

2006년 8월

석사학위 논문

구강 편평세포암종에서 Polo-like  
kinase 1의 발현

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 규 식

구강 편평세포암종에서 Polo-like  
kinase 1의 발현

Polo-like kinase 1 Expression is associated with Oral  
Squamous Cell Carcinomas

2006년 8월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 규 식

구강 편평세포암종에서 Polo-like  
kinase 1의 발현

지도교수 윤 정 훈

이 논문을 치의학 석사학위신청 논문으로  
제출함

2006년 4월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 규 식

# 김규식의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 이상호 인

위원 조선대학교 교수 안상건 인

위원 조선대학교 교수 윤정훈 인

2006년 5월 일(석사)

조선대학교 대학원

# Contents

도목차

## ABSTRACT

I. 서론	1
II 재료 및 방법	2
A. 세포배양	2
B. 면역세포화학염색(Immunocytochemistry)	2
C. 총 RNA 추출과 역전사-중합효소연쇄반응 (RT-PCR)	2
D. 흰쥐 허 암 발생 및 In situ Reverse Transcription PCR	3
III. 결과	6
A. 면역세포화학 염색면역세포화학 염색	6
B. RT-PCR 결과	7
C. In situ RT-PCR	8
IV. 고찰	9
V.참고문헌	12

## 도 목 차

Fig. 1. Immunocytochemistry revealed high plk1 expression in the nucleus of the FaDu and Hep2 cancer cells rather than IHOK cells .....	6
Fig. 2. No expression of plk1 mRNA in the IHOK and high expression of plk1 mRNA in the FaDu and Hep2 cancer cells .....	7
Fig. 3. In situ RT-PCR revealed plk1 mRNA was sequentially expressed during malignant progression from hyperplasia to dysplasia, and squamous cell carcinoma .....	8

## *ABSTRACT*

Polo-like kinase 1 expression is associated with the progression of oral squamous cell carcinomas

Kyu-Sik Kim

Advisor : Prof. Jung-Hoon Yoon

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

Polo-like kinase (PLK) is a cell cycle-regulated, cyclin-independent serine/threonine protein kinase. Recent reports have shown a critical role for PLK during tumorigenesis. To explore whether PLK plays a general role as a tumor marker of oral squamous cell carcinomas, we examined the expression of PLK mRNA and protein in oral squamous cell carcinoma cells and immortalized normal oral keratinocytes (INOK). We also investigated that PLK mRNA was expressed in specimens from 4NQO-induced SD rat tongue carcinomas using in situ RT-PCR methods. Immunocytochemically, most of the PLK was highly expressed in the nucleus of carcinoma cells, but not INOK. RT-PCR revealed PLK1 mRNA was detected in the FaDu and Hep2 cancer cells, but no detected in the INOK. In situ RT-PCR revealed PLK1 mRNA expression increased sequentially from hyperplasia to dysplasia, and squamous cell carcinoma during the malignant progression.

PLK1 expression could reflect the degree of malignancy and proliferation in oral squamous cell carcinomas. Thus, in addition to being of diagnostic value, modulation of PLK1 activity in the tumors by chemotherapeutic agents or gene therapy may prove to be of therapeutic value.

# I. 서론

세포주기에서 세포분열은 가장 중요한 과정으로 중심체의 복제, 방추사 형성과 세포질 분리와 같은 일련의 세포 구조의 변화가 일어난다. 이러한 복잡한 과정은 세포분열 증진 인자 (mitosis promoting factor)로 알려진 cdc2 - cyclin B 단백 복합체가 개시하고 증진시키며 완성하는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 그러나 cdc2 - cyclin B 복합체를 활성화 시키는 기전은 Golsteyn 등이 Polo-like kinase 1 (PLK1)을 처음 클로닝하고 PLK1에 의해 cdc2 - cyclin B 복합체가 활성화된다는 것을 처음 규명한 이후에야 확립되었다<sup>2)</sup>. PLK1은 세포의 G2/M기에 현저하게 축적되어, cdc2 - cyclin B 복합체 및 다른 세포분열에 관계하는 기질의 인산화와 활성화에 관여한다<sup>3,4)</sup>. PLK1은 종양세포를 포함하여 모든 세포의 분열에 필수불가결한 단백질이다<sup>5)</sup>. 더욱이, PLK1은 비소세포 폐암, 두경부암, 식도암, 직결장암을 포함하여 다양한 유형의 고형성 악성종양에서 그 발현이 증가한다<sup>6-10)</sup>. 현재 PLK1은 원종양유전자로 암 치료의 잠재적 표적으로 고려하고 있다<sup>11)</sup>. 최근 암의 발생에서 세포주기에 관여하는 PLK1이 암의 진단적 표지자 및 치료적 적용 가능성에 대해 연구 중에 있다. 그러나 현재까지 구강암에서 PLK1의 발현에 대한 보고는 거의 없다.

