Karzinomtyp kann de novo entstehen, sich aber auch aus bestehenden gutartigen Poromen entwickeln.[8] Robson et al. zeigten, dass 18% der EP auf Boden eines EPO entstanden sind.[18] In der Studie von Shaw et al. wiesen sogar alle 27 Patienten mit einem EP ein begleitendes EPO auf.[38]

Als weitere Risikofaktoren sind Immunsuppression und UV-Exposition anzusehen. So berichteten u. a. Mahomed et al. über fünf Fälle von EP bei immunsupprimierten Patienten.[39] Studienautoren stellten den Zusammenhang zur UV-Exposition her, da die betroffenen Stellen (Kopf, Hals und Extremitäten) häufig erhöhter UV-Exposition ausgesetzt waren.[20]

Puttonen et al. entdeckten im Rahmen ihrer Studien, dass UV-Strahlung eine immunsuppressive Wirkung auf die Tumormikroumgebung sowohl beim EP als auch beim EPO hat.[40]

Ein Überblick über die aktuelle Studienlage zu möglichen molekularen Mechanismen der Tumorgenese wird unter 1.4 gegeben.

1.2.8 Therapie

Die chirurgische Exzision steht im Vordergrund. Das am häufigsten angewendete Verfahren ist die weite lokale Exzision (WLE) mit mindestens 2 mm-Sicherheitsabstand, wobei zunehmend auch Mohs-Micrographic-Surgery (MMS) durchgeführt wird.[16, 19, 41] MMS ist eine gewebeschonende Technik der Hautkrebsentfernung. Sie ermöglicht die präzise Kontrolle des gesamten Tumorrandes, wobei die Erhaltung des gesunden Gewebes maximal ist.[42]

Eine Indikation für eine Sentinel-Lymphknoten (SLN)-Exstirpation besteht bei größeren und prognostisch ungünstig gewerteten Tumoren mit Lymphinvasion.[8]

Tsunoda et al. untersuchten den Nutzen einer SLN-Biopsie in einer Kohorte von 13 Patienten mit EP und fanden eine SLN-Metastasierung in 37,5%. Die Autoren stellen auf der Basis dieser Zahlen und der Tatsache, dass der lymphatische Weg der Hauptmetastasierungsweg ist, die Bedeutung der SLN-Biopsie für das Gesamtüberleben heraus.[43]

Chemo- und Radiotherapie werden bei Metastasierung und Rezidiven empfohlen, es gibt jedoch keine adäquaten Schemata oder Leitlinientherapien.[20, 27]

Myamoto et al. stellten die Daten für 28 Fälle, die mit Chemotherapeutika behandelt wurden, aus der Literatur zusammen und stellten fest, dass 60% der Patienten mit platinhaltigen Wirkstoffen behandelt wurden. Aufgrund ihrer Daten, dass nur 31,3 % der mit Carboplatin oder Cisplatin behandelten Patienten eine therapeutische Antwort zeigten, leiteten sie eine relative Resistenz des EP gegenüber cytotoxischen Medikamenten ab.[23]

Als weitere systemische Therapie zeigte der Einsatz des gegen EGFR gerichteten monoklonalen Antikörpers Cetuximab in Einzelfällen bei metastasiertem EP einen Erfolg.[44, 45] Singh et al. berichten über eine Remission verbunden mit der Gabe von Pembrolizumab. Dieser monoklonale Antikörper gehört zu den Programmed Death receptor 1 (PD1)-Inhibitoren.[46] Zu diesen Inhibitoren zählt auch Nivolumab, welches bei einem Patienten mit metastasiertem EP zu einer Stabilisierung führte.[44]

1.3 Das ekkrine Porom

Von den primären Hauttumoren betreffen etwa 1 % die Schweißdrüsen, wobei Porome etwa 10 % dieser Fälle ausmachen.[22] Das ekkrine Porom zählt zu den gutartigen Adnexneoplasien, die aus dem intraepidermalen Teil des Schweißdrüsengangs, dem Akrosyringium, stammen. Sie wurden erstmals von Goldmann und Pinkus et al. im Jahr 1956 als poroid differenzierte Epitheliome mit ekkrinem Ursprung beschrieben.[47] Porome gehören zu den ekkrinen Tumoren. In seltenen Fällen können sie apokrine, plattenepitheliale oder follikuläre Eigenschaften aufweisen.[48]

Man unterscheidet beim Porom vier verschiedene Formen, die sich anhand der Zelltypen und der Lage unterscheiden: Ekkrines Porom, Poroides Hidradenom, Hydroacanthoma simplex und

der dermale Gangtumor.[9, 49, 50] Alle vier Begriffe wurden als Synonyme 2006 von der WHO unter dem Terminus Poroma zusammengefasst.[49]

Das Hydroacanthoma simplex ist eine reine intraepitheliale Form des Poroms. Als Weiteres gibt es den so genannten dermalen Gangtumor, erstmalig von Winkelmann und McLeod 1966 beschrieben, welcher in der Dermis liegt und aus verschiedenen großen poroiden Zellverbänden besteht, die an manchen Stellen eine Verbindung zur Epidermis aufzeigen. Größere knotige, teils zystische Tumore werden als Poroides Hidradenom beschrieben. Es liegt isoliert in der Dermis und besteht aus kapsellosen, poroiden Zellen mit wenigen Gangstrukturen.[5, 9]

Im Rahmen dieser Dissertation werde ich mich ausschließlich auf den Terminus des ekkrinen Poroms beziehen (EPO). Auf die histologischen Kennzeichen des EPO wird im Kapitel 1.3.3 eingegangen.

1.3.1 Epidemiologie

Männer und Frauen sind gleichermaßen betroffen. Es scheint keine Präferenz für Ethnizität oder Geschlecht zu geben. EPO können in jedem Alter und kongenital auftreten, sind meist jedoch erst bei Erwachsenen zu finden.[22, 51, 52]

1.3.2 Klinisches Erscheinungsbild

Es tritt am häufigsten an den Akren, insbesondere den Handinnenflächen und Fußsohlen auf.[47] Ein Auftreten an anderen Hautstellen z. B. in der Kopf-Hals-Region, am Körperstamm und restlichen Extremitäten ist möglich.[49]

Das EPO zeigt sich oft als langsam wachsende, asymptomatische solitäre Papel, Plaque oder Knoten.[22] Farblich wird es meistens als rötlich, jedoch auch als hautfarben oder sogar blau beschrieben.[49] Seine Oberflächenbeschaffenheit variiert von weich bis warzenartig oder schuppig und in seltenen Fällen kann es ulzerieren sowie Schmerzen oder Juckreiz auslösen.[22, 53]

1.3.3 Histologie

Histologisch definiert sich das EPO durch kleine, quaderförmige Keratinozyten mit monomorphem und hyperchromatischen Zellkernen. Sie besitzen ein eosinophiles, glykogenreiches

(PAS-Positives) Zytoplasma.[5, 22] Diese poroiden Zellen bilden Epithelproliferate, die sich von der Epidermis abgrenzen und bis in die Dermis ziehen können. Innerhalb der Tumorverbände findet man intra- und interzelluläre Vakuolen sowie rudimentäre Gangstrukturen als Hinweise auf rudimentäre Gangstrukturen.[5]

Porome können theoretisch Merkmale von malignen Neoplasien aufweisen, wie verschiedene mitotische Figuren, ein ausgeprägt vaskularisiertes Stroma und Nekrosen.[22] Diese „*Necrosis en masse*“ ist jedoch als geordnete Form der Apoptose und nicht als Tumornekrose zu interpretieren.[5, 22] Die Abbildung 1 a-d in der Publikation von Holst et al. illustriert die histologischen Besonderheiten von EPO.[13]

1.3.4 Differentialdiagnosen

Differentialdiagnostisch kommen z. B. ein pyogenes Granulom, seborrhöische Keratosen, Cilyndrom, Hidradenom oder ein BCC in Frage.[22] Eine dermatoskopische Abgrenzung fällt wie beim EP oft schwer und die Diagnose sollte somit histopathologisch gesichert werden.[54, 55] Die Möglichkeit einer malignen Transformation zum EP sollte in die Differentialdiagnose miteinbezogen werden.[56] Insbesondere ein Ulzerieren, Blutungen, Schmerzen oder akzele-riertes Wachstum sind Gründe ein EP näher in Betracht zu ziehen.[22, 41]

1.3.5 Risikofaktoren und Pathogenese

Die genaue Ätiologie des EPO ist unbekannt. Bestrahlung wird als eine mögliche Ursache für das Auftreten von EPO beschrieben.[57] In der Literatur wird von Fällen einer so genannten Poromatose (dem gehäuften Auftreten von EPO) nach Chemo- und Strahlentherapie berichtet.[58]

Wie auch beim EP kann eine UV-Exposition eine immunsuppressive Wirkung auf die EPO-Mikroumgebung haben und stellt somit ein Risiko für die Entwicklung dar. Ebenso wurden neu aufgetretene EPO bei Schwangeren erstdiagnostiziert.[59]

Der aktuelle Forschungsstand zur molekularen Pathogenese von EPO wird unter 1.4 dargestellt.

1.3.6 Therapie

Die Standardtherapie des EPO besteht in der kurativen chirurgischen Exzision oder elektrochirurgischen Destruktion bei oberflächlicheren Läsionen.[22] Eine alternative Therapie bei der Poromatose stellt Imiquimod dar.[58]

Obwohl es sich um eine gutartige Neoplasie handelt, sind vereinzelt über Rezidive, trotz vorheriger Exzision, in der Literatur berichtet worden.[60-62] Im Vergleich zum EP sind Rezidive beim gutartigen EPO jedoch selten.[22]

1.4 Aktueller molekularer Forschungsstand zu EP und EPO

Zu den molekularen Entstehungsmechanismen sind nur wenige Studien durchgeführt worden, und die Tumorbilogie ist weiterhin recht unklar. Wahrscheinlich wird die Entstehung des EP von somatischen Mutationen vorangetrieben.[13, 27, 63, 64]

Im Folgenden soll ein Überblick über die aktuelle Studienlage zu den molekularen Ursachen von EP und EPO gegeben werden.

Denisova et al. identifizierten in einer Ganz-Exom-Sequenzierung (WES) von 14 primären EP eine hohe Gesamtmutationslast, welche in Zusammenhang mit UV-Exposition, der *Apolipoprotein B mRNA Editing Catalytic Polypeptide like*-Enzymdysregulation und defekter homologer Doppelstrangbruchreparatur stand. Ein gestörter DNA-Reparaturmechanismus und eine Beeinflussung des p53-Signalweges scheinen eine signifikante Rolle bei der EP-Ätiologie zu spielen. Eine gezielte Beeinflussung der p53-Achse, eine Inhibition der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) oder eine Immuntherapie könnten potenziell erfolgversprechende Therapieansätze bieten.[13, 63]

Im Rahmen ihrer Untersuchung eines metastasierten EP führten Westphal et al. ein genomisches und transkriptomisches *Profiling* an einem metastasierten EP durch. Ihre Ergebnisse zeigten eine Signalweg-Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) und der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) in den EP-Metastasen. Durch eine EGFR-gerichtete Therapie und Immun-Checkpoint-Inhibition konnte die fortgeschrittene Erkrankung des Patienten mit metastasiertem EP über mehr als zwei Jahre stabilisiert und eine Progression verhindert werden.[13, 44] Auch Comito et al. wiesen *EGFR*-Überexpression für ein

metastasiertes EP nach. Sie konnten zeigen, dass eine Therapie mit Cetuximab ein erfolgversprechender Ansatz war.[13, 65]

Thibodeau et al. führten in ihrer Studie zu einem metastasierten EP eine umfassende Genom- sowie Transkriptom-Analyse durch und entdeckten dabei zahlreiche genetische Veränderungen, darunter einen Kopienverlust für die Tumorsuppressorgene *Adenomat Polyposis coli (APC)*, *Phosphatase und Tensin-Homolog (PTEN)* und *cyclinabhängiger Kinaseinhibitor 1A (CDKN1A)*, *cyclinabhängiger Kinaseinhibitor 2A (CDKN2A)*, *cyclinabhängiger Kinaseinhibitor 2B (CDKN2B)* und eine verstärkte Expression für die Gene für *Kirsten-RAS (KRAS)*, *EGFR* und *Neurogenes Lokus Notch-Homolog-Protein 1 (NOTCH1)*. [66]

Bosic et al. präsentierten 2018 eine Untersuchung von sechs EPO und sechs EP auf Mutationen in 50 krebsrelevanten Genen mittels *Next Generation Sequencing (NGS)*. Während die EPO nur wenige Mutationen aufwiesen, zeigten die EP bis zu sechs Mutationen pro Fall, wobei Tumorprotein 53 (*TP53*)-Mutationen immer dabei waren. Somit wiesen EP eine größere genetische Heterogenität mit bis zu sechs mutierten Genen pro Fall auf. Während *TP53*-Mutationen in allen EP auftraten, fanden sie vereinzelt Mutationen in Tumorsuppressorgenen, nämlich in *Retinoblastoma 1 (RB1)*, *APC*, *CDKN2A* und *PTEN*. Zusätzlich zeigten am Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat-3-Kinase-Serin/Threonin-Kinase (PI3K-AKT) - und MAPK-Signalweg beteiligte Gene wie *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 (ABL1)*, *Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha (PDGFRA)*, *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha (PIK3CA)*, *Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog (HRAS)* und *Rearranged during Transfection (RET)*-Mutationen. Auch sie fanden im Rahmen ihrer Untersuchungen UV-assoziierte Mutationen, und zwar bei *TP53*, *APC*, *CDKN2A*, *PTEN* und *RET*. [67]

Harms et al. schlugen 2016 nach ihrer Untersuchung von fünf EP auf Mutationsereignisse in 126 krebsrelevanten Genen mittels Next-Generation-Sequenzierung *HRAS* und *EGFR*-Veränderungen ebenso wie die Inaktivierung von *TP53* und *RB1* als mögliche onkogene Treiber vor. [64]

Bislang wurden nur wenige genetische Studien über EPO durchgeführt. Die oben schon erwähnten Studien von Bosic et al. zeigten, dass EP eine höhere Mutationslast und häufiger rezidivierende *TP53*-Mutationen aufwiesen als EPO. [67] In früheren Studien wurde zudem darauf hingewiesen, dass der Verlust von Tumorsuppressoren, insbesondere in Bezug auf *TP53*, das Fortschreiten von EPO zu EP fördern könnte. [68]

Zahn et al. wiesen über immunhistochemische Färbungsmuster nach, dass eine veränderte Expression von p53, p16 und/oder Retinoblastom-Protein (RB) relativ spezifisch für EP im Vergleich zu EPO ist.[34]

Sowohl bei EPO als auch bei EP wurden in Untersuchungen Genfusionen gefunden, z. B. zwischen *Yes-associated protein 1* und *Mastermind-like transcriptional coactivator 2 (YAP1-MAML2)* oder *YAP1* und *NUT-Midline Carcinoma Family Member (YAP1-NUTM)*. Diese Funde untermauern die Hypothese, dass spezifische onkogene Triebkräfte eine wichtige Rolle bei der Tumorigenese spielen und wahrscheinlich die Umwandlung von EPO in EP fördern.[35, 62] In ihrer Studie haben Sekine et al. 104 EPO und 11 EP per RNA-Sequenzierung untersucht und dabei in 92 EPO und 7 EP *YAP1*-Fusionen gefunden, die deren histogenetische Beziehung unterstreicht und die These unterstützt, dass sich ein signifikanter Anteil von EPO durch maligne Transformation zum EP entwickelt. Sie konnten allerdings *TP53*-Mutationen auch in EPO nachweisen, woraus geschlossen wurde, dass sich diese Mutationen nicht eignen, gutartige von bösartigen Neoplasmen zu unterscheiden.[62]

Tormo-Mainar et al. bestätigen eine *YAP1-NUTM*-Genfusion bei einem Fall mit sehr späten Metastasen und sehen hier ein großes Potential für Diagnostik und Therapie.[33]

1.5 Ergänzung zur Methodik

An dieser Stelle werden zusätzliche Hinweise zur Methodik ergänzt, die im zitierten Artikel aufgrund der begrenzten Wortanzahl nicht ausführlich behandelt werden konnten.[13]

Es sei darauf hingewiesen, dass im Artikel auf eine andere Arbeit von Surowy et al. verwiesen wird, die aus dem Institut für Humangenetik Düsseldorf stammt und vergleichbare Methoden im Zusammenhang mit der Genexpressionsanalyse von ADPA verwendet hat.[13, 69]

1.5.1 Experimentelles Vorgehen

Die Genexpressionsanalyse in der Explorationskohorte wurde mittels *Microarray* durchgeführt. Die Validierung der Kandidatengene erfolgte in einer unabhängigen Kohorte im Rahmen einer quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) in Echtzeit.

Die Genexpressionsanalyse umfasste das gesamte Transkriptom. Unter einem Transkriptom versteht man die Gesamtheit aller RNA-Moleküle, die zu einem bestimmten Zeitpunkt aus dem Genom einer Zelle transkribiert werden.[70]

Das Transkriptomprofil spiegelt somit die Genaktivität wider und kann als Momentaufnahme des Zellzustands betrachtet werden. Neben Informationen zur Genfunktion sind hierin auch Details zur Genomplastizität, zur Genexpressionsregulation und zu Modifikationen einzelner Transkripte enthalten. Die Transkriptionsanalyse hat die Präzisionsonkologie entscheidend vorangetrieben.[71]

Die *Microarray*-Technologie ist ein hybridisierungsbasierter Untersuchungsansatz. Sie ermöglicht eine genomweite Genexpressionsanalyse für eine Probe in nur einem Experiment. Sie ist für die Krebsforschung und Diagnosestellung von großer Bedeutung.[72]

Diese Kopplung von *Microarray* und qPCR ist in Genexpressionsstudien ein Goldstandard. Bei passender Filterung liefern die Daten aus beiden Verfahren vergleichbare Ergebnisse.[73]

Die qPCR ermöglicht die Bestimmung der absoluten und relativen Quantifizierung der Expression für die Kandidatengene.[74]

1.5.2 RNA-Isolierung

Im Rahmen der Mikrodissektion wurden aus den formalin-fixiertes paraffineingebetteten Gewebe (FFPE)-Blöcken mithilfe des Mikrotoms Schnitte angefertigt, die eine Dicke von 10 µm aufwiesen. Anschließend wurden die Gewebebereiche mit einem Skalpell fein separiert, um das Tumorgewebe vom umgebenden Normalgewebe zu isolieren und homogenes Material zu erhalten. Die histologische Abgrenzung zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe erfolgte vorab durch eine gründliche mikroskopische Begutachtung.

Die Entparaffinierung und RNA-Isolierung wurde gemäß den Methoden von Surowy et al.,[13, 69] unter Verwendung des FormaPure DNA-Kits (Beckman Coulter Life Science, Indianapolis, IN, USA) durchgeführt. Dies erfolgte entsprechend dem Protokoll zur Isolierung von Gesamtnukleinsäuren (DNA/RNA) aus FFPE-Gewebe mit dem FormaPure DNA-Kit. Die Gewebelysetemperatur und Inkubationszeit wurde entsprechend den Literaturempfehlungen für FFPE-Gewebe weiter angepasst (vergleiche Limitationen 3.2).

