Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Sergij Goerdt)

Untersuchung der klinischen, histologischen und immunhistochemischen Charakteristika des atypischen Fibroxanthoms

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Marisa Bach

aus
Karlsruhe
2024

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Sergij Goerdt

Referent: Herr Prof. Dr. med. Jochen Utikal

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Gaiser, T., Hirsch, D., Orouji, A., Bach, M., Kind, P., Helbig, D., Quaas, A., Utikal, J., Marx, A., & Gaiser, M. R. (2018). ***MYC* gene amplification is a rare event in atypical fibroxanthoma and pleomorphic dermal sarcoma**. *Oncotarget*, *9*(30), 21182–21189. doi:10.18632/oncotarget.24997

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 1

1 EINLEITUNG 3

1.1. Tumore der Haut 3

1.2. Das atypische Fibroxanthom (AFX) 3

1.2.1. Klinik des AFX 8

1.2.2. Histologie des AFX 8

1.2.3. Immunhistochemie des AFX 8

1.2.4. Diagnostik und Differentialdiagnostik des AFX 10

1.2.5. Therapie des AFX 11

1.2.6. Prognose des AFX 13

1.3. Fragestellung und Hypothesen 14

2. MATERIAL UND METHODEN 16

2.1. Stichproben 16

2.1.1. Kohorte 1 - Mannheimer Kohorte 16

2.1.2. Kohorte 2 - Externe Kohorte 16

2.2. Erfassung klinischer Daten 16

2.2.1. Fragebogen zur Erfassung von Risikofaktoren und klinischen Charakteristika der Patientinnen und Patienten 17

2.3. Histologische und Immunhistochemische Untersuchungen 18

2.3.1. Hämatoxylin-Eosin (HE)- Färbung 18

2.3.2. Ermittlung der Tumordicke und des dominanten Zelltyps 19

2.3.3. Tissue microarrays (TMAs) 19

2.3.4. Immunhistochemische Analysen 21

2.4. Mutations-Analyse der BRAF- und NRAS-Gene 23

2.5. Statistische Analysen der Daten 24

3. ERGEBNISSE 25

3.1. Klinische Daten 25

3.1.1. Auswertung des Fragebogens zur Erfassung von Risikofaktoren 27

3.2. Klinische und histologische Präsentation des AFX 33

3.3. Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen 36

3.3.1. Ergebnisse der Mannheimer Patientenkohorte 36

3.3.2. Ergebnisse der externen Patientenkohorte und Vergleich mit der Mannheimer Kohorte 38

3.3.3. Ergebnisse des immunhistochemischen Scores 44

3.3.4. Ergebnisse der Mutationsanalysen 51

4. DISKUSSION 52

4.1. Klinische Präsentation des AFX in der untersuchten Stichprobe 53

4.2. Immunhistochemische Expressionsprofile der AFX-Proben 53
4.3. Befunde zum MAP-Kinase-Signalweg 56
4.4. Auswertung der Immunhistochemischen Scores 58
4.5. Limitationen der vorgelegten Arbeit 60
5. ZUSAMMENFASSUNG 62
6. LITERATURVERZEICHNIS 64
7. TABELLARISCHER ANHANG 70
7.1. Fragebogen für Patientinnen und Patienten mit Atypischem Fibroxanthom (AFX) 70
7.2. Vergleich der Gruppen mit und ohne infiltratives Wachstum 76
8. LEBENSLAUF 77
9. DANKSAGUNG 79

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AEC	Aminoethyl-Carbazol
AFX	Atypisches Fibroxanthom
AS	Angiosarkom
BCC	Basalzellkarzinom
BRAF	B-Raf proto-oncogene
CD	Cluster of differentiation
CK	Zytokeratin
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DFSP	Dermatofibrosarkoma protuberans
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK	Extracellular-signal regulated kinases
FH	Fibröses Histiozytom
HE	Hämatoxylin-Eosin
HMB-45	Human Melanoma Black-45
IEG	Immediate early gene
IHC	Immunhistochemie
KI	Künstliche Intelligenz
LMS	Leiomyosarkom
MAP	Mitogen-activated protein
MART1	Melanoma antigen recognized by T-cells 1
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MFH	Malignes fibröses Histiozytom
MM	Malignes Melanom
NF1	Neurofibromin 1
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
PDS	Pleomorphes dermales Sarkom
PDGFRB	Platelet-derived growth factor receptor beta
PD-1	Programmed cell death protein 1
pMEK	Phosphorylated mitogen-activated protein kinase kinase
pERK	Phosphorylated extracellular-signal regulated kinase
SCC	Plattenepithelkarzinom

SCPFT	Superficial CD34-positive fibroblastic tumor
SMA	Smooth muscle actin
TBS	Tris buffered saline
TBS-T	Tris buffered saline with Tween
TMA	Tissue-micro-array
UMM	Universitätsmedizin Mannheim
UPS	Undifferenziertes pleomorphes Sarkom
USTS	Undifferentiated soft tissue sarcomas

1 EINLEITUNG

1.1. TUMORE DER HAUT

Nicht-melanozytäre Tumore der Haut sind die häufigste Krebsart weltweit mit einer Jahr für Jahr weiter steigenden Inzidenz.[1] Die Entstehung dieser Hauttumoren wird von verschiedenen Faktoren wie genetischen Prädispositionen, Umweltbelastungen und Sonnenexposition beeinflusst. Das Basalzellkarzinom (BCC) ist global gesehen die Hautkrebsform mit der höchsten Prävalenz. Es macht etwa 70-80% aller Hauttumoren aus. Die Häufigkeit des BCCs variiert je nach geografischer Region und Sonnenexposition der Bevölkerung. In England liegt die altersstandardisierte Inzidenzrate bei ca. 110 pro 100.000 Personen pro Jahr, wohingegen die Inzidenzrate in Australien etwa das 20-fache beträgt.[2] Das Plattenepithelkarzinom (SCC) ist die zweithäufigste Hautkrebsart weltweit. Die Inzidenzraten von SCC variieren ebenfalls, wobei sie in Regionen mit starker Sonnenexposition und bei älteren Menschen höher sind. In Deutschland beträgt die altersstandardisierte Inzidenzrate ca. 40 pro 100.000 Personen pro Jahr. In den USA und Australien liegt diese entsprechend höher.[2] Das atypische Fibroxanthom (AFX) ist im Vergleich zu den oben genannten Hauttumorarten seltener und weniger gut untersucht. Informationen über seine weltweite und deutschlandweite Häufigkeit sind begrenzt und zeigen sich bisher uneinheitlich. Aufgrund seiner Eigenschaften stellt es in der Diagnostik aktuell teilweise eine Herausforderung dar und die klinischen, histologischen und immunhistochemischen Charakteristika sind bisher nicht abschließend geklärt.

1.2. DAS ATYPISCHE FIBROXANTHOM (AFX)

Beim AFX handelt es sich um eine seltene Neoplasie der Haut.[3] Präzise Daten zur Inzidenz und Prävalenz liegen nicht vor. In den Klassifikationen der Weichteiltumoren der Weltgesundheitsorganisation[4,5] sowohl von 2013 als auch von 2020 wird das AFX der Kategorie „Weichgewebstumoren unklarer Differenzierung“ zugeordnet. In dieser Klassifikation werden die einzelnen Entitäten zusätzlich in Bezug auf ihre Dignität eingeteilt. Die Einteilung erfolgt in „maligne“, „intermediär“ und „benigne“. Das AFX erhält hier den Zusatz „intermediär“. Dies spiegelt die klinisch beobachteten Eigenschaften des AFX als schnell wachsenden Tumor mit niedrigem Rezidiv- und Metastasierungsrisiko wider.[5,6]

Erstmalig wurde der Begriff atypisches Fibroxanthom 1961 von Helwig verwendet.[7] Er beschrieb diese Tumore als relativ gut umschriebene Infiltrationen der Dermis durch pleomorphe Spindelzellen, mehrkernige atypische Riesenzellen und Mitosen, die sich vor allem im Bereich lichtexponierter Areale, wie dem Gesicht und der Kopfhaut, finden ließen. Grundlage für die Bezeichnung war die Beobachtung des Autors einer xanthomatösen Erscheinung der Zellen, von denen er vermutete, fibroblastären Ursprungs zu sein. Eine klare Zuordnung der Dignität erfolgte zum Zeitpunkt der Erstbeschreibung nicht. Die klinischen Verläufe zeigten sich jedoch benigne.[7] Etwas später veröffentlichten Kempson und McGavran die erste größere Publikation mit einer Fallserie von 21 Patientinnen und Patienten.[8] Ihre Ergebnisse bestätigten die histologische Charakterisierung von Helwig und auch die Einschätzung zur Benignität der Verläufe. Allerdings diskutierten die Autoren als Ursache für das Auftreten des AFX reparative oder reaktive Prozesse vorgeschädigter Hautareale. Es folgten Arbeiten von Kroe und Pitcock sowie Hudson und Winkelmann[9,10], die die Befunde zur klinischen und histologischen Charakterisierung im Wesentlichen bestätigten. Allerdings wurden bereits früh Zweifel an der Homogenität der als AFX beschriebenen Tumore geäußert. In Übereinstimmung mit dieser Vermutung zeigten Studien, die die Einschätzung verschiedener Fachleute zum gleichen Tumorpräparat verglichen, dass Retikulohistiozytome, Myofibrosarkome, Leiomyosarkome, aber auch pseudosarkomatöse Dermatofibrome häufig als AFX fehldiagnostiziert wurden.[11] Zudem ließ sich auch der initial geäußerte Verdacht, dass es sich beim AFX um eine oberflächliche Variante des malignen fibrösen Histiozytoms (MFH, heute undifferenziertes pleomorphes Sarkom, UPS) handelt, nicht bestätigen (Fletcher 1992). Hier trugen vor allem die neuen diagnostischen Möglichkeiten durch Immunhistochemie und Elektronenmikroskopie dazu bei, das AFX als eigenständige Entität besser zu definieren und von anderen, häufig mit dem AFX verwechselten Tumoren, abzugrenzen. In der aktuellen S1-Leitlinie “atypisches Fibroxanthom und pleomorphes dermales Sarkom (PDS)” aus dem Jahr 2022[12] werden das AFX und das PDS einer Entität zugeordnet, da sie klinisch, histologisch sowie molekulargenetisch Ähnlichkeiten aufweisen. Als PDS werden Tumoren bezeichnet, die dem AFX histomorphologisch gleichen, die Dermis jedoch überschreiten und sowohl perineurale und lymphovaskuläre Infiltration sowie nekrotische Tumoranteile aufweisen können.[13-15] Das PDS ist dabei meist unscharf abgegrenzt und oft aggressiv infiltrativ wachsend.

Als mögliche Ursachen der Entstehung eines AFX wurden durch UV-Strahlung induzierte Genmutationen von p53 diskutiert.[16,17] Mutationen im p53-Gen spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Entwicklung von Hauttumoren. Das p53-Gen ist ein Tumorsuppressorgen, das für die Kontrolle des Zellzyklus und die Verhinderung von unkontrollierter Zellteilung verantwortlich ist. Mutationen in diesem Gen können zu einer Funktionsstörung von p53 führen, was wiederum zu einer gesteigerten Zellproliferation und zur Entwicklung von Tumoren führen kann. Das p53-Gen ist das am häufigsten mutierte Gen bei menschlichen Tumoren, einschließlich Hauttumoren. Es wurde gezeigt, dass etwa die Hälfte aller menschlichen Krebserkrankungen eine Mutation im p53-Gen aufweisen. In Bezug auf Hauttumoren sind diese Mutationen besonders relevant beim SCC und MM. Andere als mögliche Ursachen diskutierte Faktoren sind reaktive Umbauprozesse nach Gewebeschäden oder Bestrahlungen.[8,18] Weiterhin wurden beim PDS BRAF-Amplifikationen beschrieben.[13] Das BRAF-Gen kodiert die Serin/Threonin-Proteinkinase BRAF, die das normale Zellwachstum und die Zellproliferation reguliert. Es ist bei Tumoren häufig mutiert, wobei die höchsten Mutationsraten bei Leukämien und MM beschrieben wurden. BRAF-Mutationen können dabei zu einer konstitutiven Aktivierung der BRAF-Kinase und ihrer nachgeschalteten Signalübertragung über den “Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase”-Signalweg führen.[19] Der MAP-Kinase-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Entwicklung von Hauttumoren.[20,21] Dieser Signalweg ist eine komplexe Signalkaskade, die Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung, Apoptose und die Antwort auf externe Umweltfaktoren reguliert. In der Haut sind MAP-Kinasen an der Steuerung von zellulären Prozessen beteiligt, die für die Aufrechterhaltung einer normalen Gewebestruktur und -funktion von großer Bedeutung sind. Der MAP-Kinase-Signalweg besteht aus einer Reihe von aufeinanderfolgenden Phosphorylierungsreaktionen (siehe **Abbildung 1**). Die durch Phosphorylierung aktivierten Proteine gelangen in den Zellkern und regulieren dort die Aktivität von Transkriptionsfaktoren, die die Expression bestimmter Gene kontrollieren. Im Zusammenhang mit Hauttumoren, wie dem BCC, dem SCC und dem MM, wurde eine gesteigerte Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs beobachtet. Mutationen in Komponenten dieses Signalwegs, wie zum Beispiel in den Genen RAS oder BRAF, werden häufig bei verschiedenen Hautkrebsarten beobachtet. Diese Mutationen führen zu einer konstitutiven Aktivierung des Signalwegs und tragen zur unkontrollierten Zellproliferation, verminderten Apoptose und einer gestörten

Zelldifferenzierung bei, die charakteristisch für Hauttumoren sind. Insbesondere beim MM sind Mutationen im BRAF-Gen besonders bedeutsam. Mit 40-60% ist die BRAF V600 Mutation die beim kutanen malignen Melanom am häufigsten auftretende Mutation gefolgt von NRAS in 15-25% und NF1 in 13,1% der Fälle. Eine Inhibition des MAP-Kinase-Signaltransduktionswegs stellt daher eine therapeutische Option beim malignen Melanom dar.[19,22-26] Dies hat zur Entwicklung von zielgerichteten Therapien geführt, die spezifische BRAF-Inhibitoren verwenden, um das Wachstum und die Ausbreitung von Melanomzellen gezielt zu hemmen. Die Erforschung dieses Signalwegs bei anderen Hautkrebsarten kann perspektivisch dazu beitragen, Ansätze für nicht-operative Therapien zu identifizieren. Die Relevanz von Veränderungen im MAP-Kinase Signalweg für AFX/PDS ist bisher allerdings nicht gut untersucht und war deshalb ein zentraler Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

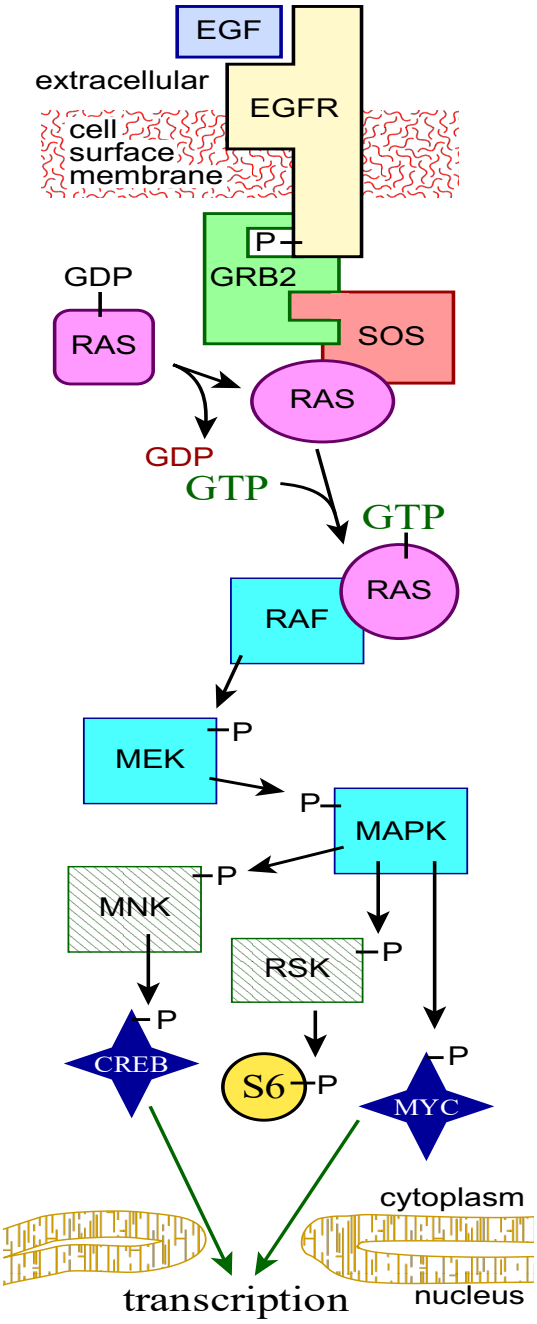


Abbildung 1. Schematische Illustration des MAP-Kinase Signalweges. Zu Beginn der Kaskade bindet der epidermale Wachstumsfaktor EGF an den EGF-Rezeptor (EGFR), der sich in der Zellmembran befindet. Dies stößt eine GTP-abhängige Phosphorylierung von RAF an und in der Folge von der MAP-Kinase (auch ERK genannt). ERK wird durch Phosphorylierung an Threonin, Serin und Tyrosin aktiviert und wandert in den Zellkern, wo es als Transkriptionsfaktor wirkt und die Transkription von IEGs (immediate early genes) auslöst und so die Zellproliferation steuert. (Nutzung des Bildes unter der Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International Lizenz ohne Modifikationen, Bildquelle: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MAPKpathway_diagram.svg).

1.2.1. Klinik des AFX

Meist imponiert das AFX als einzelner, haut- bis fleischfarbener, häufig ulzerierter Nodus mit einem Durchmesser bis zu mehreren Zentimetern, der insbesondere in sonnengeschädigten Arealen auftritt. Der Tumor wächst in der Regel innerhalb von wenigen Wochen bis zu mehreren Monaten. Betroffen sind hauptsächlich ältere, hellhäutige Patientinnen und Patienten in der 7.-8. Lebensdekade. Das männliche Geschlecht ist deutlich häufiger betroffen.[18,27-30] Auch ein Auftreten bei jüngeren Patientinnen und Patienten ist beschrieben. Hier sind häufiger auch die nicht sonnenexponierten bedeckten Körperareale wie Stamm und Extremitäten betroffen.[18,31] Ebenso wird bei jüngeren Patientinnen und Patienten ein vermehrtes Auftreten bei Xeroderma pigmentosum beschrieben.[32,33] Im Unterschied zum AFX, zeigt sich das PDS häufig unscharf begrenzt und infiltrativ wachsend. Für das PDS sind dabei ebenfalls schnelle, zum Teil aber auch langsamere Verläufe beschrieben. Die das AFX umgebende Haut weist häufig einen chronischen Lichtschaden auf. Häufig zeigen sich bei den vom AFX betroffenen Patientinnen und Patienten auch Präkanzerosen und weitere Hauttumore, wie aktinische Keratosen, Plattenepithelkarzinome und Basalzellkarzinome.[34,35]

1.2.2. Histologie des AFX

Das AFX ist ein seltener Hauttumor mesenchymalen Ursprungs.[18,27-30] Das AFX wächst als gut umschriebener Tumor häufig exophytisch. Die Epidermis ist häufig ulzeriert. Es zeigen sich Spindelzellen, epitheloide Zellen und mehrkernige Riesenzellen mit teils atypischen Mitosefiguren.[27,28] Der Tumor bleibt auf die Dermis beschränkt. Im Unterschied zum AFX überschreitet das PDS die Dermis und infiltriert die Subkutis, Muskulatur oder Faszien, Gefäße und/oder Nerven. Hier können auch nekrotische Tumoranteile vorliegen.[36,37] Das AFX und PDS zeigen dabei eine relevante Entdifferenzierung. Insgesamt zeigen das AFX und PDS eher unspezifische histologische Veränderungen im Vergleich zu anderen Hauttumoren, sodass in der Regel eine weitergehende immunhistochemische Betrachtung notwendig ist.

1.2.3. Immunhistochemie des AFX

Studien untersuchten die immunhistochemischen Eigenschaften des AFX und PDS. Hierbei zeigten sich die Tumorzellen des AFX/PDS positiv für CD10, CD99,

Prokollagen und fokal positiv für CD68 sowie α-SMA.[27,38-44] Gelegentlich zeigten sich die in Studien untersuchten AFX-Proben auch positiv für CD31, Melan-A und HMB-45.[45,46] Auch immunhistochemisch ließen sich bisher keine spezifischen Marker für das AFX und PDS identifizieren, sodass die Untersuchung einer Reihe von Markern notwendig erscheint, um das AFX und PDS von anderen Tumoren abzugrenzen.

