

Universitat de Barcelona

**ANÀLISI DE LA MAQUINÀRIA REGULADORA
DEL CICLE CEL·LULAR EN DIFERENTS
MODELS DE PROLIFERACIÓ.**

**Tesi presentada per Montserrat Jaumot i Pijoan per optar al grau de
Doctor en Biologia.**

those of cyclin D3, cdk4 and p21^{CIP}. This possibility is in agreement with a recent report which indicates that p21^{CIP} can be involved in the translocation of cyclin D-cdk4 complexes from cytoplasm into the nucleus in epithelial cells.³⁹ Experiments to test this hypothesis are currently underway in our laboratory.

It is assumed that cyclin D-cdk4 complexes are active when located in the nucleus. However, results reported here indicate that these complexes were not always active in the nucleus. At 13 h after PH both cyclin D3-cdk4 and cyclin D1-cdk4 complexes were nuclear but cdk4 activity at this time after PH was very low. It was not until 24 h after PH when cdk4 activity was maximal. The increase of cdk4 activity at 24 h after PH was accompanied neither by changes in cyclin D-cdk4 complexes nor by changes of the levels of associate CKIs suggesting that this sudden increase in the activity is due to the action of the cyclin-cdk activators (CAK or cdc25A) or/and to changes in the intranuclear location.

The analysis of the cdk4 activity and of the amounts of the cell cycle regulatory proteins in nuclear sub-fractions helped in the understanding of how cdk4 and cdk2 can be activated. Both cdk4 and cdk2 activities were detected in the soluble fraction S1. On the contrary, we were not able to detect any of these activities in the NM. The maximal activity of both kinases in S1 fraction was found at 24 h after PH, similarly to results obtained when analysed in homogenates. Thus, one can assume that the activity detected in the homogenates corresponded to that from the S1 fraction. The levels of cdk4, and cyclin D3 in the S1 fraction were low in quiescent cells. They were slightly increasing during the first 13 h after PH. However, at 24 h, a sudden increase of both proteins in this fraction was observed. These increases correlate with the peak of cdk4 activity in this fraction. Interestingly, the amount of cyclin D1 was constant during the first 24 h after PH. Thus, at 24 h after PH, significant amounts of cyclin D1, cyclin D3 and cdk4 were found in the S1 fraction. Since cdc25A and CAK (cyclin H and cdk7) were constantly present in this nuclear fraction, it could be postulated that the sudden induction of cdk4 activity was produced by the translocation of cyclin D3 and cdk4 from another nuclear compartment to S1 fraction. There, they could interact with CAK and cdc25A which could then be able to phosphorylate and dephosphorylate, respectively the specific amino acid residues of cdk4, responsible for its final activation. Interestingly, p21^{CIP}

also translocated to S1 fraction as cyclin D3 and cdk4 did, suggesting that p21^{CIP} could participate in the movement of these proteins to the S1 fraction. The strong association of p21^{CIP} with cyclins D-cdk4 complexes when they are active indicates that p21^{CIP} is not inhibiting these complexes but performing another unknown function which can be related to the movement of the complexes from one cellular compartment to another. The decrease in the activity of cdk4 observed at 28 h after PH could be due to the movement of almost all cyclin D1 from the S1 fraction to the NM. A model summarising how cyclin D-cdk4 complexes can be activated after a PH is showed in Fig. 8.

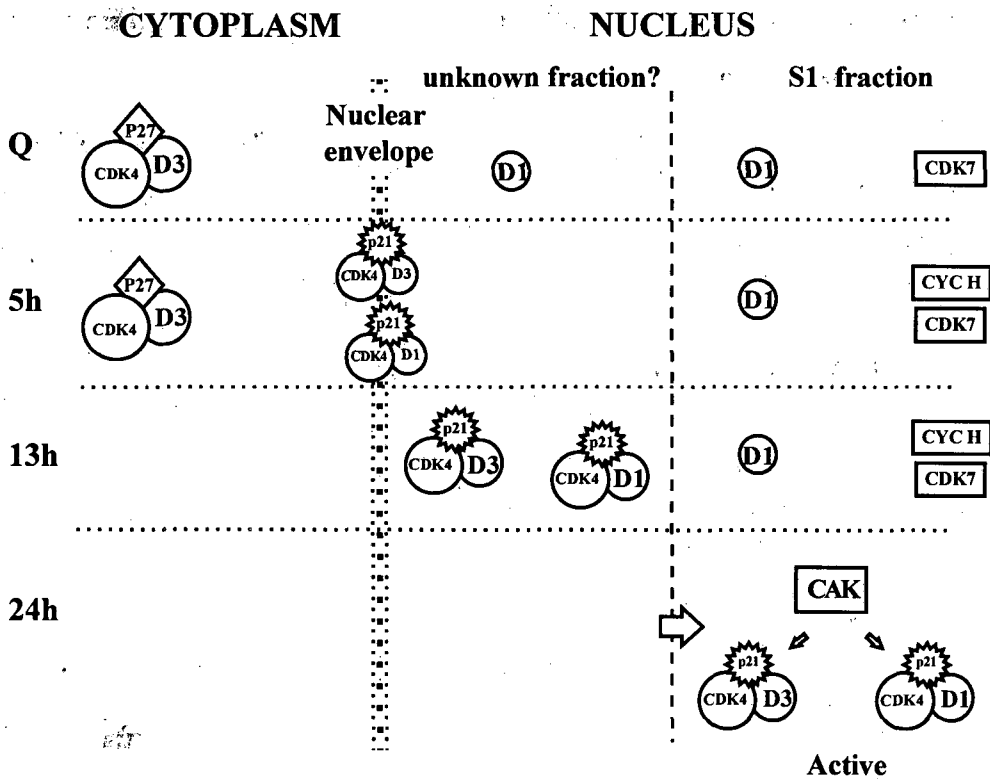


Figure 9. Model of the intracellular rearrangements of D-type cyclins, cdk4, and p21^{CIP} during rat liver regeneration. Quiescent rat liver cells contain cyclin D3-cdk4-p27 complexes in the cytoplasm. After a PH these complexes, possibly by interacting with p21^{CIP} translocate into the nucleus. The first step of this translocation is the association with the nuclear envelope, possibly through the p21^{CIP}-binding protein p70. At 13 h after PH all these proteins are located in a nuclear domain. Later on, at 24 h, they move to the S1 fraction where they become active, possibly as a consequence of the phosphorylation by CAK.

A similar hypothesis could explain the activation of cdk2. As reported here cyclin A and cdk2 were absent from the S1 fraction during the first 13 h after PH. Then, a sudden increase of both proteins in this fraction occurred at 24 h, in parallel to the induction of maximal cdk2 activity. Cyclin E was also absent in this fraction during the first 5 h. It slightly increased by 13 h after PH and then highly increased at 24 h. Since at 13 h there was not cdk2 in this fraction, the slight increase of cyclin E at this time after PH was not able to activate cdk2. Thus, it can be proposed that the activation of cdk2 could be produced by the accumulation of cdk2 and its regulatory subunits, cyclins E and A in the S1 fraction at 24 h after PH. The strong decrease in the amount of cdk2 in the S1 fraction at 28 h after PH can be responsible for the decrease of its activity observed at this time after PH.

To establish the mechanisms inducing the translocation of G1/S cyclins and cdks from cytoplasm to the nucleus during G1 and those responsible for the intranuclear movements of these proteins, are important goals for the understanding of how cdk4 and cdk2 are activated after a PH. Experiments to elucidate these mechanisms are currently underway in our laboratory.

References

1. Higgings GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. Arch. Pathol. 1931;12:186-202.
2. Steer CJ. Liver regeneration. FASEB J. 1995; 9: 1396-1400.
3. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. Science 1997; 276: 60-66.
4. Mead JE, Fausto N. Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989; 86: 1558-1562.

5. Skov-Olsen P, Boesby S, Kirkegaard P, Therkelsen K, Almdal T, Poulsen SS, Nexø E. Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Hepatology* 1988; 8: 992-996.
6. Lindroos PM, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. *Hepatology* 1991;13: 743-750.
7. Fausto N, Laird AD, Webber EM. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J.* 1995;9: 1527-1536.
8. Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Initiation of liver growth by tumour necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumour necrosis factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 1441-1446.
9. Sherr CJ. G1 phase progression: Cycling on cue. *Cell* 1994;79:551-556.
10. Pines J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem. J.* 1995; 308:697-711.
11. Graña X, Reddy PE. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin-dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* 1995; 11: 211-219.
12. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995;374:131-134.
13. Solomon MJ, Lee T, Kirschner MW. Role of phosphorylation in p34cdc2 activation; identification of an activating kinase. *Mol. Cell Biol.* 1992;3:13-27.
14. Fisher RP, Morgan DO. A novel cyclin associates with MO15/cdk7 to form the cdk-activating kinase. *Cell* 1994;78:713-724.
15. Sclafani RA. Cyclin dependent kinase activating kinases. *Curr.Opin.Cell Biol.*1996; 8:788-794.
16. Lew DL, Kornbluth S. Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr.Opin.Cell Biol.*1996; 8:795-804.
17. Strausfeld U, Labbe JC, Fesquet D, Cavadore JC, Picard A, Sadhu K, Russell P, Doree M. Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. *Nature* 1991;351:242-245.

18. Sherr C, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 1995;9:1149-1163.
19. Matsushime H, Roussel MF, Ashmun RA, Sherr CJ. Colony stimulating factor I regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 1991; 65: 701-713.
20. Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, Shibuya M, Sherr CJ, Kato J. D-Type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 1994;3:2066-2076.
21. Kato JY, Matsuoka M, Strom DK, Sherr CJ. Regulation of cyclin D-dependent kinase 4 (cdk4) by cdk4-activating kinase. *Mol. Cell Biol.* 1994;14: 2713-2721.
22. Jinno S, Suto K, Nagata A, Igarashi M, Kanaoka Y, Nojima H, Okayama H. Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *EMBO J.* 1994;13: 1549-1556.
23. Resnitzky D, Reed SI. Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G1-to-S transition. *Mol. Cell Biol.* 1995;15: 3463-3469.
24. Xiao ZX, Ginsberg D, Ewen M, Livingston DM. Regulation of the retinoblastoma protein-related protein p107 by G1 cyclin-associated kinases. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 1996;93: 4633-4637.
25. Mayol X, Graña X. pRb, p107 and p130 as transcriptional regulators: role in cell growth and differentiation. In: Meijer L, Guidet S, Philippe M, ed. *Progress in Cell Cycle Research. Volume 3.* New York: Plenum Press, 1997:157-169.
26. Lam EWF, La Thangue NB. DP and E2F proteins: co-ordinating transcription with cell cycle progression. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1994;6: 859-866.
27. Dulic V, Lees E, Reed SI. Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science* 1992;257: 1958-1961.
28. Loyer P, Glaise D, Cariou S, Baffet G, Meijer L, Guguen-Guillouzo C. Expression and activation of cdks (1 and 2) and cyclins in the cell cycle progression during liver regeneration. *J. Biol. Chem.* 1994;269: 2491-2500.
29. Rininger JA, Goldsworthy TL, Babish JG. Time course comparison of cell cycle protein expression following partial hepatectomy and WY14, 643 induced hepatic cell proliferation in F344 rats. *Carcinogenesis* 1997;18: 935-941.

30. Ehrenfried JA, Ko TC, Thompson A, Evers BM. Cell cycle-mediated regulation of hepatic regeneration. *Surgery* 1997; 122: 927-935.
31. Albrecht JH, Meyer AH, Hu MY. Regulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{CIP} (WAF1/Cip1/Sdi1) gene expression in hepatic regeneration. *Hepatology* 1997;25: 557-563.
32. Kaufman SH, Shaper JH. A subset of non-histone nuclear proteins reversibly stabilised by the sulfhydryl cross-linking reagent tetrathionate. *Exp. Cell Res.* 1984;155:4477-495.
33. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 1970;227:680-685.
34. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72:248-254.
35. Harlow E, Lane D. *Antibodies, a laboratory manual*. 2nd ed. New York: CSHL Press, 1988.
36. Neet K, Hunter T. The nonreceptor protein-tyrosine kinase CSK complexes directly with the GTPase-activating protein-associated p62 protein in cells expressing v-Src or activated c-Src. *Mol. Cell Biol.* 1995; 15: 4908-4920.
37. Bachs O, Carafoli E. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in rat liver cell nuclei. *J. Biol. Chem.* 1987;262:10786-10790.
38. Baserga R, Malamaud D. *Autoradiography: techniques and application of modern methods in experimental pathology*. 1st ed. New York: Harper and Row publishers, Inc, 1969.
39. LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A, Harlow E. New functional activities for the p21^{CIP} family of cdk inhibitors. *Genes Dev.* 1997;11:847-862.
40. Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R, Pouyssegur J. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J. Biol. Chem.* 1996;271: 20608-20616.
41. Won KA, Xiong Y, Beach D, Gilman MZ. Growth-regulated expression of D-type cyclin genes in human diploid fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992; 89: 9910-9914.

DISCUSSION.

DISCUSSIÓ.

L'estudi del cicle cel.lular en un organisme viu esdevé una tasca difícil de realitzar degut a la gran diversitat cel.lular i a les interaccions entre els diferents tipus cel.lulars que coexisteixen en un mateix teixit. Així i tot hi ha alguns models d'estudi *in vivo*. Actualment, la major part d'experiments es realitzen en cultius cel.lulars establerts a partir de cèl.lules extretes d'un organisme. Aquestes cèl.lules sembrades en plaques, en un medi de cultiu adequat a les seves necessitats nutricionals, més un tant per cent de sèrum sanguini poden dividir-se normalment un nombre de vegades limitat. En alguns casos aquestes línies esdevenen immortals i es poden multiplicar indefinidament.

En els treballs exposats en aquesta tesi s'han utilitzat models cel.lulars representants de cada un dels orígens esmentats: un model *in vivo* de proliferació de cèl.lules normals de rata, els hepatòcits de fetge activats a proliferar amb la pràctica d'una hepatectomia parcial; un model *in vivo* de cèl.lules humanes normals, els limfòcits activats a proliferar per estimulació antigènica inespecífica (administració de fitohemaglutinina al medi de cultiu); i per últim, dos models de línies cel.lulars humanes transformades: la línia d'origen limfoide Namalwa, i les cèl.lules HeLa que provenen d'un tumor de cèrvix.

Les cèl.lules normals com és el cas del hepatòcits del fetge o dels limfòcits humans es troben habitualment fora del cicle cel.lular en estat quiescent (G₀), però metabòlicament són actius. Un estímul proliferatiu pot fer que aquestes cèl.lules entrin en el cicle cel.lular i es divideixi tantes vegades com sigui necessari.