1.5.3 Transkriptom-Mikroarray

Nachdem die RNA-Proben durch ein fluorometrischen Assays (Qubit, RNA HS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) und mithilfe der UV-Absorption (Nanodrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) quantifiziert wurden, erfolgte zudem eine Messung der RNA-Qualität mittels der RNA-Integritätsnummer (RIN) (Agilent 4200 Bioanalyzer, Agilent RNA ScreenTape Assay, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

In der EP-Kohorte wurde von 10 Proben mit umgebendem Normalgewebe eine Transkriptomanalyse mittels *Microarray* durchgeführt, wie in Surowy et al. beschrieben.[69]

Die Weiterverarbeitung der RNA erfolgte gemäß den Herstelleranweisungen des GeneChip 3' IVT Pico Kits (GeneChip 3' IVT Pico Kit 703308 Rev 1; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Zunächst erfolgte die cDNA-Synthese, in der 50 ng Gesamt-RNA in cDNA umgewandelt und anschließend voramplifiziert wurden, wobei acht Zyklen verwendet wurden. Anschließend erfolgte die In-vitro-Transkription und die Biotin-Markierung der amplifizierten RNA (aRNA). Als nächster Schritt wurde die markierte aRNA fragmentiert und anschließend auf den *Arrays* (Affymetrix PrimeView Human Gene Expression Microarrays, hergestellt von Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) hybridisiert über einen Zeitraum von 16 Stunden und bei einer Temperatur von 45 °C. Anschließend wurden die *Arrays* mit einer Verbindung aus Streptavidin und Phycoerythrin gefärbt und gemäß den Herstelleranweisungen gescannt.[69]

Die *Mikroarray*-Daten, die in der Sondierungskohorte generiert wurden, wurden mit der Software Transcriptome Analysis Console (TAC) (Version 4.0.1, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) analysiert. Die anfängliche Clusterbildung wurde mit *Mikroarray*-Sonden durchgeführt, die einen *False Discovery Rate* (FDR)-korrigierten p (Wahrscheinlichkeit)-Wert von $< 0,05$ für eine differentielle Genexpression (DGE) zwischen EP- und Normaler Haut (NH)-Proben zeigten. Für den Vergleich der DGE von Transkriptom-Array-Daten aus EP- und NH-Proben wurden folgende Auswahlkriterien für die Sonden angewendet: *Fold Changes* (FC) ≤ -2 oder ≥ 2 mit einer Standardabweichung von ≤ 1 sowohl in EP- als auch in NH-Proben; und ein FDR-korrigierter p-Wert für eine DGE von $\leq 0,001$.

Die Clusteranalyse ordnete die Proben basierend auf ihren Expressionsprofilen in Gruppen und führte zu vier verschiedenen Arten von Vergleichen der DGE. Eine ausführliche Beschreibung dieses Vorgehens und der resultierenden Vergleiche findet sich in der Arbeit von Holst et al.[13]

Für alle Vergleiche wurden Listen von differentiell exprimierten Genen (DEG), *Cluster Plots* und *Volcano Plots* exportiert, die mit den *Tools* der TAC erstellt wurden.

Ergänzend wurden Clusterdendrogramme mit der 'hclust'-Funktion und *Heatmaps* für die einzelnen Vergleiche mit dem Paket 'gplots' und der Funktion 'heatmap2()' in dem Programm R-Studio generiert.[69, 75]

Für die Signalweganalyse wurde die TAC verwendet, welche auf Wikipaths als Ressource zurückgreift.

1.5.4 qPCR

Zur Auswahl von Genen für die Validierung mit qPCR wurden folgende Kriterien angewandt: mehrere Sonden pro Gen, die signifikante FC-Werte wie oben beschrieben aufweisen, und keine Sonden mit signifikanten oder unbedeutenden konträren FC-Wert. Um die große Anzahl der verbleibenden Gene für die Vergleiche 3 (CL1EP-C2EP) und 4 (CL1EP-CL2NH) zu stratifizieren, wurden Gene mit Sonden ausgewählt, die die 20 größten absoluten FC-Werte aufwiesen, und der Schwellenwert-FC aller einem Gen entsprechenden Sonden wurde auf mindestens ≤ -5 oder ≥ 5 eingestellt. Es wurden nur proteinkodierende Gene mit Ausnahme von Geruchsrezeptorgen berücksichtigt. Dies ergab insgesamt 23 Kandidatengene für die qPCR-Validierung, die in der Tabelle 1 des *Online Supplement* der Veröffentlichung aufgeführt sind.[13] Primer-Design für die qPCR war erfolgreich für 19 der ausgewählten 23 Gene. Diese Gene wurden nach erfolgreichem Primer Design mittels qPCR validiert, wie in Surowy et al. beschrieben.[69]

β -Actin (ACTB) wurde als interne Referenz verwendet. Bei der Primer-Erstellung wurde darauf geachtet, dass die Exon-Exon-Grenzen des Target Gens durch die Primer Sequenzen überlappt werden, um zu garantieren, dass wir nur mRNA als späteres Amplifikationsprodukt erhalten.

Das AccuScript High Fidelity First Strand cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers für die reverse Transkription von RNA verwendet unter Hinzunahme von zufälligen Hexamer-Primern. Für die cDNA-Generierung wurden 500 ng RNA in einem Gesamtvolumen von 20 μ l gelöst.[69]

Der Power SYBR Green Master Mix (von Life Technologies, ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) wurde gemäß den Herstelleranweisungen für die Durchführung der qPCR verwendet.[69] Dieser Power SYBR Green Farbstoff lagert sich in der Doppelstrang-DNA als

interkalierender Farbstoff an. Die gemessene Fluoreszenzintensität entspricht der amplifizierten Nukleinsäuremenge.

Jede Probe wurde dreifach bezüglich sowohl für positive als auch negative Kontrollen auf 384-Well-Platten auf dem Viiia7-System (Life Technologies, ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) amplifiziert. Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: zunächst 95 °C für 10 Minuten, gefolgt von 45 Zyklen à 30 Sekunden bei 95 °C, 60 °C und 72 °C. Für jedes Triplikate wurden Mittelwerte der *Cycle Threshold* (Ct)-Werte berechnet. Wenn ein Gen in der normalen Haut nicht exprimiert wurde, d.h. Ct-Wert > 40, aber in der entsprechenden Tumorprobe eindeutig exprimiert wurde, wurde der höchste Ct-Wert für die weiteren Berechnungen einbezogen.[69] Die Qualitätskontrolle der qPCR umfasste eine umfangreiche Bewertung der Gesamtleistung des *Gen-Assay* und der Proben. Zu diesem Zweck wurden die Schmelz- und Amplifikationskurven berücksichtigt. Nicht sichtbare oder nicht lineare Amplifikation, unregelmäßige Schmelzkurven oder das Fehlen einer Abgrenzung zur Negativkontrolle waren Gründe für eine schlechte Bewertung. Insgesamt erfüllten 12 der 19 Gene die Qualitätskriterien und wurden in der Explorationskohorte EP sowie in den Replikationskohorten EP und EPO weiter analysiert. Unter Verwendung der Δ Ct-Methode wurden die mittleren Ct-Werte an das *Housekeeping*-Gen *ACTB* angepasst. Die FC-Werte zwischen den Tumor- und Kontrollgewebepaaren wurden als $2^{-\Delta\Delta CT}$ berechnet.[69] Nach log₂-Transformation der Δ Ct-Werte, wurde ein gepaarter t-Test unter Verwendung der Funktion 't.test()' aus dem R-Paket 'stats' angewandt,[76] um die Unterschiede zwischen EP, EPO und NH zu detektieren. Die Clustering-Daten wurden mit dem R-Paket 'agnes' für hierarchisches Clustern mit der Methode der vollständigen Verknüpfung erstellt. Alle Diagramme wurden mit den R-Paketen 'ggplot2', 'reshape' und 'dendextend' erstellt.[77-79]

1.6 Ethikvotum

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität genehmigt (Studennummer: 5618R) und in Übereinkunft mit der Deklaration von Helsinki praktiziert. Es wurde von allen Patienten und Patientinnen eine schriftliche Einverständniserklärung vor Einschluss in die Studie eingeholt.

1.7 Ziele der Arbeit

Das EP ist eine seltene Krebsart, bei der die Kenntnis über die zugrunde liegenden Genexpressionsprofile bislang unzureichend ist. Dies stellt eine erhebliche Hürde dar, insbesondere wenn es darum geht, potenzielle Ziele für Präzisionstherapien zu identifizieren. Die vorliegende Arbeit setzt sich zum Ziel, dieses Wissensdefizit zu beheben und die Mechanismen der Tumorentstehung bei EP besser zu verstehen und neue Ansätze für Therapien zu liefern.[13]

Zu diesem Zweck wurde eine Transkriptomanalyse an einer umfangreichen Kohorte von EP durchgeführt,[13] denn Untersuchungen zur genomweiten Genexpression bieten eine ganzheitliche und hypothesenunabhängige Darstellung zellulärer Prozesse auf der Ebene der Transkription.

Somit wurde eine Explorations-Kohorte von 10 EP einer *Microarray*-Analyse unterzogen, in die umliegendes gesundes Gewebe mit einbezogen wurde. Ziel war es, signifikante Unterschiede in den Genexpressionsmustern zwischen den Tumoren und dem gesunden Gewebe zu identifizieren und auch mögliche Variationen innerhalb der Tumore zu erkennen. Eine Signalweg-Analyse sollte aufzeigen, welche molekularen Mechanismen die Entwicklung von EP beeinflussen, um Therapien ableiten zu können.[13]

Um die Zuverlässigkeit der *Microarray*-Ergebnisse zu gewährleisten, wurden ausgewählte Gene mittels qPCR in einer Validierungskohorte von 13 EP-Proben validiert. Darüber hinaus wurden die Ergebnisse aus den EP in einer Kohorte von 17 EPO untersucht, mit dem Ziel eine mögliche Transformation von EPO zu EP zu erforschen.[13]

Die ekkrinen Schweißdrüsenkarzinome sind ein Forschungsschwerpunkt des Institutes für Humangenetik an der Universitätsklinik Düsseldorf. Dabei bilden EP die größte histologisch homogene Subgruppe. Die systematische Erforschung des Exoms, des Transkriptoms und des Methyloms soll Erkenntnisse zur Tumorbiologie liefern und die Grundlage für die Ableitung zielgerichteter Therapien bilden.[80]

Die Behandlung seltener Tumorentitäten ist herausfordernd, da ihr Verständnis oft begrenzt ist und es keine leitlinienbasierten Therapien gibt. Die molekulare Charakterisierung von Tumoren ist entscheidend für die Identifizierung von Angriffspunkten, die gezielt durch Therapien adressiert werden können. Durch eine umfassende genomweite Genexpressionsanalyse und die Untersuchung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen soll dazu beigetragen werden, eine personalisierte Medizin voranzutreiben und die Patientenversorgung zu verbessern.

Gene expression profiling in porocarcinoma indicates heterogeneous tumor development and substantiates poromas as precursor lesions

Svenja Holst¹ | Anna K. Weber¹ | Friedegund Meier^{2,3} | Jörg Otte^{4,5} |
Patrick Petzsch⁶  Julia Reifenberger⁷ | Thorsten Wachtmeister⁶ |
Dana Westphal^{2,3}  | Mirjana Ziemer⁸  | Wasco Wruck⁴ | James Adjaye⁴ |
Regina C. Betz⁹ | Arno Rütten¹⁰ | Harald M. Surowy¹ | Silke Redler¹ 

¹Institute of Human Genetics, Medical Faculty and University Hospital Düsseldorf, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany

²Department of Dermatology, University Hospital Carl Gustav Carus, TU Dresden, Germany

³Skin Cancer Center at the University Cancer Centre Dresden and National Center for Tumor Diseases, Dresden, Germany

⁴Institute for Stem Cell Research and Regenerative Medicine, Medical Faculty and University Hospital Düsseldorf, Heinrich Heine University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany

⁵Childhood Cancer Research Unit, Department of Women's and Children's Health, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

⁶Biological and Medical Research Centre (BMFZ), Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany

⁷Department of Dermatology, Medical Faculty and University Hospital Düsseldorf, Heinrich Heine University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany

⁸Department of Dermatology, University Medical Center Leipzig, Leipzig, Germany

⁹Institute of Human Genetics, University of Bonn, Medical Faculty and University Hospital Bonn, Bonn, Germany

¹⁰Dermatopathology, Bodensee, Siemensstrasse 6/1, 88048, Friedrichshafen, Germany

Correspondence

Silke Redler, MD, Institute of Human Genetics, University of Düsseldorf, Biomedical Center (MFZ I), Moorenstrasse 5, 40225 Düsseldorf, Germany.

Email: silke.redler@med.uni-duesseldorf.de

Summary

Background and objectives: Malignant sweat gland tumors are rare, with the most common being eccrine porocarcinoma (EP). Approximately 18% of benign eccrine poroma (EPO) transit to EP. Previous research has provided first insights into the mutational landscape of EP. However, only few studies have performed gene expression analyses. This leaves a gap in the understanding of EP biology and potential drivers of malignant transformation from EPO to EP.

Methods: Transcriptome profiling of 23 samples of primary EP and normal skin (NS). Findings from the EP samples were then tested in 17 samples of EPO.

Results: Transcriptome profiling revealed diversity in gene expression and indicated biologically heterogeneous sub-entities as well as widespread gene downregulation in EP. Downregulated genes included *CD74*, *NDGR1*, *SRRM2*, *CDC42*, *ANXA2*, *KFL9* and *NOP53*. Expression levels of *CD74*, *NDGR1*, *SRRM2*, *ANXA2*, and *NOP53* showed a stepwise-reduction in expression from NS via EPO to EP, thus supporting the hypothesis that EPO represents a transitional state in EP development.

Harald M. Surowy and Silke Redler contributed equally to this article.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2024 The Authors. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* published by Wiley-VCH GmbH on behalf of Deutsche Dermatologische Gesellschaft.

Conclusions: We demonstrated that EP is molecularly complex and that evolutionary trajectories correspond to tumor initiation and progression. Our results provide further evidence implicating the p53 axis and the EGFR pathway. Larger samples are warranted to confirm our findings.

KEY WORDS

eccrine porocarcinoma, skin cancer, sweat gland carcinoma, transcriptome analysis

INTRODUCTION

Sweat gland neoplasms encompass a heterogeneous but well-defined group of rare cutaneous adnexal tumors.^{1,2} Eccrine porocarcinoma (EP) represents the most common form of malignant sweat gland tumor,¹⁻³ but represents only 0.005%–0.01% of all skin malignancies.^{1,4} Its clinical presentation is highly variable, and in contrast to its aggressive nature, often non-suggestive of a malignant process. Histopathology is a prerequisite for EP diagnosis.^{3,5,6} Eccrine porocarcinoma show a high tendency to local progression, tumor ulceration, local recurrence, and metastatic disease. Limited data are available concerning EP biology and treatment options, often resulting in an overall poor outcome. As with other tumor entities, EP development is most probably driven by somatic mutations.⁷⁻⁹ Previous research has provided the first in-depth insights into the mutational landscape of EP. Denisova et al. performed whole exome sequencing (WES) in a cohort of 14 primary EPs, and detected a high overall median mutation burden. This study also indicated that defective homologous double strand break repair and the p53 pathway play an important role in EP etiology. This suggests that targeting of the p53 axis, Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibition, or immune checkpoint inhibition may represent promising treatment strategies.¹⁰ Westphal et al. carried out genomic and transcriptomic profiling of metastatic EP. They confirmed a high tumor mutational burden, and demonstrated epidermal growth factor receptor (EGFR)-mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway activation in metastatic tissue. Consistent with this, the advanced disease of one patient with metastatic EP was successfully controlled by EGFR-directed therapy and immune checkpoint inhibition for a period of more than 2 years.¹¹ In accordance, Comito et al. demonstrated, that EGFR-overexpressing metastatic EP responded to cetuximab.¹²

Despite all this previous research, only few EP studies have investigated the issue of molecular subtyping via gene expression analyses, and these reports involved small cohorts.^{11,13} Lack of knowledge about gene expression profiles leaves a crucial gap in the understanding of EP and represents an ongoing challenge to the identification of possible targets for precision therapeutics.

The main aim of the present study was to generate in depth insights into EP biology via the comprehensive

analysis of tumor-specific gene expression properties. The analyses were conducted using $n = 23$ formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) samples of histologically well characterized EP tumors and available normal skin (NS). For such a rare tumor entity, this represents a large cohort. Transcriptome analyses were conducted in an exploratory cohort of ten of these 23 primary EPs, and findings were validated in an independent replication cohort of the remaining 13 primary EPs.

In addition, the present study aimed to generate insights into the potential drivers of the malignant transformation from eccrine poroma (EPO), the benign counterpart of EP, to EP.

Eccrine porocarcinoma originate from the upper sweat gland excretory ducts. Transition to EP is described in up to 18% of EPO cases.¹⁴ To date, few genetic studies of poromas have been performed, and these have suggested that specific oncogenic drivers play an important role in tumorigenesis and probably promote the transformation of EPOs to EPs. However, these studies have been limited by technological constraints.¹⁵⁻¹⁸

To improve knowledge of the transition from EPO to EP change in terms of current diagnostics/therapeutics, findings generated from the 23 EPs were tested in a cohort of 17 EPOs in order to gain insight into the potential drivers of the malignant transformation from EPO to EP.

MATERIAL AND METHODS

Patients/samples

The present analyses were performed using ten FFPE tissue samples from unrelated EP patients (exploratory EP cohort). Inclusion criteria were: (1) primary tumor; (2) assignment of a histopathological diagnosis by A.R. and J.R. (Figure 1); and (3) no known history of familial occurrence. Age at diagnosis ranged from 41 to 78 years (mean age at onset 55.7 years), including five female patients and four male patients. Tumors were localized to the leg ($n = 5$), foot ($n = 2$), upper arm ($n = 1$), back ($n = 1$), neck ($n = 1$). In eight of the ten patients, NS samples were available, and these were used as matched controls. Results obtained in the exploratory EP cohort were followed-up in an independent cohort of 13 additional EPs from unrelated EP patients and nine matched NS (replication EP cohort), and in an additional cohort of 17

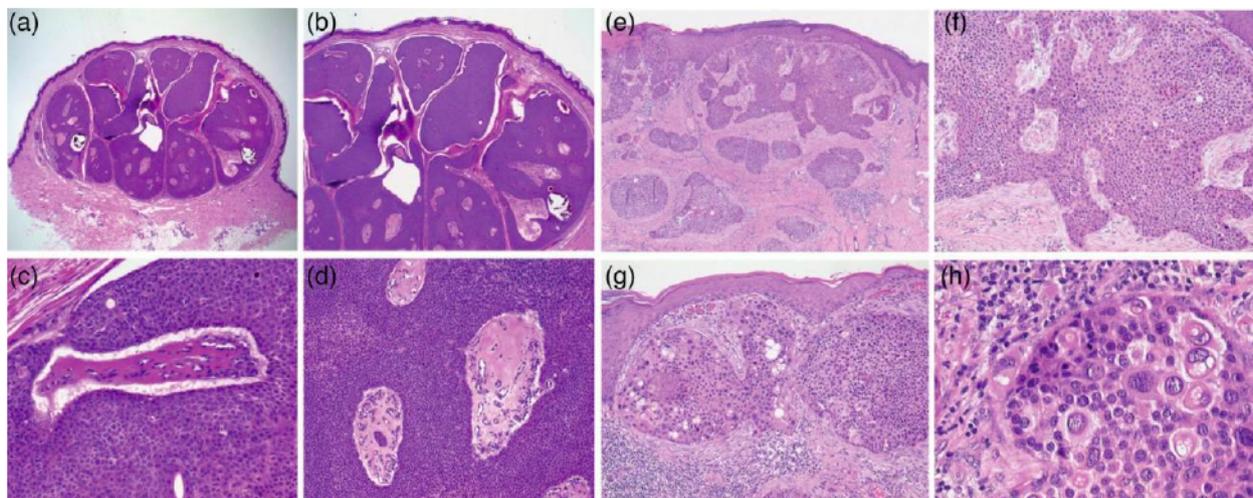


FIGURE 1 (a) Poromas (EPOs) are benign eccrine neoplasias with ductal differentiation. They are often connected to the epidermis. The tumor shows several tumor aggregates with monomorphous poroid cells. (b) These cells are eosinophilic, and have inconspicuous nuclei, very few mitotic figures, and no cytological atypia. (c) In some areas ductal differentiation is evidenced by the presence of intracytoplasmic vacuoles or true ductal structures surrounded by cuticular cells. (d) Some poromas show focal tumor necrosis, but this is not a sign of malignancy. (e) Porocarcinomas (EPs) are often connected to the epidermis, and intraepithelial extensions are indistinguishable from those observed in Bowen's disease. The tumor aggregates display atypical tumor cells with large hyperchromatic nuclei, many mitotic figures, and atypical mitoses. (f) Demonstration of ductal differentiation within a porocarcinoma is necessary in order to distinguish the tumor from a conventional squamous cell. (g) The tumors show an infiltrating growth pattern, and the surrounding tissue often shows signs of early intralymphatic spread. (h) The presence of large areas of necrosis surrounded by atypical cells is more typical for porocarcinomas. HE stain, scale bar 100 μ m.

