

Polo 样蛋白激酶 4 的研究进展

宣君丽 闫小毅 周天华*

(浙江大学医学院细胞生物学研究所, 杭州 310058)

摘要 Polo 样蛋白激酶 4 (Polo-like kinase 4, PLK4) 为 Polo 样蛋白激酶家族的成员之一, 是一种进化上高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。PLK4 主要在分裂活跃的组织 and 细胞中表达, 可能是中心粒复制的主要调控因子之一, 在中心粒的复制过程中起关键作用。此外, PLK4 与肿瘤发生、发展有着密切的联系。本文主要就 PLK4 近几年的研究进展作一综述。

关键词 PLK4; 中心粒复制; 肿瘤

Polo 样蛋白激酶 (Polo-like kinases, PLKs) 是一类进化上高度保守的丝/苏氨酸蛋白激酶, 其氨基端均具有一个高度同源的丝/苏氨酸激酶催化结构域 (catalytic domain), 羧基端具有 polo 盒结构域 (polo-box domain, PBD), 该结构域可以调节 PLKs 激酶活性且与该蛋白的亚细胞定位有关。第一个 Polo 样蛋白激酶 (果蝇的 Polo 蛋白) 是在不能进行正常有丝分裂的果蝇突变体中发现的^[1]。随后, 陆续在其它的真核生物中发现了 Polo 激酶的同源物。迄今为止, 已在哺乳动物中发现了四个 PLKs 家族成员: PLK1、PLK2/Snk、PLK3/Fnk/Prk 和 PLK4/Sak^[2]。其中, PLK4 在氨基酸序列上与其它 PLKs 差异最大, 其它 PLKs 的 PBD 都包含两个串联排列的 polo 盒, 而 PLK4 只有一个 polo 盒。PLK4 被发现主要在分裂活跃的组织 and 细胞中表达, 可能参与中心体复制和成熟, 细胞应激反应 (例如 DNA 损伤), 细胞周期的调控等生理过程。现已发现, PLK4 在部分肿瘤组织和细胞系中表达异常, 并受到 p53 的调控^[3], 可能参与了肿瘤的发生、发展, 因而是肿瘤靶向治疗的一个潜在靶点。

1 PLK4 激酶的结构、表达以及活性调节

1.1 PLK4 激酶的基因和蛋白质结构

1994 年, Fode 等^[4]为了获得调节唾液酸化作用的基因, 将小鼠淋巴 cDNA 文库转染到 CHOP 细胞并加入唾液酸凝集素 WGA 进行筛选, 经过数次筛选, 分离得到一个基因。该基因编码产物与 Polo 家族蛋白 (Snk 和 PLK1) 极其相似, 包含一个高度同源的 N 末端激酶结构域和 C 末端结构域, 因此被命名为 Snk/Plk-同类蛋白激酶 (Snk/Plk-akin kinase, Sak)。此后, 更多的研究者称其为 PLK4。

PLK4 广泛存在于线虫、果蝇和灵长类动物等真核生物中, 但在原核生物中没有发现。小鼠 PLK4 基因位于 13 号染色体, 人类 PLK4 基因位于染色体 4q28, 这个区域在人类肿瘤细胞 (尤其是肝细胞) 中经常发生染色体重排或缺失^[5]。小鼠中 PLK4 基因编码两个蛋白亚型, 分别是 PLK4-a 和 PLK4-b。PLK4-a 全长 925 个氨基酸, PLK4-b 全长 464 个氨基酸, 两者 N 末端 416 个氨基酸相同, C 末端区域不同^[4]。人类仅有一个 PLK4 蛋白, 全长 970 个氨基酸, 与鼠类 PLK4-a 具有高度同源性。

PLK4 不同于其他 PLKs, 只有一个 polo 盒, 可以形成分子间同型二聚体。这些二聚体与 PLK1 两个 polo 盒形成的分子内异二聚体结构相似^[5]。PLK1 两个 polo 盒形成的分子内异二聚体以磷酸化依赖的方式与激酶结构域结合, 从而封闭了激酶的催化区。PLK1 与磷酸化肽段结合可以改变 polo 盒构象, 使其脱离与催化结构域的结合, 暴露出激酶结构域, 从而解除对激酶的抑制作用。一般情况下, 当 PLK1 第 210 位苏氨酸磷酸化时, 其激酶活性增高。但是绝大多数参与 PLK1 磷酸化肽段结合的残基在 PLK4 中并不是保守的, 暗示 PLK4 结合底物的方式可能与 PLK1 不一样, PLK4 的 polo 盒或许不起底物结合位点的作用。

