

Aus dem Institut für Pathologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin

Direktor: Prof. Dr. med. Manfred Dietel

Habilitationsschrift mit dem Thema

Prognostische Relevanz der Polokinasen in soliden Tumoren – Implikationen für neue chemotherapeutische Ansätze

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach Pathologie

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Dr. med. Wilko Weichert

geboren am 22.09.1970 in Tübingen

Datum der Habilitation: 15.05.2007

Dekan: Prof. Dr. Martin Paul

Gutachter: Prof. Dr. Wolff Schmiegel, Medizinische Klinik, Ruhr-Universität, Bochum
Prof. Dr. Hans-Heinrich Kreipe, Institut für Pathologie, MH Hannover

Widmung

Gewidmet meinen Eltern Dagmar und Willibald

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	4
1.1.	<i>Epidemiologie der malignen Tumorerkrankungen.....</i>	4
1.2.	<i>Klassische Behandlungsstrategien maligner Tumoren.....</i>	5
1.3.	<i>Neue Ansätze im Bereich der Chemotherapie.....</i>	7
1.4.	<i>Die Familie der Polokinasen</i>	8
1.5.	<i>Funktion der Polokinasen</i>	9
1.6.	<i>Polokinasen und Oncogenese</i>	10
1.7.	<i>Polokinasen und Chemotherapie</i>	12
2.	Zielstellung.....	14
3.	Ergebnisse	15
3.1.	<i>Die Überexpression von PLK-Isoformen in Ovarialkarzinomen hat prognostische Bedeutung.....</i>	15
3.2.	<i>Prostatakarzinome mit hohem Malignitätsgrad zeigen eine erhöhte PLK1-Expression.....</i>	18
3.3.	<i>Die Überexpression von PLK1 ist ein unabhängiger Prognosefaktor im kolorektalen Karzinom.....</i>	20
3.4.	<i>PLK-Isoformen im Brustkrebs: Expression und prognostische Bedeutung</i>	25
3.5.	<i>Expressionsmuster von PLK1 in Magenkarzinomen und deren Lymphknotenmetastasen.....</i>	29
3.6.	<i>PLK1 wird in Pankreaskarzinomen und deren Vorläuferläsionen überexprimiert.....</i>	34
4.	Diskussion	36
4.1.	<i>Expression der Polokinasen in soliden Tumoren</i>	36
4.2.	<i>Prognostische Relevanz der Polokinasen</i>	39
4.3.	<i>Ursachen und Folgen der veränderten PLK-Isoform-Expression</i>	40
4.4.	<i>Implikationen für eine zielgerichtete Chemotherapie</i>	41
5.	Zusammenfassung	43
6.	Literaturverzeichnis	44
7.	Danksagung	55

Abkürzungsverzeichnis

APC	Anaphase-induzierender Komplex (anaphase promoting complex)
ATM	Ataxia teleangiectasia-mutiert (ataxia telangiectasia mutated)
ATR	Ataxia teleangiectasia und Rad3 assoziiertes Protein (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein)
Bax	Bcl-2-assoziiertes Protein X (Bcl-2-associated protein X)
BRCA	Brustkrebsgen (breast cancer gene)
cdc	Zellzykluskontrolle (cell division control)
CGH	Komparative genomische Hybridisierung (comparative genomic hybridization)
Chk	Checkpoint-Kinase (checkpoint kinase)
DCIS	Duktales Carcinoma in situ (ductal carcinoma in situ)
dn	Dominant negativ (dominant negative)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
FIGO	Internationale Vereinigung für Gynäkologie und Geburtshilfe (Fédération Internationale de Gynécologie et Obstétrique)
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (fluorescence in situ hybridization)
FNK	Fibroblastenwachstumsfaktor-induzierbare Kinase (fibroblast growth factor-inducible kinase)
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie (pancreatic intraepithelial neoplasia)
PIN	Prostatische intraepitheliale Neoplasie (prostate intraepithelial neoplasia)
PLK	Polokinase (Polo-like kinase)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PSA	Prostata-spezifisches Antigen (prostate specific antigen)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
SAK	Snk-Aktin Kinase (Snk actin kinase)
siRNA	kurze interferierende RNA (short interfering RNA)
SNK	Seruminduzierbare Kinase (serum-inducible kinase)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World health organization)

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie der malignen Tumorerkrankungen

In den Todesursachenstatistiken industrialisierter Länder stehen Krebserkrankungen nach den kardiovaskulären Erkrankungen seit Jahrzehnten an zweiter Stelle. Die Inzidenz maligner Tumorerkrankungen wurde anhand von Daten, die bis zum Jahr 2000 durch die bevölkerungsbezogenen Krebsregister in Deutschland erhoben wurden, auf ca. 200 000 Fälle pro Jahr für die männliche Bevölkerung und ca. 194 700 Fälle pro Jahr für die weibliche Bevölkerung geschätzt (1). In den USA wird von einer geschätzten Gesamtinzidenz von 1 399 790 für beide Geschlechter für das Jahr 2006 ausgegangen (2). Damit machen die Krebserkrankungen im Jahr 2005 hier ca. 23% der Gesamttodesfälle aus. Während die Mortalität an kardiovaskulären Erkrankungen in den letzten Jahrzehnten stetig abnahm, blieb die Mortalität der malignen Tumorerkrankungen trotz aller Anstrengungen in Forschung und Therapie im gleichen Zeitraum nahezu unverändert. Dieser Trend wird verdeutlicht durch Zahlen aus den USA, wo für die unter 85 jährigen von 1975 bis 2002 von einer Verminderung der Todesrate an kardiovaskulären Erkrankungen von ca. 320 Fällen auf ca. 160 Fälle pro Jahr pro 100 000 Einwohner ausgegangen wird, während die Todesrate durch Krebserkrankungen im gleichen Zeitraum mit ca. 180 Fällen pro Jahr pro 100 000 Einwohner nahezu konstant blieb. Für die über 85 jährigen sank die Inzidenz der kardivaskulären Erkrankungen im entsprechenden Zeitraum von ca. 7500 Fällen auf ca. 6600 Fälle pro Jahr pro 100 000 Einwohner. Auch in dieser Altersgruppe blieb im gleichen Zeitraum die Todesrate durch maligne Tumorerkrankungen mit ca. 1600 Fällen pro Jahr pro 100 000 Einwohner nahezu konstant (2).

In der Gruppe der malignen Tumorerkrankungen spielen die epithelialen Tumoren, die Karzinome, in beiden Geschlechtern eine herausragende Rolle. Bis zum Jahr 2000 entfielen für die männliche deutsche Bevölkerung die Mehrzahl der tödlichen Krebserkrankungen auf Malignome der Lunge (26,8%) des Darms (12,5%), der Prostata (10,2%), des Magens (6,3%), des Pankreas (5,2%) und der Niere (3,6%). Bei Frauen war der Hauptanteil der Krebstodesfälle auf Tumorerkrankungen der Brustdrüse (17,8%) des Darms (15,3%), der Lunge (9,8%), des Pankreas (6,3%), des Magens (6,2%) und der Ovarien (6,1%) zurückzuführen (1). Eine zumindest ähnliche Verteilung der häufigsten zum Tode führenden Tumoren wird auch aus den USA berichtet (2), während sich in einigen industrialisierten asiatischen Ländern zum Teil deutliche Unterschiede in Inzidenz und Mortalität in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation finden. So spielen in Japan beispielsweise nach wie

vor maligne Tumorerkrankungen des Magens mit einem geschätzten Anteil von 20,7% an der Gesamtinzidenz maligner Tumorerkrankungen für das Jahr 1997 eine deutlich größere Rolle als in westlichen industrialisierten Ländern (3).

1.2. Klassische Behandlungsstrategien maligner Tumoren

Während, wie bereits eingangs erwähnt, alle Forschungs- und Behandlungserfolge der letzten Jahrzehnte nicht zu einem Rückgang der Gesamtmortalität von malignen Tumorerkrankungen geführt haben, so sind doch für einige selektierte Tumorentitäten erhebliche Fortschritte erzielt worden.

Prinzipiell fußt die Behandlung maligner Tumoren nach wie vor auf drei Säulen, der chirurgischen Behandlung, der Strahlentherapie sowie der adjuvanten/neoadjuvanten oder alleinigen Chemotherapie. Grundsätzlich gilt jedoch das Diktum, dass abgesehen von sehr wenigen Ausnahmen eine vollständige Heilung lediglich unter Einbeziehung radikaler chirurgischer Maßnahmen erreicht werden kann. Dies gilt für alle hier im Einzelnen genannten Krebserkrankungen.

Die in den vorliegenden Studien untersuchten Entitäten wurden vornehmlich unter dem Kriterium der Häufigkeit des Auftretens beziehungsweise der klinischen Relevanz ausgewählt.

Im Folgenden wird der Status quo der Tumorbehandlung der Karzinome, mit denen sich die vorliegende Arbeit schwerpunktmäßig beschäftigt, kurz vorgestellt.

Das Mammakarzinom gehört zu den Tumorerkrankungen, für die große Fortschritte vor allem in der Früherkennung, aber auch in der adjuvanten/neoadjuvanten und palliativen Chemotherapie gemacht wurden, dennoch erbrachte der medizinische Fortschritt auch für diese Entität lediglich einen moderaten Abfall der Mortalität in den letzten 10 Jahren. Darüber hinaus stellt die Erkrankung an einem Mammakarzinom selbst für solche Patientinnen mit lediglich moderatem Risiko eines Fortschreitens der Erkrankung und mit guter Prognose eine erhebliche psychische Belastung dar. Chirurgische Therapie, Bestrahlung, hormonelle Therapie und Chemotherapie bilden die Eckpfeiler der Behandlung dieser Tumorentität (4), wobei neben der herausragenden Bedeutung adäquater chirurgischer Maßnahmen vor allem der neuartigen, so genannten gezielten Chemotherapie („targeted therapy“) im Sinne einer Blockade der Tyrosinrezeptorkinase erbB2/Her2- durch Antikörper, eine immer größere Bedeutung in kurativer Therapie und Palliation zufällt. Eine nähere Erörterung dieses Themenkomplexes folgt später in dieser Einleitung.

Anders stellt sich die aktuelle Situation für das Ovarialkarzinom dar. Da dieser Tumor in der Regel erst in fortgeschrittenen, nicht mehr organbegrenzten Tumorstadien erkannt wird, ist zumeist eine kurative Behandlung nicht mehr möglich (5). Verschiedene, meist zunächst Platin-basierte Chemotherapieregime in Kombination mit wiederholter tumorreduktiver Chirurgie führen dennoch häufig zu einer deutlichen Lebensverlängerung der jedoch oftmals leider noch relativ jungen Patientinnen.

Für das Prostratakarzinom gilt, dass Strahlentherapie und/oder chirurgische Therapie im Sinne einer radikalen Prostatovesikuloektomie mit pelviner Lymphadenektomie, teilweise in Kombination mit hormoneller Therapie bei organbegrenzten Tumoren, zu einer Heilung oder zumindest zu einer deutlichen Lebensverlängerung bei dem größten Teil der zumeist alten Patienten führen (6). Dies gilt nicht für solche Patienten mit weit fortgeschrittenem lokalem Tumorwachstum und/oder Fernmetastasen, für die ein kurativer Therapieansatz nicht mehr möglich ist. Diese Patienten erhalten unterschiedliche Kombinationen aus Bestrahlung und/oder hormoneller Therapie sowie Chemotherapie zur Eindämmung unkontrollierten, destruierenden Tumorwachstums vor allem im Bereich von Wirbelkörpermetastasen.

Für die Karzinome des Kolons besteht mittels radikaler Chirurgie in Frühstadien häufig noch Aussicht auf eine kurative Behandlung. Die chirurgische Therapie wird in einigen Fällen begleitet von einer Kombination aus lokaler Bestrahlung (vor allem Rektum) und adjuvanter/neoadjuvanter Chemotherapie in der Regel mittels 5-Fluorouracil und Levamisol (7). Auch für diese Tumorentität gibt es neue Behandlungsansätze aus dem Feld der gezielten Chemotherapie, gerichtet gegen den EGF-Rezeptor (8). Jedoch gilt auch für diese Tumorentität, dass Patienten mit fortgeschrittenem lokalem Befund und/oder Fernmetastasen, trotz aller Erfolge im Bereich der Metastasenchirurgie, nur zu einem sehr kleinen Teil kurativ behandelt werden können.

Das Magenkarzinom ist im Frühstadium durch Gastrektomie mit begleitender adjuvanter Chemotherapie heilbar. Für Patienten jedoch, die fortgeschrittene Tumorstadien aufweisen, erscheinen die zurzeit existierenden Therapieoptionen nur sehr eingeschränkt erfolgreich, was auf die relative Ineffektivität von Radio-/und Chemotherapie in dieser Tumorentität zurückzuführen ist, diese Patienten versterben in den allermeisten Fällen innerhalb eines Jahres (9).

Das Pankreaskarzinom ist in der Gruppe der hier vorgestellten Tumoren das Malignom mit der schlechtesten Gesamtprognose. Für diese Tumorentität entspricht die Inzidenz annähernd der Mortalität. Alle bis dato bekannten Radio-/Chemotherapieansätze führen lediglich zu einer geringen bis moderaten Lebensverlängerung der Patienten (10). Auch radikale

chirurgische Verfahren bei lokal begrenzten Tumorstadien führen in den wenigsten Fällen zu einer Heilung. Das Gros der Patienten verstirbt innerhalb des ersten Jahres nach Diagnosestellung.

1.3. Neue Ansätze im Bereich der Chemotherapie

Durch die sich rasch entwickelnden Methodiken im Bereich der molekularen Tumorforschung war es in den letzten Jahren möglich, einen tieferen Einblick in die Mechanismen zu gewinnen, die zu einer malignen Entartung der Zelle und damit zur Tumorentstehung führen. Darüber hinaus wurden die molekularen Charakteristika einer Krebszelle näher definiert und in Gruppen zusammengefasst. Hannahan und Weinberg (11) beschreiben diese molekularen Tumorzellalterationen in ihrer richtungweisenden Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2000 als: Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, fehlende Sensitivität für wachstumshemmende Signale, Vermeidung von Apoptose, Kontrolle der Angiogenese, unendliches replikatives Potential und Fähigkeit zur Invasion und Metastasenbildung. Zusammengenommen bewirken diese veränderten Zelleigenschaften häufig eine ausgeprägte, für Tumoren charakteristische Deregulation der mitotischen Aktivität.

Die zunehmend präzise, inhaltlich-funktionelle Definition dieser veränderten Zelleigenschaften führte in den letzten Jahren dazu, dass verstärkte Anstrengungen unternommen wurden, den rein „empirischen“ Ansatz der Chemotherapieentwicklung zu verlassen und sich gezielt auf die Hemmung solcher Proteine und Proteingruppen zu konzentrieren, die in der Signaltransduktion der genannten alterierten Zelleigenschaften eine herausragende Rolle spielen. Dieser neue Ansatz der Chemotherapie wurde unter dem Namen „targeted therapy“ oder „zielgerichtete Chemotherapie“ bekannt. Die Hemmung von speziellen Proteinen und Proteingruppen kann dabei beispielsweise durch kleine chemische Moleküle (so genannte „small molecules“) oder durch Antikörper erfolgen, auch einige RNA-inhibierende Methodiken befinden sich in Erprobung.