EPOs from unrelated patients (poroma cohort). Tumors in the replication EP cohort were selected in accordance with the criteria used for the exploratory cohort. Age at diagnosis ranged from 44 to 80 years (mean age at onset 63.2 years), including six female patients and seven male patients.

Tumors were localized to the leg ($n = 5$), face ($n = 2$), upper arm ($n = 1$), neck ($n = 1$), thorax/ decollete ($n = 3$), external ear ($n = 1$). Ethical approval was obtained from the ethics committee of the Heinrich Heine University Düsseldorf, and all participants provided written informed consent prior to inclusion (Ethics vote 5618R). The study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.

RNA extraction

Microdissection to distinguish between tumor and NS was performed using standard procedures. Deparaffination and RNA isolation were performed as described in Surowy et al.¹⁹

Transcriptome microarray in the exploratory cohort

Transcriptome analysis in the exploratory EP cohort was performed via microarray, as described in Surowy et al.¹⁹

Microarray data analysis

The microarray data generated in the exploratory cohort were analyzed as described in Surowy et al.¹⁹

The cluster algorithm assigns the samples to clusters according to their expression profiles for the analyzed genes. During clustering, samples with the most similar expression profiles are grouped next to each other. The initial cluster analysis revealed two groups of EP tumors (see detailed description in the Results section). Based on these findings, four different types of differential gene expression (DGE) comparisons were performed: (1) comparison 1 (EP-NS): overall analysis of all EP samples (EP) and NS samples; (2) comparison 2 (CL2EP-CL2NS): analysis of EP samples from cluster 2 (CL2EP) and NS samples from cluster 2 (CL2NS); (3) comparison 3 (CL1EP-CL2EP): comparison of EP samples from cluster 1 (CL1EP) and EP samples from cluster 2 (CL2EP); (4) comparison 4 (CL1EP-CL2NS): analysis of EP samples from cluster 1 (CL1EP) and NS samples from cluster 2 (CL2NS).

Since the initial criteria yielded no genes for comparisons 1 (EP-NS) and 2 (CL2EP-CL2NS), the false discovery rate (FDR) corrected p value threshold was adjusted to ≤ 0.01 for comparison 1 (EP-NS), and to an uncorrected p value threshold of ≤ 0.005 for comparison 2 (CL2EP-CL2NS).

Quantitative polymerase chain reaction validation (qPCR)

qPCR was as described in Surowy et al.¹⁹ Expression fold changes were calculated for the following comparisons: (a) EP vs. NS samples, (b) EPO vs. NS and (c) EP vs. EPO.

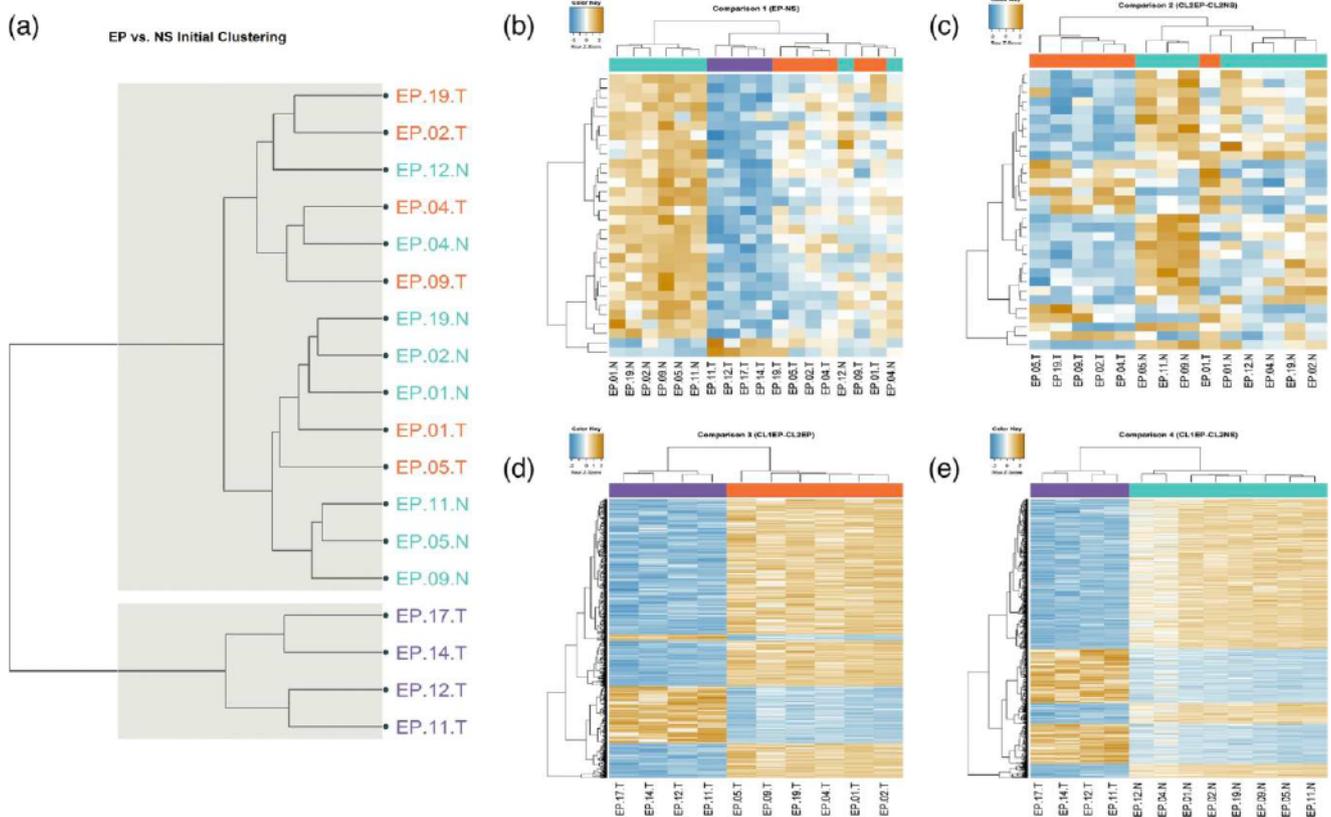


FIGURE 2 Results of the transcriptome microarray analysis. The last letter in the sample naming scheme indicates the sample type: T: eccrine porocarcinoma (EP) samples, N: surrounding healthy tissue samples (NS). (a) The dendrogram of the initial clustering analysis shows two distinct EP tumor subgroups. (b–e): Differential gene expression heatmaps for comparisons 1–4. Heatmaps are clustered according to samples (columns) and microarray probes (rows), which were selected in accordance with specified criteria. The row Z score indicates relative expression levels within each row (blue: low expression; orange: high expression).

RESULTS

Transcriptome analysis revealed two distinct EP tumor subgroups in the exploratory cohort

Initial clustering revealed two distinct clusters. One cluster comprised EP samples (CL1EP) only. The second cluster comprised both EP and NS (CL2EP and CL2NS) samples (Figure 2a). Clustering heatmaps of the four comparisons are shown in Figure 2b–e. As expected, each displays a different number of DGEs (Table 1). Across all comparisons, a downregulation of multiple genes in tumor tissue compared to NS was observed across all comparisons, and widespread gene downregulation was observed in CL1EP compared to CL2EP (CL1EP-CL2EP) (Figure 2 and online supplementary Figure S1 and online supplementary Table S1). Of the 23 DGEs out of the four comparisons that were selected as candidates for validation, 22 showed down-regulation in tumor tissue (online supplementary Table S2). The top seven downregulated genes were Cluster of differentiation 74 (*CD74*), N-myc-downstream-regulated-gene-1 (*NDGR1*), Cell division control protein 42 (*CDC42*), Serine/arginine repetitive matrix 2 (*SRRM2*), Annexin2 (*ANXA2*), Kruppel-like factor 9 (*KLF9*), and Ribosome biogenesis factor 53 (*NOP53*).

Several cancer-related pathways were dysregulated in EP

The major pathways that were dysregulated in association with downregulated genes were: the endothelin pathway; the vascular endothelial growth factor A-vascular

TABLE 1 Number of differentially expressed genes (microarray results).

Comparison	Genes down	Genes up
C1 (EP-SHT)	29	1
C2 (C2EP-C2SHT)	18	9
C3 (C1EP-C2EP)	567	181
C4 (C1EP-C2SHT)	652	422

All microarray data generated in the exploratory cohort of $n = 10$ EP samples were analyzed. The initial cluster analysis revealed two groups of EP tumors. Based on these findings, four different types of DGE comparisons were performed:

- (1) C1 (EP-SHT): comparison of all EP samples (EP) and surrounding healthy tissue (SHT) samples
- (2) C2 (C2EP-C2SHT): comparison of EP samples from cluster 2 (C2EP) and SHT samples from cluster 2 (C2SHT)
- (3) C3 (C1EP-C2EP): comparison of EP samples from cluster 1 (C1EP) and EP samples from cluster 2 (C2EP)
- (4) C4 (C1EP-C2SHT): comparison of EP samples from cluster 1 (C1EP) and SHT samples from cluster 2 (C2SHT)

endothelial growth factor receptor 2 (VEGFA-VEGFR2) signaling pathway; the hair follicle development: cytodifferentiation-part 3 of 3-pathway; the PodNet: protein-protein interactions in the podocyte pathway; the focal adhesion pathway; the transforming growth factor (TGF)-beta signaling pathway; the cytoplasmic ribosomal protein pathway; and the Hippo signal regulation pathway (online supplementary Table S3).

Comparison of the two distinct tumor clusters CL1EP-CL2EP (comparison 3) yielded 65 pathways that were significantly affected (p -value ≤ 0.01) by differential expression. These included all of the major pathways mentioned above, with the exception of hair follicle development: cytodifferentiation-part 3 of 3 pathway, and all were downregulated in CL1EP compared to CL2EP. In addition, this analysis suggested that the Hippo-YAP and the EGF/EGFR signaling pathways were significantly downregulated in the CL1EP group compared to the CL2EP group.

The largest number of dysregulated pathways ($n = 91$) was found in the comparison of CL1EP and NS (comparison 4). While the above-mentioned pathways were also affected in this analysis, the significant pathways, e.g. the endothelin pathway, the VEGFA-VEGFR signaling pathway, the cytoplasmic protein pathway, and the TGF-beta pathway, each showed a higher number of DGEs than was the case in the comparison of the CL1EP and the CL2EP groups.

The comparison of the CL2EP tumor subgroup to NS (comparison 2) yielded only two significantly affected pathways: the endothelin pathway and the hair-follicle development pathway part 3 of 3.

EPOs are a likely transitional state in EP development

Downregulation in EP compared to NS samples was confirmed for five genes, i.e. *CD74*, *NDGR1*, *SRRM2*, *CDC42*, and *ANXA2* (Figure 3a). In contrast, *ADAR* (adenosine deaminase RNA specific) and *CDC248* (cluster of differentiation endosialin) were significantly upregulated in EP. A significant downregulation in EPO samples compared to NS was found for *CD74*, *NDGR1*, *SRRM2*, and *ANXA2* (Figure 3c). The genes *CDC42*, *KFL9*, and *SRRM2* showed a significantly lower level of expression in EP compared to EPO (Figure 3b). Thus, the genes *CD74*, *SRRM2*, and *NDGR1* showed decreasing expression from EPO to EP. While *CDC42* and *KFL9* showed no difference in expression between EPO and NS, they showed borderline downregulation between EP and NS. A cluster analysis based on the qPCR data showed extensive degree of separation between EP and NS samples, whereas EPO samples tended to cluster at intermediate positions (Figure 4). For many of the individual assayed genes, this was also apparent from the mean delta CT (dCT) values over all sample types (Figure 5).

DISCUSSION

To our knowledge, the present study investigated one of the largest cohorts of histologically well-characterized FFPE primary EP and matched NS samples to date, in addition to a comparably large cohort of EPOs.

Our transcriptome-wide gene expression data revealed an overall diversity in gene expression among the investigated EPs and indicated the existence of biologically heterogeneous sub-entities. Hierarchical clustering identified two key matrisomal clusters, which are likely to represent two major EP tumor subtypes with marked transcriptional differences. Cluster 1 comprised four EP tumors. These were similar in terms of their gene expression pattern, but clearly demarcated from the six tumors that formed cluster 2. Interestingly, while the clusters showed gene expression similarities, they also showed expression differences, suggesting specific genes expression patterns. Most of the successfully validated genes showed differences in their expression levels in the distinct clusters, and were significantly downregulated in cluster 1 (CL1EP) compared to cluster 2 (CL2EP), e.g. *NDGR1*, *CD74*, *CDC42*, *ANXA2*, and *SRRM2*. Downregulation of *KFL9* was specific for the comparison of CL2EP and NS (online supplementary Table S2).

Tumor heterogeneity is a well-established phenomenon in solid tumors, and represents an ongoing challenge in the treatment of patients with advanced disease.²⁰ Despite first promising approaches to the treatment of patients with advanced EP including targeting of the EGFR pathway and immune checkpoint inhibition,^{11,12} EP tumor heterogeneity and its impact on the selection of treatment strategy remain poorly understood. To generate an in depth understanding of tumor heterogeneity and its impact on prognosis and therapy, molecular profiling of tumor tissue, correlations with clinical parameters, and either long-term patient follow-up or the establishment of a systematic patient registry for rare diseases are imperative.

In addition to tumor heterogeneity, the exploratory transcriptome analyses revealed a widespread downregulation of multiple genes in EPs compared to NS. A likely explanation for this observation is the existence of epigenetic regulatory mechanisms, which can lead to the repression of gene expression and gene silencing.²¹ Recent reports suggest that epigenetic silencing of tumor suppressor genes constitutes an early driving event in carcinogenesis.^{21–23} However, to our knowledge, no systematic methylation profiling or gene-specific DNA methylation analyses have been performed to date in EP.

Our transcriptomic data, which were validated with qPCR, revealed several downregulated genes, which are frequently implicated in tumorigenesis and/ or tumor progression. These comprised *CD74*, *NDGR1*, *SRRM2*, *CDC42*, and *ANXA2*. In addition, *KFL9* and *NOP53* showed a trend towards downregulation. Some of these genes have not been described previously in relation to EP etiology and

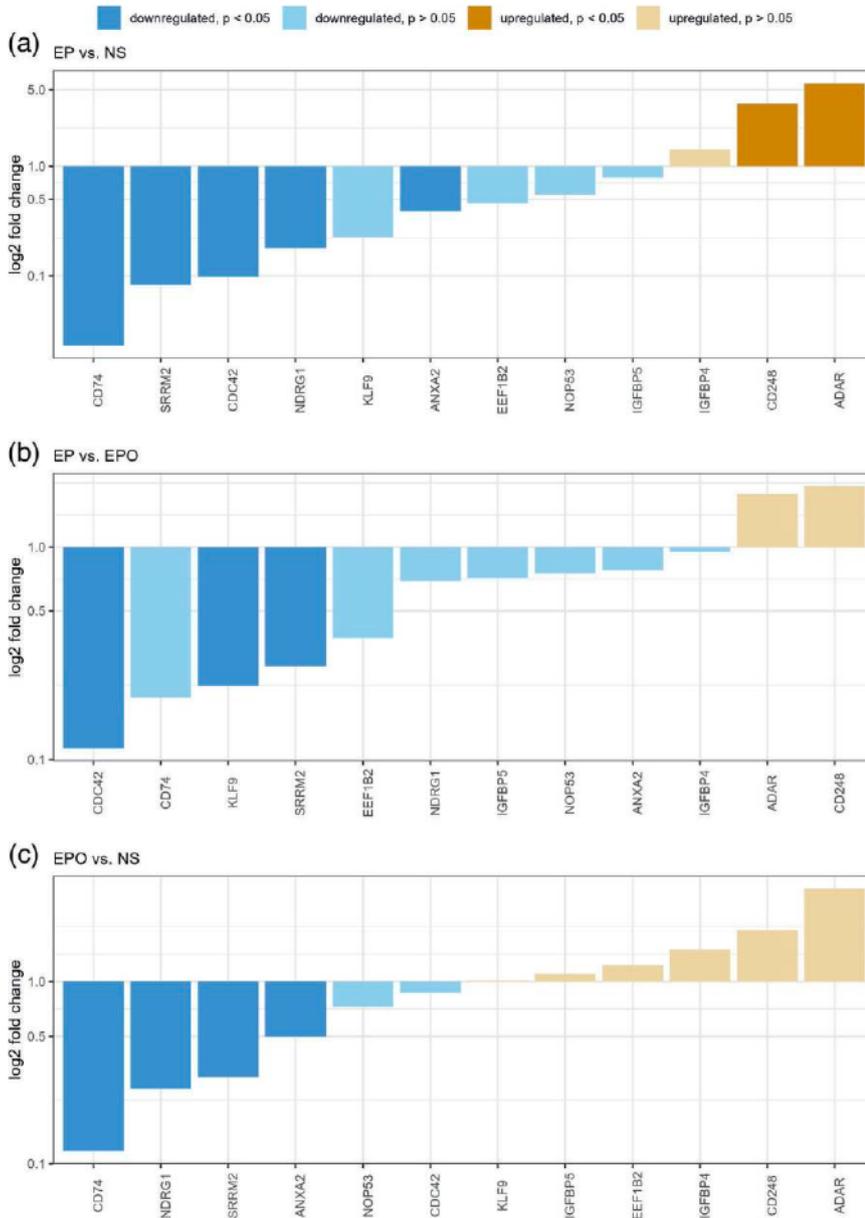


FIGURE 3 Gene expression fold changes for the genes studied with qPCR in eccrine porocarcinoma (EP), eccrine poroma (EPO), and surrounding healthy tissue (NS). Blue: downregulation; orange: upregulation, dark colors: p value < 0.05. Top panel: EP vs. NS (comparison a), middle panel: EP vs EPO (comparison b), bottom panel: EPO vs. NS (comparison c). In each panel, genes are ranked from lowest to highest fold change.