1.2 PLK4 激酶的表达调控

PLK4 在分裂活跃的组织 and 细胞中高表达。成年小鼠中, PLK4 mRNA 在睾丸组织高表达, 在脾和

收稿日期: 2009-12-14 接受日期: 2010-06-24

国家自然科学基金 (No.30771107) 和浙江省自然科学基金 (No. Y207382) 资助项目

* 通讯作者。Tel: 0571-88208257, E-mail: tzhou@zju.edu.cn

胸腺中中等表达,而在脑、心、肾、肝和卵巢中则几乎没有表达^[4]。Karn 等^[6]研究了 16 种不同的人体组织,发现 PLK4 mRNA 在睾丸中表达水平最高。PLK4 在许多人类肿瘤细胞株(HeLa、SKOV-3、Saos-2、A-431、Du145 和 H1229 等)中也有表达^[7]。

PLK4 mRNA 和蛋白表达水平随细胞周期呈周期性变化,类似于 PLK 家族其它成员。在正常周期性循环的细胞中,PLK4 mRNA 水平在 G₀ 期细胞中不表达,在 G₁ 期末增加,并在 S 期和 M 期持续上升,有丝分裂结束后,在 G₁ 期早期逐渐下降。研究表明这种精确调控对于细胞生长和细胞分裂时维持细胞核的完整性是必要的^[8]。

PLK4 蛋白表达水平受到转录后调控。PLK4 蛋白具有三个 PEST 序列,一个位于 N 端催化域而另两个紧密相连,位于 C 端。PEST 是泛素连接酶的识别位点,可使 PLK4 被泛素化,从而被蛋白酶体快速降解,因此 PLK4 蛋白的半衰期很短,只有 2~3 个小时。Yamashita 等^[9]证明 PEST 序列的缺失能增强 PLK4 的稳定性。另外,PEST 介导的 PLK4 降解可能受到胞质酪氨酸激酶 TEC 调控,TEC 磷酸化 PLK4 可以增强 PLK4 的稳定性。研究发现 p53 可以显著抑制 PLK4 的表达,而且这种抑制是不依赖细胞系的^[3]。p53 对 PLK4 的抑制可以被曲古抑菌素 A——组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂缓解。p53 可能是通过募集 HDAC 来抑制 PLK4 的表达。PLK4 蛋白序列中第 170 位苏氨酸突变成天冬氨酸(T170D)后极大提高了激酶活性,而 PLK4 ATP 结合位点的突变,即第 41 位赖氨酸突变成甲硫氨酸(K41M),其激酶活性明显下降^[5]。

1.3 PLK4 激酶的亚细胞定位

在 G₂ 期,外源表达的 PLK4 主要分布在核仁中,在 G₂/M 期重定位于中心体,胞质分裂时则被募集到分裂沟上^[10]。外源表达 PLK4 的 polo 盒结构域,主要分布在中心体和分裂沟,这与 Cdc5 和 PLK1 的 polo 盒结构域的定位一致,提示 PLK4 激酶可能具有一个功能性 polo 盒结构域。实验发现 polo 盒结构域的缺失并不破坏 PLK4 的亚细胞定位。但是,与全长相比,更大的包含 polo 盒结构域 C 末端的缺失可导致 PLK4 在中心体上的定位效率下降。外源表达 PLK4 polo 盒结构域的上游区域(cry-pb),发现其也定位在中心体,暗示 cry-pb 也可使 PLK4 定位在中心体上。这样,po1o 盒结构域对 PLK4 的中心体定位并不是必需的。而 PLK1 和 Cdc5 中 polo 盒结构域对其中心体定位则是必不可少的^[11]。

2 PLK4 的生物学功能研究

近年来研究发现 PLK4 是中心粒复制的主要调控因子之一,PLK4 的表达异常会影响中心粒的正常复制,干扰有丝分裂的正常进程。PLK4 在肿瘤细胞中表达异常,与肿瘤的发生、发展也有着密切的联系。