α-SMA (Alpha-Smooth-Muscle-Actin) ist ein Marker für glatte Muskelzellen und myofibroblastische Zellen. In der Dermatohistopathologie wird α-SMA oft verwendet, um myofibroblastische Differenzierung und Tumore mit glatten Muskelzellkomponenten, wie zum Beispiel Leiomyome, Leiomyosarkome oder Dermatofibrosarkome, zu identifizieren.[47]

CD10 ist auch bekannt als Neprilysin und dient der Abgrenzung von BCC zu anderen Tumorarten. Es ist ein Oberflächenmarker und Enzym, das an der Spaltung und Inaktivierung von Peptidhormonen beteiligt ist. BCC zeigen in der Regel eine starke CD10-Expression, während andere Tumorarten normalerweise keine CD10-Expression aufweisen.[47]

CD31 (auch Plattenendothelzelladhäsionsmolekül-1 [PECAM-1]), wird vor allem von Endothelzellen der Blutgefäße exprimiert und ist ein Oberflächenmarker, der in der Diagnosestellung von vaskulären Läsionen und Angiosarkomen von Bedeutung ist.[47]

CD68 ist ein Zelladhäsionsmolekül aus der Gruppe der CD (Cluster of Differentiation)-Oberflächenmerkmale, welches von Makrophagen exprimiert wird. In der Dermatohistopathologie kann CD68 bei der Unterscheidung von entzündlichen Prozessen von Hauttumoren wie zum Beispiel BCC hilfreich sein.[47]

CD99 ist ein membranassoziiertes Glykoprotein aus der Gruppe der CD-Oberflächenmerkmale, welches vor allem von Weichteilsarkomen exprimiert wird. In der Dermatohistopathologie kann CD99 zur Abgrenzung von Sarkomen und anderen Tumorarten beitragen.[47]

Melan-A und HMB-45 sind immunhistochemische Marker, die sich vor allem in Melanozyten finden. Sie können in der Diagnostik genutzt werden, um Melanozyten,

die pigmentproduzierenden Zellen in der Haut, zu identifizieren und das MM von anderen pigmentierten Läsionen zu unterscheiden.[48]

Prokollagen ist ein Vorläufermolekül von Kollagen, das für die Struktur und Festigkeit des Bindegewebes verantwortlich ist. In der Dermatohistopathologie kann die Immunmarkierung von Prokollagen bei der Unterscheidung von Fibroblasten und Fibrozyten von anderen Zelltypen hilfreich sein. Es wird unter anderem in Fibroblasten von Dermatofibromen und einigen anderen Hauttumoren exprimiert.[47]

1.2.4. Diagnostik und Differentialdiagnostik des AFX

Die Diagnose AFX ist nicht leicht zu stellen. Das klinische Erscheinungsbild ist nicht eindeutig dem AFX zuzuordnen, sondern kann beispielsweise auch mit schlecht differenzierten Varianten eines malignen Melanoms (MM) oder eines spinozellulären Karzinoms (SCC) verwechselt werden. Als weitere Differenzialdiagnosen sollten das Pleomorphe dermale Sarkom (PDS), das Leiomyosarkom (LMS), Myxofibrosarkom, fibröses Histiozytom (FH), pleomorphes Fibrom, Granularzelltumor und das kutane Angiosarkom (AS) ausgeschlossen werden. Gemäß aktuellem Stand der Forschung handelt es sich beim AFX um eine histologische und immunhistochemische Ausschlussdiagnose. In der aktuellen deutschen Leitlinie[12] wird eine tiefe Spindelbiopsie bzw. eine komplette Exzision des Tumors empfohlen mit einer anschließenden Bandbreite an immunhistochemischen Untersuchungen, um die Diagnose zu sichern. Bei einer zu oberflächlichen Biopsie ist nach aktueller Erkenntnis keine Differenzierung zwischen AFX und PDS möglich. Da bis heute keine spezifischen Marker für das AFX identifiziert werden konnten, ist die Diagnose des AFX weiterhin eine Ausschlussdiagnose. Mithilfe der Immunhistochemie werden die in Frage kommenden Differentialdiagnosen, u.a. SCC, MM, Gefäßtumore sowie andere Sarkome, die in der Regel eine deutlich schlechtere Prognose aufweisen als das AFX, ausgeschlossen.[8,28]

Zum Ausschluss der Differentialdiagnosen sollten Zytokeratinmarker, Melanozytenmarker, Gefäßmarker und Muskelmarker sowie CD10 herangezogen werden.[29,45,49] Als obligate Routinemarker werden in der aktuellen deutschen Leitlinie Zytokeratinmarker (AE1/3, KL1, CAM5.2), melanozytäre Marker (S100, SOX10), Desmin und CD34/ERG empfohlen. Als fakultative Marker werden zudem CD10, α-SMA, PDGFRB, CD99, Prokollagen-1, CD68 und Ki-M1p empfohlen.[12]

Tabelle 1. Häufige Differentialdiagnosen des AFX und deren immunhistochemisches Färbeverhalten

Diagnose	Immunhistochemisches Färbeverhalten
AFX	Positiv für CD10, CD99, Prokollagen, CD68, SMA Negativ für Panzytokeratin-Marker (AE1/3, KL1, CAM5.2), Melanozytäre Marker (S100, Sox10) und CD34/ERG
AS	Positiv für CD31, CD34
SCC	Positiv für PanCK
MM	Positiv für S100B, MelanA*, HMB45*
LMS	Positiv für Desmin, SMA, Caldesmon

Legende: AFX=Atypisches Fibroxanthom, AS=Angiosarkom, SCC=Plattenepithelkarzinom, MM=malignes Melanom, LMS=Leiomyosarkom, *nicht beim spindelzelligen oder desmoplastischen MM

1.2.5. Therapie des AFX

Die Therapie der Wahl, gemäß der aktuellen Leitlinienempfehlungen, stellt die komplette Exzision des Tumors dar. Hierbei zeigte die Therapie mittels Mohs Chirurgie einen Vorteil gegenüber der großzügigen Exzision ohne mikroskopische Kontrolle. Ein Sicherheitsabstand zum Tumorrand sollte eingehalten werden.[50] Beim AFX zeigt sich die mikroskopisch-kontrollierte Chirurgie (MKC) alleine zur klinischen Heilung ausreichend. Ist die mikroskopisch-kontrollierte Chirurgie nicht möglich, sollte eine großzügige Exzision mit einem klinischen Sicherheitsabstand von 0,5 Zentimetern erfolgen. Durch die komplette operative Entfernung des Tumors konnten sowohl Lokalrezidive als auch die häufig damit korrespondierenden metastasierenden Tumoren reduziert werden.[51-54]

Das PDS sollte ebenfalls in toto, wenn möglich mittels mikroskopisch-kontrollierter Chirurgie, entfernt werden. Zusätzlich ist ein Sicherheitsabstand von 2 Zentimetern empfohlen, der je nach Tumorlokalisation an die anatomischen Gegebenheiten angepasst werden muss.[50,55-57] Vor allem die Therapie von primär nicht operablen Tumoren oder Rezidiven stellt aktuell eine Herausforderung in der Therapie des AFX und PDS dar.

Die Strahlentherapie stellt bei unvollständiger Tumorresektion eine ergänzende Therapieoption dar, wobei es aktuell keine ausreichende Evidenz zur Ableitung von

konkreten Empfehlungen zur Dosis, Fraktionierung und Dauer gibt.[55] Im Hinblick auf eine adjuvante Strahlentherapie bei vollständig exzidierten PDS, berichtete eine Arbeit mit kleinem Kollektiv von einer positiven, jedoch nicht signifikanten Tendenz bezüglich ihres Nutzens hinsichtlich der beobachteten Lokalrezidivrate und Metastasierungsrate.[58]

Bis heute gibt es keine standardisierte und evidenzbasierte Systemtherapie bei AFX und PDS. Im Fall von inoperablen oder metastasierten Tumoren sollte eine individuelle Entscheidung in einer interdisziplinären Tumorkonferenz getroffen werden.

Zum Einsatz der Chemotherapie bei AFX und PDS gibt es lediglich Einzelfallberichte. Miller et al. (2012) dokumentierten eine erfolgreiche Therapie von Hautmetastasen sowie Lymphknotenmetastasen mit Adriamycin und Ifosfamid bei einem Patienten.[37] Crimini et al. (2019) berichten von einer erfolgreichen Behandlung eines AFX/PDS Rezidivs mit Elektrochemotherapie. Das verwendete Chemotherapeutikum hier war Bleomycin.[59] In einem Fallbericht wurde zudem der erfolgreiche Einsatz von Doxorubicin bei AFX beschrieben.[60]

Der Einsatz von Immuntherapien bei AFX/PDS wird aktuell diskutiert. Aufgrund der hohen Mutationslast von PDS scheint eine Behandlung mit Immuntherapien möglich. Verschiedene Arbeitsgruppen schlugen vor, dass Patientinnen und Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien von einer Therapie mit den programmed cell death protein 1 (PD-1) -Inhibitoren Pembrolizumab und Nivolumab sowie einem anti-CTLA-4 Antikörper wie Ipilimumab profitieren könnten.[56,61,62] Die Wirksamkeit einer Therapie mit anti-PD-1-Antikörpern konnte in ersten Fallberichten gezeigt werden.[56,61,62]

Zu zielgerichteten Therapien bei AFX/PDS gibt es bisher keine Erfahrungen. Diese könnten jedoch bei Nachweis onkogener Alterationen zum Einsatz kommen.[13,61,63] Hierbei könnte vor allem der MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg einen möglichen Angriffspunkt bieten.[20,21] Dysregulationen dieser Signaltransduktionskaskade können zu Tumorentstehung und Tumorprogression führen. Einzelne Elemente dieser Signalkaskade dienen bereits als Angriffspunkte zielgerichteter Therapien z.B. beim malignen Melanom.[64] Ein Einsatz solcher therapeutischer Strategien beim AFX/PDS wurde allerdings bisher nicht untersucht.

Bisher liegt keine Evidenz zur Nachsorge von Patientinnen und Patienten mit AFX/PDS vor. In der aktuellen S1-Leitlinie wird für das AFX und PDS eine Nachsorge über insgesamt 5 Jahre empfohlen. Für das AFX in einer Frequenz der Untersuchungen im Abstand von je 6 Monaten in den ersten zwei Jahren und dann jährlich. Für das PDS in einer Frequenz der Untersuchungen im Abstand von je 3 Monaten in den ersten drei Jahren und dann alle 6 Monate. Diese umfasst neben klinischen Kontrollen beim PDS auch eine Sonographie der Lymphknoten und eine Sonographie der Primärtumorregion.[12]

1.2.6. Prognose des AFX

Die Prognose des AFX ist abhängig von der vertikalen Eindringtiefe des Tumors, von der Infiltration von Muskeln und/oder Fettgewebe und der Infiltration in Nerven und/oder Gefäße. Das AFX hat im Vergleich zum PDS in der Regel eine bessere Prognose. Bei vollständiger Exzision des AFX sind sowohl ein Lokalrezidiv als auch eine Metastasierung selten.[65-67] In der Literatur findet sich nach korrekter Anwendung der aktuellen Diagnosekriterien ein Fall eines metastasierten AFX.[68]
Bei den älteren in der Literatur beschriebenen Fällen von Metastasen bei AFX handelt es sich um Berichte aus einer Zeit ohne den Einsatz immunhistochemischer Marker. Hier handelt es sich rückblickend vermutlich nicht um ein AFX nach aktueller Definition. In der neueren Literatur sind keine Fälle von metastasiertem AFX zu finden. Für das PDS sind Lokalrezidive und Metastasierungen in der Literatur beschrieben und werden mit einer Häufigkeit von 5-28% für Lokalrezidive und 8,8-20% für Metastasierung angegeben.[37,49,58] Das Auftreten von Lokalrezidiven beim PDS innerhalb der ersten zwei Jahre nach Primärexzision wurde wiederholt beschrieben. Hier handelt es sich häufig um nicht vollständig exzidierte Primärtumoren.[37,67] Ein zusätzlich zur mikroskopisch-kontrollierten Exzision entnommener Sicherheitsabstand von bis zu 2 cm wird beim PDS empfohlen, um das Lokalrezidivrisiko zu minimieren.[58] Ist der PDS Primarius sehr dick und infiltriert tiefere Strukturen, kann dies das Risiko für Lymphknotenmetastasen, Hautmetastasen und selten, in etwa 4-10%, auch für Fernmetastasen erhöhen. Hiervon betroffen sind häufiger Patientinnen und Patienten mit vorbestehender hämatologischer Grunderkrankung.[37,49,58]

1.3. FRAGESTELLUNG UND HYPOTHESEN

Das atypische Fibroxanthom ist ein seltener Hauttumor, der aufgrund seiner variablen morphologischen Merkmale und seiner ähnlichen Erscheinungsbilder zu anderen Tumorarten eine Herausforderung bei der Diagnosestellung darstellt. Bisher stellt die Diagnose eines AFX eine Ausschlussdiagnose dar, da keine spezifischen histologischen oder immunhistochemischen Marker verfügbar sind. Die Klassifikation ist somit nur über eine Abgrenzung zu anderen Tumorarten möglich. Zudem zeigt sich das Wachstumsverhalten des AFX variabel, ohne dass die hierfür verantwortlichen Mechanismen bisher abschließend geklärt werden konnten. Ein besseres Verständnis der klinischen, histologischen und immunhistochemischen Charakteristika des AFX, sowie der beteiligten Mechanismen der Tumorgenese und Tumorproliferation, könnte dazu beitragen eine präzisere Diagnostik zu ermöglichen und Ansatzpunkte für Behandlungsmöglichkeiten zu identifizieren.

Zielsetzung

Die vorgelegte Arbeit hatte zum Ziel, die klinischen, histologischen und immunhistochemischen Charakteristika des AFX anhand zweier unabhängiger Stichproben von Tumorpräparaten zu untersuchen. Darüber hinaus sollte eine mögliche Beteiligung des MAP-Kinase-Signalwegs an der Pathogenese des AFX geklärt werden, um potentielle Ansätze für alternative Therapieoptionen zu ermitteln.

Folgende Hypothesen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit geprüft:

Hypothese 1

Bezüglich der klinischen Präsentation des AFX erwarten wir entsprechend der Erkenntnisse aus vorherigen Studien eine Lokalisation des Tumors in lichtexponierten Arealen, ein häufiges Auftreten anderer Hauttumore bei den Patientinnen und Patienten sowie Juckreiz und Blutungen des Tumors als häufige klinische Symptome.

Hypothese 2

Im Hinblick auf die immunhistochemischen Charakteristika erwarten wir eine Negativität für Melanozyten-, Endothel-, Keratinozyten-Marker und Desmin sowie eine Positivität für Aktin, Vimentin, CD10, CD68 und CD99. Wir erwarten, dass sich diese Expressionsmuster konsistent in der Betrachtung der Immunpositivität (d.h. Anteil positiver Tumorareale) sowie auch in der kombinierten Betrachtung der Immunpositivität und Immunintensität über einen immunhistochemischen Gesamtscore abbilden lassen.

Hypothese 3

Bei AFX-Tumorproben erwarten wir eine hohe Expression von Proteinen der MAP-Kinase-Kaskade (BRAF, ERK, pERK, MEK, pMEK). In diesem Zusammenhang vermuten wir eine Mutation im NRAS- oder BRAF-Gen als mögliche Ursache einer gesteigerten Aktivität des MAP-Kinase-Signalwegs.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. STICHPROBEN

Die Grundlage der vorgelegten Arbeit bilden die Auswertungen der klinischen, histologischen und immunhistochemischen Marker zweier unabhängiger Kohorten.

2.1.1. Kohorte 1 - Mannheimer Kohorte

In der Mannheimer Kohorte wurden alle in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universitätsmedizin Mannheim (UMM) im Zeitraum von Januar 2003 bis Juli 2014 mit AFX diagnostizierten Patientinnen und Patienten eingeschlossen. Dies waren insgesamt 27 Fälle. Davon vier Frauen und 23 Männer. Die Gesamtzahl der verfügbaren histologischen Tumorpräparate dieser Gruppe betrug 27 (100% der Stichprobe).

2.1.2. Kohorte 2 - Externe Kohorte

Die Gruppe der externen Patientinnen und Patienten setzte sich aus 29 Personen zusammen, deren Tumorexzisionen ambulant in verschiedenen dermatologischen Praxen in Deutschland durchgeführt wurden und im MVZ Dermatopathologie Prof. Dr. Kind in Offenbach untersucht und als AFX diagnostiziert wurden. Es wurden uns 73 Gewebeproben von insgesamt 31 Patientinnen und Patienten aus dem Zeitraum zwischen 2011 und 2012 zur Verfügung gestellt. Von diesen Gewebeproben waren 29 Tumorpräparate von 29 Patientinnen und Patienten aus dem Zeitraum zwischen 2011 und 2012 zur weiteren Untersuchung geeignet. Klinische Informationen zu den Patientinnen und Patienten lagen nicht vor, sodass diese Gewebe ausschließlich immunhistochemisch untersucht wurden und nur in die immunhistochemische Auswertung dieser Arbeit einflossen.

2.2. ERFASSUNG KLINISCHER DATEN

Von der Stichprobe der externen Patientinnen und Patienten aus dem MVZ für Dermatopathologie Prof. Dr. Kind in Offenbach lagen keinerlei klinische Informationen vor. Eine Auswertung der Behandlungsakten war hier nicht möglich. Für die Stichprobe der Mannheimer Patienten-Kohorte, die in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universitätsmedizin Mannheim behandelt wurde,

erfolgte die Auswertung der Behandlungsakten zur Erhebung folgender Daten: Alter bei Diagnosestellung, Geschlecht, Einweisungsdiagnose, Symptomatik, Lokalisation, Tumorgröße, Aussehen des Tumors, Komorbiditäten, Therapie. Darüber hinaus erfolgte in dieser Gruppe die Erfassung weiterer klinischer und soziodemographischer Variablen mit Hilfe eines speziell für diese Arbeit erstellten Fragebogens (siehe **Anhang 7.1**). Dieser Fragebogen wurde an 18 der 27 Patientinnen und Patienten der Mannheimer Kohorte versendet, die zum Untersuchungszeitpunkt im Herbst 2014 erreichbar und mit der Teilnahme einverstanden waren. Von 18 versendeten Fragebögen erhielten wir 17 Fragebögen ausgefüllt zurück, die in die Auswertung miteinbezogen wurden. Einige Fragebögen wurden jedoch nicht komplett ausgefüllt, sodass die Informationen zu den einzelnen Punkten nicht immer von allen Befragten vorliegen.

2.2.1. Fragebogen zur Erfassung von Risikofaktoren und klinischen Charakteristika der Patientinnen und Patienten

Anhand bisher bekannter Risikofaktoren für Hauttumoren im Allgemeinen und spezieller Risikofaktoren für das AFX wurde ein Fragebogen mit den Unterkategorien 1. Allgemeine Angaben, 2. Freizeitverhalten, 3. Erkrankungen und 4. Der Tumor (hier: AFX) entwickelt (siehe **Anhang 7.1**).

Es wurden u.a. Daten zu Person, Wohnort, Beruf, Noxen erhoben. Es wurde gezielt nach Freizeitaktivitäten und -verhalten in der Kindheit und Freizeitverhalten in den letzten 20 Jahren vor der Tumorerkrankung gefragt. Des Weiteren wurde die Sonnenexpositionsdauer, Verwendung von Sonnenschutz und die Teilnahme an Hautkrebsscreeninguntersuchungen erfragt (siehe **Anhang 7.1**).

Darüber hinaus wurden zusätzliche Angaben zur Haar- und Augenfarbe sowie zum Hauttyp, erfasst (siehe **Anhang 7.1**).

Im Teil „Erkrankungen“ wurde gezielt nach weiteren Erkrankungen und insbesondere nach Krebserkrankungen und deren spezifischer Therapien, gefragt (siehe **Anhang 7.1**). Der letzte Teil des Fragebogens enthielt Fragen zum AFX (siehe **Anhang 7.1**).

2.3. HISTOLOGISCHE UND IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

Für eine histologische und eine anschließende immunhistochemische Untersuchung standen 27 intraoperativ gewonnene Tumorexzisate von insgesamt 27 Patientinnen und Patienten aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universitätsmedizin Mannheim zur Verfügung. Für eine immunhistochemische Untersuchung standen zusätzlich 29 Präparate aus dem MVZ Dermatopathologie Prof. Dr. Kind in Offenbach zur Verfügung.
Nach der operativen Exzision in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universitätsmedizin Mannheim wurden die entnommenen Tumorgewebe zur weiteren Aufarbeitung in das Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mannheim transportiert. Dort erfolgte durch die Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Mannheim nach vorheriger standardisierter Aufbereitung der Präparate eine Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung der Gewebeproben entsprechend dem HE- Protokoll für Autostainer XL von Leica wie unter Abschnitt 2.3.1 beschrieben.

Die Fixierung der Präparate erfolgte mithilfe von Autotechnicon TP 1020 von Leica.
Zunächst wurden die Proben 2-mal in Formalin 10% gegeben und im Anschluss in aufsteigender Alkoholreihe (70% $\rightarrow$ 80% $\rightarrow$ 96% $\rightarrow$ 2-mal 100%) entwässert. Die Proben wurden danach 2-mal in Xylol verbracht bevor sie in Paraffin eingebettet wurden und im letzten Schritt per Hand am Folgetag in Kassetten mit Paraffin eingedeckt wurden.

2.3.1. Hämatoxylin-Eosin (HE)- Färbung

Die HE-Färbung gehört zu den Standardfärbungen. Sie dient häufig als Übersichtsfärbung, bevor immunhistochemische Färbungen angefertigt werden. Sie besteht aus zwei Anteilen, die für die unterschiedliche Färbung verschiedener Anteile der Zellen verantwortlich sind. Hämatoxylin wird aus dem Blauholzbaum gewonnen und ist dadurch ein natürlicher Farbstoff, der jedoch erst durch Oxidation zu Hämatein seine typische Farbe erhält. Eosin ist ein künstlich hergestellter, saurer Farbstoff.[69] Der Hämatoxylinanteil färbt basophile Strukturen wie Zellkerne, Kalk und Bakterien blau,

wohingegen der Eosinanteil für die Rotfärbung von azidophilen Strukturen wie Bindegewebe, Zytoplasma, Muskulatur, Osteoid sowie Exsudat verantwortlich ist.

Durchführung der HE-Färbung anhand des HE- Protokolls für Autostainer XL von Leica: Die Proben wurden hierfür 4-mal in Folge für jeweils 1 Minute in Xylol entparaffiniert und im Anschluss in absteigender Alkoholreihe (99% → 96% → 70%) für jeweils 1 Minute in Wasser gebracht. Danach erfolgte die Färbung in Hämatoxylin für 4 Minuten gefolgt von erneutem Wässern über 10 Minuten und anschließender Färbung mit Eosin 0,5% für 2 Minuten vor wiederholtem Wässern für 0,30 Minuten. In aufsteigender Ethanolreihe (80% → 96% → 96% (für je 0,30 Minuten) → 99% → 99% → 99% (für je 1 Minute)) wurde zunächst entwässert und, bevor das Eindecken mit Eukit erfolgte, 2-mal für jeweils 1 Minute in Xylol verbracht.

Nach Durchführung dieser Färbung konnten weitere Untersuchungsschritte erfolgen.

2.3.2. Ermittlung der Tumordicke und des dominanten Zelltyps

Mit dem Lichtmikroskop BX45 von Olympus (OLYMPUS Life And Material Science Europa GmbH, Hamburg, Deutschland) und einer 20er Vergrößerung wurde die Tumordicke der einzelnen formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten und HE-gefärbten Präparate ermittelt. Darüber hinaus erfolgte die Ermittlung des Zelltyps (epitheloid, spindelzellig, gemischt) in Prozent.

2.3.3. Tissue microarrays (TMAs)

In seiner heutigen Form wurde der TMA erstmalig im Jahre 1998 von Kononen et al. (1998) beschrieben. Bei diesem Verfahren werden mithilfe einer Hohlnadel aus repräsentativen Regionen formalinfixierter, in Paraffin eingebetteter Gewebeschnitte Stanzen mit einem Durchmesser von 0,6 mm und einer Höhe von 3-4 mm entnommen. Bis zu 1000 dieser Gewebszylinder verschiedener zu untersuchender Gewebe werden dann in einen neuen Wachsblock eingebracht. Hiervon können nachfolgend bis zu 200 Schnitte von 4-8 µm Dicke geschnitten werden.[70] Diese Methode wurde gewählt, da sie sowohl gewebesparend, als auch kosteneffizient ist. Zudem ermöglicht sie die Untersuchung von Gewebeproben unterschiedlicher Patientinnen und Patienten und

Präparaten mit einer einzigen immunhistochemischen Färbung, was zu einer optimierten Standardisierung und Vergleichbarkeit zwischen den Proben beiträgt. Zur Herstellung eines TMAs wurde ein für den Tumor repräsentatives Areal des formalinfixierten in Paraffin eingebetteten und HE-gefärbten Gewebeschnittes durch einen erfahrenen Facharzt für Dermatologie ausgewählt und markiert. Die Erstellung des TMAs wurde vom Nationalen Centrum für Tumorerkrankungen Heidelberg und der klinischen Kooperationseinheit Dermatoonkologie (KKE G300) des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg übernommen. Die TMAs wurden mit Hilfe des TissueMax Automated and Personal Tissue Microarrayer (Arrayit Corporation, Sunnyvale, Kalifornien, USA) nach dem Hersteller-Protokoll[71] erstellt. Auf diese Weise wurde ein TMA für die Proben der Mannheimer Kohorte (TMA1) und ein TMA für die Proben der externen Kohorte (TMA2) angefertigt. Nach Erstellung des TMAs durch das NCT wurden die Blöcke von Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universitätsmedizin Mannheim für 24 Stunden in 4% Paraformaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet und im Anschluss in 4 µm dicke Scheiben geschnitten und auf je einem Objektträger für die einzelnen immunhistochemischen Färbungen fixiert. Die Färbungen erfolgten gemäß eines standardisierten Protokolls (siehe **Abschnitt 2.3.4**) und entsprechend der Empfehlung des Herstellers der jeweiligen Antikörper (siehe **Tabelle 2**).