Dins de les cèl.lules proliferants en cultiu trobem dos grups diferenciats: les cèl.lules normals que sota restriccions de sèrum sanguini en el medi de cultiu o d'alta densitat cel.lular a la placa surten del cicle cel.lular i s'aturen en la fase G₀ (per exemple les cèl.lules NRK); i les cèl.lules transformades que tenen l'habilitat de proliferar sota condicions que aturarien el creixement de les cèl.lules normals (per exemple les cèl.lules HeLa).

Les cèl.lules normals poden esdevenir tumorals degut a un ventall molt ampli i encara desconegut de causes que les activa a proliferar incontroladament. Entre aquestes causes cal destacar les mutacions o deleccions en gens que codifiquen per algunes de les proteïnes de cicle cel.lular. Entre elles trobem les definides com a proteïnes supressores de tumors perquè la seva manca desemboca en tumorigènesi i és el cas de retinoblastoma (pRb), p53, i p16; i les proteïnes oncogèniques la sobreexpressió de les quals té també com a conseqüència la formació de tumors, com a exemple podríem destacar la ciclina D o *ras*. Actualment, estudis realitzats en línies cel.lulars establertes procedents de tumors humans de còlon i de pàncreas assenyalen que dues de les vies reguladores del cicle cel.lular (la de la cdk4 i la cdk2) presenten alteracions a nivell de l'expressió de certes proteïnes, i que el nombre d'alteracions observades correlaciona amb la capacitat proliferativa d'aquestes cèl.lules (Paules et al., dades en preparació). Totes aquestes anormalitats esmentades a més de desembocar en una divisió incontrolada de les cèl.lules, en alguns casos els hi confereix la capacitat de saltar-se les barreres existents entre teixits i envair altres territoris provocant així les anomenades metàstasis, molt greus per la supervivència de l'individu.

Vista la gran interrelació que hi ha entre la patologia del càncer i el cicle cel.lular, resulta encara més interessant l'estudi de la maquinària reguladora del cicle tant en models normals de proliferació com en models alterats.

Els resultats presentats en aquesta tesi es podem incloure en tres apartats:

- 1. Identificació de nous substrats de cdk2.**
- 2. Localització intracel.lular de proteïnes que intervenen en la regulació del cicle cel.lular.**
- 3. Anàlisi dels mecanismes d'activació de la cdk4 i la cdk2 durant la regeneració hepàtica.**

Identificació de nous substrats de cdk2.

Les associacions entre les proteïnes determina, juntament amb la seva localització dins la cèl.lula i de modificacions bioquímiques (com els nivells de fosforilació), la seva activitat. Una mateixa proteïna depenent de les associacions que estableix pot realitzar funcions diferents: és el cas per exemple del PCNA que pot interaccionar amb la DNA polimerasa δ , RF-C, p21CIP, Fen 1, Gadd45, MyD118, DNA polimerasa ϵ i ciclina D. L'associació amb una o altre d'aquestes proteïnes determina la seva implicació en processos relacionats amb proliferació com la replicació del DNA (síntesi de les dues cadenes), o amb altres diferents com la reparació del DNA o la diferenciació (Cox., 1997).

En un primer moment vam considerar interessant estudiar proteïnes associades a cdk2 i no identificades, i a l'hora investigar si en aquests complexos podíem detectar algun possible substrat de la quinasa. Tal com es revisa a la introducció, el nombre de substrats coneguts d'aquesta quinasa és molt petit malgrat la seva importància com a proteïna reguladora del cicle cel.lular durant les fases G1, G1/S i S. Vam pensar que si fosforilàvem *in vitro* amb ATP- P^{32} els complexos cdk2 obtinguts amb els assajos d'immunoprecipitació, podríem detectar els substrats presents en aquests complexos mitjançant autoradiografia dels gels.

Nous substrats de cdk2 en cèl.lules HeLa:

Els primer bloc d'experiments es va realitzar amb cèl.lules HeLa amb l'objectiu d'ampliar posteriorment els estudis a altres models cel.lulars de proliferació.

El primer pas va estar comprovar que els complexos obtinguts per immunoprecipitació amb anticossos anti cdk2 tenien activitat quinasa associada. Efectivament, a l'afegir com a substrat exogen la histona H1, aquesta proteïna es fosforilava. Seguidament, es va realitzar el mateix experiment sense substrat exogen i en gels de diferents concentracions de poliacrilamida. Es van detectar dues proteïnes

que es fosforilaven una de 18-21 kDa i una de 170 kDa (article 1 i annex 4 del capítol I).

Identificació de la proteïna de 18-21 kDa com a l'inhibidor de cycle cel.lular p21CIP:

En el capítol III es descriuen el seguit d'experiments que es van realitzar i que van tenir com a resultat la identificació de la p21CIP com la proteïna de 18-21 kDa que es fosforila en els complexos cdk2 de cèl.lules HeLa.

El sentit funcional de la fosforilació de p21 per cdk2 encara no es coneix. El mateix tipus d'experiment realitzat, però, amb cèl.lules HeLa sincronitzades per restricció de sèrum i amb la droga hidroxiurea (article 2 i annex 1 del capítol II), evidencia que la p21 es pot fosforilar progressivament a mesura que el cycle cel.lular avança de G1 (cèl.lules asincròniques), a G1/S (punt 0 hores), S (punt 5 hores) i G2/M (punt de 10 hores). A l'haver estat realitzats aquests assajos de fosforilació *in vitro*, és possible que *in vivo* els llocs de fosforilació no estiguin ocupats i per aquesta raó puguem fosforilar-los experimentalment, per tant l'interpretació dels resultats seria a l'inrevés: a mesura que s'avança en el cycle la p21 es va defosforilant. L'activitat quinasa de cdk2 sobre la histona H1 també va incrementant de igual manera que ho fa la fosforilació de la p21, mentre que l'expressió de l'enzim roman constant durant el cycle. Curiosament l'associació de p21 a la cdk2 també incrementa de G1/S a G2/M, encara que el màxim es detecta en mostres asincròniques. L'associació de p21 a la ciclina A en canvi es manté constant durant totes les fases i per tant és possible que l'increment de p21 que es detecta en les immunoprecipitacions de cdk2 sigui deguda a la que està associada als complexos ciclina E- cdk2.

Encara que hem demostrat que p21CIP es fosforila per la cdk2 i per tal que aquesta proteïna sigui acceptada definitivament com a substrat de cdk2, manca encara esbrinar si els llocs de fosforilació *in vivo* i *in vitro* coincideixen i si la fosforilació provoca canvis en les propietats funcional de la proteïna.

La molècula de p21 té dos llocs consens de fosforilació per la cdk2 i per tant aquests residus són bons candidats a ser els llocs que es fosforilen en les cèl·lules HeLa. Aquest lloc està descrit com una prolina que segueix als residus de serina o treonina (S / T- P).

```
MSEPAGDVRQNPCGSKACRRLFGPVDSEQLSRDCDALMAGCIQ
EARERWNFDVFTETPLEGDFAWERVRGGLPKLYLPTGPRRGRD
ELGGRRPGTSPALLQGTAEEDHVDLSLSCTLVPRSGEQAEGSP
GGPGDSQGR KRRQTSMTDF YHSKRRLIFS KRKP
```

Fig 1. Llocs consens de fosforilació per la cdk2 en la molècula de p21CIP.

Quin sentit funcional pot tenir la fosforilació de la p21CIP?

La p21 ha estat descrita com a proteïna inhibidora de l'activitat cdk per unió directa al complex ciclina-cdk. Encara que la funció com a inhibidor del cicle cel·lular és molt clara, existeixen evidències de la seva implicació en altres funcions com descriuen LaBaer et al (1997). A certes concentracions la p21 promou l'associació de la cdk4 amb les ciclins D per formar complexos actius, però a concentracions més elevades inhibeix aquesta activitat quinasa. Anàlisi per mutacions de diferents fragments de p21 demostren que per promoure l'associació de complexos és necessari que el lloc de unió a la cdk i a la ciclina estiguin intactes (regió aminoterminal). Aquest mateix efecte en l'associació s'observa també amb les proteïnes p27 i p57. En el nostre estudi sobre la regeneració hepàtica també trobem la p21 en els complexos actius tant de cdk4 com els de cdk2. De fet, la formació dels complexos cdk4 o cdk6 amb les ciclins D necessita un factor d'acoblament (Kato, et al., 1994 i Matsushime, et al., 1994) tal com està demostrat en assajos *in vitro* en els quals les dues proteïnes purificades per si soles no s'associen. La p21 és una bona candidata a realitzar aquesta tasca, però segurament està implicada en alguna altre funció degut al fet que també la trobem formant part dels complexos cdk2-ciclina A/E els quals en principi no necessiten un factor d'acoblament per què siguin actius. LaBaer et al., 1997 també demostren que la p21 afavoreix l'estabilitat dels complexos ciclina-cdk.

Experiments de transfecció amb plàsmids de cdk4, ciclina D1 i p21 en cèl.lules SAOS-2 seguits d'anàlisi per immunocitoquímica, assenyalen que la p21 dirigeix la localització nuclear de la cdk4 i de la ciclina D (LaBaer, et al., 1997). A favor d'aquesta teoria existeix l'evidència que la P21 conté un senyal de localització nuclear potencial (NLS) (domini 141-156) a la seva seqüència que coincideix amb el lloc de interacció amb el PCNA en la regió carboxiterminal de la molècula. Ni la cdk4 ni les ciclins D tenen senyals NLS descrites i per tant és lògic pensar que la p21 podria ser l'encarregada de direccionar la translocació al nucli d'aquestes proteïnes.

Totes aquestes evidències assenyalen que la p21 pot jugar diversos papers en la regulació de les cdk's i la seva fosforilació podria participar en alguna d'elles: a) molècula **inhibidora** dels complexos cdk-ciclina; b) proteïna responsable de la senyalització necessària pel **transport** dels complexos ciclina D-cdk4 del **citoplasma** al **nucli**; c) proteïna responsable del **moviment** d'altres proteïnes d'un compartiment **nuclear** a un altre (com veurem més endavant); i d) proteïna **estabilitzadora** dels complexos ciclina-cdk. A part, la fosforilació de p21 podria estar relacionada amb la seva **degradació**, que es postula que és via ubiquitina, tal com ha estat demostrat per la p27 la fosforilació de la qual deguda al complex ciclina E-cdk2 és responsable de la degradació per aquesta via.

El nou substrat de cdk2 de 170 kDa no és la DNA polimerasa α :

La proteïna de 170 kDa (que anomenem p170), també es marca metabòlicament amb metionina S³⁵ en els immunocomplexos de cdk2 obtinguts de cèl.lules que han incorporat aquest aminoàcid marcat radioactivament. Existeixen fins el moment molts treballs realitzats amb la tècnica del marcatge metabòlic amb metionina-S³⁵ seguit d'immunoprecipitació, orientats a trobar nous complexos proteics on les cdk's i altres proteïnes de cicle cel.lular hi estiguin involucrades. Així, s'han trobat complexos binaris com els formats per la cdk unida a la seva ciclina, la cdk unida a una proteïna inhibidora, o la ciclina A associada a l'oncoproteïna vírica E1A en cèl.lules transformades víricament (Pines and Hunter, 1990); complexos ternaris on la proteïna inhibidora s'associa a la cdk-ciclina (revisat a Sherr and

Roberts, 1995); i quaternaris com els ciclina A/E-p107-cdk2-E2F (revisat a Zhang, et al., 1993) que impliquen les cdk amb la regulació de l'activitat de factors de transcripció, i els cdk (1,2,4 i 5)-ciclina (A, B1, D1 i D3)-p21-PCNA (Xiong, et al., 1992;; Xiong, et al., 1993) els quals van fer pensar que el PCNA no és simplement un factor de replicació, sinó que participa en altres funcions relacionades amb el cicle. Aquests complexos també presenten trets diferencials segons pertanyen a cèl.lules normals o a cèl.lules transformades, Xiong, et al el 1993 van suggerir que durant la transformació cel.lular es produeix una reordenació dels complexos perquè no van trobar el PCNA i la p21 associada a les cdk i ciclins en forma de complex quaternari en algunes línies cel.lulars transformades.

El primer pas va estar estudiar els complexos cdk2, ciclina A i p21 en mostres de HeLa asincròniques. Es van marcar les cèl.lules metabòlicament amb metionina- S^{35} i es van immunoprecipitar amb els anticossos específics contra les proteïnes esmentades. En els gels analitzats es va trobar la ciclina A i la p21 associades a la cdk2, però no el PCNA; la cdk2 (i una altre cdk segurament la cdc2), la p19, la p21 acomplexades amb la ciclina A; i una o varies cdk i ciclins, i dues proteïnes no descrites anteriorment de 28 kDa i de 38 kDa associades a la p21. El seguiment de la proteïna de 38 kDa s'està realitzant actualment el nostre laboratori i fins el moment s'ha identificat com la proteïna SET, un inhibidor de la fosfatasa PP2A (Estañol, et al., dades en preparació). Amb l'anàlisi dels mateixos experiments amb gels d'un tant per cent de poliacrilamida més baix, vam detectar la p170.

Amb aquests experiments es van identificar nous components dels complexos ciclina A, cdk2 i p21: la p170, la p28, i la p38. Aquests resultats ens mostren un bon sistema per trobar noves proteïnes d'associació amb les proteïnes de cicle.

Fins el moment, la p170 encara no ha estat identificada i l'única evidència que tenim és que no és la DNA polimerasa α . En un principi, vam pensar que podria tractar-se d'aquest enzim replicatiu ja que està proposat com a substrat de les cdk (Voitenleitner, 1997) i el pes molecular és similar. Vam aprofitar la propietat d'aquesta polimerasa de formar complexos amb la proteïna P1 (Kimura, et al., 1994). Al realitzar paral·lelament les immunoprecipitacions amb anticossos contra la cdk2 i

la P1 en mostres marcades metabòlicament, vam comprovar que la DNA pol α tenia un pes molecular clarament superior a la p170.

Nous substrats de cdk2 en diferents models cel·lulars.