In den letzten Jahren feierte dieser neue Zweig der Chemotherapieforschung bereits überzeugende Erfolge. So ist eine gezielte Hemmung der Rezeptortyrosinkinase erbB2/Her2 mittels Antikörpern (Trastuzumab) aus der Behandlung des Mammakarzinoms nicht mehr wegzudenken (12), auch die Hemmung der Rezeptortyrosinkinase Kit mittels eines kleinen chemischen Moleküls (Imatinib) eröffnete in der Behandlung von Leukämien (13) und gastrointestinalen Stromatumoren (14) neue Perspektiven. Schließlich sind Antikörper (Cetuximab) und kleine chemische Moleküle (Gefitinib) zur Hemmung des EGF-Rezeptors

seit kurzem zur Kombinationsbehandlung des fortgeschrittenen Kolonkarzinoms (8) und des fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (15) zugelassen. Das Beispiel der EGF-Rezeptorhemmer verdeutlicht jedoch auch, dass eine eingehende Analyse der zu behandelnden Tumoren im Hinblick auf Expression, Mutationsstatus und biologische Bedeutung des auszuschaltenden Zielproteins vor der klinischen Erprobung neuer Medikamente dringend notwendig ist (16), um die Kosten der Entwicklung in vertretbarem Rahmen zu halten und nicht mögliche Behandlungseffekte aufgrund falscher Patientenauswahl zu übersehen und schließlich um eine zusätzliche Schädigung der Patienten durch unnötige und unwirksame Behandlung zu vermeiden.

1.4. Die Familie der Polokinasen

Die ersten Vertreter dieser Familie von Serin/Threoninkinasen wurden in *Drosophila melanogaster* (*Polo*) (17,18) und *Saccharomyces cerevisiae* (*cdc5*) (19) Mutanten beschrieben, die nicht in der Lage waren, eine geordnete mitotische Zellteilung durchzuführen. In den Folgejahren schloss sich die Entdeckung einer variablen Anzahl von Polo-Homologa in unterschiedlichsten Organismen wie Bakterien, Hefen, Mäusen und Menschen an (20,21). Bei den Polokinasen handelt es sich um in Eukaryonten hochkonservierte Proteine.

Die Familie der humanen Polokinasen besteht zurzeit aus drei klassischen Vertretern, die zunächst mit den Namen PLK (Polo-like kinase), SNK (serum-inducible kinase) und FNK (fibroblast-growth-factor-inducible kinase) benannt wurden, jedoch in der aktuellen Literatur unter den Namen PLK1, PLK2 und PLK3 firmieren (22-28). Die Isoenzyme dieser Proteinfamilie teilen eine verwandte katalytische Domäne am aminoterminalen Ende der Proteine sowie charakteristische, repetitive Sequenzmotive, die so genannten Poloboxen, nahe des carboxyterminalen Endes der Proteine. Die Funktion der Polobox beinhaltet vor allem die Sicherstellung der subzellulären Lokalisation der Proteine im Bereich mitotisch relevanter Strukturen der Zelle (29). Ein vierter Vertreter der Familie der Polokinasen wurde vor einiger Zeit beschrieben (30,31) und als SAK (Snk actin kinase) bzw. PLK4 benannt (32). Dieses Protein weist im Gegensatz zu den genannten Isoformen lediglich eine Polobox auf.

1.5. Funktion der Polokinasen

Da sich die funktionelle molekulare „*Polo*“-Forschung der letzten Jahre vornehmlich auf die PLK1 konzentrierte, ist deren Funktion gut charakterisiert, während nur spärliche und teilweise widersprüchlich Daten zu weiteren PLK-Isoformen vorliegen.

Man weiß heute, dass PLK1 die Rolle eines zentralen essentiellen Zellzyklusregulators sowohl nicht transformierter als auch maligne transformierter Zellen innehat (33,34,35). Die Expression von PLK1 in der Zellkultur steigt in der S-Phase an und erreicht ihren Gipfel zur G2/M Phase. In G2/M erreicht auch die Kinaseaktivität des Proteins ein Maximum. PLK1 greift mittels seiner Funktion als Kinase regulierend in alle Phasen der Mitose ein (Abbildung 1). So phosphoryliert PLK1 *cdc25C* (36,37,38,39) und *cyclinB1* (40), was in Konsequenz zu einer Translokation des *cdc2/cyclinB1*-Komplexes in den Nukleus führt, ein Vorgang, der für den Eintritt einer Zelle in die Prophase der Zellteilung zwingend notwendig ist. Weiterhin spielt PLK1 bei der Reifung von Zentrosomen (41,42,43), der bipolaren Spindelausbildung (44) und der Zerstörung der so genannten Kohesine („*cohesins*“) eine zentrale Rolle (45). Später in der Mitose reguliert PLK1 die Aktivierung von Komponenten des so genannten Anaphase-induzierenden Komplexes (APC) (46,47) und greift schließlich regulierend in die Zytokinese der Zelle ein (48,49,50). Weiterhin spielt PLK1 in der Interaktion von DNA-Schädigung und Mitoseregulation eine wichtige Rolle (51,52).

Daten zur Funktion der PLK3 sind spärlich und teilweise widersprüchlich. Einige Autoren postulieren analog zur PLK1 eine Akkumulation von Protein und einen Aktivitätsgipfel in der späten S-Phase und in G2/M (53,54), während in anderen Arbeiten keine Veränderung der Proteinexpression und des Phosphorylierungsstatus im Verlauf des Zellzyklus beobachtet werden konnte (55).

In *Saccharomyces cerevisiae* ließ sich sowohl mittels PLK3 als auch mittels PLK1 eine *Cdc5* (das *Polo*-Homolog dieser Spezies) temperatursensitive Mutation funktionell antagonisieren, was auf eine Überlappung der Funktion beider Isoformen hindeutet (53).

Weiterhin zeigt PLK3 ähnlich wie PLK1 eine Assoziation mit dem Spindelapparat (56,57,58). PLK3 phosphoryliert analog zu PLK1 ebenfalls *cdc25C*, jedoch scheint die Phosphorylierung in unterschiedlichen Zellsystemen und möglicherweise abhängig von der subzellulären Lokalisation entweder aktivierende (59) oder inaktivierende (60) Wirkung auf das Protein zu haben. Die funktionellen Implikationen der weiteren PLK-Isoformen werden hier nicht im

Detail erwähnt, da die nachfolgende Arbeit sich lediglich mit den Isoformen PLK1 und PLK3 beschäftigt.

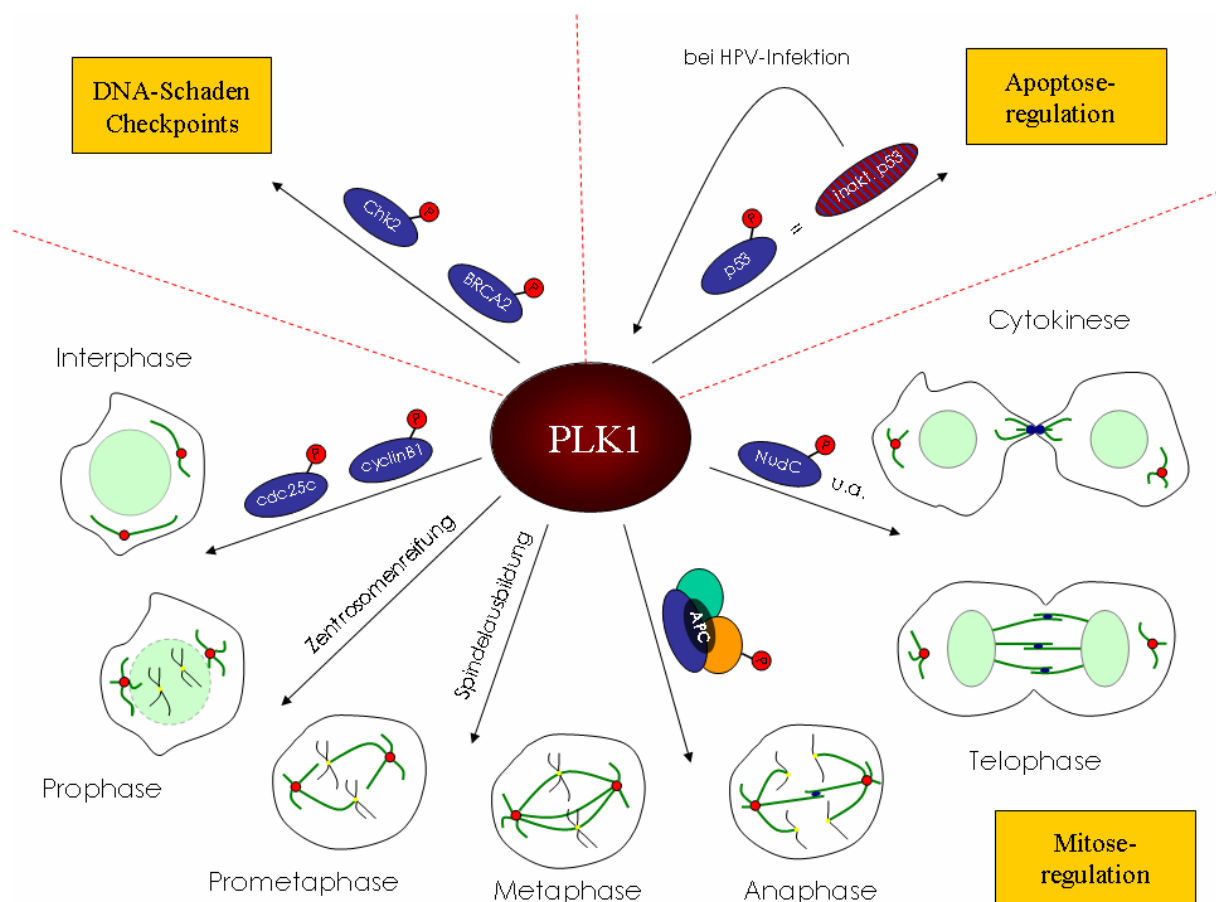


Abbildung 1: Darstellung einiger Funktionen der am besten untersuchten Polokinase-Isoform PLK1 (angelehnt an 33). Eine detaillierte Beschreibung der dargestellten Funktionen findet sich im Text.

1.6. Polokinasen und Oncogenese

Nachdem die herausragende Rolle der Proteine dieser Familie in der Zellzyklusregulation erkannt war, fokussierte sich das Forschungsinteresse zunehmend auf die Rolle dieser Proteine in der Krebsentstehung und Krebsentwicklung (61,62).

In Hefen (44) und Drosophila (63) konnte sowohl durch Ausschaltung als auch durch Überexpression der Polo-Homologa der entsprechenden Spezies gezeigt werden, dass die intakte Ausbildung einer bipolaren, mitotischen Spindel zwingend die Anwesenheit einer physiologischen Menge an funktionsfähiger Polokinase erfordert. Die entsprechend behandelten Zellen entwickelten mono- und multipolare, abnorme Mitosespindeln und in

einigen Zellen kam es zu einem Zellzyklusarrest in einem metaphasenahen Stadium der Zellteilung. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in HeLa-Zellen mittels Injektion von Antikörpern, gerichtet gegen PLK1, erzielt werden (41). Weiterhin ist bekannt, dass der intakte zentrosomale Teilungszyklus einer Zelle ebenfalls auf einer intakten Funktion von PLK1 und wohl auch PLK3 fußt (41,58). Diese PLK-Funktionen sind insofern für die Krebsentstehung von Interesse, als bekannt ist, dass eine zentrosomale Dysregulation ebenso wie Störungen im Bereich der Mitosespindel zu Aneuploidie und genetischer Instabilität führen können, beides typische Eigenschaften einer Krebszelle.

Darüber hinaus bewirkt eine ektope Expression von aktiver PLK1 in U2OS Osteosarkom-Zellen eine Aufhebung des G2-Blocks, der nach DNA-Schädigung eintritt (51).

Smith und Coautoren konnten in einem wichtigen Experiment zeigen, dass eine Überexpression muriner PLK1 in NIH3T3-Zellen zu einem transformierten Phänotyp dieser Zelllinie führt, dadurch verdeutlicht, dass die behandelten Zellen sowohl in der Lage waren Kolonien in Soft-Agar als auch Tumoren in Nacktmäusen zu bilden (64). Passend zu diesen Ergebnissen konnten van Vugt und Kollegen anhand von U2OS-Zellen nachweisen, dass eine Depletion der PLK1 in dieser Zelllinie zu einem Verlust der Fähigkeit dieser Zellen führt, Kolonien auszubilden (65).

Ein weiteres interessantes Funktionsfeld der PLK1 ist die Interaktion der Kinase mit p53. PLK1 phosphoryliert p53 *in vitro* (66) und bindet physikalisch im Bereich der DNA-Bindungsregion des Proteins. Expression von PLK1 und p53 in der p53 defizienten Lungenkarzinomzelllinie H1299 führt zu einem Verlust der p53 vermittelten Expression von p21^{Waf1}, mdm2 und Bax, während eine Kinase-defiziente Mutante von PLK1 diesen Effekt nicht vermittelt. Die Autoren schlossen, dass PLK1 die proapoptotische Funktion von p53 inhibieren kann (67). Passend zu diesen Ergebnissen konnten Liu und Erikson zeigen, dass eine Depletion der PLK1 zu einer Erhöhung der Stabilität der p53-Aktivität führt (68). Für PLK3 hingegen wurde eine durch Phosphorylierung vermittelte Erhöhung der Stabilität von p53 postuliert (66).

Eine weitere Implikation der PLK1 in der Oncogenese ergab sich aus Studien von Pratel und Coautoren sowie Incassati und Coautoren, die zeigen konnten, dass die Überexpression der E6/E7-Genprodukte des humanen Papillomavirus 16 in humanen Keratinozyten in der Lage ist einen durch Nocodazol oder Adriamycin hervorgerufenen Zellzyklusarrest zu umgehen und dass dieser Effekt einhergeht mit p53-Funktionsverlust, der Ausbildung einer Tetraploidie und mit einer aberranten Überexpression von PLK1. Weiterhin konnten die Autoren belegen dass die Überexpression von PLK1 in Konsequenz des p53-Verlustes

zustande kommt und in der Folge zur Ausbildung der keratinozytären Tetraploidie führt (69,70).

Ein weiteres Feld der Interaktion von Polokinasen und Oncogenese betrifft die Wechselwirkungen von Proteinen dieser Familie mit Tumorsupressorproteinen, die in die Zykluskontrolle von Tumorzellen nach DNA-Schädigung involviert sind.

So ergaben Studien, dass PLK1 BRCA2 (71,72) und Chk2 (73) phosphoryliert. Die Phosphorylierung von BRCA2 führt zur Dissoziation eines Multiproteinkomplexes, der den verfrühten Eintritt in die Mitose beispielsweise nach DNA-Schädigung verhindert (71), der Effekt der Chk2-Phosphorylierung durch PLK1 ist noch nicht ausreichend untersucht. Auch PLK3 ist in der Lage, Chk2 zu phosphorylieren, die Phosphorylierung soll einen stabilisierenden Effekt auf die Aktivität der Kinase in Folge eines DNA-Schadens haben (55). Für PLK1 konnte des Weiteren gezeigt werden, dass im Rahmen einer DNA-Schädigung eine Inhibition von PLK1 durch die Aktivität der Tumorsuppressoren ATM/ATR vermittelt wird (74), während andere Autoren auch von einer PLK1-Aktivitätsinhibition als Folge eines DNA-Schadens berichten, die unabhängig von ATM/ATR verlaufen soll (75). Gegensätzliche Ergebnisse erbrachte eine Studie für PLK3, nach der PLK3 von ATM phosphoryliert und aktiviert wird (66). Abschließend sei für PLK1 noch eine Studie von Gunawardena und Coautoren erwähnt, in der die Autoren berichten, dass die PLK1-Promotoraktivität über den Retinoblastoma-Signaltransduktionsweg inhibiert werden kann (76).

Eine weitere interessante, hypothetische Rolle der PLK3-Isoform im Rahmen der Oncogenese ergab sich aus einer Studie von Holtrich und Coautoren, in der nachgewiesen wurde, dass PLK3 in adhärenenten, versus nicht-adhärenenten Makrophagen überexprimiert wird (27), was auf eine mögliche Rolle des Proteins bei der Zelladhäsion, ebenfalls ein zentrales Feld der zellulären oncogenen Transformation, hindeuten könnte.