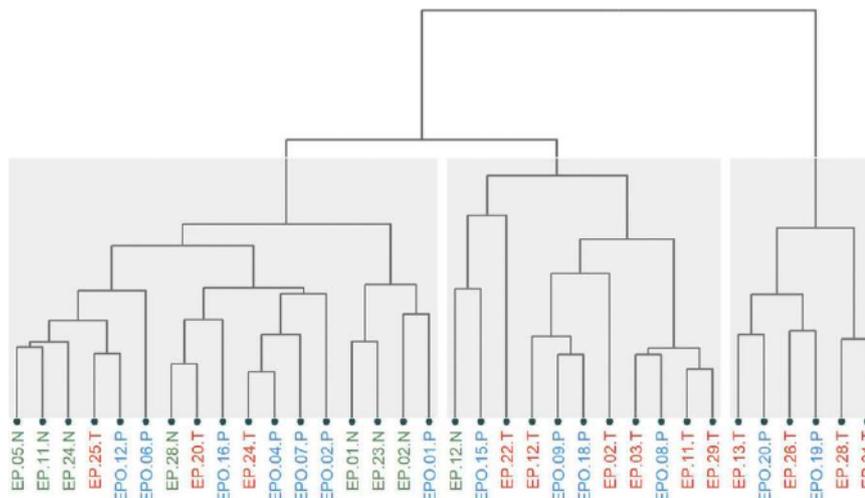


FIGURE 4 The dendrogram of the cluster analysis based on qPCR data shows three broad clusters that largely separate eccrine porocarcinoma (EP) and surrounding healthy tissue (NS) samples, while eccrine poromas (EPO) samples tend to cluster at intermediate positions. Sample type is indicated by the last letter in the sample naming scheme and color: N (green): NS, P (blue): EPO, T (red): EP.

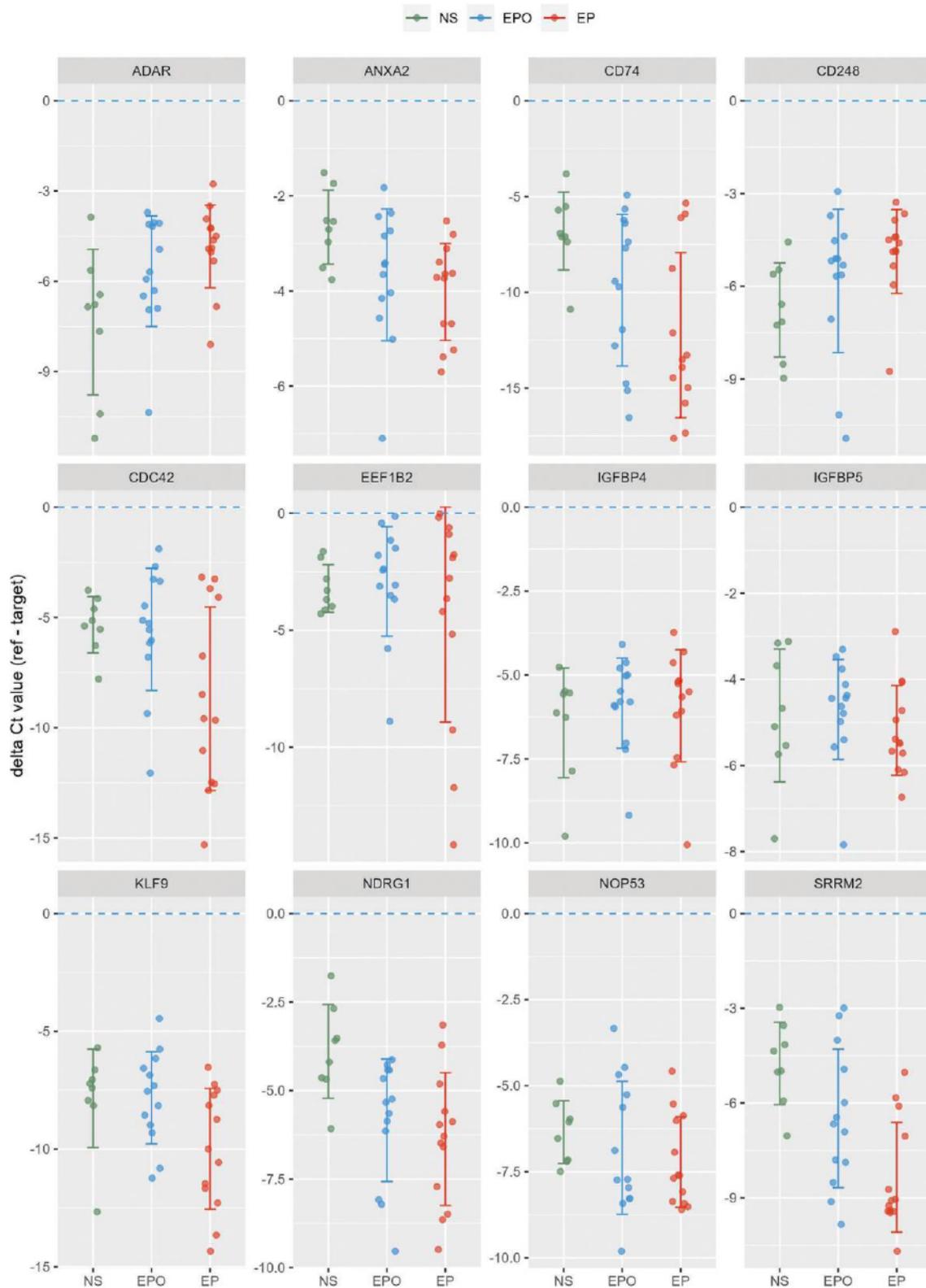


FIGURE 5 Jitter plots of the dCT values for each of the assayed genes, sorted according to sample type (green: surrounding healthy tissue samples [NS], blue: poroma samples [EPO], red: eccrine porocarcinoma samples [EP]), respectively. Within each group, bars indicate the range of ± 1 standard deviation around the mean dCT value.

suggest further mechanisms of tumorigenesis. The mechanisms underlying the development of tumors are most likely complex. They comprise transcriptomic and epigenomic alterations as well as somatic mutations in pivotal driver genes. The transcriptome reflects gene activity. Changes in the transcriptome do not necessarily lead solely to carcinogenesis. Potential driver mutations and intrinsic modifications of driver genes can have a significant impact on the transcriptome by altering the expression of certain genes. These genetic alterations are critical because they can affect signaling pathways that lead to uncontrolled cell growth and thus contribute significantly to the development of cancer.

NDGR1 and *NOP53* are involved in the p53 axis of genome maintenance. The p53 protein is a key regulator of cell growth and death.²⁴ In a recent study, our group demonstrated that the p53 pathway is involved in EP etiology, and that targeting of this pathway may represent a promising treatment strategy.^{10,11} *NDRG1* regulates centrosome number and amplification, and its expression is induced in a p53-dependent manner in response to DNA damage. Upon homozygous loss of *TP53*, *NDRG1* expression becomes insufficient, leading to abnormal centrosome numbers and genomic instability.²⁵ *NOP53* modulates the response to DNA damage by regulating DNA damage repair proteins and p53 expression via the MDM2-mediated polyubiquitination pathway.²⁶ In addition, both *NDGR1* and *NOP53* are involved in the PI3K-AKT pathway, which is one of the most frequently activated signal transduction pathways in tumor development. This pathway modulates the intracellular signal transduction response to extracellular signals, as mediated through serine and/or threonine phosphorylation of a range of downstream substrates.²⁷ Decreased expression of *NOP53* sensitizes cells to DNA damage, delays DNA repair, and switches off G2/M checkpoint activation.²⁸

SRRM2 encodes a pre-mRNA splicing protein. Recently, RNA splicing regulators have emerged as a new class of proteins that can act as oncoproteins or tumor suppressors, and which may affect various cellular processes, including epigenetic regulation and DNA damage response.²⁹

CDC42 is involved in cellular proliferation, transformation, and homeostasis, as well as cellular migration and invasion processes.^{30,31} *CDC42* can act as both an oncogene and a tumor suppressor. As such, *CDC42* is of importance in maintaining cell differentiation and regulating progenitor proliferation.³⁰ Previous authors have suggested that short-term systemic treatment to decrease *CDC42* activity improves the regenerative capacity of stem cells in mice.³²

ANXA2 belongs to the calcium-mediated phospholipid-binding protein family of annexins and has numerous intra and extra cellular functions. *ANXA2* exists in four forms: cytoplasmic, surface membrane bound, nuclear, and secreted.³³ In many cancer types, overexpression of *ANXA2* has been reported to contribute to cancer progression, metastasis and drug resistance, possibly sec-

ondary to enhanced angiogenesis.³⁴ Thus, anti-angiogenic cancer therapies may represent promising therapeutic targets.³⁵

CD74 encodes a cell surface receptor, which is expressed in multiple cell types. Recent research suggests that the pleiotropic cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF) confers a risk for numerous inflammatory disorders and malignancies via binding to the CD74 receptor and the activation of downstream signaling pathways.³⁶ MIF has been described as playing a central role in the regulation of innate and adaptive immunity. Additionally, research suggests that MIF inhibition could contribute towards overcoming resistance to immune checkpoint blockade therapy in melanoma.³⁷

KLF9 is a member of a family of DNA-binding transcriptional regulators that control crucial cellular processes, e.g. proliferation, differentiation, migration, and maintenance of pluripotency.^{38–40} *KLF9* influences keratinocyte proliferation and differentiation through diurnal control of target gene expression.⁴¹ Reduced expression of this gene has been reported in melanoma and cutaneous squamous cell carcinoma.^{42,43}

The results of the present study underline the power of gene expression profiling in solid tumors and increase understanding of the genetic architecture of EP, thus advancing efforts to translate molecular findings into prospective clinical trials of novel agents and promising treatment strategies.^{11,44} However, the highly variable clinical presentation of EP often impedes early diagnosis, and the steps that lead to EP transformation remain poorly understood.^{7,10,17,45} To dissect the stages of EP carcinogenesis, we followed up our gene expression profiling results in a cohort of EPO samples. Here, the aim was to identify genes that show altered progression from NS to EPO to EP. Interestingly, for several of the genes studied in EPO, the respective expression levels were between those observed in EP and NS, with *CD74*, *SRRM2*, *NDGR1*, *NOP53*, and *ANXA2* all showing a stepwise reduction in expression from NS via EPO to EP (Figures 3, 5). This suggests that these genes are possible drivers of oncogenic transformation, and supports the hypothesis that EPO is a risk factor for EP development. Interestingly, the phenomenon of evolutionary trajectories that correspond to tumor initiation and progression is well described in skin tumors, and has facilitated the identification of molecular markers to enable early diagnosis and thus improve the clinical management of skin malignancies.^{46,47}

Evolutionary trajectories are of great interest in understanding malignant transformation. Cancer can be viewed as a Darwinian system, and thus evolutionary processes such as mutation and selection can be used to explain the origin and spread of malignant clones and subclones.⁴⁸

However, the development of malignant tumors cannot be explained solely by a single evolutionary model, such as the Darwinian model. Epigenetic changes, e.g. a high degree of DNA methylation, which can inactivate tumor suppressor genes, interactions with the clonal

microenvironment and transcriptional plasticity influence the evolutionary process.⁴⁹ When mutations and epigenetic changes in these cells favor self-renewal and clonal growth, evolution toward malignancy occurs. However, only a few mutations are driver mutations. In most cases, cancer cell evolution aborts, and premalignant lesions are much more common than malignant tumors. Subclonal genetic diversity of a tumor can explain treatment failure.^{48,50}

To expand our exploration of the transcriptional mechanisms of EP and potential new therapeutic avenues, a pathway analysis of the results of genome-wide expression comparisons was performed (online supplementary Table S3). Interestingly, our results are consistent with first therapeutic successes and underscore the importance of EGFR-targeted therapy.^{11,12} Additionally, other cancer-related pathways demonstrated a high significance in our analysis, including the endothelin pathway, the VEGFA-VEGFR2 signaling pathway, the focal adhesion pathway, the TGF-beta signaling pathway, and the cytoplasmic ribosomal protein pathway. While these pathways currently do not offer treatment alternatives for EP, they may potentially serve as future therapeutic options. However, none of the identified pathways showed consistent dysregulation in all four comparisons, and no pathways were clearly attributable to one of the two key matrisomal clusters. The recruitment of larger cohorts of EP and EPO patients is thus warranted in order to follow-up our findings.

In conclusion, the present study generated novel insights into the transcriptional landscape of the rare sweat gland carcinoma EP. Our results revealed a widespread downregulation of genes in EP tumor tissue, which might be explained by hitherto unexplored epigenetic regulatory mechanisms, and indicate crucial oncogenic driver pathways. In accordance with previous findings, our results implicate the p53 axis and the EGFR pathway in EP etiology, and support the hypothesis that targeting of the p53 axis and EGFR represent promising treatment strategies. Interestingly, the investigated EPs were shown to be molecularly complex, and evolutionary trajectories that correspond to tumor initiation and progression were demonstrated. This reinforces the need to improve understanding of EP tumor heterogeneity and molecular hallmarks via integrative research strategies that also consider poromas. This will be key not only in terms of identifying high-risk individuals, but also in terms of the translation of molecular findings into prospective clinical trials of novel agents.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank all patients for their participation.

Open access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

FUNDING SOURCES

S.R. and R.C.B. received financial support from the Wilhelm Sander-Stiftung (Nr. 2015.042.1). R.C.B. is funded

by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation), under the auspices of the Germany Excellence Strategy - EXC2151 - 390873048. These funds had no influence on the study design or the interpretation of the data. The authors are solely responsible for the content of the study.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

None.

ORCID

Patrick Petzsch  <https://orcid.org/0000-0002-8355-5524>

Dana Westphal  <https://orcid.org/0000-0003-4340-0402>

Mirjana Ziemer  <https://orcid.org/0000-0001-6488-1917>

Silke Redler  <https://orcid.org/0000-0002-0991-252X>

REFERENCES

- Rütten A, Requena L. Schweißdrüsenkarzinome der Haut. *Hautarzt*. 2008;59:151-160.
- Rütten A. Ekkrine Schweißdrüsenkarzinome der Haut. *Pathologe*. 2002;23:79-88.
- De Giorgi V, Salvati L, Barchielli A, et al. The burden of cutaneous adnexal carcinomas and the risk of associated squamous cell carcinoma: a population-based study. *Br J Dermatol*. 2019;180:565-573.
- Nazemi A, Higgins S, Swift R, et al. Eccrine Porocarcinoma: New Insights and a Systematic Review of the Literature. *Dermatol Surg*. 2018;44:1247-1261.
- Mishima Y, Morioka S. Oncogenic differentiation of the intraepidermal eccrine sweat duct: eccrine poroma, poroepithelioma and porocarcinoma. *Dermatologica*. 1969;138:238-250.
- Goel R, Contos MJ, Wallace ML. Widespread metastatic eccrine porocarcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 2003;49:S252-254.
- Salih AM, Kakamad FH, Essa RA, et al. Porocarcinoma: A systematic review of literature with a single case report. *Int J Surg Case Rep*. 2017;30:13-16.
- Xu YG, Aylward J, Longley BJ, et al. Eccrine Porocarcinoma Treated by Mohs Micrographic Surgery: Over 6-Year Follow-up of 12 Cases and Literature Review. *Dermatol Surg*. 2015;41:685-692.
- Brown CW, Dy LC. Eccrine porocarcinoma. *Dermatol Ther*. 2008;21:433-438.
- Denisova E, Westphal D, Surowy HM, et al. Whole-exome sequencing in eccrine porocarcinoma indicates promising therapeutic strategies. *Cancer Gene Ther*. 2021;29:697-708.
- Westphal D, Garzarolli M, Sergon M, et al. High tumour mutational burden and EGFR/MAPK pathway activation are therapeutic targets in metastatic porocarcinoma. *Br J Dermatol*. 2021;185:1186-1199.
- Comito F, Nigro MC, Sperandi F, et al. Immunotherapy-refractory, EGFR overexpressing metastatic porocarcinoma responding to cetuximab. *Eur J Cancer*. 2021;146:84-86.
- Thibodeau ML, Bonakdar M, Zhao E, et al. Whole genome and whole transcriptome genomic profiling of a metastatic eccrine porocarcinoma. *NPJ Precis Oncol*. 2018;2:8.
- Robson A, Greene J, Ansari N, et al. Eccrine porocarcinoma (malignant eccrine poroma): a clinicopathologic study of 69 cases. *Am J Surg Pathol*. 2001;25:710-720.
- Sekine S, Kiyono T, Ryo E, et al. Recurrent YAP1-MAML2 and YAP1-NUTM1 fusions in poroma and porocarcinoma. *J Clin Invest*. 2019;129:3827-3832.
- Macagno N, Kervarrec T, Sohler P, et al. NUT Is a Specific Immunohistochemical Marker for the Diagnosis of YAP1-NUTM1-rearranged Cutaneous Poroid Neoplasms. *Am J Surg Pathol*. 2021;45:1221-1227.