2.3.4. Immunhistochemische Analysen

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurden eine Reihe von immunhistochemischen Markern untersucht (siehe **Tabelle 2**).

Tabelle 2. Übersicht der verwendeten Antikörper

Primärantikörper	Klon	Typ	Hersteller	Code
Aktin	1A4	Mouse	Agilent	M0851
BRAF	VE1	Mouse	Amsbio	E19290
CD10	56C6	Mouse	Sigma-Aldrich	110M16
CD34	QBEnd10	Mouse	Beckman Coulter	PN IM0786
CD68	PG-M1	Mouse	Dako	M0876
CD99	12E7	Mouse	Dako	M3601
Desmin	polyclonal	Rabbit	Thermo Fisher Scientific	RB-9014-R7
EGFR	31G7	Mouse	Diagnostic BioSystems	Mob461
ERK1/2	137F5	Rabbit	Cell Signaling Technology	#4695S
Ki67	SP6	Rabbit	Abcam AG	Ab16667
MART1/ Melan-A	A103	Mouse	Thermo Fisher Scientific	MA5-14168
MEK 1/2	L38C12	Mouse	Cell Signaling Technology	#4694S
NF1	polyclonal	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology	SC-67
Pan-Cytokeratin	H-240	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology	SC-15367
pERK1/2	20G11	Rabbit	Cell Signaling Technology	#4376S
pMEK1/2	166F8	Rabbit	Cell Signaling Technology	#2338S
Anti-S100	polyclonal	Rabbit	Abcam AG	Ab868
Vimentin	SP20	Rabbit	Thermo Fisher Scientific	RM-9120-S

Anmerkung: Als Sekundärantikörper wurden Dako EnVision+ System-HRP, AEC, Rabbit K4009, Dako, Germany und Dako EnVision+ System-HRP, AEC, Mouse K4005, Dako, Germany verwendet.

Die Färbungen wurden von den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universitätsmedizin Mannheim gemäß Standard Protokoll durchgeführt.

Die Proben wurden nach Standard Protokoll zunächst 3-mal für jeweils 5 Minuten in Xylol verbracht und danach über eine absteigende Alkoholreihe (100% $\rightarrow$ 100% $\rightarrow$ 90% $\rightarrow$ 80% $\rightarrow$ 70%) für jeweils 3 Minuten in destilliertes Wasser gebracht für 15 Sekunden. Die Proben wurden dann 5-10 Minuten mit TBS gewaschen. Es folgte das Kochen, je nach verwendetem Antikörper, entweder in HIER Citrate Puffer bei pH 6,0 (Zytomed, Bestellnummer ZUC028-500) oder in HIER T-EDTA-Puffer bei pH 9,0

(Zytomed, Bestellnummer ZUC029-500), bei 100°C für 60 Minuten im Wasserbad gefolgt von Abkühlen über 20-30 Minuten (Dako-Pen S2002) und Einbringen in destilliertes Wasser für 15 Sekunden. Im Anschluss wurde 3-mal gewaschen, 2-mal mit TBS und 1-mal mit TBS-T 20 1% für 5 Minuten bevor der Peroxidase Block (Dako Kit), 0,03% dazugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert wurde. Anschließend wurde erneut 3-mal gewaschen (2-mal mit TBS für 5 Minuten und 1-mal mit TBS-T für 5 Minuten) bevor der Primärantikörper mit Dako Antikörper Verdünnung (S0809) hinzugegeben und über Nacht in der feuchten Kammer bei 4°C inkubiert wurde. Danach wurde 3-mal gewaschen, 2-mal mit TBS und 1-mal mit TBS-T 20 1% für 5 Minuten bevor der Sekundärantikörper Dako EnVision-System-HRP (Rabbit K4009 oder K4005 Mouse) für 60 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert wurde. Nach wiederholtem 3-maligem Waschen, 2-mal mit TBS und 1-mal mit TBS-T 20 1% für 5 Minuten wurde 1 Tropfen AEC für 10-30 Minuten hinzugegeben. Die Färbung wurde anschließend mit destilliertem Wasser gestoppt und es erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin 1:10 für 7 Minuten und anschließendem Waschen mit je 2-mal Leitungswasser und 2-mal destilliertem Wasser bevor das Eindecken mit Dako S3025 erfolgte.

Die immunhistologische Auswertung wurde mittels Lichtmikroskop BX45 von Olympus (Olympus Life And Material Science Europa GmbH, Hamburg, Deutschland) in 20-facher Vergrößerung der Präparate von zwei unabhängigen Untersucherinnen durchgeführt. Des Weiteren wurden die TMA-Schnitte mit dem Nikon Eclipse Ni Mikroskop (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) in einer 20er Vergrößerung eingescannt. Die Auswertung der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen erfolgte durch die Verfasserin der Arbeit unter Supervision einer erfahrenen Fachärztin für Dermatologie der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universitätsmedizin Mannheim. Dabei erfolgte die Beurteilung der Positivität der jeweiligen Tumorprobe für einen jeden Antikörper als dichotome Entscheidung (Ja/Nein) und in positiven Fällen die Quantifizierung der Positivität im Sinne des prozentualen Anteils der positiv gefärbten Areale an der Gesamtfläche der Probe (in %). Für die Auswertung des TMAs beider untersuchten Kohorten hinsichtlich MEK, pMEK, ERK, pERK, EGFR und NF1 wurde ein spezielles Scoring System verwendet. Aus dem Produkt von Quantität und Intensität der Immunpositivität errechnet sich ein Gesamtscore (siehe unten). Dieses Scoring System wurde 2014 von 3 Mitarbeitern

der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universitätsmedizin Mannheim für die TMA-Analyse zur IHC-Bewertung auf Basis von Arbeiten von Lian et al. (1999) und Nisolle et al. (2012) entwickelt.[72,73] Anhand der Intensität und Quantität der Färbung wird ein Gesamtscore ermittelt, der sich wie folgt berechnet:

Gesamtscore = Immunpositivitäts (IP) Score x Immunintensitäts (II) Score

Für die Intensität der Färbung (Immunintensität) wurden Werte von 0-3 vergeben, wobei eine Intensität von 0 keiner Reaktion, eine Intensität von 1 einer leichten, eine Intensität von 2 einer mäßigen und eine Intensität von 3 einer starken Reaktion entspricht. Die Quantität, also der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen (Immunpositivität), wurde den Kategorien 0-4 zugeordnet mit Kategorie 0 (<1%), 1 (1-9%), 2 (10-24%), 3 (25-74%), 4 (75-100%). Aus der Multiplikation der Scores für IP und II ergibt sich ein Gesamtscore mit Werten zwischen 0 und 12. Dieser Score wurde für jede Probe des TMAs berechnet. Der Durchschnittswert der ermittelten Werte eines Tripletts ergibt den jeweiligen Score eines Tumorsamples.[74] Die Erhebung erfolgte auch hier durch zwei unabhängige Untersucherinnen.

2.4. MUTATIONS-ANALYSE DER BRAF- UND NRAS-GENE

Zum Zeitpunkt der Erstellung der vorgelegten Arbeit war die genetische Basis des beim AFX beobachteten schnellen Tumorwachstums nicht abschließend geklärt. Aufgrund der Relevanz und dem therapeutischen Potential, die sich aus Mutationen im NRAS- und BRAF-Gen ergeben, wurden potentielle Mutationen bei einer Teilstichprobe von n=7 Tumorproben untersucht, die die höchste Expression von Proteinen des MAP-Kinase Signalwegs zeigten (MEK, ERK, pERK, pMEK). Die Mutationsanalysen wurden im Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mannheim durchgeführt. Diese erfolgten mittels Qiagen Pyrosequencer mit den entsprechenden Therascreen Pyro Kits für BRAF und NRAS der Firma Qiagen (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland). Die Ergebnisse der Analysen wurden im Anschluss digital an die Projektmitarbeiterinnen und -mitarbeiter der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universitätsmedizin Mannheim übermittelt. Die Analysen wurden dort entsprechend etablierter Prozeduren durchgeführt. Da die molekulargenetischen Analysen im Rahmen der vorgelegten

Arbeit lediglich Zusatzanalysen darstellen, wird auf eine detaillierte Beschreibung der Methodik verzichtet. Die Details zur verwendeten Methodik sind ausführlich in Publikationen der Arbeitsgruppe dargestellt.[75]

2.5. STATISTISCHE ANALYSEN DER DATEN

Die Analyse der Daten und die Erstellung von Abbildungen erfolgte mit Hilfe der statistischen Analyse Software IBM SPSS in der Version 27.0 (IBM Company, Armonk, New York, USA). Die Auswertung der klinischen, demographischen und Fragebogendaten erfolgte dabei mittels geeigneter deskriptiver Maße für die jeweiligen Parameter. Auch die Analyse der histologischen Daten zu Tumordicke und dem Anteil von Epitheloid- und Spindelzellen im jeweiligen Präparat erfolgt mit Hilfe geeigneter deskriptiver Maße für die jeweiligen Parameter. Die Darstellung der Positivität und Intensität sowie des Immunhistochemischen Gesamtscores erfolgte durch geeignete Summenmaße. Der Vergleich der beiden Studien-Kohorten im Hinblick auf die Häufigkeiten positiver Reaktionen auf einen entsprechenden Antigen-Marker erfolgte mittels Fisher-Yates-Test beziehungsweise einem exakten Chi-Quadrat-Test. Die Analyse von Gruppenunterschieden erfolgte für normalverteilte Variablen mit Hilfe von t-Tests für ungepaarte Stichproben und im Falle nicht-normalverteilter Variablen und Zielgrößen mit ordinalem Skalenniveau (II-Score, IP-Score, IHC-Gesamt-Score) mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests. Die Normalverteilung der Daten wurde mittels visueller Inspektion und Shapiro- Wilk Test überprüft.

3. ERGEBNISSE

Den dargestellten Ergebnissen liegen die klinischen, histologischen, immunhistochemischen und genetischen Daten einer Kohorte von N=27 Patientinnen und Patienten aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universitätsmedizin Mannheim zu Grunde und die immunhistochemischen Daten von N=29 Patientinnen und Patienten einer externen Kohorte, deren Proben von einem externen dermatopathologischen Labor zur Verfügung gestellt wurden.

3.1. KLINISCHE DATEN

Das als Mannheimer Kollektiv bezeichnete Kollektiv von Patientinnen und Patienten bestand aus insgesamt 27 Personen. Eine Übersicht der soziodemographischen und klinischen Charakteristika der Stichprobe ist in **Tabelle 3** dargestellt. Das Kollektiv umfasste 85% (23/27) männliche Patienten und 15% (4/27) weibliche Patientinnen. Dies entspricht einem Verhältnis Männer zu Frauen von 5,6:1. Das Alter der Patientinnen und Patienten bei Erstdiagnose zeigte eine Spannbreite von 67 bis 95 Jahren. Das Durchschnittsalter lag bei 78,70 +/- 7,69 Jahren, der Median bei 77 Jahren.

Tabelle 3. Darstellung der soziodemographischen und klinischen Charakteristika der Mannheimer Kohorte sowie der klinischen Präsentation und mikroskopisch-histologischen und immunhistochemischen Präsentation der Tumorproben, die als AFX klassifiziert worden waren.

Mannheimer Kohorte (N=27)	
Alter [in Jahren; M (SD)]	78,70 (7,7)
Geschlecht [Männer/Frauen]	23 (85,2%) / 4 (14,8%)
Hauttyp nach Fitzpatrick [Typ I/Typ II/Typ III: Typ IV/Typ V/Typ VI][#1]	0/9/6/0/1/0
Anderer Hauttumor [Ja/Nein]	16 (59,3%) / 11 (40,7%)
Raucher [Ja/Nein] [#]	9 (52,9%) / 8 (47,1%)
Packyears [Pack × Anzahl Raucherjahre; M (SD)]	11,15 (18,8)
Exposition gegenüber Chemikalien in der Vorgeschichte [Ja/Nein][#]	4 (23,5%) / 10 (67,5%)
Radiotherapie in der Vorgeschichte [Ja/Nein] [#]	2 (11,8%) / 15 (88,2%)
Chemotherapie in der Vorgeschichte [Ja/Nein] [#]	1 (5,9%) / 16 (94,1%)
Phototherapie in der Vorgeschichte [Ja/Nein] [#]	4 (23,5%) / 13 (76,5%)
Klinische Präsentation	
Lokalisation [Capillitium/Gesicht/Ohr/Hand/ Dekolleté]	14 / 5 / 6 / 1 / 1
Juckreiz [Ja/Nein] [#]	8 (47,1%) / 9 (52,9%)
Ulzeration mit Blutung [Ja/Nein] [#]	7 (41,2%) / 10 (58,8%)
Metastasierung [Ja/Nein] [#]	0 (0%) /17 (100%)
Histologisch-immunhistochemische Präsentation	
Tumordicke [in mm; M (SD)]	5,62 (3,2)
PanCK [% positiver Präparate, n=21]	0%
PanCK [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	0 (0)
MART1 [% positiver Präparate, n=21]	0%
MART1 [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	0 (0)
S100 [% positiver Präparate, n=20]	0%
S100 [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	(0)
CD34 [% positiver Präparate, n=14]	0%
CD34 [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	0 (0)
Aktin [% positiver Präparate, n=26]	53,8%
Aktin [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	16,66 (19,9)
Desmin [% positiver Präparate, n=24]	8,3%
Desmin [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	2,60 (10,5)
Vimentin [% positiver Präparate, n=21]	100%
Vimentin [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	81,90 (12,5)
CD68 [% positiver Präparate, n=24]	87,5%

CD68 [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	42,94 (16,9)
Ki67 [% positiver Präparate, n=23]	87,5%
Ki67 [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	27,82 (15,1)
CD99 [% positiver Präparate, n=21]	61,9%
CD99 [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	68,46 (34,1)
CD10 [% positiver Präparate, n=26]	96,2%
CD10 [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	57,75 (27,9)
BRAF [% positiver Präparate, n=21]	61,9%
BRAF [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	50,76 (29,4)
MEK [% positiver Präparate, n=21]	38,1%
MEK [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	67,5 (30,5)
pMEK [% positiver Präparate, n=21]	95,2%
pMEK [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	78,50 (20,3)
ERK [% positiver Präparate, n=21]	81,0%
ERK [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	47,88 (28,8)
pERK [% positiver Präparate, n=21]	38,1%
pERK [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	4,79 (7,9)

Legende: M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, # = Fehlende Werte für n=10 Patientinnen und Patienten, da nur ein Teil der Stichprobe mittels Fragebogen befragt wurde (n=18) und n=17 auf den zugesandten Zusatzfragebogen antwortete; [1]=Einteilung der Hauttypen nach.[76]

3.1.1. Auswertung des Fragebogens zur Erfassung von Risikofaktoren

Von 17 der 27 Patientinnen und Patienten des Mannheimer Kollektivs konnten mittels Fragebogen noch weitere über die Inhalte der Behandlungsakte hinausgehende Daten erhoben werden. Einige Fragen wurden teilweise offengelassen, weswegen sich teilweise eine abweichende Gesamtzahl ergibt.

<u>Daten zu Geburtsort, Beruf und Lebensmittelpunkt</u>

94,1% (16/17) der befragten Patientinnen und Patienten wurden in Deutschland geboren, 1 Patient (5,8%) wurde im Ausland (Bosnien-Herzegowina) geboren. Allen 17 Patientinnen und Patienten gemeinsam war der Hauptlebensmittelpunkt in Deutschland, genauer in der Rhein-Neckar-Odenwald-Region, dem Haupteinzugsgebiet unserer Klinik. Angaben zum Beruf machten 13/17 der befragten Patientinnen und Patienten. Es wurden die Berufe Maler, Hausfrau, Diplomingenieur, Kaufmann für Baustoffe, Pfarrer, kaufmännischer Angestellter, Maschinenschlosser, Wirtschaftsingenieur, Oberstudienrat, Speditionskaufmann, Elektroingenieur,

Verkaufsleiter, Beamter und Dreher genannt. Keiner der 17 Patientinnen und Patienten arbeitete beruflich im Freien.

Daten zur Exposition gegenüber Chemikalien, Strahlentherapie, Phototherapie, Chemotherapie und Nikotin

Kontakt zu Chemikalien im Beruf gaben 4/17 Patientinnen und Patienten, (23,5%) an. Als Kontaktstoffe wurden Lösungsmittel, Holzschutzmittel, Kühlmittel, Asbest, Eternit, Bleiweiß (Bleihydroxidkarbonat), Menninge (Blei (II,IV)-oxid), Salmiak (Ammoniumchlorid) und Ammoniak jeweils einfach genannt. Anamnestisch konnte bei 1 Patienten (5,88%) eine Phototherapie bei atopischer Dermatitis ermittelt werden. Einer Radiatio aufgrund von anderen Tumorerkrankungen hatten sich anamnestisch 2 Patienten (11,76%) unterzogen. Die Frage nach Nikotinkonsum im Laufe ihres Lebens beantworteten 47% (8/17) mit nein und 53% (9/17) der Patientinnen und Patienten mit ja. Unter den 9 Patientinnen und Patienten, die einen Nikotinkonsum angaben, waren zum Zeitpunkt der Befragung noch 3 Personen aktive Raucher und Raucherinnen, die anderen 6 hatten den Nikotinkonsum inzwischen aufgegeben. Der durchschnittliche Nikotinkonsum der ehemaligen sowie der aktiven Raucher und Raucherinnen erbrachte einen Wert von durchschnittlich 11,1 Packyears (SD=18,8).

Daten zum Hauttyp und zu regelmäßigem Hautkrebsscreening

16 Patientinnen und Patienten gaben mittels Fragebogen eine Einschätzung zu ihrem individuellen Hauttyp, basierend auf ihrer Haarfarbe, Augenfarbe sowie dem Bräunungs- und Verbrennungsverhalten der Haut, ab. Hierbei identifizierten sich die Teilnehmer als Hauttypen II, III und V (n=9 [56%] Hauttyp II, n=6 [37%] Hauttyp III, n=1 [6%] Hauttyp V) (siehe **Abbildung 2**).[76] Angaben zu regelmäßigem Hautscreening nach Diagnose des Hauttumors machten 16 von 17 der befragten Patientinnen und Patienten. Von 1 Patienten fehlen die Angaben in dieser Kategorie. 12 von 16 Patientinnen und Patienten gaben an, mindestens 2-mal jährlich zum Hautkrebsscreening zu gehen. 1 von 16 Patientinnen und Patienten gaben an, das Screening mindestens 1-mal pro Jahr wahrzunehmen, nur 3 von 16 Patientinnen und Patienten gaben an, dies seltener als 1-mal pro Jahr wahrzunehmen.

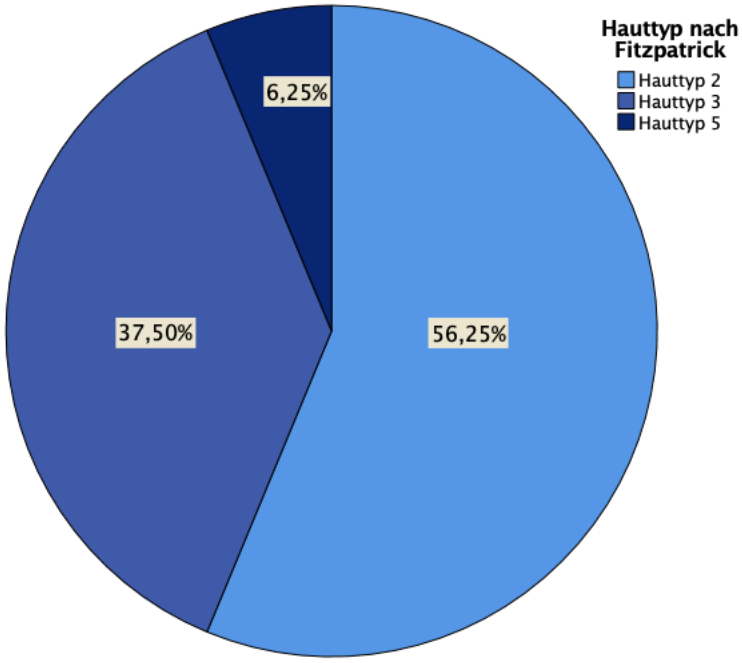


Abbildung 2. Häufigkeit der verschiedenen Hauttypen bei Patientinnen und Patienten der Mannheimer Kohorte (Daten waren für n=16 Patientinnen und Patienten verfügbar).

Familienanamnese

Die Familienanamnese für Hauttumoren war bei allen 17 befragten Patientinnen und Patienten leer.

Daten zu Präkanzerosen und anderen Hauttumoren

Bei den Begleiterkrankungen wurde insbesondere nach weiteren Hauttumoren gefragt. 55,60% (15/27) der Patientinnen und Patienten wiesen noch mindestens 1 weitere Präkanzerose oder 1 weiteren Hauttumor in der Vorgeschichte auf (siehe **Abbildung 3**). Dies war bei 5/27 (18,50%) der Patientinnen und Patienten eine aktinische Keratose, bei 7/27 (25,90%) ein Morbus Bowen, bei 1/27 (3,70%) Patientinnen und Patienten eine Lentigo Maligna, bei 1/27 (3,70%) ein malignes Melanom, bei 1/27 Patienten (3,70%) ein malignes fibröses Histiozytom (MFH), bei 7/27 (25,90%) Patientinnen und Patienten ein Basalzellkarzinom (BCC), bei 7/27 (25,90%) Patientinnen und Patienten ein spinozelluläres Karzinom (SCC), bei 1/27 Patienten (3,70%) ein Bowen-Karzinom und bei 1/27 Patienten eine Mykosis fungoides (3,70%).

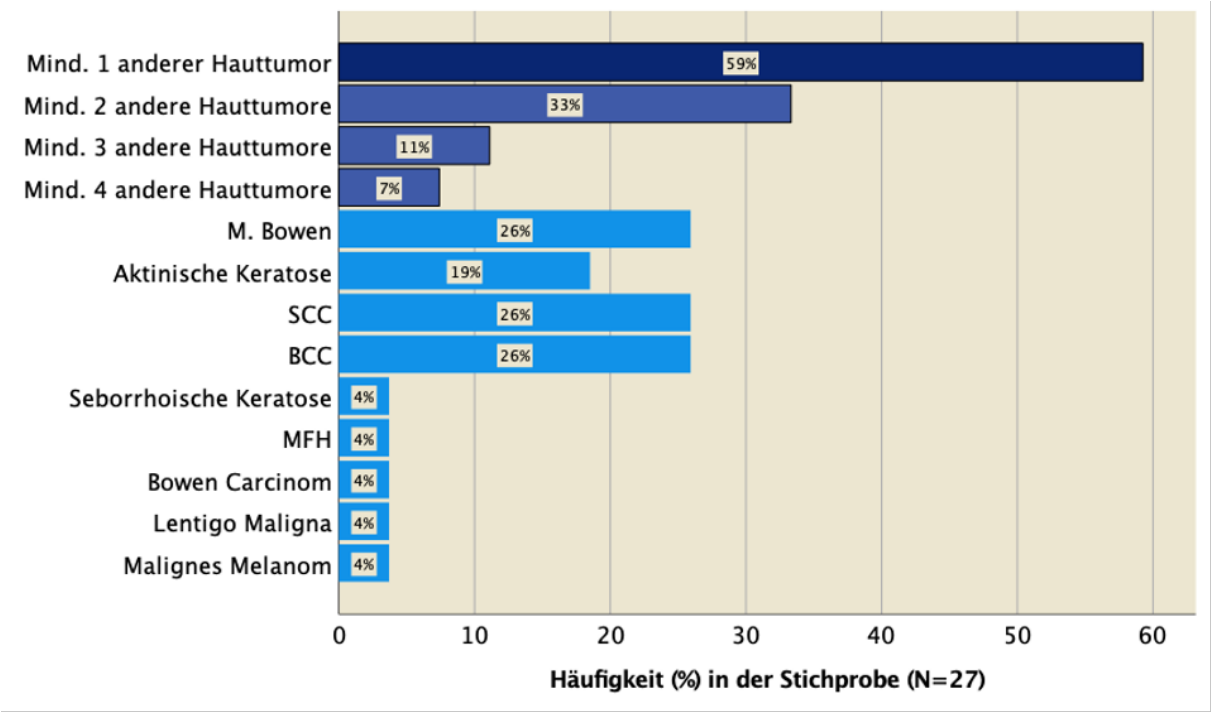


Abbildung 3. Darstellung der Häufigkeit von Präkanzerosen und anderen Hauttumoren in der Mannheimer Kohorte.