이 연구에서는 구강 각화 불멸화 세포주인 Immortalized Normal Oral Keratinocyte (INOK)와 두경부 암세포주인 FaDu, Hep2 세포에서 면역조직화학 및 역전사 중합효소 연쇄반응법으로 PLK1의 발현을 조사하였으며, 4NQO를 투여하여 Sprague-Dawley (SD) rat에서 혀 암을 유도한 후 in situ RT-PCR을 통해 조직내에서 PLK1의 발현과 발현 위치를 조사하였다. 이를 통해 구강암 발생 과정에서 PLK1이 구강암 진행에 따른 생물학적 표지자로의 효용성과 구강암의 유전자 치료에 응용할 수 있는 가능성을 조사하고자 이 연구를 시행하였다.



## II. 재료 및 방법

### A. 세포배양

불멸화된 정상 구강세포인 INOK (단국치대 이종현 교수 제공)는 KGM 배지에, 두경부암 세포주인 Hep2, FaDu는 10% fetal calf serum과 100 units/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin이 포함된 DMEM 배지를 사용하여 37°C의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 계대 배양하여 사용하였다. FaDu 및 Hep2 편평세포암종 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 제공받아 사용하였다.

### B. 면역세포화학 염색(Immunocytochemistry)

INOK와 FaDu 및 Hep2 세포를 유리 슬라이드에 부착시켜 PLK1에 대한 면역조직화학 염색을 시행하였다. 세포가 부착된 슬라이드는 0.5 % hydrogen peroxide/methanol 용액에서 내인성의 peroxidase를 제거한 후 정상 goat serum으로 30 분간 처리하고 PLK1 일차항체를 3 % bovine serum albumin (BSA)가 포함된 PBS 용액에 희석하여 1시간 동안 반응시켰다. 일차항체 반응 후 Tris-buffered saline (TBS)에서 3 회 세척하고, Envision (+) rabbit peroxidase (DAKO)에 30 분간 반응시킨 다음, 다시 TBS에서 3 회 세척하였다. 그 후 3,3-diaminobenzidine tetrachloride와 hydrogen peroxide를 이용하여 발색시킨 다음 Meyer씨 hematoxylin으로 대조 염색하여 광학현미경으로 확인하였다.

### C. 총 RNA 추출과 역전사-중합효소연쇄반응 (RT-PCR)

PLK1의 발현정도를 조사하기 위하여 TRI Reagent® (Molecular Research Center, Inc., OH)를 이용하여 INOK, FaDu, Hep2 세포로부터 총 RNA를 추출하였다. RT-PCR반응을 위하여 sense 5'-ATGAGTGCTGCAGTGA CTGCAGGGA-3'와 antisense 5'-TTAGGAGGCCTTGAGACGGTTGCTG-3' (1,812 bp) primer를 제작하

고 SuperScript™ One-Step RT-PCR systems (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 다음의 조건으로 RT-PCR을 수행하였다. 우선 cDNA합성을 위하여 0.1 µg의 총 RNA를 50°C에서 30분간 역전사 반응을 시킴으로서 cDNA를 합성하였다. PCR 반응은 94°C에서 2분, 변성반응을 94°C에서 15초, 결합반응을 55°C에서 30초, 중합반응을 72°C에서 40초간 30주기를 반복하고 마지막 중합반응은 72°C에서 10분간 연장하여 반응시켰다. PCR 반응 산물은 AccuPrep® PCR Purification Kit (BIONEER, Korea)으로 정제하고 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