Vam considerar també interessant ampliar els experiments sobre la identificació de substrats nuclears de cdk2 a altres models cel·lulars. Donat que les cèl·lules HeLa són cèl·lules transformades, vam escollir dos models de cèl·lules normals: els limfòcits humans i els hepatòcits proliferants; addicionalment vam disposar de la línia transformada d'origen limfoide Namalwa. Els resultats que vam obtenir obren noves perspectives en l'anàlisi de substrats de la cdk2. En primer lloc i comparant les dues línies del mateix origen els limfòcits i les cèl·lules Namalwa, detectem varies proteïnes fosforilades diferencialment, fet que recolza la teoria de Zhang, et al (1993) sobre la reordenació de complexos proteics durant la transformació i l'amplia a l'àmbit dels substrats de les quinases. En segon lloc observem també diferències quan el que comparem són les diferents fases del cicle cel·lular: en cèl·lules HeLa sincronitzades es detecta una proteïna de 63 kDa no present en mostres asincròniques. En tercer lloc es detecten diferències quan es comparen els resultats obtinguts en les dues subfraccions nuclears S1 i S2 obtingudes de nuclis purificats d'hepatòcits proliferats a les 24 hores post HP (que coincideix amb el pic màxim de síntesi de DNA i també amb el pic màxim d'activitat cdk2 com es descriu al capítol IV).

Per el moment aquestes proteïnes fosforilades resten per identificar a excepció de la de 21 kDa present en totes les línies analitzades, que tal com hem exposat correspon a l'inhibidor p21CIP.

Resulta interessant anomenar el treball publicat recentment per Sarcevic et al (1997). Aquests autors han caracteritzat nous possibles substrats dels complexos ciclins D-cdk4 i ciclina A/E-cdk2 mitjançant la fosforilació d'extractes nuclears d'una línia tumoral de mama amb els complexos ciclina-cdk purificats expressats en baculovirus. Diversos d'aquests substrats són específics de cada complex, mentre

d'altres són compartits, per exemple ciclina E-cdk2 i ciclina A-cdk2 coincideixen en 22 de les proteïnes fosforilades, mentre que 6 són exclusives de ciclina A-cdk2 i només un ho és per ciclina E-cdk2.

Proteïna (PM)	HeLa	Hepatòcits	Limfòcits normals	Namalwa
20		+		+
21	+	+	+	+
25		+	+	
29		+		
34		+		
37		+	+	
39		+		
40			+	+
57		+	+	
63	+			
65				+
67				+
70			+	+
112				+

Taula 1. Nous possibles substrats de cdk2 en diferents models cel.lulars de proliferació.

Localització intranuclear de proteïnes que intervenen en la regulació del cycle cel.lular.

Les cèl.lules eucariotes tenen la capacitat de respondre als canvis que tenen lloc en l'ambient que les envolta. Tradicionalment s'ha pensat que les senyals extracel.lulars es transmeten a través dels sistemes de transducció citoplasmàtics, arriben al nucli i és en aquest compartiment on finalment tenen lloc els processos que determinen el tipus de resposta de la cèl.lula.

Localització de proteïnes reguladores del cicle cel.lular en orgànuls citoplasmàtics.

Malgrat és acceptat que les proteïnes reguladores del cicle cel.lular realitzen les seves funcions dins el nucli, existeixen alguns estudis de localització subcel.lular que obren noves perspectives en la funcionalitat de les proteïnes reguladores del cicle cel.lular. La localització en compartiments cel.lulars diferents al nucli d'algunes d'aquestes proteïnes i dels complexos actius dels quals formen part, amplien el ventall de possibles mecanismes regulats per les proteïnes reguladores del cicle cel.lular. És interessant anomenar el treball de Jackman, et al. (1995) en el qual es descriu la diferent localització de les ciclins B1 i B2 dins la cèl.lula. La ciclina B1 s'associa amb els microtúbuls en el citoplasma, i després de translocar al nucli durant la profase, colocalitza amb els microtúbuls del fus mitòtic. Al contrari, la ciclina B2 s'associa amb l'aparell de Golgi on segurament regula altres aspectes de la reorganització de l'arquitectura cel.lular que tenen lloc durant aquesta fase. En Vergés, et al (1996) es descriu la presència de ciclina A, cdk2, cdc2 i d'activitat quinasa associada a ciclina A i cdk2 en endosomes aïllats de fetge regenerant. Durant el procés de regeneració hepàtica induïda per la pràctica d'una hepatectomia parcial es produeixen canvis en l'organització del compartiment endocític, així com un bloqueig en el tràfic vesicular general al començament de la mitosi, el qual es normalitza durant la telofase. Els resultats d'aquest treball sumats als de Tuomikoski et al. (1989) i Thomas et al. (1992), en els quals evidenciaven el paper inhibidor de la cdc2 associada a la ciclina B en la fusió de vesícules endocítiques *in vitro*, suggereixen una nova perspectiva funcional dels complexos cdks-ciclins en la reorganització del compartiment endocític durant la proliferació hepàtica. En Castro, et al (1994) es demostra la presència de ciclina A, i d'activitat cdk2 quinasa en la fracció microsomal de cèl.lules de fetge activades a proliferar, així com la localització de la ciclina A en la membrana plasmàtica de mostres del mateix origen.

Queda clar, doncs, que les proteïnes reguladores del cicle cel.lular a més d'estar ubicades en el nucli, també es localitzen en altres compartiments cel.lulars. L'estudi d'aquestes proteïnes fora de l'àmbit estrictament nuclear pot obrir noves

perspectives en la recerca de noves funcions. Concretament, en el treball presentat en el capítol IV, l'anàlisi de la localització de la cdk4, ciclina D i p21 per immunocitoquímica, ens ha permès aprofundir en els mecanismes d'activació de la maquinària de cicle en el model de proliferació hepàtica com discutirem més endavant.

La cdk2 i la ciclina A colocalitzen amb la maquinària replicativa en cèl.lules HeLa.

De l'estudi dels gradients de densitat vam concloure que existeixen complexos de pes molecular molt elevat, al menys superiors al PM de la tiroglobulina de 670 kDa dels quals la cdk2, la ciclina A, el PCNA i la DNA polimerasa α hi formen part. El fet que detectem activitat quinasa associada a cdk2 confirma que aquests complexos són actius, i el fet que d'altres autors utilitzin els mateixos gradients per aïllar els complexos replitasa en els quals es detecten activitats enzimàtiques d'alguns enzims relacionats amb la síntesi del DNA, també recolza els resultats obtinguts amb el subfraccionament nuclear, que comentarem seguidament, sobre la implicació de les cdks-ciclina més les proteïnes que les regulen en la fosforilació de substrats essencials per la replicació del DNA.

La compartimentació nuclear i les proteïnes reguladors del cicle cel.lular en les cèl.lules HeLa.

Per tal d'estudiar la implicació de la compartimentació nuclear en els mecanismes d'activació del cicle cel.lular, es va escollir un protocol de fraccionament del qual a partir de nuclis purificats sencers s'obtenen les subfraccions S1, S2 i matriu nuclear. Deixarem pel final de la discussió la informació que ens va aportar aquest procediment en l'estudi del model de proliferació hepàtica, i discutirem ara, els resultats obtinguts de l'anàlisi de les subfraccions de nuclis de cèl.lules HeLa

asincròniques. Cal tenir en compte que un cultiu de les cèl·lules HeLa no sincronitzades conté al voltant del 60% de cèl·lules en la fase G1. Es van analitzar 16 proteïnes que es poden subdividir en cinc grups: cdks (1,2 i 4) i ciclins (A, B i D); CKIs (p21, p27, p15, i p16); retinoblastoma; i proteïnes relacionades amb la replicació del DNA (DNA polimerasa α , PCNA, RPA, P1, i cdc21). Totes elles s'extrauen amb el tractament amb nucleases menys la ciclina D1 que ho fa només feblement. Amb la S2 s'extrauen també totes les proteïnes analitzades a excepció de la la ciclina D, i els inhibidors p27, p15 i p16. La fracció S1 s'obté del tractament dels nuclis sencers amb DNasa i RNasa, i per tant les proteïnes que conté, estan unides directa o indirectament al DNA o al RNA. La S2 correspon a la fracció soluble a un tractament amb altes concentracions de NaCl (1,6 M) que provoca un xoc hipotònic que reventa completament el nucli. Cal dir les proteïnes que formen complexos grans no poden sortir del nucli amb la S1 encara que les nucleases les hagin alliberat de la seva associació amb el DNA o el RNA, degut a que la integritat del nucli no es veu gaire alterada amb aquest tractament. Per últim resten les proteïnes associades a la matriu nuclear: totes les cdks, la ciclina D, pRb, p21, p16, DNA pol α , P1 i cdc21.

D'aquest anàlisi podem concloure que hi ha un grup de les proteïnes que estan presents en el nucli de les cèl·lules HeLa en dos *pools* diferenciats, un que s'extrau amb nucleases i un que roman associat a la matriu nuclear. Amb l'extracció amb nucleases Aquestes darreres proteïnes corresponen a les cdks, la forma hiperfosforilada de retinoblastoma, i els inhibidors p21 i p16. D'altra banda aquest mateix comportament el presenten la DNA polimerasa α i les proteïnes P1 i cdc21, totes elles essencials per la replicació del DNA. Tant la polimerasa com la proteïna P1 han estat presentades com a possibles substrats de cdks com hem descrit a la introducció (Voitenleitner, et al., 1997; Hu, et al., 1993). Cal destacar que en cas de la DNA polimerasa α observem que les dues bandes que es detecten per immunoblot i que corresponen a diferents formes fosforilades de la proteïna, s'extrauen diferencialment en la S1 i la matriu. Aquesta modificació bioquímica és responsable de l'afinitat de l'enzim per la molècula de DNA i pot afectar també la interrelació amb altres proteïnes relacionades amb la replicació. Nasheuer, et al. (1991) descriuen que la subunitat catalítica (180 kDa) de l'enzim està fosforilada durant tot el cicle i s'hiperfosforila al G2/M, mentre que la subunitat de 70 kDa només ho està durant la

mitosi. Aquesta forma de l'enzim presenta menys afinitat per la cadena simple de DNA. Kimura, et al.(1994) ja descriuen que la proteïna P1 es troba present fortament unida a l'estructura nuclear i es va alliberant per fosforilació a mesura que la replicació del DNA va avançant.

Els resultats obtinguts amb el subfraccionament nuclear estan a favor de la implicació directa de les cdks en la fosforilació de proteïnes essencials per la progressió en la fase S; i segurament, la proximitat física afavoreix les interaccions d'aquestes quinases amb els seus substrats. D'altra banda, el fet que els orígens de replicació i la síntesis de DNA també estiguin associats a la matriu nuclear (Berezney, 1991) recolza aquesta teoria.

Així mateix, la proteïna retinoblastoma és també substrat de les cdks i els seus nivells de fosforilació (que li confereixen mobilitats electroforètiques en el rang de 110 a 112-120 kDa) determinen l'activitat com a repressor de la transcripció de gens transcrits per les tres RNA polimerases. Mancini et al (1994) troben ja pRb associat a la matriu nuclear al començament del G1, concretament la forma hipofosforilada que és la única que té capacitat de unió amb les oncoproteïnes víriques. Mittnacht and Weinberg (1991) descriuen que existeix una correlació entre la manera d'associar-se pRb al nucli i la fase del cicle cel.lular. Així pRb s'extrau fàcilment amb un tampó amb baixes concentracions de sal si els nuclis provenen de cèl.lules en fase S i G2/M, mentre que es fa resistent a un tampó hipotònic més un tractament amb nucleases si són nuclis en fase G1. Sembla ser que la forma menys fosforilada de pRb és la que roman fortament associada a la matriu nuclear, i la fosforilació que té lloc al llindar G1/S és la que causa la modificació responsable de la dissociació; possiblement la quinasa que fosforila pRb necessita que estigui associat a un altre component nuclear per tal de reconeixè'l com a substrat. La propietat d'unir-se a la matriu nuclear es veu alterada en línies cel.lulars derivades de tumors que tenen pRb mutat freqüentment en la regió de unió a oncoproteïnes. En les nostres mostres de cèl.lules HeLa, observem que amb la S1 s'extrauen dues bandes fosforilades, mentre que a la matriu, només la banda de pes molecular més elevat hi queda retinguda, al contrari del que succeeix en cèl.lules normals. Possiblement aquesta alteració podria tenir alguna relació amb la

seva transformació. Per últim, l'inhibidor p21, tal com hem demostrat al capítol III, és un substrat de cdk2 i observem també que s'extrau amb el mateix tractament.

Bosser et al (1995) descriuen que amb la fracció S1 procedent de nuclis d'hepatòcit, s'extrauen l'enzim caseïna quinasa 2 i els seus substrats de 36, i 40-42 kDa identificats com les ribonucleoproteïnes A2 i C1. Aquestes proteïnes s'uneixen als trànscripats de RNA naixent de la RNA polimerasa II i entre d'altres funcions estableixen aquest RNA i afavoreixen el seu posterior processament o *splicing*. El fet que les proteïnes de cicle que hem estudiat s'alliberin per acció de les nucleases com també passa amb les ribonucleoproteïnes i la quinasa que les fosforila, fa entreveure una possible participació d'aquestes proteïnes en el procés de la transcripció i processament del RNA.

Les ciclins A i B, i els inhibidors p27 i p15 estan associats a les cdks d'una forma extraïble només amb nucleases; així com el PCNA, i el RP-A ho estan a la DNA polimerasa δ i al DNA.

Curiosament, la ciclina D apareix quasi totalment associada a la matriu nuclear, al contrari que les altres ciclins analitzades que s'extrauen amb la S1. S'han descrit complexos ciclina D1-cdc2 (a part dels de ciclina D associada a cdk4, cdk2 i cdk5) (Zhang, et al., 1993) que suggereixen que la ciclina D juga diferents papers en el control del cicle. En cèl.lules asincròniques l'associació de ciclina D amb cdc2 és inferior a l'associació trobada amb les altres cdks, però cal tenir en comte que en una població asincronia, més del 50% de les cèl.lules estan a la fase G1, i que la funció del complex ciclina D-cdc2 segurament és situa a la mitosi. A diferència de les altres ciclins, la D s'expressa constantment durant tot el cicle cel.lular sempre que hi ha disponibilitat de factors de creixement, i per tant no és estrany suposar que pugui participar en esdeveniments que tenen lloc en fases diferents del G1. El fet que la ciclina D es localitzi majoritàriament associada a la matriu nuclear, impossibilita la realització d'assajos d'immunoprecipitació amb aquesta fracció degut a la seva elevada insolubilitat. Per tant és possible que aquests complexos ciclina D-cdc2 siguin essencials, però que no hagi estat possible detectar-los per limitacions experimentals. Cal afegir que l'estudi que hem realitzat amb mostres de subfraccions nuclears d'hepatòcits proliferants en diferents fases del cicle, la ciclina D que durant el G0-G1 i S s'extrau amb la fracció S1, durant la mitosi es trasllada espectacularment a la matriu

nuclear. I per últim, treballs d'immunocitoquímica amb anticossos contra la ciclina D1 no són capaços de detectar-la en cap lloc dins de la cèl.lula durant la fase S (Baldin, et al., 1993) segurament i donat als nostres resultats, perquè es troba associada a la matriu nuclear i s'han donat casos en els quals aquesta estructura tant insoluble emmascara els antígens que conté.

