

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Ha-*ras*- und TP53-Mutationsmuster aktinischer Keratosen in
einer therapeutischen Vergleichsstudie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nadja Krawtchenko

geboren in Minsk, Belarus

Gutachter: 1. PD Dr. rer. nat. I. Nindl
 2. Prof. Dr. med U. Hengge
 3. Univ.-Prof. Dr. Dr. J. C. Becker

Datum der Promotion: 30. November 2012

Danksagung

Meinem Doktorvater, PD Dr. rer. nat. Ingo Nindl, bin ich für die Überlassung des Themas und das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit zu großem Dank verpflichtet. Ein besonderer Dank gilt auch an Prof. Dr. med. Eggert Stockfleth, der mir jegliche klinische Unterstützung in dieser Arbeit bot.

Meiner Betreuerin, Frau Dr. rer. nat. Anja Köhler, bin ich für ihr unendliches Motivationsvermögen dankbar, was mich stets zu neuen Überlegungen und Fragestellungen animierte und vor allem die praktische Labortätigkeit zu lieben lehrte. Letzteres wäre auch kaum ohne die liebevolle Unterstützung von Frau Mandy Lehmann, der medizinisch-technischen Assistentin unserer Arbeitsgruppe denkbar.

Meinem Freund, Henrik Müller, gilt ein ganz besonderer Dank dafür, dass er mir stets den Rücken freigehalten hat und mich bestärkt hat, wenn ich ins Zweifeln kam.

Meinen Eltern möchte ich danken, dass sie mir diesen Bildungsweg ermöglicht haben und fortwährend an mich geglaubt haben.

Zu guter Letzt sind noch alle freiwilligen Studienteilnehmer zu erwähnen, ohne die diese Studie nicht möglich gewesen wäre.

Meinem Vater, der mich stets lehrte zu hinterfragen.

Publikationsliste

N. Krawtchenko, J. Roewert-Huber, M. Ulrich, I. Mann, W. Sterry and E. Stockfleth: „A randomised study of topical 5% imiquimod vs. topical 5-fluorouracil vs. cryosurgery in immunocompetent patients with actinic keratoses: a comparison of clinical and histological outcomes including 1-year follow-up“; *British Journal of Dermatology*, 157 (Suppl. 2), 34–40, (2007)

I. Nindl, M. Gottschling, **N. Krawtchenko**, M.D. Lehmann, J. Roewert-Huber, J. Eberle, E. Stockfleth and T. Forschner: „Low prevalence of p53, p16INK4a and Ha-ras tumour-specific mutations in low-graded actinic keratosis“; *British Journal of Dermatology*, 156 (Suppl. 3), 34–39, (2007)

Lebenslauf

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

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Aktinische Keratose.....	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Klinik	2
1.2	Aktinische Keratose - ein Plattenepithelkarzinom in situ.....	3
1.3	Die Photokarzinogenese der Haut.....	5
1.3.1	Grundlagen der molekularen Genetik.....	5
1.3.2	Ultra-violette Strahlung als Auslösefaktor intragenischer Mutationen	7
1.3.3	Onkogene und Tumorsuppressorgene in der Karzinogenese.....	7
1.4	Therapieoptionen der AK	10
1.4.1	Kryotherapie.....	11
1.4.2	5-Fluoruracil.....	12
1.4.3	Imiquimod	13
1.5	Herleitung einer Aufgabenstellung.....	14
2	Material und Methoden	15
	Allgemein	15
2.1	Klinischer Teil.....	15
2.1.1	Studienpopulation	15
2.1.2	Studiendesign	16
2.1.3	Evaluierungskriterien.....	21
2.2	Molekularbiologischer Teil.....	23
2.2.1	Grundlagen der Polymerase-Ketten-Reaktion.....	23

2.2.2	Die DNA-Isolation.....	23
2.2.3	Analyse der Markergene mittels Polymerase-Kettenreaktion.....	24
2.2.4	PCR der Markergene.....	25
2.2.5	DNA-Sequenzierung.....	26
2.2.6	Mikrodissektion ausgewählter Gewebeproben.....	26
2.3	Statistische Methoden.....	27
3	Ergebnisse.....	28
3.1	Klinischer Teil.....	28
3.1.1	Studienpopulation und eingehende Charakteristika	28
3.1.2	Klinische Evaluierung.....	29
3.1.3	Histologische Evaluierung	31
3.1.4	Beurteilung des Therapieerfolges zum Auswertpunkt II (12 Monate nach Behandlungsende)	32
3.1.5	Kosmetischer Erfolg	34
3.2	Molekularbiologischer Teil.....	36
3.2.1	Mutationsanalysen	36
4	Diskussion.....	43
4.1	Klinische Ergebnisse	43
4.1.1	Was sind die Kriterien einer optimalen AK-Therapie?	44
4.1.2	Vergleich der Therapiegruppen anhand der vier Kriterien einer optimalen AK- Therapie	47
4.2	Molekularbiologischer Teil.....	56
4.2.1	Mutationsanalyse von TP53- und Ha- <i>ras</i> -Genen in AK.....	56
5	Zusammenfassende Schlussfolgerungen	62
6	Zusammenfassung.....	63
7	Abkürzungen.....	65
8	Literaturverzeichnis.....	66

9	Abbildungsverzeichnis	70
10	Tabellenverzeichnis.....	72

1 Einleitung

1.1 Aktinische Keratose

Die aktinische Keratose (AK) stellt ein Plattenepithelkarzinom (PEK) der Epidermis *in situ* dar.¹ Dabei handelt es sich um die Proliferation zytologisch atypischer Keratinozyten im Bereich der epidermodermalen Junktionszone in chronisch lichtgeschädigter Haut.

Die erste Erwähnung dieser Hauterkrankung geht auf den französischen Dermatologen Dubreuilh zurück, der 1896 den Begriff „Keratosi senilis“ prägte. Dabei berichtete er über die Ähnlichkeit der beschriebenen Läsionen mit einem PEK und legte eindeutig fest, dass die Keratosi senilis, eine „natürliche Tendenz aufwies in einen epithelialen Tumor zu degenerieren“.² Etwa 30 Jahre später charakterisierte der deutsche Dermatologe Freudenthal die histopathologischen Grundlagen von Keratosi senilis und verifizierte die von Dubreuilh vorgelegte Hypothese des Überganges diesen in ein Karzinom.³ Pinkus führte 1958 im Rahmen einer umfangreichen Beschreibung des Krankheitsbildes den heute verbreiteten Begriff „aktinische Keratose“ ein.⁴

1.1.1 Epidemiologie

Epidemiologische Studien zeigen ein erhöhtes Auftreten der AK in der hellhäutigen Bevölkerung. Eine höhere Prävalenz der Hauterkrankung ist vor allem in Ländern mit intensiver im Vergleich zu Regionen mit mäßiger UV-Belastung zu beobachten. Eine Studie

aus Großbritannien berichtete von einer Prävalenz der AK bei Männern vs. Frauen von 16% vs. 6%. Im Alter von 70 Jahren betrug die AK-Prävalenz bereits 34% bei Männern und 18% bei Frauen.⁵ Eine viel höhere Prävalenz wird in Australien (Queensland) bei der hellhäutigen Bevölkerung beobachtet. In den Altersgruppen von 30 bis 70 Jahren beträgt sie 55% bei Männern und 37% bei Frauen.⁶ Andere Studien berichteten über niedrigere Prävalenzen von 11% bis 26%.⁷ Insgesamt zeigen diese Daten eine ca. dreifach höhere AK-Prävalenz bei Männern als bei Frauen.

Die Entwicklung eines invasiven PEK auf der Basis einer bestehenden AK ist bereits seit der Erstbeschreibung dieser Hauterkrankung bekannt. Die momentane Studienlage lässt eine Risikoschätzung für die Transformation einzelner Läsionen auf etwa 10% zu.^{7,8} Man geht aber auch davon aus, dass bei Patienten mit multiplen Läsionen binnen 10 Jahren in 10% bis 20% mit dem Auftreten eines invasiven PEK zu rechnen ist.⁹

1.1.2 *Klinik*

AK treten solitär oder in Mehrzahl nahezu ausschließlich in chronisch lichtexponierten Arealen auf, insbesondere an den so genannten Sonnenterrassen wie Stirn und Glatze, Ohrmuschel, Wangen, Nasenrücken, Unterlippe, außerdem an Unterarmen und Handrücken (**Abbildung 1-1**). Das Erscheinungsbild ist sehr variabel: es finden sich runde, ovale oder unregelmäßig geformte, meist scharf begrenzte, teils teleangiektatische Papeln, deren Färbung von hautfarben oder entzündlich gerötet bis braun pigmentiert variiert. Die rauen hornigen Herde sind oft mit gelblichen, schmutzig-braunen bis grau-schwarzen Keratosen oder Krusten versehen. Die Effloreszenzengröße variiert zwischen 0,1 bis 2,5 cm.



Abbildung 1-1: Multiple AK an sonnenexponierten Arealen (A) der Handoberflächen und (B) der Kopfhaut (Glatze)

Die Patienten sind in der Regel beschwerdefrei, klagen aber teilweise über Spannungsgefühl, Brennen oder Juckreiz. Es bestehen zumeist allgemeine Zeichen der chronisch lichtexponierten Altershaut mit Elastizitätsverlust und Hyper- bzw. Depigmentierungen und Teleangiektasien.¹⁰

1.2 Aktinische Keratose - ein Plattenepithelkarzinom in situ

Allgemeine Charakteristika

Die AK ist eine auf die Epidermis begrenzte Läsion. Histologisch besteht eine fokale Proliferation atypischer Keratinozyten, die in Nestern und zunächst in den unteren Epidermisschichten liegen und später das gesamte Epithel durchsetzen können. Die

Zelldifferenzierung ist defekt und bedingt eine Störung der normalen Histo-Architektur der Epidermis (Polarisationsverlust), die mit hyperkeratotischen oder parakeratotischen Hornauflagerungen über der verbreiteten, aber oft auch atrophisch ausgedünnten, Epidermis einhergeht.

Histologische Veränderungen einer AK sind mit denen im invasiven PEK vergleichbar und klinisch nicht voneinander zu unterscheiden. Unbehandelt können AK in ihrem Wachstum progredieren und jederzeit die Basalmembran durchbrechen. Von dort können sie sich in tiefere Hautschichten invasiv ausbreiten und zu einem ungewissen Zeitpunkt metastasieren, was im schlimmsten Fall zum Tod führen kann. Welche der Läsionen letztendlich einen invasiven Tumor entwickelt, kann nicht vorhergesagt werden. Damit sind die wichtigsten Malignitätskriterien erfüllt und AK sollten laut neuestem Kenntnisstand als ein PEK *in situ* (oberflächliches PEK) therapiert werden.^{1,11}

1.2.1.1 Klassifikation der AK

Cockerell und Kollegen führte 2000 analog zur intraepithelialen Neoplasie des Gebärmutterhalses die Bezeichnung der AK als eine keratinozytische intraepitheliale Neoplasie (KIN) ein, die in die Stadien I bis III unterteilt wurde (Cockerell *et al.* 2000). Diese allerdings ziemlich unspezifische Klassifikation wurde mittlerweile modifiziert und wie folgt in verschiedene Grade unterteilt: frühes PEK *in situ* AK I bzw. II, und PEK *in situ* AK III (modifiziert von Röwert-Hubner *et al.* 2007). Die Einteilung in die oben genannten drei AK-Grade - entsprechend mild, moderat und stark ausgeprägt - erfolgt aufgrund des klinischen Erscheinungsbildes und der histologischen Ausprägung der Zell- und Gewebeatypen der AK.¹¹⁻¹³

1.2.1.2 Ätiologie der AK

Der wesentliche ätiologische Faktor für die Entstehung von Hautkrebs, speziell von AK, ist chronische UV-Bestrahlung durch Sonnenstrahlen, daher kommt auch das oft gebrauchte Synonym „solare Keratose“ zum Einsatz. Genauer soll im Abschnitt „Photokarzinogenese der Haut“ erläutert werden. Einen anderen Ko-Faktor der malignen Transformation von AK können nach neueren Untersuchungen kutane humane Papillomviren (HPV) darstellen. In verschiedenen Studien wurde eine HPV-Prävalenz in aktinischen Keratosen bei immunkompetenten Patienten zwischen 35% und 85% gefunden.¹⁴⁻¹⁶ Ein letzter Beweis für diese Hypothese steht aber noch aus.

1.3 Die Photokarzinogenese der Haut

1.3.1 Grundlagen der molekularen Genetik

Die Desoxyribonukleinsäure (engl. DNA) ist Träger genetischer Information der menschlichen Zelle. Sie enthält Gene, die über Ribonukleinsäuren Proteine kodieren, welche für die biologische Entwicklung eines Organismus und den Stoffwechsel einer Zelle notwendig sind. Chemisch gesehen handelt es sich um einen Nukleinsäuren-Doppelstrang, dass aus vier verschiedenen Bausteinen - den Nukleotiden - aufgebaut ist. Abhängig von der stickstoffhaltigen Base in ihrer Struktur werden diese als Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) oder Thymin (T) bezeichnet.

Nur bestimmte Abschnitte der DNA, die Gene, kodieren für Proteine, die bei der Regulation des Stoffwechsels einer Zelle und deren Aufbau beteiligt sind. Drei Nukleotide (Triplet)

bilden das Codon, welcher für eine Aminosäure des entsprechenden Proteins kodiert. Dabei können mehrere unterschiedliche Triplets ein und dieselbe Aminosäure kodieren, was als Degeneration des genetischen Codes bezeichnet wird.¹⁷

Bereits durch die Labilität ihrer Bausteine, vor allem aber durch Umwelteinflüsse, insbesondere durch die ultravioletten Strahlen des Sonnenlichts, ist die Struktur der DNA ständig gefährdet. Können spezielle Schutzmechanismen der menschlichen Zelle externen Einflüssen nicht kompensieren, so entstehen Mutationen als dauerhafte Veränderungen des Erbgutes. Diese können auf verschiedenen Ebenen der Erbgutorganisation auftreten. Für die vorliegende Arbeit sind jedoch die intragenischen Mutationen von besonderer Relevanz. Diese werden durch einen Austausch, Addition (Insertion) oder Verlust (Deletion) eines oder mehrerer nebeneinander liegenden Nukleotide verursacht.¹⁷

Aufgrund der bereits erwähnten degenerativen Eigenschaft des genetischen Codes führt ein Nukleotid-Austausch in der DNA nicht zwingend zum Aminosäureaustausch im Protein. Solch eine DNA-Mutation bezeichnet man als stille Mutation (engl.: *silent mutation*). Gefährlich sind allerdings intragenische Mutationen, die eine Veränderung der Proteinstruktur bewirken. Eine solch tiefgreifende Modifikation kann durch einen einzelnen Nukleotid-Austausch erfolgen, wodurch das betroffene Codon eine neue Aminosäure kodiert. Eine solche Mutation bewirkt somit die Synthese eines veränderten Proteins (engl.: *missense mutation*). Eine besondere Form der *missense*-Mutation ist die Entstehung eines Stopp-Codons anstatt einer codierenden Aminosäure (engl.: *nonsense mutation*). So kommt es zum frühzeitigen Syntheseabbruch des kodierten Proteins (engl.; *truncation*). Eine andere Form dieser Mutationen sind Deletionen und Insertionen vereinzelter Nukleotide. Sie zerstören den Triplett-Codon-Takt der DNA und verschieben somit das normale Leseraster der DNA-Transkription (engl.: *frame shift*), wodurch das kodierte Protein eine völlig neue Struktur bekommt.¹⁷

1.3.2 Ultra-violette Strahlung als Auslösefaktor intragenischer Mutationen

Grundlegend sind zwei Bestandteile des UV-Lichts zu unterscheiden, die kurzen (Wellenlänge 290 - 320 nm) UV-B-Strahlen, welche vor allem direkte Schäden der DNA verursachen und lange UV-A-Strahlen (Wellenlänge 320 - 400 nm), die zum einen über aktive Sauerstoffradikale die DNA schädigen und zum anderen immunsuppressiv wirken. Die direkte UV-B-Einwirkung betrifft überwiegend die Pyrimidinbasen Thymin und Cytosin, die nebeneinander innerhalb eines DNA-Stranges liegen (C-C, T-T, C-T und T-C). Man spricht dabei von den so genannten „hot spots“ für UV-induzierte DNA-Schäden und Mutationen.^{18,19} Es kommt zur Ausbildung von UV-typischen Dimeren (s.g. Photoprodukten.). Solche Photoprodukte werden von der DNA-Polymerase falsch erkannt, was im neu synthetisierten DNA-Strang zu einer C-zu-T-Transition führt. Somit besteht die Möglichkeit UV-induzierte Mutationen molekulargenetisch zu erkennen.

1.3.3 Onkogene und Tumorsuppressorgene in der Karzinogenese

Als Tumorsuppressorgene werden Gene bezeichnet, deren Produkte die unkontrollierte Teilung genomisch geschädigter Zellen durch z.B. Zellarrest oder Induktion der Apoptose unterdrücken. Dadurch verhindern sie die Entstehung von Tumoren. Genprodukte der Tumorsuppressorgene sind unter anderem p53, p21, p16, BAX, oder das Rb-Protein.

Im Gegensatz zu den Tumorsuppressorgenen werden Onkogene in dysplastischen Zellen exprimiert und fördern somit die Tumorentwicklung. Solche Gene sind in Form von Proto-onkogenen ubiquitärer Bestandteil einer gesunden Zelle und meistens an der Regulation deren Wachstums und Proliferation beteiligt. Durch Mutationen kann ein Gen verändert werden und anschließend zum unkontrollierten Zellwachstum und Proliferation einer Zelle führen

(Wachstumsfaktoren, Ras-Protoonkogene, Tyrosinkinase, nukleäre Transkriptionsfaktoren).²⁰

Aufgrund ihrer Relevanz in den AK und des Schwerpunktes dieser Arbeit sollen zwei Vertreter dieser Gene genauer beschrieben werden: das Tumorsupressorgen TP53 und das Onkogen Ha-*ras*.

1.3.3.1 Das Tumorsupressorgen TP53

Das Gen TP53, genauer gesagt das von ihm kodierte Protein p53, reguliert als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion der Apoptose (des programmierten Zelltods) oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Aufgrund dieser zentralen Eigenschaften wird p53 in der Literatur als ‚Wächter des Genoms‘ bezeichnet.²¹

Das TP53 liegt auf dem Chromosom 17p13 und ist ca 20 kB groß. Es besteht aus 11 Exons, die für 393 Aminosäuren kodieren. Das aktive Protein ist ein Tetramer, das aus vier einzelnen 53 kDa großen Phosphoproteinen gebildet wird. Jedes dieser Phosphoproteine besteht aus mehreren funktionellen Domänen: einer DNA-Bindungs-, einer Transkriptionsaktivierungs- und einer Tetramerisierungsdomäne. Auf der Nukleotidebene des TP53-Gens finden sich zudem fünf hoch konservierte Sequenzabschnitte, die eine sehr hohe Übereinstimmung unter vielen Spezies zeigen.²² Die meisten der im Tumorgewebe gefunden Mutationen waren in diesen hoch konservierten Regionen lokalisiert.²³ (**Abbildung 1-2**)

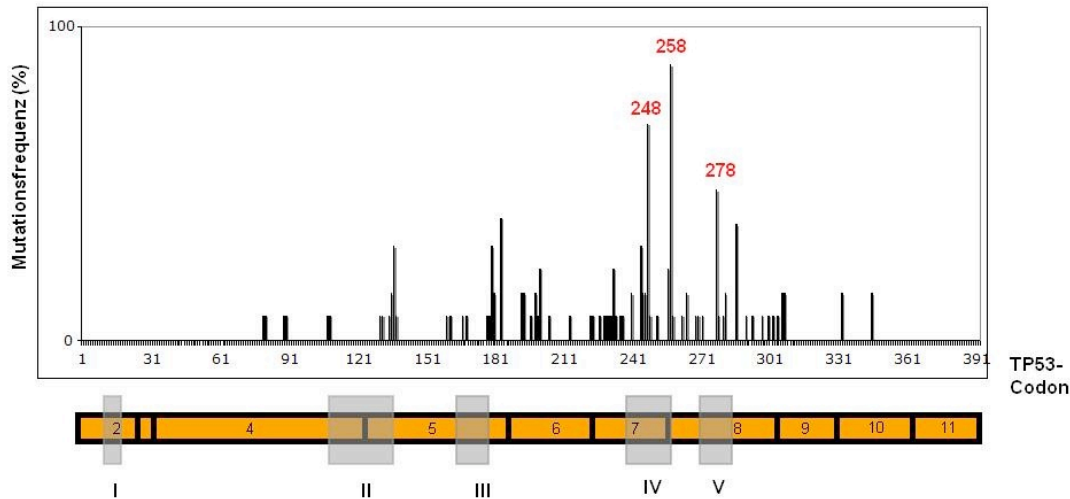


Abbildung 1-2: Mutations-, „hot spots“ des TP53-Gens in 132 aktinischen Keratosen. Unten - die TP53-Struktur (Exons 2-11, hoch konservierte Sequenzabschnitte I-V); oben - Mutationshäufigkeiten des jeweiligen TP53-Codons (1-393). Modifiziert aus „The UMD p53 database“, Linn Hjortsberg and Thierry Soussi (<http://p53.free.fr>).