## **D. 흰쥐 혀 암 발생 및 *In situ Reverse Transcription PCR***

### **1. 병리조직학적 관찰**

6주 된 Sprague-Dawley (SD) rats 58 마리 중 48 마리는 50 ppm의 농도로 먹는 물에 4NQO 용액을 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 주 동안 투여하고, 10 마리는 대조군으로 하였다. 4NQO 투여 후, 혀 조직을 절제하여 10% 중성 formalin 에 고정하고 병리조직학적 관찰을 위해 파라핀에 포매하여 4µm로 박절한 후 통법에 따라 H & E 염색을 시행하였다.

### **2. *PLK1 mRNA*에 대한 *In situ Reverse Transcription PCR***

혀 암 조직에서 plk1 mRNA 발현을 확인하기 위해 in situ RT-PCR을 시행하였다. 그 과정은 다음과 같다.

#### **a. 조직표본의 전처리**

파라핀에 포매된 조직을 3µm 두께로 잘라 코팅 슬라이드에 부착하여 55°C 항온기에 30분 방치하고 37°C incubator에서 48시간 둔 후, 10분간 2번 xylene 용액에 담귀 파라핀을 제거하고 100%, 85%, 70%, 50%, 30% EtOH과 0.85% NaCl, 1X PBS에 단계적으로 흡수하였다. DNase buffer(40mM Tris(pH 7.9), 10mM NaCl, 6mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM CaCl<sub>2</sub>) 내에서 DNase A(20µg/ml)를 37°C 30분간 반응시켜 DNA를 분해했다. DNase는 75°C 10분동안 가열함으로써 반응을 중지시켰다. 1X PBS로 수세해준 후 proteinase buffer(100mM Na<sub>2</sub>EDTA;2H<sub>2</sub>O, 1M Tris-HCl pH 7.5)에서

proteinase K(50 $\mu$ g/ml)를 37 $^{\circ}$ C 30분간 반응시켜 protein을 분해하였다. Proteinase는 0.2% glycine in 1X PBS로 반응을 중지시켰다. 1X PBS로 수세 후 4% Paraformaldehyde로 고정시키고 다시 1X PBS로 수세했다. 0.25% acetic acid(for 100mM Triethanolamine), 1X PBS와 0.85% NaCl, 30%, 50%, 70%, 85%, 100% EtOH 을 거쳐 단계적으로 탈수하였다.

b. 역전사(Reverse transcription)

역전사 반응에는 sense 5'-GACTCAACACGCCTCATCCTC-3' antisense 5'-CTAGGAGGCCTTGAGGCGGTTGCA-3' (500 bp) rPLK1 primer와 대조군으로 GAPDH sense 5'-CCAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3' 과 5'-antisense GTCATACCAGGAAATGAGCTTGACA-3' (464 bp) primer를 제작하여 사용하였다. 역전사에 사용하는 반응 혼합물에 대한 최종 농도는 다음과 같다. Improm-II<sup>TM</sup> 5X reaction buffer(Promega), 25mM MgCl<sub>2</sub>(Promega), 10mM dNTP mix(Invitrogen), GAPDH primer와 Improm-II<sup>TM</sup> reverse transcriptase(Promega)를 첨가하였다. Reverse transcriptase 혼합물을 조직의 절편위에 떨어뜨리고 cover-slip 덮은 다음에 42 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 용액을 흡입 제거하였다.

c. 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction)

PCR 증폭은 10mM dNTP mix[ 1 : 1 : 1 : 0.65 dTTP(Invitrogen)], 25nm digoxigenin-11-dUTP(Roche), 10X PCR reaction buffer(Invitrogen), 50mM MgCl<sub>2</sub>(Invitrogen), 5U/ $\mu$ l Taq DNA polymerase(Invitrogen), GAPDH sense와 antisense primer로 하였다. PCR 혼합물을 슬라이드 절편위에 떨어뜨리고 PCR machine (Eppendorf)에 넣은 후 cover-slip 덮고 94 $^{\circ}$ C에서 30초간 변성반응, 60 $^{\circ}$ C에서 30초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 primer extension을 1분간 20 cycle 반복하였다. 조직 절편 슬라이드를 100% EtOH로 1분간 수세후 1X PBS로 4 $^{\circ}$ C에서 overnight으로 수세하였다.