2.1 PLK4 与中心体复制

中心体是动物细胞内主要的微管组织中心(microtubule-organizing center),每一个中心体包含两个中心粒和中心粒外周基质(PCM)^[12]。中心粒的外壁由 9 组微管蛋白三连体组成,呈圆桶状结构。中心体的稳定和正常复制在保持遗传的稳定性和协调联系细胞其它活动中起着关键的作用。中心体的异常可导致染色体分离紊乱,改变细胞的遗传稳定性,干扰细胞的正常活动,进而可能导致肿瘤发生^[13,14]。

通常情况下,一次细胞分裂完成后,每个新的子代细胞仅有一个中心体,包含两个中心粒。在有丝分裂后期/G₁ 期的早期阶段,两个中心粒分离;S 期,细胞以一个中心粒(母中心粒)为模板进行中心粒复制,在母中心粒近端形成原中心粒;在 G₂/M 转变期,中心体成熟。有丝分裂前期,两个中心体分别沿着细胞核的表面向两侧迁移并形成纺锤体的两极。有丝分裂结束时,每个子代细胞继承了一个纺锤体极,包含一个中心体。

PLK4 是中心粒复制的关键调控因子之一^[15]。中心粒的复制起始于两个中心粒分离,接着 PLK4 活化,PLK4 促使下游调控因子 Sas-6 和其它中心粒成分募集到母中心粒,这是中心粒组装的关键步骤。在人的细胞中,母中心粒上的 PLK4 激活后, γ -微管蛋白、CPAP、Cep135 和 Sas-6 等蛋白被迅速招募到中心体上。然后 CP110 在新形成的中心粒处形成一个帽状结构。最后,伴随着募集到中心粒的微管蛋白增多,中心粒逐渐成熟(图 1)。

PLK4 表达水平的异常,往往导致中心粒数目的改变和中心体结构异常。Habedanck 等^[16]首先发现,过量表达野生型 PLK4 可导致细胞中心粒数目增加,在转染野生型 PLK4 的 U2OS 细胞中,约 80% 细胞含有 4 个以上的中心粒;转染激酶失活型 PLK4 的细胞中这一比例约为 20%~30%,在未转染的细胞中则仅有不到 10% 具有 4 个以上的中心粒。在 HeLa 细胞中,过量表达 PLK4 也同样导致中心粒数目增加。除中心粒数目增加外,过量表达 PLK4 还可导致中心体结构异常,一些细胞内出现多个散落的中心粒,一些细胞中多个子中心粒排列在母中心粒周围,形成

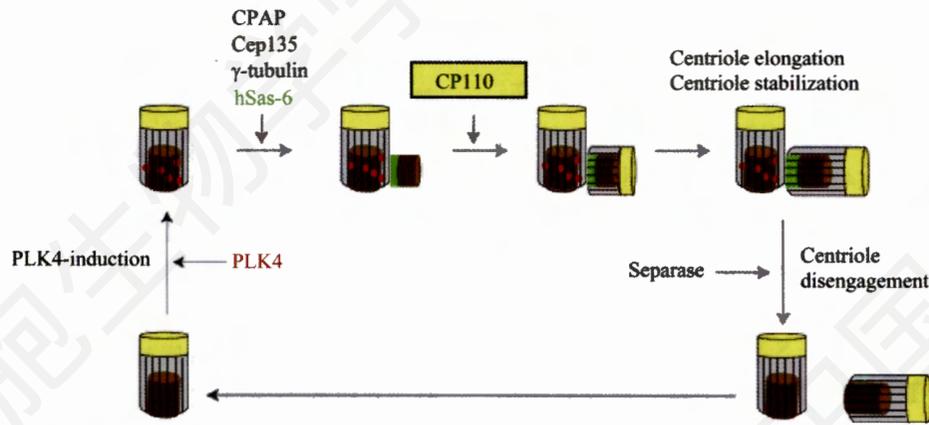


Fig.1 Model of centriole assembly in human cells (modified from ref. [15])

This scheme summarizes the centriole assembly pathway. Nascent procentriolar structures are depicted coding PLK4 in red. Other proteins are indicated in different colours: hSas-6, green; CPAP, Cep135 and γ -tubulin, brown; CP110, yellow.