Daten zu anderen Begleiterkrankungen

Im Bereich der Begleiterkrankungen wurden insbesondere Krebserkrankungen anderer Organe als der Haut, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Schilddrüsenerkrankungen sowie Diabetes erfragt. Begleitende Krebserkrankungen waren bei 33,33% (9/27) der Patientinnen und Patienten des Mannheimer Kollektivs vorhanden. Diese betrafen bei 4 Patienten die Prostata, bei 1 Patientin die Mamma, bei 1 Patienten den Larynx, in 2 weiteren Fällen das blutbildende System (chronisch lymphatische Leukämie (CLL)) und bei 1 weiteren Patienten das Lymphsystem (Non Hodgkin Lymphom (NHL)). Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems waren bei 18,52% (5/27) vorhanden. Bei 8/27 Patientinnen und Patienten (29,63%) war begleitend ein Diabetes mellitus Typ II bekannt. Schilddrüsenerkrankungen waren bei 5/27 Patientinnen und Patienten (18,52%) als Begleiterkrankungen genannt worden. Von den 5 Patientinnen und Patienten mit bekannter Erkrankung der Schilddrüse waren dies in 1 Fall eine Struma multinodosa, in den verbleibenden 4 Fällen eine Hypothyreose.

Daten zum Freizeitverhalten

Zu Freizeitaktivitäten in der Kindheit machten die Patientinnen und Patienten folgende Angaben: 3 von 17 Patientinnen und Patienten gaben an, häufig gewandert zu sein, 7/17 manchmal, 5/17 selten. 2 von 17 Patientinnen und Patienten gaben an, in der Kindheit nie gewandert zu sein. Wintersport wurde nach Angaben der Patientinnen und Patienten von 3/16 Personen häufig, von 3/16 manchmal, selten von 2/16 und nie von 8/16 der Befragten ausgeübt. Von 1 Patienten fehlten hierzu die Angaben. Im Punkt Spazierengehen antworteten 11/16 Patientinnen und Patienten mit häufig, 2/16 mit manchmal, 1/16 mit selten und 2/16 mit nie. 1 Patient machte hierzu keine Angaben. Fußballspielen wurde von 2/17 Personen als häufige Aktivität benannt, 3/17 gaben an manchmal Fußball gespielt zu haben, 3/17 gaben an dies selten getan zu haben und 8/17 nie. Fahrradfahren nannten 12/17 als häufige Aktivität, 2/17 als manchmal, 1/17 als selten und 2/17 als nie. Joggen nannten 2/16 Patientinnen und Patienten als seltene, 14/16 als nie durchgeführte Aktivität. 1 Patient machte in dieser Kategorie keine Angabe. Von den Befragten nannten 6/17 Schwimmen als häufige, 5/17 als manchmal, 2/17 als seltene und 4/17 als nie durchgeführte Freizeitaktivität. Tennis hat in seiner Kindheit nur 1 der Patienten häufig gespielt, 93,75% verneinten dies (15/16). Von 1 befragten Patienten fehlt die Angabe in der Kategorie Tennisspielen. Golfspielen und Segeln wurde von allen Patientinnen und Patienten, die eine Angabe in dieser Kategorie machten (16/16), verneint. Gartenarbeit führten 8/17 häufig, 3/17 manchmal, 3/17 selten und 3/17 nie aus. Jährlicher Urlaub in sonnigen Regionen wurde von 2/17 als häufig, von 3/17 als manchmal, von 1/17 als selten und von 11/17 als nie genannt. Sonnenbaden waren 2/17 häufig, 2/17 manchmal, 3/17 selten und 10/17 der Befragten nie. Sonnencreme wurde von keiner bzw. keinem der 17 Befragten häufig verwendet, 2/17 benutzten sie manchmal, 6/17 selten und 9/17 verwendeten nie Sonnencreme. Sonnenbrände in der Kindheit gaben die Patientinnen und Patienten mit folgender Häufigkeit an: 1/17 häufig, 2/17 manchmal, 7/17 selten und 7/17 nie.

Für den Zeitraum der letzten 20 Jahre vor der Diagnose AFX machten die befragten Personen folgende Angaben zu ihren Freizeitaktivitäten: Die Frage ob sie in diesem Zeitraum gewandert seien beantworteten insgesamt 16 Patientinnen und Patienten. 8/15 mit häufig, 3/15 mit manchmal, 1/15 mit selten und 3/15 mit nie. 2 Patienten machten keine Angaben in dieser Kategorie. Wintersport betrieben 1/15 häufig, 3/15 manchmal, 2/15 selten und 9/15 nie. 2 Patientinnen und Patienten machten hierzu

keine Angaben. Spazieren gingen 9/16 häufig, 2/16 manchmal, 4/16 selten und 1/16 nie. Von 1 Patienten wurde keine Angabe gemacht. Fußballspielen gehörte bei 1/16 Patienten häufig, bei keiner bzw. keinem der Patientinnen und Patienten manchmal, bei 1/16 selten und bei 14/16 nie zu den Freizeitaktivitäten. 1 Patient machte keine Angabe. Fahrradfahren nannten 8/16 als häufige Aktivität, 3/16 manchmal, 1/16 selten und 4/16 nie. Von 1 Patienten wurde diese Frage nicht beantwortet. Joggen gingen 2/15 häufig, keine der befragten Personen manchmal oder selten, 13/15 nie. 2 der befragten Patientinnen und Patienten machten hierzu keine Angaben. Schwimmen wurde unter den Freizeitaktivitäten bei jeweils 4/16 als häufig, 4/16 manchmal und 3/16 selten sowie bei 5/16 nie genannt. 1 Patient hat diese Frage nicht beantwortet. Jährlichen Urlaub in sonnenreichen Regionen führten 3/16 häufig, 7/16 manchmal, 1/16 selten und 5/16 Personen nie durch. 1 Patient hat diese Frage nicht beantwortet. Sonnenbaden wurde von 1/15 selten und von 14/15 als nie genannt. Von 2 Patientinnen und Patienten fehlt die Angabe. 1/16 Patienten benutzte häufig Sonnencreme, 4/16 manchmal, 7/16 selten und 4/16 nie. 1 Patient machte keine Angabe. Sonnenbrände hatten 7/17 Patientinnen und Patienten selten, 10/17 nie. Gartenarbeit war bei 9/16 häufig, bei 3/16 manchmal, bei 1/16 selten und bei 3/16 befragten nie ein Teil der Freizeitaktivitäten. 1 Patient machte keine Angaben. 1/15 gab Tennisspielen als häufige Freizeitaktivität an, wohingegen 14/15 diese Aktivität nie ausübten. 2 Patientinnen und Patienten haben diese Frage nicht beantwortet. Segeln sowie Golfspielen spielte auch im Erwachsenenalter bei den Befragten keine Rolle. 100% gaben an, weder gesegelt zu sein noch Golf gespielt zu haben (jeweils 15/15). Von 2 Patientinnen und Patienten fehlten auch hier die Antworten.

Daten zur UV-Exposition und zum Sonnenschutz

Insgesamt zeigte sich bei 12/17 Patientinnen und Patienten, dass sie sehr viel Zeit (>=2 Stunden) im Freien verbracht haben. 4/17 Patientinnen und Patienten hingegen verbrachten keine Zeit im Freien. Die Aufenthaltsdauer erstreckte sich über einen Zeitraum von 0 bis hin zu 8 Stunden täglich, mit einem Median von 2,58 Stunden. Besuche im Solarium wurden von 100% aller befragten Patientinnen und Patienten (17/17) sowohl in der Vergangenheit, als auch zum aktuellen Zeitpunkt der Befragung, verneint. Zur Verwendung von Sonnenschutz textiler Art (Kleidung, Hut) äußerten sich 15/16 Patientinnen und Patienten positiv, 1 Patient verneinte die Verwendung. 1 Patient machte keine Angabe. Unter den Patientinnen und Patienten, die sich positiv

äußerten machten jedoch 3/16 die Bemerkung, dies erst seit dem Tumor zu tun. Sonnencreme mit Lichtschutzfaktor verwendeten 7/15 der Befragten. Angaben zur Höhe des Lichtschutzfaktors machten nur 4/7. Der unter ihnen durchschnittlich verwendete Lichtschutzfaktor (LSF) lag bei 40. Als Ferienziele wurden dreifach „die Berge“ genannt, Mehrfachnennungen gab es von Österreich und verschiedenen Regionen Italiens, weitere Angaben waren Griechenland, Kanaren, Kroatien, Frankreich, Großbritannien, USA, Skandinavien, Deutschland und Polen.

Daten zur klinischen Symptomatik des AFX

Daten zur klinischen Symptomatik sind in **Tabelle 3** dargestellt. In keinem Fall (0/17) war ein Rezidiv oder eine Metastasierung aufgetreten. Das AFX wurde bei 12/17 Patientinnen und Patienten durch den Haus- bzw. Hautarzt erkannt. Bei 1/17 Befragten sei der Tumor zuerst den Angehörigen aufgefallen und 4/17 Patientinnen und Patienten haben den Tumor selbst entdeckt.

3.2. KLINISCHE UND HISTOLOGISCHE PRÄSENTATION DES AFX

Die Ergebnisse zur Histologie des AFX beziehen sich allein auf die Mannheimer Kohorte (N=27). Die Auswertung zur Klinik setzt sich aus den anamnestischen Aufzeichnungen der Krankenakten zum Zeitpunkt des klinischen Aufenthaltes sowie teils ergänzende Angaben durch den Fragebogen zusammen.
Zur allgemeinen histologischen Untersuchung standen 25 Präparate der 27 Patientinnen und Patienten zur Verfügung. Angaben zu den übrigen zwei Tumoren stammen aus den entsprechenden vorliegenden histologischen Befunden der Krankenakte.

Das klinische Bild des Tumors wurde in allen 27 Fällen als solitärer, hautfarbener Nodus mit in 52% der Fälle ulzerierter Oberfläche beschrieben (siehe **Abbildung 4**). Histologisch zeigten sich die Tumoren zellreich, mit einer Ausbreitung in der Dermis. In 20% der Fälle zeigte sich eine Infiltration des subkutanen Fettgewebes. Faszie oder Muskulatur wurde von keinem unserer 27 untersuchten Tumoren infiltriert. Perineurale Infiltration zeigte sich in 1 der untersuchten Präparate (4%). Es war in keinem Fall eine vaskuläre Infiltration zu finden.

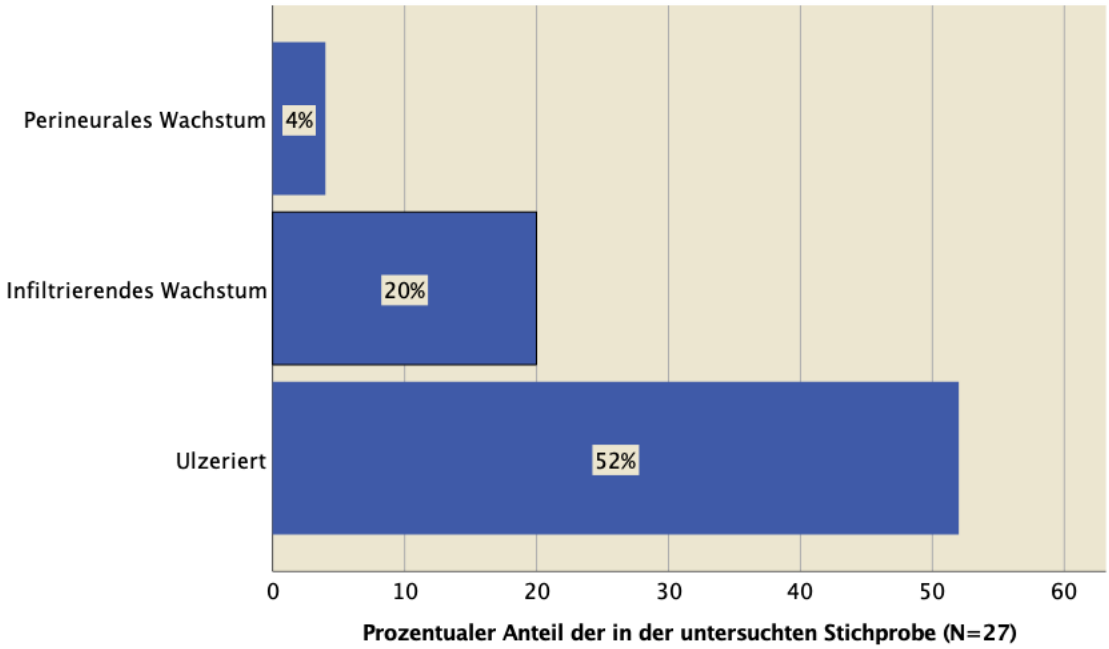


Abbildung 4. Darstellung des Wachstumsverhaltens der AFX in der untersuchten Patientenkohorte.

Die Tumordicke ließ sich im Bereich zwischen 2,5 mm und 17,5 mm einordnen, mit einem Durchschnittswert von 5,62 mm und einer Standardabweichung von 3,20 mm (siehe **Abbildung 5**).

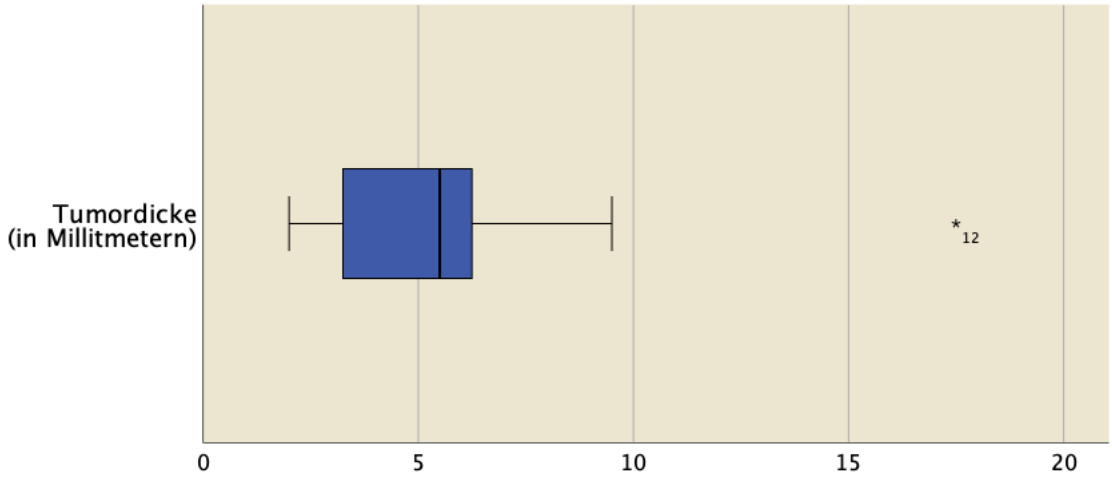


Abbildung 5. Darstellung des Mittelwerts und der Interquartilsabstände der gemessenen Tumordicken der AFX-Präparate

Die Tumore befanden sich in lichtexponierten Arealen (siehe **Abbildung 6**). Am häufigsten trat das AFX in der untersuchten Mannheimer Patientenkohorte im Bereich des Capillitiums auf, gefolgt von Ohr und Gesicht. Deutlich seltener fand sich das AFX in anderen Bereichen wie der Hand und dem Dekolleté.

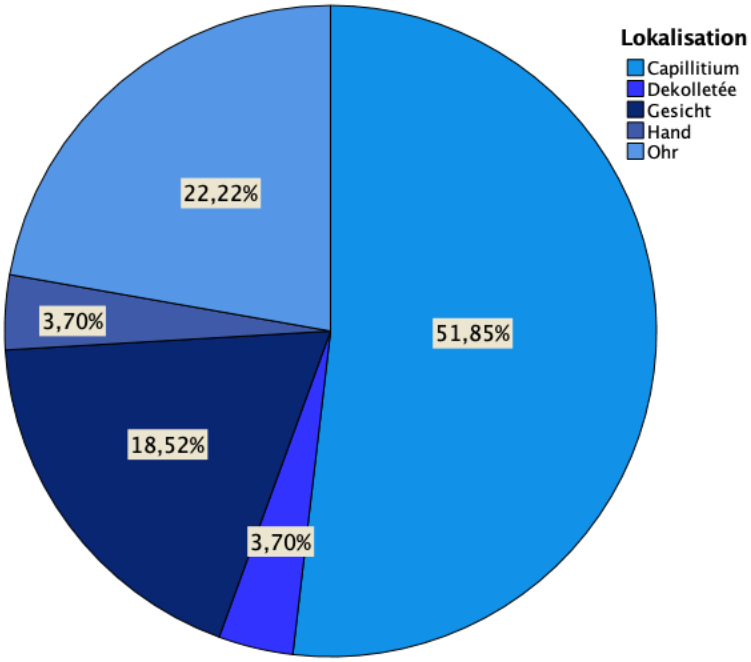


Abbildung 6. Darstellung der Häufigkeiten der Lokalisationen des AFX in der untersuchten Mannheimer Patientenkohorte (N=27).

Histologisch ließen sich Tumoren von vermehrt spindelzelligem sowie Tumoren mit vermehrt epitheloidzelligem Zelltyp finden. Ebenso war eine Mischung beider Typen zu sehen. Ein überwiegend spindelzelliges Bild (>50%) zeigte sich in 52,4% der untersuchten Tumoren (siehe **Abbildung 7**). Das epitheloide Zellbild überwog in 19,0% der untersuchten Tumoren. In 28,6% der Tumoren zeigte sich ein zwischen epitheloiden und spindelzelligen Tumorzellen ausgeglichenes Verhältnis.

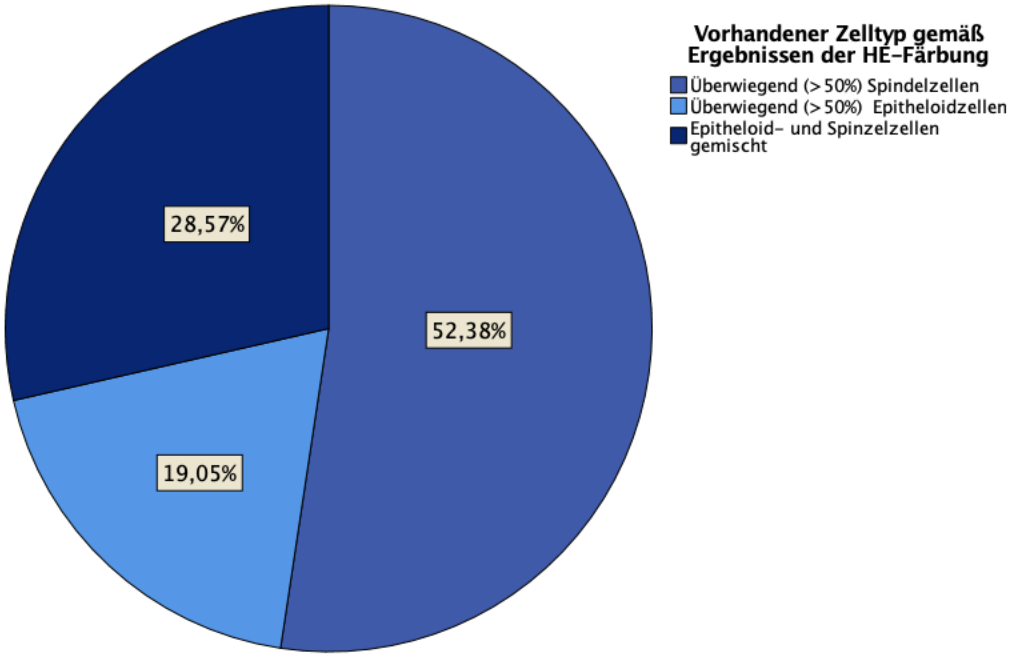


Abbildung 7. Darstellung der beobachteten Häufigkeiten des dominierenden Zelltyps (Spindelzellen versus Epitheloidzellen) in den AFX-Tumorpräparaten der Mannheimer Patientenkohorte.

Insgesamt zeigte sich mikroskopisch ein Bild pleomorpher, hyperchromatischer Zellkerne, häufig mit teils atypischen Mitosefiguren. Riesenzellen wurden in 12% (3 von 25) der untersuchten Präparate gefunden.

In 21 der 25 Präparate wurde eine solare Elastose detektiert. In 4 der 25 untersuchten Schnitte konnte keine solare Elastose gefunden werden. Das Ausmaß der solaren Elastose wurde in 4 Kategorien (0 bis 3) eingeteilt, wobei 0 der Abwesenheit von Zeichen einer solaren Elastose entspricht, 1 einer milden, 2 einer moderaten und 3 einer intensiven Ausprägung. Eine milde solare Elastose zeigte sich in 6/25 Fällen, eine mäßige solare Elastose in 4 von 25 und eine intensive solare Elastose war in 11 von 25 Präparaten zu finden.

3.3. Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

3.3.1. Ergebnisse der Mannheimer Patientenkohorte

Von insgesamt 21 der 27 Patientenproben des Mannheimer Kollektivs war es möglich einen TMA zur immunhistochemischen Färbung zu erstellen. Von den übrigen 6 Patienten lagen zum Teil aus zuvor durchgeführten Färbungen bereits Präparate oder

Ergebnisse vor, die dann ebenfalls mit in die Auswertung einbezogen wurden, sodass sich teilweise unterschiedliche Gesamtanzahlen von untersuchten Präparaten zwischen den einzelnen Färbungen ergeben (siehe **Tabelle 3**).

Eine Übersicht der Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen der Mannheimer Kohorte (N=27) findet sich in **Tabelle 3** und **Abbildung 8**. Die Färbung mit einem Antikörper gegen den Melanozytenmarker S100 lieferte in allen 20 untersuchten Präparaten ein negatives Ergebnis. 23 der vorliegenden Präparate wurden mit einem anti-MART1 Antikörper angefärbt und zeigten sich in allen Fällen negativ. PanCK war in allen 21 untersuchten Präparaten negativ. Negativ waren auch alle 14 mit einem anti-CD34 Antikörper gefärbten Präparate. Desminexpression konnte in 8,3% (2/24) der Proben detektiert werden mit einem Anteil Desmin-positiver Zellen zwischen 10% und 50%. Smooth Muscle Actin (SMA) konnte in 53,8% (14/26) der untersuchten Präparate nachgewiesen werden (<10% bis max. 70%). Die Färbung mit einem anti-CD99 Antikörper reagierte positiv in 61,9% (13/21) der Fälle, wobei 20% bis 100% der Zellen CD99 exprimierten. Die Expression von CD68 wurde in 87,5% (21/24) der untersuchten Tumorpräparate festgestellt, mit einem Anteil der CD68-exprimierenden Zellen zwischen 20 bis 90%. In 96,2 % (25/26) zeigte sich die Färbung mit anti-CD10 Antikörper positiv mit einem Anteil CD10-exprimierender Zellen zwischen 10 und 90%. Vimentinexpression konnte in allen untersuchten Präparaten detektiert werden mit einem Anteil Vimentin-exprimierender Zellen zwischen 70% bis 100%. Mithilfe des Proliferationsmarkers Ki67 wurde bei 23 untersuchten Präparaten ein Anteil an Tumorzellen zwischen 10% und 50% angefärbt.