Mutationen des TP53-Gens in menschlichen Hauttumoren sind seit langem bekannt.^{23,24} Speziell in PEK ist das TP53 in bis zu 90% der Läsionen mutiert.²⁵⁻²⁷ In AK variiert die Mutationsrate zwischen 11 und 48%.^{28,29} Diese überwiegend UV-spezifischen (C zu T oder CC zu TT) Mutationen sind vor allem in den hoch konservierten Regionen der Exons 7 und 8 (Codons 248, 258, 278) gefunden worden.^{19,23,30}

1.3.3.2 Das Onkogen Ha-ras

Die Gene der *ras*-Familie - Ha-(Harvey)-*ras*, N-(Neuroblastoma)-*ras* und K-(Kirsten)-*ras* - sind Proto-Onkogene. Sie bestehen aus 4 Exons und kodieren 189 Aminosäuren lange Proteine. Das Ha-*ras* Protein liegt gebunden an das Guanosindiphosphat (GDP) an der Innenseite der Zellmembran. Im aktivierten Zustand kann es durch eine Kaskade von intrazellulären Reaktion die Proliferation und den Wachstum der Zelle stimulieren.^{31,32}

In ca. 20% der menschlichen Tumore wurde mindestens eine Mutation im *ras*-Gen gefunden.³³ Vergleichsuntersuchungen an benignen und malignen Hauttumoren zeigten, dass die Mutationen zum Zeitpunkt der Tumorinitiation (erstes Stadium der Karzinogenese), allerdings kaum eine Rolle in seiner Progression spielen.³⁴ Mutations-, „*hot spots*“, die für eine Aktivierung des Onkogens verantwortlich sind, liegen im Exon 1 (Codon 12 und 13) und im Exon 2 (Codon 61).²⁰ Eine Vielzahl von Studien zeigten kontroverse Ergebnisse bezüglich der Mutationsrate von Ha-*ras* im kutanen PEK des Menschen. Die meisten Studien deuten hier auf eine geringe Mutationsrate des Onkogens hin.³⁵⁻³⁷ Zwei unabhängige Studien berichten über Guanin (G) zu Thymin (T) Basenaustausche in der zweiten Position des Codons 12 (Exon1) in 46% der 24 untersuchten PEK.^{38,39}

1.4 Therapieoptionen der AK

Zur Behandlung der AK steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung. Bei der Entscheidung für die jeweilige Behandlungsoption spielen die Ausdehnung und die Lokalisation der AK, die individuelle Anamnese des Patienten und nicht zuletzt seine „*Compliance*“ (engl.: das kooperative Verhalten des Patienten im Rahmen einer Therapie) eine Rolle. Bei der Beurteilung der Tumorausdehnung sollte man sich nicht allein auf die klinisch sichtbaren Läsionen beschränken. Neueren Untersuchungen zufolge geht man auch bei AK von einer multifokalen Tumorentstehung innerhalb eines bestimmten Areals aus.⁴⁰ Dieses Phänomen der Flächenentartung (engl.: *field cancerization*) wurde primär im Zusammenhang mit dem oralen PEK 1953 von Slaughter *et al.*⁴¹ beschrieben und stellt eine besondere Herausforderung für die Therapie der AK dar.

Die große Methodenvielfalt kann nach ihrem Wirkprinzip in physikalische (z.B. CO₂-Laser, Kryotherapie, chirurgische Exzision großer Läsionen), lokale medikamentöse (z.B. 5-

Fluoruracil, Diclofenac und Imiquimod) und kombinierte Verfahren (z.B. Photodynamische Therapie mit Aminolävulinsäure) unterteilt werden. An das Design dieser Studie anlehnd soll im folgenden Abschnitt auf drei der am häufigsten verwendeten Therapiemethoden genauer eingegangen werden.

1.4.1 Kryotherapie

Bei der Kryotherapie handelt es sich um das international am häufigsten eingesetzte Verfahren zur Behandlung von AK. Die Kryotherapie kann sowohl im so genannten Kontakt-Verfahren bei wenigen, als auch im „offenen Sprayverfahren“ bei multiplen, flächenhaften Läsionen eingesetzt werden. Üblicherweise wird flüssiger Stickstoff mit einer Temperatur von -196°C als Kühlelement verwendet. Das Wirkprinzip beruht auf einer unspezifischen Destruktion sowohl Tumor- als auch normaler Zellen der Umgebung.⁴² Durch eine schnelle Einfrierung werden dabei aufgrund ihres hohen Wassergehaltes überwiegend Zellen angegriffen, Bindegewebsstrukturen bleiben erhalten. Im Rahmen der AK-Behandlung kann damit selektiv die befallene Epidermis zerstört werden, anschließend erfolgt eine Reepitelisierung aus der Tiefe der Haarfollikel.⁴³ Bis jetzt gibt es keine Standardisierung weder für die Anzahl und Dauer der Anwendungen, noch für die optimale Temperatur speziell für Behandlung der AK. Die Entscheidung wird letztendlich vom behandelnden Arzt aufgrund seiner klinischen Erfahrung getroffen.

Die Heilungsraten nach erfolgter Kryotherapie variieren zwischen 75% und 98%.^{44,45} Die Rezidivraten liegen zwischen 1% und 12% innerhalb einer 12-monatigen Nachbeobachtungszeit.⁴⁶ Trotz häufiger Anwendung gibt es kaum histologisch kontrollierte Studien zur langfristigen Effektivität von Kryotherapie.

Während und nach der Therapie können ausgeprägte Schmerzen, Rötung, Ödem- und Blasenbildung auftreten. Als negative Effekte werden zudem Hyper- und vor allem Hypopigmentierungen beobachtet.⁴⁷

1.4.2 5-Fluoruracil

Das Wirkstoff 5-Fluoruracil (5-FU) ist ein Pyrimidinanalogon, welches die DNA-Synthese hemmt und somit direkt die Zellteilung beeinflusst. Dabei interferiert 5-FU mit der Synthese von DNA und RNA (engl.: *ribonucleic acid*) über die Hemmung der Thymidylsynthetase.^{48,49}

Zur Behandlung von AK stehen 5-FU-Cremes mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen zur Verfügung. Bislang war der Einsatz 5%iger Lösungen üblich.^{50,51} Neuere Studien zeigten, dass eine 0,5%ige 5-FU-Lösung für eine lokale AK-Therapie zu vergleichbaren Ergebnissen führt wie 5%ige Präparate.^{52,53}

Üblicherweise wird 5-FU zweimal täglich auf die betroffenen Hautstellen aufgetragen, meistens über einen Zeitraum von zwei bis vier Wochen. Der Wirkmechanismus von 5-FU ist unspezifisch, daher wird neben den Tumorzellen auch gesundes Gewebe in ihrem Wachstum beeinträchtigt. Dies führt des Öfteren zu Hautentzündungen mit Erythemen, Trockenheit, Juckreiz, Brennen und Schmerzen sowie Erosionen, gegebenenfalls Ulzerationen. Die unerwünschten Reaktionen korrelieren mit der Ausprägung der aktinischen Schädigung und limitieren somit die Anwendung von 5-FU. Die Abheilungsrate liegt bei etwa 50% und Rezidive treten in bis zu 55% nach einer Anwendung bei AK auf.^{53,54}

1.4.3 Imiquimod

Imiquimod ist ein Vertreter der so genannten „*Immune Response Modifier*“ (IRMs). Es ist ein Immunmodulator, der an dem Toll-like-Rezeptor 7 (TLR7) antigen-präsentierender Zellen bindet und das zelleigene Immunsystem aktiviert. Dies führt zu einer Transkriptionsaktivierung im Zellkern, wodurch vermehrt Interferon alpha (IFN α), Tumornekrosisfaktor alpha (TNF α), sowie Interleukine (IL) IL-1, 6, 8, 12 und andere Zytokine synthetisiert und freigesetzt werden. Dadurch hat Imiquimod antivirale und immunmodulierende Wirkungen.⁵⁵ Aufgrund dieser Wirkungsart treten während einer Behandlung mit Imiquimod unterschiedlich starke lokale Irritationen in den Behandlungsarealen auf, die zu einem Erythem, gelegentlich sogar zu einer Erosion und Ulzeration führen, und Hypo- und Hyperpigmentierungen hinterlassen können.

Bis vor kurzem wurde Imiquimod in Deutschland nur für die Therapie von Condylomata acuminata zugelassen. Seit November 2006 ist der Immunmodulator auch für die Behandlung von AK zugelassen.

In zwei Studien wurde Imiquimod bei AK dreimal wöchentlich für die Dauer von 16 Wochen verwendet und anschließend erfolgte eine histologische Kontrolle der Therapieerfolge. Es zeigten sich vollständige Abheilungen zwischen 45% bis 84% der behandelten Patienten. Die Rezidivrate betrug 10% innerhalb eines einjährigen und 20% eines zweijährigen Beobachtungszeitraumes.^{56,57}

1.5 Herleitung einer Aufgabenstellung

Aufgrund der hohen Prävalenz der AK und vor allem der Entartungsrisikos, sind AK ein sehr aktuelles Forschungsgebiet. Im Vordergrund steht hier die Suche nach einer optimalen Behandlungsmethode. Neben einem langfristigen Abheilungseffekt sollte diese gut verträglich sein. Die Therapiewahl der AK ist vielfältig - eine Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile ist bislang durch Studien nicht ausreichend belegt worden.

Das vorrangige Ziel des klinischen Teils dieser Studie war es die drei am häufigsten verwendete AK-Therapiemethoden auf ihre kurz- und langfristige Effektivität zu untersuchen: Kryotherapie und topische Behandlungen mit 5-Fluoruracil bzw. 5%ige Imiquimod-Creme.

Ferner sind auch weitere Erkenntnisse über die Entstehung der AK beziehungsweise deren Übergang in ein invasives PEK erforderlich. Die Tatsache, dass nur ein Teil der AK im Verlauf in ein invasives PEK übergeht lässt vermuten, dass bestimmte Mutationen am Progressionsverhalten beteiligt sein könnten. Bislang wurde eine hohe Mutationsrate von TP53 und Ha-*ras* in invasiven PEK gefunden. Ob diese bereits in frühen Stadien des Tumors bestehen oder erst in höhergradig entarteten Läsionen entstehen war zum Zeitpunkt dieser Arbeit unbekannt.

Zusammenfassende Fragestellungen der Arbeit:

- Lässt sich eine Therapieoption der ersten Wahl für AK definieren?
- Sind Mutationen im TP53 und Ha-*ras*-Genen bereits in frühen Stadien der PEK nachweisbar?
- Haben die jeweiligen Therapiemethoden der AK evtl. Einflüsse auf die Mutationsrate der Gene TP53 und Ha-*ras*?

2 *Material und Methoden*

Allgemein

Zur besseren Verständlichkeit der Studiengestaltung sollen 2 wesentliche Teile der Arbeit unterschieden werden: ein klinischer und ein experimenteller Teil. Der klinische Teil beinhaltet das Patientenkollektiv, das abhängig von der eingesetzten Therapie in 3 Gruppen aufgeteilt wurde. Hier wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Behandlungserfolg auf klinischer und histologischer Ebene evaluiert. Der experimentelle Abschnitt umfasst eine molekularbiologische Analyse von Marker-Genen aus den im Rahmen des klinischen Teils gewonnenen Hautproben. Beide Teile wurden parallel durchgeführt und anschließend sowohl einzeln als auch gemeinsam ausgewertet.

2.1 *Klinischer Teil*

Im klinischen Abschnitt dieser Doktorarbeit wurde eine s.g. „*single center, open label, 3-arm-randomized study*“ durchgeführt.

2.1.1 *Studienpopulation*

Insgesamt 75 Patienten (Hauttyp I bis III, nach Fitzpatrick⁵⁸) wurden im Zeitraum vom August 2004 bis Februar 2005 in die Studie miteinbezogen. Die klinische Betreuung der Patienten erfolgte vom Ärzteteam der Arbeitsgruppe von Prof. Eggert Stockfleth (HTCC – Hauttumorzentrum Charité) im Rahmen der photodermatologischen Sprechstunde. Die

Teilnahme an der Studie setzte eine Volljährigkeit der Patienten und die Einwilligung zu den im Rahmen der Studie geplanten therapeutischen Maßnahmen voraus. Alle Patienten hatten mindestens 5 sichtbare und histologisch bestätigte AK-Läsionen in einem auf 5 x 10 cm begrenzten Bereich (5 x 20 cm) am Kopf, Hals oder Dekolleté nachzuweisen. Darüber hinaus wirkten folgende Ausschlusskriterien:

- vorhergehende (weniger als 4 Wochen) Behandlung mit Immunomodulatoren, Interferon oder Interferon-Induktoren, zytotoxischen oder Immunsystemhemmenden Medikamenten, Kortikosteroiden, Retinoiden, oder den zu untersuchenden Medikamenten
- jede andere Behandlung von AK weniger als 2 Wochen vor Studienbeginn
- invasive Tumoren innerhalb des behandelten Areals (z.B. PEK)
- Patienten mit kardiovaskulären, hämatologischen, hepatischen, neurologischen, renalen, endokrinen, vaskulären oder gastrointestinalen Erkrankungen
- aktuell vorhandene dermatologische Erkrankungen innerhalb des Behandlungsareals oder anliegend (3 cm Abstand) oder bekannte Hypersensibilität auf Bestandteile der in der Studie angewandten Behandlungen

Alle Protokolle und Patienteninformationen, einschließlich der Einwilligungserklärungen wurden vor dem Studienbeginn von der Ethikkommission der Universitätsklinik Charité, Berlin überprüft und bewilligt (Nummer Si. 248).

2.1.2 Studiendesign

2.1.2.1 Screening-Visite und Therapiebeginn

Zum Studienbeginn wurden im Rahmen einer Screening-Visite eine allgemeine Anamnese und klinische Untersuchung der Studienteilnehmer durchgeführt und Vitalparameter gemessen

(Blutdruck, Puls und Temperatur). In die Studienakten der Patienten wurde die gesamte Krankengeschichte, einschließlich der Atopie- und Genussmittelanamnese, und vorhergehender Behandlungen der aktinischen Keratosen dokumentiert. Anschließend wurde der Zeitplan der Behandlung festgelegt und jeder Teilnehmer unterschrieb eine Einverständniserklärung.

Das Behandlungsareal (BA) wurde als eine kohärente, 5 x 10 cm große Fläche auf sonnenexponierter Haut mit mindestens 10 sichtbaren AK-Läsionen definiert (Abbildung 2-1: **Behandlungsareal**). Genaue Lokalisation jeder Läsion wurde auf anlegbaren gerasteten Folien (Bodycharts) fotodokumentiert. Unmittelbar vor dem Therapiebeginn wurde eine 4-mm Stanzbiopsie (erste Stanzbiopsie) einer der im Behandlungsareal gelegenen AK-Läsionen entnommen und zweigeteilt. Die eine Hälfte diente der histologischen Kontrolle der klinischen Diagnose einer aktinischen Keratose. Die Evaluation der Hämatoxylin-/Eosin-gefärbten Gewebeschnitte erfolgte durch zwei unabhängige Histologen. Die andere Hälfte wurde zusammen mit einer weiteren Stanzbiopsie (zweite Stanzbiopsie) von gesunder nicht sonnenexponierter Haut im Unterarmbereich im molekulargenetischen Labor auf Mutationen untersucht (siehe Abschnitt „Molekulargenetisches Studiendesign“).



Abbildung 2-1: Behandlungsareal

Anschließend wurden die Teilnehmer bezüglich ihrer Therapie aufgeklärt und darauf hingewiesen 24 Stunden vor jedem Evaluierungstermin keine Sonnenschutzmittel oder Feuchtigkeitscremes auf das Behandlungsareal aufzutragen.

Die erste Cremeapplikation (5-FU und Imiquimod) beziehungsweise die erste Kryotherapie-Anwendung wurde unter der Aufsicht vom Studienarzt durchgeführt .

Die Behandlungsschemata der Kryotherapie und 5-FU-Gruppen basierten jeweils auf der maximal empfohlenen und erprobten Dosis.

2.1.2.2 Therapieprotokoll

Die weitere Studienplanung unterschied sich abhängig von der Zugehörigkeit zu den 3 Behandlungsgruppen (Abbildung 2-2). Die Zuteilung erfolgte in Form einer telefonischen Randomisierung, durchgeführt von einem externen spezialisierten Unternehmen.

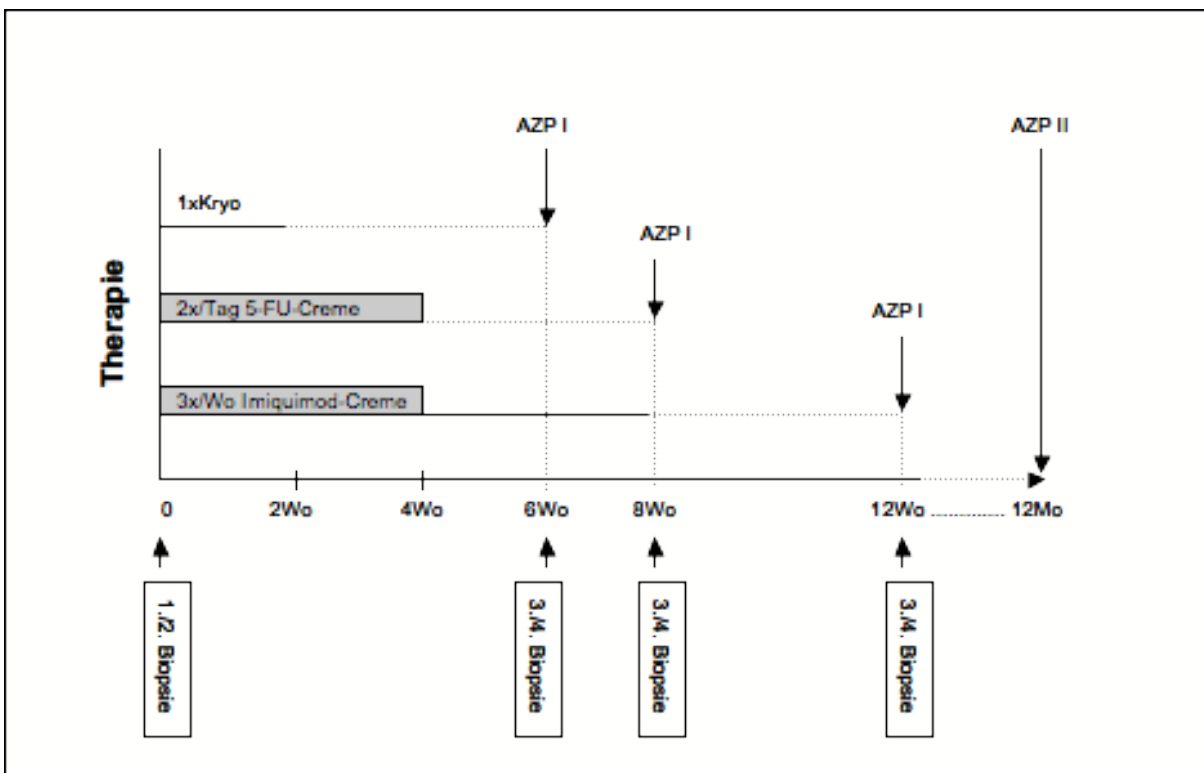


Abbildung 2-2: Studienprotokoll im zeitlichen Ablauf. Horizontale Darstellungen: Kästchen - unmittelbare Therapieanwendungszeit; ganze Linie - Pause nach einer Therapie bis zum eigentlichen Behandlungsende (2 Wochen nach Kryotherapie, 4 Wochen nach letzter Imiquimod-Applikation, in der 5-FU-Gruppe wurde keine Therapiepause eingelegt), gestrichelte Linie – jeweils vier Wochen Beobachtungszeitraum nach Therapieende bis zum ersten AZP (AZP I), Boxen – Biopsieentnahme zur histologischen Diagnosesicherung und molekularbiologische Untersuchungen.

