

## **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 Zystadenome (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  $\chi^2$  -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 prostatichen 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 periprostatichen 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 prostatichen, 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.

	<b>Fälle</b>	<b>PLK1 negativ</b>	<b>PLK1 positiv</b>	<b>p-Wert</b>
	36	20 (55.6%)	16 (44.4%)	
<b>CGH</b>				
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:  $\chi^2$ -Test für Trends*

	<b>Primäre Karzinome</b>	<b>PLK1 negativ</b>	<b>PLK1 positiv</b>	<b>p-Wert</b>
	20	8 (40%)	12 (60%)	
<b>CGH</b>				
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  $\chi^2$ -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  $\chi^2$ -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  $\chi^2$ -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.

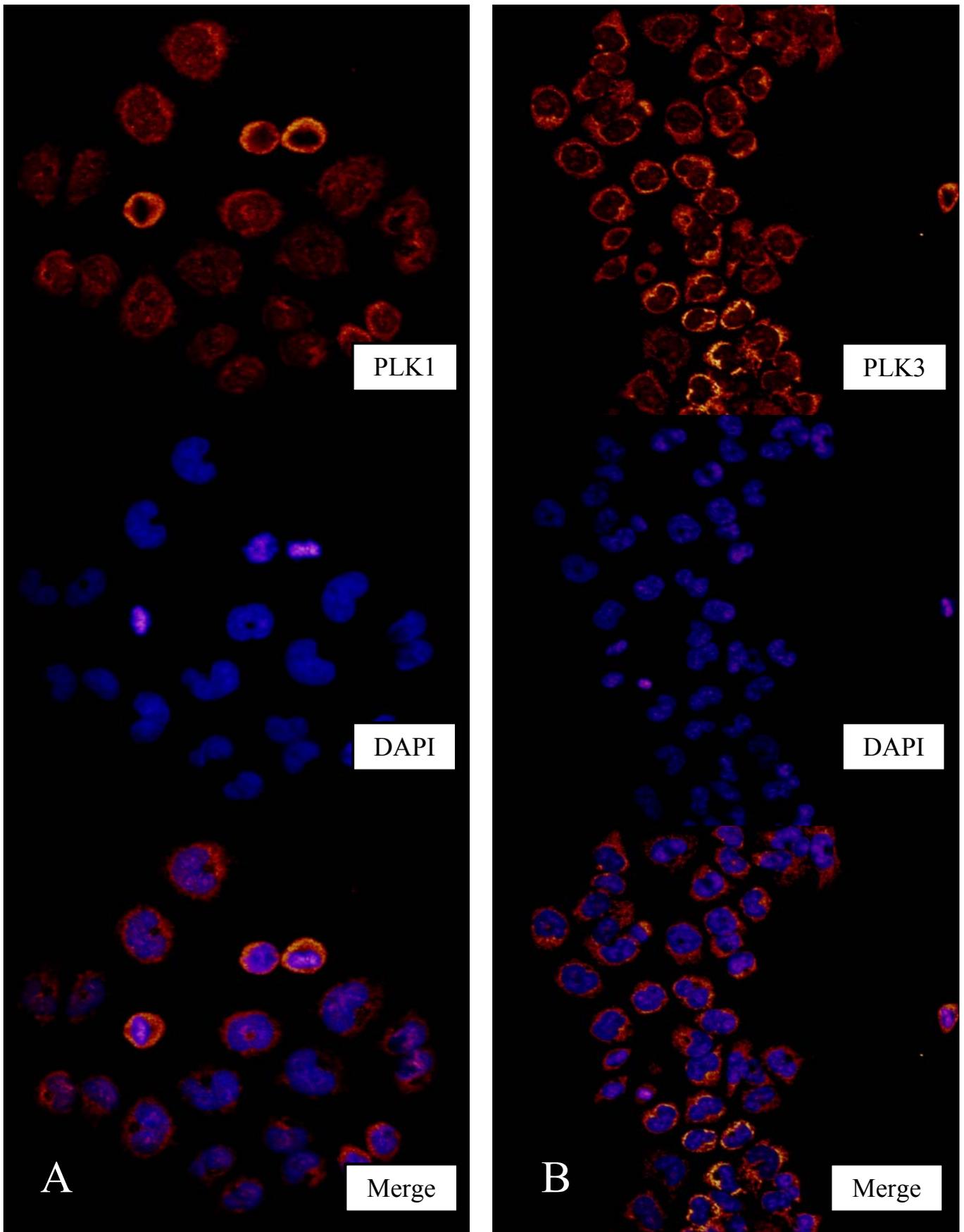


Abbildung 6: Fluoreszenzdarstellung von PLK1 (A) und PLK3 (B) in der Magenkarzinomzelllinie EGP 85-257P

### ***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.