Estudi de l'activació del cicle cel.lular en el model de la proliferació cel.lular *in vivo* de la regeneració hepàtica.

Com a conseqüència de la pràctica de l'hepatectomia parcial (HP) i a l'estímul mitogènic que desencadena, les cèl.lules del fetge abandonen la fase de quiescència i entren en el cicle cel.lular. Totes les cèl.lules entren en el *gap* G1, però només els hepatòcits avancen en el cicle i comencen a sintetitzar DNA a partir de les 14 hores post HP. El pic de màxima síntesi de DNA es presenta a les 24 hores post HP i el nombre màxim de mitosis s'observa de 4 a 6 hores més tard.

Ens vam proposar fer un estudi general de la maquinària reguladora del cicle cel.lular durant les primeres 28 hores de regeneració hepàtica. L'objectiu era esbrinar els possibles mecanismes d'activació del cicle en aquest model *in vivo* i comparar-los amb els coneixements que es tenen extrets dels models de cultius cel.lulars.

En l'anàlisi per immunoblot d'homogenats de fetge regenerant, no s'observen variacions espectaculars en l'expressió de les proteïnes de cicle estudiades durant les primeres 28 hores de regeneració hepàtica. Curiosament, cal destacar que el fetge quiescent ja conté totes les proteïnes reguladores de cicle cel.lular. Així, la ciclina D, que en estudis realitzats amb cultius cel.lulars s'expressa com a conseqüència de l'estímul mitogènic generat pels factors de creixement, ja es detecta en el fetge control. La ciclina E i la ciclina A que tradicionalment presenten el màxim d'expressió en el llindar G1/S i durant la fase S respectivament, també es troben presents en el fetge quiescent. L'única proteïna que gairebé està absent en les mostres en G0 és l'inhibidor p21 el qual comença a detectar-se clarament a les 5 hores post HP i va

incrementant a mesura que el cicle avança. El sentit que pot tenir aquesta evidència encara no el coneixem, segurament està relacionat amb la importància que té el fetge com a òrgan essencial per la vida de l'organisme. El fetge sembla ser que està preparat per proliferar, al menys pel que fa referència a la presència de les proteïnes claus per la progressió en el cicle cel.lular, i possiblement una vegada rep les senyals mitogèniques no ha de "perdre" temps en activar la síntesi d'aquestes proteïnes. Per una altra banda hem vist a la introducció que les senyals mitogèniques disparades pels factors de creixement clàssics (HGF, EGF, i TGF α) no són suficients per generar la resposta proliferativa del fetge i que cal un període de sensibilització (*priming*) per tal que els receptors d'aquests factors puguin respondre. Contràriament, els hepatòcits en cultiu responen directament als factors de creixement esmentats de la mateixa manera que ho fan la resta de línies cel.lulars. Per tant, amb aquests primers resultats ja s'evidencia un comportament diferencial entre el sistema de proliferació *in vivo* de la regeneració hepàtica i els sistemes de proliferació cel.lular en cultiu utilitzats tradicionalment.

Durant el període de proliferació hepàtica analitzat, els pics màxims d'activitat quinasa de la cdk4 i la cdk2 coincideixen temporalment amb el pic de màxima síntesis de DNA a les 24 hores post HP. Possiblement, si ampliéssim el nombre de punts intermitjos analitzats entre les 20 i les 24 hores post HP, detectaríem alguna diferència temporal entre aquestes activitats. Matsushime et al (1994) defineixen el màxim d'activitat ciclina D en macròfags en el llindar G1/S i seguidament el màxim d'activitat cdk2. Cal dir que l'estudi de les activitats quinases es realitza sempre detectant la fosforilació d'un substrat afegit externament, que en el cas de la cdk4 és un fragment de pRb i en el de cdk2 és la histona H1. Encara que aquestes proteïnes s'hagin definit com a bons substrats *in vitro* de les quinases, no es descarta que aquests enzims puguin fosforilar altres substrats *in vivo* o a temps diferents dels observats *in vitro*. Per exemple, Hauser et al (1997) troben activitat quinasa deguda a ciclina A-cdk2 en els immunocomplexes de p130 i p107. Aquests complexos no són capaços però, de fosforilar la histona H1 i sí les proteïnes de fusió GST-pRb, GST-p130 i GST-p107. Per tant, estan detectant un *pool* de cdk2, desconegut fins el moment, que fosforila preferentment les proteïnes *pocket*.

Encara que no s'observen diferències espectaculars en els nivells d'expressió de les proteïnes estudiades durant les 28 hores post HP, sí cal destacar l'increment en els nivells de ciclina D1, i de cdk2 i una disminució en l'expressió de p27 a les 24 hores post HP. Aquests canvis correlacionen amb els pics d'activitat quinasa i per tant podrien estar relacionats amb l'activació d'aquests enzims.

L'estudi dels complexos que forma la cdk4 amb les ciclines D1 i D3 i el seguiment per immunocitoquímica, proporciona algunes pistes sobre l'activació d'aquesta quinasa. La cdk4 es troba associada a la ciclina D3 ja en el fetsge quiescent, i al contrari, no s'associa a la ciclina D1 fins a les 13 hores post-HP. Sembla ser, que la raó d'aquesta evidència és que la ciclina D1 i la cdk4 es localitzen en compartiments diferents durant les primeres hores post HP: la cdk4 i la ciclina D3 es troben en el citoplasma i la ciclina D1 en el nucli. L'estudi més detallat de localització detecta un marcatge diferencial a les 5 hores post HP, en el qual les proteïnes estudiades (cdk4, ciclina D1 i D3 i p21) es situen en la zona de l'embolcall nuclear (constituent de la matriu nuclear) donant una imatge al microscopi en forma d'anella. Totes les proteïnes analitzades, tant les que venen del citoplasma: cdk4, ciclina D3 i p21; com la que ja es troba en el nucli, la ciclina D1, es situen en aquest estructura.

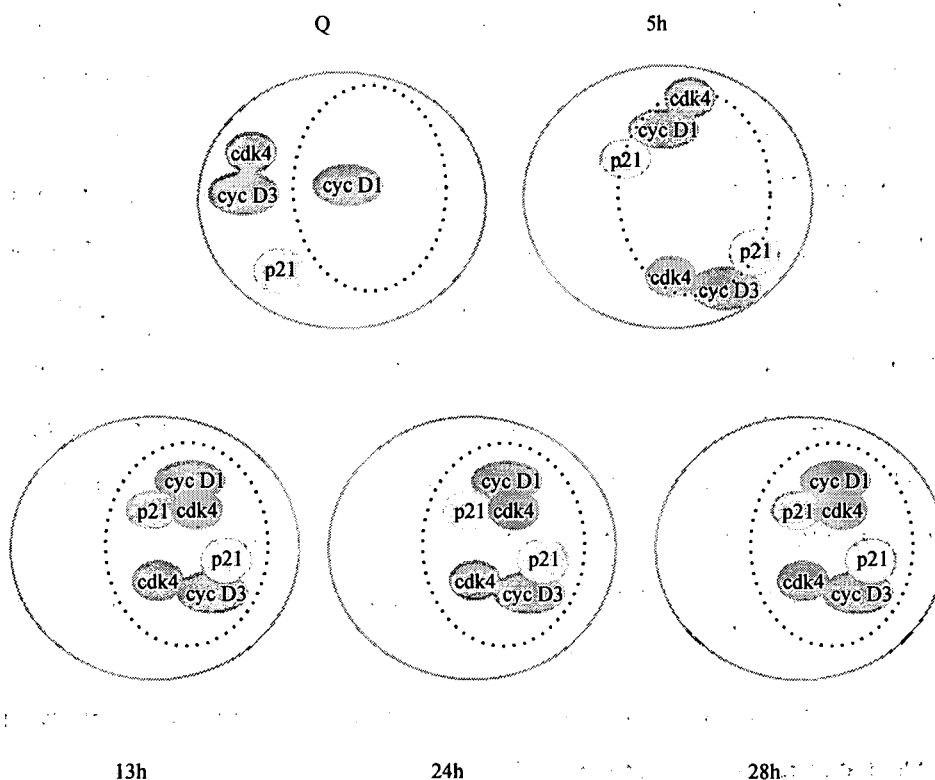


Fig. 3 Esquema hipotètic de la distribució dels complexos.

L'estudi dels complexos que formen les ciclins D1 i D3 mostren que la cdk4 comença a associar-se a elles ja durant la quiescència, i que la p21 ho fa a les 5 hores i lleument a la quiescència, respectivament. Així, en els fetges control coexisteixen els complexos ciclina D3-cdk4-p27, p16-cdk4, ciclina D1-cdk4 i mínimament els ciclina D3-cdk4-p21. A les 13 hores post HP la localització de totes les proteïnes és intranuclear. Sigui com sigui encara que els complexos estan formats i a primer cop d'ull totes les proteïnes localitzades en el mateix compartiment, no hi ha activitat quinasa detectable en el nucli a les 13 hores post HP. Per tal d'esbrinar aquesta qüestió es va aprofundir en la compartimentació nuclear.

El mètode de subfraccionament utilitzat per tal d'analitzar la distribució d'aquestes proteïnes dins el nucli, ha estat el mateix que l'emprat en el capítol I amb les cèl.lules HeLa. En general, observem que les proteïnes estudiades es localitzen diferencialment en les subfraccions S1 i matriu segons la fase del cicle. Cal destacar que la cdk4 i la cdk2, i les seves ciclins D3 i D1, A i E respectivament, es situen a la S1 a les 24 hores post HP, temps que coincideix amb el pic màxim d'activitat d'aquestes quinases. Per tant, suposem que l'activitat quinasa es localitza a la subfracció S1. Curiosament, la ciclina D1 es trasllada de la S1 a la matriu d'una manera espectacular a les 28 hores post HP fet que la implica amb algun esdeveniment que té lloc durant la mitosi i amb la pèrdua d'activitat cdk4. De fet, en les cèl.lules HeLa, la ciclina D1 s'associa a la matriu ja durant la fase G1 tal com s'ha discutit anteriorment.

L'inhibidor p21 es troba a la S1 a partir de les 24 hores post HP i per tant segueix el mateix patró de localització que la cdk4, la cdk2, les seves ciclins i l'activitat quinasa. A les 5 hores post HP l'expressió de p21 a la matriu nuclear es veu incrementada considerablement, fet que coincideix amb la detecció per overlay d'una proteïna de 70 kDa que uneix p21. La p70 es detecta només en la matriu en mostres quiescents i de 5 hores, posteriorment es degrada, marxa de la matriu o bé perd la capacitat d'unir p21.

D'aquests darrers resultats s'extrau que la p21 definida tradicionalment com a inhibidor de cicle cel.lular forma part dels complexos actius cdk4 i cdk2 durant la proliferació hepàtica i companya a la cdk4 i a la ciclina D3 des de el citoplasma cap

el nucli on a les 5 hores post HP pot associar-se a la matriu nuclear mitjançant una proteïna de 70 kDa.

La ciclina D3 i la ciclina D1 en el model de la regeneració hepàtica es comporten diferencialment. La primera ciclina que s'associa a la cdk4 és la D3 que ho fa ja a la quiescència. Quin sentit pot tenir la formació d'aquest complex en cèl.lules en G0? L'activitat cdk4 no es detecta fins a les 13 hores post HP, al menys l'activitat quinasa que fosforila pRb; tal com hem comentat anteriorment no podem descartar que el complex tingui un altre substrat durant G0 o principis de G1 que amb aquest protocol no el detectem. Per exemple, la proteïna p130 de la família de les *pocket* ja s'expressa en G0 i varia els seus nivells de fosforilació depenent de la fase del cicle cel.lular, així una de les formes fosforilades és característica només d'aquesta fase i encara no es coneix la quinasa responsable d'aquesta fosforilació (Mayol et al, 1995).

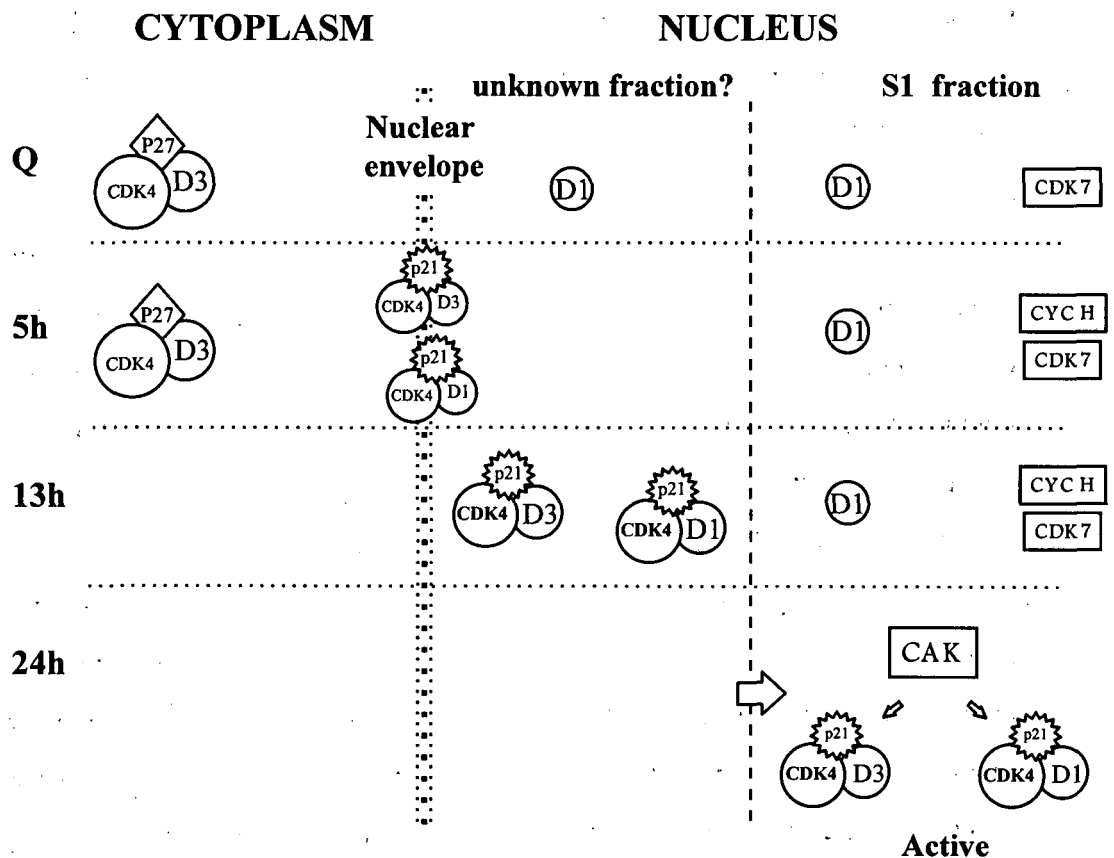


Fig. 4 Model d'activació de la cdk4 durant les primeres 24 hores de regeneració hepàtica.