Tabelle 2-1: Erläuterung der einzelnen Stanzbiopsien

Stanzbiopsie (Nr.)	Klinische Einteilung	Zeitpunkt der Entnahme
1	Klinisch diagnostizierte AK aus dem BA	Screening-Visite
2	Normalhautgewebe aus Nicht-Sonnenexponierter Haut des Oberarmes	Screening-Visite
3	Klinisch abgeheilte AK im BA	AZP I
4	Klinisch nicht abgeheilte AK im BA	AZP I

Abkürzungen: AK – aktinische Keratose, BA – Behandlungsareal, AZP I - Auswertungszeitpunkt I;

2.1.2.2.1 Kryotherapie-Gruppe

Hier wurde jede einzelne Läsion im Behandlungsareal mittels Kryospray im geschlossenen Kontaktverfahren (flüssiger Stickstoff, -196°C) 20-40 Sekunden lang behandelt. Nach zwei Wochen wurde das Ergebnis beurteilt. Verblieben klinisch nicht abgeheilte Läsionen im Behandlungsareal, so wurde die Vereisung wiederholt und nach zwei Wochen Pause erneut evaluiert. Damit war nach maximal vier Wochen die Therapie in dieser Gruppe abgeschlossen.

2.1.2.2.2 5-FU Gruppe (5-FU)

Während des Behandlungszeitraums wurde 5%ige 5-FU Creme (Efudix-Creme®, ICN Pharmaceuticals Ltd, Basingstoke, UK) zweimal täglich vier Wochen lang vom Patienten selbst aufgetragen. Im Falle einer ausgeprägten Entzündungsreaktion konnte eine Therapiepause von bis zu einer Woche eingelegt werden.

2.1.2.2.3 Imiquimod-Gruppe (I)

Patienten dieser Gruppe applizierten die 5%ige Imiquimod-Creme (Aldara, 3M Healthcare Ltd, Loughborough, UK) über Nacht (für acht Stunden) dreimal die Woche vier Wochen lang. Dabei wurde eine vom Hersteller auf 0,25 g Creme dosierte Portionspackung verbraucht. Den vier Wochen Behandlungszeit folgten vier Wochen Pause, und insgesamt nach acht Wochen ab Behandlungsbeginn erfolgte die erste Evaluation. War die Abheilung nach den ersten acht Wochen nicht zufrieden stellend, so wurde der 4- plus 4-Wochenzyklus wiederholt. Nach maximal 16 Wochen war die Behandlung beendet. Im Falle einer akuten Entzündungsreaktion konnte, wie auch in der 5-FU-Gruppe, eine Behandlungspause von bis zu einer Woche eingelegt werden.

2.1.2.3 Auswertungszeitpunkte

Die erste datenrelevante Evaluierung der Therapieerfolge im Behandlungsareal wurde in allen drei Gruppen zum Auswertungszeitpunkt I (AZP I) vier Wochen nach Behandlungsende (sechs Wochen nach letzter Kryotherapie, vier Wochen nach letzter 5-FU- und acht Wochen nach letzter Imiquimod-Applikation) durchgeführt. Auch hier wurden Stanzbiopsien aus abgeheilten (dritte Stanzbiopsie) und klinisch nicht abgeheilten Läsionen (vierte Stanzbiopsie) entnommen und in zwei Schritten untersucht: histologisch zur Diagnosesicherung und molekulargenetisch zur Kontrolle eventuell vorhandener behandlungsabhängiger Mutationen in den Markergenen.

Zwölf Monate nach der ersten Auswertung (Auswertungszeitpunkt II, AZP II) wurde die langfristige Abheilung in den Behandlungsarealen klinisch untersucht.

2.1.3 *Evaluierungskriterien*

2.1.3.1 **Therapieerfolg**

Primäres Evaluierungskriterium im Behandlungserfolg war die komplette Abheilung der Läsionen im Behandlungsareal zu den zwei AZP (I und II). Dieser wurde definiert als die Abwesenheit klinisch erkennbarer aktinischer Keratosen im Behandlungsareal. Jede klinische Diagnose wurde anschließend histologisch kontrolliert.

Zum AZP II erfolgte eine zweite klinische Evaluierung der Behandlungsareale, deren primäres Ziel das Erfassen rezidivfreier Fälle war. Dabei gab es aufgrund der unterschiedlichen Therapieeigenschaften in den einzelnen Gruppen zwei Herangehensweisen. Zum einen wurde die Tatsache berücksichtigt, dass Kryotherapie eine punktuelle Behandlung ist. Dazu wurden einzelne AK-Läsionen auf Rezidive kontrolliert. Zum anderen sollte aber auch das gesamte Behandlungsareal auf eine anhaltende Abheilung der aktinischen Keratosen überprüft werden. Somit konnte der flächendeckende Effekt von 5-FU und Imiquimod erfasst werden. Aufgrund dieser zwei Herangehensweisen wurden anschließend auch zwei unterschiedliche langfristige Therapieerfolge ermittelt: der tatsächliche Läsions- bzw. Arealtherapieerfolg (LTE, bzw. ATE). Der anschließende Vergleich der Ergebnisse in allen drei Gruppen erfolgte anhand beider Werte.

2.1.3.2 **Kosmetischer Erfolg**

Der kosmetische Erfolg der Behandlungen wurde zu den beiden AZP sowohl vom Studienarzt als auch vom Patienten beurteilt. Hierbei wurden Narbenbildung, Atrophien, Induration und Pigmentveränderungen im Vergleich zur normalen, nicht behandelten Haut berücksichtigt. Das Ergebnis wurde als exzellent eingestuft, wenn keine Unterschiede zur gesunden Haut bestanden. Gutes kosmetisches Ergebnis ließ eine moderate Rötung oder Pigmentveränderung zu, während zusätzliche leichte bis moderate Narbenbildung, Atrophie oder Induration für ein ausreichendes

Ergebnis sprachen. Ausgeprägte Narbenbildung, Atrophie und Indurationen im Behandlungsareal belegten ein schlechtes kosmetisches Ergebnis.

2.2 Molekularbiologischer Teil

2.2.1 Grundlagen der Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion, allgemein mit PCR (engl. *polymerase chain reaction*) abgekürzt, wurde 1987 von Kary B. Mullis entwickelt (Mullis & Faloona, 1987). Durch stetige Weiterentwicklung ist sie heute eine vielseitig eingesetzte Methode zur *in vitro* Amplifikation von Nukleinsäuremolekülen. Mit Hilfe dieser Technik kann eine bekannte Nukleotidsequenz selektiv und schnell in großen Mengen aus jeder DNA, in der sie enthalten ist, repliziert werden. Dafür wird die DNA-Matrize mit zwei Startermolekülen (Start-Oligonukleotide, engl.: *primer*), die beide Seiten des Abschnitts flankieren (F- und R-Primer entsprechend ihrer Komplementarität am 3' bzw. 5'-Ende des DNA-Stranges), sowie die vier verschiedenen Desoxynukleosid-Triphosphate mit den Basen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G), und Thymin (T) benötigt. In einer chemischen Reaktion, die allein durch eine zyklische Temperaturänderung gesteuert wird, baut eine thermostabile DNA-Polymerase aus den oben aufgeführten Komponenten zur DNA-Vorlage komplementäre Stränge auf. In etwa 30–50 Wiederholungen werden drei Temperaturschritte nacheinander durchgeführt, die zur exponentiellen Vermehrung des DNA-Abschnittes führen: Denaturierung des Doppelstrangs (bei mehr als 90°C); Hybridisierung der spezifischen Oligonukleotide (engl.: *annealing*, erfolgt sequenzabhängig bei 35–65°C); Verlängerung der Oligonukleotide komplementär zur gebundenen DNA-Vorlage (engl.: *elongation*, abhängig von der verwendeten Polymerase; bei etwa 70°C).

2.2.2 Die DNA-Isolation

Nach Entnahme wurden die Biopsate sofort in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur DNA-Isolation bei –80°C aufbewahrt. Die DNA-Isolation wurde mittels QIAamp DNA-Mini-Kit (QIAGEN; Hilden, Deutschland) nach Herstellerangabe durchgeführt.

Unmittelbar vor der Isolation wurden 5-10 mg der Biopsat-Menge entnommen, zerkleinert und in ein 1,5 ml großes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 180 µl ATL Puffer (QIAGEN) wurden das Gewebe im Ultraschallbad für 30 min bei 50% Aktivität aufgeschlossen. Anschließend wurde die Probe mit 20 µl Proteinase K (QIAGEN) versetzt und die Zellen mindestens 3 Stunden im Thermoschüttler bei 56°C lysiert. Das Lysat wurde mit 200 µl Buffer AL (QIAGEN) versetzt und die Proteinase K wurde in einem Inkubationsschritt für 10 min bei 70°C inaktiviert. Nach einer Zugabe von 200 µl absoluten Ethanol wurde das gesamte Volumen (ca. 600 µl) einschließlich Präzipitat auf eine DNA-bindende Säule (QIAamp spin column, QIAGEN) gegeben und 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert, Das Filtrat wurde verworfen, und die auf der Säule gebundene DNA in zwei Schritten mit Puffer (AW1, AW2; QIAGEN) gewaschen. Anschließend wurde die DNA durch 2 Elutionsschritte (je 50 µl) extrahiert. Von den gewonnenen 100 µl DNA-Lösung wurden für die nachfolgenden Experimente 2-10 µl eingesetzt. Die isolierte DNA wurde bei -20°C gelagert. Der Erfolg der DNA-Isolation wurde mittels einer β -Globin-PCR überprüft.

2.2.3 Analyse der Markergene mittels Polymerase-Kettenreaktion

Im molekularbiologischen Teil dieser Arbeit wurden zwei tumorrelevante Markergene aus den im klinischen Teil der Studie gewonnenen Hautproben auf Mutationen analysiert. Mittels PCR (*engl.: polymerase chain reaction*) wurden die entsprechenden DNA-Bereiche der Normalhaut- und AK-Biopsate amplifiziert. Anschließend wurden die PCR-Produkte sequenziert und auf Mutationen geprüft. Dabei wurde auf Punktmutationen geachtet, die in informationskodierenden Gen-Abschnitten (Exons) lagen. Diese wurden dann auf ihre Relevanz für die Aminosäuresequenz im entsprechenden Protein überprüft. Somit konnten *missense*- (Aminosäureaustausch), *nonsense*- (verursacht einen Stopp der Proteinsynthese) oder *silent*- Mutationen (gleiche Aminosäure) ermittelt werden. In der Endauswertung wurden lediglich die *missense*- und *nonsense*-Mutationen berücksichtigt.

2.2.4 PCR der Markergene

Für die Amplifizierung der Exons 7 und 8 des TP53-Gens bestand das finale PCR-Volumen (50 µl) aus 1 µmol/L von jedem genspezifischem Primer (Tabelle 2-3) 50 µmol/L dNTPs, 1,5 mmol/L MgCl₂ in 1 x PCR Puffer (QIAGEN), 0,25 Einheiten Taq Polymerase (QIAGEN) und 1 µL der zu untersuchenden DNA.

Ha-*ras*-Gen Exon 1 wurde im finalen PCR-Volumen von 50 µl amplifiziert, dass wie folgt zusammengesetzt wurde: 0,2 µmol/L des gen-spezifischen Primers, 100 µmol/L dNTPs, 1 mmol /L MgCl₂ in 1 x PCR Puffer (Applied Biosystems), 2,5 Einheiten AmpliTaqGold Polymerase (Applied Biosystems) und 1 µL genomischer DNA. Da die Produktmenge aus der ersten PCR nicht ausreichend für die weitere Analyse war, wurde eine zweite PCR mit je 1 µL Amplifikationsprodukt der ersten PCR durchgeführt (Re-PCR).

Beide PCR-Reaktionen liefen unter den in der Tabelle 2-2 aufgeführten Bedingungen im Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg).

Tabelle 2-2: Temperaturprotokoll für Marker-Gene-PCR TP53 und Ha-*ras*

PCR-Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (Sekunden)	N (Zyklen)
Initiale Denaturierung	94	240	1
Denaturierung	94	45	} 40
Hybridisierung	64	45	
Elongation	72	45	
Finale Elongation	72	4	1

Tabelle 2-3: Primer der Mutationsanalyse der Marker-Gene

Gen/Exon	Sequenz	Amplikonlänge
TP53/ exon 7		
Exon7-F	CTT GCC ACA GGT CTC CCC AA	248 bp
Exon7-R	AGG GGT CAG CGG CAA GCA GA	
TP53/ Exon 8		
Exon8-F	TTG GGA GTA GAT GGA GCC T	313 bp
Exon8-R	AGA GGC AAG GAA AGG TGA TA	
Ha-ras/ Exon 1		
HR-2-F	GGC AGG TGG GGC AGG AGA CC	191 bp
Ex1R	TGG ACG GCG GCG CTA G	

Abkürzungen: bp – Basenpaar

2.2.5 DNA-Sequenzierung

Jedes PCR-Produkt wurde unter Anwendung entsprechender gen-spezifischer Primer durch die Firma AGOWA Genomics (Berlin, Deutschland) sequenziert. Dies erfolgte mittels ABI PRISM 310 Genetic Analyse unter Anwendung eines DNA-Sequenzierungs-Kit (beides Applied Biosystems, Carlsbad, USA). Die erhaltenen Sequenzen wurden unter Anwendung des Computerprogramms Se-Al v2.0a72 mit entsprechenden Gen-Prototypen der NCBI GeneBank verglichen (AF307851 für TP53, NM_176795 für Ha-ras).

Jede Mutation wurde erneut mittels Re-PCR und Re-Sequenzierung bestätigt.

2.2.6 Mikrodissektion ausgewählter Gewebeproben

Zur Kontrolle der Aussagekraft der im Rahmen der Studie erhaltenen Mutationsergebnisse wurden Mikrodissektionen einzelner Gewebeproben durchgeführt. Damit sollten pathologisch veränderte Zellen in aktinischen Keratosen möglichst von den normalen separiert werden.

Anschließend erfolgte eine erneute molekulargenetische Untersuchung der pathologischen Gewebebestandteile. Die Ergebnisse wurden dann mit denen aus den Gewebeproben verglichen.

2.3 Statistische Methoden

Die statistische Analyse wurde mittels Chi-Quadrat-Test und im Falle einer Häufigkeit von kleiner als 5 mit dem Fisher-Exact-Test vorgenommen. Bei einem p-Wert $< 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $< 5\%$) wurde das Ergebnis als signifikant gewertet. Zur Beurteilung der Aussagekraft klinischer Diagnosen wurde der negative prädikative Wert (NPW) berechnet. Dieser Wert zeigt die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Test falsch negativ ausfallen könnte und wurde in der Studie als das Verhältnis histologisch gesicherter Abheilungen zu den klinisch diagnostizierten berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Klinischer Teil

3.1.1 Studienpopulation und eingehende Charakteristika

In die Studie wurden 62 männliche und 13 weibliche PatientInnen im Alter zwischen 57 und 88 Jahren (Durchschnittsalter 73 Jahre) eingeschlossen. Infolge einer telefonischen Randomisierung wurden 25 Patienten (33%) der Kryotherapie-, 24 Patienten (32%) der 5-FU- und 26 (35%) der Imiquimod-Gruppe zugeteilt. Die vorangegangene Screening-Visite ergab folgende bedeutende Anamneseergebnisse: 23 Patienten (31%) berichteten über Allergien (überwiegend das respiratorische System betreffend) und bei 44 Patienten (59%) erfolgte in der Vergangenheit bereits eine Behandlung der aktinischen Keratosen. Der Alkoholkonsum unter den Teilnehmern war mäßig, ein Nikotin- und Drogenabusus - selten. Bezüglich der Hauttypenverteilung nach Fitzpatrick hatten 14 PatientInnen den Hauttyp I, 28 PatientInnen hatten den Hauttyp II, 31 PatientInnen - Hauttyp III und ein Patient - Hauttyp IV. Die genaue Auflistung und Gruppenverteilung der grundlegenden Charakteristika sind in Tabelle 3-1 aufgeführt.

Die klinische Diagnose der im Behandlungsareal lokalisierten AK wurde in allen Fällen histologisch bestätigt. Alle einbezogenen Patienten haben die Studie abgeschlossen, bzw. den AZP I erreicht.

Tabelle 3-1: Basischarakteristika der Studienpopulation

	Kryotherapie	5-FU	Imiquimod
Teilnehmer	25	24	26
Alter (in Jahren)			
Mittelwert	72,1	70,4	70,8
SA	8,6	6,7	5,6
Median	70	72	68
Männer, n (%)	22 (85)	19 (79)	20 (80)
Fitzpatrick			
I, n (%)	5 (20)	7 (29)	2 (8)
II, n (%)	8 (32)	8 (33)	12 (46)
III, n (%)	12 (48)	8 (33)	12 (46)
IV, n (%)	0	1 (4)	0
AK-Läsionen im BA			
Mittelwert	7,9	8,3	7,9
Median	8	8,5	8
Min-Max	5-10	5-10	5-10
Mindestens eine vorherige AK- Therapie, n (%)	15 (60)	15 (63)	17 (65)

Abkürzungen: 5-FU - 5-Fluoruracil; SA - Standardabweichung; AK - aktinische Keratose; BA - , Behandlungsareal

3.1.2 Klinische Evaluierung

Zum AZP I waren in der Kryotherapie-Gruppe 68% (17 von 25) der Behandlungsareale frei von klinisch sichtbaren AK-Läsionen. Bei PatientInnen der 5-FU- bzw. Imiquimod-Gruppe zeigten 96% (23 von 24) bzw. 85% (22 von 26) klinisch eine Abheilung im Behandlungsareal (n.s.).

In der Imiquimod-Gruppe wurde in 23% (6 von 26) der Fälle die Therapie bereits nach dem ersten Zyklus (4 Wochen Imiquimod und 4 Wochen Pause) abgeschlossen. Dabei zeigten 5

dieser PatientInnen eine klinische Abheilung der Läsionen. In einem Fall wurde die weitere Behandlung vom Patienten abgelehnt.