1.7. Polokinasen und Chemotherapie

Aus den hier vorgestellten funktionellen Ergebnissen der PLK-Forschung wird deutlich, dass eine Hemmung der PLK-Expression in humanen Tumoren möglicherweise therapeutisch sinnvoll sein könnte. Diesbezüglich liegen einige weitere Hinweise vor. So konnte, wie bereits weiter oben erwähnt, gezeigt werden, dass eine Hemmung der PLK1 in der Osteosarkomzelllinie U2OS deren Fähigkeit, Kolonien zu bilden, zerstört (65). In der gleichen Zelllinie konnte unter Verwendung von dominant-negativer (dn)-PLK1 gezeigt werden, dass eine Ausschaltung der Proteinfunktion zu einem Zellzyklusarrest und zur

Apoptoseinduktion führt (77). Das Interesse an PLK1 als chemotherapeutisches Target wurde weiterhin durch Arbeiten mehrerer Arbeitsgruppen geschürt, die zeigten, dass eine Ausschaltung von PLK1-Message mittels kurzer interferierender (si)-RNA sowie mittels Antisense zu einem Zellzyklusarrest und zur Apoptoseinduktion in einer Reihe von Tumorzelllinien führt (68, 78,79).

Kürzlich konnte, über diese Ergebnisse hinausgehend, von Guan und Coautoren gezeigt werden, dass PLK1-siRNA Behandlung der Fibrosarkomzelllinie HT1080 nicht nur die Fähigkeit der Zellen vermindert, Kolonien in Softagar zu bilden sondern auch das Wachstum von Xenografttumoren in immundefizienten Mäusen hemmt (80). Die gleichen Autoren beobachteten interessanterweise in einer Reihe nicht-transformierter, kultivierter Zellen keinen Zellzyklusarrest als Folge einer PLK1-Ausschaltung.

Schließlich konnten Nogawa und Kollegen zeigen, dass eine intravesikale Administration von PLK1-siRNA in einem orthotopen Maustumormodell nach Implantation von Tumorzellen in die Harnblasenwand zu einer Verhinderung des Wachstums von Harnblasenkarzinomen führen kann (81).

Kürzlich wurden die ersten Studienergebnisse zu einem chemischen Inhibitor, ON01910, welcher die Substratbindungsstelle von PLK1 besetzen und PLK1 effektiv inhibieren soll, vorgestellt (82). Bei vertretbarer Toxizität wies der Inhibitor zusätzlich zu einer breiten *in vitro* Aktivität gegen zahlreiche Tumorzelllinien eine gute Wirksamkeit in Xenograftmausmodellen für die Zelllinien Bel-7402, MCF-7, MIA und PaCa auf. Allerdings lassen uns eigene, unveröffentlichte Ergebnisse an der PLK1-Spezifität des vorgestellten Moleküls zweifeln. Mehrere Pharmafirmen arbeiten jedoch zurzeit mit Hochdruck an der Entwicklung neuer spezifischer PLK-Inhibitoren.

2. Zielstellung

Die Zielstellung der hier vorgestellten Arbeiten bestand darin, verschiedene PLK-Isoformen in humanen epithelialen Tumoren zu untersuchen. Hierzu sollte

- die Expression der PLK-Isoformen 1 und 3 in Tumorgewebe häufiger Karzinomentitäten (Colon, Magen, Pankreas, Prostata, Brust, Ovar) im Vergleich zur Expression in korrespondierendem Normalgewebe an Gewebsschnitten mittels Immunhistologie untersucht werden,
- die Expression einzelner PLK-Isoformen in homogenisierten Gewebeproben von Tumor- und korrespondierendem Normalgewebe mittels Western Blot untersucht werden,
- die Expression einzelner PLK-Isoformen in humanen Tumorzelllinien mittels Immunfluoreszenz/Immunhistochemie, Western Blot und PCR untersucht werden,
- eine Korrelation der immunhistologisch bestimmten PLK-Isoform-Expression mit Markern proliferativer Aktivität durchgeführt werden,
- eine Korrelation der immunhistologisch bestimmten PLK-Isoform-Expression mit klinisch-pathologischen Daten durchgeführt werden,
- die PLK-Isoform-Expression in Tumorkollektiven hinsichtlich ihrer prognostischen Relevanz überprüft werden,

um, in Zusammenschau mit Daten zur Funktion der PLK-Isoformen, eine Aussage bezüglich der Eignung dieser Proteine als Zielstrukturen für eine gerichtete Chemotherapie in den untersuchten Tumorentitäten zu erlangen.

3. Ergebnisse

3.1. Die Überexpression von PLK-Isoformen in Ovarialkarzinomen hat prognostische Bedeutung

Literatur: Weichert W, Denkert C, Schmidt M, Gekeler V, Wolf G, Köbel M, Dietel M, Hauptmann S. Polo like kinase isoform expression is a prognostic factor in ovarian carcinoma. Br J Cancer. 2004;90:815-21.

3.1.1. Studienkollektiv

Die Gewebeproben dieser Studie stammen von 116 Patientinnen (Alter 28-85 Jahre, medianes Alter 59,5 Jahre), die zwischen 1990 und 2001 an der Charité, Universitätsmedizin Berlin, operiert wurden. Keine der Patientinnen erhielt präoperative, neoadjuvante Chemotherapie. Daten zur postoperativen Chemotherapie standen für 50 der 77 Patientinnen zur Verfügung. Von diesen 50 Patientinnen erhielten 41 (82%) eine primäre, Platin-basierte Chemotherapie. Die übrigen Patientinnen erhielten entweder andere primäre Chemotherapieregime (3 Fälle, 6%) oder keine Chemotherapie (6 Fälle, 12%).

Für die Verteilung weiterer Patientencharakteristika im Studienkollektiv sei auf die genannte Publikation verwiesen.

3.1.2. Expression von PLK1 und PLK3 in humanen ovariellen Tumoren und in normalen Ovarien

PLK1-Expression war in normalem ovariellen Oberflächenepithel nicht nachweisbar. Auch Inklusionszysten ovariellen Oberflächenepithels im Stroma zeigten keine Expression von PLK1. Mittelgradige, zytoplasmatische PLK1-Expression lag in Granulosazellen und Theka interna-Zellen von Follikelzysten, die in einigen der normalen Ovarien gesehen wurden, vor. 17.6% aller benignen ovariellen Zystenadenome (17 Fälle) und 26% aller primären

Ovarialkarzinome (77 Fälle) waren zytoplasmatisch positiv für PLK1. Allerdings ließ sich in fast allen untersuchten Tumoren eine schwache Expression von PLK1 nachweisen, die jedoch nicht ausreichte, um die entsprechenden Tumoren als PLK1-positiv zu werten. In den untersuchten Borderline-Tumoren (13 Fälle) war keine wesentliche Expression von PLK1 detektierbar.

Für PLK3 ließ sich ebenfalls keine Expression im ovariellen, nicht-transformierten Oberflächenepithel feststellen. Allerdings zeigte sich in einem Fall in den Einfältelungen des Epithels eine detektierbare, zytoplasmatische PLK3-Expression. Passend zu dieser Beobachtung wiesen ca. 10% aller auf den Schnitten erfassten Inklusionszysten eine fokale, stärkergradige PLK3-Expression auf. 29,4% aller benignen Zystadenome und 50,6% aller primären Ovarialkarzinome waren zytoplasmatisch PLK3-positiv. Wie auch für PLK1, ließ sich nahezu in allen Tumoren eine gewisse, wenngleich schwache, diskontinuierliche Expression für PLK3 nachweisen. Borderline-Tumoren zeigten in 13,4% der Fälle eine relevante PLK3-Expression.

Insgesamt ergab sich somit eine Überexpression für PLK1 und PLK3 in Ovarialkarzinomen im Vergleich zu Zystadenomen, Borderlinetumoren und normalem ovariellen Oberflächenepithel.

3.1.3. Korrelation der PLK-Isoform-Expression mit klinisch-pathologischen Daten und Indikatoren mitotischer Aktivität

In der hier vorgestellten Studie ergab sich keine signifikante Korrelation der PLK1-Expression mit Patientenalter, FIGO-Stadium und Tumorgrad. Auch die PLK3-Expression korrelierte nicht mit Patientenalter und FIGO-Stadium. Allerdings ließ sich eine signifikante, positive Korrelation des Tumorgrades mit der PLK3-Expression nachweisen ($p=0,025$). Sowohl die PLK1- als auch die PLK3-Expression korrelierte signifikant mit Indikatoren mitotischer Aktivität im Ovarialkarzinom. Der ungruppierte PLK1-Score erreichte in einer Spearman-Rangfolge-Korrelation mit den ausgezählten Mitosen pro zehn Hochvergrößerungsgesichtsfeldern einen Korrelationskoeffizienten von 0,229 und einen p-Wert von 0,044. Für die Korrelation mit dem PLK3-Score betrug die entsprechenden Werte 0,254 für den Korrelationskoeffizienten und 0,026 für den p-Wert. In einer Untergruppe der Ovarialkarzinome ($n=54$), in der Daten zur Ki-67-Expression verfügbar waren, ließ sich

mittels χ^2 -Test für Trends eine signifikante Korrelation der gruppierten PLK Isoform-Expression mit dem Ki-67 Index nachweisen (p=0,027 für PLK1 und p=0,019 für PLK3).

3.1.4. PLK-Isoform-Expression und Patientinnenüberleben

Sowohl die PLK1- als auch die PLK3-Expression hatte signifikanten Einfluss auf das Patientinnenüberleben. Die mediane Überlebenszeit wurde in beiden PLK-negativen Patientinnengruppen nicht erreicht, während die mediane Überlebenszeit der Patientinnen mit PLK1/PLK3-positiven Tumoren jeweils 37,9 Monate (PLK1: p=0,022, PLK3: p=0,021) betrug. Die Überlebensrate der Patientinnen nach 24 Monaten betrug 52,9% für PLK1-positive Fälle versus 70,2% für PLK1-negative Fälle und 59,4% für PLK3-positive Fälle versus 72,7% für PLK3-negative Fälle. In einer multivariaten Analyse unter Einschluss aller univariat signifikanter Prognosefaktoren (FIGO-Stadium, Tumorgrad, Patientenalter) ließ sich für die PLK1-Expression, nicht jedoch für die PLK3-Expression eine unabhängige prognostische Signifikanz (p=0,03) mit einem relativen Risiko von RR=2,4 nachweisen.

Weitere Details zum Expressionsmuster, zu klinisch-pathologischen Korrelationen sowie eine eingehende Diskussion der Ergebnisse sind der entsprechenden Publikation zu entnehmen.

3.2. Prostatakarzinome mit hohem Malignitätsgrad zeigen eine erhöhte PLK1-Expression

Literatur: Weichert W, Schmidt M, Gekeler V, Denkert C, Stephan C, Jung K, Loening K, Dietel M, Kristiansen G. Polo like kinase 1 is overexpressed in Prostate Cancer and linked to higher Tumor Grades. *Prostate*. 2004;60:240-5.

3.2.1. Studienkollektiv

Für diese Studie fanden Gewebeproben von 78 Patienten (Alter 47-72 Jahre, medianes Alter 63 Jahre) Verwendung. Die verwendeten Gewebeproben entstammten alle Prostatovesikulektomiepräparaten von Patienten, die an der Charité, Universitätsmedizin Berlin in den Jahren 1996 bis 2001 operiert wurden. Keiner der Patienten erhielt präoperative Radio-, Chemo- oder Hormontherapie. Klinische Daten zur Entwicklung des postoperativen PSA-Spiegel im Verlauf lagen zu allen Fällen vor.

Weitere Patientencharakteristika und Daten zur Verteilung klinisch-pathologischer Parameter im Kollektiv sind der genannten Publikation zu entnehmen.

3.2.2. Expression von PLK1 in normalem prostatistischem Parenchym und in Prostatakarzinomen

Normales Prostataparenchym wie auch die Drüsen der fibromyoglandulären Prostatahyperplasie zeigten keine wesentliche Expression von PLK1. Das Prostatastroma war ebenfalls PLK1-negativ. Vereinzelt ließen sich PLK1-exprimierende Lymphozyten im Stroma nachweisen. Autonome neurale Plexuszellen im periprostatistischem Weichgewebe wiesen eine reproduzierbare, starke PLK1-Expression auf und dienten als interne Positivkontrolle. Adenokarzinome der Prostata zeigten in 41 der untersuchten 78 Fälle (52,6%) eine starke zytoplasmatische PLK1-Expression im Epithel. Die PLK1-Expression schien im Bereich der Invasionsfront nochmals verstärkt vorzuliegen. In den Fällen, in denen intraepitheliale Tumoranteile im Sinne einer prostatistischen, intraepithelialen Neoplasie (PIN) nachweisbar

waren, ergab sich in der PIN in der Regel ein gleichartiges PLK-Färbemuster wie in den dazugehörigen invasiven Karzinomanteilen.

Die PLK1-negativen Tumoren zeigten partiell eine schwache inhomogene Färbung für PLK1.

3.2.3. Korrelation der PLK1-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern

Der PLK1-Expressionsstatus zeigte keine Korrelation mit dem präoperativen PSA-Spiegel, mit dem Resektionsrandstatus, mit dem Patientenalter, mit dem Tumorstadium sowie mit dem WHO-Tumor-Grad.

Der ungruppierte PLK1-Score (0-12) korrelierte hingegen signifikant mit dem ungruppierten Gleason-Grad (2-10). Dieser hochsignifikante Zusammenhang ($p=0,001$) wies eine moderate Korrelationsstärke ($r=0,362$) auf. Auch die Korrelation der PLK1-Expression mit etablierten Gleason-Risikogruppen (low vs. intermediate vs high) ergab einen statistisch signifikanten Zusammenhang ($p=0,011$).

In dem von uns untersuchten Studienkollektiv hatte der Expressionsstatus von PLK1 keinen prädiktiven Wert hinsichtlich der PSA-rezidivfreien Überlebenszeit der Patienten. Die mittlere PSA-rezidivfreie Überlebenszeit betrug in der Gruppe der Patienten mit PLK1-negativen Tumoren 48 Monate und in der Gruppe der Patienten mit PLK1-positiven Tumoren 63 Monate.

Hinsichtlich einer eingehenderen Darstellung der Resultate und einer vertiefenden Diskussion dieser Ergebnisse sei auf die entsprechende Publikation verwiesen.

3.3. Die Überexpression von PLK1 ist ein unabhängiger Prognosefaktor im kolorektalen Karzinom

Literatur: Weichert W, Kristiansen G, Schmidt M, Gekeler V, Noske A, Niesporek S, Dietel M, Denkert C. Polo-like kinase 1 expression is a prognostic factor in human colon cancer. World J Gastroenterol. 2005;11:5644-50.

3.3.1. Studienkollektiv

In die Studie wurden 153 Patienten (Alter 31-86 Jahre, Median 65,5 Jahre) mit kolorektalen Adenokarzinomen sowie 5 Patienten mit kolorektalen Adenomen eingeschlossen, die in der Charité, Universitätsmedizin Berlin, zwischen 1996 und 1999 operiert wurden. Für alle Patienten lagen Überlebensdaten vor. Als Ausschlusskriterien galten das Vorliegen eines anderen histologischen Subtyps sowie ein bekanntes Zweitkarzinom.

Weitere Details zur Patientenauswahl und zur Verteilung der klinisch-pathologischen Parameter im Patientenkollektiv sind der genannten Publikation zu entnehmen.

3.3.2. Expression von PLK1 in normalem Kolon und im kolorektalen Karzinom sowie in Kolonkarzinomzelllinien

Für PLK1 zeigte sich eine schwache bis mittelgradige zytoplasmatische Expression am Kryptengrund normaler Kolonschleimhaut. Weiterhin ließ sich eine zytoplasmatische PLK1-Expression in einer Subgruppe des schleimhautresidenten, lymphozytären Infiltrates nachweisen. Ebenfalls PLK1-positiv waren die autonomen neuralen Ganglienzellen des Plexus submucosus sowie des Plexus myentericus des Kolons.