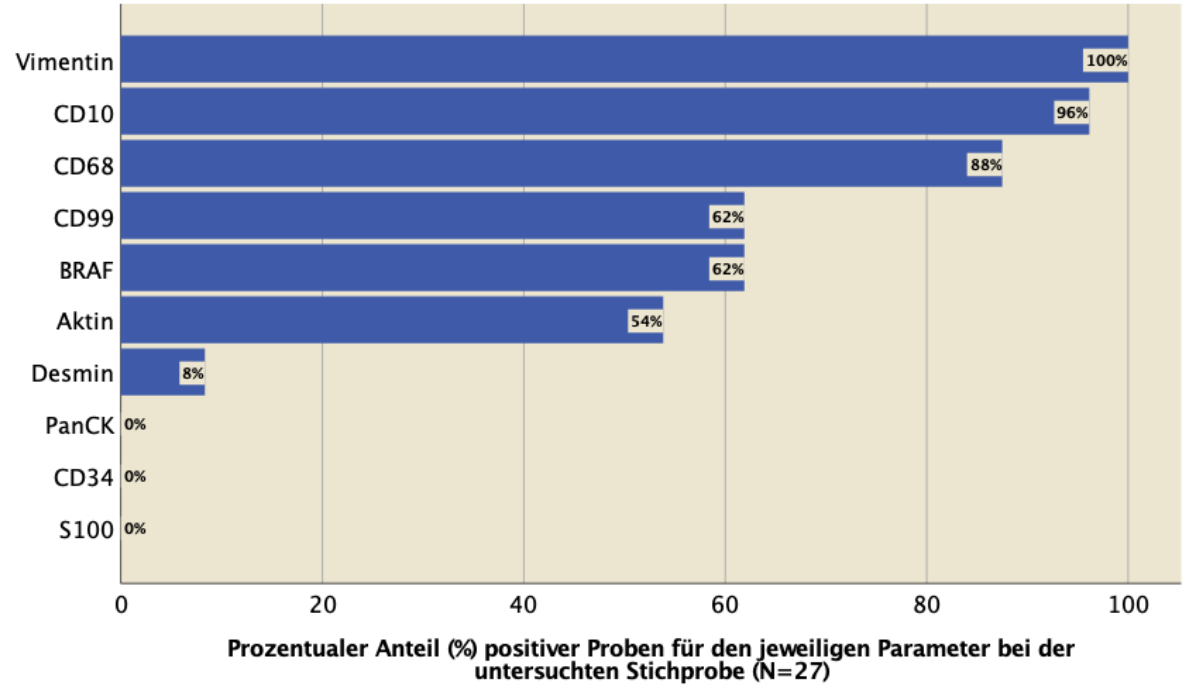


Abbildung 8. Darstellung des Anteils positiv gefärbter Proben für die untersuchten immunhistochemischen Marker (Vimentin, CD10, CD68, ERK, CD99, BRAF, Aktin, Desmin, PanCK, CD34, S100).

Die folgenden Untersuchungen der am MAPK- Signalweg beteiligten Proteine MEK, pMEK, ERK, pERK wurden nur mit den 21 Präparaten im vorliegenden TMA des Mannheimer Kollektivs durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 3** und **Abbildung 9** dargestellt. Es ergab sich eine zu jeweils 38,1% (8/21) vorliegende Positivität sowohl für MEK als auch für pERK. Dabei exprimierten 20% bis 100% der Zellen MEK und <1% bis max. 20% exprimierten pERK. 61,9% (13/21) der Präparate zeigten eine Positivität für BRAF mit <10% bis 90% BRAF-exprimierenden Zellen. 17/21 (81%) der Präparate waren positiv für ERK mit einem Anteil von 10% bis 100% ERK-exprimierender Zellen. pMEK-Expression war in 95,2% (20/21) der Proben nachweisbar mit einem Anteil von 50% bis 100% pMEK-exprimierender Zellen.

3.3.2. Ergebnisse der externen Patientenkohorte und Vergleich mit der Mannheimer Kohorte

Von dem erstellten TMA aus 29 Gewebeproben der externen Patientenkohorte wurden dieselben Färbungen wie für die Mannheimer Kohorte angefertigt. Aufgrund geringen Probenmaterials waren für drei Patientenproben keine Auswertungen möglich. Weiterhin gab es einzelne Färbungen, die bei gewissen Tumorproben des TMAs

ebenfalls nicht auswertbar waren. Somit ergeben sich unterschiedliche Gesamtprobenzahlen der verschiedenen Färbungen. Eine Darstellung der für die jeweilige Färbung verfügbaren Proben und der Ergebnisse für das externe Patientenkollektiv findet sich in **Tabelle 4**.

Tabelle 4. Darstellung mikroskopisch-histologischen und immunhistochemischen Präsentation der als AFX klassifizierten Proben des externen Patientenkollektivs (N=29).

Externe Patientenkohorte (N=29) **Histologisch-immunhistochemische Präsentation**	
PanCK [% positiver Präparate, n=24]	0%
PanCK [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	0 (0)
MART1 [% positiver Präparate, n=25]	0%
MART1 [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	0 (0)
S100 [% positiver Präparate, n=24]	62,5%
S100 [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	9,21 (12,9)
CD34 [% positiver Präparate, n=22]	100%
CD34 [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	50,91 (14,8)
Aktin [% positiver Präparate, n=23]	52,2%
Aktin [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	20,00 (32,6)
Desmin [% positiver Präparate, n=25]	12,0%
Desmin [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	10,00 (8,7)
Vimentin [% positiver Präparate, n=20]	75,0%
Vimentin [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	29,00 (24,5)
CD68 [% positiver Präparate, n=23]	79,3%
CD68 [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	24,29 (32,1)
Ki67 [% positiver Präparate, n=22]	100%
Ki67 [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	11,19 (6,1)
CD99 [% positiver Präparate, n=23]	73,9%
CD99 [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	24,29 (32,1)
CD10 [% positiver Präparate, n=23]	91,3%
CD10 [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	48,33 (34,0)
BRAF [% positiver Präparate, n=24]	8,3%
BRAF [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	1,58 (6,9)
MEK [% positiver Präparate, n=23]	26,1%
MEK [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	4,52 (9,7)
pMEK [% positiver Präparate, n=25]	0%
pMEK [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	0,00 (0,0)
ERK [% positiver Präparate, n=24]	91,7%

ERK [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	53,10 (31,4)
pERK [% positiver Präparate, n=22]	48,0%
pERK [Positivität der Präparate in %; M (SD)]	6,94 (11,1)

Legende: M = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Im Vergleich zu dem Mannheimer Kollektiv (siehe **Abbildung 9** und **Tabelle 5**), zeigte sich ein ähnliches Färbeverhalten für einige der untersuchten Marker. Auch hier zeigte sich eine Negativität für PanCK und MART1 sowie eine geringe Expression von Desmin und darüber hinaus eine intermediäre Expression von CD68, CD10, CD99, Ki67, Aktin und Vimentin. Im Vergleich zur Mannheimer Kohorte zeigte sich dabei eine höhere Expression von Desmin ($t=-6,205$, $p<0,001$) sowie eine signifikant geringere Expression von Vimentin ($t=8,780$, $p<0,001$), CD68 ($t=3,168$, $p=0,003$), CD99 ($t=3,808$, $p<0,001$) und Ki67 ($t=4,696$, $p<0,001$). Im Unterschied zu den Ergebnissen der Mannheimer Kohorte zeigte sich im Gruppenvergleich auch eine signifikant höhere Positivität für S100 ($t=-2,847$, $p=0,007$). Hierbei zeigte sich allerdings eine niedrige mittlere Positivität der Proben von circa 9%. Weiterhin zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die Expression von CD34 mit einer Positivität des Markers in 100% der untersuchten externen Proben mit einer mittleren Positivität von circa 51% ($t=-12,827$, $p<0,001$). Dies Stand im deutlichen Kontrast zu den Werten der Mannheimer Kohorte (siehe **Abbildung 9**).

Im Hinblick auf die untersuchten Parameter des MAP-Kinase Signalwegs zeigte sich in den Proben der externen Patientenkohorte ähnliche Expressionsmuster für ERK und pERK (siehe **Abbildung 9** und **Tabelle 5**), aber im Unterschied zur Mannheimer Kohorte signifikant geringere Expressionen für pMEK ($t=19,360$, $p<0,001$), MEK ($t=8,571$, $p<0,001$) und BRAF ($t=7,058$, $p<0,001$), was auf eine deutliche Variabilität der Expressionsmuster hindeutet.

Tabelle 5. Vergleich der Anteile positiv gefärbter Bereiche der AFX-Präparate zwischen der Mannheimer und der externen Kohorte

Parameter		Mannheimer Kohorte (N27)	Externe Kohorte (N=29)	T-Statistik	p-Wert (zweiseitig)	Korrigierter p-Wert (FDR-Korrektur)
PanCK						
	n	25	24			
	M	0,00	0,00	-	-	
	SD	0,00	0,00			
MART1						
	n	22	24			
	M	0,00	0,00	-	-	
	SD	0,00	0,00			
S100						
	n	16	24			
	M	0,00	9,21	-2,847	0,007*	0,009*
	SD	0,00	12,88			
CD34						
	n	14	22			
	M	0,00	50,91	-12,827	<0,001*	0,002*
	SD	0,00	14,77			
Aktin						
	n	12	20			
	M	16,67	20,00	-0,319	0,752	0,752
	SD	19,99	32,57			
Desmin						
	n	21	3			
	M	0,00	10,00	-6,205	<0,001*	0,002*
	SD	0,00	8,66			
Vimentin						
	n	21	20			
	M	81,90	29,00	8,780	<0,001*	0,002*
	SD	12,50	24,47			
CD99						
	n	13	21			
	M	68,46	24,29	3,808	0,001*	0,002*
	SD	34,12	32,10			

CD10						
	n	20	18			
	M	57,75	48,33	0,937	0,355	0,451
	SD	27,93	33,95			
CD68						
	n	17	23			
	M	42,94	23,26	3,168	0,003*	0,005*
	SD	16,96	21,03			
Ki67						
	n	23	21			
	M	27,83	11,19	4,696	<0,001*	0,002*
	SD	15,14	6,10			
BRAF						
	n	13	19			
	M	50,77	1,58	7,058	<0,001*	0,002*
	SD	29,43	6,88			
MEK						
	n	8	21			
	M	67,50	4,52	8,571	<0,001*	0,002*
	SD	30,59	9,73			
pMEK						
	n	20	25			
	M	78,50	0,00	19,360	<0,001*	0,002*
	SD	20,33	0,00			
ERK						
	n	17,00	21,00			
	M	47,88	53,10	-0,527	0,601	0,675
	SD	28,85	31,40			
pERK						
	n	8	18			
	M	4,79	6,94	-0,492	0,627	0,675
	SD	7,97	11,13			

Legende: M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n = Angabe der Patientenproben mit verfügbaren Werten je Parameter, *= signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen $p<0,05$. Die Signifikanzen blieben auch nach Korrektur für multiples Testen unter Verwendung der „False Discovery Rate“ (FDR) Korrektur nach Benjamini und Hochberg bestehen. Alle Ergebnisse wurden mit Hilfe nicht-parametrischer Mann-Whitney-U-Tests validiert, die die Ergebnisse der parametrischen t-Test für ungepaarte Stichproben bestätigen.

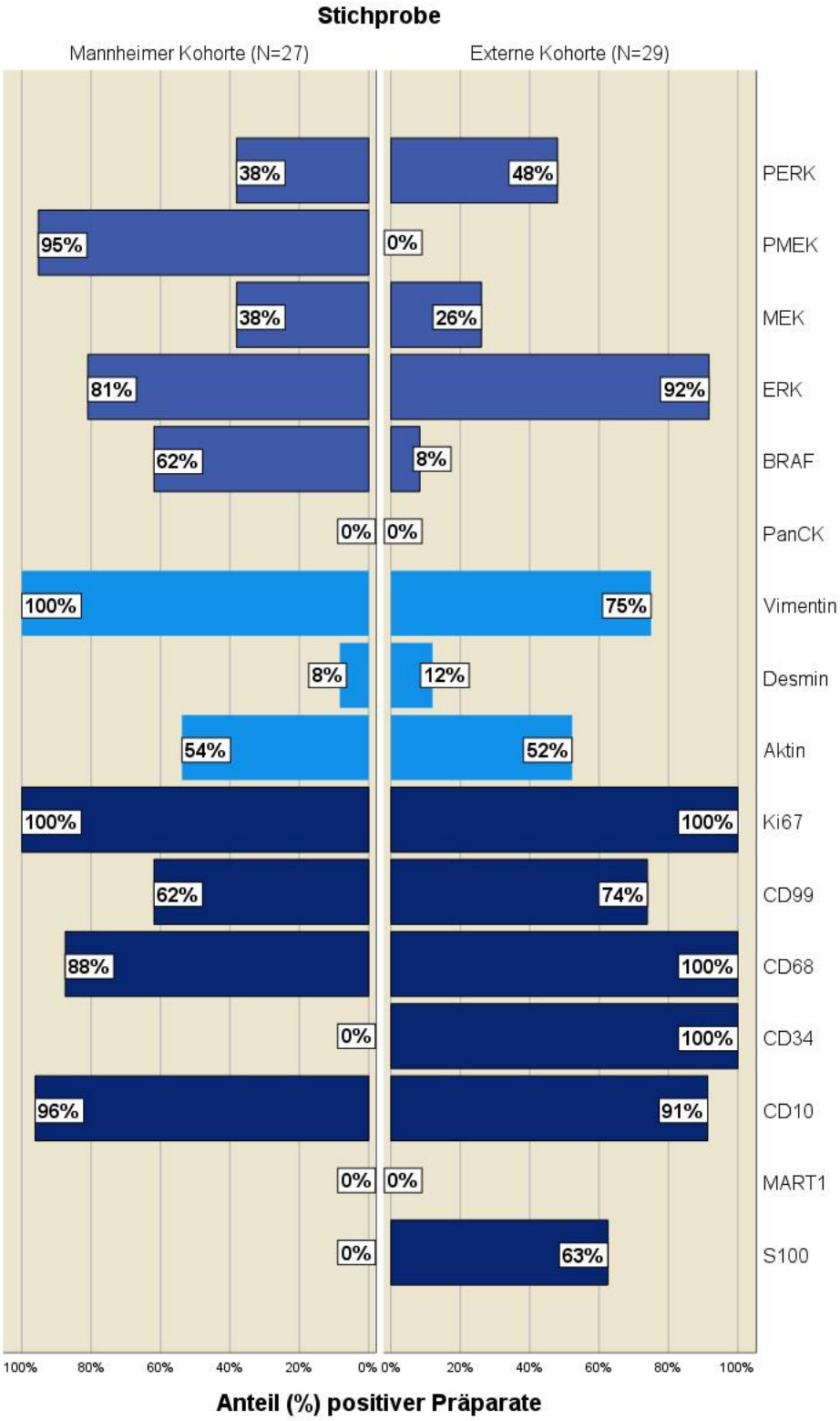


Abbildung 9. Darstellung des Anteils positiv gefärbter Proben für die untersuchten immunhistochemischen Marker in den beiden untersuchten Kohorten.

3.3.3. Ergebnisse des immunhistochemischen Scores

Um die starke MAP-Kinase-Signalweg-Aktivierung weiter zu untersuchen, erfolgte eine weitere Untersuchung der Expression der am MAP-Kinase-Signalweg beteiligten Proteine Ki67, MEK, pMEK, ERK, pERK, EGFR und NF1 unter Einbeziehung der Proben des externen Kollektivs. Die Ergebnisse dieser Analysen und des Vergleichs zwischen den beiden Patientenkollektiven ist in **Tabelle 6** und **Abbildung 10** dargestellt. Hierbei zeigte sich insbesondere eine starke Expression von pMEK, ERK und pERK sowie EGFR und eine im Vergleich zu diesen Markern niedrigere Expression von NF1 und MEK. Die Ergebnisse deckten sich im Wesentlichen mit den Ergebnissen der zuvor dargestellten Auswertungen zur Positivität der Proben für die Marker ERK, MEK, pMEK, pERK, BRAF und Ki67. Hier zeigten sich die mittleren Werte für die Ergebnisse der Immunpositivität im vergleichbaren Wertebereich. Die Ergebnisse für EGFR wiesen dabei auf eine relevante intermediäre Expression bei 60% der Proben der Mannheimer Kohorte und 53% der externen Kohorte hin. Im Hinblick auf NF1 zeigte sich eine niedrige bis sehr niedrige Expression in der Mannheimer (30%) und der externen Kohorte (4%) (siehe **Abbildung 11**). Hier zeigte sich für einzelne Parameter teilweise eine Variabilität der Ausprägung (siehe **Abbildung 11**).

Der Vergleich zwischen den beiden Patientenkohorten zeigte signifikant höhere IHC-Gesamtscores in der Mannheimer Kohorte für die Parameter pMEK ($Z=-2,32$, $p<0,020$), BRAF ($Z=-3,62$, $p<0,001$), Ki67 ($Z=-3,02$, $p=0,003$) und NF1 ($Z=-3,62$, $p<0,001$) (siehe **Tabelle 6**). Für die übrigen untersuchten Parameter zeigten sich ähnliche Werte für die untersuchten Proben beider Gruppen.

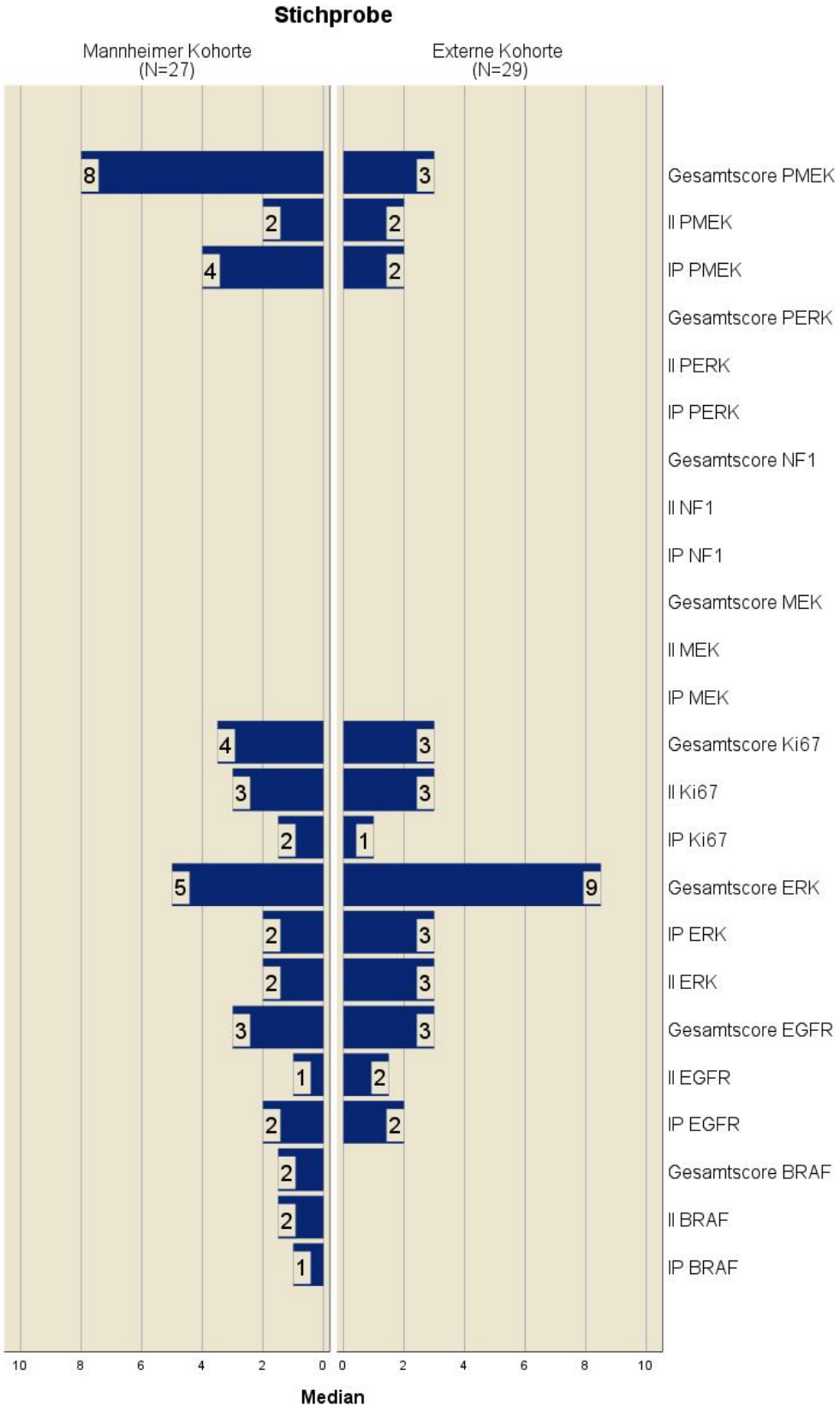


Abbildung 10. Darstellung der Ausprägungen (Mediane) der Immunpositivität und Immunintensität sowie des hieraus ermittelten IHC-Gesamtscores für beide untersuchten Kollektive für die Marker BRAF, EGFR, ERK, Ki67, MEK, pMEK, NF1 und pERK.