d. PCR 산물의 면역학적 검색

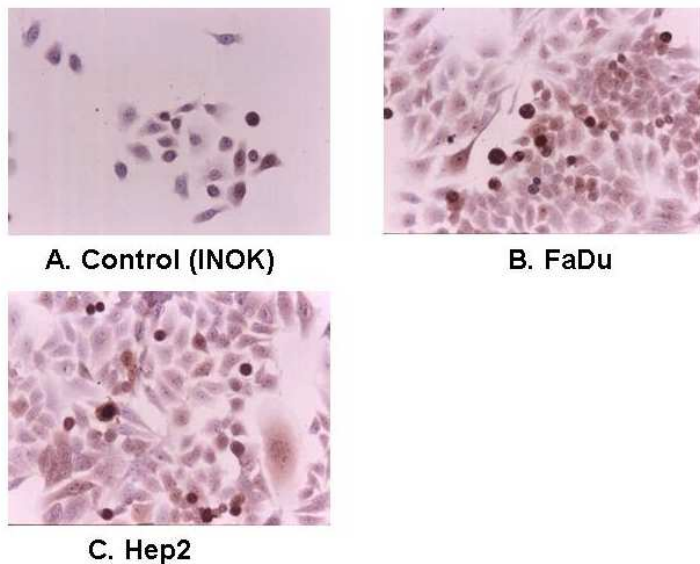
슬라이드를 1X PBS로 30분간 2번 wash하고 Block solution 1[TBS

buffer(0.1mM Tris pH 7.5, 0.15M NaCl) 내 0.5% block reagent(Roche)]에서 1시간 blocking한다. Block solution 2[TBS buffer(0.1M Tris pH 7.5, 0.15M NaCl) 내 1% Bovine Serum Albumin(Sigma)과 0.3% Triton-X 100(Sigma)]에 45분간 반응시키고 Block solution 2에 1 : 10000으로 희석시킨 alkaline phosphatase(Boeringer Mannheim)가 붙어있는 anti-digoxigenin antibody을 RT에서 2시간동안 반응시켰다. Block solution 2로 20분간 수세후 4℃ overnight하였다. Fresh한 Buffer C(5M NaCl, 1M Tris-HCl pH 9.7, 1M MgCl<sub>2</sub>)내에서 30분간 반응시키고 fresh한 Buffer C내에 nitroblue tetrazolium salt(NBT)(Promega) 용액 33 $\mu$ l와 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate(BCIP)(Promega) 용액 16.5 $\mu$ l를 각 slide에 첨가시켜 빛이 없는 장소에서 1시간 이하로 반응시켰다. 30%, 50%, 70%, 85%, 100% EtOH을 거쳐 단계적으로 탈수하고 Histoclear에서 10분간 2번 투명시킨 후 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

### Ⅲ. 연구결과

#### A. 면역세포화학 염색

불멸화 구강세포인 INOK와 편평세포암종 FaDu 및 Hep2 세포에서 PLK1 단백질의 발현부위를 확인하기 위해 면역세포화학 염색을 시행하였다. 그 결과, PLK1의 단백질은 모든 세포의 핵에 발현되는 것을 관찰하였다. PLK1 단백질의 발현은 대조군인 INOK에서의 발현은 미약한 반면, 암세포주인 FaDu 및 Hep2 세포에서는 핵에서 강한 발현을 확인하였다 (Fig. 1).