La p21 s'associa a la ciclina D3 ja durant la quiescència. En els immunoprecipitats fets contra la cdk4, l'associació p21-cdk4 no es detecta possiblement perquè estem immunoprecipitant tota la cdk4 de la cèl.lula tant la lliure com l'associada, i no som capaços d'evidenciar-la; en canvi, la ciclina D3 deu estar tota acomplexada. La p21 comencem a detectar-la associada a la ciclina D1 a les 5 hores post HP que coincideix amb els resultats obtinguts per immunocitoquímica de localització en la zona de l'embolcall nuclear. Per tant, sembla ser que la p21 acompanya al complex ciclina D3-cdk4 des de el citoplasma al nucli i possiblement la seqüència NLS de p21 sigui la responsable de la translocació del complex. Una vegada dins el nucli, la cdk4 s'associa a la ciclina D1 on romanen inactives en un compartiment encara per determinar i no és fins a les 24 hores que es situen a la S1 on s'activen. Suposem que l'activació és deguda a l'activitat CAK i cdc25, les tres proteïnes (ciclina H, cdk7 i cdc25) estan presents a la subfracció S1 durant les 28 hores analitzades, en canvi no es detecta ciclina H a la matriu nuclear.

Per acabar, i com a referència, existeixen alguns treballs sobre la localització i translocació de les proteïnes de cicle al nucli duts a terme en línies cel.lulars. Els estudis paral.lels durant la regeneració hepàtica són objecte d'estudi actualment. Així, la ciclina B1 es localitza en el citoplasma i a la profase transloca al nucli (Pines and Hunter, 1991). La ciclina B2, s'ha trobat associada a Golgi i no transloca al nucli (Jackman, et al., 1995). Es pensa que una seqüència de l'extrem N terminal d'aquestes ciclins anomenada *cytoplasmic retention signal* (CRS) determina la localització citoplasmàtica de la ciclina B1 durant el G2 i que la fosforilació d'una serina d'aquesta regió és responsable de la translocació al nucli (Li, et al., 1997). La localització de la ciclina A és preferentment nuclear (Pines and Hunter 1991) i no presenta CRS. Una vegada és sintetitzada transloca al nucli ràpidament i d'una manera independent de la seqüència NLS (*nuclear localization signals*). Hi ha evidències que la translocació al nucli de la ciclina A depèn de la formació d'un complex proteic que possiblement conté cdk2, p107 i p21 la qual si que presenta NLS (Pines and Hunter, 1994). Les ciclins D s'han trobat exclusivament localitzades en el nucli durant el G1, i durant les fases S, G2 i M no es localitza en cap lloc (Baldin, et al., 1993., i Lukas, et al., 1994). Com hem vist anteriorment sembla ser que la p21 podria dirigir els

complexes ciclina D-cdk4 al nucli (LaBaer, et al., 1997). La ciclina E està sempre en el nucli (Ohtsubo, et al., 1995) mentre que la cdk2 es troba en el citoplasma durant el període en el qual no es detecta activitat quinasa d'aquest complex, i per tant la localització diferencial de les dues proteïnes és un factor limitant de la seva activitat (Bresnahan, et al., 1996). La ciclina F presenta seqüència NLS i té una localització també preferentment nuclear, encara que també se'n detecta en el citoplasma. (Bai, et al., 1994).

Les seqüències NLS estan formades per un o més grups d'aminoàcids bàsics i són les responsables del direccionament de la proteïna cap el nucli. Aquestes senyals de localització no són les úniques que existeixen, recentment ha estat identificat el domini M9 de la hnRNPA1 que funciona d'una manera assemblant a les NLS. El sistema de transport citoplasma-nucli en aquests casos consisteix en primer lloc en el reconeixement citoplasmàtic del receptor i la proteïna que ha de ser conduïda al nucli; seguidament el conjunt és dirigit a través dels complexos del porus nuclear (NPCs) cap a dins del nucli on el lligand és alliberat del receptor el qual sol recicle cap el citoplasma. En el cas de les proteïnes amb seqüència NLS el receptor és l'heterodímer anomenat importina α i β , i concretament el lloc de unió a NLS pertany a la subunitat α , i és la β l'encarregada de connectar amb els filaments citoplasmàtics del NPC i de la translocació a través del porus. Aquest procés necessita l'energia generada per la hidròlisi del GTP duta a terme per la GTPasa Ran /TC4 amb col.laboració del factor NTF2 (revisat a Panté and Aebi, 1996; i Görlich, 1997).

CONCLUSIONS.

CONCLUSIONS

- 1- Dos nous substrats nuclears de cdk2, de 21 kDa i de 170 kDa, es troben associats als complexos de cdk2 en cèl.lules HeLa asincròniques.
- 2- S'ha identificat el substrat de 21 kDa com a l'inhibidor de cicle cel·lular p21CIP.
- 3- Les cèl.lules HeLa sincronitzades amb la droga hidroxiurea i amb restricció de sèrum en el medi de cultiu, presenten el pic de màxima síntesi de DNA cinc hores després de l'alliberament de la droga. A les 10 hores, les cèl.lules es situen al llindar G2/M.
- 4- Encara que la l'expressió de cdk2 no varia en mostres de cèl.lules HeLa sincronitzades amb hidroxiurea i amb restricció de sèrum en el medi de cultiu, l'activitat quinasa de l'enzim va incrementant a mesura que les cèl.lules avancen en el cicle cel·lular. Paral·lelament a aquesta evidència, la quantitat de proteïna i el grau de fosforilació de l'inhibidor p21CIP que s'associa als complexos de cdk2 va incrementant de la mateixa manera.
- 5- Els substrats associats als complexos de cdk2 varien depenent de diversos factors: la transformació cel·lular, la fase del cicle cel·lular i el compartiment nuclear.
- 6- Dues noves proteïnes de 28 i 38 kDa s'associen als complexos de p21CIP en lisats totals de cèl.lules HeLa asincròniques. La proteïna de 38 kDa ha estat recentment identificada com a SET un l'inhibidor

de les fosfatases tipus PP2A (Estañol et al, en preparació). La proteïna de 28 kDa encara no ha estat identificada.

- 7- Les proteïnes que participen en la regulació del cicle cel.lular es distribueixen diferencialment en els diversos compartiments nuclears.
- 8- Existeixen dos *pools* intranuclears de les quinases dependents de ciclins (cdks 1,2,i 4), de la ciclina D1, de retinoblastoma (pRb), dels inhibidors de cicle p21 i p16, de la DNA polimerasa α , de P1 i de cdc21. Un *pool* és sensible al tractament amb nucleases i correspon a proteïnes associades a estructures que contenen DNA o RNA; i l'altre *pool* està associat a la matriu nuclear i no respon al tractament amb nucleases.
- 9- Contràriament, les ciclins A i B, els inhibidors de cicle p27 i p15, el PCNA i el RP-A són totalment sensibles al tractament amb nucleases i per tant estan associats exclusivament a estructures que contenen DNA i RNA.
- 10- La fosforilació de cdk2, DNA polimerasa α , retinoblastoma i cdc21 pot contribuir a la seva distribució intranuclear degut a l'observació que les formes fosforilades diferencialment es situen en compartiments nuclears també diferents.
- 11- La cdk2 i la ciclina A, però no la cdc2 i la ciclina B, poden estar associats activament als macrocomplexes que contenen la maquinària responsable de la replicació del DNA (complexes replitasa).

- 12-** Els hepatòcits activats a proliferar amb una hepatectomia parcial (HP) comencen a sintetitzar el DNA a les 14 hores post HP i presenten el pic de màxima síntesi a les 24 hores post HP.
- 13-** En hepatòcits activats a proliferar el pic de màxima activitat cdk4 i cdk2 es presenta a les 24 hores post HP i coincideix amb el pic de màxima síntesi de DNA.
- 14-** A la quiescència, el fetge adult conté les principals proteïnes que participen en la regulació del cicle cel·lular a diferència dels models de proliferació en cultiu cel·lular.
- 15-** Durant la proliferació hepàtica no hi ha variacions significatives en l'expressió de les principals proteïnes que participen en la regulació del cicle cel·lular.
- 16-** Durant la quiescència, la ciclina D3, la cdk4 i la p21 es localitzen en el citoplasma dels hepatòcits, contràriament de la ciclina D1 que es troba dins el nucli. A les 5 hores de regeneració les quatre proteïnes es situen a la zona de l'embolcall nuclear. A les 13 hores de regeneració totes presenten una distribució clarament intranuclear.
- 17-** Es produeixen canvis de distribució dins el nucli de les proteïnes reguladores del cicle cel·lular durant les primeres 28 hores de proliferació hepàtica. Aquests canvis són essencials per la seva activació.
- 18-** Una proteïna de 70 kDa associada a la matriu nuclear uneix p21 durant la quiescència i les 5 primeres hores de regeneració.

BIBLIOGRAFIA.

- Adams, P.D., Sellers, W.R., Sharma, S.K., Wu, A.D., Nalin, C.M., and Kaelin, W.G. (1996). Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol. Cell Biol.* **16** (12): 6623-6633.
- Afshari, C. A., Nichols, M. A., Xiong, Y., and Mudryj, M. (1997). A role for p21-E2F interaction during senescence arrest of normal human fibroblast. *Cell. Growth Differ.* **7**(8): 979-988.
- Akiyama, T., Ohuchi, T., Sumida, S., Matsumoto, K., and Toyoshima, K. (1992). Phosphorylation of the retinoblastoma protein by cdk2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**(17), 7900-7904.
- Alberts, A. S., Thorburn, A. M., Shenolikar, S., Mumby, M. C., Feramisco, J. R. (1993) Regulation of cell cycle progression and nuclear affinity of the retinoblastoma protein by protein phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**(2): 388-392.
- Albrecht, J. H., Hoffman, J. S., Kren, B. T., and Steer, C. J. (1993) Cyclin and cyclin dependent kinase 1 mRNA expression in models of regenerating liver and human liver diseases. *Am. J. Physiol.* **265**: 857-864.
- Albrecht, J. H., Meyer, A. H., and Hu, M. Y. (1997) Regulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (WAF1/Cip1/Sdi1) gene expression in hepatic regeneration. *Hepatology* **25**(3): 557-563.
- Amellem, O., Stokke, T., Sandvik, J.A., and Pettersen, E. O. (1996) The retinoblastoma gene product is reversibly dephosphorylated and bound in the nucleus in S and G2 phases during hypoxic stress. *Exp. Cell Res.* **227**(1): 106-115.
- Ando, k., Ajchenbaum-Cymbalista, F., Griffin, J. D. (1993) Regulation of G1/S transition by cyclin D2 and D3 in hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**(20): 9571-9575.
- Aprelikova, O., Xiong, Y., and Liu, E. T. (1995) Both p16 and p21 families of cyclin-dependent kinase inhibitors block the phosphorylation of cyclin-dependent kinases by the cdk-activating kinase (1995) *J. Biol. Chem.* **270**(31): 18195-18197.
- Bachs, O and Enrich, C. Regeneración hepática. Enfermedades digestivas. Ed. (en prensa).
- Bai, C., Richman, R., and Elledge, S. J. (1994) Human cyclin F. *EMBO J.* **13**(24): 6087-6098.
- Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M. J., Pagano, M., and Draetta, G. (1993) Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev.* **7**(5): 812-821.

- Baumann, K., Mandelkow, EM., Biernat, J., Piwnica-Worms, H., and Mandelkow, E. (1993) Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Lett.* **336(3)**: 417-24
- Beach, D., Durkacz, B., and Nurse, P. (1982) Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature* **300(5894)**: 706-709.
- Berezney, R., and Coffey, D. S. (1974) Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **60(4)**: 1410-1417.
- Berezney, R., and Coffey, D. S. (1975) Nuclear protein matrix: association with newly synthesized DNA. *Science* **189(4199)**: 291-293.
- Berezney, R. (1991) The nuclear matrix: a heuristic model for investigating genomic organization and function in the cell nucleus. *J. Cell Biochem.* **47(2)**: 109-123.
- Blake, M. C., and Azizkhan, J. C. (1989) Transcription factor E2F is required for the expression of the hamster dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **9(11)**: 4994-5002.
- Blenis, J. (1993) Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RKS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90(13)**: 5889-5892.
- Bohmer, R. M., Scharf, E., and Assoian, R.K. (1996) Cytoskeletal integrity is required throughout the mitogen stimulation phase of the cell cycle and mediates the anchorage dependent expression of cyclin D1. *Mol. Biol. Cell.* **7(1)**: 101-111.
- Bosser, R., Faura, M., Serratosa, J., Renau-Piqueras-J., Pruschy, M., and Bachs, O. (1995) Phosphorylation of rat liver heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2 and C can be modulated by calmodulin. *Mol. Cel. Biol.* **15(2)**: 661-670.
- Brattsand, G., Marklund, U., Nylander, K., Roos, G., and Gullberg, M. (1993). Cell-cycle regulated phosphorylation of oncoprotein 18 in Ser16, Ser25 and Ser38. *Eur. J. Biochem.* **220(2)**: 359-368.
- Braun, L., Mead, J. E., Panzica, M., Mikumo, R., Bell, G. I., and Fausto, N. (1988) Transforming growth factor beta RNA increases during liver regeneration: a possible paracrine mechanism of growth regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85(5)**: 1539-1543.
- Bresnahan, W. A., Boldogh, I., Ma, T., Albrecht, T., and Thompson, E. A. (1996) Cyclin E/Cdk2 activity is controlled by different mechanisms in the G0 and G1 phases of the cell cycle. *Cell Growth Differ.* **7(10)**: 1283-1290.
- Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J. I., Beach, D., Jacks, T., and Hannon, G. J. (1995) Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* **377(6549)**: 552-557.