Tabelle 6 Vergleich der Ausprägungen der Immunpositivität und Immunintensität sowie des hieraus ermittelten IHC-Gesamtscores für die Marker BRAF, EGFR, ERK, Ki67, MEK, pMEK, NF1, pERK zwischen der Mannheimer Kohorte (N=27) und der externen Kohorte (N=29)

	Mannheimer Kohorte (N=27)	**Externe Kohorte (N=29)**	**Mann-Whitney U-Statistik**	**Z-Statistik**	**p-Wert** (zweiseitig)	**Korrigierter p-Wert** (FDR-Korrektur)
Immunpositivität BRAF						
n	20	23				
M	1,55	0,26	114	-3,38	0,001*	0,006*
SD	1,64	0,92				
Immunintensität BRAF						
n	20	23				
M	1,30	0,13	106	-3,64	<0,001*	0,006*
SD	1,22	0,46				
IHC-Gesamtscore BRAF						
n	20	24				
M	3,70	0,33	113	-3,62	0,001*	0,006*
SD	4,45	1,13				
Immunpositivität EGFR						
n	20	26				
M	1,95	2,00	266	0,14	0,885	0,956
SD	1,82	1,96				
Immunintensität EGFR						
n	20	26				
M	1,30	1,31	258	-0,47	0,963	0,963
SD	1,26	1,32				
IHC-Gesamtscore EGFR						
n	20	26				
M	4,50	5,00	264	0,10	0,916	0,956
SD	4,88	5,28				

Immunintensität ERK							
	n	20	24				
	M	1,90	2,75	335	2,30	0,021*	0,046*
	SD	1,17	1,36				
Immunpositivität ERK							
	n	20	24				
	M	2,10	2,50	277	0,19	0,358	0,452
	SD	1,48	0,89				
IHC-Gesamtscore ERK							
	n	20	24				
	M	5,35	7,75	314	1,79	0,073	0,146
	SD	4,49	4,14				
Immunpositivität Ki67							
	n	20	23				
	M	1,50	1,00	115	-3,826	<0,001*	0,006*
	SD	0,51	0,00				
Immunintensität Ki67							
	n	20	22				
	M	2,85	2,95	232	0,70	0,481	0,550
	SD	0,49	0,21				
IHC-Gesamtscore Ki67							
	n	20	24				
	M	4,30	3,08	137	-3,02	0,003*	0,014*
	SD	1,66	0,65				
Immunpositivität MEK							
	n	19	24				
	M	1,32	0,46	176	-1,53	0,126	0,189
	SD	1,77	0,98				
Immunintensität MEK							
	n	19	23				
	M	0,95	0,39	170	-1,47	0,142	0,200
	SD	1,22	0,72				

IHC-Gesamtscore MEK							
	n	19	24				
	M	3,05	0,67	173	-1,62	0,105	0,168
	SD	4,54	1,373				
Immunpositivität NF1							
	n	20	25				
	M	0,75	0,08	184	-2,39	0,017*	0,045*
	SD	1,29	0,40				
Immunintensität NF1							
	n	20	25				
	M	0,50	0,04	183	-2,43	0,015*	0,045*
	SD	0,83	0,20				
IHC-Gesamtscore NF1							
	n	20	25				
	M	1,20	0,08	183	-2,43	0,015*	0,045*
	SD	2,09	0,40				
Immunpositivität pERK							
	n	20	25				
	M	0,25	0,56	312	1,68	0,093	0,159
	SD	0,44	0,65				
Immunintensität pERK							
	N	20	25				
	M	0,70	0,84	278	0,74	0,458	0,550
	SD	1,17	0,94				
IHC-Gesamtscore pERK							
	N	20	25				
	M	0,55	1,00	303	1,39	0,162	0,216
	SD	1,05	1,26				
Immunpositivität pMEK							
	N	19	17				
	M	3,11	1,76	83	-2,57	0,012*	0,045*
	SD	1,20	1,60				

Immunintensität							
pMEK							
	N	18	17				
	M	2,00	1,35	105	-1,74	0,082	0,151
	SD	0,77	1,11				
IHC-Gesamtscore							
pMEK							
	n	19	17				
	M	6,74	3,82	89	-2,32	0,020*	0,046*
	SD	3,60	4,04				

Legende: M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, IHC-Gesamtscore = Immunhistochemischer Gesamtscore (adaptiert nach Knappe et al., 2016), n = Anzahl der Proben mit verfügbaren Werten je Parameter, *= signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen $p<0,05$. Die Signifikanzen blieben auch nach Korrektur für multiples Testen unter Verwendung der „False Discovery Rate“ (FDR-)Korrektur nach Benjamini und Hochberg bestehen.

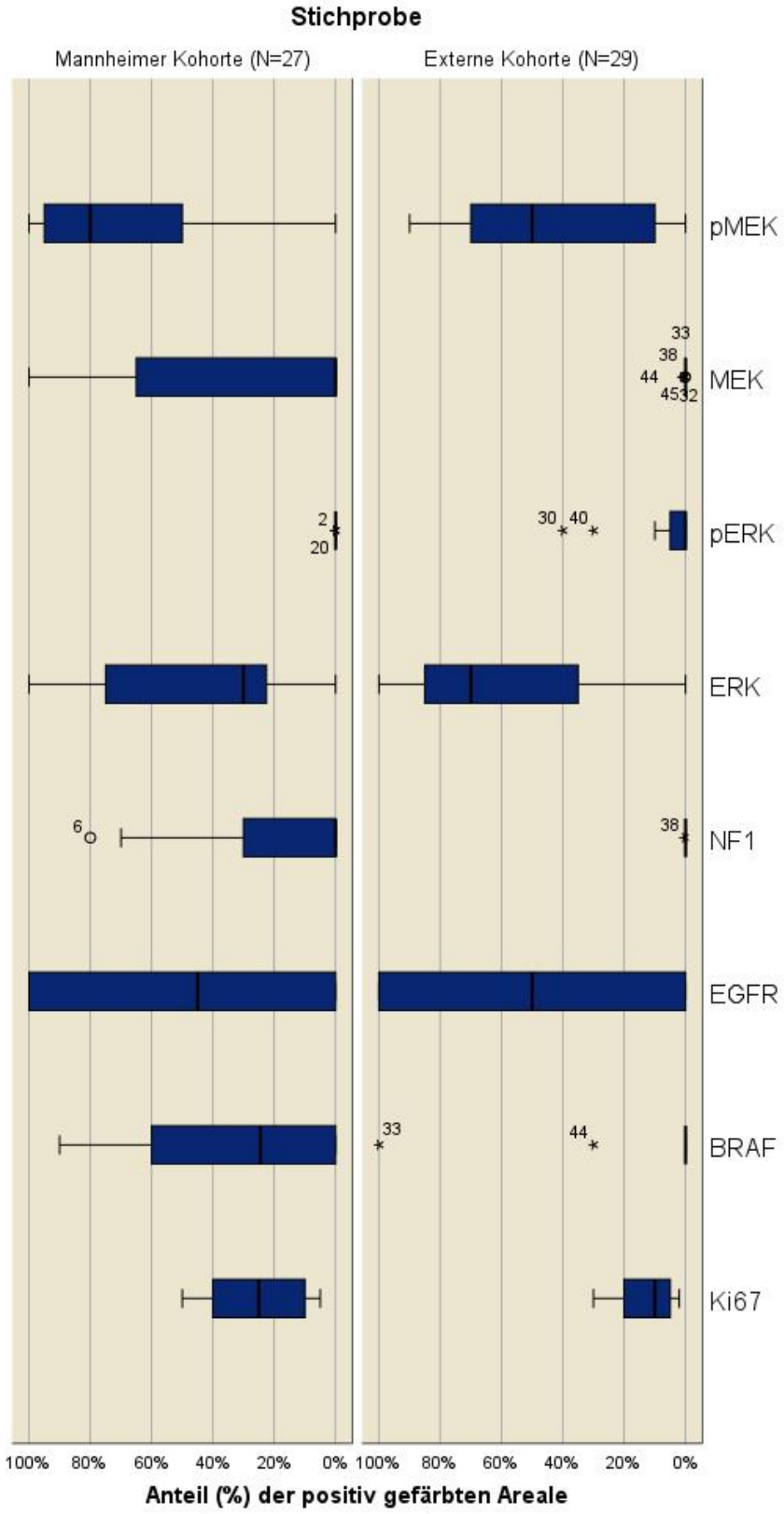


Abbildung 11. Mittelwerte und Variabilität der Anteile positiv gefärbter Probenareale für die immunhistochemischen Marker in den beiden Patientenkohorten (° = Kennzeichnung von Fällen mit Extremwerten > 1,5 x Interquartilsabstand < 3 x Interquartilsabstand; * = Kennzeichnung von Fällen mit Extremwerten > 3,0 x Interquartilsabstand).

3.3.4. Ergebnisse der Mutationsanalysen

7 von 21 Proben der Mannheimer Kohorte wiesen eine erhöhte Expression von pMEK und ERK auf und wurden daher einer Sequenzierung des BRAF- und NRAS-Gens unterzogen. Diese Analyse konnte keine Mutationen des BRAF- oder NRAS-Gens detektieren.

4. DISKUSSION

Das AFX ist ein seltener Hauttumor, dessen Abgrenzung zu anderen Tumoren der Haut seit der Erstbeschreibung in den 1960er Jahren eine Herausforderung darstellt. Klinisch präsentiert sich das AFX dabei typischerweise als ein bis zu mehreren Zentimetern durchmessender, schmerzloser, zum Teil ulzerierter Knoten, welcher vor allem in chronisch lichtexponierten Bereichen (Kopf und Hals) auftritt. Das AFX imponiert dabei oft als schnell wachsender, jedoch gut umschriebener Tumor. Es zeigt sich histologisch häufig ein Bild spindelförmiger und epitheloider Zellen, mit atypischen mehrkernigen Riesenzellen sowie atypischen Mitosen. Studien wiesen allerdings darauf hin, dass dieses histomorphologische Bild keine präzise Differenzierung des AFX von anderen Hauttumoren ermöglicht. So zeigten Studien, dass insbesondere Retikulohistiozytome, Myofibrosarkome, Leiomyosarkome, aber auch pseudosarkomatöse Dermatofibrome regelmäßig als AFX fehldiagnostiziert wurden.[11] Insbesondere das pleomorphe dermale Sarkom (PDS) zeigt histopathologische Ähnlichkeiten mit dem AFX, mit atypischen Riesenzellen und atypischen Mitosen, was eine Abgrenzung teilweise erschweren kann. Im Unterschied zum AFX zeigt sich das PDS eher unscharf begrenzt und eher infiltrativ wachsend mit teilweise schnelleren klinischen Verläufen als beim AFX. Histomorphologisch sind die atypischen mehrkernigen Riesenzellen und atypischen Mitosen beim AFX in der Regel auf die Dermis beschränkt, wohingegen sie beim PDS auch im subkutanen Fettgewebe oder anderen tiefer liegenden Strukturen zu finden sind. Aufgrund der eingeschränkten Spezifität der Histologie wiesen Studien auf die Notwendigkeit zusätzlicher immunhistochemischer Untersuchungen zur Diagnosestellung und Abgrenzung von anderen Tumoren, wie dem SCC, dem Melanom, von Gefäßtumoren, anderen Sarkomen, dem Retikulohistiozytom und dem atypischen fibrösen Histiozytom, hin.[34]

In der vorliegenden Arbeit wurden anhand der Tumorpräparate zweier unabhängiger Kollektive mit N=27 und N=29 Fällen die Expressionsprofile immunhistochemischer Marker bei den Tumoren, die als AFX klassifiziert worden waren, untersucht. Darüber hinaus wurden die klinischen Charakteristika der betroffenen Patientinnen und Patienten erfasst und deskriptiv analysiert.

4.1. KLINISCHE PRÄSENTATION DES AFX IN DER UNTERSUCHTEN STICHPROBE

In Übereinstimmung mit unserer ersten Hypothese (siehe **Abschnitt 1.3**) sowie früheren Fallserien und Fallberichten[28,77] wiesen die verfügbaren Fragebogendaten des Mannheimer Kollektivs darauf hin, dass die als AFX klassifizierten Tumore vor allem im Bereich des Kopfes und anderen lichtexponierten Arealen lokalisiert waren. Darüber hinaus zeigte sich passend zu Vorbefunden eine klinische Präsentation mit Blutungen oder Juckreiz in knapp der Hälfte der untersuchten Fälle. Die Patientinnen und Patienten wiesen dabei ein mittleres Alter von circa 79 Jahren auf, was zu den Ergebnissen früherer Fallserien passt.[28,77] In der untersuchten Stichprobe zeigte sich eine Dominanz der lichtempfindlichen Hauttypen sowie Hinweise auf eine spezifische UV-Exposition im Rahmen einer zurückliegenden Phototherapie bei circa einem Viertel der Patientinnen und Patienten. In Übereinstimmung mit früheren Arbeiten[34,35] konnte bei mehr als der Hälfte der Patientinnen und Patienten mindestens ein weiterer Hauttumor bzw. Präkanzerose festgestellt werden. Besonders häufig waren SCC, BCC, Aktinische Keratose und M. Bowen. Bei keinem der Patientinnen und Patienten mit verfügbaren Daten kam es zur Metastasierung oder einem Rezidiv, vereinbar mit den vorbeschriebenen klinischen Verläufen des AFX.

4.2. IMMUNHISTOCHEMISCHE EXPRESSIONSPROFILE DER AFX-PROBEN

Die Analysen der Expressionsprofile der immunhistochemischen Marker bei den als AFX klassifizierten Tumorproben aus der Mannheimer Patientenkohorte, ergaben eine Negativität für die Marker PanCK, MART1 und S100 sowie eine geringe Expression von CD34 und Desmin. Im Unterschied dazu exprimierte ein hoher Anteil an Zellen CD10, Ki67, Aktin, Vimentin und CD99. Expression von CD68 konnte in mehr als der Hälfte der untersuchten Tumorpräparate nachgewiesen werden mit einer mittleren Positivität von 43%.

In allen untersuchten Proben lag eine positive Expression von Ki67 mit intermediärer Immunpositivität vor, was für eine hohe Proliferationsaktivität der untersuchten Tumore spricht. PanCK ist ein Marker für Keratine, die eine Gruppe von Faserproteinen sind, die in den Epithelzellen der Haut vorkommen. Dieser Marker wird in der immunhistochemischen Diagnostik häufig verwendet, um epitheliale Tumoren wie

Basalzellkarzinom (BCC) und Plattenepithelkarzinom (SCC) von anderen nicht-epithelialen Hauttumoren zu unterscheiden. Die Negativität für PanCK deutet darauf hin, dass das untersuchte Gewebe keine epitheliale Differenzierung aufweist. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen anderer Studien überein und spricht gegen eine zuvor über Jahrzehnte diskutierte epitheliale Differenzierung des AFX. Die Negativität der Proben auf MART1 und S100, als spezifische Marker für Melanozyten beziehungsweise Nervenzellen, unterstreicht die Abgrenzung der untersuchten AFX-Tumorpräparate von Melanomen. Die geringe Expression von CD34 ist vereinbar mit den Ergebnissen anderer Studien.[28,78] Die geringe Expression von CD34, als ein Marker für endotheliale Vorläuferzellen, die an der Bildung von Blutgefäßen beteiligt sind, spricht für eine Abgrenzung der untersuchten Tumorproben gegenüber Angiosarkomen und anderen Gefäßtumoren. Die geringe Expression von Desmin in den untersuchten Präparaten, als ein Marker für Muskelgewebe, spricht für eine Abgrenzung von Leiomyomen und Leiomyosarkomen der Haut. Der Nachweis einer fehlenden Expression von Desmin kann vor allem in Fällen einer Positivität für Aktin zum Ausschluss eines Leiomyosarkoms beitragen. Die hohe Expression von CD10, auch bekannt als Neprilysin, kann als nicht-spezifischer Marker interpretiert werden, der sich in früheren Arbeiten bei AFX konsistent erhöht zeigte, aber auch eine Positivität bei SCC und BCC aufweist.[44] Zusammen mit der negativen Expression von PanCK ist das Expressionsmuster aber vereinbar mit der Diagnose eines AFX, wie sie in früheren Studien beschrieben wurde und spricht für das Vorliegen eines nicht-epithelialen Tumors. Das Expressionsmuster von CD99, einem membranassoziierten Glykoprotein, ist vereinbar mit Vorbefunden und unterstützt die Abgrenzung zu MFH.[40] Im Unterschied zu MFH exprimierte die Mehrheit der untersuchten Proben (62%) CD99 mit intermediärer Positivität von im Mittel 68%. Die Expressionsmuster für Aktin und Vimentin, als Proteine mesenchymalen Gewebes, sind vereinbar mit den Befunden früherer Arbeiten.[79] Die Autoren dieser Arbeiten wiesen darauf hin, dass eine starke Positivität auf Aktin, kombiniert mit einer spindelzelligen Histomorphologie, zu einer falschen Diagnose eines kutanen Leiomyosarkoms führen kann. Die vorliegenden Präparate zeigten sich zwar in etwas mehr als der Hälfte der Fälle Spindelzell-dominant (d.h. >50%), in Abgrenzung zum MFH jedoch mit einem intermediären Aktin- und Vimentin-Expressionsprofil. In den Tumorpräparaten der Mannheimer Kohorte wurde ein intermediär-positives Expressionsmuster des Makrophagenmarkers CD68 beobachtet. Dieses Muster bestätigt frühere

Fallserien[28,78], in denen eine Expression von CD68 in als AFX klassifizierten Proben beobachtet wurde. Zusammengefasst zeigen sich die Expressionsmuster, wie sie in den Tumorproben der aktuellen Kohorte beobachtet wurden, in Übereinstimmung mit vorherigen Studien.[28,78] Zudem stimmen die Befunde überein mit dem gemäß der aktuellen S1-Leitlinie[12] typischen immunhistochemischen Muster eines AFX. Die Diagnose AFX stellt in der Regel eine Ausschlussdiagnose dar und beruht meist auf dem Fehlen von Melanozyten- (S100, MART1) und Epithelmarkern (PanCK) sowie Desmin, wobei die positive Färbung für unspezifische Marker wie Aktin, CD68, und CD10 häufig beobachtet wird. Die Ergebnisse der Mannheimer Kohorte waren dementsprechend vereinbar mit unserer zweiten Hypothese (siehe **Abschnitt 1.3**).

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen der zweiten, externen, Kohorte mit N=29 Patienten lieferten ähnliche Ergebnisse, wie die Analysen der Proben der Mannheimer Kohorte für einige der untersuchten Marker. Auch hier zeigte sich eine Negativität für PanCK und MART1 sowie eine geringe Expression von Desmin und darüber hinaus eine intermediäre Expression von CD68, CD10, CD99, Ki67, Aktin und Vimentin. Im Vergleich zur Mannheimer Kohorte wurde dabei eine höhere Expression von Desmin sowie eine geringere Expression von Vimentin, CD68, CD99 und Ki67 beobachtet. Im Unterschied zu den Ergebnissen der Mannheimer Kohorte war allerdings ein signifikant höherer Anteil der Proben (62%) positiv für S100. Allerdings wiesen die S100-exprimierenden Proben der externen Kohorte eine geringe mittlere Immunpositivität von circa 9% auf, sodass der höhere Anteil S100-exprimierender Proben vor allem durch Proben mit einer geringen Ausprägung der Positivität bedingt wird. Weiterhin konnte in allen untersuchten externen Proben die Expression von CD34 mit einer mittleren Immunpositivität von circa 51% detektiert werden. Diese beiden Befunde stehen im Gegensatz zu bisherigen Arbeiten[28] und könnten auf eine Fehlklassifikation hinweisen. Gegen die Fehlklassifikation eines MM als AFX spricht allerdings die Negativität auf MART1, sodass auch denkbar ist, dass S100-positive Langerhans-Zellen zur Positivität beigetragen haben können. In Bezug auf die diffuse Positivität für CD34 sind oberflächliche CD34-positive fibroblastische Tumoren (Superficial CD34-positive fibroblastic tumor, SCPFT) und das Dermatofibrosarkoma protuberans (DFSP) als Differentialdiagnosen zu diskutieren.[80,81]

Insgesamt zeigte sich ein differenziertes Expressionsmuster verschiedener immunhistochemischer Marker, das mit vorherigen Arbeiten übereinstimmt. Zur diagnostischen Abklärung des Verdachts auf ein AFX empfiehlt sich daher die gleichzeitige Bestimmung multipler Marker. Diese Überlegung zeigt sich in Übereinstimmung mit den aktuellen Empfehlungen der S1-Leitlinie, die zum Ausschluss anderer Differentialdiagnosen ein immunhistochemisches Panel von mindestens 2 melanozytären Markern (z.B. S100, MART1), 2 Zytokeratinmarkern (z.B. PanCK), und 1 Muskelmarker (z.B. Desmin) sowie ergänzenden Untersuchungen auf weitere Marker wie CD10, Gefäßmarker (z.B. CD34) und weitere myozytäre Marker (z.B. α-SMA) empfiehlt.[12]

4.3. Befunde zum MAP-Kinase-Signalweg

Veränderungen des MAP-Kinase Signalwegs finden sich häufig bei Hauttumoren, insbesondere beim MM. Beim MM sind Mutationen im BRAF-Gen und NRAS-Gen besonders häufig. Diese Mutationen führen zu einer konstitutiven Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs, die das unkontrollierte Wachstum und die Ausbreitung des MMs begünstigt. BRAF-Inhibitoren, die spezifisch gegen mutiertes BRAF gerichtet sind, zeigen deutliche Effekte in der Therapie des MM.[82] Medikamente wie Vemurafenib und Dabrafenib hemmen das Wachstum von Melanomzellen effektiv und verbessern die Überlebensraten von Patientinnen und Patienten mit fortgeschrittenem MM. Ein weiterer vielversprechender Ansatz, der auf die MAP-Kinase Signalkaskade abzielt, sind MEK-Inhibitoren, die mit BRAF-Inhibitoren kombiniert werden. MEK ist ein weiteres Schlüsselprotein im MAP-Kinase-Signalweg, das nach der Aktivierung von BRAF phosphoryliert wird und somit weitere Downstream-Prozesse in der Kaskade anstößt. Patientinnen und Patienten, die mit einer Kombination aus BRAF- und MEK-Inhibitoren behandelt werden, entwickeln seltener Resistenzen als Patientinnen und Patienten, die mit einer Monotherapie mit einem BRAF- oder MEK-Inhibitor allein behandelt werden. Neben dem MM ist eine Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs auch in einigen nicht-melanozytären Hautkrebsarten wie dem BCC und dem SCC beschrieben worden. In einigen Fällen haben sich auch hier BRAF-Inhibitoren als wirksam erwiesen, insbesondere bei seltenen Fällen von BRAF-mutierten BCC. Aufgrund der Relevanz der Signalkaskade für die Zellproliferation, Apoptose und damit für das Tumorwachstum, stellen therapeutische Ansätze, die in diese Signalkaskade

eingreifen, potentiell effektive und zielgerichtete Interventionen dar, insbesondere in Fällen, in denen eine primäre operative Therapie nicht möglich ist. Besonders große Tumoren oder Tumoren an anatomisch schwierig zu operierenden Lokalisationen erfordern adjuvante Therapien oder Therapiealternativen. Die Strahlentherapie stellt eine solche adjuvante Therapie bei nicht zu erreichender R0-Resektion oder auch bei inoperablen Tumoren dar. Therapiealternativen gibt es bisher keine. Chemotherapien haben sich in der Vergangenheit als ineffizient herausgestellt.