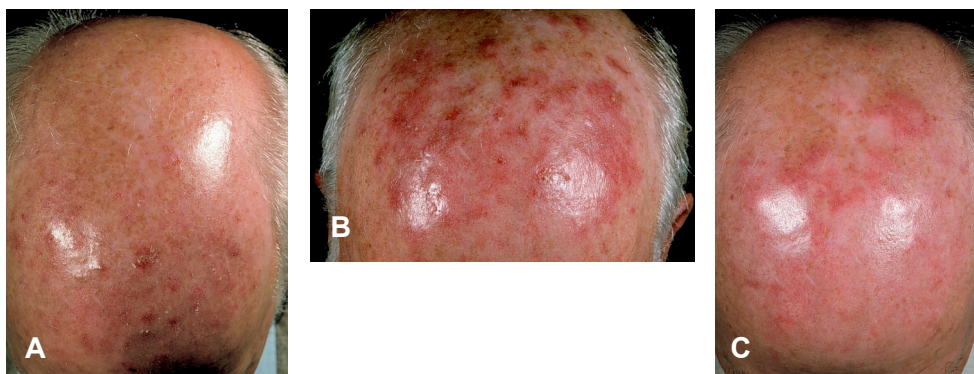


Abbildung 3-1: (A) Behandlungsareal mit multiplen AK vor einer Therapie; (B) Behandlungsareal nach 4 Wochen Imiquimod-Therapie (inflammatorische therapieunterstützende Reaktion im Behandlungsareal); (C) Behandlungsareal zum AZP I nach einer 2x4 wöchigen Therapie mit Imiquimod (klinisch abgeheilte AK im gesamten Behandlungsareal).

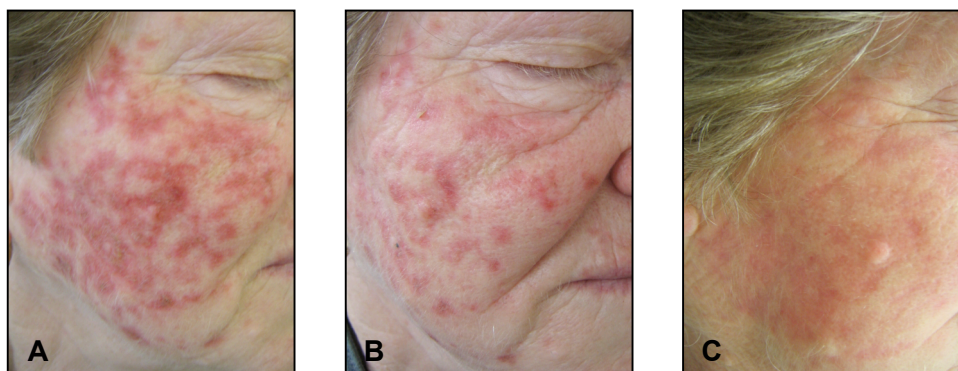


Abbildung 3-2: (A) Behandlungsareal mit multiplen AK vor einer Therapie; (B) Behandlungsareal nach 4 Wochen 5-FU-Therapie; (C) Behandlungsareal zum AZP I nach einer Therapie mit 5-FU (klinisch abgeheilte AK im gesamten Behandlungsareal).

3.1.3 Histologische Evaluierung

Die histologische Befundung der therapierten Läsionen ergab eine Abheilung von 32% (8 von 25) in der Kryotherapiegruppe, 67% (16 von 24) in der 5-FU- und 73% (19 von 26) in der Imiquimod-Gruppe (für Kryotherapie und Imiquimod $p < 0,01$, Kryotherapie und 5-FU $p < 0,05$).

Damit wurde bei 32% (8 von 25) der Kryotherapie-PatientInnen die Abheilung der AK im Behandlungsareal zum AZP I histologisch bestätigt. In der 5-FU- Gruppe waren es 67% (16 von 24) und entsprechend 73% (19 von 26) in der Imiquimod-Gruppe. Anlehnend an die histologischen Ergebnisse betrug der negative prädikative Wert (NPV) für die klinische Diagnose jeweils 47% nach Kryotherapie, 70% nach 5-FU und 86% nach Imiquimod (Abbildung 3-3).

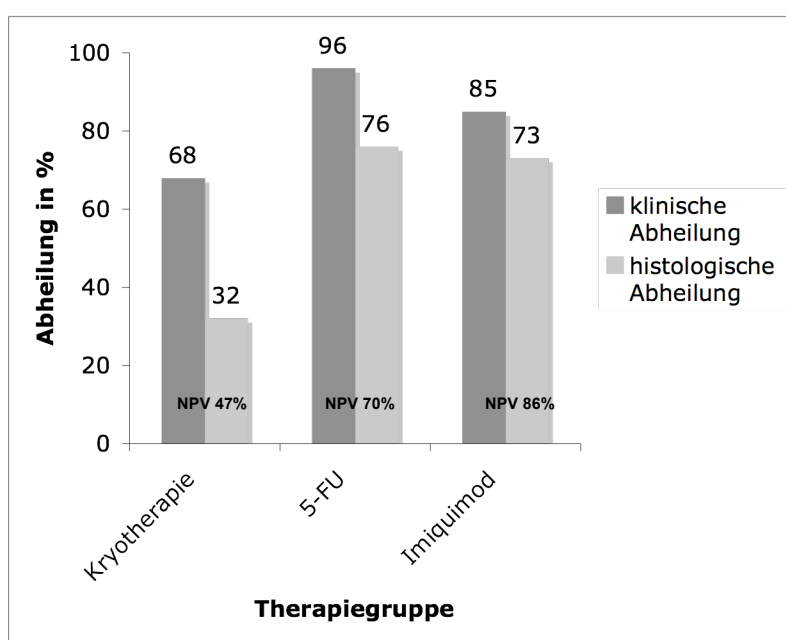


Abbildung 3-3: Abheilungsergebnisse zum AZP I in den drei Therapiegruppen im Vergleich: klinisch (n.s.), histologisch (Imiquimod vs. Kryotherapie $p < 0,01$; 5-FU vs. Kryotherapie $p < 0,05$). NPV – negativer prädikativer Wert.

3.1.4 Beurteilung des Therapieerfolges zum Auswertpunkt II (12 Monate nach Behandlungsende)

Zum AZP II brachen drei Patienten der Imiquimod- und ein Patient der Kryotherapie-Gruppe vorzeitig die Studie ab. Alle vier PatientInnen hatten zum AZP I noch klinisch und histologisch vorhandene AK. Alle vier PatientInnen wurden in den jeweiligen Berechnungen der Läsions- bzw. Arealtherapieerfolge zum AZP II als nicht abgeheilt gehandhabt. Die Berechnung bezieht sich damit auf die Zahl der Patienten, die zu beiden AZP evaluiert werden konnten.

Nach 12-Monaten Beobachtungszeitraum trat bei sieben der Kryotherapie-Patienten kein Rezidiv der beobachteten Läsionen im Behandlungsareal auf. In der 5-FU- und Imiquimod-Gruppe waren es 13 bzw. 19 Patienten. Hiermit ergab sich ein langfristiger Läsionstherapieerfolg von 28% (7/25) vs. 54% (13 von 24) zwischen Kryotherapie und 5-FU ($p < 0,05$) und vs. 73% (19 von 26) in der Imiquimod-Gruppe (n.s.).

Eine anhaltende Abheilung aller AK-Läsionen im Behandlungsareal bestand bei einem Patienten der Kryotherapie-, bei acht PatientInnen der 5-FU- und 19 PatientInnen der Imiquimod-Gruppe. Damit ergab sich ein langfristiger Arealtherapieerfolg von 4% (1 von 25) für Kryotherapie, 33% (8 von 24) für 5-FU und 73% (19 von 26) für Imiquimod. Die Signifikanzprüfung ergab folgende p-Werte: $p \leq 0,01$ für Kryotherapie und 5-FU, $p \leq 0,01$ für 5-FU und Imiquimod und $p < 0,0001$ für Kryotherapie und Imiquimod. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3-2 und Abbildung 3-4 zusammengefasst.

Tabelle 3-2: Läsions- und Arealtherapieerfolge zum AZP II (alle Angaben basieren auf der klinischen Diagnose)

	Kryotherapie K (n = 25)	5-FU (n = 24)	Imiquimod I (n = 26)
Klinische Abheilung im BA zum AZP I*	68% (17/25)	96% (23/24)	85% (22/26)
	K vs. 5-FU (p<0,05)**		
Ausbleiben eines Läsionsrezidivs zum AZP II*	7	13	19
langfristiger Läsionstherapieerfolg*	28% (7/25)	54% (13/24)	73% (19/26)
	K vs. 5-FU (p<0,05)***		
	I vs. K (p<0,005)***		
Ausbleiben etlicher AK im BA zum AZP II*	1	8	19
langfristiger Arealtherapieerfolg*	4% (1/25)	33% (8/24)	73% (19/26)
	K vs. 5-FU (p<0,05)**		
	I vs. 5-FU (p<0,05)***		
	I vs. K (p<0,001)**		

Abkürzungen: K – Kryotherapie; 5-FU – 5-Fluoruracil; I – Imiquimod, BA – Behandlungsareal, AZP – AZP, AK – aktinische Keratose, vs. – versus; **Fisher-exact-Test; ***Yates Chi2-Test. Nicht signifikante Vergleiche wurden nicht aufgeführt

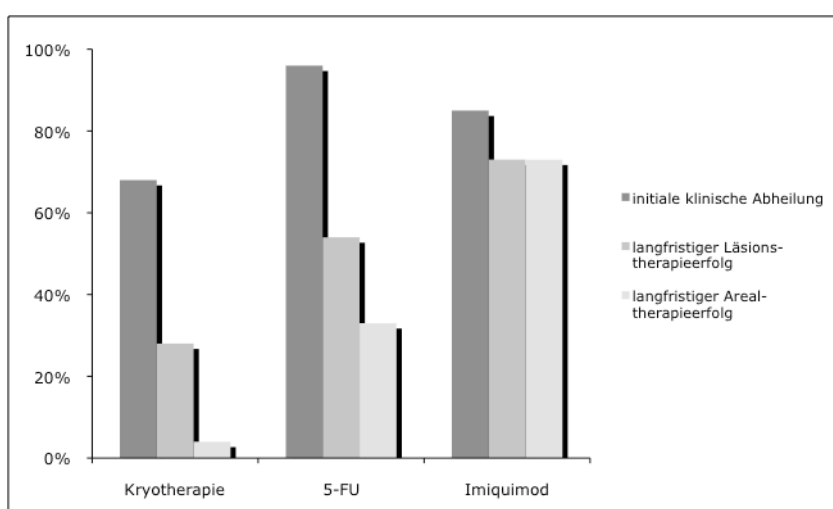


Abbildung 3-4: Gegenüberstellung der klinischen Abheilungsraten zum AZP II vs. initiale klinische Abheilung zum AZP I (genaue Angaben siehe **Tabelle 3-2**)

3.1.5 Kosmetischer Erfolg

Eine kosmetische Beurteilung des Behandlungsareals vom Studienarzt zum AZP I ergab in 19% der Fälle für die Imiquimod-Gruppe ein exzellentes Ergebnis, in den Gruppen 5-FU und Kryotherapie waren es 8% bzw. 4%. In den meisten Fällen wurde der kosmetische Erfolg in allen Gruppen vom Untersucher als „gut“ bezeichnet (76% - 71% - 65% entsprechend Kryotherapie – 5-FU – Imiquimod). Die Beurteilung des kosmetischen Erfolges seitens des Patienten war mit der des Studienarztes vergleichbar. Insgesamt bestand zum AZP I kein signifikanter Unterschied im kosmetischen Erfolg nach allen drei Behandlungen ($p = 0,56$ für ärztliche Beurteilung, $p = 0,41$ für die der Patienten).



Abbildung 3-5: Beispiel eines als „ausreichend“ eingestuften kosmetischen Erfolges nach einer Therapie mit 5-FU (AZP I)

Nach 12 Monaten, also zum AZP II, waren in allen drei Gruppen wesentliche Unterschiede der kosmetischen Erfolge zu vermerken. Basierend auf einer Beurteilung durch den Studienarzt hatten jeweils 4% der Kryotherapie- und der 5-FU-Patienten zum AZP II ein exzellentes kosmetisches Ergebnis, unter den Imiquimod-PatientInnen waren es 92%. Statistisch bestand ein signifikanter Unterschied ($p < 0.0001$) der Imiquimod-Gruppe zu der 5-FU- beziehungsweise Kryotherapie-Gruppe. Auch hier wurde der kosmetische Erfolg von PatientInnen ähnlich gewertet wie vom behandelten Arzt (Abbildung 3-6, Abbildung 3-7)

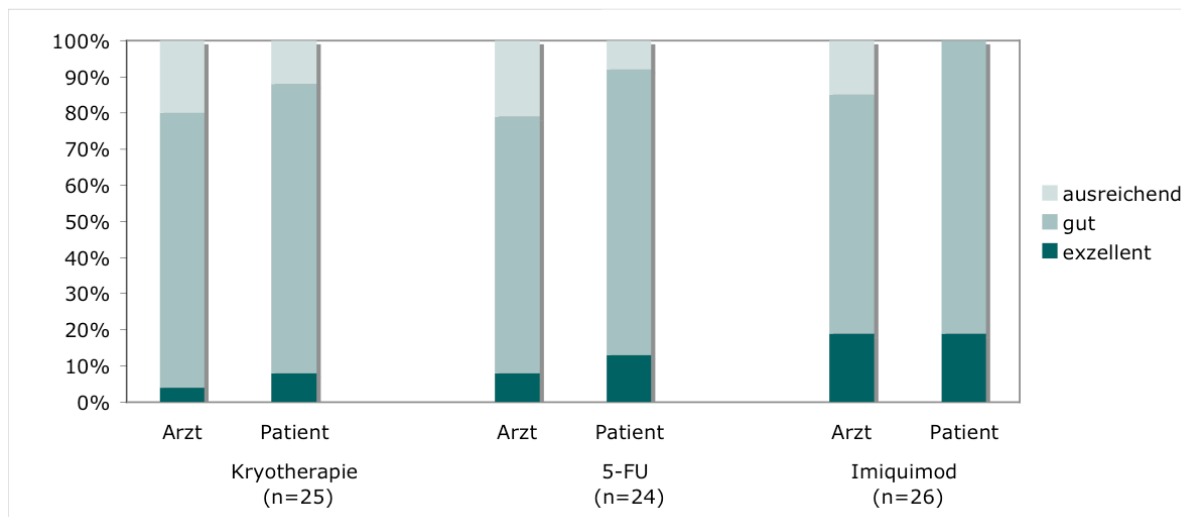


Abbildung 3-6: Diagramm zum kosmetischen Erfolg zum AZP I (Beschriftungserläuterungen: Arzt - Bewertung seitens des Studienarztes; Patient - Bewertung seitens des Patienten; Erläuterungen der einzelnen Beurteilungskriterien siehe 2.1.3.2)

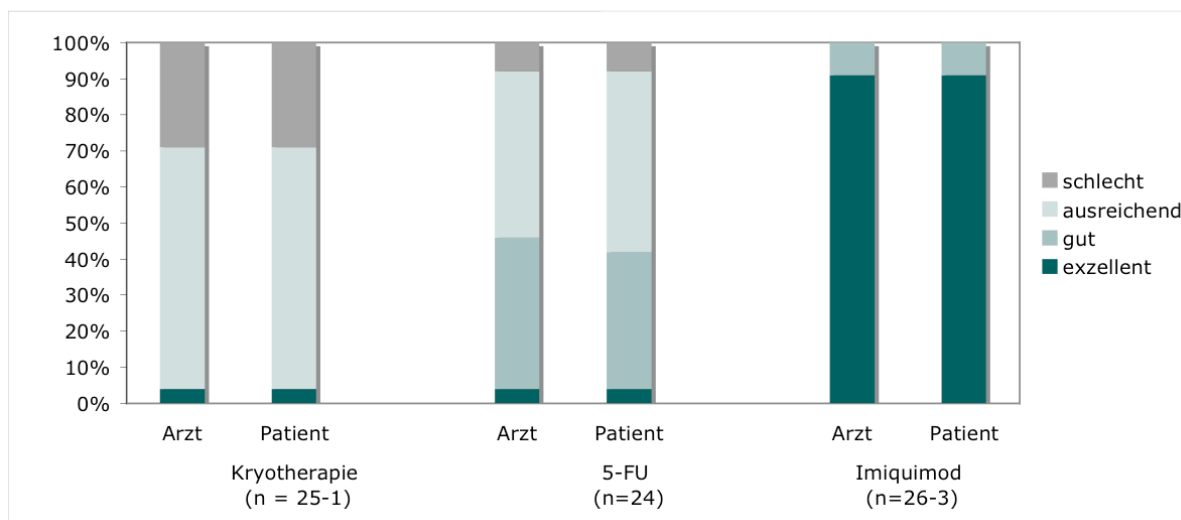


Abbildung 3-7: Diagramm zum kosmetischen Erfolg zum AZP II (Beschriftungserläuterungen: Arzt: Bewertung seitens des Studienarztes; Patient: Bewertung seitens des Patienten; Erläuterungen der einzelnen Beurteilungskriterien siehe 2.1.3.2)

3.2 Molekularbiologischer Teil

3.2.1 Mutationsanalysen

Im Rahmen der Studie standen uns insgesamt 237 Biopsien zur Mutationsanalyse der *Ha-ras*- und TP53-Gene zur Verfügung. Davon wurden 63% (150 von 237) vor Therapiebeginn entnommen (1. und 2. Stanzbiopsie, jeweils 75 AK- und Normalhautbiopsien) und die restlichen 37% (87 von 237) stammten aus den zum AZP I bewerteten Behandlungsarealen (3. und 4. Stanzbiopsie, klinisch abgeheilte, bzw. nicht abgeheilte AK). Nach histologischer Begutachtung wurden 60% (52 von 87) der nach Behandlung entnommenen Biopsien als noch vorhandene AK klassifiziert. Die restlichen 40% (35 von 87) galten als abgeheilt.

Insgesamt konnten 12 *missense*- und 1 *nonsense*-Mutation in allen untersuchten AK-Biopsien gefunden werden. Unter den 13 gefunden Mutationen waren 4 (31%) einzelne C zu T und 4 (31%) G zu A Basenaustausche. Alle C zu T Austausche betrafen das Exon 8 des TP53 Gens. In einer der nach Kryotherapie-Behandlung entnommenen Probe wurde ein Austausch (8%) benachbarter CC- zu TT-Nukleotiden im Exon 7 des TP53-Gens gefunden (Tabelle 3-3).

Alle Normalhaut-Biopsien (2. Stanzbiopsie) waren frei von Mutationen. Eine zusätzliche DNA-Untersuchung der Mikrodissektate aus 10 AK-Biopsien bestätigten die vorher erhaltenen Ergebnisse der Mutationsuntersuchungen.

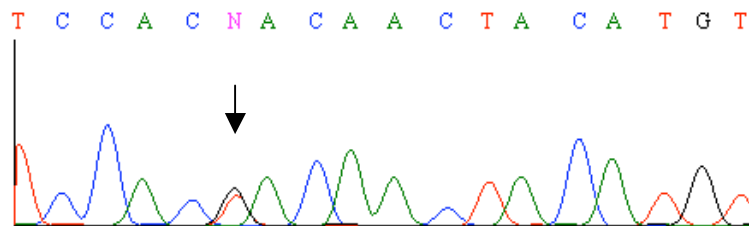


Abbildung 3-8: Beispiel eines T zu A Nucleotidaustausches im Exon 7 des TP53-Gens in einer der nicht behandelten AK-Biopsie (TP53 Exon7: A104T (D259V))

3.2.1.1 Ergebnisse der Mutationsanalysen vor einer Therapie

Unter den 75 vor einer Behandlung untersuchten AK-Biopsien wiesen 6 (8%) eine *missense*-Mutation auf. Wie bereits erwähnt wurde, war die entsprechende Normalhaut-Biopsie (2. Stanzbiopsie) mutationsfrei. Somit sind die gefundenen Mutationen als tumorspezifisch zu betrachten. Die Verteilung einzelner Mutationen auf die drei Patientengruppen zeigt sich wie folgt: in der Kryotherapie-Gruppe wies keiner der Patienten vor Therapiebeginn eine Mutation im Marker-Gen auf, in der 5-FU-Gruppe war es ein Patient von 25 (4%), in der Imiquimod-Gruppe wurden bei fünf von 26 Patienten nachgewiesen (19%).