- Cardoso, M., Leonhardt, H., and Nadal-Ginard, B. (1993) Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: cyclin A and cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication. *Cell* **74(6)**: 979-992.
- Carrier, F., Smith, M. L., Bae, I., Kilpatrick, K. E., Lansing, T. J., Chen, C. Y., Engelstein, M., Friend, S. H., Henner, W. D., and Gilmer, T. M. Characterization of human Gadd45, a p53-regulated protein. *J. Biol. Chem.* **269(51)**: 32672-32677.
- Castro, A., Jaumot, M., Verges, M., Agell, N., and Bachs, O. (1994) Microsomal localization of cyclin A and cdk2 in proliferating rat liver cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201(3)**: 1072-1078.
- Cavanaugh, A., Hempel, W. M., Taylor, L. J., Rogalsky, V., Todorov, G., and Rothblum, L. I. (1995) Activity of RNA polymerase I transcription factor UBF blocked by Rb gene product. *Nature* **374(6518)**: 177-180.
- Chan, A. K., Lichfield, D. W., and Wright, J. A. (1993). Phosphorylation of ribonucleotide reductase R2 protein: In vivo and in vitro evidence of a role for p34cdc2 and cdk2 protein kinase. *Biochemistry* **32**, 12835-12840.
- Chan, F. K., Zhang, J., Cheng, L., Shapiro, D. N., and Winoto, A. (1995) Identification of human and mouse p19, a novel cdk4 and cdk6 inhibitor with homology to p16ink4. *Mol. Cell. Biol.* **15(5)**: 2682-2688.
- Chen, X., Ko, L. J., Jayaraman, L., and Prives, C. (1996) p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev.* **10(19)**: 2438-2451.
- Chevalier, S., and Blow, J. (1996) Cell cycle control of replication initiation in eukaryotes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8(6)**: 815-821.
- Chin, Y. E., Kitagawa, M., Su, W. C., You, Z.H., Iwamoto, Y., and Fu, X.Y. (1996) Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1 / CIP1 mediated by STAT1. *Science* **272(5262)**: 719-722.
- Clurman, B. E., Sheaff, R. J., Thress, K., Groudine, M., Roberts, J. M. (1996) Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes Dev.* **10(16)**: 1979-1990.
- Columbano, A., and Shinozuka, H. (1996) Liver regeneration versus direct hyperplasia. *FASEB J.* **10(10)**: 1118-1128.
- Connell-Crowley, L., Harper, J. W., and Goodrich, D. W. (1997) Cyclin D1/Cdk4 regulates retinoblastoma protein-mediated cell cycle arrest by site-specific phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* **8(2)**: 287-301
- Cox, L. S. (1997) Who binds wins: competition for PCNA rings out cell-cycle changes. *Trends Cell Biol.* **7**: 492-498.

- Dalton, S. (1992) Cell cycle regulation for the human *cdc2* gene. *EMBO J.* **11(5)**: 1797-1804.
- Datto, M. B., Li, Y., Panus, J. F., Howe, D. J., Xiong, Y., and Wang, X. F. (1995) Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92(12)**: 5545-5549.
- De Bondt, H. I., Rosenblatt, J., Jankarik, J., Jones, H. D., Morgan, D. O., and Sung-Hou, K. (1993) Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* **363(6430)**: 595-602.
- DeGregory, J., Kowalik, T., and Nevins, J. R. (1995) Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis and G1/S regulatory genes. *Mol. Cell Biol.* **15(8)**: 4215-4224.
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J., and Leder, P. (1995) Mice lacking p21^{CIP1}/WAF undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* **82(4)**: 675-684.
- DePamphilis, M. L. (1993) Origins of DNA replication that function in eukaryotic cell. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5(3)**: 434-441.
- Devault, A., Martínez, A. M., Fesquet, D., Labbe, J. C., Morin, N., Tassan, J. P., Nigg, E. A., Cavadore, J. C., and Doree, M. (1995) MAT1 (menage à trois) a new RING finger protein subunit stabilizing cyclin H-cdk7 complexes in starfish and *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **14(20)**: 5027-5036.
- Diehl, A. M. and Rai, R. M. (1995) Regulation of signal transduction during liver regeneration. *FASEB J.* **10(2)**: 215-227.
- Diehl, J. A., Zindy, F., and Sherr, C. J. (1997) Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine 286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* **11(8)**: 957-972.
- Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A. Jr., Butel, J. S., Bradley, A. (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356(6366)**: 215-221.
- Dowly, S. F., Hinds, P.W., Louie, K., Reed, S. I., Arnold, A., and Weinberg, R. A. (1993) Physical interaction of the retinoblastoma protein with D type cyclins. *Cell* **73(3)**: 499-511.
- Dulic, V., Lees, E., and Reed, S. I. (1992) Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science* **257(5078)**: 1958-1961.

- Dynlacht, B. D., Flores, O., Lees, J. A., and Harlow (1994) Differential regulation of E2F transactivation by cyclin/cdk2 complexes. *Genes Dev.* **8(15)**: 1772-1786.
- Ehrenfried, J. A., Ko, T. C., Thompson, A., and Evers, B. M. (1997) Cell cycle-mediated regulation of hepatic regeneration. *Surgery* **122 (5)**: 927-935.
- Elledge, S. J. (1996) Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* **274(5293)**: 1664-1672.
- Ewen, M. E., Xing, Y. G., Lawrence, J. B., and Livingston, D. M. (1991) Molecular cloning, chromosomal mapping and expression of cDNA for p107, a retinoblastoma gene product-related protein. *Cell* **66(6)**: 1155-1164.
- Ewen, M. E., Sluss, H. K., Sherr, C. J., and Matsushime, H. (1993) Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* **73(3)**: 487-497.
- Fan, G., Xu, R., Wessendorf, M. W., Ma, X., Kren, B. T., and Steer, C. J. (1995) Modulation of retinoblastoma related proteins in regenerating rat liver and primary hepatocytes. *Cell Growth Differ.* **6(11)**: 1463-1476.
- Fang, F., and Newport, J. W. (1993) Distinct roles of cdk2 and cdc2 in RP-A phosphorylation during the cell cycle. *J. Cell Sci.* **106(3)**: 983-994.
- Fang, F., Orend, G., Watanabe, N., Hunter, T., and Ruoslahti, E. (1996) Dependence of cyclin E-cdk2 kinase activity on cell anchorage. *Science* **271(5248)**: 499-502.
- Fausto, N., Laird, A. D., and Webber, E. M. (1995) Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J.* **9(15)**: 1527-1536.
- Feaver, W. J., Svejstrup, J. Q., Henry, N. L., and Kornberg, R. D. (1994) Relationship of cdk-activating kinase and RNA polymerase II CTD kinase TFIIF/TFIIK. *Cell* **79(6)**: 1103-1109.
- Fey, E., Krochmalnic, G., Penman, S. (1986) The nonchromatin substructures of the nucleus: the ribonucleoprotein (RNP)-containing and RNP-depleted matrices analyzed by sequential fractionation and resinless section electron microscopy. *J. Cell Biol.* **102(5)**: 1654-1665.
- Fisher, R. P., and Morgan D. O. (1994) A novel cyclin associates with MO15/cdk7 to form the cdk-activating kinase. *Cell* **78(4)**: 713-724.
- Fotadar, R., Fitzgerald, P., Rousselle, T., Cannella, D., Doree, M., Messier, H., and Fotadar, A. (1996) p21 contains independent binding sites for cyclin and cdk2: both sites are required to inhibit cdk2 kinase activity. *Oncogene* **12(10)**: 2155-2164.

- Gallant, P., and Nigg, E. A. (1992) Cyclin B2 undergoes cell cycle-dependent nuclear translocation and, when expressed as a non-destructible mutant, causes mitotic arrest in HeLa cells. *J. Cell. Biol.* **117**(1): 213-224.
- Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., Nurse, P., and Maller, J. (1988) Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell* **54**(3): 433-439.
- Gavin, K. A., Hidaka, M., and Stillman (1995) Conserved initiator proteins in eukaryotes. *Science* **270**(5242): 1585-1587.
- Geng, Y., Eaton, E., Picón, M., Roberts, J. M., Lundberg, A. S., Gifford, A., Sardet, C., and Weinberg, R. A. (1996) Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene* **12**(6): 1173-1180.
- Gerhart, J., Wu, M., and Kirschner, M. (1984) Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *J. Cell Biol.* **98**(4): 1247-1255.
- Girard, F., Strausfeld, A., Fernandez, A., and Lamb, J. C. (1991) Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* **67**(6): 1169-1179.
- Glotzer, M., Murray, A. W., and Kirschner, M. W. (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**(6305): 132-138.
- Golsteyn, R. M., Schultz, S. J., Barket, J., Zieiecki, A., Ried, T., and Nigg, E. A. (1994) 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.* **107**(6): 1509-1517.
- Görlich, D. (1997) Nuclear protein import. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**: 412-419.
- Graña, X., and Reddy, P. E. (1995) Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin-dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* **11**(2): 211-219.
- Gu, Y., Turck, C. W., and Morgan, D. O. (1993) Inhibition of *cdk2* activity in vivo by an associated 20 k regulatory subunit. *Nature* **366**(6456): 707-710.
- Guadagno, T. M., and Newport, J. W. (1996) Cdk2 kinase is required for entry into mitosis as a positive regulator of *cdc2*-cyclin B kinase activity. *Cell* **84**(1): 73-82.
- Guan, K. L., Jenkins, C. W., Li, Y., Nichols, M. A., Wu, X., O'Keefe, C. L., Matera-A. G., and Xiong, Y. (1994) Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev.* **8**(24): 2939-2952.

- Guo, K., Wang, J., Andres, V., Smith, R. C., and Walsh, K. (1995) MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. *Mol. Cell Biol.* **5(7)**: 3823-3829.
- Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H., and Brent, R. (1993) Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with cdk2. *Cell* **75(4)**: 791-803.
- Hainaut, P. (1995) The tumor suppressor protein p53: a receptor to genotoxic stress that controls cell growth and survival. *Curr. Opin. Oncol.* **7(1)**: 76-82.
- Hannon, G. J., and Beach, D. (1994) P15INK4B a potential effector of TGF-beta induced cell cycle arrest. *Nature* **371(6494)**: 204.
- Hara, E., Hall, M., and Peters, G. (1997) Cdk2-dependent phosphorylation of Id2 modulates activity of E1A-related transcription factors. *EMBO J.* **16(2)**:332-342.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, and K., Elledge, S. J. (1993) The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75(4)**: 805-816.
- Harper, J. W., Elledge, S. J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L. H., Zhang, P. M., Dobrowolski, S., Bai, C., Connellcrowley, L., Swindell, E., Fox, M. P., and Wei, N. (1995) Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol. Biol. Cell* **6(4)**: 387-400.
- Hauser, P. J., Agrawal, D., Chu, B., and Pledger, W. J. p107 and p130 associated cyclin A has altered substrate specificity. (1997) *J. Biol Chem.* **272(36)**: 22954-22959.
- Herber, B., Truss, M., Beato, M., and Muller, R. (1994) Inducible regulatory elements in the human cyclin D1 promoter. *Oncogene* **9(7)**: 1295-1304.
- Hershko, A., Ganoth, D., Sudakin, V., Dahan, A., Cohen, L. H., Luca, F. C., Ruderman, J. V., and Eytan, E. (1994) Components of a system that ligates cyclin to ubiquitin and their regulation by the protein kinases cdc2. *J. Biol. Chem.* **269(7)**: 4940-4946.
- Hiebert, S. W., Lipp, M., and Nevins, J. R. (1989) E1A-dependent trans-activation of the human MYC promoter is mediated by the E2F factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86(10)**: 3594-3598.
- Higashi, H., Suzuki-Takahashi, I., Taya, Y., Segawa, K., Nishimura, S., and Kitawana, M. (1995) Differences in substrate specificity between cdk2-cyclin A and cdk2-cyclin E in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **216(2)**: 520-525.
- Higgins, G. M., and Anderson, R. M. (1931) Experimental pathology of the liver I. restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol.* **12**: 186-202.

- Hirai, H., Roussel, M. F., Kato, J. Y., Ashmun, R. A., and Sherr, C. J. (1995) Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases cdk4 and cdk6. *Mol. Cell. Biol.* **15(5)**: 2672-2681.
- Hoffmann, I., and Karseti, E. (1994) The role of CDC25 in checkpoints and feedback controls in eukaryotic cell cycle. *J. Cell Sci. Suppl.* **18**: 75-79.
- Hoffmann, F., and Livingston, D. M. (1996) Differential effects of cdk2 and cdk3 on the control of pRb and E2f function during G1 exit. *Genes Dev.* **10(7)**:851-861.
- Hollingsworth, R. E., Chen, P., and Lee, W. (1993) Integration of cell cycle control with transcriptional regulation by the retinoblastoma protein. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5(2)**: 194-200.
- Horne, M. C., Goolsby, G. L., Donaldson, K.L., Tran, D., Neubauer, M., and Wahl, A. F. (1996) Cyclin-G1 and cyclin G2 comprise a new family of cyclins with contrasting issue-specific and cell cycle-regulated expressions. *J. Biol. Chem.* **271(11)**: 6050-6061.
- Hozák, P., Hassan, B., Jackson, D. A., and Cook, P. (1993) Visualization of replication factories attached to a nucleoskeleton. *Cell* **73(2)**: 361-373.
- Hozák, P., and Cook, P. R. (1994) Replication factories. *Trends Cell Biol.* **4**: 48-51.
- Hu, B., Burkhart, R., Schulte, D., Musahl, C., and Knippers, R. (1993) The P1 family, a new class of nuclear mammalian proteins related to the yeast MCM replication proteins. *Nucleic Acids Res.* **21(23)**: 5289-5293.
- Iavarone, A., and Massagué, J. (1997) Repression of the cdk activator cdc25A and cell cycle arrest by cytokine TGF-beta in cells lacking the cdk inhibitor p15. *Nature* **387(6631)**: 417-422.
- Inabana, T., Matsushime, H., Valentine, M., Roussel, M. F., Sherr, C. J., and Lock, A. T. (1992) Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human CYL (cyclin D) genes. *Genomics* **13**: 565-574.
- Jackman, M., Firth, M., and Pines, J. (1995) Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus. *EMBO J.* **14(3)**: 1646-1654.
- Jallepalli, P. V., and Pelly, T. J. (1996) Rum 1 and cdc18 link inhibition of cyclin dependent kinase to the initiation of DNA replication in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev.* **10(5)**: 541-552.
- Jaumot, M., Graña, X., Giordano, A., Reddy, P. V., Agell, N., and Bachs, O. (1994) Cyclin/cdk2 complexes in the nucleus of HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203(3)**: 1527-1534.

Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massagué, J., and Pavletich, N. P. (1995) Mechanism of cdk activation revealed by the structure of a cyclin A-cdk2 complex. *Nature* **376(6538)**: 313-320.

Johnson, D. G. (1995) Regulation of E2F-1 gene expression by p130 and D-type cyclin kinase activity. *Oncogene* **11(9)**: 1685-1692.