In der aktuellen Arbeit wurden deshalb die Expressionsmuster unterschiedlicher Komponenten des MAP-Kinase Signalweges untersucht und darüber hinaus bei den Tumoren mit der stärksten Expression von Proteinen des MAP-Kinase Signalwegs (n=7) nach Mutationen in den BRAF- und NRAS-Genen gesucht. Im Hinblick auf die Expression von unterschiedlichen Komponenten des MAP-Kinase Signalweges war in Übereinstimmung mit unserer dritten Hypothese (siehe **Abschnitt 1.3**) in den Präparaten der Mannheimer Kohorte eine Expression von pMEK in fast allen untersuchten Proben (95%) sowie eine positive Expression von ERK in mehr als 80% der Proben nachweisbar. BRAF Expression konnte in ⅔ und MEK und pERK Expression in ⅓ der untersuchten Präparate detektiert werden. Die Mutationsanalyse der 7 Tumoren mit der stärksten Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweg konnte keine Mutationen in den BRAF- und NRAS-Genen ausfindig machen. Dies weist darauf hin, dass die erhöhte Aktivität des MAP-Kinase-Signalwegs durch andere Veränderungen hervorgerufen wird. Hieraus ergibt sich, dass, basierend auf den aktuellen Daten, eine Therapie mit einem BRAF-Inhibitor bei Patienten mit AFX keine hohe Aussicht auf Erfolg hat. Der Nachweis einer verstärkten Expression von EGFR deutet darauf hin, dass eine veränderte EGFR-Aktivierung möglicherweise zu der beobachteten verstärkten Expression von MEK und pMEK beiträgt. Diese These könnte in zukünftigen Arbeiten mit Hilfe einer Mutationsanalyse des EGFR-Gens geprüft werden. Hieraus könnten sich Ansatzpunkte für die Behandlung mit Hilfe von EGFR-Inhibitoren ergeben beziehungsweise eine Grundlage für die Prüfung ihrer Effektivität bei Patientinnen und Patienten mit AFX darstellen. Eine alternative Erklärung für die beobachtete hohe Expression von Proteinen der MAP-Kinase-Signalkaskade stellt eine Enthemmung der Kaskade durch eine erniedrigte Aktivität von NF1 dar, wie sie in der aktuellen Arbeit in den Tumorproben beider Kohorten gefunden wurden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen zudem auf eine niedrige Expression von

NF1 in den untersuchten Tumorproben beider Kohorten hin, mit signifikant niedrigeren Werten in den Proben des externen Patientenkollektivs. NF1 spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Entwicklung von Hauttumoren, insbesondere bei der Neurofibromatose, einer genetischen Erkrankung, die durch die Bildung von Neurofibromen gekennzeichnet ist. NF1 ist ein Protein, das durch das NF1-Gen codiert wird und als Tumorsuppressor fungiert. Mutationen im NF1-Gen führen zu einem Verlust oder einer verminderten Funktion von NF1. Dies hat zur Folge, dass die MAP-Kinase-Signalkaskade dauerhaft aktiviert ist, was wiederum die unkontrollierte Zellproliferation und das Wachstum begünstigt. Die Bedeutung von NF1 für die Therapie von Hauttumoren, insbesondere bei Neurofibromatose, liegt in der Erforschung neuer Behandlungsansätze, die auf die Wiederherstellung oder Stabilisierung der Funktion von NF1 abzielen. Die Entwicklung von Therapien für Hauttumoren, die auf NF1 abzielen, steht jedoch noch in den Anfängen, und weitere klinische Studien und Forschung sind erforderlich, um die Wirksamkeit und Sicherheit solcher Behandlungsansätze zu bewerten.

Im Vergleich zu den Proben der Mannheimer Kohorte wurden in den Proben der externen Patientenkohorte ähnliche Expressionsmuster für ERK und pERK, aber im Unterschied signifikant geringere Expressionen für pMEK, MEK und BRAF detektiert, was auf eine deutliche Variabilität der Expressionsmuster hindeutet. Dies kann so interpretiert werden, dass für Therapien, die auf die MAP-Kinase-Signalkaskade abzielen, nicht prinzipiell von einer Effektivität ausgegangen werden kann, sondern vielmehr einzelne Patientinnen und Patienten mit hohen Expressionsprofilen von einer solchen Behandlung profitieren könnten. Perspektivisch müssten Patientinnen und Patienten entsprechend stratifiziert werden. Hierdurch könnten möglicherweise diejenigen Patientinnen und Patienten profitieren, für die eine primär operative Therapie nicht möglich ist und die gleichzeitig eine hohe Aktivität des MAP-Kinase-Signalwegs zeigen. Allerdings muss die Effektivität solcher Therapieansätze erst in prospektiven randomisierten Studien geprüft werden.

4.4. Auswertung der Immunhistochemischen Scores

Basierend auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde für einige der relevanten immunhistochemischen Marker (Ki67, BRAF, MEK, pMEK, ERK, pERK, NF1 und EFGR) ein Gesamtscore ermittelt, der durch Multiplikation der Intensität und Quantität

des Expressionsmusters des jeweiligen Markers für eine jede Tumorprobe bestimmt wurde und mit Hilfe eines zuvor festgelegten Schemas erfasst wurde.[74] Der IHC Gesamt-Score erlaubt dabei eine Gewichtung der Ausprägung und Intensität des gemessenen Musters. Dabei entsteht durch Multiplikation der Intensität in 4 Stufen (0 bis 3) mit der Ausprägung der Positivität des Signals in 5 Stufen (0 bis 4) ein Parameter mit höherer Varianz als die konstituierenden Werte. Dies erlaubt im Vergleich zur Betrachtung der Einzelparameter eine bessere Darstellung einer möglichen Variabilität der Intensität und Positivität über verschiedene Proben hinweg. In der vorliegenden Stichprobe war entsprechend eine deutliche Varianz der Werte mit hohen Standardabweichungen nachweisbar, was für eine deutliche Heterogenität der Ausprägung über Tumorproben hinweg spricht und damit für eine individuelle Variabilität der Manifestation des AFX.

Die Werte dieses Scores deckten sich mit den Ergebnissen der zuvor dargestellten Auswertungen zur Positivität der Proben für die Marker ERK, MEK, pMEK, pERK, BRAF und Ki67. Hier lagen die mittleren Werte für die Ergebnisse der Immunpositivität im vergleichbaren Wertebereich, was für eine Vergleichbarkeit der mittels beider Ansätze ermittelten Werte spricht und die Bedeutung der Befunde, insbesondere die hohe Expression von pMEK, unterstreicht. Als zusätzliche Parameter wurden in diesen Analysen NF1 und EGFR betrachtet als 2 Schlüsselproteine für die Regulation der Zellproliferation und Tumorentstehung im Rahmen multipler Hauttumore. Die Ergebnisse für EGFR bestätigten dabei eine relevante intermediäre Expression bei 60% der Proben der Mannheimer Kohorte und 53% der externen Patientenkohorte. Im Hinblick auf NF1 zeigte sich eine niedrige bis sehr niedrige Expression in der Mannheimer (30%) und der externen Kohorte (4%). Eine mögliche Rolle von EGFR und NF1 im Zusammenhang mit der beobachteten Expression der Parameter des MAP-Kinase-Signalwegs, insbesondere von pMEK und ERK, wurde bereits diskutiert und wird durch diese Ergebnisse weiter unterstützt. Zusammenfassend unterstützen die Befunde der zusätzlichen Ermittlung und Analyse der IHC-Gesamt-Scores für die Parameter ERK, MEK, pMEK, pERK, BRAF und Ki67 die Ergebnisse der Analyse der Immunpositivität und die Ergebnisse zu NF1 und zu EGFR liefern wichtige zusätzliche Hinweise auf deren mögliche Beteiligung an der beobachteten Hochregulation des MAP-Kinase Signalwegs.

4.5. LIMITATIONEN DER VORGELEGTEN ARBEIT

Die Daten der aktuellen Arbeit beruhen auf zwei unabhängigen Patientenstichproben. Diese wurden allerdings nicht zufällig ausgewählt, sondern stellten sogenannte Gelegenheitsstichproben dar. Dieses Vorgehen wurde aufgrund der Seltenheit der untersuchten Tumorentität gewählt, um eine ausreichende Anzahl an Tumorproben und damit Aussagekraft und Generalisierbarkeit der Analysen zu ermöglichen. Eine Verzerrung der Ergebnisse durch Besonderheiten der Stichproben, aufgrund von nicht beobachteten Faktoren, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. Allerdings unterstützt die Übereinstimmung der vorliegenden Befunde der Mannheimer Stichprobe mit Vorbefunden multipler unabhängiger internationaler Studien die Repräsentativität der untersuchten Stichprobe.

Die histologische Untersuchung der Proben der Mannheimer Kohorte zeigt bei 6 der 27 Proben eine Infiltration des subkutanen Fettgewebes. Diesbezüglich muss eine Klassifikation dieser Tumorentitäten als PDS diskutiert werden, welche allerdings im Nachgang an die Datenerhebung und Datenauswertung der vorliegenden Arbeit als eigenständige Entität definiert wurde. Eine separate Sensitivitätsanalyse, die nur Tumorproben ohne infiltratives Wachstum berücksichtigte, bestätigte allerdings die Befunde in der Gesamtstichprobe, ohne signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (siehe **Anhang 7.2**)**.** Zudem muss berücksichtigt werden, dass die Diagnose AFX auf der damals im Jahr 2014 gängigen Praxis beruhte, was nicht zwingend den diagnostischen Empfehlungen der aktuellen Leitlinien zum AFX entspricht, welche im Verlauf der Erstellung der Arbeit vor Kurzem veröffentlicht wurden.[12]

In den Analysen zeigten sich für einige untersuchte immunhistochemische Parameter signifikante Unterschiede zwischen den beiden Patientenkohorten. Basierend auf den verfügbaren Daten kann keine abschließende Klärung dieser Unterschiede erfolgen. Allerdings zeigen sich die Ergebnisse der Mannheimer Patientenkohorte in Übereinstimmung mit bisherigen Studien und den in den aktuellen Leitlinien formulierten diagnostischen Kriterien für ein AFX. Weiterhin sprechen die verfügbaren klinischen Daten über einen Beobachtungszeitraum von bis zu 5 Jahren (Probenentnahme im Jahr 2009 und Nachbefragung im Jahr 2014) - insbesondere die fehlende Metastasierung - für die Korrektheit der Diagnose eines AFX. Für die externe

Patientenkohorte liegen solche Daten nicht vor, sodass hier keine zusätzliche Validierung der Korrektheit der Diagnose erfolgen kann. Allerdings zeigen sich auch in dieser Stichprobe die meisten Befunde passend zu Vorbefunden. Zu den unerwartet positiven Befunden für CD34 und S100 können zum einen S100-positive Langerhans-Zellen beigetragen haben, zum anderen müssen oberflächliche CD34-positive SCPFT und das DFSP als mögliche Differentialdiagnosen diskutiert werden.[80,81] Dabei muss - wie bereits erörtert - die gängige klinische Praxis zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im Jahr 2014 berücksichtigt werden. Insgesamt stellen die fehlenden klinischen und histologischen Daten (bspw. Tumordicke) für die externe Patientenkohorte eine Limitation der vorgelegten Arbeit dar. Allerdings ermöglichte die Untersuchung einer unabhängigen zweiten Stichprobe - auch ohne diese Daten - die Konsistenz der Befunde zu prüfen und Schlussfolgerungen über die Variabilität der Expressionsmuster zu ziehen.

Der TMA stellt ein Gewebe und Antikörper sparendes Verfahren zur immunhistochemischen Untersuchung von Tumoren dar. Dabei wird ein kleiner Teil des Tumors untersucht, dessen Auswahl mit dem Ziel erfolgt, einen möglichst repräsentativen Ausschnitt des Gesamttumors darzustellen. Die Generalisierbarkeit der mittels TMA gewonnen Ergebnisse hängt dabei entscheidend von der Auswahl des untersuchten Teilbereichs des Tumors und der Homogenität des Tumors ab. Auch hier unterstützt die Übereinstimmung der Befunde der Mannheimer Patientenkohorte mit bisherigen Studienbefunden die Repräsentativität der untersuchten Stichprobe.

Die Auswertung der TMAs erfolgte - entsprechend der gängigen Praxis - durch Sichtung und manuelle Quantifizierung der Expressionsmuster. Durch dieses Vorgehen kann eine Abhängigkeit der Ergebnisse vom Untersucher/Untersucherin bzw. den Untersuchern/Untersucherinnen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Allerdings zeigten Arbeiten, dass die Auswertung von TMA durch Nicht-Pathologen, nach vorheriger Einweisung durch Fachpersonal, zu validen und reproduzierbaren Ergebnissen führt, sodass das angewandte Prozedere prinzipiell geeignet erscheint, valide und replizierbare Ergebnisse zu ermitteln. In diesem Kontext könnten perspektivisch automatisierte Bildauswertungen mittels KI zu einer weiteren Standardisierung und Objektivierung beitragen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das AFX ist ein seltener Tumor der Haut, der sich häufig als schnell wachsender, haut- bis fleischfarbener, knotiger Tumor präsentiert, der insbesondere in sonnenexponierten Arealen auftritt und vornehmlich Männer im höheren Alter betrifft. Die Diagnostik des AFX stellt eine Herausforderung dar, da bisher keine spezifischen histologischen oder immunhistochemischen Marker zur Verfügung stehen. Darüber hinaus sind die genetischen Mechanismen, die der Tumorgenese zu Grunde liegen und die potentielle Ansatzpunkte für therapeutische Strategien im Falle nicht operabler Tumore darstellen könnten, bisher nicht abschließend identifiziert worden. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb das histologische, immunhistochemische und molekulargenetische Profil von AFX-Tumorpräparaten von zwei Kohorten mit N=27 und N=29 Patientinnen und Patienten mit Hilfe etablierter Standardprozeduren untersucht und verglichen. Die Ergebnisse der vorliegenden Auswertung bestätigen die Erkenntnisse, die aus vorherigen Arbeiten zu der klinischen Präsentation des AFX gewonnen wurden. So zeigte sich eine Lokalisation der Tumore in sonnenexponierten Arealen, insbesondere im Bereich des Kopfes und typische klinische Symptome wie Juckreiz und Blutung. Durch die Nachbefragung der Patientinnen und Patienten nach einem Zeitraum von bis zu 5 Jahren nach initialer Tumorresektion, ließen sich Hinweise auf die Rezidivfreiheit über diesen Zeitraum ermitteln, was die Diagnose eines AFX bei diesen Patientinnen und Patienten unterstützte. Im Hinblick auf die immunhistochemischen Charakteristika der Tumorproben der Mannheimer Kohorte (N=27) wurde eine Negativität für die Marker PanCK, MART1 und S100 sowie eine geringe Expression von CD34 und Desmin nachgewiesen. Im Unterschied dazu zeigte sich ein hoher Anteil an Zellen, die CD10, Ki67, Aktin, Vimentin und CD99 exprimierten. Im Hinblick auf CD68 zeigte sich ein intermediäres Expressionsmuster. Diese Befunde ließen sich, abgesehen von einer höheren Expression von S100 und CD34, in der unabhängigen Stichprobe externer Patientinnen und Patienten (N=29) replizieren. In den anschließenden Analysen der Expression von Proteinen der MAP-Kinase Kaskade (BRAF, MEK, pMEK, ERK, pERK) wurde in den Präparaten der Mannheimer Kohorte eine Expression von pMEK in fast allen untersuchten Proben (95%) sowie eine positive Expression von ERK in mehr als 80% der Proben detektiert. BRAF Expression war in ⅔ und MEK und pERK Expression in ⅓ der untersuchten Präparate sichtbar. Im Vergleich zu den Proben der Mannheimer Kohorte, zeigten sich

in den Proben der externen Kohorte ähnliche Expressionsmuster für ERK und pERK, aber im Unterschied signifikant geringere Expressionen für pMEK, MEK und BRAF, was auf eine deutliche Variabilität der Expressionsmuster hindeutet. In der durchgeführten Mutationsanalyse der 7 Tumoren mit der stärksten Aktivierung im MAP-Kinase-Signalweg konnten keine Mutationen in den BRAF- und NRAS-Genen nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die erhöhte Aktivität des MAP-Kinase-Signalwegs durch andere Mechanismen hervorgerufen wird. Indirekte Hinweise für diese Vermutung liefern auch die Ergebnisse der zusätzlichen Analysen von NF1 und EGFR. In beiden Stichproben wurde eine niedrige NF1 Expression gefunden, was als möglicher Hinweis auf eine NF1-assoziierte Disinhibition der MAP-Kinase-Kaskade aufgefasst werden kann. Darüber hinaus weist die hohe Expression von EGFR im Tumorgewebe auf eine mögliche EGFR-assoziierte Dysregulation der MAP-Kinase-Kaskade hin. Beide Signalwege könnten perspektivisch Ansatzpunkte für Therapien darstellen in Fällen, in denen weder eine operative Therapie, noch eine Strahlentherapie des AFX aussichtsreich erscheint.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Flohil SC, de Vries E, Neumann HA, Coebergh JW, Nijsten T. Incidence, prevalence and future trends of primary basal cell carcinoma in the Netherlands. *Acta Derm Venereol*. Jan 2011;91(1):24-30. doi:10.2340/00015555-1009
2. Plewig G, Ruzicka T, Kaufmann R, Hertl M. Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie. 2018;doi:10.1007/978-3-662-49544-5
3. Anderson HL, Joseph AK. A pilot feasibility study of a rare skin tumor database. *Dermatol Surg*. Jun 2007;33(6):693-696. doi:10.1111/j.1524-4725.2007.33145.x
4. Jo VY, Fletcher CD. WHO classification of soft tissue tumours: an update based on the 2013 (4th) edition. *Pathology*. Feb 2014;46(2):95-104. doi:10.1097/PAT.0000000000000050
5. Sbaraglia M, Bellan E, Dei Tos AP. The 2020 WHO Classification of Soft Tissue Tumours: news and perspectives. *Pathologica*. Apr 2021;113(2):70-84. doi:10.32074/1591-951X-213
6. Fletcher CD. The evolving classification of soft tissue tumours - an update based on the new 2013 WHO classification. *Histopathology*. Jan 2014;64(1):2-11. doi:10.1111/his.12267
7. Helwig EB, May D. Atypical fibroxanthoma of the skin with metastasis. *Cancer*. Jan 15 1986;57(2):368-376. doi:10.1002/1097-0142(19860115)57:2
8. Kempson RL, McGavran MH. Atypical Fibroxanthomas of the Skin. *Cancer*. Nov 1964;17:1463-1471. doi: 10.1002/1097-0142(196411)17:11<1463::aid-cncr2820171114>3.0.co;2-e
9. Kroe DJ, Pitcock JA. Atypical fibroxanthoma of the skin. Report of ten cases. *Am J Clin Pathol*. Apr 1969;51(4):487-492. doi:10.1093/ajcp/51.4.487
10. Hudson AW, Winkelmann RK. Atypical fibroxanthoma of the skin: a reappraisal of 19 cases in which the original diagnosis was spindle-cell squamous carcinoma. *Cancer*. Feb 1972;29(2):413-422. doi:10.1002/1097-0142(197202)29:2<413::aid-cncr2820290224>3.0.co;2-0
11. Zelger BG, Soyer HP, Zelger B. Giant cell atypical fibroxanthoma: does it really exist? *Am J Dermatopathol*. Feb 1999;21(1):108-110. doi:10.1097/00000372-199902000-00087
12. Helbig D, Ziemer M, Dippel E, et al. [Not Available]. *J Dtsch Dermatol Ges*. Feb 2022;20(2):235-245. S1-Leitlinie Atypisches Fibroxanthom (AFX) und pleomorphes dermales Sarkom (PDS). doi:10.1111/ddg.14700_g
13. Helbig D, Ihle MA, Putz K, et al. Oncogene and therapeutic target analyses in atypical fibroxanthomas and pleomorphic dermal sarcomas. *Oncotarget*. Apr 19 2016;7(16):21763-21774. doi:10.18632/oncotarget.7845
14. Withers AH, Brougham ND, Barber RM, Tan ST. Atypical fibroxanthoma and malignant fibrous histiocytoma. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. Nov 2011;64(11):e273-278. doi:10.1016/j.bjps.2011.05.004
15. Griewank KG, Schilling B, Murali R, et al. TERT promoter mutations are frequent in atypical fibroxanthomas and pleomorphic dermal sarcomas. *Mod Pathol*. Apr 2014;27(4):502-508. doi:10.1038/modpathol.2013.168
16. Dei Tos AP, Maestro R, Doglioni C, et al. Ultraviolet-induced p53 mutations in atypical fibroxanthoma. *Am J Pathol*. Jul 1994;145(1):11-17.
17. Sakamoto A, Oda Y, Itakura E, et al. Immunoexpression of ultraviolet photoproducts and p53 mutation analysis in atypical fibroxanthoma and

superficial malignant fibrous histiocytoma. *Mod Pathol*. Jun 2001;14(6):581-588. doi:10.1038/modpathol.3880354
18. Fretzin DF, Helwig EB. Atypical fibroxanthoma of the skin. A clinicopathologic study of 140 cases. *Cancer*. Jun 1973;31(6):1541-1552. doi:10.1002/1097-0142(197306)31:6<1541::aid-cncr2820310635>3.0.co;2-6
19. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. Jun 27 2002;417(6892):949-954. doi:10.1038/nature00766
20. Hommes DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut*. Jan 2003;52(1):144-151. doi:10.1136/gut.52.1.144
21. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev*. Apr 2012;92(2):689-737. doi:10.1152/physrev.00028.2011
22. Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, et al. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst*. Dec 17 2003;95(24):1878-1890. doi:10.1093/jnci/djg123
23. Mercer KE, Pritchard CA. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta*. Jun 5 2003;1653(1):25-40. doi:10.1016/s0304-419x(03)00016-7
24. Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell*. Oct 2004;6(4):313-319. doi:10.1016/j.ccr.2004.09.022
25. Wellbrock C, Ogilvie L, Hedley D, et al. V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer Res*. Apr 1 2004;64(7):2338-2342. doi:10.1158/0008-5472.can-03-3433
26. Dhomen N, Reis-Filho JS, da Rocha Dias S, et al. Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell*. Apr 7 2009;15(4):294-303. doi:10.1016/j.ccr.2009.02.022
27. Mirza B, Weedon D. Atypical fibroxanthoma: a clinicopathological study of 89 cases. *Australas J Dermatol*. Nov 2005;46(4):235-238. doi:10.1111/j.1440-0960.2005.00190.x
28. Beer TW, Drury P, Heenan PJ. Atypical fibroxanthoma: a histological and immunohistochemical review of 171 cases. *Am J Dermatopathol*. Aug 2010;32(6):533-540. doi:10.1097/DAD.0b013e3181c80b97
29. Luzar B, Calonje E. Morphological and immunohistochemical characteristics of atypical fibroxanthoma with a special emphasis on potential diagnostic pitfalls: a review. *J Cutan Pathol*. Mar 2010;37(3):301-309. doi:10.1111/j.1600-0560.2009.01425.x
30. Iorizzo LJ, 3rd, Brown MD. Atypical fibroxanthoma: a review of the literature. *Dermatol Surg*. Feb 2011;37(2):146-157. doi:10.1111/j.1524-4725.2010.01843.x
31. Ma CK, Zarbo RJ, Gown AM. Immunohistochemical characterization of atypical fibroxanthoma and dermatofibrosarcoma protuberans. *Am J Clin Pathol*. Apr 1992;97(4):478-483. doi:10.1093/ajcp/97.4.478
32. Youssef N, Vabres P, Buisson T, Brousse N, Fraitag S. Two unusual tumors in a patient with xeroderma pigmentosum: atypical fibroxanthoma and basosquamous carcinoma. *J Cutan Pathol*. Oct 1999;26(9):430-435. doi:10.1111/j.1600-0560.1999.tb01870.x
33. Dilek FH, Akpolat N, Metin A, Ugras S. Atypical fibroxanthoma of the skin and the lower lip in xeroderma pigmentosum. *Br J Dermatol*. Sep 2000;143(3):618-620. doi:10.1111/j.1365-2133.2000.03721.x