Unter den prätherapeutisch gefundenen Mutationen wurde eine im Exon 1 des *Ha-ras*-Gens 1% (1 von 75) gefunden, eine im Exon 7 (1%, 1 von 75) und vier im Exon 8 des TP53-Gens (5%, 4 von 75) (n.s.) (Tabelle 3-3).

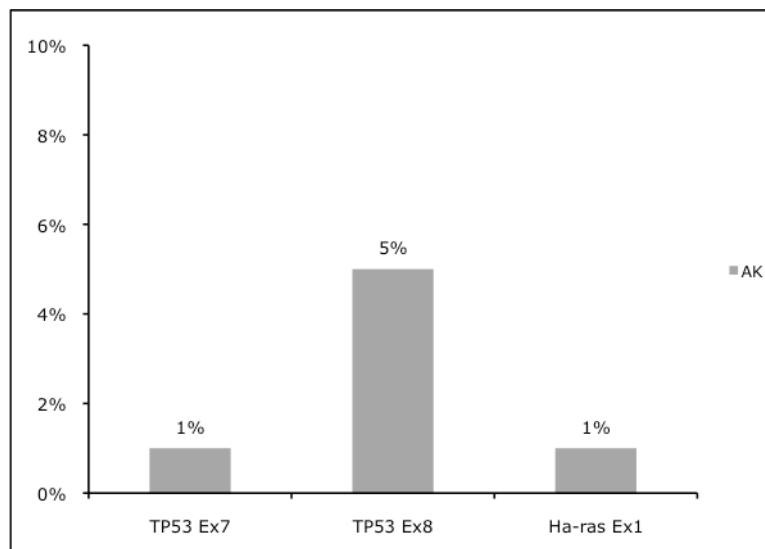


Abbildung 3-9: Verteilung der Mutationsraten in den Marker-Genen TP53 (Exon 7 und Exon 8) und Ha-ras (Exon 1) in frühen AK vor einer Therapie (bezogen auf alle prätherapeutisch untersuchten AK).

3.2.1.2 Ergebnisse der posttherapeutischen Mutationsanalysen

Allgemein

Insgesamt wurden 87 Biopsien aus den Behandlungsarealen posttherapeutisch molekulargenetisch untersucht: 60% der Proben (52 von 87) stammten aus histologisch abgeheilten Läsionen, die restlichen 40% (35 von 87) aus weiterhin vorhandenen AK.

Die Verteilung aller posttherapeutisch entnommenen Proben auf die einzelnen Patientengruppen war folgende: 37% (32 von 87) gehörten der Kryotherapie-Gruppe, 29% (25 von 87) - der 5-FU- und 34% (30 von 87) der Imiquimod-Gruppe an.

Insgesamt wiesen 8% (7 von 87) der posttherapeutisch untersuchten Proben eine Mutation in einem der Marker-Gene auf. Alle sieben Mutationen traten neu auf, das heißt, dass die vor einer Therapie untersuchten AK-Proben dieser Patienten mutationsfrei waren. Umgekehrt konnten die vor einer Therapie gefundenen Mutationsergebnisse bei den jeweiligen Patienten posttherapeutisch nicht wiederholt werden.

Bei den histologisch noch vorhandenen AK-Läsionen war in einer (3% von 35) eine Mutation zu finden. Unter den histologisch abgeheilten Läsionen waren 6 Proben (12% von 52) mutiert (n.s.).

Die Verteilung der gefundenen Mutationen auf die untersuchten Gen-Abschnitte war folgende: das *Ha-ras*-Gen (Exon 1) war einmal mutiert (1%, 1 von 87), das Exon 7 des TP53-Gens war in 2 Proben (2%, 2 von 87) und das Exon 8 – in 4 Proben (5%, 4 von 87) mutiert (n.s.).

3.2.1.2.1 Mutationsanalysen nach einer Kryotherapie

In der Kryotherapie-Gruppe standen posttherapeutisch 32 Gewebeproben für eine molekularbiologische Untersuchung zur Verfügung. Darunter wiesen 13% (4 von 32) eine Neu-Mutation auf. Alle diese vier Mutationen wurden in histologisch abgeheilten Proben gefunden. Eine der Mutationen (3%, 1 von 32) betraf das Exon 7, die restlichen drei - das Exon 8 (9%, 3 von 32) des TP53-Gens. (n.s.)

3.2.1.2.2 Mutationsanalysen nach einer 5-FU-Therapie

Auf die 5-FU-Gruppe fielen 29% (25 von 87) der posttherapeutisch entnommenen Proben. Eine der 25 Proben (4%) wies eine Neu-Mutation im Exon 8 des TP53-Gens auf. Die mutierte DNA stammte aus einer histologisch abgeheilten Läsion.

3.2.1.2.3 Mutationsanalyse nach einer Imiquimod-Therapie

In der Imiquimod-Gruppe waren 35% (30 von 87) der posttherapeutisch entnommenen Gewebeproben. Darunter enthielten 2 (7%) eine Neu-Mutation. Eine davon war im Ha-*ras*-Gen und eine im Exon 7 des TP53-Gens. Letztere trat in einer histologisch nicht abgeheilten Läsion auf.

In der Verteilung der Mutationen auf die drei Therapiegruppen bestand kein signifikanter Unterschied.

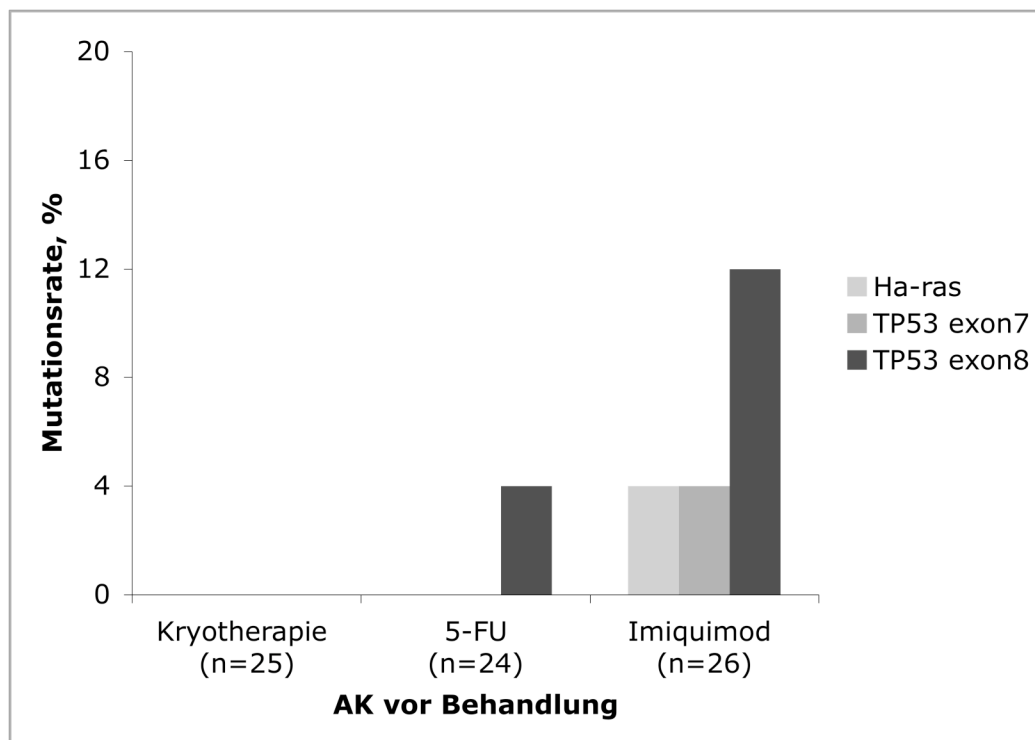


Abbildung 3-10: Vergleich von Mutationsraten in den 3 Marker-Genen in AK aus den drei Therapiegruppen vor einer Behandlung (n.s.)

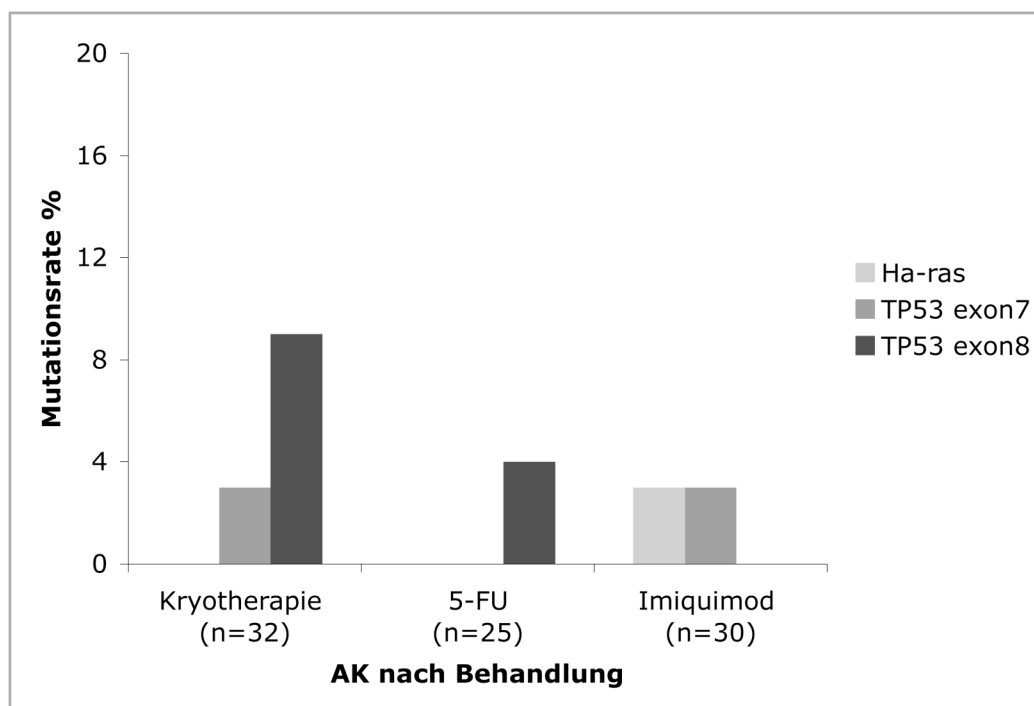


Abbildung 3-11: Vergleich von Mutationsraten in den 3 Marker-Genen in AK aus den drei Therapiegruppen nach einer Behandlung (*abgeheilte und nicht abgeheilte AK werden nicht unterschieden). (n.s.)

Tabelle 3-3: Mutationsspektrum der Studienproben

Patientengruppe	Patient	Alter/Geschlecht	Vor Behandlung (n=150)		Nach Behandlung (n=87)	
			AK* (n=75)	NH* (n=75)	AK* (n=35)	NH* (abgeheilte AK) (n=52)
Kryotherapie	1	63/m	WT	WT	WT	TP53 Exon 8: C50T (P278S)
	2	61/m	WT	WT	WT	TP53 Exon 8: C50T (P278S)
	3	74/m	WT	WT	WT	TP53 Exon 8: G74A (E286K)
	4	77/w	WT	WT	NV	TP53 Exon 7: CC69,70TT (R248W)
5-FU	5	74/m	WT	WT	NV	TP53 Exon 8: G74A (E286K)
	6	70/m	TP53 Exon 8: G59A (D281N)	WT	NV	WT
Imiquimod	7	67/m	WT	WT	NV	Ha-ras Exon 1: G144A (E31K)
	8	75/m	Ha-ras Exon 1: C112T (T20I)	WT	NV	WT
	9	78/m	TP53 Exon 7: A104T (D259V)	WT	WT	NV
	10	71/w	WT	WT	TP53 Exon 7: T28G (Y234D)	NV
	11	71/m	TP53 Exon 8: C50T (P278S)	WT	NV	WT
	12	72/m	TP53 Exon 8: T75C (E286V)	WT	NV	WT
	13	67/m	TP53 Exon 8: G110T (E298x)	WT	NV	WT

*entsprechend histologischer Diagnose. Abkürzungen: AK - aktinische Keratose; NH – Normalhaut; m - männlich; w - weiblich; NV –nicht vorhanden, Biopsie wurde nicht entnommen; WT – „Wildtyp“-DNA

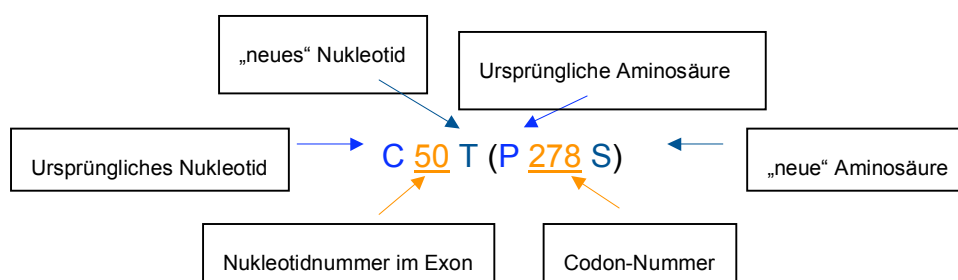


Abbildung 3-12: Erläuterung des Einbuchstaben-Codes für Nukleotid-Austausch-Mutationen (*missense*) auf Nukleotid-, sowie Aminosäureebene.

4 Diskussion

4.1 Klinische Ergebnisse

Die AK ist ein Plattenepithelkarzinom (PEK) der Epidermis *in situ*. Epidemiologische Studien zeigen ein generelles Ansteigen der Prävalenz für AK innerhalb der letzten zehn Jahre. Diese Prävalenz variiert weltweit zwischen 6 und 55%, wobei die höchsten Erkrankungsraten unter der stark sonnenexponierten Bevölkerung Australiens zu finden sind.⁵⁻⁷ Nach wie vor sollte die primäre Strategie in der Bekämpfung steigender AK-Prävalenzen ein konsequenter UV-Schutz sein. Dennoch darf die Notwendigkeit einer rechtzeitigen Diagnostik und vor allem einer zuverlässigen Therapie der AK nicht unterschätzt werden.

Die Methodenauswahl zur Therapie der AK ist sehr vielfältig. Welche Option letztendlich gewählt wird, hängt vom behandelnden Arzt ab. Dabei spielt seine klinische Erfahrung die entscheidende Rolle. Eine so genannte „*first line*“-Therapie gibt es bislang nicht.

Auf der Suche nach einer optimalen AK-Therapie wurde die aktuelle Studie ins Leben gerufen. Im Rahmen derer wurden drei häufig verwendete Therapiemethoden der AK auf ihre Effektivität hin verglichen. Die Gestaltung der Studie ermöglichte es, mehrere Aspekte der einzelnen Therapien aufzudecken, die Vorteile in ihrem Einsatz zur AK-Behandlung haben könnten. Bevor diese Vorteile nun dargelegt werden, sollte der Versuch gestartet werden, eine grundlegende Frage zu beantworten: was definiert eine optimale Therapie der AK?

4.1.1 Was sind die Kriterien einer optimalen AK-Therapie?

Die Frage kann nur unter Berücksichtigung einiger Besonderheiten der AK beantwortet werden. Anhand dieser Besonderheiten lassen sich vier wichtige Kriterien einer AK-Therapie definieren. Diese sollen im Folgenden aufgeführt und diskutiert werden. Anschließend soll jede der drei untersuchten Therapiemethoden auf die jeweiligen Kriterien hin verglichen werden. Hiermit erhoffen wir uns einen objektiven Vergleich der wichtigsten AK-Behandlungsmethoden zu erhalten, der einem behandelnden Arzt in seiner klinischen Tätigkeit zur Verfügung stehen soll.

- **Kriterium 1: Eine zuverlässige histologische Abheilung ist das wichtigste Kriterium einer erfolgreichen Therapie der AK.**

Die Diagnose der AK kann in den meisten Fällen auf der Basis des klinischen Erscheinungsbildes gestellt werden. Diese Tatsache ist hinsichtlich der hohen Prävalenz der Erkrankung sehr hilfreich. In Zweifelsfällen, insbesondere zur Abgrenzung zum invasiven PEK, ist eine histologische Nachuntersuchung erforderlich. Auch die posttherapeutische Erfolgskontrolle erfolgt meistens klinisch. Dennoch ist hier an eine histologische Besonderheit der aktinischen Keratosen zu erinnern.

AK-Läsionen werden bereits durch die Anwesenheit atypischer Keratinozyten in der Basalzellschicht der Epidermis definiert. Diese können in fortgeschrittenen Stadien die gesamte Epidermis durchsetzen und an der Hautoberfläche erscheinen.^{11,59} Das bedeutet, dass nicht alle AK durch eine klinische Blickdiagnose erfasst werden können. Das könnte vor allem posttherapeutisch problematisch werden. Verbliebene, in der Beurteilung nicht erfasste AK-Läsionen werden den Patienten im Verlauf erneut zum Arzt führen und es besteht weiterhin ein erhebliches Risiko für die Entwicklung eines invasiven PEK.

Dieses Problem könnte zwei Lösungen haben. Entweder man greift stets auf den Goldstandard (Histologie) der Diagnostik zurück, um im Falle eines Therapieversagens die Behandlung zu

wiederholen. Eine aufwendige und für den Patienten schmerzhaft Variante. Oder man findet eine möglichst effektive Therapie, welche eine Nachkontrolle weitestgehend überflüssig macht. Also muss nach einer Therapie gesucht werden, die zuverlässig hohe histologische Abheilungsraten der AK garantiert. Für den klinischen Alltag bedeutet es, dass eine klinische Diagnose nur noch im Ausnahmefall nachkontrolliert werden muss.

▪ **Kriterium 2: Das Prinzip der Feldentartung und die histologischen Eigenschaften der AK erfordern einen großflächigen Therapieansatz**

AK treten oft multipel in größeren Arealen auf. Im vorangehenden Abschnitt konnte bereits gezeigt werden, dass auf Grund der histologischen AK-Eigenschaften nicht alle Läsionen an der Hautoberfläche zum Vorschein treten. Daneben gibt es eine weitere Erkenntnis über AK, die das Vorhandensein subklinischer Läsionen im bestimmten Areal sehr wahrscheinlich macht. Die Tatsache, dass eine gesamte Region transformierte Keratinozyten in verschiedenen Graduierungen, einschließlich subklinischer Läsionen, aufweist, war der Grund dafür, den Begriff „Feldentartung“ einzuführen.^{40,41} In einer Studie, in der mehr als 1000 PEK aus sonnengeschädigter Haut histologisch untersucht wurden, zeigten sich in der Peripherie der PEK in fast 100% der Fälle histopathologische Veränderungen im Sinne einer AK.⁶⁰

Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen kommen wir zu einem wichtigen Paradigmenwechsel: trotz möglichen einzelnen Auftretens der Läsionen sollte im Falle von AK stets davon ausgegangen werden, dass diese multipel im größeren Areal vorhanden sind. Demnach muss die optimale AK-Therapie die maximale Anzahl der Läsionen erfassen, die klinisch und subklinisch in einem bestimmten Areal vorhanden sind. Das kann, zum Beispiel, durch eine großflächige Therapieanwendung geboten werden.

- **Kriterium 3: Die Tendenz der AK in ein invasives PEK überzugehen, erfordert eine langfristig erfolgreiche AK-Therapie**

Die AK ist ein PEK *in situ* und somit initiale Läsion im Laufe der Entwicklung eines invasiven PEK. Diese Entwicklung ist klinisch und histologisch ein Kontinuum, das durch eine Progression der aktinischen Keratose ins invasive PEK aufrechterhalten wird.