In den fünf untersuchten Adenomen des Kolons ließ sich keine wesentliche Überexpression von PLK1 nachweisen.

102 (66,7%) der insgesamt 153 untersuchten kolorektalen Karzinome wiesen eine starke Expression von PLK1 auf. Allerdings zeigten auch solche Tumoren, die aufgrund des

verwendeten Score-Systems als PLK1-negativ eingestuft wurden, eine diskontinuierliche, schwache Expression von PLK1. Vollständig PLK1-negative Tumoren waren in unserem Kollektiv nicht vertreten.

In drei von vier gepaarten Gewebeproben aus normaler Kolonmukosa und Kolonkarzinomgewebe ließ sich mittels Western Blot ebenfalls eine verstärkte Expression von PLK1 in den Karzinomen nachweisen. Der vierte Tumor zeigte eine geringere PLK1-Expression als die korrespondierende normale Kolonschleimhaut.

In allen untersuchten Kolonkarzinomzelllinien ließen sich starke PLK1 mRNA- und Proteinexpression nachweisen (HRT-18, HT-29, CX-2, RKO).

3.3.3. Koexpression von PLK1 und Ki-67

In den Doppelimmunhistologien für PLK1 und Ki-67 zeigte sich in der Kolonkarzinomzelllinie RKO eine Koexpression beider Proteine in der Mehrzahl der Zellen, ohne dass jedoch ein striktes Überlappen der Expression zu beobachten war.

Interessanterweise ließ sich eine Reihe von Tumorzellen nachweisen, die zwar zytoplasmatische PLK1-Expression, nicht aber nukleäre Ki-67-Expression aufwiesen.

Von einigen der hinsichtlich der PLK1-Expression untersuchten Kolonkarzinome wurden Konsekutivschnitte für Ki-67 gefärbt, um eine mögliche Koexpression von PLK1 und dem Proliferationsmarker Ki-67 nachzuweisen. Hierbei zeigte sich, dass stark proliferativ aktive Tumoranteile tendenziell auch eine stärkere PLK1-Expression aufwiesen. Allerdings ließ sich auch hier eine strenge Kolo-kalisation beider Proteine nicht nachvollziehen.

3.3.4. PLK1-Expression und klinisch-pathologische Parameter

In den Korrelationsanalysen der PLK1-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern ergab sich eine starke positive Korrelation der Expression mit dem Dukes-Stadium ($p < 0,001$), mit dem WHO-Tumorstadium ($p = 0,001$) sowie mit dem Nodalstatus ($p = 0,049$). Die stärkste Tendenz zu einer Überexpression beider Isoformen zeigten somit lokal fortgeschrittene, nodal metastasierte Tumoren.

Die PLK1-Expression korrelierte nicht mit dem Patientenalter, dem histopathologischen Tumorgrad und dem Fernmetastasenstatus.

3.3.5. PLK1-Expression und Patientenüberleben

Die PLK1-Überexpression korrelierte negativ mit dem Überleben der Patienten. Sowohl im Gesamtkollektiv (n=153, p=0,006) als auch in der Subgruppe von Patienten ohne Fernmetastasen (n=140, p=0,012) ergab sich für die PLK1-Expression univariat prognostische Signifikanz.

In der multivariaten Überlebensanalyse, die unter Einschluss aller univariat signifikanter Prognosefaktoren durchgeführt wurde, wies die PLK1-Expression im Gesamtkollektiv keinen unabhängigen statistischen Einfluss auf das Überleben auf. In der Gruppe der Patienten ohne Fernmetastasen allerdings ergab die multivariate Überlebensanalyse einen unabhängigen signifikanten Einfluss der PLK1-Expression auf das Überleben der Patienten. Patienten mit starker PLK1-Expression wiesen verglichen mit der PLK1-negativen Patientengruppe ein dreifach erhöhtes Risiko (RR=3,3) auf, im gegebenen Zeitintervall zu versterben (p=0,019).

Bezüglich einer eingehenderen Darstellung der Studienergebnisse sowie bezüglich einer ausführlichen Ergebnisdiskussion sei auf die genannte Publikation verwiesen.

3.3.6. PLK1-Expression und CGH-Daten

Die nachfolgend vorgestellten Ergebnisse sind nicht in den der Arbeit zugrunde liegenden Publikationen enthalten, sollen aber dennoch hier in aller Kürze dargestellt werden.

Gesetzt dem Fall, dass die beobachtete PLK1-Überexpression in Tumoren nicht als Folge, sondern möglicherweise vielmehr als Auslöser einer gesteigerten Proliferation in Tumoren zu sehen ist, stellt sich die Frage, worin die Ursache der gesteigerten Expression dieser Proteinfamilie in Tumoren begründet liegt.

Zwei mögliche Erklärungsansätze für die regelmäßig beobachtete Überexpression des Proteins in Tumoren kommen diesbezüglich in Betracht:

1. Alterierte Signaltransduktionswege in entarteten Zellen führen zur einer gesteigerten Transkription oder einem verlangsamten Abbau der Proteine.
2. Ein vermehrtes Vorliegen genetischen Materials im Bereich des Genlocus der PLK-Isoformen aufgrund chromosomaler Aberrationen führt zu einer erhöhten Proteinsynthese.

Um die zweite These zu überprüfen, wurden Gewebsschnitte von 36 Kolonkarziomgewebeproben, für die CGH-Daten vorlagen (83), auf einen Tissue-Microarray aufgebracht und mittels Immunhistochemie auf ihre Expression von PLK1 überprüft. Bei den untersuchten Tumoren handelte es sich um 20 primäre Kolonkarzinome, 5 Lymphknotenmetastasen, 3 peritoneale Metastasen und 8 Fernmetastasen (6x Leber, 2xLunge). Anschließend wurden die PLK1-Expressionsdaten mit den CGH-Daten für den PLK1-Genlocus (16p12) verglichen.

	Fälle	PLK1 negativ	PLK1 positiv	p-Wert
	36	20 (55.6%)	16 (44.4%)	
CGH				
Verlust	5 (13.9%)	5 (100%)	0 (0%)	0.021
keine Änderung	1 (2.8%)	1 (100%)	0 (0%)	
Zugewinn	30 (83.3%)	14 (46.7%)	16 (53.3%)	

Tabelle 1: Korrelation von mittels CGH detektierten Veränderungen am PLK1-Genlocus 16p12 mit der Expression des kodierten Proteins (alle Kolonkarzinome). *P-Wert: χ^2 -Test für Trends*

	Primäre Karzinome	PLK1 negativ	PLK1 positiv	p-Wert
	20	8 (40%)	12 (60%)	
CGH				
Verlust	3 (15%)	3 (100%)	0 (0%)	0.049
Zugewinn	17 (85%)	5 (29.4%)	12 (70.6%)	

Tabelle 2: Korrelation von mittels CGH detektierten Veränderungen am PLK1-Genlocus 16p12 mit der Expression des kodierten Proteins (primäre Kolonkarzinome). *P-Wert: Fisher's exact Test*

Die hier dargestellten Korrelationsanalysen zeigen somit, dass in ausnahmslos allen untersuchten Tumoren im Kollektiv, die einen Verlust an chromosomalem Material oder keine Veränderungen auf 16p12 aufwiesen, immunhistochemisch keine wesentliche Expression von PLK1 nachweisbar war. Im Gegensatz dazu zeigten Tumoren, die eine Amplifikation im Bereich des Genortes aufwiesen, in 53,3% aller Fälle und sogar in 70,6% der primären Karzinome eine starke immunhistochemisch detektierbare PLK1-Überexpression. Somit liegt der Gedanke nahe, dass ähnlich den Beobachtungen für andere tumorrelevante Proteine (z.B. erbB2/Her2) eine Amplifikation des Genlocus Ursache für die Proteinüberexpression von PLK1 im Kolonkarzinom sein könnte. Zur Verifizierung des hier vorgestellten, rein korrelativen Ergebnisses werden zurzeit jedoch weitere Untersuchungen mittels FISH an den zur Proteinexpressionsanalyse verwendeten Gewebeproben durchgeführt. Es sei einschränkend darauf hingewiesen, dass die vorliegende Untersuchung an einer relativ kleinen Fallzahl durchgeführt wurde und dass die Anwendung des χ^2 -Tests für Trends (Tabelle 1) statistisch bei kleinen Fallzahlen dazu tendiert, ungenaue p-Werte zu produzieren. Eine ausführlichere Diskussion dieser Ergebnisse findet sich in Kapitel 4.

3.4. PLK-Isoformen im Brustkrebs: Expression und prognostische Bedeutung

Literatur: Weichert W, Kristiansen G, Winzer KJ, Schmidt M, Gekeler V, Noske A, Muller BM, Niesporek S, Dietel M, Denkert C. Polo-like kinase isoforms in breast cancer: expression patterns and prognostic implications. *Virchows Arch* 2005;446:442-450.

3.4.1. Studienkollektiv

In der Studie wurden 135 Patientinnen (Alter 28,0-88,3 Jahre, medianes Alter 61,8 Jahre) berücksichtigt, die in den Jahren 1991 bis 1996 an der Charité, Universitätsmedizin Berlin, operiert wurden. Ausschlusskriterien für die Aufnahme in das Kollektiv waren eine R1-Resektion, der Nachweis von bilateralen Tumoren und das Vorliegen von Fernmetastasen zum Operationszeitpunkt. Klinisch-pathologische Daten lagen für alle Patientinnen vor, ebenso Daten zum Gesamtüberleben. Daten zum rezidivfreien Überleben lagen für eine große Untergruppe von Patientinnen (n=101) ebenfalls vor.

Zur weiteren Verteilung klinisch-pathologischer Charakteristika im Kollektiv sei auf die genannte Publikation verwiesen.

3.4.2. Expression von PLK1 und PLK3 in Mammakarzinomen und in normalem Brustdrüsenparenchym

Für PLK1 ließ sich in der überwiegenden Anzahl der Fälle keine wesentliche Expression in normalem Brustdrüsenparenchym nachweisen. Gelegentlich fand sich in einer kleinen Minderheit der normalen Brustdrüsenlobuli eine schwache bis mikrofokal maximal mittelgradige zytoplasmatische PLK1-Expression. Dies galt im Besonderen für Lobuli in der Nachbarschaft invasiver Karzinome. Die intraduktale Tumorkomponente (DCIS), wenn nachweisbar, verhielt sich hinsichtlich der PLK1-Expression analog zu den korrespondierenden Karzinomen. In der Gruppe der Karzinome ließ sich eine

zytoplasmatische Überexpression von PLK1 in 57 (42,2%) der untersuchten 135 Tumoren nachweisen. Allerdings zeigten auch PLK1-negative Tumoren eine fokale, diskontinuierliche, schwache Expression des Proteins. Eine Betonung der PLK1-Expression im Bereich der Invasionsfront war auch in diesem Tumortyp in den meisten Fällen zu beobachten.

Normales Brustdrüsenparenchym wies in der Regel eine schwache, inhomogene Expression für PLK3 auf. In DCIS-Komponenten ließ sich prinzipiell ein zu den korrespondierenden Karzinomen analoges Expressionsmuster für PLK3 detektieren. 64 (47,4%) der untersuchten 135 invasiven Tumoren zeigten eine prononcierte, zytoplasmatische Überexpression für PLK3. Auch für PLK3 wurde eine verstärkte Expression im Bereich der Invasionsfront beobachtet.

Die Expression von PLK1 und PLK3 korrelierte hochsignifikant im Kollektiv. Allerdings zeigten 16 der 78 PLK1-negativen Tumoren eine starke PLK3-Expression. Im Gegensatz dazu waren nur 9 der 71 PLK3-positiven Tumoren PLK1-negativ.

3.4.3. PLK1/PLK3-Expression und klinisch-pathologische Parameter

Die Korrelationsanalysen der PLK-Isoform-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern ergaben eine signifikante, positive Korrelation der PLK1-Expression mit dem Vorliegen einer Gefäßinvasion ($p=0,022$). Eine Korrelation der PLK-Isoform-Expression mit dem histologischen Typ, dem Tumorstadium und dem Nodalstatus ließ sich nicht nachweisen. Es fand sich jedoch ein signifikanter (PLK1, $p=0,029$) bzw. hochsignifikanter (PLK3, $p=0,001$) Zusammenhang der PLK-Isoform-Expression mit dem Tumorgrad. Schlechter differenzierte „malignere“ Tumoren zeigten prinzipiell eine stärkere PLK-Isoform-Expression. Der Tumorgrad wurde mittels des sog. modifizierten Elston-Ellis-Gradings bestimmt. In dieses Grading-Schema gehen bekanntermaßen Punktwerte für die Mitoserate, die nukleäre Pleomorphie und die Architektur des Tumors ein. Somit stellte sich die Frage, auf welchen Einzelfaktoren die genannten Korrelationen beruhten.

In den Korrelationen der Punktwerte der Einzelparameter des Gradings mit der PLK-Isoform-Expression zeigten sich im χ^2 -Test für Trends eine signifikante Korrelation der PLK1-Expression mit dem Score für die nukleäre Pleomorphie der Tumorzellen ($p=0,01$) sowie ein signifikanter Zusammenhang zwischen PLK3-Expression ($p=0,003$) und nukleärem Pleomorphiescore. Weiterhin ergab sich im χ^2 -Test für Trends ein signifikanter

Zusammenhang für die Expression beider PLK-Proteine mit dem jeweiligen Score für die Mitoserate (PLK1: $p=0,004$, PLK3: $p<0.001$).

Die Höhe des Punktwertes für die Tumorarchitektur korrelierte nicht mit der PLK-Isoform-Expression.

3.4.4. PLK1- und PLK3-Expression und Marker mitotischer Aktivität

Sowohl der ungruppierte PLK1-Score als auch der ungruppierte PLK3-Score zeigte einen hochsignifikanten, positiven Zusammenhang moderater Stärke ($r=0,44$, $p<0,001$ für PLK1; $r=0,47$, $p<0,001$ für PLK3) mit der Mitosezahl (pro zehn Hochvergrößerungsgesichtsfelder) im Tumor. Dieser Zusammenhang ließ sich durch eine signifikante, positive Korrelation (p -Wert für beide Isoformen kleiner $0,05$) geringer Stärke ($r=0,27$ für PLK1 und $r=0,28$ für PLK3) von PLK-Isoform-Expression und Proliferationsindex (Ki-67) der entsprechenden Tumoren bestätigen. Die jedoch nur schwache bis moderat starke Korrelation der Expression beider Proteine mit Markern mitotischer Aktivität spiegelt sich auch in den Ergebnissen der Doppelmarkierungen von Tumorgewebeproben für PLK-Isoformen und Ki-67 wider. Hier zeigte sich, dass in Tumoren mit erhöhter mitotischer Aktivität eine verstärkte PLK-Isoform-Expression detektierbar war, ohne dass jedoch eine strikte Koexpression beider Proteine auf zellulärer Ebene vorlag.

3.4.5. PLK1- und PLK3-Expression und Hormonrezeptorstatus

Im Gegensatz zu von anderen Autoren an kleineren Fallzahlen publizierten Ergebnissen fand sich in unserem Studienkollektiv eine signifikante, negative Korrelation der PLK1- ($p=0,001$) wie auch der PLK3-Expression ($p=0,048$) mit der Expression des Östrogenrezeptors. Darüber hinaus ergab sich eine positive Korrelation der PLK3-Expression mit dem erbB2/Her2-Expressionsstatus ($p=0,049$). Für die Expression beider Proteine war keine Korrelation mit dem Progesteronrezeptorstatus nachweisbar.