17. Bosis M, Kirchner M, Brasanac D, et al. Targeted molecular profiling reveals genetic heterogeneity of poromas and porocarcinomas. *Pathology*. 2018;50:327-332.
18. Zahn J, Chan MP, Wang G, et al. Altered Rb, p16, and p53 expression is specific for porocarcinoma relative to poroma. *J Cutan Pathol*. 2019;46:659-664.
19. Surowy HM, Giesen AK, Otte J, et al. Gene expression profiling in aggressive digital papillary adenocarcinoma sheds light on the architecture of a rare sweat gland carcinoma. *Br J Dermatol*. 2019;180:1150-1160.
20. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, et al. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339:1546-1558.
21. Kazanets A, Shorstova T, Hilmi K, et al. Epigenetic silencing of tumor suppressor genes: Paradigms, puzzles, and potential. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1865:275-288.
22. Muthusamy V, Duraisamy S, Bradbury CM, et al. Epigenetic silencing of novel tumor suppressors in malignant melanoma. *Cancer Res*. 2006;66:11187-11193.
23. Lomberk GA. Epigenetic silencing of tumor suppressor genes in pancreatic cancer. *J Gastrointest Cancer*. 2011;42:93-99.
24. Efeyan A, Serrano M. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle*. 2007;6:1006-1010.
25. Croessmann S, Wong HY, Zabransky DJ, et al. NDRG1 links p53 with proliferation-mediated centrosome homeostasis and genome stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:11583-11588.
26. Lee S, Ahn YM, Kim JY, et al. Downregulation of NOP53 Ribosome Biogenesis Factor Leads to Abnormal Nuclear Division and Chromosomal Instability in Human Cervical Cancer Cells. *Pathol Oncol Res*. 2020;26:453-459.
27. Martini M, De Santis MC, Braccini L, et al. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Ann Med*. 2014;46:372-383.
28. Lee S, Kim JY, Kim YJ, et al. Nucleolar protein GLTSCR2 stabilizes p53 in response to ribosomal stresses. *Cell Death Differ*. 2012;19:1613-1622.
29. Dvinge H, Kim E, Abdel-Wahab O, et al. RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors. *Nat Rev Cancer*. 2016;16:413-430.
30. Stengel K, Zheng Y. Cdc42 in oncogenic transformation, invasion, and tumorigenesis. *Cell Signal*. 2011;23:1415-1423.
31. Xiao XH, Lv LC, Duan J, et al. Regulating Cdc42 and Its Signaling Pathways in Cancer: Small Molecules and MicroRNA as New Treatment Candidates. *Molecules*. 2018;23:787.
32. Zhang M, Wang X, Guo F, et al. Cdc42 Deficiency Leads To Epidermal Barrier Dysfunction by Regulating Intercellular Junctions and Keratinization of Epidermal Cells during Mouse Skin Development. *Theranostics*. 2019;9:5065-5084.
33. Wang CY, Lin CF. Annexin A2: its molecular regulation and cellular expression in cancer development. *Dis Markers*. 2014;2014:308976.
34. Wang T, Wang Z, Niu R, et al. Crucial role of Anxa2 in cancer progression: highlights on its novel regulatory mechanism. *Cancer Biol Med*. 2019;16:671-687.
35. Sharma MR, Koltowski L, Ownbey RT, et al. Angiogenesis-associated protein annexin II in breast cancer: selective expression in invasive breast cancer and contribution to tumor invasion and progression. *Exp Mol Pathol*. 2006;81:146-156.
36. Leng L, Metz CN, Fang Y, et al. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med*. 2003;197:1467-1476.
37. de Azevedo RA, Shoshan E, Whang S, et al. MIF inhibition as a strategy for overcoming resistance to immune checkpoint blockade therapy in melanoma. *Oncimmunology*. 2020;9:1846915.
38. Jiang J, Chan YS, Loh YH, et al. A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*. 2008;10:353-360.
39. McConnell BB, Yang VW. Mammalian Kruppel-like factors in health and diseases. *Physiol Rev*. 2010;90:1337-1381.
40. Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2007;1:39-49.
41. Sporf F, Korge S, Jurchott K, et al. Kruppel-like factor 9 is a circadian transcription factor in human epidermis that controls proliferation of keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:10903-10908.
42. Bagati A, Moparthy S, Fink EE, et al. KLF9-dependent ROS regulate melanoma progression in stage-specific manner. *Oncogene*. 2019;38:3585-3597.
43. Xing J, Jia Z, Xu Y, et al. KLF9 (Kruppel Like Factor 9) induced PFKFB3 (6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2, 6-Biphosphatase 3) downregulation inhibits the proliferation, metastasis and aerobic glycolysis of cutaneous squamous cell carcinoma cells. *Bioengineered*. 2021;12:7563-7576.
44. Harms PW, Hovelson DH, Cani AK, et al. Porocarcinomas harbor recurrent HRAS-activating mutations and tumor suppressor inactivating mutations. *Hum Pathol*. 2016;51:25-31.
45. Puttonen M, Isola J, Ylinen O, et al. UV-induced local immunosuppression in the tumour microenvironment of eccrine porocarcinoma and poroma. *Sci Rep*. 2022;12:5529.
46. Loras A, Gil-Barrachina M, Marques-Torres MA, et al. UV-Induced Somatic Mutations Driving Clonal Evolution in Healthy Skin, Nevus, and Cutaneous Melanoma. *Life (Basel)*. 2022;12:1339.
47. Testa U, Castelli G, Pelosi E. Melanoma: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Clonal Evolution and Tumor Initiating Cells. *Med Sci (Basel)*. 2017;5:28.
48. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012;481:306-313.
49. Ashouri A, Zhang C, Gaiti F. Decoding Cancer Evolution: Integrating Genetic and Non-Genetic Insights. *Genes (Basel)*. 2023;14:1856.
50. Sabaawy HE. Genetic Heterogeneity and Clonal Evolution of Tumor Cells and their Impact on Precision Cancer Medicine. *J Leuk(Los Angel)*. 2013;1:1000124.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Holst S, Weber AK, Meier F, et al. Gene expression profiling in porocarcinoma indicates heterogeneous tumor development and substantiates poromas as precursor lesions. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2024;22:1115–1124.
<https://doi.org/10.1111/ddg.15445>

3 Diskussion

3.1 Ergebnis-Diskussion

FFPE-Proben primärer EP und EPO sowie umgebender NH bildeten die Hauptdatenquellen dieser Arbeit. 10 EP mit gepaartem gesundem NH, soweit vorhanden, bildeten die Explorationskohorte und wurden für die genomweite Genexpressionsanalyse durch *Microarray* verwendet. Für die Validierung der Transkriptom-*Array*-Ergebnisse mittels qPCR wurden 13 zusätzliche EP mit umgebender NH verwendet. Darüber hinaus wurden die Resultate der EP an einer Kohorte von 17 EPO überprüft.[13]

Nach Sichtung der aktuellen Studienlage, welche in dem Kapitel 1.4 dieser Arbeit zusammengefasst wird, ist davon auszugehen, dass es sich um die bisher größte Kohorte aus EP und EPO handelt, für die eine umfassende Genexpressionsanalyse durchgeführt wurde.[13]

Ziel dieser Dissertation war es, mithilfe der genomweiten Transkriptomanalyse weitere Erkenntnisse zu den molekularen Mechanismen der Tumorentwicklung zu erhalten und damit ein tieferes Verständnis der Tumorbiologie der EP zu gewinnen. Hierzu diente die Untersuchung auf mögliche DGE in den EP, die Identifikation von Treibergen und die Untersuchung der Signalwege hinsichtlich signifikanter Veränderungen. Zudem sollten mögliche Treiber für die Transformation vom EPO zum EP identifiziert werden.[13]

Zusammenfassend ergab die Genexpressionsanalyse mittels *Microarray* und qPCR folgende wichtige Ergebnisse:

- Bei dieser Tumorerkrankung liegen biologisch heterogene Subtypen vor. Denn die hierarchische initiale Clusterbildung auf der Basis der *Microarray*-Daten identifizierte zwei Tumorcluster mit deutlichen Unterschieden in der Genexpression.[13]
- In allen Vergleichen dominierte eine Herunterregulierung von Genen in den EP im Vergleich zu NH, aber auch in den Vergleichen der Tumorcluster untereinander. Die erfolgreich validierten Gene *Cluster of Differentiation 74 (CD74)*, *N-myc-downstream-regulated-gene-1 (NDGR1)*, *Serin/Arginin Repetitive Matrix 2 (SRRM2)*, *Cell Division Control Protein 42 (CDC42)*, *Annexin A2 (ANXA2)* und *Ribosome Biogenesis Factor 53 (NOP53)* waren in den EP im ersten Cluster in allen Vergleichen herunterreguliert. *Kruppel-like Factor 9 (KFL9)* zeigte eine signifikante Herabregulierung in den EP im

zweiten Cluster im Vergleich zu NH. Die Verringerung der Expressionsniveaus könnte durch epigenetisches Stummschalten der Gene erklärt werden.[13]

- Unter den validierten Genen fanden sich sowohl Tumorsuppressor- als auch Onkogene, die neue Erkenntnisse zur EP-Entwicklung lieferten.[13]
- Die Untersuchungen legen die Beteiligung der p53-Achse an der EP-Genese nahe. Denn die Gene *NDGR1* und *NOP53* sind in diese Achse eingebunden und waren herunterreguliert.[13]
- Die Gene *CD74*, *NDGR1*, *SRRM2*, *ANXA2* und mit Trend zur Signifikanz auch *NOP53* wiesen in der Studie eine schrittweise abnehmende Expression von NH über EPO zu EP auf. Diese Beobachtung legt nahe, dass sie die onkogene Transformation vom EPO zum EP fördern könnten, und deutet darauf hin, dass EPO ein Übergangsstadium in der Entwicklung von EP darstellen könnte.[13]
- Die Signalweg-Analyse identifizierte zahlreiche Tumor bezogene Pfade und deutete unter anderem auf eine mögliche Beteiligung des Endothelin- und den VEGFA/VEGFR2-Signalwegs an der EP-Entstehung hin. So konnten neue, noch nicht beschriebene Mechanismen der Tumorentstehung aufgezeigt werden. Die Ergebnisse untermauern zudem die Relevanz der EGFR-gerichteten Therapie des EP.[13]

Mit diesen Erkenntnissen wird ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen bei EP erreicht, welches eine Grundlage für zukünftige Forschung und klinische Anwendungen bietet. Im Folgenden werden diese Teilergebnisse vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur im Hinblick auf die Ziele der Arbeit diskutiert.

3.1.1 Tumorheterogenität der EP-Kohorte

Die durch das hierarchische Clustern auf der Basis der *Microarray*-Daten identifizierten Tumor-Subtypen wiesen innerhalb eines Clusters Ähnlichkeiten in der Genexpression auf. Der Vergleich beider Cluster brachte jedoch deutliche Unterschiede hervor. Dies lässt auf spezifische Genexpressionsmuster der Subtypen schließen. Vier EP bildeten Cluster 1 (CL1EP), sechs EP zusammen mit allen NH das Cluster 2 (CL2EP und CL2NH). In Cluster 2 waren die sechs EP als Untergruppe erkennbar, wie im Cluster-Dendrogramm aus Holst et al. Abbildung 2a, dargestellt.[13] Die erfolgreich validierten Gene zeigten unterschiedliche Expressionsniveaus in den Clustern. In CL1EP im Vergleich zu CL2EP waren die Expressionsstärken dieser Gene deutlich herunterreguliert. Dies galt für die Gene *CD74*, *NDGR1*, *SRRM2*, *CDC42*, *ANXA2*,

und *NOP53*. Für CL2EP war die Herabregulierung von *KFL9* im Vergleich zu NH kennzeichnend, wie in der *Online Supplement* Tabelle 1 aus der Arbeit von Holst et al. zu sehen ist.[13] Die *Microarray*-Analyse zeigte somit eine Tumorerheterogenität auf, die ein häufig beobachtbares Merkmal von Tumorerkrankungen ist und eine Behandlung fortgeschrittener Tumore erschwert.[13, 81-83]

Folgende Formen genetischer Heterogenität bei Tumoren werden in der Literatur unterschieden:

- Interpatientenheterogenität: Unterschiede zwischen den Tumoren verschiedener Patienten. Die Anerkennung dieser Heterogenität führt zur Entwicklung individualisierter Behandlungen.
- Intratumorale Heterogenität: Diese bezieht sich auf den Primärtumor und beruht auf den mit jeder Teilung zusätzlich erworbenen Mutationen. Sie liefert die Grundlage für die intermetastatische Heterogenität, der eine große klinische Bedeutung zukommt.
- Intermetastatische Heterogenität: Diese bezieht sich auf die genetische Unterschiedlichkeit verschiedener metastatischer Läsionen bei einem Patienten.
- Intrametastatische Heterogenität: Diese beschreibt die Unterschiede innerhalb einer Metastase.[81]

Bei den genetischen Veränderungen geht es nicht nur um Mutationen, sondern auch um epigenetische Veränderungen, wie den Methylierungszustand.[81] Auf die Epigenetik wird im weiteren Verlauf der Diskussion eingegangen.

Durch die der Dissertation zugrunde liegende Untersuchung konnte eine Interpatientenheterogenität für die untersuchte Kohorte an EP aufgezeigt werden.[13] Die Tatsache, dass sämtliche analysierte EP in dieser Studie Primärtumore sind und vor Therapiebeginn chirurgisch entfernt wurden, schließt die Wahrscheinlichkeit aus, dass die beobachtete Tumorerheterogenität eine Reaktion auf schnelle genomische Veränderungen unter therapeutischem Druck darstellt.

Die Erstellung molekularer Profile von Tumorgewebe ist ein wichtiger Baustein, der die Tumorerheterogenität und deren Bedeutung für Therapie und Verlauf verständlich machen kann.

Das molekulare *Profiling* bietet die Möglichkeit der Klassifikation vieler solider Tumoren und hat die Entwicklung und Umsetzung neuer Behandlungsansätze gefördert. Als spezifisches Tumormerkmal bildet das Genexpressionsprofil die Basis für die Ableitung von Präzisionstherapien. [82, 83] Dies gilt auch für seltene Tumore wie das EP.[13, 44, 63, 66]

In der Onkologie gewinnt die personalisierte Medizin besondere Bedeutung, vor allem wenn bisherige Therapien frustrierend sind oder seltene Tumorerkrankungen vorliegen. Entscheidungen

über die individuelle Therapie basieren auf dem molekularen Profil des Tumors und werden in einem interdisziplinären Tumorboard getroffen, das Experten aus verschiedenen Fachbereichen zusammenbringt. Ein Beispiel für die Umsetzung dieses Ansatzes ist das Zentrum für Personalisierte Medizin in Düsseldorf, wo auf Grundlage eines ganzheitlichen Ansatzes maßgeschneiderte Behandlungen entwickelt werden, um jedem Patienten die bestmögliche Versorgung zu bieten.[84]

Bezogen auf das EP konnten Fortschritte hinsichtlich des biologischen Verständnisses und beim therapeutischen Management erzielt werden, wie im Kapitel 1.4 und in der Publikation beschrieben. So konnte durch Hemmung von Immuncheckpoints und einen gezielten Eingriff in den EGFR-Signalweg der Zustand eines Patienten mit metastasiertem EP über zwei Jahre stabilisiert werden.[44] Der p53-Signalweg, die gezielte Hemmung der PARP,[63] und die YAP1/TEAD-abhängige Transkription,[62] sind Ansatzmöglichkeiten für neue Therapieoptionen. Doch trotz aller Fortschritte ist die Tumorerheterogenität beim EP ein bisher wenig verstandenes Phänomen.[13]

Von großer Bedeutung ist auch die Einrichtung eines Patientenregisters für seltene Tumorerkrankungen. Nur so können Tumorerheterogenität und ihre Auswirkung auf Therapie und Prognose verstanden werden.[13]

In Europa spricht man dann von einer seltenen Erkrankung, wenn sie weniger als eine von 2000 Personen betrifft.[85] Von einer seltenen Krebserkrankung wird bei einer Inzidenz von weniger als 6 pro 100 000 Personenjahre gesprochen.[86] Die Inzidenz von EP variiert in der Literatur von 0,02 und 1,9 pro 100 000 Personenjahre, wie in Kapitel 1.2.1 aufgeführt. Daher zählt es zu den seltenen Krebserkrankungen.

Seltene Krebserkrankungen machen ca. 24% aller Krebserkrankungen aus. Auch wenn die Gruppe dieser Erkrankungen heterogen ist, so treten für jede Form der seltenen Tumore vergleichbare Problemlagen auf, wie z.B. Schwierigkeiten bei der Diagnosestellung, Mangel an Therapien und erschwerte Forschungsbedingungen.[87]

Für seltene Erkrankungen bilden Patientenregister die unabdingbare Grundlage, um ausreichende Stichprobengrößen für die Forschung zu gewinnen.[85]

In einem Register werden patientenbezogene Daten systematisch zum Zwecke der wissenschaftlichen Beschreibung und Analyse von Krankheitsverläufen oder Behandlungsfolgen zusammengetragen. Um die Brauchbarkeit von Datensammlungen sicherzustellen, müssen einheitliche Begrifflichkeiten und Dokumentationsregeln beachtet werden.[88]

Register spielen eine entscheidende Rolle bei Erforschung von Krankheitsverläufen und für die Entwicklung und Überprüfung von Therapien sowie das Auffinden von Biomarkern, insbesondere bei seltenen Krebserkrankungen.[88, 89]

Das Projekt RARECARENet ist ein wichtiges Informationsnetzwerk für seltene Krebserkrankungen in Europa. Ein bedeutendes Ziel besteht darin, Daten aus verschiedenen europäischen Krebsregistern zu sammeln und in eine gemeinsame Datenbank zu integrieren, um eine umfassende Überwachung und Erforschung seltener Krebserkrankungen zu ermöglichen. Dabei ist die Standardisierung der Daten zwischen den verschiedenen Registern ein entscheidendes Teilerziel, um die Datenqualität zu verbessern.[90] Gerade für die Register für seltene Erkrankungen besteht ein hohes Potential von der Digitalisierung im Gesundheitswesen zu profitieren, denn die Datenzusammenführung spielt hier eine entscheidende Rolle.[91]

Ein systematisches internationales Patientenregister würde die weitere Forschung für EP deutlich erleichtern. Neben allen Vorteilen der Datenzusammenführung würde auch die Probengewinnung für weitere Studien vereinfacht.

3.1.2 Herunterregulierung zahlreicher DEG in EP

Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigten eine Herunterregulierung zahlreicher Gene in den EP. Diese Herunterregulierung war sowohl im Vergleich zu normalen Geweben als auch im intertumoralen Vergleich zwischen den EP-Clustern zu erkennen. Die CL1EP wiesen gegenüber CL2EP eine Herunterregulierung auf. Eine überwiegende Herunterregulierung von Genen in den Tumorproben zeigte sich in allen durchgeführten Genexpressionsvergleichen, wie in der Tabelle 1 und der Abbildung 2b-e aus Holst et al. dargestellt.[13]

Epigenetische Regulationsmechanismen, welche zur Unterdrückung der Genexpression führen, könnten diese Ergebnisse erklären.[13] So kann die Genexpression von Tumorsuppressorgen durch diese Mechanismen unterdrückt werden, was zu einem *Silencing* dieser Gene führt. Ein solches Stummschalten von Tumorsuppressorgen wird in der jüngsten Literatur als initial treibendes Ereignis in der Entwicklung bösartiger Tumore beschrieben.[13, 92-94]

Mögliche epigenetische Veränderungen sind z. B. DNA-Methylierung, Histonmodifikationen und RNA-Veränderungen. Durch diese reversiblen, aber vererbaren Modifikationen entstehen veränderte Genexpressionsmuster.[95] In zahlreichen Studien sind epigenetische Veränderungen für kutane Neoplasmen untersucht und auch gefunden worden. So fanden Goldberg et al. in 88% ihrer untersuchten BCC eine Promoter- Methylierung für das Tumorsuppressorgen

Fragile Histidine Triad Protein (FHIT). [96] Murao et al. fanden Hypermethylierung für mehrere Tumorsuppressorgene bei SCC, wobei die Promotorregion von *Cadherin 1 (CDH1)* in 95% der untersuchten SCC hypermethyliert war. Dieses Gen unterdrückt Invasion und Metastasierung. [97]

Auch für das maligne Melanom konnten spezifische DNA-Methylierungen gefunden werden. Eine globale DNA-Hypomethylierung trug zur Immuntherapieresistenz bei. Dies liegt ursächlich an der Förderung der Expression des Gens *Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1)*. [98] Promoter spezifische DNA-Hypermethylierungen wurden für zahlreiche Tumorsuppressorgene in verschiedenen Studien nachgewiesen, z.B. für das Gen *PTEN*, wobei diese Hypermethylierung ein negativer prognostischer Marker für das Überleben beim malignen Melanom ist. [99] Eine Hochregulierung von DNA-Methyltransferasen (DNMT) wurde in metastasierten Melanomen im Vergleich zu Nävi gefunden. Diese epigenetische Veränderung korrelierte mit Proliferation und Tumorprogression. [100, 101]

Der Grad der DNA-Methylierung könnte als Biomarker z.B. zur Unterscheidung zwischen Nävi und malignen Melanomen und zur Verlaufskontrolle dienen. [102] In einem Melanom-Maus-Modell konnte die Behandlung mit DNMT zu einer Verbesserung der Immuntherapie führen. [103]

Auch wenn viele Zusammenhänge noch nicht verstanden sind, können epigenetische Analysen zu einem besseren Verständnis der Tumorentstehung und Progression führen. Sie bieten eine interessante Basis für Biomarker und Therapieansätze. [95, 102]

DNA-Methylierungsanalysen und auch Untersuchungen zu möglichen Histonmodifikation sind für EP nach momentaner Studiensichtung noch nicht durchgeführt worden und stellen somit einen zukünftigen Studienansatz dar. [13]

Die mittels qPCR validierten Genexpressionsdaten wiesen in EP sowohl die Herunterregulierung für Gene auf, die als Tumorsuppressoren bekannt sind als auch für onkogene Treibergene. Zu den erfolgreich validierten Genen zählten *NDGR1*, *SRRM2*, *CDC42*, *ANXA2*, *CD74*, *KFL9* und mit Trend zur Herunterregulierung auch *NOP53*. [13]

Einige dieser herunterregulierten Gene sind Bestandteile zentraler onkogener Signalwege. Im Zusammenhang mit der EP-Entwicklung sind die obig genannten Gene in der Literatur noch nicht erwähnt worden. Sie könnten auf zusätzliche Wege der Tumorgenese hinweisen. Einige Gene sind jedoch in Achsen integriert, die schon im Rahmen der EP-Forschung oder in Korrelation mit anderen Hauttumoren erwähnt wurden. [13]

Die obig genannten Gene werden nun im wissenschaftlichen Kontext in Bezug auf ihre Rolle bei der Krebsentwicklung diskutiert.