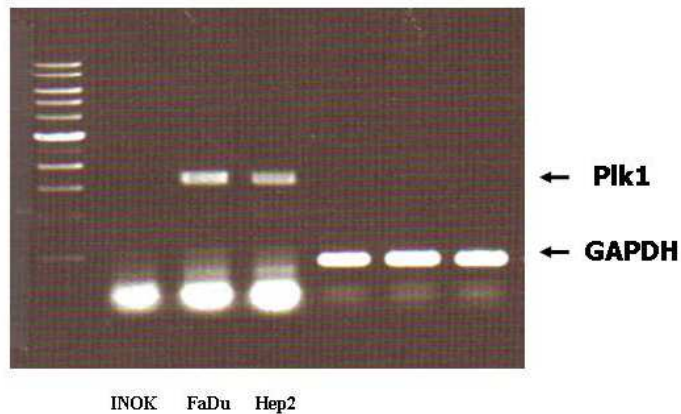


*Fig. 1.* Immunocytochemistry showed high plk1 expression in the nucleus of the FaDu and Hep2 cancer cells rather than INOK cells.

#### B. RT-PCR 결과

불멸화된 정상 구강 세포인 INOK와 구강암 세포주인 FaDu, Hep2 세포에서 PLK1

mRNA의 발현을 확인하기 위하여 PLK1 primer (Table 1)를 이용하여 RT-PCR 방법으로 그 발현정도를 관찰하였다. 두경부 암세포주인 FaDu 및 Hep2 세포에서 PLK1의 발현을 관찰할 수 있었으나, INOK에서 mRNA 발현은 관찰할 수 없었다 (Fig. 2).

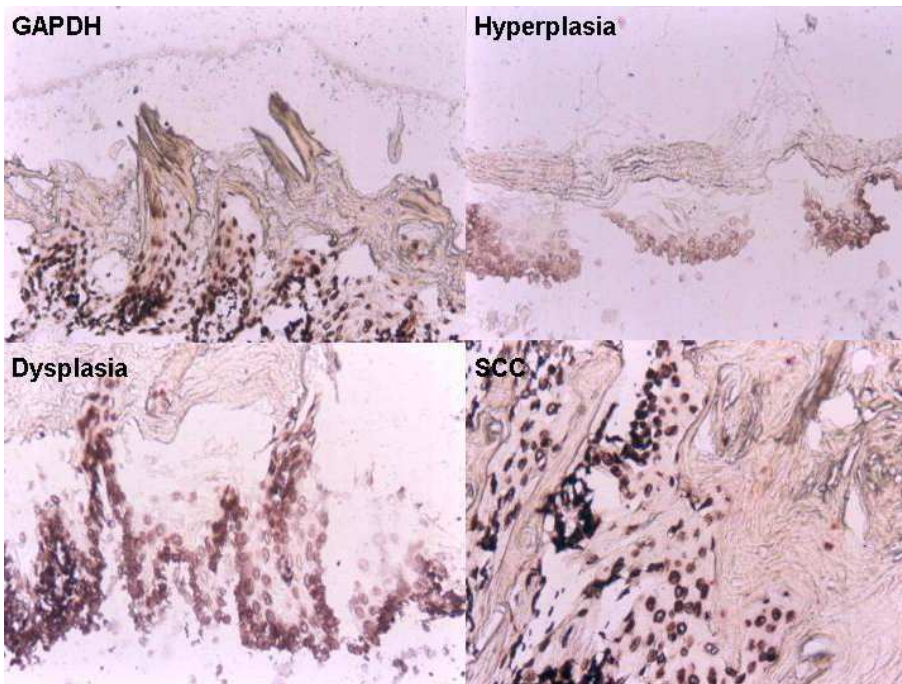


**Fig. 2.** RT-PCR revealed PLK1 mRNA was detected in the FaDu and Hep2 cancer cells, but no detected in the INOK.

### *C. In situ RT-PCR*

구강암 발생의 대표적인 모델인 4NQO를 이용한 SD rat 모델을 이용 in vivo 실험을 시행하였다. 과증식 조직에서는 PLK1의 발현의 발현은 미약하였고 발현부위는 기저층 세포의 일부에 국한하였으나, 상피 이형성증이 증가할수록 PLK1의 발현이 기저층과 부기저층으로 확산되어 증가하였다. 편평세포암종으로 진행된 경우에는 암 조직 전체에 증가된 PLK1의 발현이 관찰되었다. 이는 정상에서 상피 증식, 상피 이형성을 거쳐 암종으로 다단계로 암 발생이 진행됨에 따라 PLK1의 발현이 점차 증가하는 양상을 보였다. 또한 정상 및 과증식에서 PLK1의 발현은 주로 세포질에서 발현하다가 상피 이형성증을 거쳐 암종으로 진행하면서 점차 핵을 포함한 세포 전체에서 높은 발

현을 보였다 (Fig. 3).