“花样结构”(flower structure)^[16]。但大多数过量表达激酶失活型 PLK4 的细胞中心体结构正常,没有出现“花样结构”,表明 PLK4 的激酶活性可能与中心粒数目增多有关。

PLK4 表达不足可引起细胞内中心粒数目减少。Habadanck 等^[16]通过 RNA 干扰(RNAi)技术减少 HeLa 细胞内 PLK4 的表达,结果发现:在 RNAi 24 小时后,处于有丝分裂的细胞中约 50% 具有 4 个中心粒,36% 具有 2 个中心粒,而 RNAi 对照组约有 90% 的细胞具有 4 个中心粒;随 RNAi 时间的延长,中心粒的数目进一步减少, RNAi 48 小时后,约 70% 处于有丝分裂的细胞仅具有一个中心粒。相似的结果在果蝇细胞中也得到了验证^[17]。

PLK4 表达不足也可引起中心体结构异常。人类 HCT116 结肠癌细胞含有结构异常的中心体。其中心体由紊乱的圆柱体微管和其它附属体构成,仅有 γ -微管蛋白、Centrin 和 PCM1 等一些中心体蛋白定位其中,但 CPAP、Cep135 和 Sas-6 等常见的中心体蛋白则不与其相互作用。与正常细胞相比,PLK4 在这些具有异常中心体的细胞中含量偏低。外源表达 PLK4 可以抑制这些异常结构的形成,提示 PLK4 可能参与了中心粒微管蛋白三连体的组装^[18]。通过 RNAi 减少 HeLa 细胞 PLK4 的表达亦可导致多种异常纺锤体的形成。在 RNAi 24 小时后,52% 处于有丝分裂期的细胞仍能形成正常的双极纺锤体,33% 的细胞形成两极各有 1 个中心粒的双极纺锤体; RNAi 48 小时后,形成单极纺锤体的细胞大量增加,并以具有 1 个中心粒的单极纺锤体为主,占 56%^[16]。

中心体复制是一个多种蛋白参与调控的复杂过程。除 PLK4 以外,其它蛋白激酶(如 Cdk2、PLK2、Mps1 和 Zyg-1)以及中心体结构蛋白(包括 SAS-4 和 SAS-6)也参与了中心粒复制的调控^[16]。但只有当 PLK4 表达处于正常水平时,PLK4、Cdk2、CP110 和 SAS6 等共同作用,中心粒复制才能严格的遵循以下规则:一个母中心粒产生一个且仅有一个子中心粒。

Skp/Cullin/F box(SCF)家族泛素酶可通过调节 PLK4 水平,从而调节中心体的复制。SCF E3 泛素连接酶蛋白 Slimb 能调节 PLK4 蛋白的降解,使得中心粒扩增受抑制。SCF/Slimb 的缺失可导致 PLK4 的积聚,进而引起中心体的扩增,使得一个母中心粒周围有大量的子中心粒生成。PLK4 能通过其保守的 Slimb 结合基序(DSGIIT)与 Slimb 结合,并且是 Slimb 介导的泛素化作用的一个靶蛋白。在小鼠中敲除 Slimb 的同源基因 β -Trcp1 也可引起中心体的扩增。进一步研究发现, Slimb 和 PLK4 都定位在中心粒, Slimb 在细胞分裂间期可调节 PLK4 定位于中心粒的过程,从而确保中心粒的正常数目^[19,20]。

SCF 复合物的关键分子 culling 1(CUL1)也定位在母中心粒,其对于抑制中心体的异常扩增是至关重要的。siRNA 敲除 CUL1 引起一个母中心粒周围生成多个子中心粒。8.5% CUL1 缺失的细胞表现出中心体的异常扩增,而在对照组细胞中,这一比例仅为 0.6%。CUL1 参与了母中心粒上 PLK4 的降解,其对于 PLK4 蛋白的稳定性是重要的。这在人类癌细胞中经常观察到^[21]。总之, CUL1 可以通过调节 PLK4 蛋白水平来抑制额外子中心粒形成,因而减少了中心

体介导的细胞分裂错误和染色体不稳定。

RNA 结合蛋白 SZY-20 也能调节 PLK4 的蛋白含量, 从而控制了中心体的大小。在线虫中, 当 SZY-20 活性缺失时, PLK4 和其它原中心粒成分含量增加。尤其在中期, SZY-20 活性缺失突变体中 PLK4 含量是野生型的两倍多, 这导致中心体增大。扩大的中心体具有正常的中心粒, 较多的成核微管, 不能恰当地指导许多依赖微管的生理过程。PLK4 的缺失修复了 SZY-20 活性缺失突变体中心粒的大小和微管功能, 这表明 PLK4 含量与中心体大小有关^[22]。