NDGRI, [104, 105] und **NOP53**, [106] werden in der Literatur überwiegend als Tumorsuppressoren beschrieben und sind in die sogenannte p53-Achse involviert. [13]

Das Protein p53, von zentraler Bedeutung für die Erhaltung des Genoms, wirkt tumorsuppressiv, da es den Zellzyklus unterbricht und bei DNA-Schäden und onkogener Transformation Apoptose einleitet. [13, 107]

Die Expression von *NDGRI*, welches an der Regulation der Zentrosomenzahl beteiligt ist, wird nach einer DNA-Schädigung in Abhängigkeit von p53 ausgelöst. Die Expression von *NDGRI* ist nicht ausreichend, wenn ein homozygoter Verlust von *TP53* vorliegt. Dies führt zu einer abnormen Zentrosomenzahl und genomischer Instabilität. [13, 108] Die Promotorregion des *NDGRI*-Gens enthält eine p53-Bindungsstelle, die eine p53-abhängige Transkriptionsaktivierung ermöglicht. Ansätze zur RNA-Interferenz und induzierbaren Genexpression legen nahe, dass *NDGRI* eine wichtige Rolle bei der p53-vermittelten Caspase-Aktivierung und Apoptose spielt. [109] *NDGRI* hat die Fähigkeit *EGFR* herunterzuregulieren. Seine antionkogene Wirkung, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, macht dieses Gen zu einem interessanten therapeutischen Ziel. [104, 105] Die Ergebnisse dieser Studie unterstreichen die Bedeutung von *NDGRI* als Tumorsuppressor. [13]

NOP53 (früher als *Glioma Tumor Suppressor Candidate Region Gen 2*, *GLTSCR2* bezeichnet) steuert die Expression von DNA-Reparatur-Proteinen und die p53-Expression über den *Murine Double Minute 2* (MDM2) -vermittelten Polyubiquitinierungsweg und moduliert darüber die Reaktion auf DNA-Schäden. Folgenreich für die Zellen ist eine verminderte Expression von *NOP53*, denn die DNA-Reparatur ist dann verzögert und die Aktivierung des G2/M-*Checkpoints* wird ausgeschaltet. [13, 106] Bei ribosomalem Stress verlagert sich *NOP53* in das Nukleoplasma, interagiert mit p53 und stabilisiert es. Darüber hinaus hemmt die ektopische Expression von *NOP53* das Wachstum von Krebszellen in einem *Xenograft*-Tiermodell über den p53-abhängigen Weg erheblich. Es wurde vorgeschlagen, dass es ein neues Mitglied der Nukleolus-Nukleoplasma-Achse für die Regulierung von p53 ist. [110]

Es konnte im Rahmen der Studie von Denisova et al. gezeigt werden, dass die p53-Achse in die EP-Entstehung involviert ist. [63] Die Ergebnisse im Rahmen der vorliegenden Studie unterstreichen, dass ein Eingriff in diese Achse ein erfolgsversprechender Therapieansatz sein könnte. [13]

NDGR1 und *NOP53* sind auch in den PI3K-AKT-Signalweg integriert. Bei diesem Signalweg handelt es sich um einen der am häufigsten aktivierten Signalübertragungswege in der Tumorentwicklung. Er beeinflusst die intrazelluläre Signaltransduktionsreaktion auf extrazelluläre Signale. Dies geschieht durch Serin- und/oder Threonin-Phosphorylierung einer Reihe von nachgeschalteten Substraten.[13, 111]

SRRM2 codiert für ein Protein, welches als Spleißfaktor agiert, dabei das alternative Spleißen reguliert und an der Organisation der Kernflecken während des Zellzyklus beteiligt ist. Bei Mangel an *SRRM2* können bestimmte Genabschnitte, sogenannte Kassetten-Exons, falsch geschnitten werden, was zur Veränderung großer Proteinbereiche führen kann.[13, 112]

Defekte im alternativen Spleißen sind häufig bei menschlichen Tumoren zu finden. RNA-Spleißregulatoren wurden jüngst als neue Proteinklasse identifiziert, die als Onkoproteine oder Tumorsuppressoren agieren können. Sie können auf unterschiedliche zelluläre Prozesse einwirken, darunter die epigenetische Regulierung und die Reaktion auf DNA-Schäden.[13, 113] Die Dysregulation des alternativen Spleißens erweist sich als mögliche Basis für neuartige therapeutische Ziele und Biomarker für das Fortschreiten bei Tumorerkrankungen.[114]

Die Ergebnisse dieser Untersuchung könnten auf Spleißdysregulationen im Rahmen der EP-Entwicklung hindeuten.[13]

CDC42 ist an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt. Dazu zählen Proliferation, Transformation, Homöostase sowie Migrations- und Invasionsprozesse.[13, 115, 116] In Studien wird von Wirkungen als Onkogen als auch als Tumorsuppressor berichtet, wobei *CDC42* eine Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Zelldifferenzierung und für die Regulierung der Progenitorproliferation zugeschrieben wird.[13, 115]

In einem Mausmodell führte heterozygoter *CDC42*-Mangel zu erhöhter Proliferation und verminderter Keratozyten-Apoptose sowie zu einer Schädigung von *Tight Junctions*, *Adherens Junctions* und Desmosomen. *CDC42* scheint somit eine wichtige Rolle für die Hautentwicklung und Hautbarrierefunktion einzunehmen.[13, 117]

ANXA2 zählt zur Familie der Calcium-vermittelten Phospholipid-bindenden Proteine der Annexine. *ANXA2* werden vielfältige Funktionen im intra- und extrazellulären Kontext zugeschrieben. Es präsentiert sich in vier Formen: zytoplasmatisch, an die Oberflächenmembran gebunden, kernständig und sezerniert.[13, 118] In der Literatur wird *ANXA2* als überwiegend als Onkogen beschrieben. Für zahlreiche Krebsarten wird Überexpression von *ANXA2* berichtet, so z.B. bei Brustkrebs und dem hepatozellulären Karzinom sowie verschiedenen Leukämieformen. Diese führt zum Fortschreiten, zur Metastasierung und zur Arzneimittelresistenz. Eine

verstärkte Angiogenese könnte mit der veränderten *ANXA2*-Expression in Verbindung stehen. Diese Erkenntnisse rücken antiangiogene Krebstherapien als interessante therapeutische Ziele in den Fokus.[13, 119]

Bei wenigen Krebsarten wirkt *ANXA2* als Tumorsuppressor, so bei dem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus, Osteosarkom und Prostata-Krebs.[118]

CD74 kodiert für einen Zelloberflächenrezeptor, der in vielen Zelltypen vorkommt und ist in die Antigenpräsentation bei der Immunantwort eingebunden.[13, 120] Studien von Zeiner et al. zu Hirnmetastasen zeigten heterogene Expressionsniveaus von *CD74* in derselben Tumorentität, wobei niedrige *CD74*-Proteinexpression mit *CD74*-Promotor-Methylierung einhergeht.[121]

Ein Risiko für zahlreiche entzündliche Erkrankungen und bösartige Tumore stellt das Zytokin Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) über die Bindung an den *CD74*-Rezeptor und die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege dar, wie zahlreiche Studien berichten. Zudem wird in der Literatur die Bedeutung von MIF bei der Regulierung der angeborenen und adaptiven Immunität hervorgehoben.[13, 122, 123]

Ogata et al. untersuchten die MIF/*CD74*-Achse und schlugen *CD74* als prognostischen Tumormarker vor, der mit einem guten Überleben bei Melanomen im Stadium III und IV assoziiert ist, [124] MIF-Inhibition soll zudem zur Überwindung der Resistenz gegen eine Immun-Checkpoint-Blockade-Therapie beim Melanom beitragen.[13, 125]

KLF9 steuert als DNA-bindender Transkriptionsregulator zentrale zelluläre Prozesse. Dazu zählen Proliferation, Differenzierung, Migration und Erhaltung der Pluripotenz.[13, 126, 127] Durch die tageszeitliche Kontrolle der Genexpression von Zielgenen nimmt es Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten.[13, 128].

Bagati et al. stellen heraus, dass *KLF9* bei mehreren Arten von menschlichen Krebsarten herunterreguliert war. Sie untersuchten selbst das Expressionsmuster von *KLF9* in metastatischen Melanomzellen und normalen menschlichen Melanozyten (NHM). Dabei wurde in metastasierenden Melanomzellen im Vergleich zu NHM ein signifikanter Rückgang der *KLF9*-Proteinexpression beobachtet. Messung der *KLF9*-Proteinexpression in menschlichen Melanomproben mittels Immunhistochemie ergab einen sinkenden *KLF9*-Spiegel mit zunehmender Melanomprogression. Funktionell legten sie einen Zusammenhang zwischen der *KLF9*-Expression und der Reactive Oxygen Species (ROS)-Regulation nahe.[129]

Xing et al. zeigten in einer Studie zum SCC, dass Herunterregulierung von *KLF9* die hemmende Wirkung des Knockdowns von *6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Biphosphatase 3*

(*PFKFB3*) auf die Proliferation, Metastasierung und aerobe Glykolyse von SCC-Zellen aufhebt. Somit wird wohl *PFKFB3* durch *KLF9* transkriptionell reguliert. *PFKFB3-Silencing* durch *KLF9* hemmt die Proliferation, Metastasierung und aerobe Glykolyse von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen.[130] Die Ergebnisse der vorliegenden Studie haben eine signifikante verminderte Expression von *KLF9* in EP aufgezeigt. Dies war kennzeichnend für die CL2EP und entspricht den Ergebnissen von Studien zu anderen Hauttumoren. So wurde eine verminderte Expression dieses Gens auch bei malignen Melanomen und Plattenepithelkarzinomen der Haut festgestellt.[13, 129]

Die Ergebnisse dieser Studie zu den in den Tumorproben differentiell exprimierten und erfolgreich validierten Gene zeigen mögliche neue Wege der EP-Entwicklung auf.[13] Die aufgeführten Gene sind bei verschiedenen Tumorerkrankungen schon in der Literatur als Onkogen oder Tumorsuppressor beschrieben worden, für das EP jedoch nicht. Bemerkenswert ist die Bedeutung von *KLF9* und *CD74* für die Karzinogenese auch anderer Hauttumore. Die Studienergebnisse verdeutlichen die Leistungsfähigkeit der Genexpressionsprofilierung bei soliden Tumoren. Damit wird ein besseres Verständnis der molekularen Ursachen von EP möglich.[13] Die Ergebnisse helfen, wissenschaftliche Erkenntnisse auf molekularer Ebene voranzutreiben und in zukunftsweisende klinische Studien einzubringen, die neue Medikamente und vielversprechende Behandlungsansätze untersuchen.[13, 44]

3.1.3 EPO als potenzielles Übergangsstadium in der EP-Entwicklung

Um den Prozess der EP-Karzinogenese weiter zu entschlüsseln, sind im Rahmen dieser Studie die Ergebnisse der *Microarray* basierten Genexpressionsanalyse nicht nur in weiteren EP- und NH-Proben, sondern auch in einer Kohorte von EPO-Proben weiter untersucht worden. Die Studienergebnisse wiesen aus, dass die Expressionsniveaus mehrerer untersuchter Gene in EPO zwischen denen in EP und NH lagen. So zeigten *CD74*, *NDGR1*, *SRRM2*, *ANXA2* und *NOP53* eine schrittweise verringerte Expression von NH über EPO zu EP auf.[13]

Die Entdeckung einer bösartigen Tumorerkrankung in einem frühen Stadium vor einer weitreichenden lokalen Invasion und/oder metastatischen Ausbreitung führt im Allgemeinen zu einer günstigeren Prognose. Eine frühzeitige Diagnose kann Morbidität und Mortalität verringern. Eine solche ist beim EP eine Herausforderung, bedingt durch das sehr variable klinische Erscheinungsbild, wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben.[13]

Die Schritte der Tumorevolution des EP sind nur ansatzweise bekannt. Dies unterstreicht die Notwendigkeit zu verstehen, wie somatische und molekulare Faktoren zur Krebsentstehung und -progression beitragen.[13] Es wird in der Literatur beschrieben, dass bis zu 18% der EP auf dem Boden eines EPO entstanden sind und somit EPO höchstwahrscheinlich als Vorläuferläsionen zu klassifizieren sind.[18]

Um Erkenntnisse über den Weg von der Vorläuferläsion hin zum bösartigen EP gewinnen, sollten Gene identifiziert werden, die eine veränderte Expression von NH zu EPO zu EP aufweisen. Die Ergebnisse der qPCR zeigten für die obig genannten erfolgreich validierten Gene eine schrittweise verringerte Expression für die oben genannten Gene, wie in den Abbildungen 3 bis 5 von Holst et al. dargestellt.[13] Somit liegt die Schlussfolgerung nahe, dass diese Gene möglicherweise die onkogene Transformation vorantreiben. Die Ergebnisse stützen die Hypothese, dass EPO als möglicher Risikofaktor für die Entstehung von EP anzusehen sind.[13]

Gerade für Hauttumore sind die evolutionären Bahnen, die zur Tumorentstehung führen, gut beschrieben. Sie bildeten die Basis für die Identifikation molekularer Marker. Die Kenntnis dieser Marker hat zu Verbesserungen in Frühdiagnose und Therapie geführt.[13, 131, 132] Das Wissen über evolutionäre Wege der bösartigen Transformation ist von großer Bedeutung, da es eine frühe Diagnose und damit eine bessere klinische Behandlung bösartiger Hautveränderungen möglich macht.[13]

Maligne Transformation lässt sich einerseits durch die Betrachtung bösartiger Tumore als darwinistischem System erklären und verstehen. Mutation und Selektion sind dabei zentrale Faktoren der Tumorevolution und führen zur Entstehung und Ausbreitung von Clonen und Subclonen. Dabei erfolgt die Entwicklung bei jedem Menschen einzigartig. Die Anzahl der Mutationen reicht von wenigen bis zu Hunderttausenden, wobei die *Passenger*-Mutationen von der Anzahl her die *Treiber*-Mutation deutlich übersteigen.[13, 133]

Doch nicht nur Mutation und Selektion treiben die Tumorentwicklung voran. Auch genetisch identische Tumorzellen können eine hohe Plastizität aufweisen. Intratumorale Heterogenität findet ihre Grundlage z. B. auch in epigenetischen Veränderungen wie z.B. einem hohen Grad von DNA-Methylierung, alternativen Spleißmustern, Transkriptionsplastizität und der Wechselwirkung mit der Mikroumgebung.[13, 133, 134]

Führen die obig genannten Veränderungen zur Entwicklung neuer Eigenschaften im Bereich von Proliferation, Migration und Invasion, so kann dies die Malignität antreiben. Nur wenige Mutationen bieten einen Vorteil zum Überleben und zur Ausbreitung der Krebszellen im

Gewebe. Dies zeigt auch die Häufigkeit von prämaligen Läsionen verglichen mit der Anzahl bösartiger Tumore.[13, 134]

Die Ergebnisse dieser Studie liefern Einblicke in mögliche Mechanismen der malignen Transformation vom EPO zum EP. Sie unterstreichen die Bedeutung einer konsequenten Diagnose und Behandlung von EPO sowie eines vertieften Verständnisses der Entwicklungspfade bei EP.[13]

Eine klinische Konsequenz könnte sein, EPO, die insbesondere an typischen Risikolokalisationen für EP entstehen, zu überwachen oder präventiv zu exzidieren, um eine maligne Transformation zu vermeiden.

Umfassendere Untersuchungen und größere Probenanzahlen sind erforderlich, um aussagekräftigere und robustere Schlussfolgerungen ziehen zu können, wie in Abschnitt 3.2 dargelegt.

3.1.4 Dysregulation tumorrelevanter Signalwege

Auf der Basis der Ergebnisse der genomweiter Expressionsvergleiche wurde auch eine Signalweganalyse durchgeführt, wie in Tabelle 3 des *Online Supplement* der Publikation dargestellt.[13] Damit sollten die Transkriptionsmechanismen bei EP weiter erforscht und die Bedeutung der Genexpressionsveränderungen für die intra- und interzellulären Signalwege analysiert werden. Als Ergebnis zeigte sich die Dysregulation zahlreicher Krebs bezogene Signalwege. Hierzu gehörten unter anderem der Endothelin-Signalweg, der VEGFA-VEGFR2-Signalweg, der Focal-Adhesion-Signalweg, der Transforming Growth Factor (TGF)- β -Signalweg, der zytoplasmatische ribosomale Protein-Signalweg und der EGFR-Signalweg.[13]

Von besonderem Interesse ist die Entdeckung des Endothelin-Signalwegs für die Genese von EP. Endotheline steuern das Gefäßwachstum, und das Endothelin-1-System ist an der Umprogrammierung des Zellverhaltens in der Mikroumgebung des Tumors beteiligt.[135] Veränderungen in der Transkriptionsaktivität von Endothelin und seinen Rezeptoren, die an mehreren Signalwege beteiligt sind, sind für die Karzinogenese von Bedeutung und wurden für verschiedene Tumortypen, einschließlich dem Melanom, beschrieben.[136]

Immunhistochemische Studien haben gezeigt, dass die Endothelin-Signalisierung über den Mitogen-aktivierten Protein (MAP)-Kinase-Weg zum Zellwachstum in SCC beiträgt.[137] Darüber hinaus spielt der Endothelin-Signalweg nachweislich eine Schlüsselrolle bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen und pulmonaler arterieller Hypertonie (PAH). Dies hat zur

Entwicklung von Therapeutika wie Endothelin-Rezeptor-Antagonisten geführt. Hierdurch können die erhöhten Konzentrationen endogener Vasokonstriktoren gesenkt werden. Diese therapeutischen Wirkstoffe werden derzeit im Zusammenhang mit PAH untersucht, sind aber auch vielversprechende therapeutische Kandidaten im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen, deren Nutzen jedoch noch nicht erwiesen ist.[138, 139]

Darüber hinaus deuten die Daten der Signalweganalyse auf eine Beteiligung der VEGFA/VEGFR2-Achse an der Entwicklung von EP hin.[13] Diese Achse ist ein Schlüsselmediator der Angiogenese und an Wachstum, Migration und Überleben von Endothelzellen beteiligt. Sie beeinflusst zusammen mit der Endothelin-1-Achse nicht nur die Tumorzellen, sondern auch deren Mikroumgebung.[140, 141]

Dieser Signalweg ist bei Melanomen gut bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass Melanomzellen *VEGFR-1* und *-2* sowie *VEGFA* exprimieren. Hierdurch werden die Proliferation, Chemotaxis und extrazelluläre Matrixinvasion von Tumorzellen gefördert.[142] Es wurde auch von Surowy et al. gezeigt, dass dieser Signalweg möglicherweise an der Entwicklung des ADPA beteiligt ist, einem anderen seltenen Schweißdrüsentumor, der vorwiegend in den Schweißdrüsen der Finger und Zehen entsteht.[69] Medikamente, die auf die VEGF/VEGFR-Achse abzielen, sind bereits verfügbar und könnten somit eine mögliche Therapieoption bei der Behandlung von Schweißdrüsenkarzinomen darstellen, um die Angiogenese zu hemmen.