Laut aktueller Studienlage besteht das Risiko für eine maligne Transformation der AK-Läsionen in etwa 10% der Fälle.^{7,8} Umgekehrt beträgt die Wahrscheinlichkeit für eine einzelne AK-Läsion innerhalb von 10 Jahren in ein invasives PEK überzugehen 10,2%.⁹ Somit hat im Prinzip jede Läsion die Tendenz zu entarten, die Frage ist nur zu welchem Zeitpunkt dies geschieht.¹⁰ Mit anderen Worten: je schneller eine AK eliminiert wird, desto kleiner ist ihre Wahrscheinlichkeit, in ein invasives PEK überzugehen. In diesem Zusammenhang spielen vor allem eine rechtzeitige Erkrankungsdiagnose und ein früher Therapiebeginn eine entscheidende Rolle. Wichtig ist auch eine möglichst schnelle und langfristig sichere, das heißt Rezidiv-freie, Abheilung der einzelnen Läsionen.

- **Kriterium 4: Eine gute kosmetische Verträglichkeit der jeweiligen AK-Therapie unterstützt den Therapieerfolg**

In den vorangehenden Abschnitten konnte bereits mehrmals die Notwendigkeit einer großflächigen AK-Therapie belegt werden. Nun soll daran erinnert werden, dass AK fast ausschließlich an sonnenexponierten, und somit sichtbaren Hautarealen auftreten. Hier darf also die Bedeutung einer guten kosmetischen Verträglichkeit der jeweiligen AK-Therapie nicht unterschätzt werden. Letztere kann die Compliance des Patienten und somit den endgültigen Therapieerfolg stark beeinflussen.

Im Falle einer minderen kosmetischen Verträglichkeit kann erwogen werden, ob die Therapie aufgrund einer signifikant besseren Wirksamkeit dennoch angewandt wird. In diesem Fall muss

die Compliance des Patienten, zum Beispiel durch ausführliche Aufklärung, besonders unterstützt werden.

4.1.2 Vergleich der Therapiegruppen anhand der vier Kriterien einer optimalen AK-Therapie

4.1.2.1 Kryotherapie

Kryotherapie ist weltweit ein am meisten eingesetztes Verfahren zur Therapie der AK. Die Methode galt stets als sicher und zuverlässig. Bisherige Studien zeigten klinisch diagnostizierte Heilungsraten zwischen 67 und 98%.^{44,45,47} Bis jetzt mangelt es allerdings an histologisch kontrollierten Studien. Die Dauer und Temperatur einer einzelnen Kryotherapie-Anwendung wird von dem behandelnden Arzt individuell gewählt und hängt im Wesentlichen von seiner klinischen Erfahrung ab. Somit erweist sich ein objektiver Datenvergleich bezüglich der Effektivität der Kryotherapie als schwierig. Thai und Kollegen konnten in ihrer prospektiven Multizenterstudie zeigen, dass eine Gefrierzeit zwischen 15 und 20 Sekunden die höchsten Therapieerfolge sichert.⁴⁷

- ***Kryotherapie zeigt histologisch die niedrigsten Abheilungsraten von 32%, dabei erweist sich die rein klinische Diagnose als unzureichend***

In unserer Studie war laut klinischer Evaluierung bei 17 der 25 (68%) PatientInnen eine Behandlung mit Kryotherapie erfolgreich. Diese Heilungsraten konnten unter einer maximal effektiv empfohlenen Kryotherapie-Dosis erzielt werden. Solche Ergebnisse bestätigen früher publizierte Daten. Letztere basieren allerdings ausschließlich auf einer klinischen Diagnose. Die von uns zur Diagnosesicherung durchgeführte histologische Nachuntersuchung konnte lediglich 32% der klinischen Diagnosen bestätigen. In vielen der nachuntersuchten Gewebeproben

verblieben laut histologischen Befunden einzelne atypische Keratinozyten, meist in unteren Lagen der Epidermis.

Somit konnte ein negativer prädikativer Wert für die klinische Diagnose nach einer erfolgten Kryotherapie von lediglich 47% ermittelt werden. Dies bedeutet, dass in mehr als der Hälfte der als klinisch abgeheilt beurteilten Läsionen die klinische Diagnose falsch war.

- ***Als ein lokal destruktives Verfahren erfasst Kryotherapie nicht das Prinzip des großflächigen Auftretens der AK.***

In der Analyse der langfristigen Ergebnisse in der Kryotherapie-Gruppe fällt ein wesentlicher Methodennachteil diesen lokalen Kontaktverfahrens auf. Der 12 Monate nach einer Kryotherapie erfasste Therapieerfolg im gesamten Behandlungsareal zeigte die schlechtesten Ergebnisse unter den drei Gruppen. Lediglich einer von den 25 PatientInnen (4%) blieb zu diesem Zeitpunkt komplett läsionsfrei im Behandlungsareal. Die restlichen 16 PatientInnen (64%) entwickelten 12 Monate nach der Behandlung Rezidive alter Läsionen und/oder auch komplett neue AK. Zu erwähnen sind hier die 24% (6 von 25) der behandelten PatientInnen, die ausschließlich neue AK-Läsionen entwickelten. Zum einen stärkt dieses Ergebnis die Annahme, AK unterliegen dem Prinzip der Feldentartung und entstehen somit multifokal. Zum anderen fällt dadurch ein methodischer Nachteil der Kryotherapie auf – die Methode kann nur klinisch vorhandene Läsionen erfassen, subklinische Läsionen in tieferen Schichten der Epidermis verbleiben dabei unbehandelt.

- ***Kryotherapie wirkt unzureichend gegen die Tendenz der AK in ein invasives PEK zu übergehen.***

Wie bereits vorhin erwähnt, zeigte Kryotherapie langfristig die schlechtesten Abheilungsergebnisse unter den drei Therapiegruppen. Laut den Untersuchungen von Dodson *et al.* steigt die Entartungswahrscheinlichkeit für eine AK mit der Zeit ihres Bestehens an.⁹ In

diesem Zusammenhang fällt der niedrige langfristige Läsionstherapieerfolg in der Kryotherapiegruppe auf. Lediglich 28% (7 von 25) der mit Kryotherapie behandelten PatientInnen zeigten auch nach 12 Monaten Beobachtungszeit (AZP II) keine Rezidive der initial abgeheilten AK. Das wiederum bedeutet, dass bei knapp zwei Dritteln der PatientInnen weiterhin Läsionen bestanden, die nun zumindest durch den Zeitfaktor begünstigt eine höhere Entartungstendenz in sich trugen.

- ***Der kosmetische Erfolg nach einer Kryotherapie verschlechtert sich im Verlauf***

Zum AZP I konnte anhand der kosmetischen Evaluierung ein überwiegend gutes Ergebnis in der Kryotherapie-Gruppe beobachtet werden. Damit bestand kaum Unterschied zu den anderen Therapiegruppen. Dieser wurde erst nach 12 Monaten bemerkbar, nachdem sich der Schwerpunkt von „gut“ zu „ausreichend“ verlagerte und mit 29% einige schlechte Beurteilungen neu hinzukamen. Eine wesentliche Rolle in solch einer „Zufriedenheitssenkung“ spielt sicherlich auch das schlechtere langfristige klinische Ergebnis einer Kryotherapie.

Zusammengefasst entspricht die Kryotherapie nach unseren Ergebnissen nur bedingt den Kriterien einer optimalen AK-Therapie. Aufgrund der schnellen und einfachen Handhabung stellt diese Therapiemethode eine denkbare Alternative zur Behandlung einzelner AK-Läsionen dar. Der Therapieerfolg sollte allerdings engmaschig nachkontrolliert werden, z.B. mittels einer histologischen Untersuchung oder der nicht invasiven Reflektanz konfokalen Lasermikroskopie. Zudem sollten die Patienten langfristig in einer klinischen Beobachtung involviert bleiben.

4.1.2.2 5-Fluoruracil

Laut aktueller Studienlage führt die Behandlung mit einer 5%igen 5-FU-Salbe bei 50 bis 86% der behandelten PatientInnen zu einer kompletten Abheilung der behandelten Läsionen.⁶¹ Die relativ große Erfolgsdifferenz unter den einzelnen Studien könnte durch unterschiedliche Therapieregimes und vor allem unterschiedliche Evaluierungszeitpunkte erklärt werden. Labandeira *et al.* zeigten in ihrer Studie, dass eine intermittierende 5-FU-Behandlung ähnliche Ergebnisse zu einer 2-mal-wöchentlichen Anwendung führte. Der Unterschied bestand allerdings in der Zeitdauer bis zur Remission, wobei sich diese bei reduzierter Anwendungshäufigkeit verlängert.⁶² Askew und Mitarbeiter brachten 2009 in ihrem Literatur-Review zur 5-FU-Effektivität eine weitere Erklärung für die widersprüchlichen Erfolgsergebnisse in der Literatur.⁵⁴ Diese basierte auf unterschiedlichen Herangehensweisen der einzelnen Studien ihre Therapieergebnisse zu beurteilen. Die meisten Studien zählten einfach die Läsionen vor und nach einer Therapie und verglichen anschließend diese Zahlen. Somit wurde lediglich die Läsionsreduktion nach einer Behandlung ermittelt. Aus den Ergebnissen unserer Studie lässt sich schlussfolgern, dass damit nicht der wahre Erfolg einer Therapie beurteilt werden kann.

- ***5-Fluoruracil zeigt bessere histologische Abheilungsraten, allerdings eine kaum stärkere Aussagekraft der klinischen Diagnose als Kryotherapie***

Mit 67%iger (16 von 24) histologischer Abheilungsrate entsprechen unsere Ergebnisse in der 5-FU-Gruppe der bisherigen Studienlage. Auch wenn das von uns angewandte 5-FU-Therapieregime dem maximal empfohlenen entsprach, könnte man auch hier einen verzögerten Therapieerfolg, wie von Labandeira und Kollegen beschrieben, vermuten.⁶² Die Ergebnisse besserten sich allerdings nicht im Verlauf. Im Gegenteil, die nach 12 Monaten erhobenen klinischen Abheilungsraten betragen für 5-FU lediglich 33% (8 von 24).

Zudem fällt auch hier auf, dass bei einem negativ prädikativen Wert (NPW) von 70% die klinische Diagnose nicht aussagekräftig genug ist. Somit schneidet die 5-FU-Therapie beim ersten Therapiekriterium zwar geringfügig besser ab als Kryotherapie. Ist aber von einer optimalen Therapie weit entfernt.

- ***Die 5-FU-Creme wirkt großflächig und zeigt im Vergleich zur Kryotherapie bessere langfristige AK-Heilungsraten***

Dass eine Behandlung mit der 5-FU-Salbe aufgrund ihrer Anwendungsform einen besseren Einfluss auf die Feldentartung im Behandlungsgebiet als Kryotherapie hat, ist durchaus anzunehmen. Auch subklinische Läsionen sollten von dieser chemodestruktiven Flächentherapie besser erfasst werden können. Im Vergleich der langfristigen Arealtherapieerfolge in den beiden ersten Gruppen fällt ein signifikanter Unterschied der Ergebnisse zu Gunsten der 5-FU-Gruppe auf: 33% der 5-FU-Patienten im Vergleich zu den 4% der Kryotherapie-Gruppe blieben nach 12 Monaten Beobachtungszeit komplett läsionsfrei. Dieser Vorteil kommt sowohl durch eine mindere Anzahl von Läsionsrezidiven zum AZP I, als auch durch das seltenere Auftreten von neuen AK-Läsionen zustande.

- ***Bei einer 54%igen Läsionsrezidivrate im Verlauf wirkt 5-FU unzureichend gegen die Entwicklung eines invasiven Plattenepithelkarzinoms***

Das Ausbleiben von Läsionsrezidiven nach einer 5-FU-Therapie war mit 54% signifikant besser als nach einer Kryotherapie ($p < 0,05$). Dennoch ist es immer noch die Hälfte der PatientInnen, die ein erhöhtes Risiko für ein invasives PEK behält und durch den Zeitfaktor begünstigt dieses womöglich sogar gesteigert hat.

- ***5-FU führt teilweise zu starken lokalen Reaktionen und erfordert eine hohe Patienten-Compliance.***

Auch in der 5-FU-Gruppe bestand zum AZP I mit einem überwiegend „guten“ Ergebnis kaum Unterschied zu den anderen Therapiegruppen. Langfristig verlagerte sich der Ergebnisschwerpunkt aber zu „ausreichend“, vor allem bedingt durch das vermehrte Auftreten von Hypo- bzw. Hyperpigmentierungen.

Während der Therapie klagten die Patienten über ausgeprägte Rötungen und Reizungen im Behandlungsareal. Diese sistierten zum Zeitpunkt der Endauswertung. Zum einen kann diese Nebenwirkung durch die unselektiv destruktive Wirkung von 5-FU in der Epidermis erklärt werden. Zum anderen kommt hier ein die Therapie begünstigender Effekt zum Vorschein. Verursacht durch die flächendeckende 5-FU-Anwendung kommen bislang nicht sichtbare subklinische Läsionen an die Hautoberfläche und vermitteln dem Patienten eine „Zustandsverschlechterung“. Beide Faktoren belasten sehr stark die Compliance des Patienten.

Grundsätzlich scheint die 5-FU-Therapie eine bessere Alternative zur Kryotherapie zu sein. Allerdings überraschen die langfristigen Ergebnisse in dieser Gruppe. Hier fällt auf, dass nach 12 Monaten bei zwei Dritteln der PatientInnen die Therapie erfolglos war. Solch ein Therapieerfolg kann die schlechtere kosmetische Verträglichkeit von 5-FU unserer Meinung nach keinesfalls relativieren und erfordert weitere methodische Optimierungen oder gar eine neue Therapiealternative. Eine Option wäre die Anwendung einer niedrigeren Wirkstoffkonzentration (0,5%, 1%, 2%). Deren vor allem langfristige Wirksamkeit muss jedoch durch Studien belegt werden, was aktuell noch nicht der Fall ist.

4.1.2.3 Imiquimod

Der lokale Immunmodulator Imiquimod ist in Deutschland erst seit 2006 zur Therapie von aktinischen Keratosen zugelassen. Bis dahin berichteten vor allem Studien aus den USA über sehr gute und vor allem langfristige Behandlungserfolge mit Imiquimod. Die Arbeitsgruppe von Stockfleth et al. belegte 2002 in ihrer doppelblinden, placebokontrollierten Pilotstudie komplette histologische AK-Remissionen von 84% unter den 36 behandelten Patienten.⁵⁷ In etwa 10% kam

es im Nachbeobachtungs-Zeitraum von zwei Jahren zu Rezidiven. In einer weiteren doppelblinden, placebokontrollierten Studie wurden 286 PatientInnen dreimal die Woche für 16 Wochen behandelt. Eine komplette, histologisch überprüfte Remission trat in 57% der Fälle ein.⁶³

In der Regel kommt es unter der Behandlung mit Imiquimod zu einer relativ starken inflammatorischen Umgebungsreaktion. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die bekannten inflammatorischen Nebenwirkungen bei topischer Applikation von Imiquimod mit dem Therapieerfolg direkt korrelieren.⁶⁴ So treten unterschiedlich starke lokale Irritationen in den Behandlungsrealen auf, die zu einem Erythem, gelegentlich sogar zu einer Errosion und Ulzeration führen, oder Hypo- oder Hyperpigmentierungen hinterlassen. Die meisten Nebenwirkungen wurden jedoch von den Studienteilnehmern nur als „mild“ bis „mittelschwer“ eingestuft. Den Patienten und behandelnden Ärzten sollte bewusst sein, dass die inflammatorischen Reaktionen bei der Imiquimod-Therapie nicht als eine neu aufgetretene „Kontaktallergie“ zu interpretieren sind, sondern vielmehr die Therapieantwort günstig beeinflussen. Eine gute Compliance der Patienten ist bei diesem Therapieverfahren unabdingbar.

- ***Imiquimod zeigte mit 73%iger histologischer Abheilung das beste Behandlungsergebnis unter den drei Gruppen.***

Unsere Ergebnisse entsprechen weitestgehend der aktuellen Studienlage zur Imiquimod-Effektivität.^{56,57} Dabei erwies sich die klinische Diagnose bei einem NPW von 86% als wesentlich zuverlässiger im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Somit bietet Imiquimod eine zuverlässige Abheilung der Läsionen, wobei eine Nachkontrolle nicht zwingend notwendig ist.

- ***Imiquimod wirkt zuverlässig im gesamten Therapieareal.***

Auch hier, wie schon bei 5-FU, ist aufgrund der Applikationsform von Imiquimod ein flächendeckender Therapieeffekt zu erwarten. Die langfristigen Ergebnisse unserer Studie sprechen ebenfalls dafür: auch 12 Monate nach Behandlungsende blieben 73% der behandelten PatientInnen weiterhin läsionsfrei im behandelten Areal. Interessanterweise entspricht diese Zahl den initialen histologischen Abheilungsraten (AZP I). Zudem stammten alle zum AZP II aufgetretenen Rezidive aus alten Läsionen, neue AK traten nicht auf. Diese beiden Ergebnisse deuten auf einen bedeutenden Therapievorteil von Imiquimod in der Behandlung von AK: das Erfassen von subklinischen Läsionen im Behandlungsareal.

- ***Eine Imiquimod-Therapie zeigt die höchste langfristige Abheilungsbeständigkeit***

Bei einem langfristigen Läsionstherapieerfolg von 73% zeigt die Imiquimodgruppe das beste langfristige Ergebnis. Dies entspricht auch der bisherigen Studienlage.^{16,65}

Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt, stimmt hier mit 73% der langfristige klinische Läsionstherapieerfolg mit den initialen histologischen Ergebnissen (zum AZP I) überein. Das führt zu der Überlegung, dass die zum AZP II rezidierten Läsionen Überbleibsel von den zum AZP I nicht austherapierten Läsionen sein könnten. Wäre dies der Fall, so könnte man z.B. durch eine Kombinationstherapie mit Kryotherapie ein lokal besseres Ergebnis erzielen. Die Arbeitsgruppe von Tan und Kollegen deuteten 2007, in ihrer randomisierten Vergleichsstudie an 63 Patienten, auf therapeutische Vorteile einer postkryotherapeutischen Anwendung von Imiquimod hin.⁶⁶ Bereits nach Abschluss der vorliegenden Arbeit publizierten Jorizzo *et al.* die Ergebnisse ihrer Studie zur Anwendung von 3,75% Imiquimod-Creme nach lokaler Kryotherapie.⁶⁷ Hier konnte ein signifikanter Vorteil der Kryotherapie-Imiquimod-Kombination gegenüber einzelner Kryotherapie-Anwendung bezüglich der Läsionsreduktion und großflächigen Abheilung gegenüber solitärer Kryotherapie gezeigt werden.

- ***Imiquimod überzeugt vor allem durch langfristige kosmetische Ergebnisse***

Wie erwartet traten auch in unserer Studie die bekannten inflammatorischen Reaktionen während der Imiquimod-Therapie auf. Diese wurden von den meisten der Patienten gut toleriert. Lediglich ein Patient brach bereits nach dem ersten Therapiezyklus die Behandlung aufgrund derer Nebenwirkungen vorzeitig ab. Das war in keiner anderen Gruppe der Fall.

Zum Ende der Behandlung (AZP I) zeigte die Imiquimod-Gruppe aus kosmetischer Sicht kaum Unterschiede zu den anderen beiden Gruppen. Mit 90%igem „exzellenten“ kosmetischen Ergebnis seitens der PatientInnen zum AZP II war dieses überragend besser im Vergleich zu den anderen Gruppen.

