

## 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.