Der TGF- β -Signalweg ist an der Regulierung von Wachstum, Entwicklung, Homöostase und des Immunsystems beteiligt. Diese Signalkaskade kann sowohl tumorsuppressive Wirkungen haben, indem sie die Zellproliferation hemmt und die Differenzierung in normale Zellen fördert, als auch onkogene Wirkungen bei fortgeschrittenem Krebs, indem sie das Fortschreiten des Tumors und die Metastasierung fördert.[143]

Die Übertragung von TGF- β -Signalen spielt eine Rolle bei der Weiterentwicklung verschiedener Krebsarten, indem sie die Bewegung von Zellen verstärkt, die Eindringung von Krebszellen unterstützt und die Reaktionen des Immunsystems unterdrückt. Beim malignen Melanom wurde festgestellt, dass erhöhte Expression von TGF- β das Fortschreiten des Tumors begünstigt. Es beeinflusst die Tumorplastizität und die Antitumorimmunität. Die zusätzliche Rolle als Tumorsuppressor ist bei der Entwicklung von Antitumormedikamenten zu beachten.[144]

Der Focal-Adhesion-Signalweg, beeinflusst mit dem wichtigsten Regulator, der fokale Adhäsionskinase, die Signalübertragung durch Zelloberflächenrezeptoren in normalen und Krebszellen identifiziert wurde. Dieses Protein ist in menschlichen Krebszellen häufig überexprimiert. Es steuert die Aktivitäten von Krebszellen sowie der Tumormikroumgebung. Das

umfasst die Regulation von Zellwanderung, Invasion und der Angiogenese. Inhibitoren dieses Proteins haben sich als wirksame antitumorale Medikamente erwiesen.[145, 146]

Der zytoplasmatische ribosomale Protein-Signalweg ist mit der Koordination der Ribosomen-Genese verknüpft. Die cytoplasmatischen ribosomalen Proteine sind bedeutsam für den Ribosomenaufbau, haben aber teilweise auch Ribosomen unabhängige Funktionen wie z.B. Aktivierung des p53-Signalweges bei zellulärem Stress und Regulation des Zellzyklus. Die Expression von cytoplasmatischen ribosomalen Proteinen während der Tumorentstehung ist häufig verändert, die Produktion von Ribosomen erhöht. Der Einsatz einiger solcher Proteine als Biomarker und molekulare Ziele in der Krebsbehandlung wird diskutiert und hat erste Erfolge gezeigt.[147, 148]

Die Ergebnisse, die hier gefunden wurden, bestätigen zudem die Relevanz der EGFR-gerichteten Therapie, die bei der Behandlung von EP erste therapeutische Erfolge gezeigt hat.[13, 44] Denn im Rahmen der Signalweganalyse ergab sich eine signifikante Dysregulation des EGFR-Signalweges in den CL1EP im Vergleich mit CL2EP. Die Ergebnisse sind in der *Online Supplement* Tabelle 3 der Publikation visualisiert.[13]

EGFR ist ein wichtiger Zellwachstum und -differenzierung regulierender Rezeptor und gehört zur Rezeptorfamilie der Tyrosinkinase. EGFR und seine Wachstumsfaktorliganden treiben fördern die Entstehung und Progression einiger Krebsarten. Sie sind beliebte Ziele für Krebstherapien, wobei die Entwicklung von Resistenzen ein großes Problem darstellt.[149]

Bis auf den EGFR-Signalweg, der schon eine Therapieoption für das EP ist, handelt es bei den anderen gefundenen Signalwege nicht um derzeitige, sondern zukünftige Therapieoptionen für das EP, die durch weitere Forschung bestätigt werden sollten.[13]

Keiner der aufgedeckte veränderten Signalwege war jedoch in allen vier Vergleichen durchgängig dysreguliert. Im Rahmen der Studie konnten keine Signalwege identifiziert werden, die eindeutig einem der beiden matrisomalen Cluster zugeordnet werden konnten. Dies unterstreicht die Wichtigkeit, die Ergebnisse an noch größere Kohorten von EP- und EPO-Patienten zu überprüfen.[13]

3.2 Limitationen

Die Aussagekraft dieser Studie könnte durch mehrere Faktoren wie die Auswahl der Untersuchungsmethoden und die Qualität und Quantität der Proben eingeschränkt sein.

Während *Microarrays* die vorherrschende Transkriptom-Untersuchungsmethode der letzten zwei Jahrzehnte waren, wird heute zunehmend die RNA-Sequenzierung eingesetzt. *Microarray*-Untersuchungen bieten aufgrund der geringen Kosten und der Verfügbarkeit für Genom weite Expressionsanalysen Vorteile, brauchen jedoch eine Referenz zur Sondengestaltung. Die RNA-Sequenzierung hat einen höheren dynamischen Bereich und ist besser geeignet, Transkripte mit geringer Häufigkeit zu identifizieren und die Erkennung und Analyse neuartiger Transkripte zu erleichtern.[150] Dennoch wird beiden Verfahren eine ähnliche Leistungsfähigkeit zugeschrieben.[151] Obwohl Datenbanken von Genexpressionsdaten, die mittels *Microarray*-Technologie generiert wurden, weiterhin von Nutzen sind,[151] bietet die RNA-Sequenzierung eine vielversprechende Alternative für zukünftige EP-Studien.

Trotz fortschrittlicher Technologien und Fortschritte auf dem Gebiet der Krebsforschung ist die molekulare Architektur insbesondere seltener bösartiger Erkrankungen wie dem hier in der Studie untersuchten EP nach wie vor unbekannt. Der Datenmangel zur Biologie von Schweißdrüsenkarzinomen liegt zum einen in ihrer Seltenheit begründet. Dadurch sind Patientenkohorten klein und weit verstreut. Die diagnostischen Herausforderungen und die Abgrenzung von möglichen Differentialdiagnosen führen wohl zudem zu einer gewissen Rate an übersehenen Fällen. Des Weiteren macht der Mangel an frisch gefrorenen Gewebeproben herausfordernde molekulare Analysen mit FFPE-Gewebe nötig, welches oft nur in geringer Menge und schlechter Qualität verfügbar ist. Diese genannten Faktoren wurden bereits von Surowy et al. aufgeführt.[69] FFPE-Gewebe stellen eine wertvolle Ressource in der klinischen Praxis dar, die im alltäglichen diagnostischen Umfeld vielseitig eingesetzt wird.[152] Es ist die geläufigste Methode zur Gewebekonservierung in der Pathologie. Die Stabilität bei Raumtemperatur und die Eignung für langfristige Lagerung sind Vorteile von FFPE-Proben.[153] Es gibt große Probenarchive weltweit. Darüber hinaus steigert die Präsenz umfassender klinischer *Follow-up*-Daten die Relevanz dieser Archive.[154] Die Konservierung mit Formalin führt jedoch zu einer Degradation der RNA durch Vernetzung von Molekülen und Fragmentierung, was eine erhebliche Beeinträchtigung für weitere Analysen darstellt.[155, 156]

Daher ist es herausfordernd, hochwertige RNA aus FFPE-Gewebe für Genexpressionsanalysen zu gewinnen. Studien zeigen jedoch, dass bereits aus 2ng RNA, die aus FFPE-Gewebe generiert

wurden, reproduzierbare *Microarray*-Ergebnisse im Vergleich mit frisch gefrorenem Gewebe erzielt werden konnten.[157] Um die RNA-Isolierung zu optimieren, gilt es mehrere Schritte und Faktoren zu berücksichtigen.[156, 157] Die Anwendung von Proteinase K zur Gewebelyse ist unverzichtbar und in sämtlichen gebräuchlichen Analysekits enthalten.[156] Durch eine Verlängerung der Gewebelysezeit auf 10 Stunden während der RNA-Isolation wird das Auftreten langkettiger RNA-Moleküle verringert, während eine zusätzliche Inkubation bei 70 °C signifikant zu einer Erhöhung der RNA-Ausbeute führt.[157]

Die Beurteilung der RNA- Qualität ist zudem zwingend erforderlich. Höhere RIN-Werte verbessern die Detektionsrate in der qPCR. Zusätzlich zur RNA-Qualität sind weitere Faktoren bei FFPE-Gewebe wichtig für die qPCR. Die cDNA-Synthese sollte mit zufälligen Primern erfolgen, um die Konversionsrate zu verbessern. Darüber hinaus kann eine cDNA-Voramplifikation und Gen spezifisches *Priming* die Empfindlichkeit der qPCR erhöhen.[158]

Im Rahmen dieser Studie wurden die wesentlichen der hier aufgeführten Aspekte der verbesserten Analyse-Arbeit mit FFPE-Gewebe berücksichtigt und experimentell umgesetzt. Die begrenzte Verfügbarkeit von frischem Gewebe, insbesondere aufgrund der Seltenheit von EP ist dennoch eine bedeutende Einschränkung. Um dieser Herausforderung zu begegnen und die Forschung auf diesem Gebiet voranzutreiben, ist eine verstärkte Zusammenarbeit zwischen verschiedenen medizinischen Einrichtungen erforderlich. Die Etablierung von Netzwerken oder Kollaborationen zwischen Kliniken und Forschungseinrichtungen könnte den Zugang zu frischen Gewebeproben erleichtern.

Weiterhin kann die Aussagekraft der Studie durch die geringe Anzahl an Proben und die geringe Menge an genetischen Markern eingeschränkt sein. Ein umfassenderer Ansatz in größeren Kohorten ist erforderlich, um die Ergebnisse zu untermauern. Nichtsdestotrotz liefern diese Einblicke in die Tumorbilogie von EP und die möglichen Mechanismen der malignen Transformation.[13]

3.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie lieferten Einblicke in die Transkriptionsprofile von EP-Tumoren und zeigten Hinweise auf wichtige onkogene Antriebswege. Sie identifizierten Tumorsubtypen mit deutlichen Unterschieden in der Genexpression und legen damit für EP eine Tumorerogenität nahe. Eine überwiegende Herunterregulierung von Genen in den EP-Tumoren deutet

darauf hin, dass epigenetische Regulationsmechanismen, wie DNA-Methylierung, eine Rolle spielen könnten. Dies legt nahe, dass zukünftige Studien zu epigenetischen Veränderungen potenzielle Biomarker und therapeutische Ansätze identifizieren könnten.[13]

Die Ergebnisse zeigten eine verringerte Expression krebsassoziierter Gene in den EP-Tumoren, darunter *KLF9* und *CD74*. [13] Für beide Gene wurde dies auch schon bei anderen Hauttumoren beschrieben. Die könnte darauf hindeuten, dass ähnliche Antriebswege eine Rolle spielen.

Die festgestellte schrittweise reduzierte Expression einiger Gene von NH über EPO zu EP legen zudem nahe, dass EPO mögliche Vorläuferläsionen von EP darstellen.[13]

Die Untersuchungen bestätigten die Involvierung der p53-Achse und des EGFR-Signalwegs an der Ätiologie von EP, was in Einklang mit früheren Forschungen steht. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine gezielte Beeinflussung der p53-Achse und des EGFR-Signalwegs vielversprechende Behandlungsansätze repräsentieren.[13] Zusätzlich wurden weitere dysregulierte Signalwege entdeckt, darunter der Endothelin- und der VEGFA-VEGFR2- Signalweg.[13] Die Studie unterstreicht die Komplexität der Tumorigenese von EP und bietet Einblicke in die evolutionären Pfade der Tumorentstehung und -progression. Das Verständnis der Vielfalt von EP-Tumoren und ihrer molekularen Eigenschaften sollte durch ganzheitliche Forschungsansätze mit Einbindung von EPO vertieft und in klinische Studien umgesetzt werden.[13]

Um die Mechanismen der EP-Tumorentwicklung besser zu erfassen, ist die Einrichtung eines systematischen internationalen Patientenregisters ein wichtiger Schritt.[13] Dieses würde die Verfügbarkeit von Proben erhöhen und dadurch molekulare Studien mit aussagekräftigen Ergebnissen ermöglichen. Darüber hinaus könnte es die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze beschleunigen.

Zusammenfassend bietet diese Dissertation eine solide Grundlage für weiterführende Forschung unter Einbeziehung möglicher klinischer Anwendungen. Zur Bestätigung der Ergebnisse sind weitere Untersuchungen mit einer noch größeren Probenzahl erforderlich.[13]

Personalisierte Medizin könnte dazu beitragen, diese Erkenntnisse in effektive, individuell angepasste Behandlungen umzusetzen, um die bestmöglichen Ergebnisse für Patienten mit EP zu erzielen.

4 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Heckmann M. Erkrankungen der Schweißdrüsen. In: Plewig G, Ruzicka T, Kaufmann R, Hertl M: *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2018: 1337-1349.
2. Sato K, et al. Biology of sweat glands and their disorders. I. Normal sweat gland function. *J Am Acad Dermatol*. 1989;20:537-563.
3. Held L, Metzler G, Schaller M. Histologische Strukturen der normalen Haut. In: Cerroni L, Garbe C, Metze D, Kutzner H, Kerl H: *Histopathologie der Haut*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015: 1-21.
4. Wilke K, et al. A short history of sweat gland biology. *Int J Cosmet Sci*. 2007;29:169-179.
5. Rütten A. Schweißdrüsentumoren mit apokriner und ekkriner Differenzierung. In: Cerroni L, Garbe C, Metze D, Kutzner H, Kerl H: *Histopathologie der Haut*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015: 1-39.
6. Sato K, Leidal R, Sato F. Morphology and development of an apoecrine sweat gland in human axillae. *Am J Physiol*. 1987;252:R166-180.
7. Rütten A. Ekkrine Schweißdrüsenkarzinome der Haut. *Pathologe*. 2002;23:79-88.
8. Rütten A, Requena L. Schweißdrüsenkarzinome der Haut. *Hautarzt*. 2008;59:151-160.
9. Rütten A. Tumoren der Hautadnexe. In: Plewig G, Ruzicka T, Kaufmann R, Hertl M: *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2018: 1829-1849.
10. Cardoso JC, Calonje E. Malignant sweat gland tumours: an update. *Histopathology*. 2015;67:589-606.
11. Obaidat NA, Alsaad KO, Ghazarian D. Skin adnexal neoplasms--part 2: an approach to tumours of cutaneous sweat glands. *J Clin Pathol*. 2007;60:145-159.
12. De Giorgi V, et al. The burden of cutaneous adnexal carcinomas and the risk of associated squamous cell carcinoma: a population-based study. *Br J Dermatol*. 2019;180:565-573.
13. Holst S, et al. Gene expression profiling in eccrine porocarcinoma indicates heterogeneous tumour development and substantiates poromas as likely precursor lesions. *JDDG*. 2024;22:1115-1124.
14. Pinkus H, Mehregan AH. Epidermotropic Eccrine Carcinoma. A Case Combining Features of Eccrine Poroma and Paget's Dermatitis. *Arch Dermatol*. 1963;88:597-606.
15. Mishima Y, Morioka S. Oncogenic differentiation of the intraepidermal eccrine sweat duct: eccrine poroma, poroepithelioma and porocarcinoma. *Dermatologica*. 1969;138:238-250.
16. Nazemi A, et al. Eccrine Porocarcinoma: New Insights and a Systematic Review of the Literature. *Dermatol Surg*. 2018;44:1247-1261.
17. Elder DE, et al. *WHO Classification of Skin Tumours: WHO Classification of Tumours, Volume 11*. World Health Organization. 2018.
18. Robson A, et al. Eccrine porocarcinoma (malignant eccrine poroma): a clinicopathologic study of 69 cases. *Am J Surg Pathol*. 2001;25:710-720.

19. Le NS, et al. Eccrine porocarcinoma of the head and neck: Meta-analysis of 120 cases. *Head Neck*. 2020;42:2644-2659.
20. Salih AM, et al. Porocarcinoma; presentation and management, a meta-analysis of 453 cases. *Ann Med Surg (Lond)*. 2017;20:74-79.
21. Poiaras Baptista A, et al. Eccrine porocarcinoma. A review of 24 cases. *Ann Dermatol Venereol*. 1993;120:107-115.
22. Sawaya JL, Khachemoune A. Poroma: a review of eccrine, apocrine, and malignant forms. *Int J Dermatol*. 2014;53:1053-1061.
23. Miyamoto K, et al. Diagnosis and Management of Porocarcinoma. *Cancers (Basel)*. 2022;14.
24. Merilainen AS, et al. Malignant Eccrine Porocarcinoma in Finland During 2007 to 2017. *Acta Derm Venereol*. 2021;101:adv00363.
25. Goon PKC, et al. Eccrine Porocarcinoma of the Skin is Rising in Incidence in the East of England. *Acta Derm Venereol*. 2018;98:991-992.
26. Huet P, et al. Metastasizing eccrine porocarcinoma: report of a case and review of the literature. *J Am Acad Dermatol*. 1996;35:860-864.
27. Brown CW, Jr., Dy LC. Eccrine porocarcinoma. *Dermatol Ther*. 2008;21:433-438.
28. Riera-Leal L, et al. Eccrine porocarcinoma: epidemiologic and histopathologic characteristics. *Int J Dermatol*. 2015;54:580-586.
29. Perna C, et al. Eccrine porocarcinoma (malignant eccrine poroma). *Am J Surg Pathol*. 2002;26:272-274.
30. Beer TW, Shepherd P, Theaker JM. Ber EP4 and epithelial membrane antigen aid distinction of basal cell, squamous cell and basosquamous carcinomas of the skin. *Histopathology*. 2000;37:218-223.
31. Goto K, et al. Comparison of Immunohistochemical Expression of Cytokeratin 19, c-KIT, BerEP4, GATA3, and NUTM1 Between Porocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma. *Am J Dermatopathol*. 2021;43:781-787.
32. Goto K, et al. CD117 (KIT) is a useful immunohistochemical marker for differentiating porocarcinoma from squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol*. 2016;43:219-226.
33. Tormo-Mainar S, et al. YAP1-NUTM1 Gene Fusion in Eccrine Porocarcinoma with Late Metastatic Recurrence: A Case Report. *Acta Derm Venereol*. 2022;102:adv00752.
34. Zahn J, et al. Altered Rb, p16, and p53 expression is specific for porocarcinoma relative to poroma. *J Cutan Pathol*. 2019;46:659-664.
35. Macagno N, et al. NUT Is a Specific Immunohistochemical Marker for the Diagnosis of YAP1-NUTM1-rearranged Cutaneous Poroid Neoplasms. *Am J Surg Pathol*. 2021;45:1221-1227.
36. Skowron F, et al. Primary eccrine porocarcinoma: a clinicopathological study of 50 cases. *Ann Dermatol Venereol*. 2014;141:258-264.
37. Scampa M, et al. Head and Neck Porocarcinoma: SEER Analysis of Epidemiology and Survival. *J Clin Med*. 2022;11.
38. Shaw M, et al. Malignant eccrine poroma: a study of twenty-seven cases. *Br J Dermatol*. 1982;107:675-680.
39. Mahomed F, Blok J, Grayson W. The squamous variant of eccrine porocarcinoma: a clinicopathological study of 21 cases. *J Clin Pathol*. 2008;61:361-365.
40. Puttonen M, et al. UV-induced local immunosuppression in the tumour microenvironment of eccrine porocarcinoma and poroma. *Sci Rep*. 2022;12:5529.