Kato, J.Y., Matsuoka, M., Strom, D. K., and Sherr, C. J. (1994) Regulation of cyclin D-dependent kinase 4 (cdk4) by cdk4-activating kinase. *Mol. Cell Biol.* **4(4)**: 2713-2721.

Kaufmann, S. H., and Shaper, J. H. (1984) A subset of non-histone nuclear proteins reversibly stabilized by the sulfhydryl cross-linking reagent tetrathionate. Polypeptides of the internal nuclear matrix. *Exp. Cell Res.* **155(2)**: 477-495.

Kimura, H., Nozaki, N., and Sugimoto, K. (1994) DNA polymerase alpha associated protein P1, a murine homolog of yeast MCM3, changes its intranuclear distribution during the DNA synthetic period. *EMBO J.* **13(18)**: 4311-4320.

Kitagawa, M., Higashi, H., Suzuki-Takahashi, I., Segawa, K., Hanks, S. K., Taya, Y., Nishimura, S., and Okuyama, A. (1995) Phosphorylation of E2F-1 by cyclin A-cdk2. *Oncogene* **10(2)**, 229-236.

Kiyokawa, H., Kineman, R. D., Manova-Todorova, K. O., Soares, V. C., Hoffman, E. S., Ono, M., Khanam, D., Hayday, A. C., Frohman, L. A., and Koff, A. (1996) Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27kip1. *Cell* **85(5)**: 721-732.

Klotzbucher, A., Stewart, E., Harrison, D., and Hunt, T. (1996) The destruction box of cyclin A allows B type cyclins to be ubiquitinated, but not efficiently destroyed. *EMBO J.* **15(12)**: 3053-3064.

Knudsen, E. S., and Wang, J. Y. (1996) Differential regulation of retinoblastoma protein function by specific cdk phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* **271(14)**: 8313-8320.

Kobayashi, S., Ishiguro, K., Omori, A., Takamatsu, M., Arioka, M., Imahori, K., and Uchida, T. (1993) A cdc2-related kinase PSSALRE/cdk5 is homologous with the 30 kDa subunit of tau protein kinase II, a proline-directed protein kinase associated with microtubule. *FEBS-Lett* **335(2)**: 171-175.

Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, J., Harper, W., Elledge, S., Nishimoto, D., Morgan, D. O., Franza, B. R., and Roberts, J. M. (1992) Formation and activation of cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* **257(5077)**: 1689-1694.

- Koff, A., Ohtsuki, M., Polyak, K., Roberts, J. M., and Massague, J. (1993) Negative regulation of G1 mammalian cells: inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF- β . *Science* **260**(5107): 536-553.
- Kornbluth, S., Sebastian, B., Hunter, T., and Newport, J. (1994) Membrane localization of the kinase which phosphorylates p34cdc2 on threonine 14. *Mol. Biol. Cell* **5**(3): 273-282.
- Kretzschmar, M., Doody, J., and Massague, J. (1997) Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature* **389**(6651): 618-622
- LaBaer, J., Garrett, M.D., Stevenson, L.F., Slingerland, J. M., Sandhu, C., Chou, H.S., Fattaey, A., and Harlow, E. (1997) New functional activities for the p21 family of cdk inhibitors. *Genes Dev.* **11**(7): 847-862.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259): 680-685.
- Lam, E. W. F., and Watson, R. J. (1993) An E2F binding site mediates cell-cycle regulated repression of mouse B-myb transcription. *EMBO J.* **12**(7): 2705-2713.
- Lam, E. W. F. and La Thangue N. B. (1994) DP and E2F proteins: coordinating transcription with cell cycle progression. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**(6): 859-866.
- Leatherwood, J., López-Girona, A., and Russell, P. (1996) Interaction of cdc2 and cdc18 with a fission yeast ORC2-like protein. *Nature* **379**(6563): 360-363.
- Lee, M. G., and Nurse, P. (1987) Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control cdc2. *Nature* **327**(6117): 31-35.
- Lee, M. H., Reynisdottir, I., and Massague, J. (1995) Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev.* **9**(6): 639-49
- Leno, G. H., Downes, C. S., and Laskey, R. A. (1992) The nuclear membrane prevents replication of human G2 nuclei but not G1 nuclei in *Xenopus* egg extract. *Cell* **69**(1): 151-158.
- Levine, A. J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**: 323-331.
- Lew, D. J., Dulic, V., and Reed, S. I. (1991) Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeasts. *Cell* **66**(6): 1197-1206.
- Lew, J., Huang, Q. Q., Qi, Z., Winkfein, R.J., Aebersold, R., Hunt, T., and Wang, J. H. A. (1995) Brain-specific activator of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* **371**(6496): 423-226.

- Li, C. Y., Suardet, L., and Little, J. B. (1995) Potential role of WAF1 / Cip1 /p21 as a mediator of TGF-beta cytoinhibitory effect. *J. Biol. Chem.* **270(10)**: 4971-4974.
- Li, H., Bhattacharyya, S., and Prives, C. (1997) Cyclin-dependent kinase regulation of the replication functions of polyomavirus large T antigen. *J. Virol.* **71**: 6479-85.
- Liu, F., Stanton, J. J., Wu, Z., and Piwica-Worms, H. (1997) The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmatic reticulum and Golgi complex. *Mol. Cell Biol.* **17(2)**: 571-583.
- Lohka, M. J., Hayes, M. K., and Maller, J. L. (1988) Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85(9)**: 3009-3013.
- Loyer, P., Glaise, D., Cariou, S., Baffet, G., Meijer, L., and Guguen,-Guillouzo, C. (1994) Expression of activation of cdk's (1 and 2) and cyclins in the cell cycle progression during liver regeneration. *J. Biol. Chem.* **269(4)**: 2491-2500.
- Lu, X. P., Koch, K. S., Lew, D. J., Dulic, V., Pines, J., Reed, S. I., Hunter, T., and Leffert, J. L. (1992) Induction of cyclin mRNA and cyclin associated histone H1 kinase during liver regeneration. *J. Biol. Chem.* **267(5)**: 2841-2844.
- Lukas J., Pagano, M., Staskova, Z., Draetta, G., and Bartek, J. (1994) Cyclin D1 protein oscillates and is essential for cell cycle progression in human tumour cell lines. *Oncogene* **9(3)**: 707-718.
- Lukas, J., Parry, D., Aagaard, L., Mann, D. J., Bartkova, J., Strauss, M., Peters, G., and Bartek, J. (1995) Retinoblastoma-protein-dependent cell cycle-inhibition by the tumor supressor p16. *Nature* **375**: 503-506.
- Lukas, J., Herzinger, T., Hansen, K., Moroni, C., Resnitzky, D., Helin, K., Reed, S.I., and Bartek, J. (1997). Cyclin E-induced S phase without activation of the pRb /E2F pathway. *Genes Dev* **11(11)**:1479-1492.
- Luo, Y., Hurwitz, J., and Massagué, J. (1995) Cell-cycle inhibition by independent cdk and PCNA binding domain in p21 Cip1. *Nature* **375(6527)**: 159-161.
- Maki, C. G., and Howley, P. M. (1997) Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation. *Mol. Cell Biol.* **17(1)**: 355-363.
- Mal, A., Piotrkowski, A., and Harter, M. L. (1996) Cyclin-dependent kinases phosphorylate the adenovirus E1A protein, enhancing its ability to bind pRb and disrupt pRb-E2F complexes. *J. Virol.* **70(5)**: 2911-2921.
- Mancini, M. A., Shan, B., Nickerson, J., Penman, S., and Lee, W. (1993) The retinoblastoma gene product is a cell cycle-dependent, nuclear matrix-associated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91(1)**: 418-422.

- Massagué, J., Hata, A., and Liu, F. (1997) TGF- β signalling through the smad pathway. *Trends Cell Biol.* **7**(5):187-192.
- Matsuoka, S., Edwards, M. C., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., and Harper, J. W., Elledge, S. J. (1995) P57KIP2, a structurally distinct member of the p21 CIP1 cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev.* **9**(6): 650-62.
- Matsushime, H., Roussel, M. F., Ashmun, R. A., and Sherr, C. J. (1991) Colony stimulating factor I regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* **65**(4): 701-713.
- Matsushime, H., Ewen, M. E., Strom, D. K., Kato, J. Y., Hanks, S. K., Roussel, M. F., and Sherr, C. J. (1992) Identification and properties of an atypical catalytic subunit 8p34PSK-J13/cdk4 for mammalian D-type G1 cyclins. *Cell* **71**(2): 323-334.
- Matsushime, H., Quelle, D. E., Shurtleff, S. A., Shibuya, M., Sherr, C. J., and Kato, J. Y. (1994) D type cyclin dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* **14**(3): 2066-2076.
- Mayol, X., Graña, X., Baldi, A., Sang, N., Hu, Q., and Giordano, A. (1993) Cloning of a new member of the retinoblastoma gene family (pRb2) which binds to the E1A transforming domain. *Oncogene* **8**(9): 2561-2566.
- Mayol, X., Garriga, J., and Graña, X. (1995) Cell cycle-dependent phosphorylation of the retinoblastoma-related protein p130. *Oncogene* **11**(4): 801-808.
- Mayol, X., and Graña, X. (1997) pRb, p107 and p130 as transcriptional regulators: role in cell growth and differentiation. *Progress in Cell Cycle Research* **3**:157-169.
- Meyerson, M., Enders, G. H., Wu, C. L., Su, L. K., Gorke, C., Nelson, C., Harlow, E., and Tsai, L. H. (1992) A family of human cdc2-related protein kinases. *EMBO J.* **11**(8):2909-2917.
- Meyerson, M., and Harlow, E. (1994) Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol. Cell Biol.* **14**(3): 2077-2086.
- Michalopoulos, G. K. and DeFrances, M. C. (1997) Liver regeneration. *Science* **276**(5309): 60-66.
- Micklem, G., Rowley, A., Harwood, J., Nasmyth, K., Diffley, J. F. (1993) Yeast origin recognition complex is involved in DNA replication and transcriptional silencing. *Nature* **366**(6450): 87-89.
- Mittnacht, S., and Weinberg, R. A. (1991) G1/S phosphorylation of the retinoblastoma protein is associated with an altered affinity for the nuclear compartment. *Cell* **65**(3): 381-393.

- Moreno, S., and Nurse, P. (1990) Substrates for p34cdc2: in vivo veritas? *Cell* **61(4)**: 549-551.
- Morgan, D. O., and De Bondt, H. L. (1994) Protein kinase regulation: insights from crystal structure analysis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6(2)**: 239-246.
- Motokura, T., Keyomarsi, K., Kronenberg, H. M., and Arnold, A. (1992) Cloning and characterization of human cyclin D3, a cDNA clone closely related in sequence to PRAD1/cyclin D1 proto-oncogene. *J Biol Chem* **267(28)**: 20412-20415.
- Mourelle, M., and Rubalcava, B. (1981) Regeneration of the liver after carbon tetrachloride. Differences in adenylate cyclase and pancreatic hormone receptors. *J. Biol. Chem.* **256(4)**: 1656-1660.
- Murray, A. (1995) Cyclin ubiquitination: the destructive end of mitosis. *Cell* **81(2)**: 149-152.
- Nakamura, T., Sanokawa, R., Sasaki, Y. F., Ayusawa, D., Oishi, M., and Mori, N. (1995) Cyclin I: a new cyclin encoded by a gene isolated from human brain. *Exp Cell Res* **221(2)**: 534-542.
- Nakayasu, H., and Berezney, R. (1989) Mapping replicational sites in the eucaryotic cell nucleus. *J. Cell Biol.* **108(1)**:1-11.
- Nasheuer, H. P., Moore, A., Wahl, A. F., and Wang, T. S. (1991) Cell cycle-dependent phosphorylation of human DNA polymerase alpha. *J. Biol. Chem.* **266(12)**: 7893-7903.
- Nickerson, J., He, D., Fey, E. F., and Penman. (1990) The nuclear matrix. The eukaryotic nucleus, vol. 2. The Telford Press. pp. 763-782.
- Nigg, E. A. (1993). Cellular substrates of p34cdc2 and its companion cyclin dependent kinases. *Trends in Cell Biology* **3**: 296-301.
- Nurse, P., and Bissett, Y. (1981) Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature* **292**: 558-560.
- Ookata, K., Hisanaga, S., Okano, T., Tachibana, K., and Kishimoto, T (1992) Relocation and distinct subcellular localization of p34cdc2-cyclin B complex at meiosis reinitiation in starfish oocytes. *EMBO J.* **11(5)**: 1763-1772.
- Ohtani, K., DeGregori, J., Leone, G., Herendeen, D. R., Kelly, T. J., and Nervins, J. R. (1996) Expression of the HsOrc1 gene, a human ORC1 homolog, is regulated by cell proliferation via the E2F transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* **16(12)**: 6977-6984.

- Ohtsubo, M., and Roberts, J. M. (1993) Cyclin dependent regulation G1 in mammalian fibroblasts. *Science* **259(5103)**: 1908-1912.
- Ohtsubo, M., Theodoras, A. M., Schumacher, J., Roberts, J. M., and Pagano, M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol. Cell Biol.* **15(5)**: 2612-2624.
- Okamoto, K., and Beach, D. (1994) Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. *EMBO J.* **13(20)**: 4816-4822.
- Pagano, M., Pepperkok, F., Verde, W., Ansorge, W., and Draetta, G. (1992) Cyclin A is required in two points in the human cell cycle. *EMBO J.* **11(3)**: 961-971.
- Pagano, M., Tam, A.M., Theodoras, A.M., Beer-Romero, P., Del Sal, G., Chau, V., Yew, P.R., Draetta, G.F., and Rolfe, M. (1995). Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating amounts of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* **269(5224)**: 682-685.
- Pan, Z. Q., Amin, A. A., Gibbs, E., Niu, H., and Hurwitz, J. (1994) Phosphorylation of the p34 subunit of human single-stranded DNA -binding protein in cyclin A activated G1 extracts is catalyzed by cdk-cyclin A complex and DNA- dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91(18)**: 8343-8347.
- Pan, Z. Q., Raeardon, J. T., Li, L., Flores-Rozas, H., legerski, R., Sancar, A., and Hurwitz, J. (1995) Inhibition of nucleotide excision repair by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *J. Biol. Chem.* **270(37)**: 22008-22016.
- Panté, N., and Aebi, U. (1996) Toward the molecular dissection of protein import into nuclei. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**: 397-406.
- Pardee, A. (1974) A restriction point for control of normal animal proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 1286-1290.
- Paulovich, A. G., Toczyski, D. P., and Hartwell, L. H. (1997) When checkpoints fail. *Cell* **88(3)**: 315-321.
- Pawson, T., and Gish, G. D. (1992) SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell* **71(3)**: 359-362.
- Pearson, B. E., Nasheuer, H. P., and Wang, T. S. (1991) Human DNA polymerase alpha gene: sequences controlling expression in cycling and serum-stimulated cells. *Mol. Cell Biol.* **11(4)**: 2081-95.
- Peeper, D. S., Keblusek, P., Helin, K., Toebes, M., van der Eb, A., and Zantema, A. (1995) Phosphorylation of a specific cdk site in E2F -1 affects its electrophoretic mobility and promotes pRb-binding *in vitro*. *Oncogene* **10(1)**: 39-48.