3.4.6. PLK1-/PLK3-Expression und Patientinnenüberleben

Die Überlebensanalysen ergaben, dass eine verstärkte PLK3-Expression, nicht aber eine verstärkte PLK1-Expression einen signifikanten Prognosefaktor im Mammakarzinom darstellt. Patientinnen mit starker PLK3-Expression im Tumor zeigten eine signifikant kürzere Gesamtüberlebenszeit und rezidivfreie Überlebenszeit als Patientinnen ohne PLK3-Expression. Die mittlere Gesamtüberlebenszeit betrug in der PLK3-positiven Patientinnengruppe 87 Monate und in der PLK3-negativen Patientinnengruppe 117 Monate. In der Gruppe der Patientinnen mit PLK3-positiven Tumoren betrug das mittlere rezidivfreie Überleben 75 Monate, dem gegenüber stand ein mittleres rezidivfreies Überleben von 107 Monaten in der Patientinnengruppe mit PLK3-negativen Tumoren. Dieses Ergebnis wurde untermauert durch die multivariate Überlebensanalyse unter Einschluss univariat signifikanter Prognosemarker (Alter, Tumorgröße, Nodalstatus, Grad), die ergab, dass als unabhängige Prognosefaktoren in dem von uns untersuchten Studienkollektiv lediglich der Nodalstatus und die PLK3-Expression für das Gesamt- und auch das rezidivfreie Überleben der Patientinnen von Bedeutung waren.

Für eine ausführlichere Ergebnisdarstellung sowie für eine Diskussion der Ergebnisse sei auf die entsprechende Publikation verwiesen.

3.5. Expressionsmuster von PLK1 in Magenkarzinomen und deren Lymphknotenmetastasen

Literatur: Weichert W, Ullrich A, Schmidt M, Gekeler V, Noske A, Niesporek S, Buckendahl AC, Dietel M, Denkert C. Expression Patterns of Polo-like Kinase 1 in Human Gastric Cancer. *Cancer Sci.* 2006;97:271-6.

3.5.1. Studienkollektiv

Bei den eingeschlossenen Fällen handelte es sich um primäre Magenkarzinome von Patienten, die sich zwischen 1995 und 2002 an der Charité, Universitätsmedizin Berlin, einer totalen Gastrektomie unterziehen mussten.

Als Ausschlusskriterien galten das Vorliegen eines Rezidivs, das Vorliegen einer zweiten malignen Tumorerkrankung, das Vorliegen einer anderen Histologie als Adenokarzinom, das Fehlen von Überlebensdaten und das Fehlen qualitativ hochwertigen Gewebes. Insgesamt wurden von uns 207 konsekutive Patienten mit Magenkarzinomen auf diese Kriterien hin überprüft. Aus diesem Gesamtkollektiv gingen schließlich 135 Patienten (Alter 25 - 93 Jahre, medianes Alter 63,4 Jahre) in das endgültige Studienkollektiv ein.

Die Verteilung weiterer klinisch-pathologischer Parameter im Patientenkollektiv sind der genannten Publikation zu entnehmen.

3.5.2. PLK1-Expression im Magenkarzinom und in normaler Magenmukosa

In normaler Magenschleimhaut ließ sich immunhistologisch eine mittelgradige zytoplasmatische Expression von PLK1 im Bereich der säureproduzierenden Belegzellen nachweisen. Foci mit intestinaler Metaplasie zeigten ebenfalls eine stärkergradige zytoplasmatische Expression von PLK1. In normalem Schleimhautstroma war, abgesehen von einigen PLK1-exprimierenden Entzündungszellen, keine erhöhte PLK1-Expression detektierbar.

Die von uns untersuchten Magenkarzinome zeigten in 73 von 135 Fällen (54,1%) eine starke zytoplasmatische Expression von PLK1. Dabei ließ sich in dieser Tumorentität, ähnlich den in anderen Karzinomkollektiven gewonnenen Daten, eine unmittelbare Expressionssteigerung am Übergang von normalem zu neoplastischem Epithel darstellen.

3.5.3. PLK1-Expression in Lymphknotenmetastasen

Zusätzlich zu den 135 Primärtumoren wurden in der Studie in 46 Fällen zu den Primärtumoren korrespondierende Lymphknotenmetastasen hinsichtlich ihrer PLK1-Expression untersucht. Von den untersuchten 46 Metastasen wurden 30 (65,2%) als PLK1-positiv klassifiziert. Eine Korrelation moderater bis starker Bindung ($r=0,629$, $p<0,001$) war zwischen der Expression von PLK1 im Primärtumor und in der dazugehörigen Lymphknotenmetastase nachweisbar. Passend zu diesem Ergebnis zeigte der ungruppierte PLK1-Expressionsscore in Lymphknotenmetastase und Primärtumor keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p=0,895$).

3.5.4. PLK1-Expression und klinisch-pathologische Parameter

Die Korrelation der PLK1-Expression mit klinisch-pathologischen Daten ergab eine hochsignifikante, positive Korrelation der Expression von PLK1 mit dem Tumorstadium ($p=0,001$) und dem Nodalstatus ($p=0,003$) der Patienten. Dies bedeutet, dass lokal fortgeschrittene, nodal metastasierte Tumoren eine signifikant stärkere PLK-Isoform-Expression aufwiesen als lokal beschränkte, nodal-negative Tumoren. Interessanterweise ließ sich eine Korrelation der PLK1-Expression mit der Tumorarchitektur, klassifiziert nach Laurén, nachweisen. Nicht-kohäsiv wachsende, diffuse Magenkarzinome waren demnach signifikant ($p=0,02$) häufiger PLK1-positiv als glanduläre Strukturen ausbildende, intestinale Tumoren.

3.5.5. PLK1 Expression und Überleben

In der univariaten Überlebensanalyse zeigte sich für die PLK1-Expression ein hochsignifikanter Einfluss auf das Patientenüberleben ($p=0,003$). Die mediane Überlebenszeit betrug für PLK1-positive Patienten 11,3 Monate versus 22,2 Monate für PLK1-negative Patienten. In der durchgeführten multivariaten Überlebensanalyse ließ sich jedoch kein unabhängiger Einfluss der Expression von PLK1 auf das Patientenüberleben darstellen. Dies ist mit der starken Korrelation der PLK1-Expression mit dem Tumorstadium und dem Nodalstatus erklärbar. Schichtete man die univariaten Analysen für die PLK1-Expression für das Tumorstadium und den Nodalstatus, so verlor die jeweilige Proteinexpression in den Einzelschichtanalysen ihre Signifikanz.

Für eine weitergehende Darstellung der Resultate sowie für die Ergebnisdiskussion verweisen wir auf die entsprechende Publikation.

3.5.6. PLK-Isoform-Expression in der Magenkarzinomzelllinie EGP 85-257P

Die im Folgenden dargestellten Immunfluoreszenzen sind in den entsprechenden Publikationen nicht enthalten, sollen hier dennoch in Kürze dargestellt werden. Die Immunfluoreszenzdarstellung von PLK1 und PLK3 erfolgte nach Standardprotokoll mit einer 1:100 Verdünnung der für die Immunhistologie verwendeten PLK-Isoform-Antikörper und mit gleichzeitiger DAPI-Kernfärbung. Die Aufnahmen wurden mittels eines Leica-Konfokalmikroskops angefertigt. Die Aufnahmen zeigen, dass die Expression von PLK1 (in 1A dargestellt) zwar mit starker Intensität in sich teilenden Magenkarzinomzellen nachweisbar ist, dass aber auch Zellen, die keine Teilungsfiguren aufweisen, noch schwache zytoplasmatische PLK1-Positivität zeigen. Für PLK3 (in 1B dargestellt) lässt sich eine starke zytoplasmatische Expression in der Mehrzahl der Tumorzellen nachweisen.

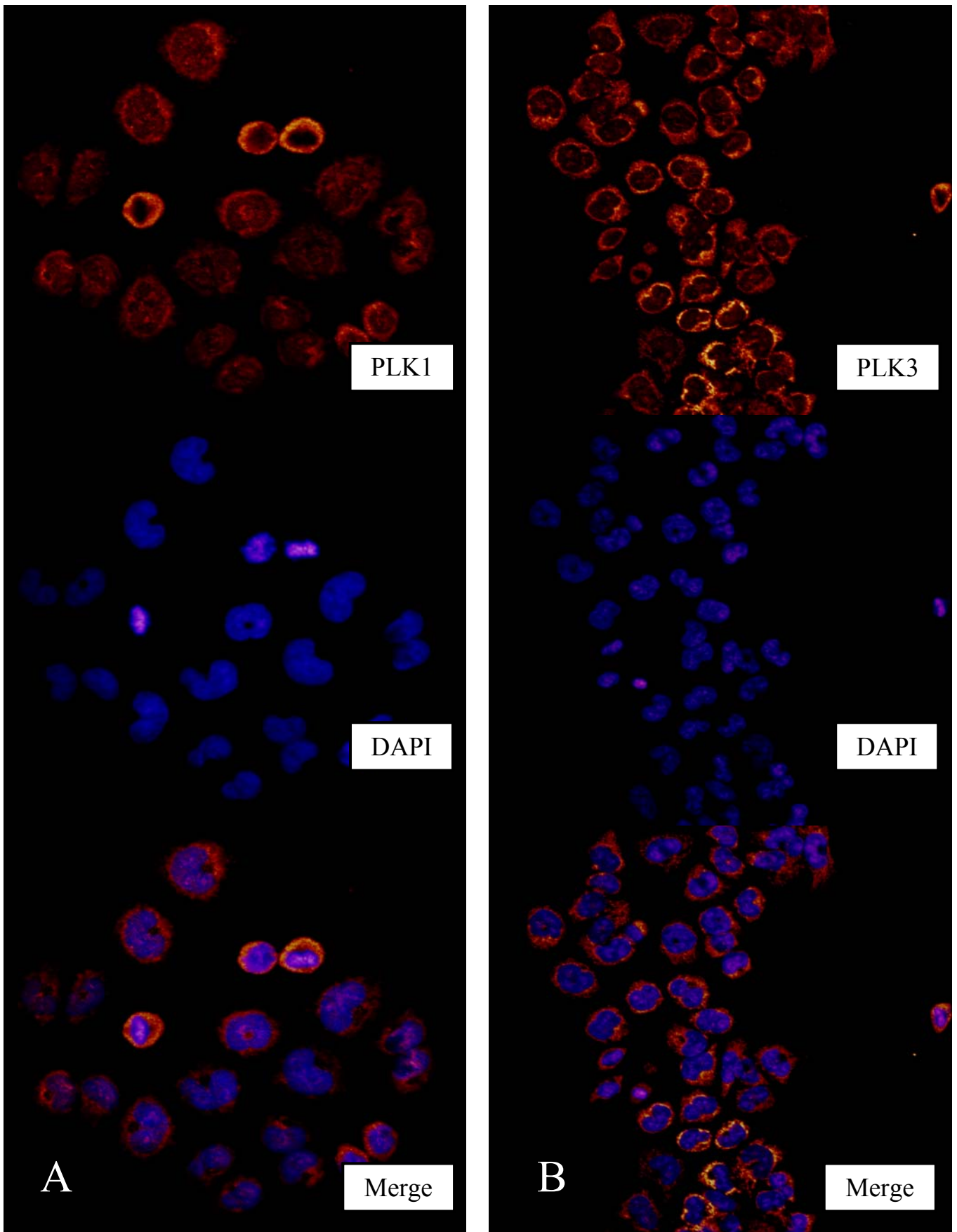


Abbildung 6: Fluoreszenzdarstellung von PLK1 (A) und PLK3 (B) in der Magenkarzinomzelllinie EGP 85-257P

3.6. PLK1 wird in Pankreaskarzinomen und deren Vorläuferläsionen überexprimiert

Literatur: Weichert W, Schmidt M, Jacob J, Gekeler V, Langrehr J, Neuhaus P, Bahra M, Denkert C, Dietel M, Kristiansen G. Overexpression of Polo-like kinase 1 is a common and early event in pancreatic cancer. *Pancreatology*. 2005;5:259-265.

3.6.1. Studienkollektiv

In diese Studie wurden 86 Patienten (Alter 39-80 Jahre, medianes Alter 66 Jahre) mit primären pankreatischen Adenokarzinomen, die zwischen 1991 und 2000 mittels einer partiellen Pankreatoduodenektomie an der Charité, Universitätsmedizin Berlin, behandelt wurden, aufgenommen. Zu allen Fällen lagen Überlebensdaten vor. Zusätzlich wurden fünf Fälle von chronischer Pankreatitis untersucht.

Zur Verteilung weiterer klinisch-pathologischer Parameter im Kollektiv sei auf die genannte Publikation verwiesen.

3.6.2. Expression von PLK1 in normalem Pankreasparenchym, chronischer Pankreatitis und pankreatischen Adenokarzinomen

Normales Pankreasparenchym zeigte lediglich eine diskontinuierliche, schwache, zytoplasmatische Expression in den Pankreasazini. Pankreasgangepithelien wiesen keine wesentliche Expression von PLK1 auf. Pankreasstroma exprimierte kein PLK1, im Stroma nachweisbares entzündliches Infiltrat färbte sich vereinzelt positiv für PLK1.

Degeneratives und regeneratives Pankreasparenchym in chronischer Pankreatitis wies zwar eine im Vergleich zum normalen Parenchym dezent erhöhte Expressionsrate für PLK1, jedoch keine starke PLK1-Überexpression auf.

Eine zytoplasmatische Überexpression von PLK1 im Pankreaskarzinom im Vergleich zum nicht-transformierten Pankreasparenchym war in 41 von 86 (47,7%) der untersuchten Fälle evident. Interessanterweise ließ sich die Überexpression in der Regel auch in präinvasiven

Läsionen der pankreatischen, intraepithelialen Neoplasie (PanIN) nachweisen. Eine Überexpression fand sich regelhaft jedoch nur in high-grade PanIN (PanIN III) Läsionen, nicht jedoch in low-grade-Läsionen.

3.6.3. PLK1-Expression und klinisch-pathologische Parameter

In unserem Studienkollektiv fand sich kein korrelativer Zusammenhang der Überexpression von PLK1 mit klinisch-pathologischen Parametern und mit dem Patientenüberleben.

Für eine ausführlichere Darstellung der Ergebnisse sowie für eine ausführliche Diskussion verweisen wir auf die entsprechende Publikation.

4. Diskussion

4.1. Expression der Polokinasen in soliden Tumoren

Seit der ersten Beschreibung der namensgebenden Kinase *Polo* durch Sunkel und Glover in *Drosophila* vor 18 Jahren (17) wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt eine große Menge an Informationen zur Familie der Polokinasen zusammengetragen. Auf diesem Feld der Forschung stand lange und steht noch heute der funktionelle Aspekt der Rolle dieser Kinasefamilie in der mitotischen und auch meiotischen Zellteilung in unterschiedlichen Spezies eindeutig im Vordergrund. Die Ergebnisse der bis dato vorliegenden diesbezüglichen Forschung sind in mehreren Übersichtsarbeiten zu diesem Thema dargelegt worden (20,33,34,35). Erst in den letzten Jahren fokussierte die Forschung an dieser Proteinfamilie verstärkt auf die humanen Polokinase-Isoformen und vor allem auf deren Bedeutung in der Onkogenese (62) und in malignen humanen Tumoren (61). Auch in diesem Forschungsfeld liegt der Schwerpunkt nach wie vor auf der Aufklärung funktioneller Interaktionen der Kinasefamilie in Signaltransduktionswegen verschiedenster Tumorzelllinien.