**Fig. 3.** In situ RT-PCR revealed PLK1 mRNA expression increased sequentially from hyperplasia to dysplasia, and squamous cell carcinoma during malignant progression.

## IV. 고찰

이 연구에서는 사람 두경부 편평세포암종 세포주인 FaDu 및 Hep2 세포를 이용하여 PLK1의 발현을 조사하였다. RT-PCR 기법을 이용한 PLK1의 mRNA 발현을 조사한 실험을 통해 FaDu 및 Hep2 세포에서 PLK1의 발현을 확인할 수 있었으나 정상 구강 세포인 INOK에서는 PLK1의 발현은 관찰 할 수 없었다. 면역조직화학을 이용한 실험에서도 PLK1 단백질의 발현은 FaDu 및 Hep2 세포에서 확인할 수 있었으나 INOK에서의 발현은 미약하였다. 특히 PLK1 단백질의 발현이 FaDu 및 Hep2 세포의 핵에 강하게 발현되는 것을 관찰하였다. 아울러 구강암 발생의 대표적인 모델인 SD rat을 이용하여 암 발생과정에서도 상피 과증식 조직에서는 PLK1의 발현의 발현은 미약하였고 발현부위는 기저층 세포의 일부에 국한하였으나, 상피 이형성증이 증가할수록 PLK1의 발현이 기저층과 부기저층으로 확산되어 증가하였다. 또한 편평세포암종으로 진행된 경우에는 암 조직 전체에 증가된 PLK1의 발현이 관찰되었다. 이는 정상에서 상피 증식, 상피 이형성을 거쳐 암종으로 다단계로 암 발생이 진행됨에 따라 PLK1의 발현이 점차 증가하는 양상을 보였다. 또한 정상 및 과증식에서 PLK1의 발현은 주로 세포질에서 발현하다가 상피 이형성증을 거쳐 암종으로 진행하면서 점차 핵을 포함한 세포 전체에서 높은 발현을 보였다.

PLK1은 비소세포 폐암, 두경부암, 식도암, 직결장암을 포함하여 다양한 유형의 고형성 종양에서 그 발현이 증가한다<sup>6-10</sup>. 아울러 PLK의 발현이 환자의 예후에 미치는 영향에 대해서는 식도암, 난소암, 두경부암, 비소세포 폐암과 간모세포종을 포함한 다양한 유형의 악성종양에서 이미 보고된 바 있다<sup>6-12</sup>. 종양 생물학에서 PLK1 과발현의 기능중에서 가장 중요한 요인은 PLK1이 세포분열 조절에서 중요한 역할을 한다는 점이다<sup>6,7,13</sup>. PLK1은 직접적인 인산화에 의해 cdc25와 cyclin B1의 활성화로 세포분열을 개시한다. 이 과정은 핵에서 cdc2/cyclin B1 복합체의 축적을 초래하며, 이는 세포분열 시작의 전단계로 중요하다<sup>2,3,5</sup>. 분열후기에 PLK1은 chromosom 부착부위에서 cohesins을 분리시키는데 작용하고<sup>14</sup>, anaphase-promoting complex를 활성화 시킨다<sup>15</sup>.