34. Calonje E, Wadden C, Wilson-Jones E, Fletcher CD. Spindle-cell non-pleomorphic atypical fibroxanthoma: analysis of a series and delineation of a distinctive variant. *Histopathology*. Mar 1993;22(3):247-254. doi:10.1111/j.1365-2559.1993.tb00114.x
35. Li YY, Hanna GJ, Laga AC, Haddad RI, Lorch JH, Hammerman PS. Genomic analysis of metastatic cutaneous squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. Mar 15 2015;21(6):1447-1456. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1773
36. McCalmont TH. Correction and clarification regarding AFX and pleomorphic dermal sarcoma. *J Cutan Pathol*. Jan 2012;39(1):8. doi:10.1111/j.1600-0560.2011.01851.x
37. Miller K, Goodlad JR, Brenn T. Pleomorphic dermal sarcoma: adverse histologic features predict aggressive behavior and allow distinction from atypical fibroxanthoma. *Am J Surg Pathol*. Sep 2012;36(9):1317-1326. doi:10.1097/PAS.0b013e31825359e1
38. Longacre TA, Smoller BR, Rouse RV. Atypical fibroxanthoma. Multiple immunohistologic profiles. *Am J Surg Pathol*. Dec 1993;17(12):1199-1209. doi:10.1097/00000478-199312000-00001
39. Monteagudo C, Calduch L, Navarro S, Joan-Figueroa A, Llombart-Bosch A. CD99 immunoreactivity in atypical fibroxanthoma: a common feature of diagnostic value. *Am J Clin Pathol*. Jan 2002;117(1):126-131. doi:10.1309/2EXB-70CW-3U6P-VQ6H
40. Hartel PH, Jackson J, Ducatman BS, Zhang P. CD99 immunoreactivity in atypical fibroxanthoma and pleomorphic malignant fibrous histiocytoma: a useful diagnostic marker. *J Cutan Pathol*. Sep 2006;33 Suppl 2:24-28. doi:10.1111/j.1600-0560.2006.00492.x
41. Hultgren TL, DiMaio DJ. Immunohistochemical staining of CD10 in atypical fibroxanthomas. *J Cutan Pathol*. May 2007;34(5):415-419. doi:10.1111/j.1600-0560.2006.00635.x
42. de Feraudy S, Mar N, McCalmont TH. Evaluation of CD10 and procollagen 1 expression in atypical fibroxanthoma and dermatofibroma. *Am J Surg Pathol*. Aug 2008;32(8):1111-1122. doi:10.1097/PAS.0b013e31816b8fce
43. Kanner WA, Brill LB, 2nd, Patterson JW, Wick MR. CD10, p63 and CD99 expression in the differential diagnosis of atypical fibroxanthoma, spindle cell squamous cell carcinoma and desmoplastic melanoma. *J Cutan Pathol*. Jul 2010;37(7):744-750. doi:10.1111/j.1600-0560.2010.01534.x
44. Wieland CN, Dyck R, Weenig RH, Comfere NI. The role of CD10 in distinguishing atypical fibroxanthoma from sarcomatoid (spindle cell) squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol*. Nov 2011;38(11):884-888. doi:10.1111/j.1600-0560.2011.01768.x
45. Thum C, Hollowood K, Birch J, Goodlad JR, Brenn T. Aberrant Melan-A expression in atypical fibroxanthoma and undifferentiated pleomorphic sarcoma of the skin. *J Cutan Pathol*. Dec 2011;38(12):954-960. doi:10.1111/j.1600-0560.2011.01798.x
46. Lefferts JA, Loehrer AP, Yan S, Green DC, Deharvengt SJ, LeBlanc RE. CD10 and p63 expression in a sarcomatoid undifferentiated melanoma: A cautionary (and molecularly annotated) tale. *J Cutan Pathol*. Jun 2020;47(6):541-547. doi:10.1111/cup.13646
47. Naert KA, Trotter MJ. Utilization and utility of immunohistochemistry in dermatopathology. *Am J Dermatopathol*. Feb 2013;35(1):74-77. doi:10.1097/DAD.0b013e31825d4f73

48. Dinehart MS, Dinehart SM, Sukpraprut-Braaten S, High WA. Immunohistochemistry utilization in the diagnosis of melanoma. *J Cutan Pathol*. May 2020;47(5):446-450. doi:10.1111/cup.13648
49. Tardio JC, Pinedo F, Aramburu JA, et al. Pleomorphic dermal sarcoma: a more aggressive neoplasm than previously estimated. *J Cutan Pathol*. Feb 2016;43(2):101-112. doi:10.1111/cup.12603
50. Tolkachjov SN, Kelley BF, Alahdab F, Erwin PJ, Brewer JD. Atypical fibroxanthoma: Systematic review and meta-analysis of treatment with Mohs micrographic surgery or excision. *J Am Acad Dermatol*. Nov 2018;79(5):929-934 e926. doi:10.1016/j.jaad.2018.06.048
51. Fletcher CD, Evans BJ, MacArtney JC, Smith N, Wilson Jones E, McKee PH. Dermatofibrosarcoma protuberans: a clinicopathological and immunohistochemical study with a review of the literature. *Histopathology*. Sep 1985;9(9):921-938. doi:10.1111/j.1365-2559.1985.tb02878.x
52. Davis JL, Randle HW, Zalla MJ, Roenigk RK, Brodland DG. A comparison of Mohs micrographic surgery and wide excision for the treatment of atypical fibroxanthoma. *Dermatol Surg*. Feb 1997;23(2):105-110. doi:10.1111/j.1524-4725.1997.tb00670.x
53. Seavolt M, McCall M. Atypical fibroxanthoma: review of the literature and summary of 13 patients treated with mohs micrographic surgery. *Dermatol Surg*. Mar 2006;32(3):435-441; discussion 439-441. doi:10.1111/j.1524-4725.2006.32087.x
54. Phelan PS, Rosman IS, Council ML. Atypical Fibroxanthoma: The Washington University Experience. *Dermatol Surg*. Dec 2019;45(12):1450-1458. doi:10.1097/DSS.0000000000001943
55. Soleymani T, Tyler Hollmig S. Conception and Management of a Poorly Understood Spectrum of Dermatologic Neoplasms: Atypical Fibroxanthoma, Pleomorphic Dermal Sarcoma, and Undifferentiated Pleomorphic Sarcoma. *Curr Treat Options Oncol*. Aug 2017;18(8):50. doi:10.1007/s11864-017-0489-6
56. Klein S, Persa OD, Mauch C, et al. First report on two cases of pleomorphic dermal sarcoma successfully treated with immune checkpoint inhibitors. *Oncoimmunology*. 2019;8(12):e1665977. doi:10.1080/2162402X.2019.1665977
57. Lonie S, Yau B, Henderson M, Gyorki D, Angel C, Webb A. Management of pleomorphic dermal sarcoma. *ANZ J Surg*. Nov 2020;90(11):2322-2324. doi:10.1111/ans.15909
58. Persa OD, Loquai C, Wobser M, et al. Extended surgical safety margins and ulceration are associated with an improved prognosis in pleomorphic dermal sarcomas. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. Aug 2019;33(8):1577-1580. doi:10.1111/jdv.15493
59. Crimini E, Roberto M, Degli Effetti V, et al. Electrochemotherapy as Promising Treatment Option in Rare Recurrent Cutaneous Neoplasm of the Scalp: Case Report of an Elderly Patient. *Case Rep Oncol Med*. 2019;2019:2507642. doi:10.1155/2019/2507642
60. Anderson ME, Rodic N, Subtil A, et al. Multifocal pleomorphic dermal sarcoma and the role of inflammation and immunosuppression in a lung transplant patient: a case report. *J Med Case Rep*. May 30 2019;13(1):169. doi:10.1186/s13256-019-2093-9

61. Klein S, Quaas A, Noh KW, et al. Integrative Analysis of Pleomorphic Dermal Sarcomas Reveals Fibroblastic Differentiation and Susceptibility to Immunotherapy. *Clin Cancer Res*. Nov 1 2020;26(21):5638-5645. doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-1899
62. Klein O, McTigue C, Wong ZW, Syme DB, Hunter-Smith DJ. Complete response of metastatic pleomorphic dermal sarcoma to anti-PD-1 therapy. *Br J Dermatol*. Dec 2020;183(6):e189. doi:10.1111/bjd.19309
63. Helbig D, Quaas A, Mauch C, et al. Copy number variations in atypical fibroxanthomas and pleomorphic dermal sarcomas. *Oncotarget*. Dec 12 2017;8(65):109457-109467. doi:10.18632/oncotarget.22691
64. da Silveira Nogueira Lima JP, Georgieva M, Haaland B, de Lima Lopes G. A systematic review and network meta-analysis of immunotherapy and targeted therapy for advanced melanoma. *Cancer Med*. Jun 2017;6(6):1143-1153. doi:10.1002/cam4.1001
65. McCalmont TH. AFX: what we now know. *J Cutan Pathol*. Nov 2011;38(11):853-856. doi:10.1111/j.1600-0560.2011.01802.x
66. Wollina U, Schonlebe J, Ziemer M, et al. Atypical fibroxanthoma: a series of 56 tumors and an unexplained uneven distribution of cases in southeast Germany. *Head Neck*. Jun 2015;37(6):829-834. doi:10.1002/hed.23673
67. Bitel A, Schonlebe J, Kronert C, Wollina U. Atypical fibroxanthoma: An analysis of 105 tumors. *Dermatol Ther*. Nov 2020;33(6):e13962. doi:10.1111/dth.13962
68. Lum DJ, King AR. Peritoneal metastases from an atypical fibroxanthoma. *Am J Surg Pathol*. Aug 2006;30(8):1041-1046. doi:10.1097/00000478-200608000-00017
69. Ramulu S, Kale AD, Hallikerimath S, Kotrashetti V. Comparing modified papanicolaou stain with ayoub-shklar and haematoxylin-eosin stain for demonstration of keratin in paraffin embedded tissue sections. *J Oral Maxillofac Pathol*. Jan 2013;17(1):23-30. doi:10.4103/0973-029X.110698
70. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. Jul 1998;4(7):844-847. doi:10.1038/nm0798-844
71. Wagner NB, Weide B, Reith M, et al. Diminished levels of the soluble form of RAGE are related to poor survival in malignant melanoma. *Int J Cancer*. Dec 1 2015;137(11):2607-2617. doi:10.1002/ijc.29619
72. Nisolle M, Gillerot S, Casanas-Roux F, Squifflet J, Berliere M, Donnez J. Immunohistochemical study of the proliferation index, oestrogen receptors and progesterone receptors A and B in leiomyomata and normal myometrium during the menstrual cycle and under gonadotrophin-releasing hormone agonist therapy. *Hum Reprod*. Nov 1999;14(11):2844-2850. doi:10.1093/humrep/14.11.2844
73. Lian CG, Xu Y, Ceol C, et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. *Cell*. Sep 14 2012;150(6):1135-1146. doi:10.1016/j.cell.2012.07.033
74. Knappe N, Novak D, Weina K, et al. Directed Dedifferentiation Using Partial Reprogramming Induces Invasive Phenotype in Melanoma Cells. *Stem Cells*. Apr 2016;34(4):832-846. doi:10.1002/stem.2284
75. Orouji E, Orouji A, Gaiser T, Larribere L, Gebhardt C, Utikal J. MAP kinase pathway gene copy alterations in NRAS/BRAF wild-type advanced melanoma. *Int J Cancer*. May 1 2016;138(9):2257-2262. doi:10.1002/ijc.29970

76. Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol*. Jun 1988;124(6):869-871. doi:10.1001/archderm.124.6.869
77. Mahalingam S, Shah A, Stewart A. Atypical Fibroxanthoma: A case series and review of literature. *Auris Nasus Larynx*. Dec 2015;42(6):469-471. doi:10.1016/j.anl.2015.04.001
78. Davidson JS, Demsey D. Atypical fibroxanthoma: clinicopathologic determinants for recurrence and implications for surgical management. *J Surg Oncol*. May 2012;105(6):559-562. doi:10.1002/jso.22128
79. Harding-Jackson N, Sangueza M, Mackinnon A, Suster S, Plaza JA. Spindle Cell Atypical Fibroxanthoma: Myofibroblastic Differentiation Represents a Diagnostic Pitfall in This Variant of AFX. *Am J Dermatopathol*. Jul 2015;37(7):509-514; quiz 515-506. doi:10.1097/DAD.0000000000000313
80. Salah HT, D'Ardis J A, Baek D, Schwartz MR, Ayala AG, Ro JY. Superficial CD34-positive fibroblastic tumor (SCPFT): A review of pathological and clinical features. *Ann Diagn Pathol*. Jun 2022;58:151937. doi:10.1016/j.anndiagpath.2022.151937
81. Palmerini E, Gambarotti M, Staals EL, et al. Fibrosarcomatous changes and expression of CD34+ and apolipoprotein-D in dermatofibrosarcoma protuberans. *Clin Sarcoma Res*. Jan 27 2012;2(1):4. doi:10.1186/2045-3329-2-4
82. Liu M, Yang X, Liu J, et al. Efficacy and safety of BRAF inhibition alone versus combined BRAF and MEK inhibition in melanoma: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Oncotarget*. May 9 2017;8(19):32258-32269. doi:10.18632/oncotarget.15632

7. TABELLARISCHER ANHANG

7.1. FRAGEBOGEN FÜR PATIENTINNEN UND PATIENTEN MIT ATYPISCHEM FIBROXANTHOM (AFX)

1. Allgemeine Angaben

Name: _____

Geburtsdatum: _____

Geburtsort: _____

An welchen Orten haben Sie im Laufe Ihres Lebens gewohnt und wie lange?

Wo?	Wie lange?

Haben Sie in südlichen Ländern gewohnt z.B. Ferienhaus?

♦ JA und zwar in _____ für ca. _____Wochen pro Jahr

♦ NEIN

Welchen Beruf haben Sie ausgeübt bzw. üben Sie aus?

Hatten Sie bei Ihrer Arbeit Kontakt mit Chemikalien?

♦ JA, und zwar mit _____

♦ NEIN

Rauchen Sie oder haben Sie geraucht?

♦ JA, ich rauche seit _____ Jahren ca. _____ Zigaretten pro Tag

♦ JA, ich habe _____ Jahre ca. _____ Zigaretten pro Tag geraucht

♦ NEIN, ich habe nie geraucht.

2. Freizeitverhalten

Bitte schätzen Sie die Häufigkeit der folgenden Aktivitäten in der Kindheit ein:

Aktivität	nie	selten	manchmal	häufig
Wandern				
Wintersport				
Spazierengehen				
Fußballspielen				
Fahrradfahren				
Joggen				
Schwimmen				
Sonnenbaden				
Jährlicher Urlaub in sonnigen Regionen				
Gartenarbeit				
Segeln				
Tennisspielen				
Golfspielen				

Bitte schätzen Sie die Häufigkeit von Sonnenbränden und Benutzung von Sonnencreme in der Kindheit ein:

Benutzung von Sonnencreme				
Sonnenbrände				

Jetzt schätzen Sie dies bitte für die letzten 20 Jahre vor Ihrer Tumorerkrankung ein:

Aktivität	nie	selten	manchmal	häufig
Wandern				
Wintersport				
Spazierengehen				
Fußballspielen				
Fahrradfahren				

Joggen				
Schwimmen				
Sonnenbaden				
Jährlicher Urlaub in sonnenreichen Regionen				
Gartenarbeit				
Segeln				
Tennisspielen				
Golfspielen				

Benutzung von Sonnencreme				
Sonnenbrände				

Haben Sie früher ein Solarium besucht oder besuchen es noch heute?

- ♦ JA, ich besuche ein Solarium momentan ca. _____ Mal im Monat
- ♦ JA, früher ca. _____ Besuche im Monat
- ♦ NEIN

Verbringen Sie viel Zeit im Freien?

- ♦ JA, und zwar _____ Stunden pro Tag
- ♦ NEIN

Wo haben Sie hauptsächlich Ihre Ferien verbracht?

_____

Benutzen Sie Sonnenschutz?

- ♦ JA, und zwar Lichtschutzfaktor _____
- ♦ NEIN

Tragen Sie zum Schutz vor Sonne Kleidung oder Hut?

- ♦ JA
- ♦ NEIN

Wie regelmäßig gehen Sie zum Hautarzt?

- ♦ seltener als 1x im Jahr
- ♦ 1x im Jahr
- ♦ 2x im Jahr
- ♦ mehr als 2x im Jahr

Wie würden Sie Ihren Hauttyp beschreiben?

- ♦ Weiße, helle Haut, stark sonnenbrandgefährdet, bräunt kaum
- ♦ Relativ helle Haut, sonnenbrandgefährdet, bräunt gering
- ♦ Etwas dunklere haut, wenig sonnenbrandgefährdet, bräunt schnell
- ♦ Braune Haut, kaum sonnenbrandgefährdet, bräunt schnell und dunkel
- ♦ Dunkelbraune oder schwarze Haut, nicht sonnenbrandgefährdet, bräunt immer stark

Welche Haarfarbe haben Sie (ohne Färbung)? Wenn Sie bereits graue Haare haben, geben Sie dies bitte zusätzlich zu Ihrer früheren Naturhaarfarbe an.

_____

Welche Augenfarbe haben Sie?

_____

3. Erkrankungen

An welchen anderen Erkrankungen leiden Sie?

- ♦ Diabetes
- ♦ Schilddrüsenerkrankungen
- ♦ Herzerkrankung
- ♦ Andere Krebserkrankungen (z.B. Prostatakrebs, Blutkrebs, Darmkrebs...)

  Und zwar: _____

Haben Sie schon einmal eine Chemotherapie erhalten?

♦ JA

♦ NEIN

Haben Sie schon einmal eine Bestrahlung erhalten (z.B. wegen einer Krebserkrankung)?

♦ JA

♦ NEIN

Haben Sie schon einmal eine Lichttherapie erhalten (z.B. wegen Neurodermitis oder Schuppenflechte)?

♦ JA

♦ NEIN

Sind auch bei Ihren Eltern, Geschwistern und Kindern Hautkrebserkrankungen aufgetreten?

♦ JA

Welche?	Bei wem?

♦ NEIN

4. Fragen zu Ihrem AFX

Wer hat damals den Tumor erkannt?

♦ ich selbst

♦ der Hausarzt

♦ der Hautarzt

♦ Familienangehörige

Hatten Sie damals Juckreiz?

- ♦ JA
- ♦ NEIN

Hat der Tumor manchmal geblutet?

- ♦ JA
- ♦ NEIN

Waren Sie nach der Operation regelmäßig bei den Kontrollterminen?

- ♦ JA
- ♦ NEIN

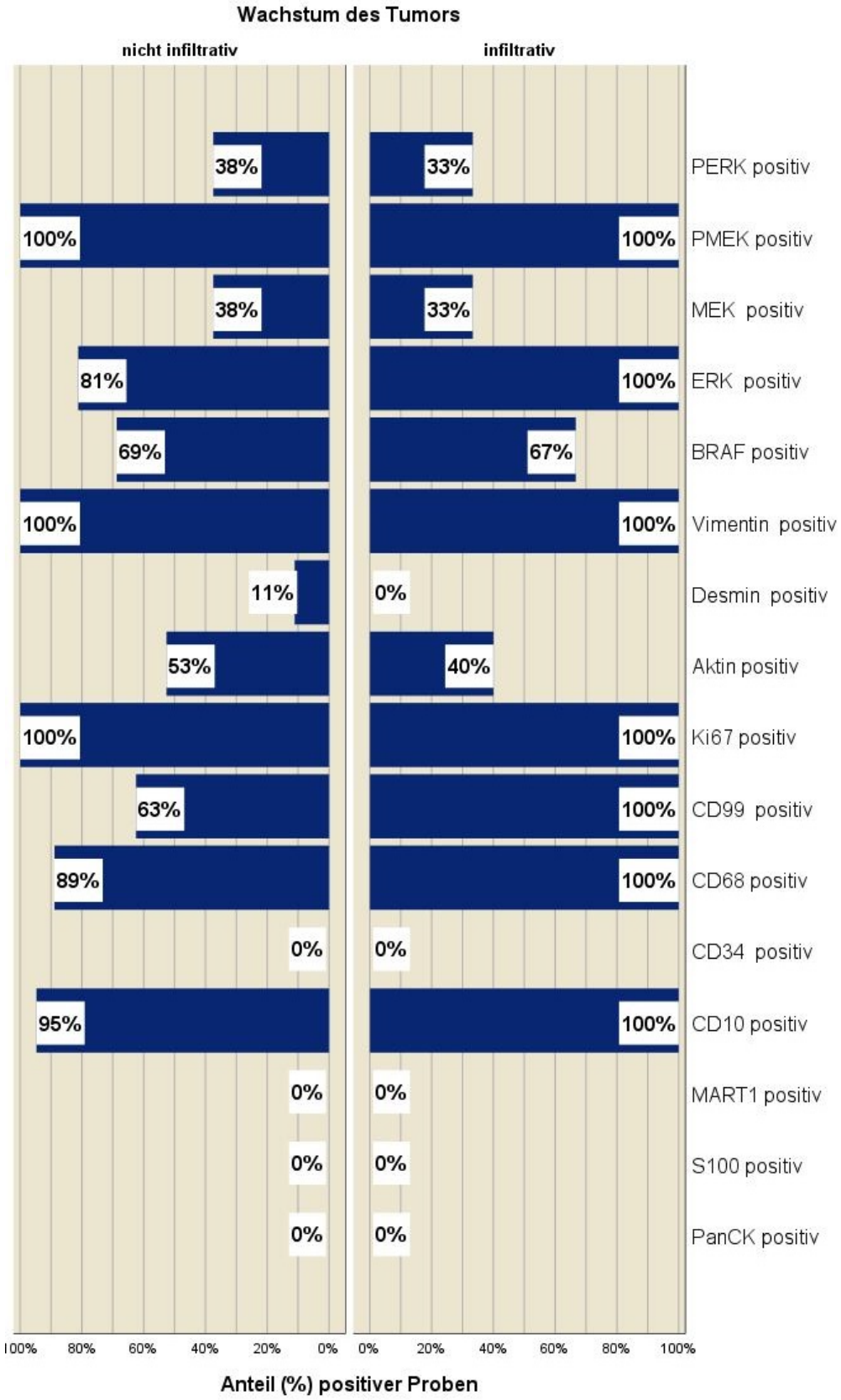
Ist bei Ihnen der Tumor nochmals wiedergekommen?

- ♦ JA
- ♦ NEIN

Haben Sie Metastasen von diesem Tumor?

- ♦ JA, und zwar dort _____
- ♦ NEIN

7.2. VERGLEICH DER GRUPPEN MIT UND OHNE INFILTRATIVES WACHSTUM



8. LEBENSLAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname:	Bach, geb. Frank, Marisa Dionisia
Geburtsdatum:	30.01.1984
Geburtsort:	Karlsruhe

SCHULISCHER WERDEGANG

1990 – 1994	Grund- und Hauptschule Daxlanden
1990 – 2003	Fichte-Gymnasium Karlsruhe
27.06.2003	Abitur

BERUFLICHER WERDEGANG

2004 – 2007	Ausbildung zur Gesundheits- und Krankenpflegerin, Städtisches Klinikum Karlsruhe
14.09.2007	Staatsexamen zur Gesundheits- und Krankenpflegerin
2007 – 2010	Berufstätigkeit als Gesundheits- und Krankenpflegerin, Städtisches Klinikum Karlsruhe
2011 – 2014	Berufstätigkeit als Gesundheits- und Krankenpflegerin, Theresienkrankenhaus Mannheim
Seit 01.02.2017	Assistenzärztin in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Universitätsmedizin Mannheim

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS2003 - SS2004	Studium Lehramt für Realschulen (Chemie, Französisch, Englisch), Pädagogische Hochschule Karlsruhe
WS2010-WS2016	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät Mannheim, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
03.09.2012	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1) - Note: befriedigend (3,5)
15.10.2015	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2) - Note: gut
16.11.2016	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3) - Note: gut (2,5)
23.11.2016	Approbation als Ärztin

9. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. S. Goerdt, Herrn Prof. Dr. med. J. Utikal sowie Frau Dr. med. A. Orouji danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die Betreuung während der langen Zeit.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. P. Kind für die Überlassung der Präparate sowie Frau B.Sc. S. Arif-Said für die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.

Danken möchte ich außerdem meinem Ehemann und meinen Eltern, die mir entsprechenden Freiraum zur Erstellung dieser Arbeit eingeräumt haben.