Infolge dieser Entwicklung entstanden jedoch auch die ersten Expressionsstudien zu dieser Proteinfamilie zunächst auf mRNA-Ebene (84), später auch auf Proteinebene (85). Dieses Feld der Polokinase-Forschung gewinnt zunehmend an Relevanz, da sich im Bereich der Chemotherapieforschung mögliche Perspektiven einer gezielten Ausschaltung dieser Proteinfamilie entwickeln. Vor einer gezielten chemotherapeutischen Behandlung sollte natürlich, soweit möglich, der Expressionsstatus und im Idealfall auch der Mutationsstatus des auszuschaltenden Zielproteins/Gens sowohl insgesamt für die Tumorentität als auch im individuellen Tumor eines jeden Patienten bekannt sein.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen belegen eine fast schon als universal zu bezeichnende, aberrante Überexpression von Polokinase-Isoformen in definierten Subgruppen solider Tumoren, während in nicht transformiertem Gewebe lediglich vereinzelte biologische Systeme eine stärkergradige Expression der Proteine aufweisen. Diese als „physiologisch“ zu bezeichnende, zellzyklusunabhängige Expression konnte beispielsweise in Parietalzellen der gastrischen Mukosa und in neuronalen, autonomen Ganglienzellen beobachtet werden. Die Expression von Polokinasen in postmitotischen, autonomen Ganglienzellen überrascht nicht, da eine mitoseunabhängige Funktion und Expression von Polokinasen in neuronalen Zellen seit längerem bekannt ist (86). Zu möglichen Funktionen der Polokinasen in Parietalzellen fehlen bis dato funktionelle Studien.

In normalem Weichgewebe konnte in den untersuchten Organsystemen keine wesentliche Expression der Polokinasen festgestellt werden. Nicht transformiertes Epithel der untersuchten Organsysteme zeigte lediglich geringe fokal bis mittelgradige Polokinase-Expression, die jeweils, ebenfalls konsistent mit Ergebnissen funktioneller Studien, im Bereich der proliferierenden Kompartimente verstärkt nachweisbar war. Ganz im Gegensatz zu normalem Gewebe ließ sich eine starke zytoplasmatische Überexpression in einem variablen Prozentsatz der untersuchten Karzinome nachvollziehen. Unter Berücksichtigung der in den Studien verwendeten Einordnungsschemata wurden zwischen 26% (Ovarialkarzinome) und 66,7% (Kolonkarzinome) der Tumoren der jeweiligen Entitäten als PLK-, „positiv“ gewertet. Diese Ergebnisse bewegen sich prinzipiell im Bereich der nicht von unserer Arbeitsgruppe publizierten RNA- und Proteinexpressionsdaten anderer Autoren (81,84,85,87-99).

So konnten Tokumitsu und Coautoren in einer Arbeit an ösophagealen (n=49) und gastralen (n=75) Karzinomen nachweisen, dass sowohl in Karzinomen des Ösophagus als auch in Karzinomen des Magens in der Mehrzahl der Fälle erhöhte PLK1 mRNA-Level detektierbar sind (88).

In kolorektalen Karzinomen beobachteten Takahasi und Kollegen (96) eine Proteinüberexpression von PLK1 in 73,1% der 78 untersuchten Tumoren und Macmillan und Koautoren (89) fanden in 77,1% der 70 untersuchten Tumoren dieser Lokalisation eine Überexpression von mRNA von PLK1, jeweils Zahlen, die sich gut mit unserem Ergebnis von 66,7% überexprimierenden Tumoren decken.

Zu weiteren hier untersuchten Tumorentitäten liegen lediglich noch Studien zum Ovarialkarzinom (94) sowie zum Mammakarzinom (93) vor, beide Arbeiten sind wegen sehr kleiner Fallzahl (Ovar: n=17, Mamma: n=30) als nicht repräsentativ einzuschätzen, die gefundenen Ergebnisse decken sich jedoch prinzipiell mit unseren Beobachtungen in größeren Studienkollektiven.

Bezüglich der PLK1-mRNA-Expression in hier nicht vorgestellten Tumorentitäten liegen inzwischen einige Studien anderer Autoren vor.

Wolf und Coautoren konnten mittels Northern blot-Analysen (116 Fälle) zeigen, dass PLK1-mRNA in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen im Vergleich zu normalem Lungenparenchym überexprimiert ist und dass hohe Expressionslevel mit einer schlechteren Patientenprognose einhergehen (84). Ähnliche Ergebnisse erzielte die gleiche Arbeitsgruppe für die PLK1-mRNA-Expression in Plattenepithelkarzinomen (n=89) der Kopf-Halsregion (87). In einer RNA-Microarrayexpressionsanalyse fanden Yamada und Kollegen eine PLK1 Überexpression in Hepatoblastomen im Vergleich zu normalem Leberparenchym (90).

Auch auf Proteinbasis sind weitere Tumorentitäten von anderen Arbeitsgruppen ebenfalls bereits untersucht worden. So konnten Knecht und Kollegen in Analogie zu ihrer oben genannten, mittels mRNA-Expressionsanalyse durchgeführten Arbeit (87) auch eine Überexpression von PLK1-Protein in einer hohen Anzahl von 157 untersuchten Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Halsregion nachweisen (85). Die gleiche Arbeitsgruppe fand in weiteren Arbeiten eine erhöhte Proteinexpression von PLK1 in einem Teil von 175 untersuchten malignen Melanomen (91,92). Takai und Coautoren berichteten in einer kleinen Studie (n=20) an Endometriumkarzinomen von einer verstärkten PLK1-Expression in dieser Tumorentität (95).

Dietzmann und Kollegen wiesen in einer Analyse 68 glialer Tumoren ebenfalls eine PLK1 Überexpression (97) in dieser Tumorentität nach. Ito und Kollegen führten eine vergleichbare Analyse zur Proteinexpression von PLK1 an 149 Schilddrüsentumoren (follikulär, papillär, anaplastisch) (98) sowie an medullären Karzinomen (99) der Schilddrüse (n=67) durch und konnten für diese Tumorentitäten ebenfalls eine verstärkte PLK1-Expression sichern.

Schließlich fanden Nogawa und Kollegen in einer Untersuchung an 58 Harnblasenkarzinomen eine Überexpression von PLK1 (81).

Proteinexpressionsstudien zu anderen Isoformen außer PLK1 existieren, abgesehen von den hier vorgestellten Arbeiten, bis dato nicht. Auf mRNA-Basis wurde aufgrund kleiner Fallzahlen ein Expressionsverlust für PLK3 in Lungentumoren (28) und Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Halsregion (100) postuliert, diesbezüglich fehlen jedoch systematische, größere Studien. Auch die Studienlage hinsichtlich funktioneller Implikationen der PLK3 ist widersprüchlich, so wird zum einen ein tumorsuppressorartiger Effekt für das Protein postuliert, der auf der Rolle dieser Kinase in der DNA-Schaden-assoziierten Kontrolle der Zellteilung fußen soll (55,66), zum anderen gibt es aber auch zweifelsfreie Hinweise auf Synergien zwischen PLK1 und PLK3 bei der Zellzykluskontrolle (53).

In der Mehrzahl der im Rahmen der hier vorgelegten Studien untersuchten Tumoren war eine Assoziation der PLK-Isoform-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern nachweisbar. So zeigten in der Regel lokal fortgeschrittene, nodal metastasierte Tumoren niedriger Differenzierung tendenziell eine höhere PLK-Isoform-Expression als lokal begrenzte, nicht-metastasierte, gut differenzierte Tumoren. Ähnliche Assoziationen wurden von anderen Autoren ebenfalls beschrieben (81,91,94,96,97), wohingegen vereinzelt auch über Entitäten mit einer stärkeren Expression in lokal begrenzten Tumoren berichtet wurde (98).

4.2. Prognostische Relevanz der Polokinasen

In einem Teil der von uns untersuchten Entitäten ließ sich ein Zusammenhang zwischen der PLK-Isoform-Expression, vornehmlich der PLK1-Expression, und der Patientenprognose nachweisen, partiell zeigte die Expression einzelner Isoformen sogar eine von konventionellen prognostischen Parametern unabhängige Signifikanz. Als unabhängiger Prognosefaktor konnten wir die Expression von PLK1 im Kolonkarzinom und im Ovarialkarzinom definieren, während die PLK3-Expression im Mammakarzinom eine unabhängige prognostische Signifikanz aufwies. Abhängigen Einfluss auf die Prognose hatten die Expression von PLK1 im Magenkarzinom und die Expression von PLK3 im Ovarialkarzinom. Uniform zeigen jeweils solche Patienten mit Überexpression der Proteine eine verschlechterte Prognose, gegensinnige Effekte wurden nicht beobachtet. Während die Mehrzahl der nicht von uns durchgeführten Untersuchungen auf eine Aussage bezüglich der prognostischen Wertigkeit der PLK-Isoform-Expression verzichtet, ist über prognostisch ungünstige Assoziationen der PLK1-Expression mit dem Patientenüberleben für Kopf-Halstumoren (85, 87), Ösophaguskarzinome (88), nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (84), Harnblasenkarzinome (81), Hepatoblastome (90) und für maligne Melanome (92) berichtet worden. Trotz ausreichend großer Fallzahl und ausreichend langer Nachbeobachtungszeit konnten wir für das Prostatakarzinom und das Pankreaskarzinom keinen Zusammenhang der PLK1-Expression mit Rezidiv-/Überlebensparametern nachweisen.

Die beobachteten Zusammenhänge zwischen Patientenprognose und Überexpression von PLK-Isoformen sind in mehrfacher Hinsicht von Interesse.

So kann die verschlechterte Prognose von Patienten mit verstärkter PLK1/3-Expression im Tumor als indirekter Hinweis auf eine biologische Relevanz der Überexpression der Proteine interpretiert werden, umso mehr als dass in einigen Tumoren eine Unabhängigkeit der prognostischen Aussagekraft der verstärkten Expression von Tumorgröße, Metastasierungsstatus und Tumorgrad evident war. Ein prognostischer Effekt einer Überexpression der PLK-Isoformen ist weiterhin zusätzlich als starkes Argument für den Versuch einer selektiven Ausschaltung des entsprechenden Proteins/der entsprechenden Proteinfamilie zum Zweck der chemotherapeutischen Tumorbekämpfung zu interpretieren. Schließlich ist aber prinzipiell auch denkbar, die Expression des Proteins/der Proteine als zusätzlichen molekularen Marker zu nutzen, um über die konventionell erhobenen Tumorparameter hinaus weitere Aussagen zur individuellen Prognose der Patienten machen zu können. Dieser Ansatz unterliegt allerdings Einschränkungen. So hat sich unter der Vielzahl postulierter prognostischer molekularer Marker in unterschiedlichen Tumorentitäten

(101, exemplarisch für das Kolonkarzinom) bis dato keiner in der klinischen Routine durchgesetzt. Weiterhin gälte es selbstverständlich, vor einer Verwendung der Marker in der Routinediagnostik deren tatsächliche prognostische Relevanz anhand einer großen, randomisierten, prospektiven Multicenter-Studie zu validieren. Daher erscheint eine regelhafte Erhebung des PLK-Expressionsstatus in der Routinediagnostik zunächst nur im Zusammenhang mit weitergehenden Fragestellungen wie beispielsweise einer Testung der Eignung eines Patienten für eine spezielle Chemotherapie angezeigt.

4.3. Ursachen und Folgen der veränderten PLK-Isoform-Expression

In den hier vorgestellten Untersuchungen konnte eine Assoziation der PLK-Isoform-Expression mit der proliferativen Aktivität im Mammakarzinom und im Ovarialkarzinom nachgewiesen werden. Gleichartige Ergebnisse liegen von anderen Autoren für Mammakarzinome (93) sowie für Kolonkarzinome (96) vor. Diese Ergebnisse passen gut zu der in funktionellen Studien herausgearbeiteten Rolle der Polokinase-Isoformen in der Zellteilung und zu Ergebnissen aus Zellkulturversuchen (33-52), in denen eine kurzzeitige temporäre Akkumulation von PLK1 Protein während der Mitose gesehen wird. Prinzipiell wäre somit die PLK-Isoform-Überexpression auch als Folge und Epiphänomen einer gesteigerten Mitoserate in Tumoren zu erklären. Interessant sind in diesem Zusammenhang jedoch einige zusätzliche Aspekte. So zeigen die hier vorgestellten Untersuchungen sowie die Untersuchungen anderer Autoren zwar eine Assoziation von Mitoserate und PLK-Isoform-Expression, jedoch besteht zwischen beiden Faktoren in allen durchgeführten Untersuchungen lediglich ein schwacher bis maximal moderat starker korrelativer Zusammenhang, was bedeutet, dass statistisch nur ein Teil der Variabilität beider Faktoren gleichgerichtet ist. Weiterhin konnte in den hier vorgestellten Untersuchungen durch Doppelfärbungen für PLK-Isoformen und Ki-67 sowohl in Zellkulturen wie auch auf Gewebsschnitten gezeigt werden, dass zumindest in den untersuchten Tumoren keine strikte Assoziation der Expression von PLK-Isoformen und proliferativer Aktivität bestand. In den Untersuchungen waren abschnittsweise sowohl Tumorzellen mit starker zytoplasmatischer PLK-Isoform-Expression, aber ohne Expression des Zellzyklusmarkers Ki-67, wie aber auch Zellen mit Ki-67-Positivität, jedoch nur schwacher punktförmiger PLK-Isoform-Expression nachweisbar. Weiterhin ließen sich in allen untersuchten Entitäten Tumoren nachweisen, in denen nahezu 100% der Tumorzellen eine starke, zytoplasmatische Expression der Proteine aufwiesen, eine Rate an Zellen, die bei weitem auch das höchste proliferative Niveau eines epithelialen

Tumors übersteigt. Eine mögliche Lösung für die genannten Unklarheiten wäre, die PLK-Isoform-Expression und hier vor allem die PLK1-Expression nicht als Folge sondern als mögliche Ursache einer gesteigerten proliferativen Aktivität in Tumoren zu sehen. So wäre denkbar, dass eine aberrante Überexpression der Proteine im Konzert mit anderen tumorspezifischen Signaltransduktionsalterationen die Zellen in eine gesteigerte Mitosefrequenz zwingt. Diesbezüglich fehlen jedoch zurzeit noch experimentelle Hinweise. Als Ursache für die verstärkte Expression der Proteine kommen mehrere Erklärungsansätze in Betracht. So könnte sowohl eine vermehrte Synthese wie auch eine verminderte Proteindegradation für die Proteinakkumulation verantwortlich sein. Eindeutig für das Vorliegen einer erhöhten Syntheserate spricht hier, zumindest für die PLK1, die Beobachtung regelhaft erhöhter mRNA-Konzentrationen in einigen malignen Tumoren (84,87-90). Zur Beantwortung der Frage nach den Gründen der erhöhten mRNA-Expression gibt es nun erneut einige unterschiedliche Erklärungsansätze. Eine mögliche Erklärung wäre, dass alterierte Signaltransduktionen in verschiedenen Signalketten in Tumorzellen zu einer erhöhten Transkription der Proteine führen, diesbezüglich gibt es jedoch keine experimentellen Hinweise. Ein weiterer attraktiver Erklärungsansatz ist die Möglichkeit einer chromosomalen Amplifikation des Genlocus der PLK-Isoformen als Ursache für eine verstärkte Transkription und Proteinsynthese. Diese Theorie wird gestützt durch CGH-Analysen anderer Autoren, nach denen chromosomale Amplifikationen im Bereich des Genlocus der PLK1 (16p12) in einer Reihe von Tumorentitäten vorliegen. Eine hohe Rate von Tumoren mit 16p12 Amplifikation ließ sich beispielsweise im Mammakarzinom (102), Magenkarzinom (103) und Kolonkarzinom (83) nachweisen. Zusätzlich konnten wir durch immunhistologische Untersuchung der Kolonkarzinome der letztgenannten Studie nachweisen, dass Tumoren ohne Amplifikation im entsprechenden chromosomalen Abschnitt immunhistochemisch keine detektierbare PLK1-Expression aufwiesen, während bis zu 71% der Fälle mit chromosomaler Amplifikation im Bereich des Genlocus der PLK1 auch eine mittels Immunhistologie detektierbare Überexpression von PLK1-Protein zeigten.