여러 연구에 의하면 다양한 종류의 암세포와 조직에서 PLK 발현정도는 세포의 분열과 밀접한 연관성이 있다<sup>6,7,13</sup>. 이 연구에서도 사람의 편평세포암종 세포에서 PLK1 단백질과 mRNA 발현이 정상세포에 비해 증가하였고, 쥐의 구강암 모델에서도 PLK mRNA이 정상에서 과증식, 상피 이형성증을 거쳐 편평세포암종으로 진행되는 동안 증가함을 관찰하였다. PLK는 주로 세포주기의 G2-M 후기에 발현하기 때문에<sup>3,4</sup>, PLK의 발현은 정상조직에 비해 구강암에서 G2-M기에 속하는 세포의 비율이 높음을 시사하는 소견이다. 최근 두경부 종양의 생물학적 특성을 이해하고 이를 치료전략으로 이용하려는 다양한 분자 연구가 증가하고 있다<sup>7</sup>. 특히 p53을 비롯 EGFR과 그 ligand인 TGF- $\alpha$  그리고 증식능 표지자인 PCNA와 Ki-67 이다<sup>7,11,12</sup>. Ki67과 PCNA은 면역조직화학적으로 쉽게 확인할 수 있어 세포증식의 표지자로 임상적으로 널리 이용하고 있다<sup>7,13,16</sup>. 그러나 아직까지 암 환자의 예후나 림프절 전이, 치료 방침의 결정에 대한 지표로는 논란이 없지 않다<sup>7,11-13,16</sup>. 그러나 PLK 발현은 비전이성 종양보다는 전이성 두경부 암종에서 높다는 보고가 있어, PLK의 발현이 두경부 암종의 증식능 표지자로서의 역할 뿐 아니라 전이 잠재성을 예측하는 지표로서의 사용가능성을 시사한다<sup>7</sup>. 암세포의 분열에서 PLK1의 주요역할은 이 연구결과에서 처럼 구강암을 포함하여 다양한 악성종양에서 PLK1 발현이 세포증식의 표지자와 강한 상관관계가 있음을 밝히고 있다<sup>6,7,9</sup>. 최근에 여러 그룹에서 다양한 암세포에서 PLK1 발현 억제제가 세포증식을 현저하게 억제하고 apoptosis를 유도한다는 보고가 있다<sup>5,11,12</sup>. 이러한 결과는 PLK1이 새로운 항암치료 방법의 표적이 되고 있음을 제시하고 있다. 그러므로, PLK1의 기능을 억제시키거나 발현을 중지시킴으로서 구강암을 포함한 두경부 암의 치료 전략에도 적용시킬 수 있을 가능성을 생각할 수 있다.

## V. 참고문헌

- 1 Ohi R, Gould KL. Regulating the onset of mitosis. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 267-273.
- 2 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: 1509-1517.
- 3 Toyoshima-Morimoto F, Taniguchi E, Nishida E. Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *EMBO Rep* 2002; 3: 341-348.
- 4 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: 865-872.
- 5 Liu X, Erikson RL. Activation of Cdc2/cyclin B and inhibition of centrosome amplification in cells depleted of PLK1 by siRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8672-8676.
- 6 Wolf G, Elez R, Doermer A, Holtrich U, AckermannH, Stutte HJ et al. Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1997; 14: 543-549.
- 7 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: 2794-2797.
- 8 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: 687-692.

9 Takahashi T, Sano B, Nagata T, Kato H, Sugiyama Y, Kunieda K et al. Polo-like kinase 1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers. *Cancer Sci* 2003; 94: 148-152.

10 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

11. Chen X, Lan B, Qu Y, Zhang X, Cai Q, Liu B et al. Inhibitory effect of Polo-like kinase 1 depletion on mitosis and apoptosis of gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 29-35.

12. Weichert W, Kristiansen G, Schmidt M, Gekeler V, Noske A, Niesporek S et al. Polo-like kinase 1 expression is a prognostic factor in human colon cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5644-5650.

13. Yuan J, Horlin A, Stutte HJ, Rubsamen-Waigmann H, Strebhardt, K. Polo-like kinase, a novel marker for cellular proliferation. *Am. J. Pathol.*, 1997; 150: 1165-1172.

14. Sumara I, Vorlaufer E, Stukenberg PT, Kelm O, Redemann N, Nigg EA et al. The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol Cell* 2002; 9: 515-525.

15. 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: 15552-15557

16. Sommer T, and Olofsson J. Significance of p53, PCNA and Ki67 in the prognosis of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Laryngo-Rhino-Otol* 76: 189-196, 1997.