41. Tidwell WJ, et al. Treatment of eccrine porocarcinoma with Mohs micrographic surgery: a cases series and literature review. *Int J Dermatol*. 2015;54:1078-1083.
42. Prickett KA, Ramsey ML. Mohs Micrographic Surgery. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL) Stat Pearls Publishing, 2023.
43. Tsunoda K, et al. Evaluation of Sentinel Lymph Node Biopsy for Eccrine Porocarcinoma. *Acta Derm Venereol*. 2019;99:691-692.
44. Westphal D, et al. High tumour mutational burden and EGFR/MAPK pathway activation are therapeutic targets in metastatic porocarcinoma. *Br J Dermatol*. 2021;185:1186-1199.
45. Godillot C, et al. Complete response of a metastatic porocarcinoma treated with paclitaxel, cetuximab and radiotherapy. *Eur J Cancer*. 2018;90:142-145.
46. Singh A, et al. Metastatic Porocarcinoma Effectively Managed by Pembrolizumab. *Cureus*. 2021;13:e20004.
47. Goldman P, Pinkus H, Rogin JR. Eccrine poroma; tumors exhibiting features of the epidermal sweat duct unit. *AMA Arch Derm*. 1956;74:511-521.
48. Harvell JD, Kerschmann RL, LeBoit PE. Eccrine or apocrine poroma? Six poromas with divergent adnexal differentiation. *Am J Dermatopathol*. 1996;18:1-9.
49. Betti R, et al. Unusual sites for poromas are not very unusual: a survey of 101 cases. *Clin Exp Dermatol*. 2014;39:119-122.
50. Miller AC, et al. Dermal Duct Tumor: A Diagnostic Dilemma. *Dermatopathology (Basel)*. 2022;9:36-47.
51. Wang SH, Tsai TF. Congenital polypoid pigmented eccrine poroma of a young woman. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008;22:366-368.
52. Orlandi C, et al. Eccrine poroma in a child. *Pediatr Dermatol*. 2005;22:279-280.
53. Shalom A, et al. Dermoscopic findings in biopsy-proven poromas. *Dermatol Surg*. 2012;38:1091-1096.
54. Lallas A, et al. Eccrine poroma: the great dermoscopic imitator. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016;30:e61-e63.
55. Ha DL, et al. Characteristic Clinical and Dermoscopic Features of Nonvolar Poroma. *J Cutan Med Surg*. 2020:1203475420952432.
56. Angthong C, et al. Recurrent eccrine poroma with malignant transformation and bony involvement of the foot: a case report and review of the literature. *J Med Assoc Thai*. 2012;95 Suppl 1:S183-189.
57. Sidro-Sarto M, et al. Eccrine poroma arising in chronic radiation dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008;22:1517-1519.
58. Mayo TT, Kole L, Elewski B. Eccrine Poromatosis: Case Report, Review of the Literature, and Treatment. *Skin Appendage Disord*. 2015;1:95-98.
59. Moon J, et al. Eccrine Poroma with Rapid Growth during Pregnancy: A Case Report and Review of the Literature. *Ann Dermatol*. 2018;30:222-225.
60. Hasan A, et al. A rare case of recurrent eccrine poroma underlying gluteal abscess. *Int J Surg Case Rep*. 2020;75:29-31.
61. Wong MW, Tse GM. Eccrine poroma: a differential diagnosis in chronic foot lesions. *Foot Ankle Int*. 2003;24:789-792.
62. Sekine S, et al. Recurrent YAP1-MAML2 and YAP1-NUTM1 fusions in poroma and porocarcinoma. *J Clin Invest*. 2019;129:3827-3832.
63. Denisova E, et al. Whole-exome sequencing in eccrine porocarcinoma indicates promising therapeutic strategies. *Cancer Gene Ther*. 2021;29:697-708.
64. Harms PW, et al. Porocarcinomas harbor recurrent HRAS-activating mutations and tumor suppressor inactivating mutations. *Hum Pathol*. 2016;51:25-31.

65. Comito F, et al. Immunotherapy-refractory, EGFR overexpressing metastatic porocarcinoma responding to cetuximab. *Eur J Cancer*. 2021;146:84-86.
66. Thibodeau ML, et al. Whole genome and whole transcriptome genomic profiling of a metastatic eccrine porocarcinoma. *NPJ Precis Oncol*. 2018;2:8.
67. Bosic M, et al. Targeted molecular profiling reveals genetic heterogeneity of poromas and porocarcinomas. *Pathology*. 2018;50:327-332.
68. Hile G, Harms PW. Update on Molecular Genetic Alterations of Cutaneous Adnexal Neoplasms. *Surg Pathol Clin*. 2021;14:251-272.
69. Surowy HM, et al. Gene expression profiling in aggressive digital papillary adenocarcinoma sheds light on the architecture of a rare sweat gland carcinoma. *Br J Dermatol*. 2019;180:1150-1160.
70. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*. 2009;10:57-63.
71. Supplitt S, et al. Current Achievements and Applications of Transcriptomics in Personalized Cancer Medicine. *Int J Mol Sci*. 2021;22.
72. Gupta S, et al. Deep learning techniques for cancer classification using microarray gene expression data. *Front Physiol*. 2022;13:952709.
73. Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol Proced Online*. 2006;8:175-193.
74. Harshitha R, Arunraj DR. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochem Mol Biol Educ*. 2021;49:800-812.
75. Warnes G, et al. Various R Programming Tools for Plotting Data. *R-Package gplots*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2015. <https://CRAN.R-project.org/package=gplots>.
76. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2020. <https://www.r-project.org/>.
77. Wickham H. *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer. 2009.
78. Wickham H. Reshaping data with the reshape package. *J Stat Softw* 2007.21:1-20.
79. Galili T. dendextend: an R package for visualizing, adjusting and comparing trees of hierarchical clustering. *Bioinformatics*. 2015;31:3718-3720.
80. <https://www.uniklinik-duesseldorf.de/patienten-besucher/klinikeninstitutezentren/institut-fuer-humangenetik/forschung/ekkrine-schweissdruesenkarzinome>. Zugriffsdatum: 17.03.2024.
81. Vogelstein B, et al. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339:1546-1558.
82. Grzywa TM, Paskal W, Wlodarski PK. Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma. *Transl Oncol*. 2017;10:956-975.
83. McGranahan N, Swanton C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell*. 2017;168:613-628.
84. <https://dnpm.de/de/zentren-des-dnpm/zpm-duesseldorf/>. Zugriffsdatum: 06.04.2024.
85. Kolker S, et al. Rare Disease Registries Are Key to Evidence-Based Personalized Medicine: Highlighting the European Experience. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:832063.
86. Botta L, et al. Incidence and survival of rare cancers in the US and Europe. *Cancer Med*. 2020;9:5632-5642.
87. Gatta G, et al. Epidemiology of rare cancers and inequalities in oncologic outcomes. *Eur J Surg Oncol*. 2019;45:3-11.

88. Storf H, et al. Patient registries for rare diseases in Germany: concept paper of the NAMSE strategy group. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2020;63:761-770.
89. Casali PG, et al. Rare Cancers Europe (RCE) methodological recommendations for clinical studies in rare cancers: a European consensus position paper. *Ann Oncol*. 2015;26:300-306.
90. <https://www.rarecarenet.eu/rarecarenet/project/aim>. Zugriffsdatum: 06.03.2024.
91. Schepers J, Fleck J, Schaaf J. The medical informatics initiative and rare diseases: next-generation routine data for diagnosis, therapy selection and research. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2022;65:1151-1158.
92. Kazanets A, et al. Epigenetic silencing of tumor suppressor genes: Paradigms, puzzles, and potential. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1865:275-288.
93. Lomberk GA. Epigenetic silencing of tumor suppressor genes in pancreatic cancer. *J Gastrointest Cancer*. 2011;42:93-99.
94. Muthusamy V, et al. Epigenetic silencing of novel tumor suppressors in malignant melanoma. *Cancer Res*. 2006;66:11187-11193.
95. Gibson F, et al. Epigenetics and cutaneous neoplasms: from mechanism to therapy. *Epigenomics*. 2023;15:167-187.
96. Goldberg M, et al. Epigenetic silencing contributes to frequent loss of the fragile histidine triad tumour suppressor in basal cell carcinomas. *Br J Dermatol*. 2006;155:1154-1158.
97. Muraio K, et al. Epigenetic abnormalities in cutaneous squamous cell carcinomas: frequent inactivation of the RB1/p16 and p53 pathways. *Br J Dermatol*. 2006;155:999-1005.
98. Chatterjee A, et al. Marked Global DNA Hypomethylation Is Associated with Constitutive PD-L1 Expression in Melanoma. *iScience*. 2018;4:312-325.
99. Roh MR, et al. Promoter Methylation of PTEN Is a Significant Prognostic Factor in Melanoma Survival. *J Invest Dermatol*. 2016;136:1002-1011.
100. Micevic G, et al. DNMT3b Modulates Melanoma Growth by Controlling Levels of mTORC2 Component RICTOR. *Cell Rep*. 2016;14:2180-2192.
101. Gassenmaier M, et al. Expression of DNA Methyltransferase 1 Is a Hallmark of Melanoma, Correlating with Proliferation and Response to B-Raf and Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibition in Melanocytic Tumors. *Am J Pathol*. 2020;190:2155-2164.
102. Micevic G, Theodosakis N, Bosenberg M. Aberrant DNA methylation in melanoma: biomarker and therapeutic opportunities. *Clin Epigenetics*. 2017;9:34.
103. Emran AA, et al. Targeting DNA Methylation and EZH2 Activity to Overcome Melanoma Resistance to Immunotherapy. *Trends Immunol*. 2019;40:328-344.
104. Menezes SV, Kovacevic Z, Richardson DR. The metastasis suppressor NDRG1 down-regulates the epidermal growth factor receptor via a lysosomal mechanism by up-regulating mitogen-inducible gene 6. *J Biol Chem*. 2019;294:4045-4064.
105. Kovacevic Z, et al. The Metastasis Suppressor, N-MYC Downstream-regulated Gene-1 (NDRG1), Down-regulates the ErbB Family of Receptors to Inhibit Downstream Oncogenic Signaling Pathways. *J Biol Chem*. 2016;291:1029-1052.
106. Lee S, et al. Downregulation of NOP53 Ribosome Biogenesis Factor Leads to Abnormal Nuclear Division and Chromosomal Instability in Human Cervical Cancer Cells. *Pathol Oncol Res*. 2020;26:453-459.

107. Efeyan A, Serrano M. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle*. 2007;6:1006-1010.
108. Croessmann S, et al. NDRG1 links p53 with proliferation-mediated centrosome homeostasis and genome stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:11583-11588.
109. Stein S, et al. NDRG1 is necessary for p53-dependent apoptosis. *J Biol Chem*. 2004;279:48930-48940.
110. Lee S, et al. Nucleolar protein GLTSCR2 stabilizes p53 in response to ribosomal stresses. *Cell Death Differ*. 2012;19:1613-1622.
111. Martini M, et al. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Ann Med*. 2014;46:372-383.
112. Xu S, et al. SRRM2 organizes splicing condensates to regulate alternative splicing. *Nucleic Acids Res*. 2022;50:8599-8614.
113. Dvinge H, et al. RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors. *Nat Rev Cancer*. 2016;16:413-430.
114. Urbanski LM, Leclair N, Anczukow O. Alternative-splicing defects in cancer: Splicing regulators and their downstream targets, guiding the way to novel cancer therapeutics. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2018;9:e1476.
115. Stengel K, Zheng Y. Cdc42 in oncogenic transformation, invasion, and tumorigenesis. *Cell Signal*. 2011;23:1415-1423.
116. Xiao XH, et al. Regulating Cdc42 and Its Signaling Pathways in Cancer: Small Molecules and MicroRNA as New Treatment Candidates. *Molecules*. 2018;23:787.
117. Zhang M, et al. Cdc42 Deficiency Leads To Epidermal Barrier Dysfunction by Regulating Intercellular Junctions and Keratinization of Epidermal Cells during Mouse Skin Development. *Theranostics*. 2019;9:5065-5084.
118. Wang CY, Lin CF. Annexin A2: its molecular regulation and cellular expression in cancer development. *Dis Markers*. 2014;2014:308976.
119. Wang T, et al. Crucial role of Anxa2 in cancer progression: highlights on its novel regulatory mechanism. *Cancer Biol Med*. 2019;16:671-687.
120. Schroder B. The multifaceted roles of the invariant chain CD74--More than just a chaperone. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863:1269-1281.
121. Zeiner PS, et al. CD74 regulates complexity of tumor cell HLA class II peptidome in brain metastasis and is a positive prognostic marker for patient survival. *Acta Neuropathol Commun*. 2018;6:18.
122. Kang I, Bucala R. The immunobiology of MIF: function, genetics and prospects for precision medicine. *Nat Rev Rheumatol*. 2019;15:427-437.
123. Penticuff JC, et al. MIF family proteins in genitourinary cancer: tumorigenic roles and therapeutic potential. *Nat Rev Urol*. 2019;16:318-328.
124. Ogata D, et al. The Expression of CD74-Regulated Inflammatory Markers in Stage IV Melanoma: Risk of CNS Metastasis and Patient Survival. *Cancers (Basel)*. 2020;12.
125. de Azevedo RA, et al. MIF inhibition as a strategy for overcoming resistance to immune checkpoint blockade therapy in melanoma. *Oncoimmunology*. 2020;9:1846915.
126. Jiang J, et al. A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*. 2008;10:353-360.
127. McConnell BB, Yang VW. Mammalian Kruppel-like factors in health and diseases. *Physiol Rev*. 2010;90:1337-1381.
128. Sporl F, et al. Kruppel-like factor 9 is a circadian transcription factor in human epidermis that controls proliferation of keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:10903-10908.

129. Bagati A, et al. KLF9-dependent ROS regulate melanoma progression in stage-specific manner. *Oncogene*. 2019;38:3585-3597.
130. Xing J, et al. KLF9 (Kruppel Like Factor 9) induced PFKFB3 (6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2, 6-Biphosphatase 3) downregulation inhibits the proliferation, metastasis and aerobic glycolysis of cutaneous squamous cell carcinoma cells. *Bioengineered*. 2021;12:7563-7576.
131. Loras A, et al. UV-Induced Somatic Mutations Driving Clonal Evolution in Healthy Skin, Nevus, and Cutaneous Melanoma. *Life (Basel)*. 2022;12.
132. Testa U, Castelli G, Pelosi E. Melanoma: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Clonal Evolution and Tumor Initiating Cells. *Med Sci (Basel)*. 2017;5.
133. Sabaawy HE. Genetic Heterogeneity and Clonal Evolution of Tumor Cells and their Impact on Precision Cancer Medicine. *J Leuk (Los Angel)*. 2013;1:1000124.
134. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012;481:306-313.
135. Irani S, et al. Expression profile of endothelin 1 and its receptor endothelin receptor A in papillary thyroid carcinoma and their correlations with clinicopathologic characteristics. *Ann Diagn Pathol*. 2014;18:43-48.
136. Olender J, et al. Endothelins and carcinogenesis. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2016;70:872-880.
137. Ishimoto S, et al. Role of endothelin receptor signalling in squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2012;40:1011-1019.
138. Otani N, et al. Recent Advances in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022;15.
139. Mares A, et al. Targeted Therapies in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension Due to Congenital Heart Disease. *Curr Vasc Pharmacol*. 2022;20:341-360.
140. Tocci P, Blandino G, Bagnato A. YAP and endothelin-1 signaling: an emerging alliance in cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2021;40:27.
141. Bagnato A, Spinella F. Emerging role of endothelin-1 in tumor angiogenesis. *Trends Endocrinol Metab*. 2003;14:44-50.
142. Ceci C, et al. Role of VEGFs/VEGFR-1 Signaling and its Inhibition in Modulating Tumor Invasion: Experimental Evidence in Different Metastatic Cancer Models. *Int J Mol Sci*. 2020;21.
143. Seoane J, Gomis RR. TGF-beta Family Signaling in Tumor Suppression and Cancer Progression. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9.
144. Kodama S, et al. Progression of melanoma is suppressed by targeting all transforming growth factor-beta isoforms with an Fc chimeric receptor. *Oncol Rep*. 2021;46.
145. Zhao J, Guan JL. Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28:35-49.
146. Murphy JM, et al. Targeting focal adhesion kinase in cancer cells and the tumor microenvironment. *Exp Mol Med*. 2020;52:877-886.
147. Zhou X, et al. Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome. *J Mol Cell Biol*. 2015;7:92-104.
148. Pecoraro A, et al. Ribosome Biogenesis and Cancer: Overview on Ribosomal Proteins. *Int J Mol Sci*. 2021;22.
149. Uribe ML, Marrocco I, Yarden Y. EGFR in Cancer: Signaling Mechanisms, Drugs, and Acquired Resistance. *Cancers (Basel)*. 2021;13.
150. Rachinger N, et al. Loss of Gene Information: Discrepancies between RNA Sequencing, cDNA Microarray, and qRT-PCR. *Int J Mol Sci*. 2021;22.
151. Kim WJ, et al. Comparison of RNA-Seq and microarray in the prediction of protein expression and survival prediction. *Front Genet*. 2024;15:1342021.

152. Kokkat TJ, et al. Archived formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks: A valuable underexploited resource for extraction of DNA, RNA, and protein. *Biopreserv Biobank*. 2013;11:101-106.
153. Grillo F, et al. Immunohistochemistry on old archival paraffin blocks: is there an expiry date? *J Clin Pathol*. 2017;70:988-993.
154. Coscia F, et al. A streamlined mass spectrometry-based proteomics workflow for large-scale FFPE tissue analysis. *J Pathol*. 2020;251:100-112.
155. Bass BP, et al. A review of preanalytical factors affecting molecular, protein, and morphological analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue: how well do you know your FFPE specimen? *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138:1520-1530.
156. Specht K, et al. Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue. *Am J Pathol*. 2001;158:419-429.
157. Wimmer I, et al. Systematic evaluation of RNA quality, microarray data reliability and pathway analysis in fresh, fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples. *Sci Rep*. 2018;8:6351.
158. Zeka F, et al. Straightforward and sensitive RT-qPCR based gene expression analysis of FFPE samples. *Sci Rep*. 2016;6:21418.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Redler für ihre wertvollen Anregungen und ihre umfangreiche Unterstützung, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Herzlichen Dank auch an Dr. Harald Surowy, insbesondere für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Ebenso möchte ich Frau Anna K. Weber erwähnen, die mich kompetent und geduldig in die Laborarbeit des Instituts für Humangenetik eingearbeitet hat.

Zudem danke ich allen Autoren der Publikation für ihre Unterstützung und Mitwirkung. Ihre Zusammenarbeit und ihr Fachwissen haben dazu beigetragen, die Qualität dieser Arbeit zu sichern und sie in den wissenschaftlichen Diskurs einzubetten.