2.2 PLK4 与肿瘤

PLK4 表达异常与肿瘤发生密切相关。在多数结肠癌样本中, PLK4 在肿瘤组织的表达水平显著高于它的临近非癌组织^[23]。肿瘤细胞中, 经常发生中心体结构和数目的异常, 而这种异常伴随着细胞分裂缺陷和基因组不稳定。老年 PLK4 杂和鼠(PLK4^{+/-})表现出肝和肺组织的 PLK4 单倍剂量不足(haploinsufficiency), 老年 PLK4^{+/-} 鼠的自发性肝和肺癌的发生率比 PLK4^{+/+} 鼠高 15 倍, 提示 PLK4 单倍剂量不足可能影响了细胞周期的正常进程和基因组的稳定性。例如, 在 2/3 肝切除模型中, 与 PLK4 野生型的再生肝细胞相比, 杂合型的肝细胞进入 M 期滞后, 并伴随着频繁的有丝分裂错误, 具有三极和四极的纺锤体的细胞比例增加。在肝切除后 9~12 个月, 所有的 PLK4^{+/-} 鼠肝均具有异常形态, 肝肿瘤发生频率也明显增加。在绝大多数肝细胞癌样品中都发现了 PLK4 的杂和性丢失^[24]。PLK4^{+/-} 胚胎成纤维细胞增殖缓慢, 表现出频繁的中心体异常扩增, 多极纺锤体和单倍体的形成^[5]。PLK4^{-/-} 鼠往往在胚胎发育的第 7.5 天死亡, 同时伴有细胞分裂阻滞和细胞凋亡现象^[10]。由此可见, PLK4 表达水平不足可能会增加有丝分裂错误和肿瘤发生的可能性。

3 展望

由于 Polo 样蛋白激酶在细胞周期调控、细胞增殖以及肿瘤的发生发展中有着非常重要的作用, 一直以来都是细胞周期调控研究的热点之一, 其中关于 PLK1 的研究最多, 也最深入。近年来, PLK4 的研究也取得了极大的进展, 其在中心粒复制和纺锤体形成方面的重要功能以及在肿瘤的发生发展中的作用得到了广泛的认同。然而, 还有许多问题仍待解决, 如 PLK4 调节中心粒复制的分子机制, 细胞内 PLK4 的蛋白相互作用网络以及靶向 PLK4 的小分子是否可

以用于肿瘤的生物治疗等等。深入研究 PLK4 在细胞中的作用, 将进一步完善 Polo 样蛋白激酶在细胞周期的调控机制, 并有可能为肿瘤生物治疗提供新的突破口。

参考文献 (References)