4.4. Implikationen für eine zielgerichtete Chemotherapie

Basierend auf der bereits ausführlich dargelegten zentralen Rolle der PLK-Isoformen in der Zellteilung, entwickelten mehrere Autoren die Idee, dass eine Hemmung der PLK-Isoformen und hier insbesondere der PLK1 prinzipiell zu einer Wachstumshemmung von

proliferierendem Gewebe führen müsste. *In vitro* konnte diese Theorie in zahlreichen Tumorzelllinien mittels unterschiedlichster molekularbiologischer Verfahren wie Verwendung von dominant-negativ Mutanten (77), Antisense (78) und siRNA (68,79,80) für die PLK1 belegt werden. Eine Ausschaltung der Genfunktion führte nicht nur zu einer Arretierung vieler Tumorzellen in einem metaphaseähnlichen Zustand sondern zwang die entsprechenden Zellen anschließend in die Apoptose. Eine Koloniebildung in Softagar wurde in einigen Zelllinien ebenfalls durch Ausschaltung des Proteins zuverlässig verhindert. Diese *in vitro*-Wirkung konnte schließlich zusätzlich auf *in vivo* Versuchsansätze übertragen werden, indem gezeigt wurde, dass sich mittels vorangehender PLK1-siRNA-Transfektion von Tumorzellen das Xenograftwachstum in Nacktmäusen hemmen lässt (80). Eine weitere Gruppe konnte zeigen, dass eine intravesikale Administration von PLK1-siRNA zu einer Unterdrückung des Wachstums von Harnblasentumoren in einem orthotopen Maustumormodell führt (81). Schließlich wurde kürzlich der erste chemische Hemmstoff der PLK1 vorgestellt (82), der eine vergleichbare Antitumorwirkung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigt. Obwohl für diesen Hemmstoff einige Zweifel an der PLK-Spezifität bestehen, sind in näherer Zukunft weitere spezifische PLK-Inhibitoren zu erwarten, da eine Reihe von Pharmafirmen unter Hochdruck an der Entwicklung von PLK-Hemmstoffen arbeitet. Zur Umsetzung dieses angedachten Therapieansatzes in klinischen Studien ist das zum Großteil in den hier vorgelegten Studien erarbeitete Wissen um die Expression der entsprechenden Zielmoleküle im Gewebe aus mehreren Gründen zwingend notwendig. Zum ersten unterstützt es die Ergebnisse funktioneller Studien durch weitere, wenn auch indirekte Hinweise auf die biologische Bedeutung der auszuschaltenden Proteine. Zum zweiten spricht die entitätsübergreifende, selektive Überexpression von PLK-Isoformen in Malignomen im Vergleich zu nicht-transformiertem Gewebe dafür, dass bei Ausschaltung der Proteine prädominant Effekte im Tumorgewebe zu erwarten sind. Zum dritten bieten die Ergebnisse eine Rationale bei der Auswahl der zunächst probatorisch zu behandelnden Tumorentität(en). Und zum vierten bietet das erworbene Wissen die Möglichkeit, begleitend im Rahmen von Studien den individuellen Expressionsstatus der Zielproteine im Gewebe einzelner Patienten zu bestimmen, eine rationale Einordnung der beobachteten Expression als stark/schwach vorzunehmen und so schließlich sicherzustellen, dass eine optimale Auswertung früher klinischer Studien hinsichtlich des Ansprechens/nicht Ansprechens auf eine probatorische gegen PLK-Isoformen gerichtete Therapie gewährleistet wird.

5. Zusammenfassung

Maligne Tumorerkrankungen nehmen in den Mortalitätsstatistiken industrialisierter Länder seit Jahrzehnten den zweiten Rang ein. Trotz Fortschritten in der Behandlung einiger dieser Erkrankungen hat sich die Gesamttumormortalität in den letzten Jahrzehnten nicht wesentlich verändert, so dass nach wie vor dringender Bedarf nach neuen Behandlungsstrategien besteht. Als neue, nicht interventionelle Therapieoption rückte in den letzten Jahren die Behandlung maligner Tumoren durch eine gezielte Ausschaltung einzelner Proteine und Proteingruppen, die so genannte „zielgerichtete Chemotherapie“, in den Fokus des medizinischen Interesses. Als mögliche Zielproteine kommen vor allem solche Proteine in Frage, die eine Rolle in der Regulation malignitätsdefinierender Zelleigenschaften spielen.

Die Familie der Polokinase (PLK) Isoformen spielt eine zentrale Rolle in der Mitoseregulation normaler und maligner Zellen. Weiterhin ist bekannt, dass eine Hemmung einzelner PLK-Isoformen *in vitro* und *in vivo* zu einer Arretierung von Tumorzellen in der Mitose, zur Apoptoseinduktion und zu einer Verminderung des Tumorwachstums führt. In den vorliegenden Studien wurde der Expressionsstatus von Polokinase-Isoformen in verschiedenen Kohorten von Karzinompatienten erhoben und mit klinisch-pathologischen und zytogenetischen Daten sowie mit dem Patientenüberleben korreliert. Zusätzlich wurde die Assoziation der PLK-Isoform-Expression mit der proliferativen Aktivität von Tumoren und Tumorzelllinien untersucht.

Zwischen 26% und 67% der untersuchten Karzinome der Brust, des Magens, des Kolorektums, der Ovarien, des Pankreas und der Prostata zeigten eine verstärkte PLK1-Expression im Vergleich zum jeweils korrespondierenden, nicht-transformierten Ausgangsgewebe. Zusätzlich konnte eine verstärkte Expression der PLK3-Isoform in malignen Tumoren des Ovars und der Brust nachgewiesen werden.

In einigen Tumoren ließ sich eine Assoziation von proliferativer Aktivität und PLK-Isoform-Überexpression darstellen, eine strikte Begrenzung der PLK-Expression auf proliferierende Tumorzellen lag nicht vor. Die Expression beider PLK-Isoformen korrelierte regelmäßig mit klinisch-pathologischen Parametern, die die Ausdehnung des Tumors und die Tumoraggressivität beschreiben. Zusätzlich ergab sich für die PLK-Isoform-Expression in einigen, aber nicht allen untersuchten Tumoren eine teilweise unabhängige, prognostische Relevanz.

Die erhobenen Daten legen unter Berücksichtigung von Daten aus funktionellen Studien nahe, dass die Inhibition von PLK-Isoformen als ein interessanter neuer Ansatz für eine gezielte Chemotherapie in einer Vielzahl von humanen Karzinomen in Frage kommt.

6. Literaturverzeichnis

1. Bertz J, Hentschel S, Hundsdörfer G, Kaatsch P, Katalinic A, Lehnert M Schön D, Stegmaier C, Ziegler H. Krebs in Deutschland. 4. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, Saarbrücken. 2004.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006;56:106-30.
3. The Research Group for Population-based Cancer Registration in Japan. Cancer incidence and incidence rates in Japan in 1997: estimates based on data from 12 population-based cancer registries. *Jpn J Clin Oncol* 2002;32:318–22.
4. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:3357–65.
5. Edmondson RJ, Monaghan JM. The epidemiology of ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2001;11:423-29.
6. Cooperberg MR, Moul JW, Carroll PR. The changing face of prostate cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:8146-51.
7. Chau I, Chan S, Cunningham D. Overview of preoperative and postoperative therapy for colorectal cancer: the European and United States perspectives. *Clin Colorectal Cancer* 2003;3:19-33.
8. Vanhoefler U. Molecular mechanisms and targeting of colorectal cancer. *Semin Oncol* 2005;32 Suppl 8:7-10.
9. Alberts SR, Cervantes A, van de Velde CJ. Gastric cancer: epidemiology, pathology and treatment. *Ann Oncol*. 2003;14 Suppl 2:ii31-6.

10. Haller DG: New perspectives in the management of pancreas cancer. *Semin Oncol* 2003;30:3-10.
11. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
12. Bell R, Verma S, Untch M, Cameron D, Smith I. Maximizing clinical benefit with trastuzumab. *Semin Oncol* 2004;31 Suppl 10:35-44.
13. Peggs K. Imatinib mesylate--gold standards and silver linings. *Clin Exp Med* 2004;4:1-9.
14. van der Zwan SM, DeMatteo RP. Gastrointestinal stromal tumor: 5 years later. *Cancer* 2005;104:1781-8.
15. Silvestri GA, Rivera MP. Targeted therapy for the treatment of advanced non-small cell lung cancer: a review of the epidermal growth factor receptor antagonists. *Chest* 2005;128:3975-84.
16. Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr Relat Cancer* 2004;11:689-708.
17. Sunkel CE, Glover DM. Polo, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. *J Cell Sci* 1988;89:25-38.
18. Llamazares S, Moreira A, Tavares A, Girdham C, Spruce BA, Gonzalez C, Karess RE, Glover DM, Sunkel CE. polo encodes a protein kinase homolog required for mitosis in *Drosophila*. *Genes Dev* 1991;5:2153-65.
19. Kitada K, Johnson AL, Johnston LH, Sugino A. A multicopy suppressor gene of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cell cycle mutant gene *dbf4* encodes a protein kinase and is identified as *CDC5*. *Mol Cell Biol* 1993;13:4445-57.
20. Nigg EA. Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:776-83.

21. Hamanaka R, Maloid S, Smith MR, O'Connell CD, Longo DL, Ferris DK. Cloning and characterization of human and murine homologues of the *Drosophila* polo serine-threonine kinase. *Cell Growth Differ* 1994;5:249-57.
22. Simmons DL, Neel BG, Stevens R, Evett G, Erikson RL. Identification of an early-growth-response gene encoding a novel putative protein kinase. *Mol Cell Biol* 1992;12:4164-9.
23. Clay FJ, McEwen SJ, Bertoncetto I, Wilks AF, Dunn AR. Identification and cloning of a protein kinase-encoding mouse gene, Plk, related to the polo gene of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4882-6.
24. Lake RJ, Jelinek WR. Cell cycle- and terminal differentiation-associated regulation of the mouse mRNA encoding a conserved mitotic protein kinase. *Mol Cell Biol* 1993;13:7793-801.
25. Golsteyn RM, Schultz SJ, Bartek J, Ziemiecki A, Ried T, Nigg EA. Cell cycle analysis and chromosomal localization of human Plk1, a putative homologue of the mitotic kinases *Drosophila* polo and *Saccharomyces cerevisiae* Cdc5. *J Cell Sci* 1994;107:1509-17.
26. Holtrich U, Wolf G, Brauninger A, Karn T, Bohme B, Rubsamen-Waigmann H, Strebhardt K. Induction and down-regulation of PLK, a human serine/threonine kinase expressed in proliferating cells and tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1736-40.
27. Holtrich U, Wolf G, Yuan J, Bereiter-Hahn J, Karn T, Weiler M, Kauselmann G, Rehli M, Andreesen R, Kaufmann M, Kuhl D, Strebhardt K. Adhesion induced expression of the serine/threonine kinase Fnk in human macrophages. *Oncogene* 2000;19:4832-9.
28. Li B, Ouyang B, Pan H, Reissmann PT, Slamon DJ, Arceci R, Lu L, Dai W. Prk, a cytokine-inducible human protein serine/threonine kinase whose expression appears to be down-regulated in lung carcinomas. *J Biol Chem* 1996;271:19402-8.
29. Lee KS, Grenfell TZ, Yarm FR, Erikson RL. Mutation of the polo-box disrupts localization and mitotic functions of the mammalian polo kinase Plk. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9301-6.

30. Fode C, Motro B, Yousefi S, Heffernan M, Dennis JW. Sak, a murine protein-serine/threonine kinase that is related to the *Drosophila* polo kinase and involved in cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:6388-92.
31. Hudson JW, Chen L-Y, Fode C, Binkert C, Dennis J. Sak kinase gene structure and transcriptional regulation. *Gene* 2000;241:65-73.
32. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 2002;298:1912-34.
33. Barr FA, Sillje HH, Nigg EA. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:429-40.
34. van Vugt MA, Medema RH. Getting in and out of mitosis with Polo-like kinase-1. *Oncogene* 2005;24:2844-59.
35. Xie S, Xie B, Lee MY, Dai W. Regulation of cell cycle checkpoints by polo-like kinases. *Oncogene* 2005;24:277-86.
36. Abrieu A, Brassac T, Galas S, Fisher D, Labbe JC, Doree M. The Polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/M-phase transition of the cell cycle in *Xenopus* eggs. *J Cell Sci* 1998;111:1751-7.
37. Qian YW, Erikson E, Li C, Maller JL. Activated polo-like kinase Plx1 is required at multiple points during mitosis in *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol* 1998;18:4262-71.
38. Roshak AK, Capper EA, Imburgia C, Fornwald J, Scott G, Marshall LA. The human polo-like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase. *Cell Signal* 2000;12:405-11.
39. Toyoshima-Morimoto F, Taniguchi E, Nishida E. Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *EMBO Rep* 2002;3:341-48.

40. Yuan J, Eckerdt F, Bereiter-Hahn J, Kurunci-Csacsco E, Kaufmann M, Strebhardt K. Cooperative phosphorylation including the activity of polo-like kinase 1 regulates the subcellular localization of cyclin B1. *Oncogene* 2002;21:8282-92.
41. Lane HA, Nigg EA. Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J Cell Biol* 1996;135:1701-13.
42. de Carcer G, do Carmo Avides M, Lallena MJ, Glover DM, Gonzalez C. Requirement of Hsp90 for centrosomal function reflects its regulation of Polo kinase stability. *EMBO J* 2001;20:2878-84.
43. do Carmo Avides M, Tavares A, Glover DM. Polo kinase and Asp are needed to promote the mitotic organizing activity of centrosomes. *Nat Cell Biol* 2001;3:421-4.
44. Ohkura H, Hagan IM, Glover DM. The conserved *Schizosaccharomyces pombe* kinase *plp1*, required to form a bipolar spindle, the actin ring, and septum, can drive septum formation in G1 and G2 cells. *Genes Dev* 1995;9:1059-73.
45. Sumara I, Vorlaufer E, Stukenberg PT, Kelm O, Redemann N, Nigg EA, Peters JM. The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol Cell* 2002;9:515-25.
46. Golan A, Yudkovsky Y, Hershko A. The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk. *J Biol Chem* 2002;277:15552-7.
47. Descombes P, Nigg EA. The polo-like kinase Plx1 is required for M phase exit and destruction of mitotic regulators in *Xenopus* egg extracts. *EMBO J* 1998;17:1328-35.
48. Zhou T, Aumais JP, Liu X, Yu-Lee LY, Erikson RL. A role for Plk1 phosphorylation of NudC in cytokinesis. *Dev Cell* 2003;5:127-38.
49. Carmena M, Riparbelli MG, Minestrini G, Tavares AM, Adams R, Callaini G, Glover DM. *Drosophila* polo kinase is required for cytokinesis. *J Cell Biol* 1998;143:659-71.