- Peeper, D. S., Upton, T. M., Ladha, M. H., Neuman, E., Zalvide, J., Bernards, R., DeCaprio, J. A., and Ewen, M. E. (1997) Ras signalling linked to the cell-cycle machinery by the retinoblastoma protein. *Nature* **386**: 178-181.
- Peters, G. (1994) The D-type cyclins and their role in tumorigenesis. *J. Cell. Sci. Suppl.* **18**: 89-96.
- Pines, J., and Hunter, T. (1990) Human cyclin A is an adenovirus E1A associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature* **346(6286)**: 760-763.
- Pines, J., and Hunter, T. (1991) Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J. Cell Biol.* **115(1)**: 1-17.
- Pines, J and Hunter, T. (1994) The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *EMBOJ.* **13(16)**: 3772-3781.
- Polyak, K., Kato, J. Y., Solomon, M. J., Sherr, C. J., Massagué, J., Roberts, J. M., and Koff, A. (1993) p27kip1, a cyclin-cdk inhibitor, links transforming growth factor beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* **8(1)**: 9-22.
- Polyak, K., Lee, M., Erdjument, H., Koff, A., Roberts, J., temst, P., and Massagué, J. (1994) Cloning of p27kip1, a cyclin dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* **78(1)**: 59-66.
- Poon, R. Y., and Hunter, T. (1995) Dephosphorylation of cdk2 Thr160 by the cyclin-dependent kinase-interacting phosphatase KAP in the absence of cyclin. *Science* **270(5233)**: 90-93.
- Price, B. D., Hughes-Davies, L., and Park, S. J. (1995) Cdk2 kinase phosphorylates serine 315 of human p53 in vitro. *Oncogene* **11(1)**: 73-80.
- Quelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R. A., Sherr, C. J. (1995) Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* **83(6)**: 993-1000.
- Quelle, D. E., Cheng, M., Ashmun, R. A., and Sherr, C. J. (1997) Cancer-associated mutations at the INK4a locus cancel cell cycle arrest by p16INK4a but not by the alternative reading frame protein p19ARF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94(2)**: 669-673.
- Reddy, P. V., and Pardee, A. (1980) Multienzyme complex for metabolic channeling in mammalian DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77(6)**: 3312-3316.
- Reddy, P. . (1994) Cell cycle: regulatory events in G1/S transition of mammalian cells. *J. Cell. Biochem.* **54(4)**: 379-386.
- Resnitzky, D., and Reed, S. I. (1995) Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G1-to-S transition. *Mol. Cell Biol.* **15(7)**: 3463-3469.

- Resnitzky, D. (1997) Ectopic expression of cyclin D1 but not cyclin E induces anchorage-independent cell cycle progression. *Mol. Cell Biol.* **17**: 5640-5647.
- Reynisdottir, I., Polyak, K., Iavarone, A., and Massague, J. (1995) Kip/Cip and Ink4 cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF- β . *Genes Dev.* **9(15)**:1831-1845.
- Reynisdottir, I., and Massagué, J. (1997) The subcellular locations of p15(Ink4b) and p27(Kip1) coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. *Genes Dev.* **11(4)**: 492-503
- Rinaudo, J. S., and Thorgeirsson, S. S. (1997) Detection of a tyrosine phosphorylated form of cyclin A during liver regeneration. *Cell Growth Differ.* **8(3)**: 301-309.
- Rininger, J. A., Goldsworthy, T. L., and Babish, J. G. Time course comparison of cell cycle protein expression following partial hepatectomy and WY14, 643 induced hepatic cell proliferation in F344 rats. *Carcinogenesis* **18(5)**: 935-941.
- Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M. (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234(4774)**: 364-368.
- Romanowski, P., and Madine, M. (1996) Mechanisms restricting DNA replication to once per cell cycle: MCMs, pre-replicative complexes and kinases. *Trends Cell Biol.* **6**: 184-188.
- Rudner, A. D., and Murray, A. (1996) The spindle assembly checkpoint. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8(6)**: 773-780.
- Russell, P., and Nurse, P. Negative regulation of mitosis by *wee1+*, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell.* **49(4)**: 559-567.
- Saha, P., Eichbaum, Q., Silberman, E. D., Mayer, B. J., and Dutta, A. (1997) P21CIP1 and cdc25A: competition between an inhibitor and an activator of cyclin dependent kinases. *Mol. Cell Biol.* **17**: 4338-4345.
- Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R. S., Richman, R., Wu, Z., Piwnicka-Worms, H., and Elledge, S. J. (1997) Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to cdk regulation through cdc25. *Science* **277**: 1497-1501.
- Savitsky, K. (1995) A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* **268(5218)**: 1749-1753.
- Schulze, A., Zerfass, K., Spitkovsky, D., Middendorp, S., Berges, J., Helin, K., Jansen-Dürr, P., and Henglein, B. (1996) Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc. Natl. Sci. USA* **92(24)**: 11264-11268.

- Sclafani, R. A. (1996) Cyclin dependent kinase activating kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8(6)**: 788-794.
- Serrano, M., Hannon, G., and Beach, D. (1993) A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D-cdk4. *Nature* **366(6456)**: 704-706.
- Serrano, M., Lee H. W., Chin, L., Cordon-Cardo, C., and Beach, D. (1996) Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* **85(1)**: 27-37.
- Serrano, M. (1997) The tumor suppressor protein p16^{INK4a}. *Exp. Cell Res.* **237**:7-13.
- Serratos, J. (1985) Caracterización estructural y ultraestructural de la regeneración hepática en la rata. Estudio morfométrico. Tesis Doctoral, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.
- Sheaff, R. J., Groudine, M., Gordon, M., Roberts, J.M., and Clurman, B. E. (1997) Cyclin E-cdk2 is a regulator of p27kip1. *Genes. Devel.* **11(11)**: 1464-1478.
- Sherr, C., and Roberts, J. M. (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* **9(10)**: 1149-1163.
- Shim, J., Lee, H., Park, J., Kim, H., and Choi, E.J. (1996) A non enzymatic p21 protein inhibitor of stress activated protein kinase. *Nature* **381(6585)**: 804-806.
- Short, J., Brown, R. F., Husakova, A., Gilberston, J. R., Zemel, R., and Lieberman, I. (1972) Induction of deoxyribonucleic acid synthesis in the liver of the intact animal. *J. Biol. Chem.* **247(6)**: 1757-1766.
- Sicinski, P., Donaher, J. L., Parker, S. B., Li, T., Fazeli, A., Gardner, H., Haslam, S. Z., Bronson, R. T., Elledge, S. J., Weinberg, R.A. (1995) Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* **82(4)**: 621-630.
- Sidorova, J., and Breeden, L. (1993) Analysis of the SW14/SW16 protein complex, which directs G1/S-specific transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **13(2)**: 1069-1077
- Smith, E. J., Leone, G., Degregori, J., Jakoi, L., and Nevins, J. R. (1996) The accumulation of an E2F-p130 transcriptional repressor distinguishes a G0 cell state from a G1 cell state. *Mol. Cell Biol.* **16(12)**: 6965-6976.
- Solomon, M. J., Lee, T., and Kirschner, M. W. (1992) Role of phosphorylation in p34cdc2 activation; identification of an activating kinase. *Mol. Cell Biol.* **3(1)**: 13-27.
- Steer, C. J. (1995) Liver regeneration. *FASEB J.* **9(14)**: 1396-1400.
- Stewart, E., and Enoch, T. (1996) S phase and DNA damage checkpoints: a tale of two yeasts. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8(6)**: 781-787.

- Stillman, B. (1996) Cell cycle control of DNA replication. *Science* **274(5293)**: 1577-1804.
- Sweeney, K.J., Sarcevic, B., Sutherland, R. L., and Musgrove, E. A. (1997) Cyclin D2 activates cdk2 in preference to cdk4 in human breast epithelial cells. *Oncogene* **14(11)**: 1329-1340.
- Tam, S. W., Theodoras, A. M., Shay, J. W., Draetta, G. F., and Pagano, M. (1994) Differential expression and regulation of cyclin D1 protein in normal and tumor human cells: association with cdk4 is required for cyclin D1 function in G1 progression. *Oncogene* **9(9)**: 2663-2664.
- Tamura, K., Kanaoka, Y., Jinno, S., Nagata, A., Ogiso, Y., Shimizu, K., Hayakawa, T., Nojima, H., and Okayama, H. (1993) Cyclin G: a new mammalian cyclin with homology to fission yeast Cig1. *Oncogene* **8(8)**: 2113-2118.
- Tassan, J. P., Jaquenoud, P., Leopoud, P., Schultz, S. J., and Nigg, E. A. (1995) Identification of a human cyclin-dependent kinase 8, a putative protein kinase partner for cyclin C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92(19)**: 8871-8875.
- Terada, Y., Tatsuka, M., Jinno, S., and Okayama, H. (1995) Requirement for tyrosine phosphorylation of Cdk4 in G1 arrest induced by ultraviolet irradiation. *Nature* **376(6538)**: 358-362.
- Thompson, N. L., Mead, J. E., Braun, L., Goyette, Shank, P. R., and Fausto, N. (1986) Sequential proto-oncogene expression during rat liver regeneration. *Cancer Res.* **46(6)**: 3111-3117.
- Tommasi, S., and Pfeifer, G. P. (1995). In vivo structure of the human cdc2 promoter: release of a p130-E2F-4 complex from sequences immediately upstream of the transcription initiation site coincides with induction of cdc2 expression. *Mol. Cell. Biol.* **15(12)**: 6901-6913.
- Tuomikoski, T., Felix, M. A., Doree, M., and Gruenberg, J. (1989) Inhibition of endocytic vesicle fusion in vitro by the cell-cycle control protein kinase cdc2. *Nature* **342(6252)**: 942-945.
- Van der Heuvel; S., and Harlow, E. (1993) Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* **262(5142)**:2050-2054.
- Verges, M., Castro, A., Jaumot, M., Bachs, O., and Enrich, C. (1997) Cyclin A is present in the endocytic compartment of rat liver cells and increases during liver regeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230(1)**: 49-53.
- Voitenleitner, C., Fanning, E., and Nasheuer, H. P.(1997) Phosphorylation of DNA polymerase alpha-primase by cyclin A-dependent kinases regulates initiation of DNA replication in vitro. *Oncogene*.**14 (13)**: 1611-1615.

- Waskiewicz, A. J., and Cooper, J. A. (1995) Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7(6)**: 798-805.
- Webber, E. M., Wu, J. C., Wang, L., Merlino, G., and Fausto, N. (1994) Overexpression of transforming growth factor alfa causes liver enlargement and increased hepatocyte proliferation in transgenic mice. *Am. J. Pathol.* **145(2)**: 398-408.
- Weintraub, S. J., Prater, C. A., and Dean, D. C. (1992) Retinoblastoma protein switches the E2F from positive to negative element. *Nature* **358(6383)**: 259-261.
- Wheater, P. R., Burkitt, H. G., and Daniels, V. G. (1980) *Histologia funcional*. Editorial Jims, Barcelona.
- White, R. J., Trouche, D., Martin, K., Jackson, S. P., and Kouzarides, T. Repression of RNA polymerase III transcription by the retinoblastoma protein. *Nature* **386(6586)**: 88-90.
- Wimmel, A., Lucibello, F. C., Sewing, A., Adolph, S., and Muller, R. Inducible acceleration of G1 progression through tetracyclin-regulated expression of human cyclin E. *Oncogene* **9(3)**: 995-997.
- Wu, H., Wade, M., Krall, L., Grisham, J., Xiong, Y., and Van Dyke (1996) Targeted in vivo expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 halts hepatocyte cell cycle. *Genes Dev.* **10(3)**: 245-260.
- Xiong, Y., Menninger, J., Beach, D., and Ward, D. C. (1992) Molecular cloning and chromosomal mapping of CCND genes encoding human D-type cyclins. *Genomics* **13(3)**: 575-584.
- Xiong, Y., Hannon, G., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. (1993) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366(6456)**: 701-704.
- Xu, M., Sheppard, K. A., Peng, C. Y., Yee, A. S., and Piwnica, W. H. (1994) Cyclin A-cdk2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1-DP1 by phosphorylation. *Mol. Cell Biol.* **14(12)**: 8420-8431.
- Yamada, Y., Kirillova, I., Peschon, J. J., and Fausto, N. (1997) Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94(4)**: 1441-1446.
- Yamaguchi, M., Hayashi, Y., and Matsukage, A. (1995) Essential role of E2F recognition sites in regulation of the proliferating cell nuclear antigen gene promoter during Drosophila development. *J. Bio. Chem* **270(42)**: 25159-25165.
- Yin, Y., Tainsky, M. A., Bischoff, F. Z., Strong, L. C., and Wahl, G. M. (1992) Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell* **70(6)**: 937-948.

- Zarkowska, T., and Mittnacht, S... (1997) Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G1/S cyclin-dependent kinases. *J. Biol. Chem.* **272(19)**: 12738-12746.
- Zeng, Y. X., and Deiry, W. S. (1996) Regulation of p21WAF1 / CIP1 expression by p53-independent pathways. *Oncogene* **12(7)**: 1557-1564.
- Zetterberg, A., Larsson, O., and Wima, K. G. (1995) What is the restriction point? *Curr. Opin. Cell Biol.* **7(6)**: 835-842.
- Zhang, H., Xiong, Y., and Beach, D. (1993) Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol. Biol. Cell.* **4(9)**: 897-906.
- Zhang, H., Hannon, G. J., and Beach, D. (1994) p21 containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev.* **8(15)**: 1750-1758.
- Zhu, X., Ohtsubo, M., Bihmer, R.M., Roberts, J.M., and Assoian, R.K. (1996) Adhesion dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D1, activation of cyclin E-cdk2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein. *J. Cell Biol.* **133(2)**: 391-403.
- Ziebold, U., Bartsch, O., Marais, R., Ferrari, S., and Klemmner, K. H. (1997) Phosphorylation and activation of B-Myc by cyclin A-cdk2. *Curr. Biol.* **7(4)**: 253-260.