- 1 Sunkel CE, Glover DM. Polo, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. *J Cell Sci* 1988; 89 (Pt 1): 25-38.
- 2 Barr FA, Sillje HH, Nigg EA. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5(6): 429-40.
- 3 Sun Y. p53 and its downstream proteins as molecular targets of cancer. *Mol Carcinog* 2006; 45(6): 409-15.
- 4 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(14): 6388-92.
- 5 Swallow CJ, Ko MA, Siddiqui NU, Hudson JW, Dennis JW. Sak/Plk4 and mitotic fidelity. *Oncogene* 2005; 24(2): 306-12.
- 6 Winkles JA, Alberts GF. Differential regulation of polo-like kinase 1, 2, 3, and 4 gene expression in mammalian cells and tissues. *Oncogene* 2005; 24(2): 260-6.
- 7 Tategu M, Nakagawa H, Sasaki K, Yamauchi R, Sekimachi S, Suita Y, *et al.* Transcriptional regulation of human polo-like kinases and early mitotic inhibitor. *J Genet Genomics* 2008; 35(4): 215-24.
- 8 Fode C, Binkert C, Dennis JW. Constitutive expression of murine Sak-a suppresses cell growth and induces multinucleation. *Mol Cell Biol* 1996; 16(9): 4665-72.
- 9 Yamashita Y, Kajigaya S, Yoshida K, Ueno S, Ota J, Ohmine K, *et al.* Sak serine-threonine kinase acts as an effector of Tec tyrosine kinase. *J Biol Chem* 2001; 276(42): 39012-20.
- 10 Hudson JW, Kozarova A, Cheung P, Macmillan JC, Swallow CJ, Cross JC, *et al.* Late mitotic failure in mice lacking Sak, a polo-like kinase. *Curr Biol* 2001; 11(6): 441-6.
- 11 Leung GC, Hudson JW, Kozarova A, Davidson A, Dennis JW, Sicheri F. The Sak polo-box comprises a structural domain sufficient for mitotic subcellular localization. *Nat Struct Biol* 2002; 9(10): 719-24.
- 12 Azimzadeh J, Bornens M. Structure and duplication of the centrosome. *J Cell Sci* 2007; 120(Pt 13): 2139-42.
- 13 Nigg EA. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer* 2002; 2(11): 815-25.
- 14 Fukasawa K. Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(12): 911-24.
- 15 Kleylein-Sohn J, Westendorf J, Le Clech M, Habedanck R, Stierhof YD, Nigg EA. Plk4-induced centriole biogenesis in human cells. *Dev Cell* 2007; 13(2): 190-202.
- 16 Habedanck R, Stierhof YD, Wilkinson CJ, Nigg EA. The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication. *Nat Cell Biol* 2005; 7(11): 1140-6.
- 17 Bettencourt-Dias M, Rodrigues-Martins A, Carpenter L, Riparbelli M, Lehmann L, Gatt MK, *et al.* SAK/PLK4 is required for centriole duplication and flagella development. *Curr*

- Biol 2005; 15(24): 2199-207.
- 18 Kuriyama R, Bettencourt-Dias M, Hoffmann I, Arnold M, Sandvig L. Gamma-tubulin-containing abnormal centrioles are induced by insufficient Plk4 in human HCT116 colorectal cancer cells. *J Cell Sci* 2009; 122(12): 2014-23.
- 19 Rogers GC, Rusan NM, Roberts DM, Peifer M, Rogers SL. The SCF Slimb ubiquitin ligase regulates Plk4/Sak levels to block centriole reduplication. *J Cell Biol* 2009; 184(2): 225-39.
- 20 Cunha-Ferreira I, Rodrigues-Martins A, Bento I, Riparbelli M, Zhang W, Laue E, *et al.* The SCF/Slimb ubiquitin ligase limits centrosome amplification through degradation of SAK/PLK4. *Curr Biol* 2009; 19(1): 43-9.
- 21 Korzeniewski N, Zheng L, Cuevas R, Parry J, Chatterjee P, Anderton B, *et al.* Cullin 1 functions as a centrosomal suppressor of centriole multiplication by regulating polo-like kinase 4 protein levels. *Cancer Res* 2009; 69(16): 6668-75.
- 22 Song MH, Aravind L, Muller-Reichert T, O'Connell KF. The conserved protein SZY-20 opposes the Plk4-related kinase ZYG-1 to limit centrosome size. *Dev Cell* 2008; 15(6): 901-12.
- 23 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(9): 729-40.
- 24 Ko MA, Rosario CO, Hudson JW, Kulkarni S, Pollett A, Dennis JW, *et al.* Plk4 haploinsufficiency causes mitotic infidelity and carcinogenesis. *Nat Genet* 2005; 37(8): 883-8.

Recent Progress in the Study of Polo-like Kinase 4

Jun-Li Xuan, Xiao-Yi Yan, Tian-Hua Zhou*

(Department of Cell Biology, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Polo-like kinase 4 (PLK4), a member of the Polo family of highly conserved serine/threonine kinases, has been identified as a key regulator of centriole duplication. PLK4 is mainly expressed in actively dividing tissues and cells, but not in resting ones, indicating a role in cell proliferation. In addition, PLK4 is also highly expressed in various cancer cells and is associated with tumorigenesis. In this article, recent findings related to PLK4 were summarized.

Key words Polo-like kinase 4; centriole duplication; cancer

Received: December 14, 2009 Accepted: June 24, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China(No.30771107) and Natural Science Foundation of Zhejiang Province(No.Y207382)

*Corresponding author. Tel: 86-571-88208257, E-mail: tzhou@zju.edu.cn