50. Mundt KE, Golsteyn RM, Lane HA, Nigg EA. On the regulation and function of human polo-like kinase 1 (PLK1): effects of overexpression on cell cycle progression. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;239:377-85.
51. Smits VA, Klompaker R, Arnaud L, Rijksen G, Nigg EA, Medema RH. Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint. *Nat Cell Biol* 2000;2:672-6.
52. Sanchez Y, Bachant J, Wang H, Hu F, Liu D, Tetzlaff M, Elledge SJ. Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms. *Science* 1999;286:1166-71.
53. Ouyang B, Pan H, Lu L, Li J, Stambrook P, Li B, Dai W. Human Prk is a conserved protein serine/threonine kinase involved in regulating M phase functions. *J Biol Chem* 1997;272:28646-51.
54. Chase D, Feng Y, Hanshaw B, Winkles JA, Longo DL, Ferris DK. Expression and phosphorylation of fibroblast-growth-factor-inducible kinase (Fnk) during cell-cycle progression. *Biochem J* 1998;333:655-60.
55. Bahassi el M, Conn CW, Myer DL, Hennigan RF, McGowan CH, Sanchez Y, Stambrook PJ. Mammalian Polo-like kinase 3 (Plk3) is a multifunctional protein involved in stress response pathways. *Oncogene* 2002;21:6633-40.
56. Glover DM, Hagan IM, Tavares AA. Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis. *Genes Dev* 1998;12:3777-87.
57. Dai W, Cogswell JP. Polo-like kinases and the microtubule organization center: targets for cancer therapies. *Prog Cell Cycle Res* 2003;5:327-34.
58. Wang Q, Xie S, Chen J, Fukasawa K, Naik U, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Jhanwar-Uniyal M, Dai W. Cell cycle arrest and apoptosis induced by human Polo-like kinase 3 is mediated through perturbation of microtubule integrity. *Mol Cell Biol* 2002;22:3450-9.

59. Bahassi el M, Hennigan RF, Myer DL, Stambrook PJ. Cdc25C phosphorylation on serine 191 by Plk3 promotes its nuclear translocation. *Oncogene* 2004;23:2658-63.
60. Ouyang B, Li W, Pan H, Meadows J, Hoffmann I, Dai W. The physical association and phosphorylation of Cdc25C protein phosphatase by Prk. *Oncogene* 1999;18:6029-36.
61. Takai N, Hamanaka R, Yoshimatsu J, Miyakawa I. Polo-like kinases (Plks) and cancer. *Oncogene* 2005;24:287-91.
62. Eckerdt F, Yuan J, Strebhardt K. Polo-like kinases and oncogenesis. *Oncogene* 2005;24:267-76.
63. Donaldson MM, Tavares AA, Ohkura H, Deak P, Glover DM. Metaphase arrest with centromere separation in polo mutants of *Drosophila*. *J Cell Biol* 2001;153:663-76.
64. Smith MR, Wilson ML, Hamanaka R, Chase D, Kung H, Longo DL, Ferris DK. Malignant transformation of mammalian cells initiated by constitutive expression of the polo-like kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;234:397-405.
65. van Vugt MA, van de Weerd BC, Vader G, Janssen H, Calafat J, Klomp maker R, Wolthuis RM, Medema RH. Polo-like kinase-1 is required for bipolar spindle formation but is dispensable for anaphase promoting complex/Cdc20 activation and initiation of cytokinesis. *J Biol Chem* 2004;279:36841-54.
66. Xie S, Wu H, Wang Q, Cogswell JP, Husain I, Conn C, Stambrook P, Jhanwar-Uniyal M, Dai W. Plk3 functionally links DNA damage to cell cycle arrest and apoptosis at least in part via the p53 pathway. *J Biol Chem* 2001;276:43305-12.
67. Ando K, Ozaki T, Yamamoto H, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Fukuzawa M, Nakagawara A. Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation. *J Biol Chem* 2004;279:25549-61.
68. Liu X, Erikson RL. Polo-like kinase (Plk)1 depletion induces apoptosis in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:5789-94.

69. Incassati A, Patel D, McCance DJ. Induction of tetraploidy through loss of p53 and upregulation of Plk1 by human papillomavirus type-16 E6. *Oncogene* 2005; [Epub ahead of print]
70. Patel D, Incassati A, Wang N, McCance DJ. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 cause polyploidy in human keratinocytes and up-regulation of G2-M-phase proteins. *Cancer Res* 2004;64:1299-306.
71. Lin HR, Ting NS, Qin J, Lee WH. M phase-specific phosphorylation of BRCA2 by Polo-like kinase 1 correlates with the dissociation of the BRCA2-P/CAF complex. *J Biol Chem* 2003;278:35979-87.
72. Lee M, Daniels MJ, Venkitaraman AR. Phosphorylation of BRCA2 by the Polo-like kinase Plk1 is regulated by DNA damage and mitotic progression. *Oncogene* 2004;23:865-72.
73. Tsvetkov L, Xu X, Li J, Stern DF. Polo-like kinase 1 and Chk2 interact and co-localize to centrosomes and the midbody. *J Biol Chem* 2003;278:8468-75.
74. van Vugt MA, Smits VA, Klompaker R, Medema RH. Inhibition of Polo-like kinase-1 by DNA damage occurs in an ATM- or ATR-dependent fashion. *J Biol Chem* 2001;276:41656-60.
75. Yuan JH, Feng Y, Fisher RH, Maloid S, Longo DL, Ferris DK. Polo-like kinase 1 inactivation following mitotic DNA damaging treatments is independent of ataxia telangiectasia mutated kinase. *Mol Cancer Res* 2004;2:417-26.
76. Gunawardena RW, Siddiqui H, Solomon DA, Mayhew CN, Held J, Angus SP, Knudsen ES. Hierarchical requirement of SWI/SNF in retinoblastoma tumor suppressor-mediated repression of Plk1. *J Biol Chem* 2004;279:29278-85.
77. Cogswell JP, Brown CE, Bisi JE, Neill SD. Dominant-negative polo-like kinase 1 induces mitotic catastrophe independent of cdc25C function. *Cell Growth Differ* 2000;11:615-23.

78. Elez R, Piiper A, Kronenberger B, Kock M, Brendel M, Hermann E, Pliquett U, Neumann E, Zeuzem S. Tumor regression by combination antisense therapy against Plk1 and Bcl-2. *Oncogene* 2003;22:69-80.
79. Spankuch-Schmitt B, Bereiter-Hahn J, Kaufmann M, Strebhardt K. Effect of RNA silencing of polo-like kinase-1 (PLK1) on apoptosis and spindle formation in human cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1863-77.
80. Guan R, Tapang P, Levenson JD, Albert D, Giranda VL, Luo Y. Small interfering RNA-mediated Polo-like kinase 1 depletion preferentially reduces the survival of p53-defective, oncogenic transformed cells and inhibits tumor growth in animals. *Cancer Res* 2005;65:2698-704.
81. Nogawa M, Yuasa T, Kimura S, Tanaka M, Kuroda J, Sato K, Yokota A, Segawa H, Toda Y, Kageyama S, Yoshiki T, Okada Y, Maekawa T. Intravesical administration of small interfering RNA targeting PLK-1 successfully prevents the growth of bladder cancer. *J Clin Invest* 2005;115:978-85.
82. Gumireddy K, Reddy MV, Cosenza SC, Boominathan R, Baker SJ, Papathi N, Jiang J, Holland J, Reddy EP. ON01910, a non-ATP-competitive small molecule inhibitor of Plk1, is a potent anticancer agent. *Cancer Cell* 2005;7:275-86.
83. Knosel T, Schluns K, Stein U, Schwabe H, Schlag PM, Dietel M, Petersen I. Chromosomal alterations during lymphatic and liver metastasis formation of colorectal cancer. *Neoplasia* 2004;6:23-8.
84. Wolf G, Elez R, Doermer A, Holtrich U, Ackermann H, Stutte HJ, Altmannsberger HM, Rubsamen-Waigmann H, Strebhardt K. Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1997;14:543-9.
85. Knecht R, Oberhauser C, Strebhardt K. PLK (polo-like kinase), a new prognostic marker for oropharyngeal carcinomas. *Int J Cancer* 2000;89:535-6.
86. Seeburg DP, Pak D, Sheng M. Polo-like kinases in the nervous system. *Oncogene* 2005;24:292-8.

87. Knecht R, Elez R, Oechler M, Solbach C, von Ilberg C, Strebhardt K. Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 1999;59:2794-7.
88. Tokumitsu Y, Mori M, Tanaka S, Akazawa K, Nakano S, Niho Y. Prognostic significance of polo-like kinase expression in esophageal carcinoma. *Int J Oncol* 1999;15:687-92.
89. Macmillan JC, Hudson JW, Bull S, Dennis JW, Swallow CJ. Comparative Expression of the Mitotic Regulators SAK and PLK in Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol* 2001;8:729-40.
90. Yamada S, Ohira M, Horie H, Ando K, Takayasu H, Suzuki Y, Sugano S, Hirata T, Goto T, Matsunaga T, Hiyama E, Hayashi Y, Ando H, Suita S, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Ohnuma N, Nakagawara A. Expression profiling and differential screening between hepatoblastomas and the corresponding normal livers: identification of high expression of the PLK1 oncogene as a poor-prognostic indicator of hepatoblastomas. *Oncogene* 2004;23:5901-11.
91. Kneisel L, Strebhardt K, Bernd A, Wolter M, Binder A, Kaufmann R. Expression of polo-like kinase (PLK1) in thin melanomas: a novel marker of metastatic disease. *J Cutan Pathol* 2002;29:354-8.
92. Strebhardt K, Kneisel L, Linhart C, Bernd A, Kaufmann R. Prognostic value of pololike kinase expression in melanomas. *JAMA* 2000;283:479-80.
93. Wolf G, Hildenbrand R, Schwar C, Grobholz R, Kaufmann M, Stutte HJ, Strebhardt K, Bleyl U. Polo-like kinase: a novel marker of proliferation: correlation with estrogen-receptor expression in human breast cancer. *Pathol Res Pract* 2000;196:753-9.
94. Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K, Nasu K, Hamanaka R, Miyakawa I. Expression of polo-like kinase in ovarian cancer is associated with histological grade and clinical stage. *Cancer Lett* 2001;164:41-9.
95. Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K, Nasu K, Hamanaka R, Miyakawa I. Polo-like kinase (PLK) expression in endometrial carcinoma. *Cancer Lett* 2001;169:41-9.

96. Takahashi T, Sano B, Nagata T, Kato H, Sugiyama Y, Kunieda K, Kimura M, Okano Y, Saji S. Polo-like kinase 1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers. *Cancer Sci* 2003;94:148-52.
97. Dietzmann K, Kirches E, von Bossanyi, Jachau K, Mawrin C. Increased human polo-like kinase-1 expression in gliomas. *J Neurooncol* 2001;53:1-11.
98. Ito Y, Miyoshi E, Sasaki N, Kakudo K, Yoshida H, Tomoda C, Uruno T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Matsuura N, Kuma K, Miyauchi A. Polo-like kinase 1 overexpression is an early event in the progression of papillary carcinoma. *Br J Cancer* 2004;90:414-8.
99. Ito Y, Nakamura Y, Yoshida H, Tomoda C, Uruno T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Kuma K, Kakudo K, Miyauchi A. Polo-like kinase 1 expression in medullary carcinoma of the thyroid: its relationship with clinicopathological features. *Pathobiology* 2005;72:186-90.
100. Dai W, Li Y, Ouyang B, Pan H, Reissmann P, Li J, Wiest J, Stambrook P, Gluckman JL, Noffsinger A, Bejarano P. PRK, a cell cycle gene localized to 8p21, is downregulated in head and neck cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;27:332-6.
101. McLeod HL, Murray GI. Tumour markers of prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1999;79:191-203.
102. Tirkkonen M, Tanner M, Karhu R, Kallioniemi A, Isola J, Kallioniemi OP. Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;21:177-84.
103. Tay ST, Leong SH, Yu K, Aggarwal A, Tan SY, Lee CH, Wong K, Visvanathan J, Lim D, Wong WK, Soo KC, Kon OL, Tan P. A combined comparative genomic hybridization and expression microarray analysis of gastric cancer reveals novel molecular subtypes. *Cancer Res.* 2003;63:3309-16.

7. Danksagung

Mein größter Dank für die Anfertigung der hier vorliegenden Arbeit gilt Prof. Dr. med. Manfred Dietel für die kontinuierliche Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit und für die Schaffung einer offenen kreativen Atmosphäre an seinem Institut, die es mir ermöglicht hat, meinen eigenen Forschungsinteressen ungehindert und mit stetiger Unterstützung nachzugehen. Weiterhin möchte ich mich bei meinen wissenschaftlichen Lehrern Prof. Dr. rer. nat. Sebastian Bachmann und Prof. Dr. med. Steffen Hauptmann bedanken, die mich in die Welt der medizinischen Forschung eingeführt haben. Mein Dank gilt außerdem meinen klinischen Lehrern, hier vor allem Prof. Dr. med. Hans Guski und Prof. Dr. med. Rudolf Meyer, die mir die Schönheit der klinischen Pathologie nahe gebracht haben. Weiterhin möchte ich meinen Kollegen und Freunden PD Dr. med. Carsten Denkert und PD Dr. med. Glen Kristiansen danken, mit denen mich eine nun schon seit mehreren Jahren bestehende, äußerst fruchtbare wissenschaftliche Zusammenarbeit verbindet. Danken möchte ich speziell auch allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Hauptmann/Denkert insbesondere Lisa Glanz, Andrea Ullrich, Ines Koch, Dr. med. Martin Köbel, Dr. med. Silvia Niesporek, Dr. med. Aurelia Noske und Dr. med. Ann-Christin Buckendahl. Mein Dank gilt ferner allen weiteren Kollegen am Institut für Pathologie der Charité und allen klinischen Kollegen, die an gemeinsamen wissenschaftlichen Projekten beteiligt waren, insbesondere möchte ich hier namentlich Dr. med. Roland Schmitt und Dr. med. Thomas Kröncke erwähnen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Kooperationspartnern der Altana Pharma AG, die an der Erarbeitung der Ergebnisse der hier vorgestellten Arbeiten einen großen Anteil hatten und mit denen mich eine langjährige und hoffentlich noch lang andauernde, fruchtbare wissenschaftliche Zusammenarbeit verbindet, hier möchte ich besonders Dr. rer. nat. Volker Gekeler, Dr. rer. nat. Mathias Schmitt, Dr. rer. nat. Hans-Peter Hofmann, Dr. rer. nat. Markus Boehm und Frau Claudia Weller persönlich danken.

Schließlich gilt mein ganz besonderer Dank meiner Freundin Eva Forster, die meine wissenschaftliche Begeisterung und teilweise ausgedehnte Freizeitbeschäftigung mit medizinischer Forschung seit Jahren klaglos erträgt und mich in diesem Interesse immer unterstützt hat.

Anhang

Die hier vorgelegte kumulative Habilitationsschrift beruht auf folgenden bereits publizierten Originalarbeiten:

1. Weichert W, Denkert C, Schmidt M, Gekeler V, Wolf G, Köbel M, Dietel M, Hauptmann S. Polo like kinase isoform expression is a prognostic factor in ovarian carcinoma. *Br J Cancer*. 2004;90:815-21.
2. Weichert W, Schmidt M, Gekeler V, Denkert C, Stephan C, Jung K, Loening K, Dietel M, Kristiansen G. Polo like kinase 1 is overexpressed in Prostate Cancer and linked to higher Tumor Grades. *Prostate*. 2004;60:240-5.
3. Weichert W, Kristiansen G, Schmidt M, Gekeler V, Noske A, Niesporek S, Dietel M, Denkert C. Polo-like kinase 1 expression is a prognostic factor in human colon cancer. *World J Gastroenterol*. 2005;11:5644-50.
4. Weichert W, Kristiansen G, Winzer KJ, Schmidt M, Gekeler V, Noske A, Müller BM, Niesporek S, Dietel M, Denkert C. Polo-like kinase isoforms in breast cancer: expression patterns and prognostic implications. *Virchows Arch* 2005;446:442-450.
5. Weichert W, Ullrich A, Schmidt M, Gekeler V, Noske A, Niesporek S, Buckendahl AC, Dietel M, Denkert C. Expression Patterns of Polo-like Kinase 1 in Human Gastric Cancer. *Cancer Sci*. 2006;97:271-6.
6. Weichert W, Schmidt M, Jacob J, Gekeler V, Langrehr J, Neuhaus P, Bahra M, Denkert C, Dietel M, Kristiansen G. Overexpression of Polo-like kinase 1 is a common and early event in pancreatic cancer. *Pancreatol*. 2005;5:259-265.

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....
Datum

.....
Unterschrift