Insgesamt kommt hier der besondere Stellenwert der ausführlichen Patientenaufklärung im Rahmen einer Imiquimod-Therapie zu Vorschein. Letztere soll vor allem die Compliance des Patienten unterstützen, die durch starke Nebenwirkungen der Therapie und relativ lange Behandlungszeiten beeinträchtigt werden kann.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine sehr starke Konkurrenzfähigkeit von Imiquimod in der Debatte über eine optimale AK-Therapie. Im Vordergrund steht dabei die sichere langfristige Abheilung der AK. Dennoch bedarf die Therapie hinsichtlich ihrer Nebenwirkungen weiterer Optimierungen. Alternativ könnten Anwendungen mit niedrigeren Wirkstoffkonzentrationen erwogen werden, eventuell in Kombination mit einem physikalischen Therapieverfahren (z.B. Kryotherapie).

4.2 Molekularbiologischer Teil

4.2.1 Mutationsanalyse von TP53- und Ha-ras-Genen in AK

Neben dem Vergleich drei verschiedener Behandlungen von AK untersuchten wir alle entnommenen Hautproben auf Mutationen in zwei tumorrelevanten Genen: TP53 und Ha-*ras*. Bei der Auswertung der Ergebnisse hatten wir zwei Herangehensweisen. Erstens hatten wir die Möglichkeit Marker-Gene aus unbehandelten AK mit der aus Normalhaut der Patienten zu vergleichen und tumorspezifische Mutationen aufzudecken. Eine Besonderheit dabei war, dass alle prätherapeutisch untersuchten Gewebe-Proben ausschließlich aus AK-Läsionen ersten Grades (frühes PEK *in situ* nach der modifizierten Klassifikation von Cockerell et al.)¹¹ stammten. So konnten wir Mutationsraten der untersuchten Markergene bereits in frühen Stadien des PEK-Kontinuums darstellen. Zweitens untersuchten wir Proben nach den jeweiligen Behandlungen. Diese Konstellation ermöglichte es uns unter Berücksichtigung der klinischen Ergebnisse der Studie drei wesentliche Fragen zu diskutieren:

- Sind Mutationen von TP53 bzw. Ha-*ras* Ereignisse, die bereits im Rahmen der Tumorentstehung eine Rolle spielen? Oder sind Veränderungen, die erst in späteren Stadien entstehen, für eine Tumorprogression verantwortlich?
- Bestehen therapiebezogene Unterschiede auf der Ebene der Markergene, bzw. haben bestimmte Therapiemethoden einen mutagenen Einfluss?
- Haben Veränderungen in Marker-Genen einen prognostischen Wert im zeitlichen Verlauf der Plattenepithelkarzinome?

4.2.1.1 Geringe Mutationsraten von TP53- und Ha-ras-Genen in frühen Entwicklungsstadien der Plattenepithelkarzinome

Unter den 75 Biopsaten aus frühen AK (I. Grades) wiesen 6 Proben eine Mutation in einem der untersuchten Markergene auf. Dabei war das TP53-Gen mit 7% (5/75) das meist betroffene Gen. Eine Mutation lag im Exon 7, die restlichen vier im Exon 8. Im Vergleich dazu war das Ha-ras-Gen lediglich in einer Probe (1%, 1/75) mutiert.

Die stufenartige Akkumulierung genetischer Veränderungen ist das Schlüsselereignis im Laufe der Tumorentwicklung. Werden genetische Veränderungen nicht rechtzeitig repariert, beziehungsweise werden betroffene Zellen nicht durch Apoptose (programmierter Zelltod) oder das Immunsystem eliminiert, so kann es zur malignen Transformation der Zelle und derer unkontrollierten Proliferation kommen.

Das p53-Protein ist eines der Schlüsselemente der Apoptose und somit ein wichtiger Akteur in der Prävention der Tumorentwicklung. Das entsprechende TP53-Gen ist in über 50% der menschlichen Tumore mutiert, darunter auch im weißen Hautkrebs. Wissenschaftliche Studien über die Mutationsrate von TP53 in AK sind rar. Taguchi und Kollegen fanden Mutationen in der DNA in 3 von 27 AK-Läsionen (11%).²⁸ Über höhere Mutationsraten von 27% (12/45) berichtete die Arbeitsgruppe von Ziegler.⁶⁸ Einspahr und Kollegen fanden eine Mutationsrate des TP53-Gens (Exon 7 und 8) in Normalhaut von 7% und eine Mutationsrate von 48% in AK.⁶⁹ Solche Unterschiede in den Mutationsraten lassen sich unter anderem dadurch erklären, dass in den meisten Studien keine histologischen Spezifizierungen der untersuchten AK vorgenommen wurden. Somit wurden AK-Läsionen aller drei Schweregrade auf DNA-Mutationen untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden nur frühe AK-Läsionen (frühes PEK *in situ* nach der modifizierten Klassifikation von Cockerell et al.¹²). Eine weitere mögliche Erklärung für solche Unterschiede ist eine niedrige Anzahl untersuchter Proben.

Im Vergleich zu TP53 ist die Datenlage zu Ha-ras in AK geringer. Gene der *ras*-Familie sind die meist mutierten Onkogene in menschlichen Tumoren.^{32,70} Allerdings wurde ihre Relevanz für

den weißen Hautkrebs von einigen Studien in Frage gestellt, nachdem diese keine Mutationen der *Ha-ras*-Gene in humanen PEK finden konnten.^{35-37,39} Im Gegensatz dazu fanden drei andere Studien Mutationsraten des *Ha-ras*-Gens in 6% (3/50)³⁴, 46% (11/24)³⁸ und 6% (2/33)⁷¹ der untersuchten PEK. Zusammengefasst ergibt dies eine Mutationsrate des *Ha-ras*-Gens in epithelialen Hauttumoren von 10 bis 20%.^{70,72,73} Allerdings sind auch hier Untersuchungen an AK gering. Mutationen im Exon 1 des *Ha-ras*-Gens wurden in 4% (1/27)³⁹ bzw. 11% (2/19)⁷¹ der untersuchten AK-Läsionen gefunden. In unserer Studie beobachteten wir ebenfalls geringe Ergebnisse. Die *Ha-ras*-Mutationsrate ist somit niedrig in epithelialen Hauttumoren, allerdings ist deren Zunahme von frühen AK zum invasiven PEK zu beobachten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass Mutationen in den Genen TP53 und *Ha-ras* seltene Ereignisse im frühen (Grad 1) Stadium der AK sind. Dabei zeigte das TP53-Gen die höchste Mutationsrate mit 7%. Somit scheinen Mutationen im *Ha-ras*-Gen nicht an der PEK-Entstehung beteiligt zu sein. Dem hingegen erscheint eine initiale Schädigung des TP53-Gens als ein tumorinzierendes Ereignis möglich.

4.2.1.2 Ein signifikanter Unterschied in den Mutationsraten der Markergene im Vergleich der prä- und posttherapeutischen DNA-Untersuchungen konnte nicht belegt werden

Der Antimetabolit 5-Fluoruracil erwies sich in verschiedenen Tests zur Mutagenität *in vivo* und *in vitro* als mutagener Wirkstoff.^{74,75} Daten zu DNA-Analysen in Normalzellen der Haut nach lokaler Applikation von 5-FU gibt es kaum. Im Gegensatz dazu gibt es einige Studien, die eine Gentoxizität nach systemischer Einwirkung von 5-FU belegen, wenn auch diese im Vergleich zu den Ziel-Tumorzellen wesentlich geringer ausfällt.^{76,77} Insgesamt kann eine lokale mutagene Wirkung von 5-FU bisher nicht ausgeschlossen werden. Im Rahmen unserer Studie standen uns insgesamt 25 Hautproben zur Verfügung, die im Rahmen der lokalen AK-Therapie der Wirkung von 5%iger 5-FU-Creme ausgesetzt waren. Darunter zeigte eine Gewebeprobe aus abgeheilten AK (4%, 1/25) eine Neu-Mutation im Exon 8 des TP53-Gens. Dieselbe Mutation trat auch in

einer weiteren Biopsie nach Kryotherapie auf. Ein vermehrtes Auftreten von Mutationen in den untersuchten DNA-Abschnitten nach einer Therapie konnte demnach nicht belegt werden. Somit bestanden in unserer Arbeit keine Hinweise für einen mutagenen Effekt einer der angewandten Therapien. Dieses Ergebnis deutet auf eine niedrige bis fehlende Genotoxizität lokaler 5-FU-Anwendungen in Keratinozyten hin. Genauere Aussagen sollten sicherlich durch größer ausgelegte Studien sowie vollständige Genanalysen belegt werden.

4.2.1.3 Mutationen in TP53 und Ha-ras könnten einen prognostischen Wert für das Weiterbestehen und Fortschreiten eines PEK haben

Wie bereits erwähnt wurde, war die Zahl der insgesamt gefundenen Mutationen gering und nicht signifikant. Dennoch fallen zwei Besonderheiten in der Kryotherapie- bzw. Imiquimodgruppe auf.

In der Zusammenfassung der bislang vorliegenden Literaturdaten zu PEK ist ein Fortschreiten des PEK von frühen AK bis zum invasiven Tumor vom häufigeren Auftreten von TP53-Mutationen begleitet. Einspahr *et al.* konnten in ihrer Vergleichsstudie zeigen, dass die Zahl der TP53-Mutationen von Normalhaut über sonnengeschädigte Haut zu AK ansteigt. Die Mutationsraten invasiver PEK waren vergleichbar mit denen aus AK. Einspahr und Kollegen postulierten in ihren Untersuchungen, dass nicht nur die ansteigende Anzahl der Mutationen, sondern ihre Qualität zur invasiven PEK-Progression führen könnte.²⁹

Ziegler und Kollegen⁶⁸ zeigten durch den Vergleich von Mutationsraten in AK und dem umgebenden Normalhautgewebe, dass TP53 nicht allein ausschlaggebend für die Entwicklung einer AK zu sein scheinen. Es ist nicht auszuschließen, dass AK zuvor aus Klonen anderweitig mutierter Zellen entstehen. Im späteren Verlauf kann eine Zweitmutation im TP53-Gen die Tumorprogression auslösen. Als mögliche Mutations-*hot spots*“ des TP53-Gens in PEK definierten in ihrem p53-Review Giglia-Mari *et al.* die Kodons 248 und 278. Der letztere Mutationsort wurde als PEK-spezifisch beschrieben.³⁰

Zusammengefasst häufen PEK im Laufe ihrer Progression genetische Mutationen an, bis zu einem undefinierten Zeitpunkt eine bestimmte Mutation das invasive Wachstum auslöst. Eines der an dieser Progression beteiligten Gene ist sicherlich das TP53-Gen. *Ha-ras* könnte zum späteren Zeitpunkt eine Rolle spielen. Es ist offensichtlich, dass solche mutierten Zellen im Rahmen einer AK-Therapie möglichst restlos und frühzeitig eliminiert werden müssen. Anderenfalls behalten sie das Potential einer AK invasive PEK zu entwickeln.

In den posttherapeutischen Mutationsergebnissen unserer Studie fallen die 13% (4/32) der Neu-Mutationen in der Kryotherapiegruppe auf. Drei davon (9%) stammen aus dem Exon 8, und eine (3%) aus dem Exon 7. Alle vier Mutationen waren UV-spezifische C zu T, bzw. CC zu TT-Mutationen, die bereits in invasiven PEK anderer Studien beschrieben wurden. In der 5-FU-Gruppe war es eine Mutation (4%, 1/25), in der Imiquimod zwei (6%, 2/30). Vor einer Therapie wies keine der Proben in der Kryotherapiegruppe eine Mutation in den untersuchten Genen auf. In der Imiquimodgruppe waren 19% (5/26) der initial untersuchten AK-Proben mutiert.

In den klinischen Ergebnissen unserer Studie fallen die schlechten langfristigen Abheilungsergebnisse zum AZP II nach einer Kryotherapie auf, insbesondere die hohe Läsionsrezidivrate. Diese hohe Rezidivrate deutet auf eine unzuverlässige AK-Eliminierung durch Kryotherapie zum AZP I hin. Könnten also die vier Neu-Mutationen in dieser Gruppe eventuell das schlechte langfristige klinische Ergebnis erklären? Es wäre möglich, dass die Kryotherapie, methodisch bedingt, nicht in der Lage ist zuverlässig einzeln verbliebene AK-Zellen zu eliminieren, die Entwicklung weiterer Mutationen zu unterbinden und dadurch die PEK-Progression zu stoppen. Dafür würde auch die Tatsache sprechen, dass diese vier UV-spezifischen Mutationen in initial abgeheilten AK-Läsionen gefunden wurden.

Im Gegenteil dazu scheint Imiquimod die genetische Besonderheit der PEK-Entwicklung therapeutisch zu erfassen. Initial gehörten dieser Gruppe mit fünf Biopsaten die meisten der mutierten AK-Proben an. Nach Therapieende wiesen zwei der insgesamt 30 (7%) untersuchten Gewebeproben eine Neu-Mutation auf. Es ist also durchaus anzunehmen, dass die besseren langfristigen Abheilungsergebnisse mit einer Eliminierung mutierter Zellen nach Imiquimod-Therapie zusammenhängen könnten.

Weitere Untersuchungen mit einer größeren Patientenzahl und längerer Nachbeobachtungszeit sind für abgesicherte Aussagen notwendig. Solche Untersuchungen wären sowohl von wissenschaftlichem, als auch von klinischem Interesse. Wäre es beispielsweise möglich spezifische Mutationen zu definieren, die für die invasive Entartung eines PEK ursächlich sind, so könnte man Hoch-Risiko-Patienten selektieren und diese im Falle eines Therapieversagens aggressiv behandeln. Von besonderer Bedeutung wäre dies für immunsupprimierte Patienten.

Bis dahin bleiben allerdings der konsequente UV-Schutz im Sinne einer Primärprävention und als nächster Schritt eine zuverlässige AK-Therapie die wichtigsten Maßnahmen im Kampf gegen das invasive PEK.

5 Zusammenfassende Schlussfolgerungen

- Imiquimod zeigt eine zuverlässigere langfristige Abheilung aktinischer Keratosen im Vergleich zur Kryotherapie und Behandlung mit 5-FU. Eine Behandlung mit Kryotherapie bedarf einer histologischen Nachkontrolle und sollte im besten Falle mit einer flächendeckenden Therapiemethode kombiniert werden.
- Mutationen in den Genen TP53 und Ha-*ras* sind seltene Ereignisse im frühen (Grad 1) Stadium der AK wobei das TP53-Gen die höhere Mutationsrate von 7% zeigt. Somit scheinen Mutationen im Ha-*ras*-Gen nicht an der PEK-Entstehung beteiligt zu sein. Dem hingegen erscheint eine initiale Schädigung des TP53-Gens als ein tumorinzierendes Ereignis möglich.
- Hinweise für einen mutagenen Therapieeinfluss konnten in unserer Studie nicht belegt werden. Signifikante Unterschiede in prä- und posttherapeutischen Mutationsanalysen bestanden nicht. Das posttherapeutische Neu-Auftreten von Mutationen in der Kryotherapie-Gruppe könnte die schlechtere langfristige AK-Abheilungsrate nach Kryotherapie erklären, bedarf aber weiterer Untersuchungen.

6 Zusammenfassung

Einleitung: Aktinische Keratosen (AK) sind Plattenepithelkarzinome *in situ* der Haut und treten fast ausschließlich in sonnenexponierten Arealen auf. Der wichtigste ätiologische Faktor der AK ist die UV-Bestrahlung, welche ihre Wirkung vor allem auf der DNA-Ebene entfaltet. Studien berichten über unterschiedliche Mutationsraten des TP53-, sowie des Ha-*ras*-Gens in Plattenepithelkarzinomen und ihren Vorläufern – den AK.

Ziel der Studie: Diese Studie verglich die initiale sowie nach 12 Monaten bestehende klinische und histologische Abheilung von AK nach drei unterschiedlichen Behandlungen (Kryotherapie, 5%ige 5-FU-Salbe, 5%ige Imiquimod-Creme). Im molekularbiologischen Abschnitt wurden die vor und nach einer Therapie entnommen Biopsien aus aktinischen Keratosen bzw. abgeheilten Läsionen auf „*missense*“ Mutationen in den Exonen 7 und 8 des TP53- und Exon 1 des Ha-*ras*-Gens untersucht.

Patienten und Methoden: Die Aufteilung der 75 Studienpatienten erfolgte zufällig zu den drei Behandlungsgruppen. Die Patienten der Kryotherapie-Gruppe erhielten eine bis zwei Kryotherapieanwendungen (je 20 bis 40 sec pro Läsion). Patienten der 5-FU-Gruppe wurden zwei Mal täglich, 4 Wochen lang mit 5%iger 5-FU-Salbe lokal therapiert. Die letzte Patientengruppe wurde in einem oder zwei Zyklen (je über 4 Wochen drei Mal wöchentlich) lokal mit 5%iger Imiquimod-Creme therapiert.

Klinische Ergebnisse: 68% (17/25) der mit Kryotherapie, 96% (23/24) mit 5-FU und 85% (22/26) mit Imiquimod behandelten Patienten zeigten initial eine klinische Abheilung der AK ($p < 0,05$). Histologisch konnte eine Abheilung der AK in 32% (8/25) der Kryotherapie-, in 67% (16/24) der 5-FU- und in 73% (19/26) der Imiquimod-Patienten gesichert werden ($p < 0,01$). Das 12-Monats Follow-up zeigte eine hohe Rezidivrate bereits abgeheilter, sowie das Auftreten neuer AK in der 5-FU-, sowie Kryotherapie-Gruppe. Ein Ausbleiben von Läsionsrezidiven konnte in 28% (7/25) der Kryotherapie-, in 54% (13/24) der 5-FU- und 73% (19/26) der Imiquimod-Gruppe beobachtet werden ($p < 0,01$). Eine anhaltende Abheilung im gesamten behandelten Areal konnte in 4% (1/25), 33% (8/24), und 73% (19/26) der Kryotherapie-, 5-FU- bzw. Imiquimod-Gruppe erzielt werden ($p < 0,01$).

Molekularbiologische Ergebnisse: Unter den 75 vor einer Behandlung untersuchten AK-Biopsien wiesen 5 (7%) eine „*missense*“ und 1 (1%) eine „*nonsense*“ Mutation auf. Das Ha-*ras*-

Gen (Exon 1) war zu 1% mutiert, das TP53-Gen (Exon 7 und 8) zeigte mit 7% eine höhere Mutationsrate. Die posttherapeutischen Mutationsraten in insgesamt 87 Biopsien zeigten keinen signifikanten Unterschied zu den prätherapeutischen Ergebnissen. Insgesamt wiesen 8% (7/87) der Proben eine Mutation auf: das *Ha-ras*-Gen (Exon 1) war einmal mutiert (1%, 1/87), das Exon 7 des TP53-Gens war in 2 Proben (2%, 2/87) und das Exon 8 – in 4 Proben (5%, 4/87) mutiert (n.s.). Die Verteilung der Mutationen auf die einzelnen Behandlungsgruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied.

Schlussfolgerung: Eine Behandlung der aktinischen Keratosen mit Imiquimod zeigte langfristig das beste klinische Ergebnis. Das schlechtere langfristige Ergebnis in der Kryotherapie-Gruppe und das damit weiter bestehenden Risiko für ein invasives Plattenepithelkarzinom deutet auf eine therapeutische Unzuverlässigkeit der Methode hin. Molekulargenetische Ergebnisse dieser Studie zeigen eine niedrige Mutationsrate der TP53- sowie der *Ha-ras*-gene in frühen AK. Dieses Ergebnis weist erneut auf die Notwendigkeit einer frühzeitigen AK-Therapie hin, insbesondere hinsichtlich der steigenden Mutationsraten im Laufe der Progression eines Plattenepithelkarzinoms. Die in dieser Studie gezeigten niedrigen Mutationsraten des *Ha-ras*-Gens deuten darauf hin, dass dieses Gen nicht an der AK-Entstehung beteiligt zu sein scheint. Dagegen kann durch die nachgewiesenen Mutationsraten des Genes TP53 letzteres eher mit der Entstehung der Erkrankung assoziiert werden.

7 Abkürzungen

AK	aktinische Keratose
PEK	Platenpithelkarzinom
TP53	Tumorsuppressor-Gen-TP53
p53	Tumorsuppressor-Protein p53
n.s.	nicht signifikant
5-FU	5-Fluoruracil
AZP	Auswertzeitpunkt
LTE	Läsionstherapieerfolg
ATE	Arealtherapieerfolg
NPW	negativer prädikativer Wert
WT	Wildtyp

8 Literaturverzeichnis

1. Ackerman AB, Mones JM. Solar (actinic) keratosis is squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2006;**155**(1):9-22.
2. Dubreuilh W. Des hyperkeratoses circonscrites. *Ann Dermatol Venereol* 1896;**27**:1158-1164.
3. Freudenthal W. Verruca senilis und Keratoma senile. *Arch Dermatol Syph (Berlin)* 1926;**152**:505-28.
4. Pinkus H. Keratosis senilis; a biologic concept of its pathogenesis and diagnosis based on the study of normal epidermis and 1730 seborrheic and senile keratoses. *Am J Clin Pathol* 1958;**29**(3):193-207.
5. Memon AA, Tomenson JA, Bothwell J, Friedmann PS. Prevalence of solar damage and actinic keratosis in a Merseyside population. *Br J Dermatol* 2000;**142**(6):1154-9.
6. Frost C, Williams G, Green A. High incidence and regression rates of solar keratoses in a queensland community. *J Invest Dermatol* 2000;**115**(2):273-7.
7. Salasche SJ. Epidemiology of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2000;**42**(1 Pt 2):4-7.
8. Glogau RG. The risk of progression to invasive disease. *J Am Acad Dermatol* 2000;**42**(1 Pt 2):23-4.
9. Dodson JM, DeSpain J, Hewett JE, Clark DP. Malignant potential of actinic keratoses and the controversy over treatment. A patient-oriented perspective. *Arch Dermatol* 1991;**127**(7):1029-31.
10. Moy RL. Clinical presentation of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2000;**42**(1 Pt 2):8-10.
11. Rowert-Huber J, Patel MJ, Forschner T, et al. Actinic keratosis is an early in situ squamous cell carcinoma: a proposal for reclassification. *Br J Dermatol* 2007;**156** Suppl 3:8-12.
12. Cockerell CJ. Histopathology of incipient intraepidermal squamous cell carcinoma ("actinic keratosis"). *J Am Acad Dermatol* 2000;**42**(1 Pt 2):11-7.
13. Yantsos VA, Conrad N, Zabawski E, Cockerell CJ. Incipient intraepidermal cutaneous squamous cell carcinoma: a proposal for reclassifying and grading solar (actinic) keratoses. *Semin Cutan Med Surg* 1999;**18**(1):3-14.
14. Euvrard S, Kanitakis J, Pouteil-Noble C, Claudy A, Touraine JL. Skin cancers in organ transplant recipients. *Ann Transplant* 1997;**2**(4):28-32.
15. Harwood CA, McGregor JM, Proby CM, Breuer J. Human papillomavirus and the development of non-melanoma skin cancer. *J Clin Pathol* 1999;**52**(4):249-53.
16. Stockfleth E, Nindl I, Sterry W, Ulrich C, Schmook T, Meyer T. Human papillomaviruses in transplant-associated skin cancers. *Dermatol Surg* 2004;**30**(4 Pt 2):604-9.
17. Knippers R. Molekulare Genetik. 7. Auflage ed. Tübingen: Thieme Verlag, 1997.
18. Berking C. [Photocarcinogenesis. Molecular mechanisms and preventive strategies]. *Hautarzt* 2007;**58**(5):398-405.
19. Ziegler A, Leffell DJ, Kunala S, Sharma HW, Gailani M, Simon JA, Halperin AJ, Baden HP, Shapiro PE, Bale AE, et al. Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;**90**(9):4216-20.
20. Barbacid M. ras genes. *Annu Rev Biochem* 1987;**56**:779-827.
21. Lane DP. Worrying about p53. *Curr Biol* 1992;**2**(11):581-3.
22. Lamb P, Crawford L. Characterization of the human p53 gene. *Mol Cell Biol* 1986;**6**(5):1379-85.

23. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;**253**(5015):49-53.
24. Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* 2000;**77**:81-137.
25. Ziegler A, Jonason A, Simon J, Leffell D, Brash DE. Tumor suppressor gene mutations and photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol* 1996;**63**(4):432-5.
26. Brash DE, Ziegler A, Jonason AS, Simon JA, Kunala S, Leffell DJ. Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1996;**1**(2):136-42.
27. Bäckvall H, Strömberg, S., Gustafsson, A., Asplund, A., Sivertsson, A., Lundeberg, J, Ponten, F. Mutation spectra of epidermal p53 clones adjacent to basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. *Exp Dermatol*. 2004;**13**(10):643-50.
28. Taguchi M, Watanabe, S., Yashima, K., Murakami, Y., Sekiya, T., Ikeda, S. Aberrations of the tumor suppressor p53 gene and p53 protein in solar keratosis in human skin. 1994 **103**(4):500-3.
29. Einspahr J, Alberts, DS., Warneke, JA., Bozzo, P., Basye, J., Grogan, TM., Nelson, MA., Bowden, GT. Relationship of p53 mutations to epidermal cell proliferation and apoptosis in human UV-induced skin carcinogenesis. *Neoplasia* 1999;**1**(5):468-75.
30. Giglia-Mari G, Sarasin A. TP53 mutations in human skin cancers. *Hum Mutat* 2003;**21**(3):217-28.
31. Alberts B, Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. Essential Cell Biology. second edition ed: Wiley-VCH, 2003.
32. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;**3**(1):11-22.
33. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;**49**(17):4682-9.
34. Corominas M, Kamino H, Leon J, Pellicer A. Oncogene activation in human benign tumors of the skin (keratoacanthomas): is HRAS involved in differentiation as well as proliferation? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;**86**(16):6372-6.
35. Campbell C, Quinn AG, Rees JL. Codon 12 Harvey-ras mutations are rare events in non-melanoma human skin cancer. *Br J Dermatol* 1993;**128**(2):111-4.
36. Lieu FM, Yamanishi K, Konishi K, Kishimoto S, Yasuno H. Low incidence of Ha-ras oncogene mutations in human epidermal tumors. *Cancer Lett* 1991;**59**(3):231-5.
37. van der Schroeff JG, Evers LM, Boot AJ, Bos JL. Ras oncogene mutations in basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas of human skin. *J Invest Dermatol* 1990;**94**(4):423-5.
38. Pierceall WE, Goldberg LH, Tainsky MA, Mukhopadhyay T, Ananthaswamy HN. Ras gene mutation and amplification in human nonmelanoma skin cancers. *Mol Carcinog* 1991;**4**(3):196-202.
39. Taguchi M, Tsuchida T, Ikeda S, Sekiya T. Alterations of p53 gene and Ha-ras gene are independent events in solar keratosis and squamous cell carcinoma. *Pathol Int* 1998;**48**(9):689-94.
40. Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res* 2003;**63**(8):1727-30.
41. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953;**6**(5):963-8.
42. Zouboulis CC. Principles of cutaneous cryosurgery: an update. *Dermatology* 1999;**198**(2):111-7.

43. Drake L, Ceilley RI, Cornelison RL, Dobes WL, Dorner W, Goltz RW, Graham GF, Lewis CW, Salasche SJ, Turner ML, et al. Guidelines of care for actinic keratoses. Committee on Guidelines of Care. *J Am Acad Dermatol*. 1995 **32(1)**:95-8.
44. Szeimies RM, Karrer S, Radakovic-Fijan S, et al. Photodynamic therapy using topical methyl 5-aminolevulinic acid compared with cryotherapy for actinic keratosis: A prospective, randomized study. *J Am Acad Dermatol* 2002;**47(2)**:258-62.
45. Graham G. Advances in cryosurgery during the past decade. *Cutis* 1993;**52(6)**:365-72.
46. Chiarello S. Cryopeeling (extensive cryosurgery) for treatment of actinic keratoses: an update and comparison. *Dermatol Surg*. 2000;**26(8)** 728-32.
47. Thai KE, Fergin P, Freeman M, et al. A prospective study of the use of cryosurgery for the treatment of actinic keratoses. *Int J Dermatol* 2004;**43(9)**:687-92.
48. Merk H, Bickers, DR., Hazen, PG., Lynch, WS., Rasokat, H. *Dermatopharmakologie und Dermatotherapie*: Blackwell Wissenschaft., 1998.
49. Heidleberger C, Chaudhuri, NK., Danneberg, P., Mooren D., Griesbach, L., Dushinsky, R., Schnitzer, RJ., Plevin, E., Scheiner, J. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature* 1957;**179(4561)**:663-6.
50. Lawrence N, Cox, SE., Cockerell, CJ., Freeman, RG., Cruz, PD Jr. A comparison of the efficacy and safety of Jessner's solution and 35% trichloroacetic acid vs 5% fluorouracil in the treatment of widespread facial actinic keratoses. *Arch Dermatol*. 1995;**131(2)**.
51. Gupta AK. The management of actinic keratoses in the United States with topical fluorouracil: a pharmaco-economic evaluation. *Cutis* 2002;**70(2 Suppl)**:30-6.
52. Loven K, Stein L, Furst K, Levy S. Evaluation of the efficacy and tolerability of 0.5% fluorouracil cream and 5% fluorouracil cream applied to each side of the face in patients with actinic keratosis. *Clin Ther* 2002;**24(6)**:990-1000.
53. Jorizzo J, Stewart D, Bucko A, et al. Randomized trial evaluating a new 0.5% fluorouracil formulation demonstrates efficacy after 1-, 2-, or 4-week treatment in patients with actinic keratosis. *Cutis* 2002;**70(6)**:335-9.
54. Askew DA, Mickan SM, Soyer HP, Wilkinson D. Effectiveness of 5-fluorouracil treatment for actinic keratosis--a systematic review of randomized controlled trials. *Int J Dermatol* 2009;**48(5)**:453-63.
55. Hauschild A, Lischner S, Stockfleth E. Imiquimod: Wirkmechanismen und Therapieindikationen. *Akt Dermatol* 2003(29):335-340.
56. Lebwohl M, Dinehart S, Whiting D, et al. Imiquimod 5% cream for the treatment of actinic keratosis: results from two phase III, randomized, double-blind, parallel group, vehicle-controlled trials. *J Am Acad Dermatol* 2004;**50(5)**:714-21.
57. Stockfleth E, Meyer T, Benninghoff B, et al. A randomized, double-blind, vehicle-controlled study to assess 5% imiquimod cream for the treatment of multiple actinic keratoses. *Arch Dermatol* 2002;**138(11)**:1498-502.
58. Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol* 1988;**124(6)**:869-71.
59. Goldberg LH, Joseph AK, Tschen JA. Proliferative actinic keratosis. *Int J Dermatol* 1994;**33(5)**:341-5.
60. Guenther ST, Hurwitz RM, Buckel LJ, Gray HR. Cutaneous squamous cell carcinomas consistently show histologic evidence of in situ changes: a clinicopathologic correlation. *J Am Acad Dermatol* 1999;**41(3 Pt 1)**:443-8.
61. Gupta AK, Davey V, McPhail H. Evaluation of the effectiveness of imiquimod and 5-fluorouracil for the treatment of actinic keratosis: Critical review and meta-analysis of efficacy studies. *J Cutan Med Surg* 2005;**9(5)**:209-14.

62. Labandeira J, Pereiro M, Jr., Valdes F, Toribio J. Intermittent topical 5-fluorouracil is effective without significant irritation in the treatment of actinic keratoses but prolongs treatment duration. *Dermatol Surg* 2004;**30**(4 Pt 1):517-20.
63. Szeimies RM, Gerritsen MJ, Gupta G, et al. Imiquimod 5% cream for the treatment of actinic keratosis: results from a phase III, randomized, double-blind, vehicle-controlled, clinical trial with histology. *J Am Acad Dermatol* 2004;**51**(4):547-55.
64. Geisse J, Caro I, Lindholm J, Golitz L, Stampone P, Owens M. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. *J Am Acad Dermatol* 2004;**50**(5):722-33.
65. Lee PK, Harwell WB, Loven KH, et al. Long-term clinical outcomes following treatment of actinic keratosis with imiquimod 5% cream. *Dermatol Surg* 2005;**31**(6):659-64.
66. Tan JK, Thomas DR, Poulin Y, Maddin F, Tang J. Efficacy of imiquimod as an adjunct to cryotherapy for actinic keratoses. *J Cutan Med Surg* 2007;**11**(6):195-201.
67. Jorizzo JL, Markowitz O, Lebwohl MG, et al. A randomized, double-blinded, placebo-controlled, multicenter, efficacy and safety study of 3.75% imiquimod cream following cryosurgery for the treatment of actinic keratoses. *J Drugs Dermatol*;9(9):1101-8.
68. Ziegler A, Jonason, AS., Leffell, DJ., Simon, JA., Sharma, HW., Kimmelman, J., Remington, L., Jacks, T., Brash, DE. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 1994;**372**:773-776.
69. Einspahr JG, Alberts DS, Warneke JA, et al. Relationship of p53 mutations to epidermal cell proliferation and apoptosis in human UV-induced skin carcinogenesis. *Neoplasia* 1999;**1**(5):468-75.
70. Giehl K. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. *Biol Chem* 2005;**386**(3):193-205.
71. Spencer JM, Kahn SM, Jiang W, DeLeo VA, Weinstein IB. Activated ras genes occur in human actinic keratoses, premalignant precursors to squamous cell carcinomas. *Arch Dermatol* 1995;**131**(7):796-800.
72. Popp S, Waltering S, Herbst C, Moll I, Boukamp P. UV-B-type mutations and chromosomal imbalances indicate common pathways for the development of Merkel and skin squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2002;**99**(3):352-60.
73. Boukamp P. Non-melanoma skin cancer: what drives tumor development and progression? *Carcinogenesis* 2005;**26**(10):1657-67.
74. Abdunur S. Why is 5-fluorouracil a mutagen? *J Theor Biol* 1976;**58**(1):165-75.
75. Pringle CR. Genetic characteristics of conditional lethal mutants of vesicular stomatitis virus induced by 5-fluorouracil, 5-azacytidine, and ethyl methane sulfonate. *J Virol* 1970;**5**(5):559-67.
76. Villarini M, Dominici L, Piccinini R, et al. Assessment of primary, oxidative and excision repaired DNA damage in hospital personnel handling antineoplastic drugs. *Mutagenesis*.
77. Wisniewska-Jarosinska M, Sliwinski T, Kasznicki J, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of capecitabine in head and neck cancer and normal cells. *Mol Biol Rep*.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Multiple AK an sonnenexponierten Arealen (A) der Handoberflächen und (B) der Kopfhaut (Glatze).....	3
Abbildung 1-2: Mutations-„hot spots“ des TP53-Gens in 132 aktinischen Keratosen. Unten - die TP53-Struktur (Exons 2-11, hoch konservierte Sequenzabschnitte I-V); oben - Mutationshäufigkeiten des jeweiligen TP53-Codons (1-393). Modifiziert aus „The UMD p53 database“, Linn Hjortsberg and Thierry Soussi (http://p53.free.fr).....	9
Abbildung 2-1: Behandlungsareal	17
Abbildung 2-2: Studienprotokoll im zeitlichen Ablauf. Horizontale Darstellungen: Kästchen - unmittelbare Therapieanwendungszeit; ganze Linie - Pause nach einer Therapie bis zum eigentlichen Behandlungsende (2 Wochen nach Kryotherapie, 4 Wochen nach letzter Imiquimod-Applikation, in der 5-FU-Gruppe wurde keine Therapiepause eingelegt), gestrichelte Linie – jeweils vier Wochen Beobachtungszeitraum nach Therapieende bis zum ersten AZP (AZP I), Boxen – Biopsieentnahme zur histologischen Diagnosesicherung und molekularbiologische Untersuchungen.	18
Abbildung 3-1: (A) Behandlungsareal mit multiplen AK vor einer Therapie; (B) Behandlungsareal nach 4 Wochen Imiquimod-Therapie (inflammatorische therapieunterstützende Reaktion im Behandlungsareal); (C) Behandlungsareal zum AZP I nach einer 2x4 wöchigen Therapie mit Imiquimod (klinisch abgeheilte AK im gesamten Behandlungsareal).....	30
Abbildung 3-2: (A) Behandlungsareal mit multiplen AK vor einer Therapie; (B) Behandlungsareal nach 4 Wochen 5-FU-Therapie; (C) Behandlungsareal zum AZP I nach einer Therapie mit 5-FU (klinisch abgeheilte AK im gesamten Behandlungsareal).....	30
Abbildung 3-3: Abheilungsergebnisse zum AZP I in den drei Therapiegruppen im Vergleich: klinisch (n.s.), histologisch (Imiquimod vs. Kryotherapie $p < 0,01$; 5-FU vs. Kryotherapie $p < 0,05$). NPV – negativer prädikativer Wert.....	31
Abbildung 3-4: Gegenüberstellung der klinischen Abheilungsraten zum AZP II vs. initiale klinische Abheilung zum AZP I (genaue Angaben siehe Tabelle 3-2).....	33

Abbildung 3-5: Beispiel eines als „ausreichend“ eingestuften kosmetischen Erfolges nach einer Therapie mit 5-FU (AZP I).....	34
Abbildung 3-6: Diagramm zum kosmetischen Erfolg zum AZP I (Beschriftungserläuterungen: Arzt - Bewertung seitens des Studienarztes; Patient - Bewertung seitens des Patienten; Erläuterungen der einzelnen Beurteilungskriterien siehe 2.1.3.2).....	35
Abbildung 3-7: Diagramm zum kosmetischen Erfolg zum AZP II (Beschriftungserläuterungen: Arzt: Bewertung seitens des Studienarztes; Patient: Bewertung seitens des Patienten; Erläuterungen der einzelnen Beurteilungskriterien siehe 2.1.3.2).....	35
Abbildung 3-8: Beispiel eines T zu A Nukleotidaustausches im Exon 7 des TP53-Gens in einer der nicht behandelten AK-Biopsie (TP53 Exon7: A104T (D259V))	37
Abbildung 3-9: Verteilung der Mutationsraten in den Marker-Genen TP53 (Exon 7 und Exon 8) und Ha- <i>ras</i> (Exon 1) in frühen AK vor einer Therapie (bezogen auf alle prätherapeutisch untersuchten AK).....	38
Abbildung 3-10: Vergleich von Mutationsraten in den 3 Marker-Genen in AK aus den drei Therapiegruppen vor einer Behandlung (n.s.).....	41
Abbildung 3-11: Vergleich von Mutationsraten in den 3 Marker-Genen in AK aus den drei Therapiegruppen nach einer Behandlung (*abgeheilte und nicht abgeheilte AK werden nicht unterschieden). (n.s.).....	41
Abbildung 3-12: Erläuterung des Einbuchstaben-Codes für Nukeotid-Austausch-Mutationen (<i>missense</i>) auf Nukleotid-, sowie Aminosäureebene.	42

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Erläuterung der einzelnen Stanzbiopsien.....	19
Tabelle 2-2: Temperaturprotokoll für Marker-Gene-PCR TP53 und Ha- <i>ras</i>	25
Tabelle 2-3: Primer der Mutationsanalyse der Marker-Gene	26
Tabelle 3-1: Basischarakteristika der Studienpopulation	29
Tabelle 3-2: Läsions- und Arealtherapieerfolge zum AZP II (alle Angaben basieren auf der klinischen Diagnose).....	33
Tabelle 3-3: Mutationsspektrum der Studienproben.....	42

Erklärung

„Ich, Nadja Krawtchenko, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Ha-ras- und TP53-Mutationsmuster aktinischer Keratosen bei einer therapeutischen Vergleichsstudie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift