

# 1. Índice



<b>1. Índice</b>	<b>1</b>
<b>2. Resumen</b>	<b>7</b>
<b>3. Introducción</b>	<b>11</b>
3.1. El ciclo celular	<b>13</b>
3.2. Control molecular del ciclo celular en mamíferos	<b>14</b>
3.2.1. Quinasas dependientes de ciclina (Cdks)	<b>15</b>
3.2.2. Ciclinas	<b>18</b>
3.3. Regulación de la actividad de las Cdks	<b>18</b>
3.3.1. Asociación con ciclinas	<b>20</b>
3.3.2. Interacciones con moléculas inhibitorias	<b>21</b>
3.3.3. Fosforilaciones activadoras	<b>23</b>
3.3.4. Fosforilaciones inhibitorias	<b>24</b>
3.4. Eventos moleculares durante el ciclo celular	<b>24</b>
3.4.1. Regulación de la re-entrada en ciclo y progresión a través de fase G1	<b>25</b>
3.4.2. Transición G1/S	<b>26</b>
3.4.3. La fase S del ciclo, la transición G2/M y la mitosis	<b>28</b>
3.5. Programa transcripcional del ciclo celular	<b>30</b>
3.6. Análisis genético del ciclo celular	<b>32</b>
3.6.1. Modelos KO de Cdk4	<b>33</b>
3.6.2. Modelos KO de Cdk6	<b>34</b>
3.6.3. Modelos KO de Cdk4 y Cdk6	<b>34</b>
3.6.4. Modelos KO de Cdk2	<b>35</b>
3.6.5. Modelos KO de Cdk2 y Cdk6	<b>36</b>
3.7. Alteraciones en la fase G1 y en la transición G1/S en cáncer	<b>36</b>
<b>4. Objetivos</b>	<b>41</b>
<b>5. Materiales y Métodos</b>	<b>45</b>
5.1. Experimentos in vivo	<b>47</b>
5.1.1. Mantenimiento y genotipaje de los ratones	<b>47</b>
5.1.2. Tratamiento con 4-Hidroxitamoxifeno (4-OHT)	<b>48</b>
5.1.3. Infecciones con adenovirus	<b>49</b>
5.1.4. Medición de los niveles de glucosa en sangre	<b>49</b>
5.1.5. Histopatología e inmunohistoquímica	<b>49</b>
5.1.6. Análisis de los precursores hematopoyéticos	<b>49</b>
5.1.7. Análisis de las poblaciones hematopoyéticas maduras	<b>50</b>
5.1.8. Ensayos de regeneración hepática	<b>51</b>
5.1.9. Ensayos de cicatrización de heridas	<b>52</b>

5.2. Experimentos in vitro	52
5.2.1. Preparación de fibroblastos embrionarios murinos y condiciones de cultivo	52
5.2.2. Entrada en fase S	53
5.2.3. Análisis de perfiles de expresión génica	53
5.2.4. PCRs convencionales	53
5.2.5. Extracción de ADN y proteínas	54
5.2.6. Análisis de ADN genómico por southern blot	54
5.2.7. Análisis de proteínas	55
<b>6. Resultados</b>	<b>57</b>
6.1. Determinación de los perfiles transcripcionales de fibroblastos embrionarios murinos	59
6.2. Generación de animales defectivos en Cdk4 y Cdk2	67
6.2.1. Generación de animales deficientes en Cdk4 y Cdk2	67
6.2.2. Caracterización fenotípica de los animales doble mutantes para Cdk4 y Cdk2	70
6.2.3. Estudio histológico de los animales doble KO para Cdk4 y Cdk2	74
6.2.4. Estudio de la proliferación y muerte celular en animales doble KO para Cdk4 y Cdk2	77
6.2.5. Caracterización bioquímica de los reguladores de ciclo celular en animales doble KO de Cdk4 y Cdk2	80
6.2.6. Estudio de la hematopoyesis adulta en los animales doble KO Cdk4 y Cdk2.	81
6.2.7. Regeneración hepática en ausencia de Cdk4 y Cdk2	84
6.2.8. Ensayos de cicatrización de heridas en ausencia de Cdk4 y Cdk2	89
6.3. Generación de animales deficientes en Cdk4, Cdk6 y Cdk2	91
6.3.1. Caracterización de animales deficientes en Cdk4, Cdk6 y Cdk2. Hepatectomías parciales	92
<b>7. Discusión</b>	<b>95</b>
7.1. Hacia un nuevo modelo del ciclo celular	97
7.2. Animales doble KO para Cdk2 y Cdk6	99
7.3. Animales doble KO para Cdk4 y Cdk6	99
7.4. Animales doble KO para Cdk2 y Cdk4	101
7.4.1. Cdk2 y Cdk4 resultan dispensables durante la vida adulta del ratón	102

7.4.2. Cdk4 y Cdk2 resultan dispensables para la proliferación celular en animales adultos	104
7.4.3. Los niveles de reguladores de ciclo celular permanecen inalterados en ausencia de Cdk4 y Cdk2	105
7.4.4 Estudio de la hematopoyesis adulta en los animales doble KO para Cdk4 y Cdk2	105
7.4.5. Los hepatocitos adultos son capaces de entrar en división y proliferar normalmente en ausencia de Cdk4 y Cdk2	106
7.4.6. Los queratinocitos deficientes en Cdk4 y Cdk2 también son capaces de proliferar bajo condiciones de estrés celular	107
7.4.7. Animales doble KO clásicos para Cdk4 y Cdk2	108
7.5. Animales triples KO para Cdk2, Cdk4 y Cdk6 y animales KO sencillos para Cdk1. De vuelta al ciclo celular de levaduras.	109
7.6. Las Cdk como dianas terapéuticas en los procesos neoplásicos	113
<b>8. Conclusiones</b>	<b>117</b>
<b>9. Bibliografía</b>	<b>121</b>
<b>10. Anexo</b>	<b>141</b>



## **2. Resumen**





During the last ten years our view of mammalian cell cycle has been challenged by the generation of genetically modified mice where specific deleterious mutations were inserted in the loci of some of the most well known and studied regulators of this complex process. Single KO mice for interphase Cdk have shown that with the exception of specialized cell types, mammalian cell cycle can be completed without almost any obvious defect. For example, Cdk4 KO mice are viable, yet they are partially sterile, in the case of female mice, and completely sterile, in the case of male animals. This is due to a proliferative defect in pituitary lactotrophs. Cdk4 mice die because of insulin-dependent diabetes, caused by a post-natally proliferative defect in  $\beta$  cells. Despite these two obvious phenotypes, and together with a reduced body size, Cdk4 KO mice show normal organogenesis.

It was argued that Cdks might play compensational roles between them. In order to determine whether this is the case or not, our lab has generated double KO animals for all of the interphase Cdks. Cdk2/6 double KO mice develop no additional defects than those shown by Cdk2 and Cdk6 single KO animals, meaning that these two Cdks do not play compensational roles. Deficiency of Cdk4 and Cdk6 results in embryonic lethality and Cdk4/6 null embryos die during midgestation, around E17.5, due to severe anemia caused by hematopoietic defects in the erythroid lineage. However, these animals are able to reach this stage of development with no dramatic phenotype and organogenesis seems to be normal.

The first aim of the work described in this thesis was to provide an analysis of the E2F-dependent transcriptional program in the presence or the absence of Cdk4 and Cdk6. We analyzed global gene expression using cDNA microarrays technology comparing transcriptional profiles of primary Wt and Cdk4<sup>-/-</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup> murine embryonic fibroblasts (MEFs) synchronized in G0 by serum starvation and then released of the cell cycle arrest by addition of fresh media with serum. Comparisons at various time points showed no statistical differences over the background signal detected in each hybridization. Only Cdk4 and Cdk6 were consistently down-regulated in double KO MEFs. Also, comparisons between Wt MEFs at time 0h. and the rest of time points did let us study the transcriptional changes that take place during cell cycle progression. In this case we founded a number of genes up- and down-regulated with statistical significance that correlated with what has been previously reported by other laboratories. According to these data and other experimental evidences obtained by other members of our lab, we were able to show that there is almost no alteration of Rb phosphorylation in the absence of Cdk4 and Cdk6 (being Cdk2 the kinase that compensates the lack of these two proteins), thus no alteration on the Rb dependent-transcriptional program of the cell.

The second aim of the thesis was the generation and characterization of a Cdk2 and Cdk4 double KO mouse model in order to study the role of these two kinases in adult animals and to establish any possible compensation between them. This model consists of a Cdk2 conditional KO animal using the Cre/loxP system in a Cdk4 null background. Upon Cre activation, using 4-hydroxytamoxifen during a 4 month-long treatment, there is almost 100% of recombination of the Cdk2 lox allele in most tissues of these animals. These mice are viable and show no additional phenotype other than those shown by single Cdk4 KO mice. Despite the lack of the two kinases most tissues show normal cellular architecture. Proliferation levels are normal and no increase in apoptosis is detected. What is more, hematopoietic tissues, which rely heavily on cell proliferation, are normal and no abnormalities are detected in any cell lineage, either precursor or mature hematopoietic population. Double KO animals were subjected to partial hepatectomy were able to regenerate mass liver as Wt animals, albeit a 24 hour delay. Southern analysis of hepatic tissue taken during surgery and at time of sacrifice showed that liver regeneration occurs from double KO hepatocytes. A similar assay done on skin, a wound-healing assay, showed similar results.

Taking together all the data, it suggests that adult mice can thrive in the absence of Cdk2 and Cdk4. Interestingly, Cdk2/4 classical double KO animals died during late gestation (some are able to reach P1) due to cardiac failure. Cardiomyocytes are unable to proliferate and ventricular walls are thinner compared to Wt littermates. No other defects were founded and in the rest of tissues organogenesis was normal.

It seems that in the absence of one or two interphase Cdks, mammalian cell cycle can take place without any major alterations. To ascertain if cell cycle can take place without any of the interphase Cdk, it is also reported in this work (as a third aim) the preliminary data obtained from Cdk4 conditional KO animals in a Cdk2/6 null background. In this case in order to conditionally ablate the Cdk4 allele we have used the Flipase/frt system. Animals infected via vein tail either with AdenoFlipase or with AdenoGFPe and subjected to partial hepatectomy are able to completely regenerate mass liver. The analysis of the hepatocyte population from AdFlpe-infected animals showed that up to 90% of the cells that regenerated the livers were triple KO for Cdk2, Cdk4 and Cdk6, thus in the absence of any of the interphase Cdks, cells are able to divide and to carry on with the cell cycle.

# **3. Introducción**

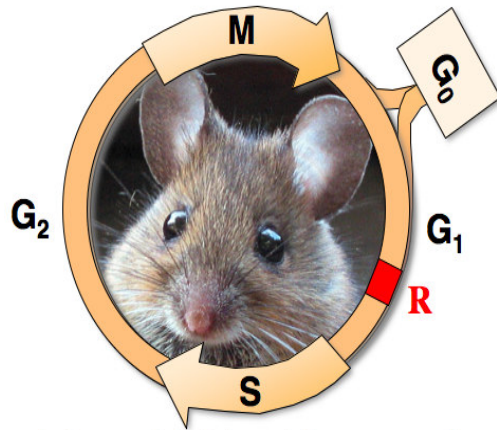


### 3.1. El ciclo celular

El ciclo celular reúne a todo un conjunto de procesos moleculares que llevan por misión última la división de la célula en dos células hijas, idénticas genéticamente entre sí e iguales en los mismos términos a la célula a partir de la cual provienen. En células eucariotas el ciclo celular consiste en la progresión a través de diferentes etapas, progresión siempre ordenada, que culminarán en la división celular anteriormente mencionada (Norbury y Nurse, 1992). Uno de los principales objetivos que persigue la célula en división es la replicación exacta de su material genético para llevar a cabo el posterior reparto de éste entre las dos células hijas que se van a originar. Estos dos hechos, definen las dos principales fases en las que se ordena el ciclo celular: las fases S y M. A lo largo de la fase S o fase de Síntesis se produce la replicación del material genético, replicación que sólo se produce una única vez durante cada ciclo. Posteriormente, en la fase M o fase de Mitosis se reparte el material cromosómico replicado entre las dos células hijas a través de un proceso que culmina con la división citoplasmática o citocinesis. En consecuencia, cada una de las células hijas recién generadas recibirá una única copia del material cromosómico completo. Entre estos dos eventos claves encontramos unas fases de preparación denominadas fase G1 (de Gap 1) y fase G2 (de Gap2). Más concretamente, la fase G1 antecede a S y la G2 se sitúa entre S y M. Los objetivos de estas 2 fases consisten en: 1) el aumento del tamaño celular, 2) revisión del estado y de las condiciones del entorno y que éstas sean adecuadas para que el ciclo progrese y 3) asegurarse que los eventos que han tenido lugar hasta ese momento se han completado correctamente (Hartwell y Weinert, 1989; Losick y Shapiro, 1993) y, así, poder proceder hacia la siguiente fase del ciclo. En los organismos superiores adultos, la mayoría de sus células no se encuentran en proceso de división. Más bien se encuentran en un estado de reposo denominado estado de quiescencia del que sólo saldrán en caso de recibir alguna señal molecular específica que les obligue a ello. El estado de quiescencia también se denomina fase G0 (Fig.1).

Una de las principales decisiones que toda célula en estado de quiescencia y a la que lleguen señales que promuevan la división celular debe adoptar es la conveniencia o no de la reentrada en el ciclo celular. Ésta es una capacidad que poseen las células en fase G0 de un organismo adulto. Tan sólo aquellas células que hayan alcanzado un estado de diferenciación terminal no serán capaces de realizar la re-entrada en el ciclo, a menos que sufran un proceso de desdiferenciación, como por ejemplo en un proceso neoplásico. Son varios los factores que la célula ha de tener en

cuenta antes de “tomar una decisión” en un sentido u otro. Las condiciones extracelulares como la disponibilidad de nutrientes, presencia de factores de crecimiento y demás señales mitogénicas son las que marcarán el destino de la célula en la fase G1 (Malumbres y Barbacid, 2001).



**Figura 1. Fases del ciclo celular en mamíferos. R: punto de restricción.**

El análisis de la dependencia celular de factores de crecimiento externos en las etapas más tempranas de la fase G1 dio lugar al desarrollo del concepto de “punto de restricción o punto R”, como aquel punto en la fase G1 a partir del cual la célula deja de ser dependiente de las señales mitogénicas para su división y se ve avocada a completar al menos

el ciclo en el que se encuentra presente (Pardee, 1974). Una vez sobrepasado el punto R, las células se ven comprometidas a entrar en fase S, duplicar su material cromosómico y proseguir a través de G2 y de M, con independencia de factores externos. No obstante, y debido a lo delicado de todo el proceso, a lo largo de varias de las fases del ciclo celular (G1, G2 y M, principalmente) se encuentran repartidos varios puntos de control o “checkpoints” (Hartwell y Weinert, 1989) donde la célula, en caso de ser detectado algún fallo en alguno de los procesos moleculares llevados a cabo hasta el momento, puede detener su avance a través de la fase en la que se encuentre y en el momento en que el fallo quede resuelto, podrá proseguir dicho avance hacia la siguiente fase del ciclo. En caso de que el fallo no pueda ser reparado y resulte fatal para la viabilidad de la célula, ésta puede optar por entrar en un proceso de muerte celular programada o apoptosis.

### 3.2. Control molecular del ciclo celular en mamíferos

De los hechos arriba mencionados queda claro la necesidad de los organismos eucariotas de disponer de una serie de mecanismos moleculares que controlen en todo momento el paso a través de cada una de las etapas del ciclo celular y la transición de una fase a otra y que aseguren el éxito de todo este proceso.

La progresión ordenada a través de las sucesivas fases del ciclo vienen controladas a un nivel fundamental por una familia de proteínas serín-treonín quinasas denominadas Cdk (por Cyclin-dependent kinases). Estas Cdk constituyen la subunidad catalítica de un complejo heterodimérico (Sherr y Roberts, 2004; Malumbres y Barbacid, 2005) cuya subunidad reguladora la constituyen una familia de proteínas cuyos niveles de expresión fluctúan a lo largo de las distintas etapas del ciclo y que por ello se han denominado Ciclinas (Sherr y Roberts, 2004; Malumbres y Barbacid, 2005). Gracias a las variaciones en los niveles de expresión de las ciclinas, se va a conseguir una activación secuencial de cada uno de los complejos heterodiméricos Cdk-Ciclina, base fundamental del control en el ciclo celular.

Los últimos estudios del genoma de humanos y ratón han permitido identificar la presencia de 11 genes que codifican para proteínas Cdk (Cdk1-11) y otros 9 que codifican para proteínas similares a Cdk (PCTAIRE,1, 2 y 3, PFTAIRE 1 y 2, PITSLRE, CCRK, CHED, CRK7) (Malumbres y Barbacid, 2005). Igualmente se han descrito hasta 29 genes en el genoma humano que codifican para proteínas del tipo Ciclinas (Ciclinas A1 y A2, B1, B2 y B3, D1, D2, y D3, E1, y E2, C, F, G1 y G2, H, I, J, K, L1 y L2, M1, M2, M3 y M4, O, T1 y T2, Cables 1 y 2) (Malumbres y Barbacid, 2005). A pesar del elevado número de Cdk y ciclinas encontradas tan sólo un número reducido de estos complejos realizan una función conocida en el control de ciclo celular.

### 3.2.1. Quinasas dependientes de ciclinas (Cdk)

El primer miembro identificado en la familia de las Cdk se corresponde con Cdk1. Esta proteína fue descrita en el transcurso de unos ensayos de cribado genético empleando *Schizosaccharomyces pombe* y *Schizosaccharomyces cerevisiae*. La proteína en cuestión fue denominada Cdc2 en el caso de *S. pombe* y Cdc28 en el caso de *S. cerevisiae* (Lee y Nurse, 1987;

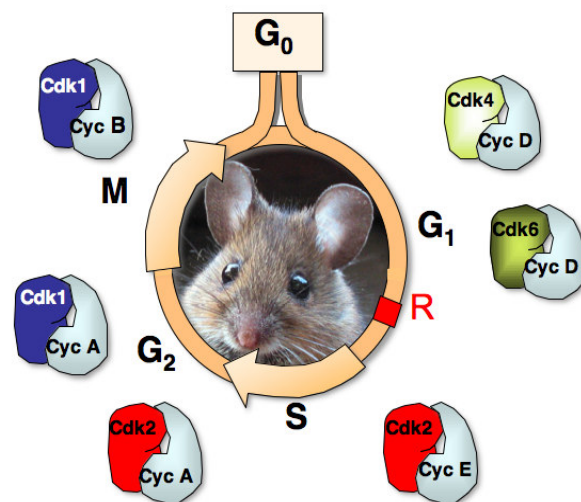


Figura 2. Complejos Cdk/Ciclina directamente implicados en la regulación del ciclo celular.

Draetta et al., 1987). Posteriormente y durante el transcurso del simposio de Ciclo Celular en Cold Spring Harbor Laboratories en 1991 se creó la nomenclatura Cdk y Cdc2 y Cdc28 pasaron a denominarse Cdk1. De la lista expuesta en el apartado

anterior de Cdks existentes tan sólo se ha descrito un papel específico en el control del ciclo celular para Cdk1, 2, 3, 4 y 6 (Fig.2).

Existen un alto número de ensayos cristalográficos que han logrado describir de manera muy precisa la estructura tridimensional de la quinasa Cdk2 en humanos. Los distintos miembro de la familia Cdk poseen una alta homología de secuencia (35-65%) con respecto a Cdk1. Así pues, los datos de Cdk2 deben de ser relativamente extrapolables a otras Cdks (De Bondt et al., 1993; Morgan, 1996). Como le sucede a la mayoría de las quinasas, Cdk2 presenta en su estructura un pequeño lóbulo N-terminal que posee una estructura en lámina  $\beta$  y el dominio PSTAIRE (dominio de unión a las ciclinas y conservado en todas las Cdks de los distintos organismos) con una estructura de  $\alpha$  hélice, y un lóbulo C-terminal de mayor tamaño donde predomina esencialmente la conformación helicoidal (Fig.3).

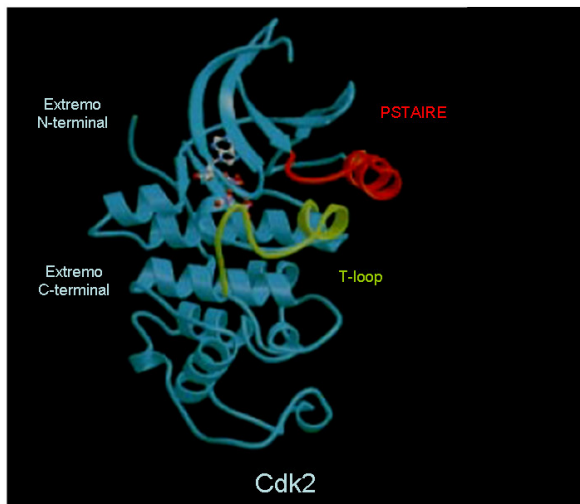


Figura 3. Estructura tridimensional de Cdk2 (modificado de Pavletich, 1999).

El ATP encajará en el surco delimitado por ambos lóbulos, con su base hidrofóbica dirigida hacia el interior de la hendidura, y los grupos fosfatos orientados hacia la apertura de la cavidad. En su conformación activa, la proteína sustrato se posiciona en la superficie del lóbulo, perfectamente enfrentada al grupo  $\gamma$ -fosfato del ATP. Finalmente, distintos residuos del centro catalítico entre los que destaca el Asp<sup>145</sup> de Cdk2 y

que se encuentra conservado en todas las Cdks (Meyerson et al., 1992; Hanks et al., 1988), dirigen el ataque nucleofílico del grupo OH de la proteína sustrato sobre el fosfato  $\gamma$  del ATP. En un estado conformacionalmente inactivo de las Cdk, el bloqueo de la proteína sustrato al ATP, mediado por una estructura flexible llamada T-loop que emerge del lóbulo C-terminal, así como el incorrecto alineamiento de los grupos fosfatos del ATP (por el posicionamiento del dominio PSTAIRE), impiden que se produzca de forma eficiente la reacción de fosfotransferencia.

Como ya hemos mencionado, las Cdks, en conjunción con su ciclina correspondiente, actúan como los “motores” moleculares del ciclo celular. Adicionalmente, ciertas Cdks actúan como sensores intracelulares encargados de integrar las señales que recibirá del medio externo la célula con la maquinaria de



control del ciclo celular. De esta manera, Cdk4 y Cdk6 unidas a las ciclinas D1, D2 y D3 (Fig. 2.), ejercen de eslabón entre las señales mitogénicas y la maquinaria del ciclo celular durante las fases tempranas de G1. Cabe resaltar que mientras que Cdk4 es de expresión más ubicua, Cdk6 se expresa principalmente en los compartimentos hematopoyéticos (Malumbres y Barbacid, 2005). A continuación, los complejos Cdk2/Ciclina E1 o E2, se activan durante las fases tardías de G1, en la transición G1/S. Una vez alcanzada la fase S, se va a producir una rápida degradación de las ciclinas E y Cdk2 pasara a asociarse a las ciclinas A1 y A2. El paso a través de G2 y de M estará encargado, primero, de Cdk1 asociado a las ciclinas A1 y A2 y, posteriormente, a las ciclinas B1 y B2. Ciclina B3 posee propiedades intermedias entre las ciclinas A y las

ciclina B (Nieduszynski et al., 2002) y se compleja con Cdk2 (Nguyen et al, 2002) (Fig.4). Finalmente, Cdk3 parece que interviene, unida a ciclina C en la salida de G0 para la re-entrada en el ciclo celular en células humanas (Ren y Rollins, 2004). Sin

embargo, la mayoría de las cepas murinas de laboratorio portan una mutación espontánea que introduce un codón de Stop prematuro en la posición 187. Esta mutación genera una proteína truncada que carece de, al menos, un tercio del dominio quinasa funcional y que, presumiblemente, torna a la proteína en inactiva (Ye et al, 2001).

El resto de Cdks descritas en este apartado (Cdk5, 7, 8, 9, 10 y 11) no están caracterizadas del todo de manera detallada y su posible papel como reguladores directos del ciclo celular aún está por ser establecido. Cdk5 se activa uniéndose a p35 y p39, proteínas cuyo papel ha quedado extensamente descrito en cerebro (Kesavapany et al, 2004; Cruz y Tsai, 2004) aunque su expresión puede extenderse a otros tejidos como páncreas, corazón y gónadas (Rosales y Lee, 2006), y parece que regula diversos aspectos de la actividad cerebral (como la función neuronal y la transmisión sináptica). Cdk7, asociada a y activada por la ciclina H, forma junto a Mat1 el complejo denominado CAK (por Cdk Activating Kinase) encargado de regular

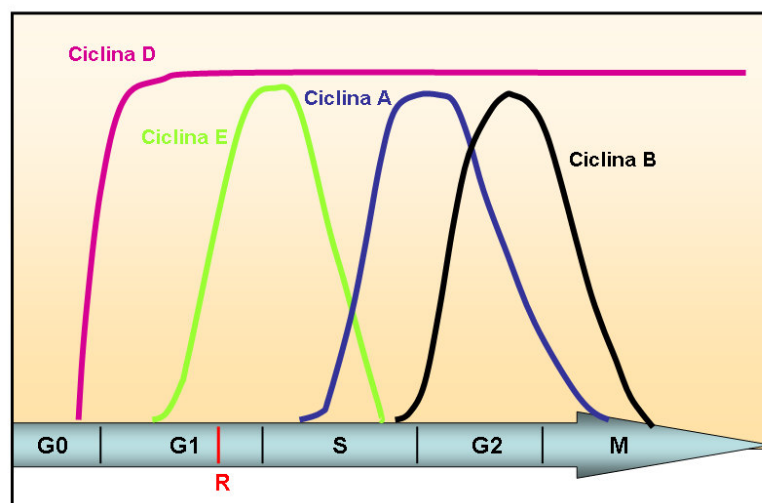


Figura 4. Expresión de las ciclinas involucradas en la regulación de las distintas fases del ciclo celular. R: Punto de Restricción.

positivamente la actividad de las Cdks que intervienen en el ciclo celular. Adicionalmente, el complejo CAK forma parte del factor de transcripción TFIIF. Los complejos Cdk8/ciclina C y Cdk9/Ciclina T también intervienen en la regulación de la transcripción por medio de la fosforilación del dominio C-terminal de la subunidad mayor de la RNA polimerasa II (Akoulitchev et al., 2000). Cdk8/ciclina C también regula la actividad del complejo CAK por medio de fosforilaciones inhibitorias. Adicionalmente, se ha observado que Cdk9 puede fosforilar a pRb aunque la relevancia de esta fosforilación aún debe ser estudiada con más detalle. No se ha logrado todavía identificar una ciclina “compañera” de Cdk10, aun así se ha establecido un posible rol de esta Cdk en la regulación de Cdk1. Cdk 11 asociada a ciclina L interviene en la producción de transcritos de RNA y su posterior procesado (Loyer et al., 2005).

### **3.2.2. Ciclinas**

Las ciclinas consisten en una familia de proteínas de peso molecular comprendido entre los 30 y 90 KD, capaces, como hemos visto en el apartado anterior de interaccionar y de activar una o más Cdks y cuya síntesis y degradación siguen un patrón cíclico a lo largo de los sucesivos ciclos de división celular (Sherr, 1996; ver figura de síntesis y degradación de ciclinas del ciclo celular). Las ciclinas también juegan un papel esencial pues son las encargadas de conferir la especificidad de sustrato a las Cdks. La mayor homología de secuencia entre las distintas ciclinas se sitúa en una región de 150 aminoácidos, aproximadamente, y conocida como cyclin box, necesaria para la unión a las Cdks (Kobayashi et al., 1992; Lee y Harlow, 1993; Malumbres y Barbacid, 2005). Se ha logrado determinar la estructura cristalográfica de una forma truncada de ciclina A. En dicha forma truncada se eliminaron 170 aminoácidos del extremo N-terminal a fin de simplificar el dominio de unión a las Cdks (Brown et al., 1995; Jeffrey et al, 1995). La estructura consiste en un par de dominios centrales (que constituyen el cyclin box), muy compactos de 5  $\alpha$  hélices cada uno, flanqueados, en las posiciones N- y C-terminales, por regiones cortas de estructura helicoidal. Mientras que la presencia de los dominios del cyclin box es una constante entre las diversas ciclinas, la estructura y posición de las regiones flanqueantes varían más a menudo entre las diferentes proteínas.

### **3.3. Regulación de la actividad de las Cdks**

Como ya hemos descrito en los apartados anteriores la activación de las Cdks viene dada por la unión a las ciclinas correspondientes. Sin embargo, la actividad de

estos complejos viene regulada por éste y otros mecanismos adicionales que vamos a resumir a continuación.

Son dos los principales grupos de mecanismos importantes que encontramos en la regulación de la actividad de las proteínas Cdk: 1) Interacciones proteína-proteína (asociación con las ciclinas y la unión a proteínas u otras moléculas inhibitoras) y 2) Modificaciones post-traduccionales (fosforilaciones activadoras y fosforilaciones inhibitoras). Al hablar de las interacciones Cdk/ciclina hemos de tener en cuenta que un mecanismo muy importante de regulación de la actividad Cdk consiste en la disponibilidad de las ciclinas y por ello los ciclos de síntesis y degradación de ciclinas son de vital importancia a la hora de controlar la actividad enzimática de la Cdk (Fig 5).

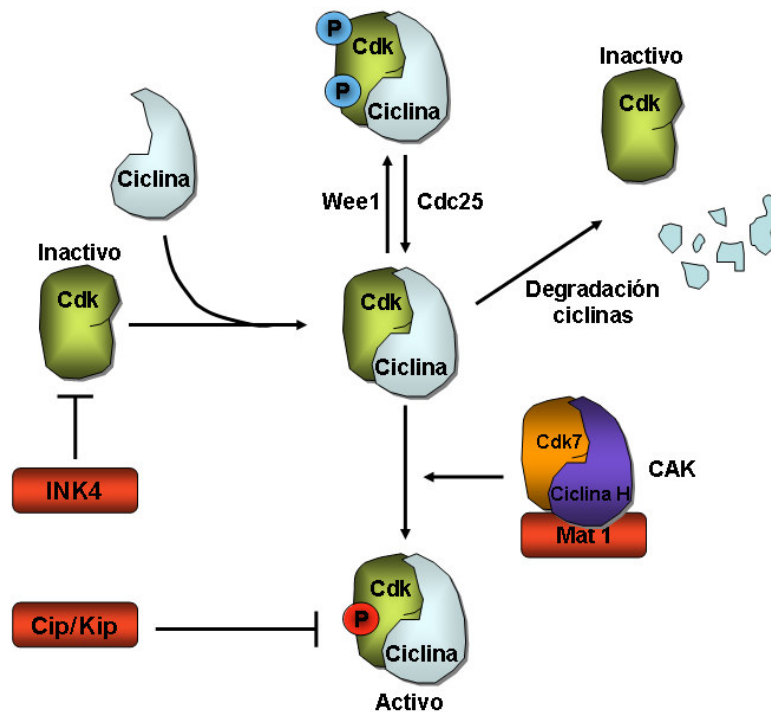
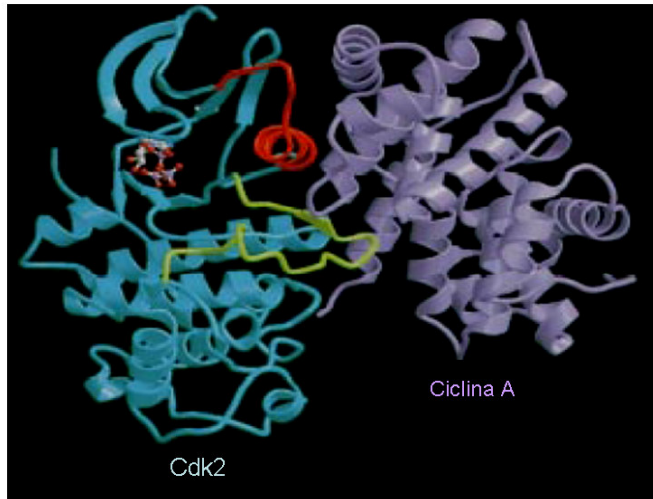


Figura 5. Principales mecanismos de regulación de la actividad de los complejos Cdk/ciclina.

Fuera de estos dos grupos hemos dejado otros aspectos como la transcripción y degradación de las Cdk, la localización subcelular de los complejos Cdk/ciclina, entre otros. De hecho, actualmente se están descubriendo evidencias cada vez mayores de nuevos niveles de regulación de la expresión génica de los componentes del ciclo celular como por ejemplo la regulación de la transcripción de Cdk6 a través de micro ARNs de interferencia o ARNm. Más concretamente, la familia miR-16 tiene entre sus dianas transcripcionales a Cdk6 y experimentos en los que se ha sobreexpresado ARNm pertenecientes a esta familia han provocado un descenso en

los niveles de esta Cdk y acumulación en G0/G1 en diversas líneas tumorales (Carleton et al., 2007). Veamos ahora, uno por uno, los mecanismos enumerados anteriormente:

### 3.3.1. Asociación con ciclinas



**Figura 6. Estructura tridimensional de los dímeros Cdk2/Ciclina A (modificado de Pavletich, 1999)**

Los estudios de la estructura tridimensional de los complejos Cdk2/ciclina A han logrado aclarar en muchos aspectos cuáles son los cambios estructurales que se producen en la subunidad catalítica del complejo tras unirse a su subunidad reguladora y cómo éstos contribuyen a la activación del conjunto heterodimérico (Fig.

6). Los principales cambios se producen tanto en el dominio PSTAIRE de Cdk2 y en las  $\alpha$  hélices 3 y 5 de los dominios de la cyclin box en la ciclina A, así como en el extremo C-terminal de la quinasa y en la  $\alpha$  hélice no conservada del extremo N-terminal de la ciclina. El resultado de estas interacciones van a producir un cambio en el centro activo de Cdk2 que conducirá, a su vez, a un incremento de la actividad quinasa de la proteína. El principal de estos cambios se va a producir en el T-loop, que dejará de ocluir el sitio de unión de la proteína sustrato adoptando una disposición plana en la entrada de la cavidad catalítica. El residuo Thr160 (residuo diana del complejo CAK) queda expuesto para que pueda ser fosforilado, incrementándose aun más la activación del complejo Cdk2/ciclina A. Otro de los cambios se va a producir en el sitio de unión al ATP. El cambio posicional que sufrirá el dominio PSTAIRE conduce a la reorientación de diversos residuos (el residuo Asp<sup>145</sup> entre ellos) lo que va a posibilitar una correcta alineación de los grupos fosfatos del ATP. Muchos de los cambios estructurales que se van a producir en el complejo Cdk/ciclina son relativamente generales; sin embargo, otros van a resultar más específicos de cada complejo, lo que explicaría en parte la especificidad de sustrato que confiere la subunidad reguladora a la subunidad catalítica. Es más, el potencial activador que confiere la ciclina a la Cdk al unirse a ésta va a variar de unos complejos a otros. En algunos casos, como por ejemplo en el caso de Cdk2/ciclina E o A, la interacción entre la Cdk y la ciclina es lo suficientemente fuerte como para que el complejo no precise

de otras modificaciones o proteínas adicionales (Desai et al., 1995). En otros casos, como por ejemplo en la unión de Cdk4 o Cdk6 a las ciclinas D, se va a requerir la intervención de factores de ensamblaje (del tipo Cip/Kip, ver más adelante). En el caso del complejo Cdk1/Ciclina A se van a requerir otras modificaciones pos-traduccionales en la subunidad catalítica para aumentar la afinidad y fortaleza de las uniones Cdk/Ciclina (Desai et al., 1995).

### 3.3.2. Interacciones con moléculas inhibitorias

En este apartado tenemos que incluir a dos familias de proteínas: 1) los inhibidores del tipo INK4, constituido por las proteínas p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup>, p19<sup>INK4d</sup>, y 2) los inhibidores de la familia Cip/Kip, formado por las proteínas p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> y p57<sup>Kip2</sup>.

Los inhibidores de la familia INK4 son inhibidores específicos de Cdk4 y Cdk6, uniéndose a la región N-terminal de éstas y actuando como inhibidores competitivos de las ciclinas D. Las cuatro proteínas INK4 comparten el motivo estructural de repeticiones de ankirinas (ankyrin repeats) y que consisten en pares de  $\alpha$  hélices antiparalelas unidas por los extremos y conectadas a través de una serie de motivos horquilla. Mientras que p16<sup>INK4a</sup> y p15<sup>INK4b</sup> presentan cuatro repeticiones de ankirina, p18<sup>INK4c</sup> y p19<sup>INK4d</sup> presentan cinco de estas repeticiones (Ruas y Peters, 1998). Estudios cristalográficos realizados con los complejos Cdk6/p16<sup>INK4a</sup> (Fig. 7) han establecido que la unión de p16<sup>INK4a</sup> se produce en una posición opuesta a la región donde se van a unir las ciclinas D. De esta manera, van a tener lugar una serie de cambios alostéricos que se van a propagar al resto de la estructura de la Cdk. Más concretamente, se producirá una reorientación del dominio PSTAIRE y de los extremos N- y C-terminales, sufriendo un giro de unos 15° con respecto al resto de la estructura de la Cdk. De esta manera, la interacción con las ciclinas D va a quedar estéricamente bloqueadas (Pavletich, 1999).

Con respecto a los inhibidores de la familia Cip/Kip, su acción inhibitoria es ejercida sobre el complejo heterodimérico Cdk/Ciclina. Parece bastante claro que al unirse a los complejos Cdk2/Ciclina E van a producir una inhibición en su actividad quinasa (Sherr y Roberts, 1999). En ausencia de Cdk2, es Cdk1 la quinasa que parece

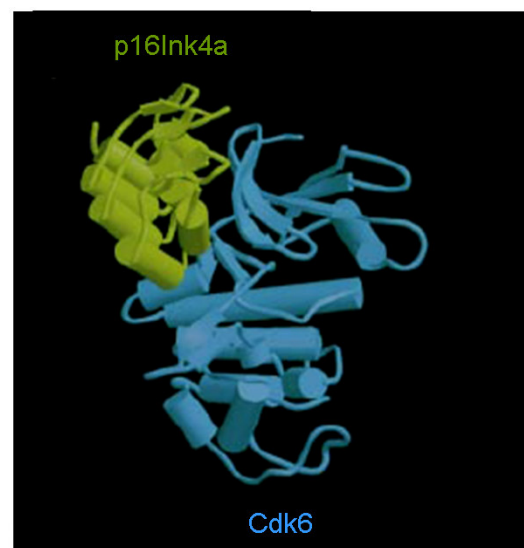


Figura 7. Estructura tridimensional del complejo Cdk6/p16Ink4a (modificado de Pavletich, 1999).

que compensa su actividad y ésta también puede ser inhibida por las proteínas Cip/Kip (Aleem et al., 2005). Más controvertido resulta el efecto que ejercen sobre los complejos Cdk4 ó 6/Ciclina D. Algunos estudios parecen indicar que también ejercen una actividad inhibitoria sobre ellos (Sherr y Roberts, 1999). Otros, por el contrario, parecen indicar que no tienen efecto positivo ni negativo sobre la actividad del complejo (Bagui et al, 2003) e incluso existen estudios que indican que la asociación entre el complejo Cdk4-6/Ciclina D y, al menos, p21<sup>Cip1</sup> o p27<sup>Kip1</sup> contribuyen a la estabilización del primero, reforzando su actividad (Sherr y Roberts, 1999). De hecho, se ha postulado que los complejos Cdk4-6/Ciclina D facilitan en parte la progresión a través de la fase G1 del ciclo secuestrando a las proteínas Cip/Kip de su unión a los complejos Cdk2/Ciclina E, contribuyendo, así, a la activación de éstos últimos (Sherr y Roberts, 1999). Se ha comprobado que el bloqueo impuesto por la sobreexpresión de p16<sup>INK4a</sup> o de p21<sup>Cip1</sup> puede sortearse sobreexpresando a su vez un mutante catalíticamente inactivo de Cdk4 que conserve intacta su capacidad de interacción con los inhibidores Cip/Kip (Sherr y Roberts, 2004). La obtención de la estructura cristalográfica del complejo ternario Cdk2/Ciclina A/p27<sup>Kip1</sup> ha ayudado a comprender el mecanismo por el que los inhibidores Cip/Kip pueden ejercer su función sobre los complejos Cdk/Ciclina (Russo et al, 1996).

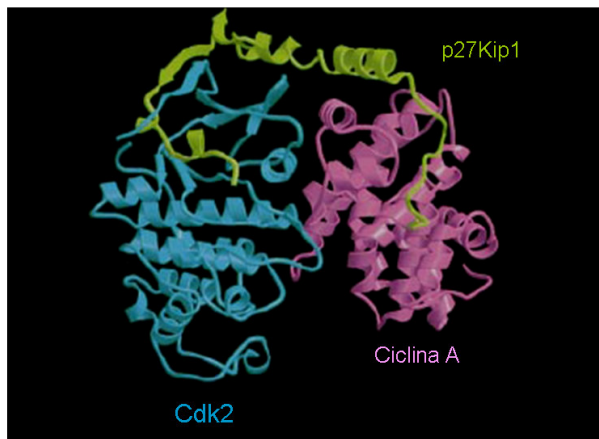


Figura 8. Estructura tridimensional de los complejos ternarios Cdk2/CycA/p27Kip1 (modificado de Pavletich, 1999).

La estructura descrita para p27 en estos estudios consiste en una forma truncada de la proteína que comprende un segmento de 69 aminoácidos que contiene los dos motivos de unión a la Cdk y a la ciclina, respectivamente (Fig. 8). Dicha forma truncada de p27<sup>Kip1</sup> se extiende por la región superior del complejo heterodimérico uniéndose a la ciclina a través de su extremo N-

terminal. Para unirse a la Cdk empleará su región C-terminal, insertando en la subunidad catalítica una  $\alpha$  hélice de pequeño tamaño, lo que bloquearía la unión del ATP a ésta. La presencia de ATP en el centro catalítico de la Cdk interferiría con la acción de las moléculas Cip/Kip pero no impediría su unión al complejo a través de la subunidad reguladora. Este hecho podría ser una de las razones que explicarían la existencia de complejos heterotriméricos Cdk/Ciclina/Cip-Kip funcionalmente activos (La Baer et al., 1997; Zhang et al., 1994; Harper et al., 1995, Soos et al., 1996).

Estudios recientes han arrojado una hipótesis adicional del mecanismo por el cual se podría regular esta actividad diferencial de los complejos Cdk4-6/Ciclina D/p27<sup>Kip1</sup> y Cdk2/Ciclina E/p27<sup>Kip1</sup>. Recientemente, varios trabajos han descrito la fosforilación de los residuos Tyr 88, principalmente, y, adicionalmente, Tyr74 y Tyr84 por parte de varias proteínas tirosina quinasas no asociadas a receptores (Abl y Src, entre otras) (Grimmler et al., 2007; Chu et al., 2007). Estas fosforilaciones van a provocar un doble efecto: 1) el desplazamiento de la pequeña hélice  $\alpha$  que ocupa el centro catalítico de la Cdk y 2) la liberación de este centro catalítico permite que se recupere la actividad del complejo Cdk/ciclina/p27<sup>Kip1</sup>. Adicionalmente, se ha sugerido que p27<sup>Kip1</sup> en su forma fosforilada en los residuos Tyr antes mencionados, posee mayor afinidad por los complejos Cdk4/Cyc D que por los Cdk2/CycE (Kaldis, 2007; James et al., 2008).

### 3.3.3. Fosforilaciones activadoras

Varios de los complejos Cdk/Ciclina requieren para su completa activación ser fosforilados en un residuo Thr conservado a lo largo de las distintas Cdk y presentes en el T-loop de éstas (Thr160 para

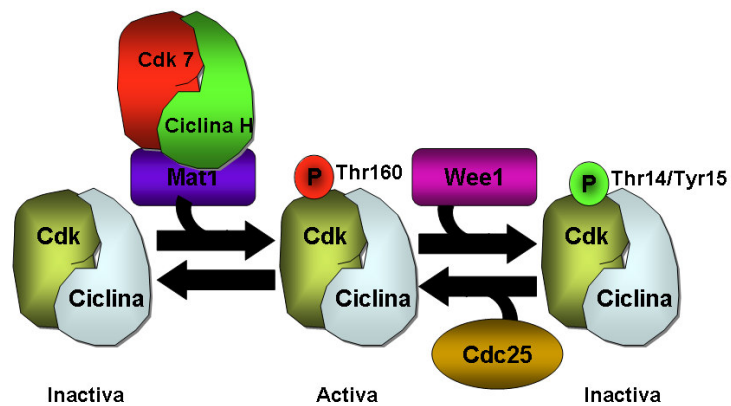


Figura 9. Regulación de la actividad de Cdk2 y Cdk1 por fosforilación.

Cdk2 y Thr174 para Cdk4) (Fig. 9). Como ya hemos comentado anteriormente, esta fosforilación es particularmente importante para algunos complejos, como los de Cdk1/Ciclina B, en los que la sola unión de la ciclina a la Cdk no resulta del todo efectiva para lograr la activación del complejo. Un caso similar lo supone el del complejo Cdk1/Ciclina A, donde la fosforilación descrita contribuye de manera importante al ensamblaje del complejo (Desai et al., 1995). Casos opuestos son el de los complejos Cdk5/p35 o Cdk7/Ciclina H, que no requieren de fosforilación alguna para ser plenamente funcionales (Qi et al., 1995; Nigg et al., 1995). Los complejos Cdk2/Ciclina A suponen un caso intermedio donde el elemento crítico para la activación de la subunidad catalítica es la unión a la subunidad reguladora y, sin embargo, la fosforilación de la Thr160 permite un incremento de hasta 300 veces en la actividad quinasas del complejo.

En los eucariotas superiores estas fosforilaciones activantes son llevadas a cabo por el complejo CAK, descrito en el apartado 2.1, y compuesto por la subunidades Cdk7, Ciclina H y Mat1. La eliminación del grupo fosfato para revertir el

efecto activante sobre el complejo Cdk/Ciclina es realizada por una fosfatasa todavía no identificada aunque se ha propuesto como posible candidata a la proteína KAP/Cd1 (Poon y Hunter, 1995).

### 3.3.4. Fosforilaciones inhibitorias

La mayoría de las Cdks que controlan el ciclo celular también sufren una serie de fosforilaciones en residuos de Tyr o Thr (Thr14 y Tyr15 en el caso de Cdk2 y Cdk1 y Tyr17 para Cdk4) que resultan en la inactivación del complejo heterodimérico. Los residuos descritos suelen encontrarse ocultos cuando la Cdk se encuentra en su forma libre y una vez que ésta se ha unido a la ciclina quedan expuestos y accesibles. Estas modificaciones provocan la reorientación de los residuos críticos del centro activo y, en consecuencia, de los grupos fosfatos del ATP.

Las encargadas de llevar a cabo las fosforilaciones correspondientes en cada Cdk son las proteínas quinasas Wee1 y Mut1 (esta última sólo se encuentra en los eucariotas superiores) (Mueller et al, 1995; Booher et al, 1997; Liu et al, 1997). Estas modificaciones juegan papeles decisivos en procesos tales como el inicio de la mitosis o en la parada del ciclo en G2 inducida por daño al ADN. Así, en las fases previas a la mitosis, en S y en G2, los complejos Cdk1/Ciclina B se mantienen silenciados gracias a estas fosforilaciones. La defosforilación necesaria para poder activar los complejos está causada por las fosfatasas de la familia Cdc25 (Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C), actuando como reguladores positivos de la actividad quinasa de los complejos Cdk/Ciclina. Aunque parece que las tres Cdc25 se mantienen activas a lo largo de las distintas etapas del ciclo parece que Cdc25A actúa preferentemente durante la fase G1 y la transición G1/S, siendo responsable de la activación de Cdk4 y Cdk2. Cdc25B y Cdc25C actuarían preferentemente en las fases G2 y M del ciclo celular, siendo las responsables de la activación de Cdk1 (Vigo et al., 1999; Jinno et al., 1999) (Fig 7). Las proteínas Cdc25 son, además, críticas en parada del ciclo en respuesta al daño en el ADN. Por ejemplo, en respuesta a un daño causado por exposición a radiación UV, Cdc25A sería degradada y, en consecuencia, Cdk2 se mantendría inactiva, parándose el ciclo en G1 (Mailand et al., 2000). Tanto Wee1 y Myt1 como las fosfatasas Cdc25 están sujetas igualmente a fosforilaciones activadoras e inhibitorias.

## 3.4. Eventos moleculares durante el ciclo celular

Aunque ya hemos hecho una breve descripción de cuáles son los complejos Cdk/Ciclina que actúan en cada fase del ciclo, en este y en los siguientes apartados



vamos a detallar brevemente cuáles son los procesos que tienen lugar en cada momento y cómo están regulados:

### 3.4.1. Regulación de la re-entrada en ciclo y progresión a través de la fase G1

Frente a una adecuada estimulación mitogénica, y una vez tomada la “decisión” molecular de abandonar el estado de quiescencia, se activan las diversas rutas de señalización que promueven la activación de los complejos Cdk4-6/Ciclina D en los diferentes niveles de regulación: transcripción, traducción y estabilización de las ciclinas D, unión de éstas a sus respectivas Cdks y, finalmente, importe de los heterodímeros al núcleo donde llevarán a cabo la fosforilación de sus sustratos correspondientes (Sherr y Roberts, 1999). La activación mitogénica de la ruta Ras/Raf/Mek/Erk, por ejemplo, eleva los niveles de ARNm de ciclina D1 (Lavoie, 1996; Balmanno y Cook, 1999; Peeper et al., 1999; Kerkhoff y Rapp, 1997; Atkas et al., 1997). La activación de manera simultánea de la ruta PI3K/Akt va a prolongar la vida media de la ciclina D1 inhibiendo su fosforilación en el residuo Thr286 por la quinasa GSK3 $\beta$  (Diehl y Sherr, 1997; Cross et al., 1995; Alt et al., 2000). Esta fosforilación promueve la asociación de la ciclina D1 con la exportina CRM1 y su consiguiente translocación citoplasmática donde será ubiquitinada y degradada por el proteosoma.

Existen estudios que indican que una vez que la célula ha completado la fase G1 no se requerirá de nuevo la actividad de los complejos Cdk4-6/Ciclina D hasta que la célula inicie una nueva ronda de división, entrando en la siguiente fase G1 (Matsushime et al., 1991). No obstante existen recientes evidencias de que la actividad quinasa de estos complejos podría ser requerida en fases posteriores del ciclo celular (Sherr, 2002). En células en división continua, a pesar de existir cierto grado de degradación de ciclina D1, la síntesis promovida por Ras permite mantener sus niveles relativamente constantes, por lo que el segundo ciclo se acorta respecto al primero (Guo, 2002). Una retirada de las señales mitogénicas o la exposición a agentes antimitogénicos como TGF $\beta$  antes de ser atravesado el punto R, frenaría de manera brusca la síntesis de ciclina D1 e incrementaría su degradación, lo que llevaría a un descenso en la actividad quinasa del complejo y una vuelta de la célula al estado de quiescencia. A su vez, procesos como la senescencia, el estrés oncogénico, la diferenciación y diversas señales antimitogénicas pueden promover la acción de los inhibidores INK4. Durante el desarrollo de la fase G1 también se produce un descenso significativo en los niveles de expresión del inhibidor p27<sup>Kip1</sup>. La ruta PI3K/Akt es la responsable de esta disminución dependiente de mitógenos en los

niveles de p27<sup>Kip1</sup> a través de la fosforilación de varios miembros de la familia de factores de transcripción forkhead. Esta fosforilación provocará el transporte de dichos factores de transcripción al citoplasma lo que impedirá la acción de éstos sobre sus regiones promotoras diana (Brunet et al, 1999; Brownawell et al., 2001). Es más, en la región promotora de p27<sup>Kip1</sup> se han identificado sitios de unión del factor transcripcional FoxO4 (Medema et al., 2000). Al descenso en los niveles de este inhibidor también contribuyen la degradación proteolítica promovida por la ubiquitín ligasa KPC durante G1 temprano (Kamura et al., 2004), degradación que no depende de la fosforilación del residuo Thr187 como si sucede en la degradación vía ubiquitín ligasa SCF<sup>Skp2</sup> (Hara et al., 2001) y que tendrá lugar durante la transición G1/S. En las primeras etapas de G1 y, aprovechando, la todavía reducida actividad quinasa que opera en los primeros momentos de esta fase, se completa la formación de los complejos prereplicativos, cuyo ensamblaje comenzó durante los momentos finales de la mitosis anterior. Así, y según este orden, las proteínas ORC, Cdc6, Cdt1 y los complejos MCM se unen a las regiones cromatínicas donde se sitúan los orígenes de replicación, de manera que adquieren éstos la capacidad de activarse e iniciar el proceso de copia del material genético a falta de su activación final (Bell y Dutta, 2002).

### **3.4.2. Transición G1/S**

A medida que se van incrementando los niveles de ciclina D, en respuesta a las señales mitogénicas, y se produce el ensamblaje de los complejos Cdk4-6/Ciclina D aumenta su actividad quinasa y comienza la fosforilación de varios sustratos, cuya modificación post-traducciona será necesaria para el avance hacia la fase S. Las principales dianas de estos complejos heterodiméricos lo constituyen las proteínas de la familia retinoblastoma o Rb y que comprende a pRb, p107 y p130 (Ewen et al., 1993; Kato et al., 1993) (Fig.10). Las proteínas de la familia Rb regulan la actividad de una serie de factores de transcripción, siendo los principales los factores E2F (Dyson, 1998). De la actividad de estos factores E2F, asociados a las proteínas de la familia DP, depende la expresión de genes esenciales para el progreso hacia la fase S. En su forma hipofosforilada y activa, Rb interacciona con los factores E2F y bloquea su actividad transcripcional. A su vez, se produce el reclutamiento de varias moléculas represoras como las histonadeacetilasas o HDAC (Brehm et al, 1998; Luo et al., 1998) y de complejos que intervienen en la remodelación de la cromatina como los complejos SWI/SNIF (Zhang et al., 2000) que se posicionan sobre las regiones promotoras de los genes cuya expresión depende de los factores E2F. Es más, en células con baja actividad HDAC o SWI/SNIF, la sobre-expresión de Rb o de un

mutante de Rb no fosforilable, no provoca la parada en G1 que sí se produce si se restaura la actividad de éstas moléculas remodeladoras de cromatina.

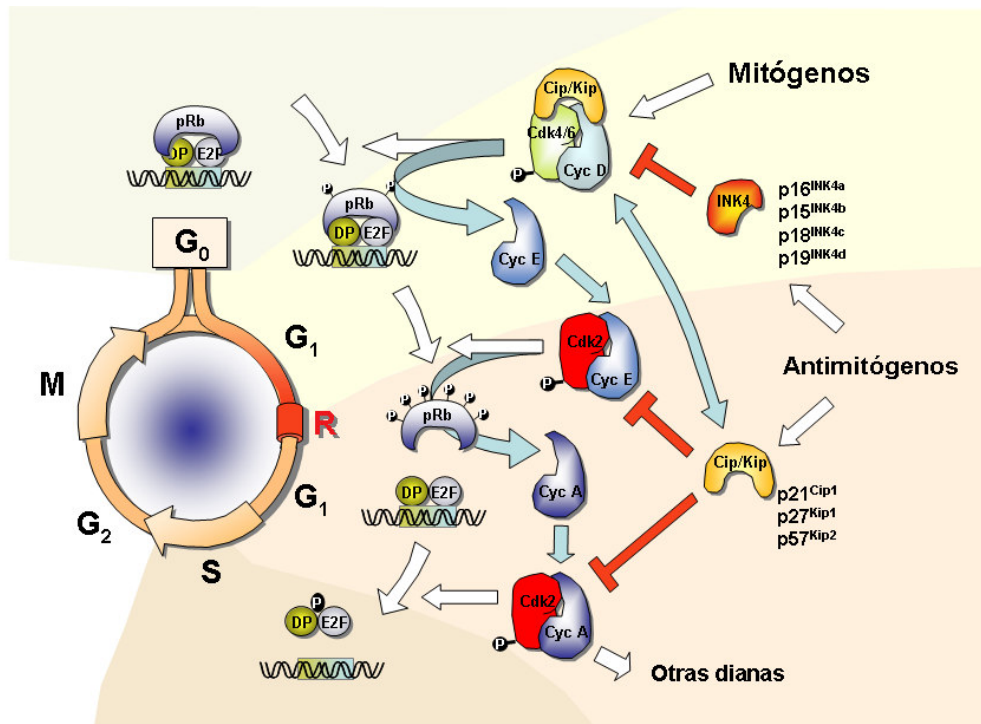


Figura 10. Principales eventos moleculares que regulan el paso a través de las distintas etapas del ciclo celular. La inactivación de Rb en la transición G<sub>1</sub>/S iniciará una cascada de eventos que conducirán a la expresión de genes necesarios para el progreso a través de la fase S hacia la fase G<sub>2</sub> y M.

Las primeras rondas de fosforilación que llevan a cabo los complejos Cdk4-6/Ciclina D en Rb provoca la disociación parcial del macrocomplejo represor descrito en el párrafo anterior y con ello se pierde la actividad HDAC y disminuye ligeramente su afinidad por los factores E2F (Harbour et al., 1999). Este hecho va a ser suficiente para que se permita una expresión y síntesis basal de la ciclina E. Una vez unida a su correspondiente Cdk, Cdk2, aumenta la actividad quinasa del complejo y comienzan a desarrollarse varios procesos de retroalimentación positiva (Koff et al., 1992; Dulic et al., 1992):

1. Movilización y descenso acusado de los inhibidores Cip/Kip:

La cada vez mayor actividad quinasa de los complejos Cdk2/Ciclina E, provocaría la fosforilación de la Thr187 en p27<sup>Kip1</sup> (Aleem et al., 2005), lo que conllevaría a su reconocimiento por parte de SCF<sup>Skp2</sup>, su poli-ubiquitinación y degradación por la ruta del proteosoma (Bloom y Pagano, 2003). Esto provocará un aumento exponencial en la actividad quinasa de Cdk2, que a su vez degradará p27<sup>Kip1</sup> cada vez más rápido. También se ha descrito que, en ausencia de Cdk2, Cdk1 también es capaz de fosforilar a p27<sup>Kip1</sup> (Aleem et al., 2005). Las fosforilaciones en residuos de Tyr de p27<sup>Kip1</sup> por parte de tirosina quinasas no asociadas a receptor descritas en el apartado 3.2 parece que favorecen a su vez la fosforilación en Thr187,

lo que reforzaría la degradación de p27<sup>Kip1</sup> a través de la ruta recién mencionada (Grimmler et al., 2007; Chu et al., 2007). Además, los complejos Cdk4-6/Ciclina D parece que proceden al secuestro de p27<sup>Kip1</sup> y su liberación de los complejos Cdk2/Ciclina E.

## 2. Inactivación completa de Rb:

Los complejos Cdk2/Ciclina E son también capaces de fosforilar a Rb aunque en posiciones distintas a las de los complejos Cdk4-6/Ciclina D (Zarkowska y Mitnacht, 1997; Kitagawa et al., 1996). Esta segunda ronda de fosforilación completará la inactivación de Rb, que verá impedida su interacción con los factores SWI/SNIF y su unión a los factores E2F (Fig. 10). El resultado es la activación de la transcripción de un gran número de genes entre los que encontramos a los propios factores E2F y a la ciclina E (Sherr, 1996; Degregori et al., 1995; Soucek et al., 1997; Geng et al., 1996). Este mecanismo de retroalimentación provoca que la síntesis de ciclina E deje de depender de las distintas cascadas de señalización que enlazan las señales mitogénicas con el ciclo celular y que pase a depender únicamente de la creciente actividad quinasa acumulada. Así, el ciclo celular pasa a ser un proceso autónomo, independiente de la presencia de mitógenos en el medio. De hecho, muchos autores identifican este punto en el que se adquiere la independencia mitogénica en la expresión de Ciclina E con el punto de restricción R (Pardee, 1989; Sherr, 1994). Una vez alcanzado este punto la actividad quinasa asociadas a las ciclinas D pasa a ser imprescindible. Cabe reseñar, aun así, que también se ha identificado como sustrato de Cdk4 y Cdk2 a la proteína Smad3 (Matsuura et al., 2004), que, por un lado, regula positivamente la actividad de TGFβ y, por otro, regula negativamente la actividad de c-Myc. La linealidad de la ruta ciclina D-Rb-ciclina E ha quedado patente a lo largo de diversos estudios experimentales. Así, el bloqueo impuesto en G1 por la sobre-expresión de Rb puede ser contrareestado por la sobre-expresión de ciclina E pero no de ciclina D1 (Lukas et al., 1997; Alevizopoulos et al., 1997). Por otro lado, la generación de ratones modificados genéticamente en los que se consiguió la inactivación del gen de la ciclina D1 insertando en su locus endógeno la secuencia codificante de ciclina E mostrarón que con la expresión de esta ciclina E se lograba revertir el fenotipo asociado a la falta de ciclina D1. En estos animales se observó una importante reversión del fenotipo asociado a la falta de ciclina D1, lo que indicaba que la función esencial de esta ciclina sería la de activar la síntesis de ciclina E (Geng et al., 1999).

### 3.4.3. La fase S del ciclo, la transición G2/M y la mitosis

Durante la fase S se produce la replicación del material cromosómico, principalmente y comienza la duplicación centriolar, que se prolongará durante la fase

G2. Existen diversos estudios que indican que Cdk2 interviene en este proceso con independencia de su papel como regulador directo de la actividad de Rb (Tsai et al., 1993; Jackson et al., 1995; Hua et al., 1997; Krude et al., 1997; Duronio et al., 1998; Krude, 2000; Futstental, 2001; Coverly, 2002). En estos trabajos se describe como Cdk2, unida a su ciclina correspondiente, es capaz de fosforilar a un elevado número de sustratos (Malumbres y Barbacid, 2005), independientemente de Rb; sustratos como CBP/p300, Cdc6, Cdc7, Cdt1, C/EBP $\beta$ , DP1, MCM2, MCM4, timidina quinasa, BRCA1, BRCA2, entre otros. En esta lista podemos encontrar ejemplos de genes que intervienen en varios procesos como el inicio de la replicación del ADN, en la elongación y la reparación del ADN. Desde un punto de vista bioquímico, los niveles de ciclina E comienzan a decaer y esta degradación resulta importante para evitar fenómenos de inestabilidad cromosómica, fenómenos que tiene lugar cuando la vida media de la ciclina se alarga más de lo debido. El descenso en los niveles de ciclina E se produce a través de su degradación proteolítica que tiene lugar por medio de dos rutas asociadas al sistema de ubiquitinación-proteosoma. Por un lado, la ubiquitín ligasa Cul3 es capaz de dirigir la destrucción de moléculas de ciclina E no asociadas a Cdk2, independientemente de su estado de fosforilación (Clurman et al., 1996; Singer et al., 1999). Una segunda ubiquitín ligasa, SCF, conjugada a Cdc4, proteína de la familia F-box, contribuye igualmente a la degradación proteolítica de la ciclina por la vía del proteosoma (Koepp et al., 2001; Moberg et al., 2001; Strohmaier et al., 2001). En esta segunda ruta es requisito que ciclina E se encuentre fosforilado en diversos sitios para que ésta pueda interactuar con Cdc4, ya sea en su estado libre o unida a Cdk2.

Una vez provocado el descenso en los niveles de ciclinas E, las ciclinas A comienzan a ocupar su lugar, complejándose, en primer lugar, con Cdk2 y, en segundo lugar, con Cdk1 (Girad et al., 1991). En el aumento de los niveles de ciclinas A participa la proteína Emi1. Ésta es capaz de asociarse a las moléculas adaptadoras Cdh1 y Cdc20 (Hsu et al., 2002; Reimann et al., 2001) bloqueando la interacción activadora de estas dos últimas con el macrocomplejo APC, ubiquitín ligasa que participa mayoritariamente en la degradación de las ciclinas A y ciclinas B. Anteriormente vimos que las ciclinas B se componen de 3 miembros: ciclina B1, B2 y B3. Para las ciclinas B1 y B2 tan sólo se han descrito interacciones con Cdk1, mientras que ciclina B3 se asocia a Cdk2. Aunque durante las fases S y G2 ya se pueden detectar ciertos niveles de ciclinas B no es hasta la transición G2/M cuando los complejos Cdk1/Ciclina B se activan (Pines y Hunter, 1992). La pérdida de las fosforilaciones inhibitorias (Izumi et al., 1992; Kumagai y Dunphy, 1992; Hoffman et al., 1993) y la translocación al núcleo por inactivación de una secuencia de retención

citoplasmática (Li et al., 1997) permiten al complejo Cdk1/Ciclina B fosforilar a un amplio número de sustratos, reflejo de la variedad de procesos en cuya regulación va a intervenir (Malumbres y Barbacid, 2005). Proteínas como Cdc25A y C, lamininas A, B y C, el recetor de laminina B, nucleolinas, Separasa, Survivina, entre otras. La lista se amplía hasta más de 70 posibles sustratos. Los procesos en los que intervendrá este complejo son tan variados como condensación cromosómica, fragmentación del aparato de Golgi, ruptura de la membrana nuclear... Finalmente, la activación de APC en la transición metafase-anafase promoverá el descenso de los niveles de ciclina B y el decaimiento progresivo de su actividad quinasa asociada. De hecho, esta inactivación del complejo Cdk1/Ciclina B resulta necesario para la salida de la célula de la fase de mitosis (King et al, 1996; Harper et al., 2002). Una vez completado el ciclo celular, y dependiendo de las condiciones extra-celulares, tendrá que enfrentarse de nuevo a la decisión de optar por una nueva ronda de división mitótica o por la salida del ciclo y la entrada en el estado de quiescencia o G0.

### **3.5. Programa transcripcional del ciclo celular**

De todo lo escrito anteriormente podemos deducir que el ciclo celular es un proceso que se encuentra altamente regulado a varios niveles. De manera básica, esta regulación se ejecuta, sobretodo, a un nivel transcripcional y a un nivel de modificaciones post-traduccionales. Además ambos niveles de control intervienen de manera diferente según en qué fase del ciclo se encuentre la célula. Así, durante las primeras etapas del ciclo celular se produce una regulación basada principalmente en el control de la actividad transcripcional. Por un lado, las señales mitogénicas integradas a través de la ruta Ras/Raf/Mek/Erk1 por la célula desembocan en la expresión de las ciclinas de tipo D (Lavoie et al., 1996; Balmanno et al., 1999; Peeper et al., 1999; Kerkhoff et al., 1997; Aktas et al., 1997). Por otro, la principal misión de los complejos Cdk4-6/Ciclina D y Cdk2/Ciclina E consiste en la fosforilación de Rb para que los factores de transcripción E2F, asociados a las proteínas DP, queden libres y puedan activar todo un programa transcripcional necesario para la síntesis del nuevo material genético y, de esta manera, completar la fase S hasta poder avanzar hacia la fase G2. De hecho, para Cdk6 sólo se han podido identificar a las proteínas de la familia Rb como únicos sustratos de esta quinasa. Para Cdk4, a parte de pRb, p107 y p130, se han descrito como sustratos a Cdt1, Marcks y Smad3 (Malumbres y Barbacid, 2005). Una vez llegados a G2 y a la transición G2/M la actividad transcripcional asociada a ciclo celular deja de ser esencial para pasar a un segundo

plano, siendo sustituida a nivel de regulación por procesos de modificación post-traduccionales. Al contrario de lo que sucede con los complejos Cdk4-6/Ciclina D, los sustratos fosforilados por los complejos heterodiméricos Cdk1/Ciclina B son muy numerosos y con funciones muy diversas (no sólo relacionadas con la transcripción). Por ejemplo, la fosforilación de las lamininas (integrantes de la membrana nuclear) provoca cambios conformacionales en éstas, lo que contribuye a la alteración de la arquitectura de la membrana y a su desaparición durante la profase en mitosis. Cdk1 también promueve, por ejemplo, la separación centromérica (fosforilando y activando la proteína motor asociada al centrosoma Eg5).

El desarrollo reciente de la tecnología de micromatrices o chips de ADN ha permitido estudiar cómo se expresan en un mismo instante miles de genes y detallar a una escala sin precedentes el programa transcripcional del ciclo celular y el papel de los factores E2F en este proceso, acelerando los estudios en los que el análisis de la expresión de genes dependiente de estos factores se debía realizar a una escala mucho más pequeña, cuando no prácticamente individual.

Varios grupos han estudiado en diferentes sistemas (células humanas, primarias o tumorales, células murinas) los perfiles transcripcionales generados a lo largo de las diversas etapas del ciclo celular (Iyer et al., 1999; Cho et al., 2001; Ishida et al., 2001; Whitfield et al., 2001; Cooper et al., 2003). El enfoque general consistió, primero, en la sincronización de las células en cultivo empleando diversos métodos y, segundo, comparar la transcripción a un nivel genómico de células en el momento “cero” de la sincronización con la transcripción de células en diferentes tiempos del crecimiento sincronizado.

Los primeros experimentos llevados a cabo con esta tecnología (Iyer et al., 1999) emplearon fibroblastos humanos primarios sincronizados en G0 por eliminación del suero en el medio de cultivo y pusieron de manifiesto cambios en los patrones de expresión de unos 517 genes de los 8600 genes representados en los chips empleados. Quizás el resultado más sorprendente fue el descubrimiento de la alteración dependiente de ciclo en los niveles de expresión de genes que intervienen en el proceso fisiológico de cicatrización de heridas. Sin embargo, este dato no resulta tan llamativo si tenemos en cuenta que la adición de suero es interpretado por las células no sólo como un estímulo mitogénico si no que se engloba en un proceso más amplio en el que la célula detecta un daño tisular y activa la maquinaria molecular necesaria para la reparación de éste. Por tanto, quedaba de manifiesto que en los estudios de estas características también es necesario tener en cuenta los métodos por los cuáles las células en cultivo han sido sincronizadas. Estudios posteriores emplearon otros métodos de sincronización arrojando las células en

otras etapas del ciclo celular. La sincronización de fibroblastos primarios humanos en G1 tardío empleando un bloqueo doble de timidina puso de manifiesto la variación a lo largo de las diferentes fases del ciclo de unos 731 transcritos de aproximadamente 40000 genes humanos representados en los chips usados para el experimento. Además, estos 731 genes se ordenaban en torno a 12 perfiles transcripcionales que presentaban una periodicidad consistente a lo largo de las fases G1, S, G2, y M. Cada uno de estos grupos se caracterizaba por la función común de sus genes integrantes (replicación de ADN, reorganización del citoesqueleto, apoptosis, segregación cromosómica, entre otros). Uno de los estudios más completos (Whitfield et al., 2002) estudiaba los perfiles transcripcionales de células HeLa empleando hasta tres métodos de bloqueo distintos (bloqueo doble de timidina, bloqueo de timidina-nocodazol y el bloqueo por agitación mitótica) y sincronizando a las células en diferentes fases del ciclo. De esta manera se pudieron identificar hasta 850 transcritos de unos 29621 genes cuya expresión parecía seguir un patrón asociado al ciclo celular. Trabajos realizados con fibroblastos embrionarios murinos o MEFs (por Murine Embryonic Fibroblasts) primarios sincronizados en G0 por privación de suero (Ishida et al., 2001) permitieron determinar unos 578 genes de 6200 genes murinos cuya expresión variaba de manera consistente a lo largo del ciclo celular. Al igual que sucedía con los fibroblastos humanos sincronizados en G0 se encontró un número significativo de genes relacionados con la cicatrización de heridas.

Una de las aportaciones más importantes de estos trabajos consistió en asignar posibles funciones a un elevado número de ESTs de función desconocida según el grupo funcional en el que eran integrados según su patrón de expresión. Por norma general, en las fases tempranas de G1 alcanzan su pico de expresión aquellos genes cuya función consiste en la transducción de señales, metabolismo, crecimiento celular... Durante la transición G1/S y la fase S eran los genes de replicación de ADN los que se expresaban en mayor medida. Además, también se identificaron una serie de 70 genes cuya expresión se encontraba regulada directamente por los factores de transcripción E2F (Ishida et al., 2001). Aproximadamente, unos 25 se correspondían con ESTs de función desconocida. Finalmente, durante las fases G2 y M los genes asociados a procesos de mitosis alcanzaban su pico de expresión.

### **3.6. Análisis genético del ciclo celular.**

Gran parte de los datos presentados en los apartados anteriores han sido obtenidos a partir de estudios *in vitro* con células en cultivo; no obstante, el desarrollo



de las técnicas de análisis y modificación genéticas en el ratón ha permitido generar una visión más precisa de los acontecimientos que tienen lugar en cada una de las etapas del ciclo celular y del papel fisiológico que juegan algunos de sus componentes reguladores más importantes. Existe un alto número de publicaciones que recopilan y revisan los diferentes modelos murinos transgénicos, KO y KI que se han generado de las moléculas reguladoras del ciclo celular (Malumbres y Barbacid, 2001; Ciemerych y Sicinski, 2005; Santamaría y Ortega, 2006). Vamos a revisar a continuación aquellos modelos que poseen una implicación más directa con el trabajo descrito en esta memoria:

### 3.6.1. Modelos KO de Cdk4

Se han generado varios modelos KO y KI murinos para estudiar la función de Cdk4 *in vivo* mediante técnicas de recombinación homóloga. En uno de estos modelos (Latres et al., 1999) se insertó un casete de resistencia a Neomicina cuya transcripción tiene lugar en dirección opuesta a la del locus de Cdk4, interrumpiendo la expresión del gen. Este casete fue insertado entre el primer exón (exón no codificante) y el segundo (primer exón codificante) del locus. De esta manera, se generó un modelo funcionalmente KO (aunque no KO en sentido estricto). En otro de los modelos (Tsutsui et al, 1999) se optó por una sustitución directa de la región genómica comprendida entre parte del primer exón hasta el exón 5 del locus por un casete de resistencia a Neomicina, eliminando, entre otras, la secuencia del ATG y la que codificaba para el centro catalítico de la proteína. En ninguno de los dos casos pudieron detectarse niveles significativos de ARN (Northern Blot) o de proteína (Western Blot).

A pesar de las diferentes estrategias empleadas en la generación de cada modelo, los fenotipos encontrados eran iguales. Básicamente, ambos animales KO eran viables, lo que demostraba que Cdk4 era dispensable para el ciclo celular, a pesar de lo que se podría esperar debido al papel descrito para esta quinasa. No obstante, el tamaño de los animales era menor al de sus hermanos de camada silvestres. Además, la ausencia de Cdk4 provocaba un defecto en la proliferación post-natal de las células  $\beta$  pancreáticas (por lo que estos animales desarrollan diabetes a partir de los dos meses de edad, aproximadamente) y de las células de la adenohipófisis (lo que provocaba esterilidad parcial en machos y completa en hembras). Los MEFs primarios aislados de estos animales eran capaces de dividirse sin mayores deficiencias (tan sólo un ligero retraso de 3-6 horas en la entrada en fase S (Tsutsui et al., 1999).

### 3.6.2. Modelos KO de Cdk6

Al igual que en el caso de Cdk4, el modelo KO de Cdk6 (Malumbres et al., 2004) era viable. El ratón fue generado sustituyendo el primer exón codificante de locus por un casete de resistencia a Neomicina cuya transcripción tenía lugar en dirección opuesta a la del gen de Cdk6. En este caso, las hembras eran de un menor tamaño que sus hermanas de camada silvestres y, aproximadamente, un 30% de ellas resultaron ser estériles. El principal defecto de estos animales se producía en el sistema hematopoyético. Mientras que los niveles de precursores hematopoyéticos resultaban normales, se producía un descenso en los niveles de varias líneas celulares diferenciadas (como glóbulos rojos, megacariocitos...). Los linfocitos aislados del timo de los animales KO alcanzaban su pico de fase S con unas 24 horas de retraso comparados con los linfocitos aislados del timo de animales silvestres hermanos de camada tras ser inducidos a entrar en el ciclo por adición de ionomicina-PMA. Sin embargo, los MEFs KOs de Cdk6 crecían normalmente y con cinéticas similares a las de los MEFs silvestres.

### 3.6.3. Modelos doble KO de Cdk4 y Cdk6

La ausencia de grandes defectos en el ciclo celular en ausencia de Cdk4 o de Cdk6 condujo a la hipótesis de posibles roles compensatorios entre estas dos quinasas. Para averiguar la veracidad de tal hipótesis se generaron animales doble KO para Cdk4 y Cdk6 por cruces entre animales Cdk4<sup>+/-</sup> y Cdk6<sup>+/-</sup> (Malumbres et al., 2004). La doble deficiencia de estas dos quinasas resultó ser letal durante las últimas etapas del desarrollo embrionario (E18.5) debido a un defecto proliferativo en la línea eritroide lo que conducía a una severa anemia. Sin embargo, la organogénesis de estos animales era prácticamente normal, lo que lleva a concluir que Cdk4 y Cdk6 resultan dispensables para la proliferación y diferenciación de la mayoría de los tipos celulares del organismo. Este dato viene corroborado por el hecho de que MEFs doble mutantes para Cdk4 y Cdk6 pueden proliferar normalmente, con cinéticas similares a las de MEFs silvestres, aunque con una menor eficiencia que los últimos, e inmortalizarse normalmente.

Es destacable el hecho de que los diferentes modelos KO desarrollados para ciclina D1, D2 o D3 y sus distintas combinaciones dobles o triples poseen fenotipos complementarios al observado en estos modelos descritos. Así, por ejemplo, los animales KO para ciclina D1 desarrollaban ciertas anormalidades neurológicas y las hembras poseían glándulas mamarias atróficas (Fantl et al., 1995; Sicinski et al., 1995). Las hembras KO para Ciclina D2 resultaron estériles debido a defectos proliferativos en las células granulosas de los ovarios mientras que los machos eran fértiles aunque presentaban hipertrofia testicular (Sicinski et al., 1996). Además, en

ausencia de esta ciclina se encontraban afectados el desarrollo del cerebelo (Huard, 1999), la neurogénesis en adulto (Kowalczyk et al., 2004), la proliferación de linfocitos B (Lam et al., 2000; Solvason et al., 2000) y la proliferación de las células  $\beta$  (Georgia y Bhushan, 2004). Los animales KO de ciclina D3 desarrollaban defectos proliferativos en los linfocitos T (Sicinska et al., 2003). Los animales doble KO de las distintas combinaciones de ciclinas D presentaban fenotipos que resultaban de la suma de los fenotipos de los KO sencillos (Ciemerych et al., 2002). Los animales triple KO para las tres ciclinas (Kozar et al., 2004) lograban alcanzar etapas intermedias del desarrollo embrionario, muriendo antes del día E17.5. La causa de la muerte se estableció en fallos proliferativos de los miocardiocitos y de las células madre hematopoyéticas o HSCs (de Hematopoietic Stem Cell). Sin embargo, al igual que sucedía con los animales doble KO de Cdk4 y Cdk6 la organogénesis del resto de tejidos permanecía relativamente inalterada. La letalidad más temprana de los animales triple KO comparada con la de los dobles KO Cdk4-6 puede deberse a la capacidad de las ciclinas D (al menos D1 y D2) de asociarse a Cdk2 para compensar la falta de las primeras (Malumbres et al., 2004).

#### 3.6.4. Modelos KO de Cdk2

Al igual que en el caso de Cdk4, para Cdk2 se generaron varios modelos deficientes en esta quinasa (Ortega et al., 2003; Berthet et al., 2003). En uno de los casos, se optó por la eliminación de los exones 2 y 3 del locus de Cdk2 (Ortega et al., 2003) que contenían la secuencia codificante para el dominio PSTAIRE y generaba un cambio en el marco de lectura provocando la transcripción de un nuevo ARNm no relacionado con Cdk2. En el otro caso, se eliminaron los exones 4 y 5 (Berthet et al., 2003) que contienen las secuencias que codifican para parte del dominio quinasa. En ambos casos, los animales KO resultaron viables y con una vida media similar a la de sus hermanos de camada silvestres. De manera sorprendente, los animales (tanto machos como hembras) defectivos de Cdk2 resultaron estériles debido a defectos en el emparejamiento cromosómico durante la primera profase de la meiosis, lo que indicaba un papel esencial de esta quinasa en este tipo de división celular.

Los MEFs obtenidos de animales KO proliferaban normalmente en ausencia de Cdk2 y se immortalizaban de la misma manera que los MEFs silvestres empleados como control.

Los animales KO para ciclina E1 o E2 (Geng et al., 2003; Parisi et al., 2003) resultaron ser viables y sin fenotipo destacable salvo por las alteraciones testiculares presentes en los machos KO para ciclina E2. No obstante, y de manera sorprendente al comparar este resultado con el del modelo KO de Cdk2, la ausencia combinada de ciclina E1 y E2 (Geng et al., 2003) resultó en letalidad embrionaria completa al

alcanzar el día E11.5 del desarrollo embrionario. Lo que demostró el papel redundante de estas dos quinasas en el desarrollo embrionario del ratón. La causa de la muerte de los animales parecía encontrarse en defectos proliferativos de los trofoblastos, componentes celulares de las placentas. Así, en ausencia de las ciclinas E, las células trofoblásticas gigantes no pueden completar su ciclos de endoreplicación. Adicionalmente, los MEFs extraídos de esta línea de ratón y creciendo de manera asincrónica se comportan de manera casi idéntica a los MEFs silvestres crecidos en las mismas condiciones. Sin embargo, los MEFs doble KO para CycE1/E2 sincronizados en G0 son incapaces de re-entrar en ciclo debido a un fallo a la hora de “cargar y activar” las proteína MCM en los orígenes de replicación.

### 3.6.5. Modelos KO de Cdk2 y Cdk6

Igual que sucede con el modelo doble KO para Cdk4 y Cdk6, la ausencia de defectos fenotípicos obvios en los animales KO de Cdk2 y en los KO de Cdk6 llevó a la generación de un modelo doble KO para Cdk2 y Cdk6 (Malumbres et al., 2004) para averiguar posibles papeles compensatorios entre ambas quinasas. No obstante, estos animales tan sólo presentan aquellos defectos presentes en los KOs sencillos de Cdk2 y Cdk6. Así, resultan completamente estériles debido a un defecto en la meiosis y, por tanto, en la maduración de las células germinales inmaduras. Además presentan los mismos defectos hematopoyéticos en la maduración de ciertas líneas hematopoyéticas (glóbulos rojos, megacariocitos, entre otros). Por tanto, Cdk2 y Cdk6 no juegan ningún papel compensatorio en el avance a través de las distintas etapas del ciclo celular.

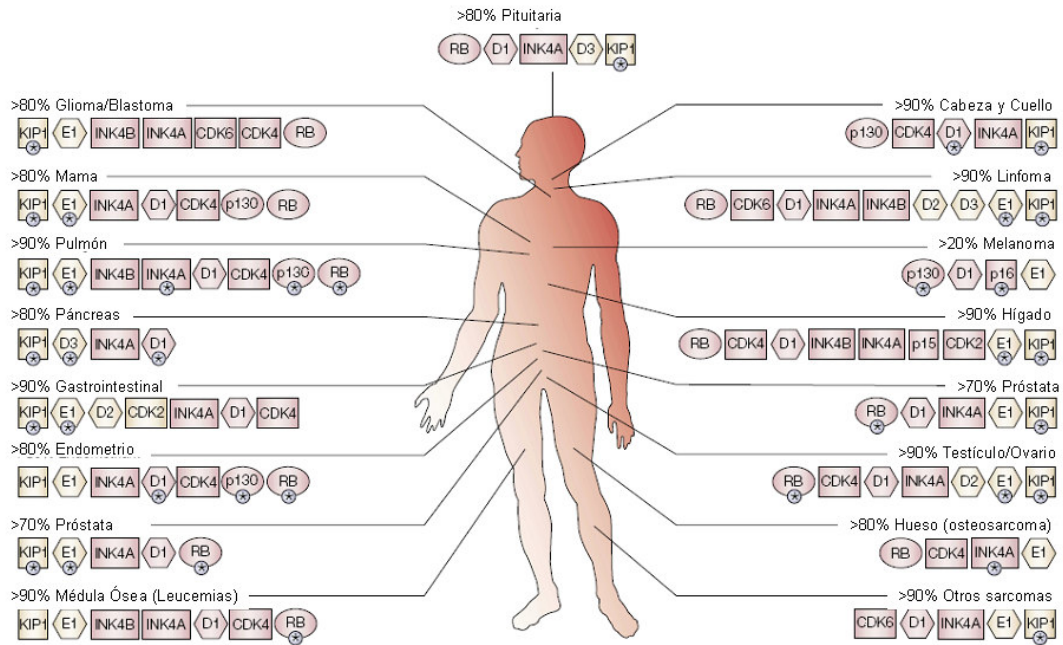
## 3.7. Alteraciones en la fase G1 y en la transición G1/S en cáncer

La importancia del control estricto en el avance a través de la fase G1 hacia la fase S queda de manifiesto en el hecho de que la mayoría de las moléculas que intervienen en el control de esta etapa del ciclo celular se encuentran mutadas en distintos tipos de tumores. Así, la ruta Cdk4-6/Ciclina D/INK4/Rb es una de las más frecuentemente mutadas en un gran número de tumores humanos (Ruas y Peters, 1998; Malumbres y Barbacid, 2001) (Fig. 11).

Cdk4, por ejemplo, se encuentra localizada en una región cromosómica (12q13) que sufre amplificaciones en varios tipos de tumores: gliomas (Schmidt et al., 1994; He et al., 1994; Sonoda et al., 1995), osteosarcomas (Khatib et al., 1993; Wunder et al., 1999; Wei et al., 1999), rhabdomiosarcomas (Khatib et al., 1993) y

cáncer de mama (An et al., 1999). Además, se ha descrito en melanomas de tipo familiar una mutación puntual en esta quinasa, Cdk4R24C, que impide a las proteínas de la familia INK4 ejercer su función inhibitoria sobre ella (Zuo et al., 1996; Sotillo et al., 2001).

Por otro lado, Cdk6 también se ha encontrado sobre-expresado en linfomas de células T (Chilosi et al., 1998) y en gliomas (Costello et al., 1997). Una mutación similar a la R24C en Cdk4 ha sido descrita para Cdk6, Cdk6R31C, en líneas celulares de neuroblastoma (Easton et al., 1998).



**Figura 11. Mutaciones en moléculas reguladoras de G1/S en diversos tipos de tumores.** Tan sólo se representan aquellos casos en los que las mutaciones aparecen en al menos el 10% de tumores primarios. El porcentaje representa el total de tumores en los que se ha detectado al menos una mutación en alguna de las moléculas representadas. En amarillo aparecen aquellas moléculas para las que no se han encontrado un mecanismo molecular que explique la relación entre la mutación y la aparición del tumor. En asterisco aparecen aquellas mutaciones que poseen un valor de pronóstico (Modificado de Malumbres y Barbacid, 2001).

También es muy frecuente encontrar mutaciones en diversos tipos de tumores de los inhibidores de la familia INK4. La pérdida de heterocigosidad del locus INK4A (que incluye a los genes p16<sup>INK4a</sup> y p19<sup>ARF</sup>) o de p15<sup>INK4b</sup> ocurre en un alto porcentaje de casos de cáncer de vejiga y de melanomas. Además, la delección total del locus INK4A ha sido descrita en leucemias, cáncer de vejiga, gliomas, carcinomas nasofaríngeo y pancreático, en melanomas (Herman et al., 1996; Ruas y Peters, 1998). Se han encontrado mutaciones que afectan a p16<sup>INK4a</sup>, sin producirse alteraciones en p19<sup>ARF</sup>, en casos de carcinomas pancreáticos y melanomas (Ruas y Peters, 1998). Uno de los mecanismos habituales de alteración de la función de los inhibidores del tipo INK4 en los procesos neoplásicos es el cambio de los patrones de metilación de los promotores de estos genes, promoviendo el silenciamiento de su

expresión. Así, el promotor de p16<sup>INK4a</sup> se encuentra hipermetilado en tumores de vejiga, carcinoma nasofaríngeo, gliomas, mielomas, cáncer de colon y melanomas (Ruas y Peters, 1998). En el caso de p15<sup>INK4b</sup>, se ha descrito la hipermetilación de su región promotora para casos de leucemias, linfomas y gliomas (Herman et al., 1996; Malumbres et al., 1997). Las mutaciones de p18<sup>INK4c</sup> y de p19<sup>INK4d</sup> no son tan frecuentes aunque se han descrito casos de leucemias, mielomas y osteosarcomas (Ruas y Peters, 1998) donde se han encontrado mutados estos genes.

La sobreexpresión y la amplificación de las ciclinas D en tumores es también un suceso habitual. En casos de cáncer de mama, de esófago y de pulmón se ha observado la amplificación de ciclina D1. Además se han descrito reorganizaciones cromosómicas en diferentes tipos de linfomas y adenomas del paratiroides (Weinberg, 1995; Sherr, 1996; Donnellan y Chetty, 1998). Ciclina D2 ha sido encontrada sobreexpresada en casos de cáncer de ovario y de testículo (Sicinski et al., 1996).

En el caso de Cdk2, y a pesar de que su actividad se encuentra alterada en un elevado número de casos de cáncer, en raras ocasiones se han encontrado alteraciones en los niveles de expresión de la proteína. Aun así, existen casos de sobreexpresión de Cdk2; más concretamente, en ciertos tipos de carcinomas orales, en tumores de ovario y carcinomas colon-rectales, generalmente correlacionados con tasas bajas de supervivencia (Marone et al., 1998; Li et al., 2001; Mihara et al., 2001).

Para las ciclinas de tipo E, se han descrito casos de sobreexpresión en linfomas, leucemias, sarcomas y cáncer de mama, ovario, pulmón y cérvix entre otros (Hwang y Clurman, 2005). De hecho, ciclina E posee un importante valor pronóstico, sobretodo en los tumores de mama y numerosos estudios muestran elevados índices de correlación entre el incremento de los niveles de ciclina E y una menor tasa de supervivencia en este tipo de tumores (Keyomarsi et al., 1994; Porter et al., 1997; Span et al., 2003). Existen trabajos que sugieren que la capacidad oncogénica de ciclina E reside en la aparición de ciertas isoformas truncadas (Keyomarsi, 2002) propias de las células tumorales y resistentes a la acción de los inhibidores de tipo Cip/Kip. Otros sugieren que esta capacidad oncogénica surge, no tanto de su actividad promotora del ciclo celular, sino de fenómenos de inestabilidad cromosómica asociada a elevados niveles de expresión de la ciclina (Spruk et al., 1999; Minella et al., 2002) que conducirían a replicaciones incompletas del genoma celular o de repartos aberrantes de éste (Kawamura et al., 2004).

No existen tantas evidencias clínicas como en el caso de las proteínas de la familia INK4 para resaltar el papel que puedan jugar los inhibidores de la familia Cip/Kip en los procesos tumorales. No se han encontrado mutaciones en el locus de p27<sup>Kip1</sup> en tumores humanos aunque los bajos niveles de este inhibidor sirven (al igual

que en el caso de ciclina E) como factor pronóstico en ciertos tipos de cáncer (Lloyd et al., 1999; Tsihlias et al., 1999). La pérdida de la expresión de p57<sup>Kip2</sup> ha sido descrita para ciertos tipos de carcinomas pulmonares (Kondo et al., 1996).

Por último, la pérdida o inactivación de Rb y, menos frecuentemente de p130, es una de las alteraciones más frecuentes asociadas a procesos neoplásicos en humanos (pulmón, mama, próstata, vejiga, carcinoma pancreático, nasofaríngeo, de endometrio, de hígado, tumores de ovario, de testículo, leucemias, linfomas...) (Paggi y Giordano, 2001).





# 4. Objetivos



El objetivo principal de esta tesis ha consistido en contribuir a determinar el papel que juegan Cdk2, Cdk4 y Cdk6 en el ciclo celular en un contexto tanto in vivo como in vitro, empleando para ello células o animales doblemente deficientes de Cdk4 y Cdk6 o Cdk4 y Cdk2 y triplemente deficientes de Cdk2, Cdk4 y Cdk6. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Detectar alteraciones en los perfiles transcripcionales asociados a la ruta Cdk4-6/CycD/pRb en fibroblastos embrionarios murinos obtenidos de animales doblemente deficientes de Cdk4 y Cdk6 y en caso de establecerse dichas alteraciones determinar qué papel juegan en la progresión del ciclo celular.
2. Generación de animales adultos doblemente deficientes para Cdk4 y Cdk2.
3. Caracterización de la homeostasis, proliferación y apoptosis de animales adultos en ausencia de Cdk4 y Cdk2.
4. Determinar la capacidad de proliferación celular de hepatocitos y queratinocitos adultos en ausencia de Cdk4 y Cdk2, bajo condiciones de estrés (hepatectomía parcial y ensayo de cicatrización de heridas).
5. Generación de animales adultos triplemente deficientes de Cdk4, Cdk6 y Cdk2 y determinar la capacidad de proliferación celular de los hepatocitos en ausencia de estas tres quinasas, bajo condiciones de estrés fisiológico (hepatectomía parcial).



# **5. Materiales y Métodos**



## 5.1 Experimentos in vivo

### 5.1.1. Mantenimiento y genotipaje de los ratones

Para llevar a cabo el trabajo que se describe en esta tesis se establecieron dos grupos destacados de animales: un primer grupo destinado a la reproducción y generación de nuevos animales, expandiendo la colonia, integrado por animales jóvenes y con un número relativamente superior de hembras con respecto a los machos (con el objetivo de maximizar la capacidad reproductora de estos últimos) y un segundo grupo de animales que serían empleados para los diferentes experimentos que se detallan a lo largo de esta memoria.

El genotipaje de los ratones se hizo de forma rutinaria mediante la extracción de ADN a partir de los fragmentos de cola cortados a los animales una vez destetados de sus madres a día p21 y posterior análisis por medio de PCR.

En el caso del gen *Cdk4*, se empleó la siguiente combinación de oligos:

1. pDC1: 5'-TCTTTGTGCCTAGTGCGATG-3'.
2. pDCWc: 5'-ATGATCACCAGCTAGTCGTC-3'.
3. pDCKO: 5'-TACCAGAGCGTAACCACCTG-3'.

La combinación de los oligos 1 y 2 genera una banda de 600pb correspondiente al alelo silvestre. La combinación de los oligos 1 y 3 genera, a su vez, una banda de 450pb que se corresponden con el alelo deleciónado.

En el caso del gen *Cdk2*, se utilizaron los siguientes oligos:

1. 3B8: 5'-CAAGTTGACGGGAGAAGTTGTG-3'.
2. 3B9: 5'-GAAGACCCTCCAGGTGAATGAA-3'.

Aquí, la combinación de los oligos 1 y 2 genera dos posibles bandas: una de 700bp, que se corresponde con el alelo condicional, y otra de 550pb, que se corresponde con el alelo silvestre.

En el caso del gen *Cdk6*, se emplearon los siguientes oligos:

1. *Cdk6r\_4B1*: 5'-ATTGGCAAACACATTCTTACACATT-3'.
2. *Cdk6f\_4B3*: 5'-CGCGAGTGCGACTCCCC-3'.
3. *PGKr\_2B2*: 5'-GCCTACCCGCTTCCATTGCT-3'.

La combinación de los oligos 1 y 2 genera una banda de 700pb que se corresponde con el alelo silvestre mientras que la combinación de los oligos 2 y 3 genera una banda de unas 530pb y que se corresponde con el alelo deletado.

Para determinar el genotipaje del gen RERT se emplearon los siguientes oligos:

1. Polr2aR\_10B6: 5'-CCTCTCTGAGCCTCAATTAAGCAG-3'.
2. esr1F\_10B7: 5'-TGAGTAACAAAGGCATGGAGCA-3'.
3. POL3: 5'-TGAGCGAACAGGGCGAA-3'.

La combinación de alelos 1 y 3 genera una banda de 450pb, que se corresponde con la banda del alelo silvestre. La combinación de los alelos 2 y 3 genera una banda de 390pb, que se corresponde con la banda del alelo recombinante.

### 5.1.2. Tratamiento con 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT)

El 4-OHT tiene una estructura química de tipo esteroídico por lo que únicamente es soluble en disolventes orgánicos (acetona, etanol, cloroformo...). Estos medios no pueden ser empleados como vehículos en la administración intraperitoneal del compuesto debido a los importantes efectos tóxicos que desencadenan. Así, para la administración del agente 4-OHT recurrimos a la preparación de una suspensión del mismo en aceite de maíz. Para mejorar la solubilidad del tamoxifeno en el aceite se sonicó la mezcla (dos minutos, 40% amplitud) en hielo (para evitar la inactivación del compuesto por calor). Esta preparación es de carácter inestable por lo que se hace necesaria su reconstitución por sonicación cada vez que va a ser empleada.

Para el tratamiento con 4-OHT los animales recibieron, vía inyección intraperitoneal, una cantidad de 2mg por semana (repartida en dos inyecciones, 1mg/inyección) durante un tiempo de 4 meses, a partir del mes de edad (una vez éstos fueron destetados y genotipados).

Como control, se procedió a tratar una cantidad de animales similar a la de animales problema de la misma manera que los anteriores con la salvedad de que éstos eran inyectados tan sólo con aceite de maíz, sin portar, 4-OHT; lo que impediría la ablación del gen Cdk2. Estos animales se mantendrían KO clásicos para Cdk4 y silvestres para Cdk2.

En todos los casos, cada vez que el animal recibía la inyección correspondiente, éste era pesado con el objeto de establecer diferencias en los pesos entre los animales silvestres, los que tan sólo carecen de Cdk4 (al haber sido tratados



con el aceite de maíz) y aquellos que carecen de Cdk4 y van perdiendo la expresión de Cdk2 (por haber sido tratados con 4-OHT).

### 5.1.3. Infección con adenovirus

A la hora de infectar los animales, éstos era expuestos durante unos 15 minutos a una lámpara de luz roja con el objetivo de dilatar los vasos sanguíneos de la cola. Pasado ese tiempo, eran introducidos en un cilindro de metacrilato con el objetivo de inmovilizarlos para llevar a cabo la inyección. La cola era sacada del cilindro de tal manera que se procedía a la inyección de 100µl ( $2 \times 10^9$  PFU) de virus en la base de la vena caudal. Tras la inacción los animales eran mantenidos durante una semana en cajas acopladas a racks ventilados. Pasada la semana, se llevaban a cabo los distintos ensayos con los animales infectados.

### 5.1.4. Medición de los niveles de glucosa en sangre

Los niveles de glicemia fueron medidos seccionando una pequeña parte de la cola de los animales y obteniendo una gota de sangre para aplicar sobre las tiras medidoras que se introducían en la máquina lectora correspondiente (sistema GlucoMen Visio, A. Menarini).

### 5.1.5. Histopatología e inmunohistoquímica

Los órganos extraídos de los animales fueron fijados en formalina tamponada al 10% (Sigma) y fijados en parafina (formol tamponado en solución fosfato al 4%). Secciones de un grosor aproximado de 3 a 5 micras fueron teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). Para los estudios de proliferación, las secciones de tejido se tiñeron por medio de anticuerpos específicos de la proteína ki67 (MIB-1; Dako). La detección de células apoptóticas se llevó a cabo por medio de ensayos TUNEL (Apoptag Peroxidase, Intergen) o empleando anticuerpos anti-Caspasa 3 activa (R&D Systems). En el caso de los ensayos de regeneración hepática (ver apartado correspondiente), para comprobar la funcionalidad de los hígados regenerados, el tejido en cuestión fue teñido contra anticuerpos específicos de CD34 (Abcam), GAPDH (Chemicom) y se realizó una tinción de P.A.S, específica de polisacáridos.

### 5.1.6. Análisis de los precursores hematopoyéticos.

Para el análisis de los precursores hematopoyéticos en médula ósea, se sacrificaron a los animales una vez completado el tratamiento correspondiente. Se extrajo el fémur y se realizaron sendos cortes en las cabezas superior e inferior del

hueso. Tras realizar estos corte se extrajo la médula haciendo pasar un volumen de 1 ml de PBS 1X por uno de los extremos del hueso y recogiendo el volumen por el extremo opuesto. Se tomaron  $2 \times 10^6$  células para analizar el número de colonias formadoras de eritrocitos (BFU) y otras  $2 \times 10^6$  células para analizar el de colonias formadoras de granulocitos (CFU-G), de macrófagos (CFU-M), y de población mixta granulocitos-macrófagos (CFU-GM). Se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos y fueron resuspendidas en 300  $\mu$ l de medio Iscove MDM suplementado con FBS al 2% (Stem Cell Technologies). Dicho volumen fue añadido a 3 ml de medio Methocult (Stem Cell Technologies), que se conserva a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se descongela a  $4^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Ambos volúmenes se mezclaron por medio de vórtex. Se añadió un volumen de 1.1 ml a placas de metilcelulosa (Stem Cell Technologies) que fueron mantenidas a  $37^{\circ}\text{C}$ , 5% $\text{CO}_2$ . Todas las placas fueron mantenidas bajo esas condiciones durante 12 días, procediendo al conteo de colonias una vez completado ese tiempo. Cada tipo de colonia fue identificada empleando criterios morfológicos (Stem Cell Technologies)

#### 5.1.7. Análisis de las poblaciones hematopoyéticas maduras.

En el caso del estudio de poblaciones hematopoyéticas se sacrificaron los animales por  $\text{CO}_2$  una vez completado el tratamiento correspondiente. Se extrajo un volumen de sangre de 0.5ml del corazón del animal. También se extrajeron los principales órganos hematopoyéticos del animal: timo, bazo y médula ósea. En el caso de la médula ósea, se extrajeron los dos fémures del animal, se realizó un corte en ambos extremos del hueso. Tras los cortes, se extrajo la médula inyectando un volumen de 1 ml de PBS 1X por uno de los extremos del hueso y recogiendo el volumen por el extremo opuesto. El timo y el bazo fueron disgregados físicamente empleando tijeras y puestos en solución de PBS.

Tras el conteo del número de células presentes, se tomó el mismo número de células ( $2 \times 10^6$  de células) de cada muestra y se llevaron a un volumen de 1 ml en PBS. De cada muestra se prepararon hasta 7 tubos con el mismo número de células en cada uno de ellos. Estas células fueron bloqueadas durante 20 minutos con una dilución 1/200 del anticuerpo Fcy block, cuyo propósito es minimizar las posibles uniones inespecíficas de toda la batería de anticuerpos que se van a detallar a continuación. La incubación se prolongó durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

El tubo 1 se incubó con anti-Ter119 y anti-CD45. En el caso del resto de tubos, adicionalmente a las incubaciones con sus respectivos anticuerpos, se realizó un paso previo de lisis celular. La muestra del tubo 2 se incubó con los mismos anticuerpos que

en el caso del tubo 1. El tubo 3 se incubó con anticuerpos contra B220, DH5 $\alpha$ , CD3 y CD45. El tubo 4 con anti-CD8, -CD4, -CD3 y anti-CD45. El tubo 5 con anti-CD16/32, -GR1, -CD11b y -CD45. En el caso del tubo 6 se incubó contra anti-CD3/APC (marcaje específico de linfocitos T) y para el tubo 7 contra anti-CD19/APC (marcaje específico de linfocitos B). Todas las incubaciones se realizaron durante 20 minutos, en oscuridad y a 4°C. Los anticuerpos portaban las siguientes moléculas para facilitar su detección por inmunofluorescencia: Ter119-PE, CD45-APC, B220-Biotina, DX5 $\alpha$ -PE, CD3-APC, CD8-FITC, CD4-APC, CD16/32-FITC, Gr1-Biotina, CD11b-FITC, CD19-APC.

Los tubos se lavaron con 2 ml de PBS y se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 rpm y a 4°C. Entonces se eliminó el sobrenadante y se pasó a realizar la lisis en los tubos del 2 al 7 resuspendiendo el pellet obtenido en 2 ml de solución de lisis 1X, dejando que la reacción prosiguiese de 7 a 10 minutos, a temperatura ambiente, pero siempre en la oscuridad. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos, a 1200 rpm, a 4°C. Entonces se volvieron a lavar siguiendo las condiciones especificadas más arriba. Finalmente y tras eliminar el sobrenadante se resuspendieron los contenidos de los tubos en 300 $\mu$ l de buffer PBS y se realizó el estudio poblacional pasando las células obtenidas por el aparato de citometría.

#### 5.1.8. Ensayos de regeneración hepáticas

En estos ensayos se emplearon 4 animales por genotipo, con una edad de 5 meses, tanto machos como hembras con el objetivo de minimizar posibles diferencias debidas al sexo. Los animales empleados en los ensayos correspondientes fueron anestesiados empleando una mezcla de oxígeno/isoflurano al 2% administrado por inhalación. Una vez anestesiados se procedió a la resección de dos tercios de la masa total del hígado (lóbulos lateral izquierdo, lateral izquierdo medio y lateral derecho medio) siguiendo el protocolo descrito por Higgins y Anderson (1931). Las muestras fueron divididas en tres porciones de manera que una de ellas se destinaría a realizar ensayos de inmunohistoquímica e histopatología, la segunda se dedicaría a la extracción de proteínas y la tercera a la de ADN. Todos los animales operados fueron tratados con una dosis de 0.05mg/kg del analgésico buprenorfina administrada por inyección subcutánea cada 8 horas, aproximadamente, durante los cuatro días posteriores a la operación. El peso de la masa reseccionada del órgano fue medido inmediatamente después de la operación. Tras 9 días, los animales fueron sacrificados y se procedió de nuevo a la medida de la masa hepática regenerada. Dos horas previas al sacrificio de los animales, éstos recibieron una inyección intraperitoneal de

BrdU, cuya dosis fue de 100µg/g. La masa hepática extraída fue dividida de la misma manera que en el momento de realizar la hepatectomía.

### 5.1.9. Ensayos de cicatrización de heridas

Para los ensayos de regeneración dérmica se emplearon 4 animales por genotipo, por sexo y tratamiento (4-OHT o aceite de maíz) con una edad de 5 meses. En primer lugar, los animales fueron anestesiados con una mezcla de isofluorano/aire al 2% y mantenidos en ese estado durante toda la operación. Se procedió a medir los niveles de glucosa en sangre siguiendo el protocolo descrito en la sección correspondiente. Tras rasurar el lomo de cada animal se procedió a practicar dos heridas, una a cada extremo del lomo del animal, de unos 4 mm de diámetro cada una empleando un bisturí de sección circular. La piel de cada herida fue seccionada empleando tijeras circulares y guardada a -80°C para proceder posteriormente al análisis de la escisión de Cdk2 por southern. El tamaño de las heridas fue medido cada 24 horas hasta producirse la completa cicatrización de éstas. Completado el proceso de cicatrización se repitieron de nuevo los ensayos, con el objeto de comprobar que el área de piel regenerada había sido producida a partir de células deficientes en Cdk2.

## 5.2. Experimentos in vitro

### 5.2.1. Preparación de fibroblastos embrionarios murinos y condiciones de cultivo

Los fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) fueron aislados a partir de embriones a día E13.5 y puestos en cultivo con DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado con glutamina 2mM, penicilina/estreptomicina 1% y suero fetal bovino o FBS (por Foetal Bovine Serum) al 10%. Los embriones fueron extraídos del útero materno y separados del saco vitelino. El hígado de los animales fue eliminado y la cabeza seccionada para servir como fuente de ADN para proceder, posteriormente, al genotipaje del embrión. El resto del embrión fue disgregado, en primer lugar, mecánicamente por medio de bisturí y enzimáticamente, en segundo lugar, tratando cada embrión con 3 ml de solución de tripsina (suplementada con EDTA) (GibcoBRL) durante unos 10 minutos a 37°C. La suspensión procedente de cada embrión fue sembrada en una placa de 150 mm de diámetro. Una vez el cultivo alcanzó el 70% de confluencia, aproximadamente, las células fueron recogidas y congeladas en nitrógeno

líquido. El pase 1 de estos MEFs se corresponde con el momento en que las células son descongeladas para ser puestas en cultivo.

Los MEFs fueron mantenidos en cultivo en el mismo medio en el que fueron aislados (DMEM+Gln+pen/estrept+FBS), a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### 5.2.2 Entrada en fase S

Con el objeto de analizar la entrada en fase S y los cambios transcripcionales asociados a dicha entrada se sembraron  $7,5 \times 10^5$  células de MEFs primarios a pase 3 en placas de 100 mm en DMEM + Gln 2mM + 1% pen/strep + 10% FBS durante 24 horas (el tiempo suficiente para que las células pudieran adherirse correctamente a la placa). Pasadas estas 24 horas, las células fueron lavadas 3 veces consecutivas con PBS 1X (GibcoBRL), y se les añadió DMEM + Gln 2mM + 1%pen/strep + 0.1%FBS. Durante las siguientes 48 horas las células fueron mantenidas en dicho medio y a continuación se cambió el medio por medio fresco DMEM + Gln 2mM + 1% pen/strep + 10% FBS.

### 5.2.3 Análisis de perfiles de expresión génica

Una vez añadido el medio fresco en MEFs que habían permanecido arrestadas durante 48 horas en G0. Se tomaron muestras a 0h., 8h., 16h., y 24h. y se extrajo el ARN total empleando el kit RNeasy (QIAGEN). 30µg de este ARN total fueron empleados para llevar a cabo los marcajes con dCTP-Cy3 y dCTP-Cy5 y proceder a las hibridaciones que se describen en la sección de resultados. Cada chip fue escaneado empleando un escáner Agilent (Agilent Array Scanner) y la imagen obtenida fue analizada por medio del software GenePix5.1 (Axon)

### 5.2.4. PCRs convencionales

Las PCRs (reacción de cadena de polimerasa) de este trabajo se llevaron a cabo en un volumen de 20µl siendo la composición de la mezcla de reacción la siguiente: 1µl de ADN molde, 2µl de tampón EcoTaq Pol 10X, 0.1µl de BSA100X, 0.75µl de cada primer (5' y 3') 10 µM, 0.25µl dNTPs 10mM, 1µl de MgCl<sub>2</sub> 1M, 0.1µl de EcoTaq y completamos volumen con H<sub>2</sub>O mili Q. El programa empleado fue el siguiente: un paso de 94°C durante 4 minutos, 35 ciclos de 94°C-30 segundos, 60°C-30 segundos, 72°C-30 segundos y un paso final de elongación a 72°C durante 5 minutos.

### 5.2.5. Extracción de ADN y de proteínas

Para el aislamiento de ADN de las diversas muestras de tejido obtenidas en los diferentes ensayos y de cola, para el genotipado de los animales, se procedió a la digestión del tejido en cuestión a 55°C con una solución de lisis (Tris-HCl 1M pH8.0, NaCl 5M, SDS 10%, EDTA 0.5M pH8.0) a la que se le añade proteinasa K llevada a una concentración final de 400µg/ml. Tras unas doce horas, las muestras fueron tratadas con una solución saturada de NaCl, precipitadas con un volumen de isopropanol y tras un lavado con etanol al 70%, resuspendidas en el tampón TE (Tris-HCl 10mM pH8.0, EDTA 1mM pH8.0).

Para el aislamiento de proteínas, los tejidos fueron lisados en una solución de Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, NP-40 0.5% e inhibidores de proteasas (PMSF 100 mM y un cocktail de inhibidores en forma de tableta, Complete Mini, Roche) y de fosfatasa (Ortovanadato sódico 100mM y NaF 1mM). Tras la lisis, los extractos fueron sonicados (10 segundos, amplitud 30%), manteniendo las muestras en hielo para evitar sobrecalentamientos, y centrifugados 20 minutos a 13.000 rpm. Finalmente, el sobrenadante fue congelado a una temperatura de -80°C.

### 5.2.6. Análisis genómico de ADN por southern blot

En este caso se emplearon 20 µg de ADN genómico aislado para el análisis por Southern. El ADN fue digerido toda la noche a 37°C empleando el enzima BamHI. Al día siguiente, las muestras fueron corridas en un gel de agarosa al 0.7%. A continuación se realizaron tres lavados sucesivos; el primero de 10 minutos en HCl 0.25N, el segundo de 20 minutos en una solución desnaturizante de NaCl 1.5M/NaOH 0.5N y el tercero de, al menos, otros 20 minutos en una solución neutralizante de NaCl 1.5M/ Tris-HCl 0.5M a pH 7.4. Una vez completados los lavados se procedió a la transferencia por capilaridad a una membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham) empleando SSC 10X como solución de transferencia. Al día siguiente el ADN se une covalentemente a la membrana aplicando una cantidad de  $1.2 \times 10^5$  µjulios de radiación UV (UV Stratalinker 1800, Stratagene). La membrana fue lavada con SSC 2X y bloqueada con solución de hibridación durante unas 4 horas a 42°C con el objeto de minimizar las uniones inespecíficas entre la sonda y el ADN no específico. Como sonda se empleó un fragmento de 560 pb que fue marcada empleando  $\alpha$ -p<sup>32</sup>-dCTP. La sonda marcada fue hibridada con la membrana durante 24 horas a 42°C. Al día siguiente, se practicaron tres lavados sucesivos de 20 minutos cada uno en condiciones cada vez menos estrictas: primer lavado en SSC 2X/SDS 0.1%, segundo lavado en SSC 1X/SDS 0.1% y tercer lavado en SSC 0.1X/SDS 0.1%.

Finalmente, tras exponer durante 24 horas la membrana, la señal fue cuantificada por medio del Phosphorimager. En el caso de los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$  se generan dos fragmentos: el correspondiente al alelo condicional de 4.3 Kb y el correspondiente al alelo escindido de 2.6 Kb.

### 5.2.7. Análisis de proteínas

En primer lugar se determinó la concentración de proteínas por medio del reactivo Bradford empleando cantidades conocidas de BSA para generar una curva patrón. Se tomaron 30  $\mu$ gr de cada muestra para cargar en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%. Como marcador de tamaño se empleó un marcador comercial (Precision Plus Standards-Dual Color de BioRad). Tras correr la electroforesis, las muestras fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (BioRad) mediante transferencia húmeda (TransBlot de BioRad). Las membranas fueron bloqueadas empleando solución de TBS-T+5% de leche durante una hora a temperatura ambiente e incubadas con anticuerpos contra Cdk2 (M2; Santa Cruz), Cdk4 (C22, Santa Cruz), Cdk6 (anticuerpo policlonal generado en el CNIO), Cdk1 (17, Santa Cruz), CycD1 (DCS-6, NeoMarkers), CycD2 (593, Santa Cruz) y  $\beta$ -Actina (AC15, Sigma). Cada una de las incubaciones se realizó siguiendo las recomendaciones marcadas por la compañía para cada anticuerpo. Como anticuerpos secundarios se emplearon anticuerpos IgG conjugados con peroxidada procedentes de la compañía Dako. Finalmente, para la detección se empleó un compuesto quimioluminiscente (ECL, Amersham).

Para los ensayos de inmunoprecipitación, se tomaron unos 300 $\mu$ g de extracto total de proteínas a los que se les añadió 5-10 $\mu$ l de anti-Ciclina D2 (593, Santa Cruz). Cada muestra se dejó incubando con agitación a 4°C durante toda la noche. A la mañana siguiente se añadieron 150 $\mu$ l de mezcla microesferas asociadas a sefarosa (Amersham) en TBS-T para arrastrar los complejos unidos a CycD2. Esta incubación se realizó durante 2 horas a 4°C en agitación continua. Tras esta incubación, se realizaron 3 lavados consecutivos con el tampón NP-40, precedidos de cada uno de ellos por una cetrifugación de las muestras a 8000rpm durante 1 minuto y a 4°C. Finalmente, las muestras eran desnaturalizadas (y así separadas de las microesferas) añadiendo tampón de carga con agente desnaturalizante (DTT), hervidas a 98°C durante 3 minutos, centrifugadas a 13000rpm durante 2 minutos y cargadas en un gel de poliacrilamida. Como control negativo de la inmunoprecipitación se empleaba una muestra a la que no se le añadía el volumen correspondiente a anti-CycD2, aunque se

seguían el resto de pasos normalmente. Como control positivo se cargaron 15µg de extracto total, sin inmunoprecipitar.



# 6. Resultados

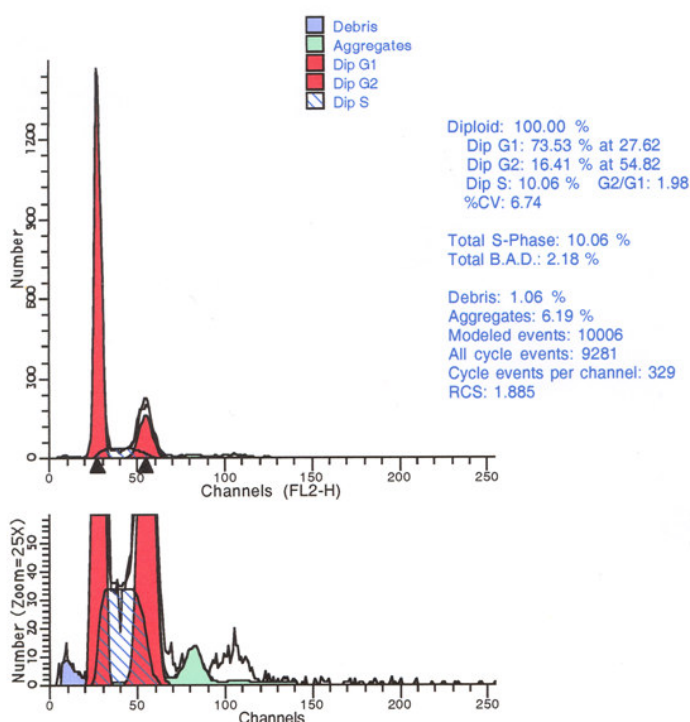


## 6.1. Determinación de los perfiles transcripcionales de fibroblastos embrionarios murinos

Existen varios tipos de micromatrices o chips de ADN para estudiar patrones de expresión génica. Uno de ellos es el chip de hibridación genómica comparativa o chip CGH (por Comparative Genomic Hybridization). La función de éstos chips es la de estudiar posibles ganancias de material cromosómico, debido a procesos de duplicación o de amplificación, o pérdidas cromosómicas debido a la deleción de regiones cromosómicas enteras. La resolución media de este chips es de, aproximadamente, 1 Mb (Inazawa et al., 2004; Mantripragada et al., 2004). Por otro lado se encuentran los denominados comúnmente como chips de ADN que pueden ser, a su vez, chips de ADN complementario (ADNc) o chips de oligonucleótidos. En el caso de los experimentos descritos en esta memoria se emplearon chips generados en la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. Más concretamente, el chip estaba constituido por unos 21000 clones de ADNc de ratón. La principal fuente de material génico empleado fue la colección de clones del National Institute of Aging (NIA), perteneciente a los National Institutes of Health (NIH, EE.UU). La colección de NIA contiene actualmente unos 30000 clones diferentes aunque en el momento de fabricar los chips usados para los experimentos descritos en esta memoria se reducía a tan sólo 16000 clones obtenidos de embriones pre- y peri-implantatorios, de gónadas de hembras en día 12.5 de desarrollo embrionario (E12.5) y de ovarios de hembras recién nacidas. El tamaño medio de estos clones era de una 1.5 Kb. Aproximadamente un 60% de los clones presentes en la colección representan a genes nuevos, con función desconocida (Tanaka et al., 2000). Adicionalmente, se incluyeron otros 1000 clones obtenidos de la compañía Research Genetics y del consorcio público IMAGE. En este grupo encontramos seleccionados oncogenes, genes supresores de tumores y otras moléculas de interés en procesos como la transducción de señales y el contacto celular, y que no se encontraban presentes en la colección de clones de NIA. A modo de control, 3000 clones procedentes de la colección NIA y los 1000 clones procedentes de Research Genetics e IMAGE se encontraban duplicados. Finalmente, se añadieron otros 1000 clones que ocupaban posiciones de control y que incluían genes de bacterias, levaduras o plantas y genes de expresión regular, denominados genes de mantenimiento celular o *Housekeeping genes*. Por tanto, en el chip se encontraban impresos unos 21000 clones totales distribuidos en 48 submatrices de 441 clones cada una.

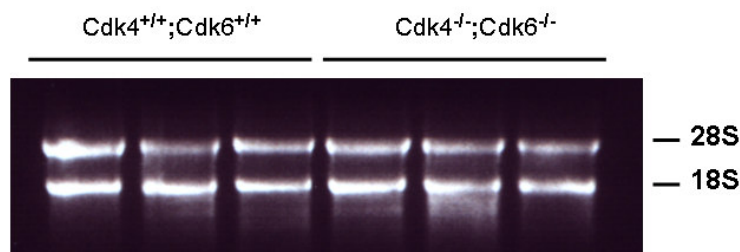
Con el objetivo de poder determinar si el fenotipo letal observado en los animales doblemente deficientes para Cdk4 y Cdk6 podía deberse, al menos en parte, a fallos en el programa transcripcional de la ruta Cdk4-6/Ciclina D/Rb se procedió a estudiar el patrón de expresión génica de fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) primarios Cdk4<sup>-/-</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup> y compararlo con el de los MEFs primarios silvestres empleando los chips de ADN descritos en el párrafo anterior. Puesto que Cdk4 y Cdk6 intervienen en la reentrada en el ciclo celular desde G0, conectando las señales mitogénicas externas con la maquinaria regulatoria del ciclo celular (Sherr y Roberts, 1991; Stacey y Kazlauskas, 2002), para determinar las posibles alteraciones concretas que se pudieran producir en los perfiles de expresión génica provocados por la ausencia de estas dos quinasas se sincronizaron las células en G0 por privación de suero del medio de cultivo durante 48 horas. Pasado este tiempo se añadió medio fresco con suero a las células, lo que las permitió entrar de nuevo en el ciclo celular desde el estado de quiescencia y poder obtener muestras en diferentes tiempos representativos con las que analizar los patrones de expresión génica globales.

En el caso de las células Cdk4<sup>+/+</sup>;Cdk6<sup>+/+</sup> se emplearon 8 embriones diferentes para obtener los MEFs primarios y, posteriormente, generar una única muestra general de ARNm para cada uno de los tiempos que iban a ser estudiados. Para el caso de las células Cdk4<sup>-/-</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup> se emplearon 3 embriones distintos a la hora de obtener los MEFs primarios. Se siguió esta estrategia de obtener una única muestra de ARNm de referencia para cada uno de los puntos a analizar con el objetivo de minimizar posibles diferencias entre embriones y sincronizaciones del genotipo silvestre. Estas diferencias podrían enmascarar, a su vez, el verdadero resultado del experimento. En ambos casos (MEFs silvestres y doble KO Cdk4/Cdk6) el ensayo de sincronización fue realizado con células a fase 3 (antes de que pudieran empezar a expresar marcadores de senescencia). Pasadas 48 horas tras la retirada del suero, se añadió medio fresco con suero fetal bovino, lo que permitió la reentrada en el ciclo de las células primarias. A distintos tiempos tras la adición de medio fresco se recogieron muestras para poder llevar a cabo el estudio de los perfiles transcripcionales. Más concretamente, se recogieron células en el momento de la adición del medio fresco (0 horas), a 8 horas, a 16 horas (que se correlaciona con el pico de MEFs primarios en fase S), y a 24 horas. En el caso del tiempo 0h. se obtuvo muestra adicional para poder estudiar el grado de sincronización estudiando el perfil del ciclo celular por medio de citometría de flujo y tinción con yoduro de propidio. Este análisis mostró una sincronización muy similar en todos los cultivos de MEFs empleados (Fase G1: 73.12±1.2%; Fase S: 9.8±1.8%; Fase G2/M: 17±0.9%) (Fig. 12).



**Figura 12. Sincronización de MEFs primarios  $Cdk4^{-/-};Cdk6^{-/-}$  en G0 tras 48 en medio sin cultivo.** La figura muestra el resultado del análisis del perfil de ciclo celular empleando el software de ModFit (Verity House Software, Inc.).

total fue analizado se procedió a su marcaje con los fluorocromos Cy3 (que emite fluorescencia con una longitud de onda correspondiente a 532nm, en el espectro del verde) y Cy5 (que emite a 635nm, en el espectro del rojo) para su posterior hibridación en los chips de ADN.

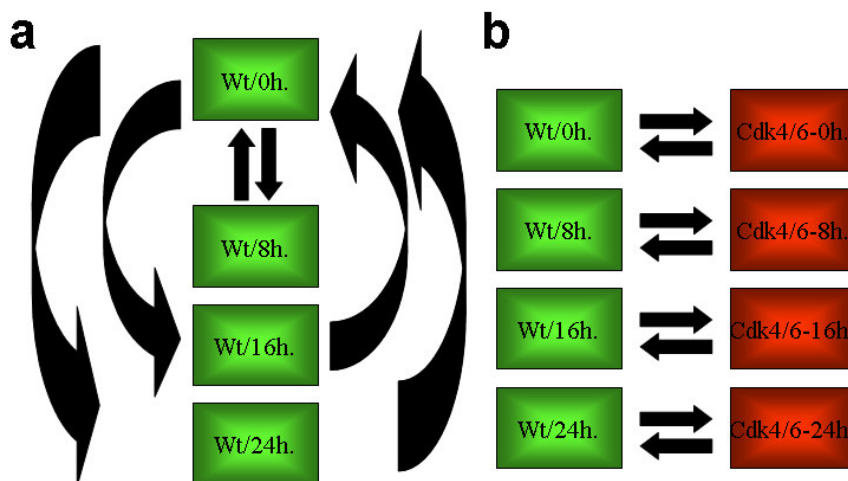


**Figura 13. Análisis del ARN total aislado para varias muestras de MEFs.** Uno de los criterios a la hora visualizar el grado de degradación del ARN total es observar la aparición de dos bandas discretas correspondientes a ARN ribosómico 28S y 18S. La ausencia de estas y la aparición de una banda continua y extendida de ARN total indicaría absoluta degradación de la muestra.

En cuanto a las hibridaciones que se llevaron a cabo, se realizaron dos grupos distintos de hibridaciones: 1) Por un lado se hibridaron las muestras de ARN total procedente de MEFs silvestres a tiempos 8h., 16h. y 24h. con las muestras de ARN

Una vez extraído el ARN total (que comprende a las fracciones de ARN mensajero, ribosómico y transferente), este se cuantificó y se procedió a analizar el grado de integridad de la muestra por análisis de las fracciones de ARN ribosómico 18S y 28S (Fig. 13). En el caso de observarse degradación en estas dos bandas la muestra quedaba descartada. Una vez que el ARN

procedentes de MEFs silvestres a tiempo 0h. De este modo, podríamos comprobar los cambios transcripcionales que se producían asociados a las distintas fases del ciclo y contrastarlos con los ya descritos en la literatura. 2) Por otro lado se hibridaron las muestras procedentes de MEFs  $Cdk4^{+/+};Cdk6^{+/+}$  a un tiempo determinado con las procedentes de MEFs  $Cdk4^{-/-};Cdk6^{-/-}$  a ese mismo tiempo (Fig. 14).



**Figura 14. Esquema de los dos grupos de hibridaciones que se llevaron a cabo.** a) Comparaciones de ARN total silvestres a tiempo cero con el ARN total, también, silvestre pero a otros tiempos. b) Comparaciones de ARN total silvestres a un tiempo dado con el ARN total aislado doble KO para ese mismo tiempo. El sentido de las flechas indica el marcaje realizado (Cy5/cabeza y Cy3/cola).

Para el primer grupo de comparaciones, se duplicaron cada una de las hibridaciones. Para el segundo, se realizó una única hibridación entre la muestra general de ARN total silvestre y cada una de las muestras de ARN total procedentes de cada uno de los embriones empleados en la extracción de MEFs doble KO  $Cdk4/6$  (excepto a tiempo 24h. que triplicaron). Otro de los controles que se llevaron a cabo fue el intercambio de la combinación de Cy3/Cy5. Esta estrategia de hibridación es conocida como inversión de fluorocromos o Dye Swap y se emplea para poner de relieve ARN totales que al retrotranscribirse a ADNc tengan tendencia a incorporar con más facilidad uno de los fluorocromos (debido, por ejemplo, a razones estéricas) que el otro. Así, en las comparaciones silvestre/silvestre, en una de ellas el tiempo 0h. estaba marcado con Cy3 y el otro tiempo en cuestión con Cy5 y en la otra hibridación era el tiempo 0h. el que estaba marcado con Cy5 y el otro tiempo con Cy3. En las comparaciones silvestres/doble KO  $Cdk4/6$  para cada tiempo, dos de ellas fueron realizadas marcando la muestra silvestre con Cy5 y la doble mutante con Cy3 y en la hibridación restante se marcó la muestra silvestre con Cy3 y la doble mutante con Cy5.

Tras llevar a cabo las hibridaciones y obtener la imagen resultante, ésta fue analizada empleando el programa GenePix 5, creado por Axon Instruments, inc. Este

programa permite el filtrado de los datos según unos parámetros establecidos que se ajustan en función de la calidad de imagen de cada uno de los puntos que representan a cada uno de los clones presentes en el chip. Una vez aplicado el factor de normalización correspondiente a cada punto del chip, se tiene en cuenta el logaritmo en base 2 del ratio de emisión 635 con la emisión 532 ( $\log_2 635/532$ ). Cuando el resultado de este logaritmo es igual o superior a 1 se considera que ha habido al menos el doble de expresión de ese clon para la muestra marcada con Cy5. Si el resultado es igual o inferior a -1 se considera que ha habido una sobreexpresión de ese clon para la muestra marcada con Cy3. Tan sólo se consideran como genes expresados diferencialmente de manera significativa aquellos en los que se cumple el anterior criterio. Este es un criterio ampliamente extendido en la literatura científica al respecto (Iyer et al., 1999; Cho et al., 2001; Ishida et al., 2001; Whitfield et al., 2001; Cooper et al., 2003).

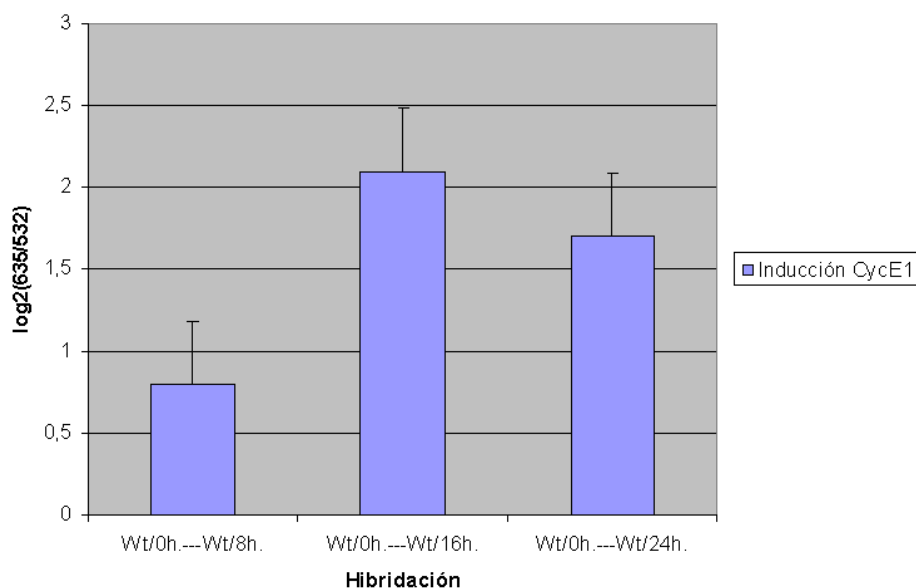
Comparación (Hibridación)	Genes inducidos	Genes reprimidos
Wt/0h.-Wt/8h.	208 Heat Shock protein 25kDa, Serum/glucocorticoid regulated kinase, Coagulation factor III, Immediate early response 3 protein, Eukaryotic translation Initiation factor 5A, Eukaryotic translation initiation factor 4E, Mitogen activated protein kinase 6...	326 Son cell proliferation protein, rho GTPase activating protein...
Wt/0h.-Wt/16h.	89 Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Cyclin E1...	631 Insuline-like growth factor 1, cyclin G, p300/CBP-associated factor, Eukaryotic translation initiation factor 3, Growth arrest specific 1...
Wt/0h.-Wt/24h.	106 Cell division cycle 2 homolog A (S.pombe), cyclin A2, MAD2, Cyclin B1, Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), CDC28 protein kinase 1...	739 Diacylglycerol kinase, alpha 80 kDa., glycogen synthase kinase 3 beta, insulin-like growth factor binding protein 4, p300/CBP-associated factor, Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide...

**Tabla 1: Resumen de los cambios de expresión génica asociados a ciclo celular.**

Resumen de los principales cambios en la expresión de genes en MEFs primarios silvestres a pase 3 que han sido sincronizados en G0 por privación de suero durante 48 horas. Una vez pasado este tiempo, la adición de medio fresco permite la reentrada sincronizada en el ciclo celular. Se obtuvieron muestras a 0h., 8h., 16h. y 24 horas para extraer el ARN total y poder marcarlo convenientemente. Las hibridaciones se llevaron a cabo comparando los tiempos 8h., 16h. y 24h., respectivamente, con 0h. (células en G0). Destaca la inducción en las primeras fases del ciclo de genes relacionados con el proceso de cicatrización de heridas, algo ya descrito anteriormente en la literatura.

Las hibridaciones de las muestras silvestres a distintos tiempos con la muestra silvestre a tiempo 0h. indicó la modificación en la expresión de diferentes genes de manera estadísticamente significativa a lo largo de los diferentes momentos del ciclo

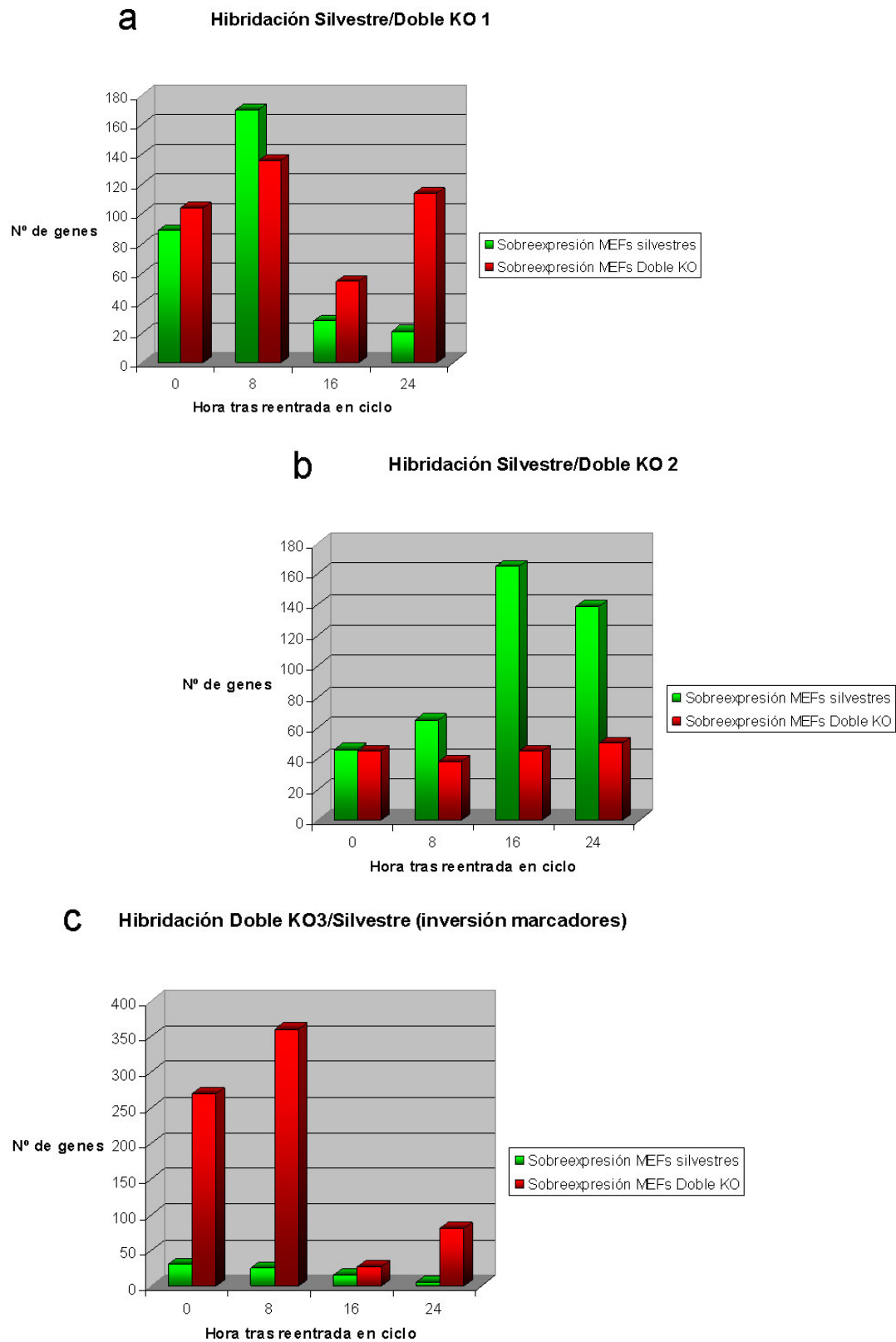
celular (Tabla1). Muchos de estos genes se correspondían con genes cuyo patrón de expresión se encontraban ya bien descritos en la literatura (Fig. 15).



**Figura 15. Niveles de inducción de CycE1.** Hibridación ARN total procedente de MEFs silvestres a 0 horas contra ARN total procedente de MEFs silvestres a diferentes horas. La expresión génica queda reflejada como el ratio de la intensidad emitida por el Cy5 (635nm) con el que se marcó el ARN total procedente de las muestras a 8h., 16h. y 24h. frente a la intensidad emitida por el Cy3 (532nm) con el que se marcó el ARN total procedente de la muestra a 0h. Las barras de error representan la desviación estándar (n=3).

Es más, al igual que en anteriores resultados (Iyer, 1999; Ishida, 2001) también se detectaron genes implicados en la cicatrización de heridas. Estos resultados pusieron de manifiesto que el sistema experimental empleado en estos ensayos funcionaba correctamente. En las hibridaciones entre muestras  $Cdk4^{+/+};Cdk6^{+/+}$  y muestras  $Cdk4^{-/-};Cdk6^{-/-}$  no se encontraron genes cuya expresión estuviera modificada de manera estadísticamente significativa a lo largo de las tres series de hibridaciones llevadas a cabo empleando MEFs doble KO procedentes de embriones distintos. Los dos únicos genes cuya expresión se encontraba sistemáticamente alterada en todas las hibridaciones de cada tiempo fueron *Cdk4* y *Cdk6* (dato esperado pues los animales doble KO de *Cdk4* y *Cdk6* deben carecer de toda expresión de estos dos genes). Sin embargo, hay que hacer notar que en cada hibridación sí se encontraron genes cuya expresión resultaba modificada diferencialmente (el  $\log_2 635/532$  resultaba superior o igual a +1 o inferior o igual a -1; es decir, mayor expresión en la muestra doble KO o en la silvestres, respectivamente) (Fig. 16). Este último hecho ponía en evidencia la existencia de una fuerte señal de ruido que podía variar de una tanda de hibridaciones a otra. Es más, cada una de las tres hibridaciones entre muestras silvestres y muestras doble KO *Cdk4/6* a tiempo 24h.





**Figura 16. Resultados de las comparaciones  $Cdk4^{+/+};Cdk6^{+/+}/Cdk4^{-/-};Cdk6^{-/-}$ .** En cada una de las series de hibridaciones que se llevaron a cabo se detectaron cambios significativos en la expresión de un número elevado de genes; no obstante, al comparar una serie con otra, estos cambios no se mantenían.

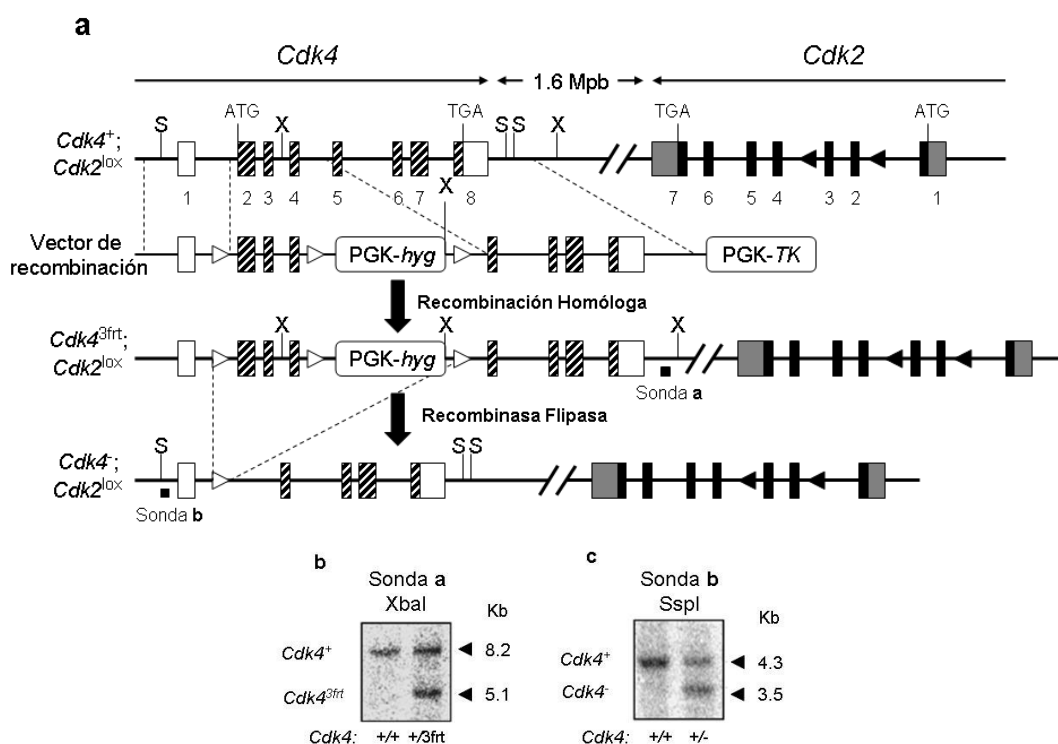
fueron repetidas para averiguar si el origen del ruido de fondo podría provenir de un marcaje inadecuado de las muestras. Estas hibridaciones adicionales mostraron que para una misma muestra de MEFs doble KO Cdk4/6 comparada con la muestra general de MEFs silvestres, la reproducibilidad de los genes expresados diferencialmente era de un 90%, aproximadamente.

En conclusión, a pesar de que sí fueron detectados cambios estadísticamente significativos asociados a ciclo celular en la expresión de genes cuando comparábamos las muestras de un mismo genotipo a distintos tiempos (hibridaciones de muestras silvestres a tiempo 0h. con muestras silvestres a tiempo 8h., 16h. y 24h.) y que un alto número de esos cambios habían sido descritos con anterioridad en la literatura científica, no se detectaron cambios significativos (a parte de Cdk4 y Cdk6) cuando comparábamos las muestras de los dos genotipos para un mismo tiempo. En cambio sí se detectó una señal de ruido, consistente cuando se repetía una misma hibridación, cuya causa podía deberse a varias razones como una sincronización imperfecta. Experimentos adicionales llevados a cabo por otros miembros del laboratorio pusieron de relieve una posible explicación a la ausencia de diferencias obvias en los perfiles de transcripción entre células silvestres y células Cdk4<sup>-/-</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup>, la compensación por parte de Cdk2, asociada a las Ciclinas D (Ver sección de Discusión).

## 6.2. Generación y caracterización de animales defectivos en Cdk4 y Cdk2

### 6.2.1. Generación de animales deficientes de Cdk4 y Cdk2.

Para determinar el papel *in vivo* que desempeñan estas dos quinasas dependientes de ciclina se decidió realizar un abordaje genético consistente en la generación de un animal doble mutante  $Cdk4^{+/-};Cdk2^{+/lox}$ . Con esta finalidad, en el laboratorio los Dres. C. Barrière y D. Santamaría procedieron a la generación de un vector de recombinación homóloga, con el que conseguir la eliminación de Cdk4, y posterior electroporación del mismo en células ES (por Embryonic Stem cells) que portaban previamente un alelo condicional para Cdk2 (Fig. 17).



**Figura 17. Generación de los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{lox/lox}$  y  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{-/-}$ .**

a) Estrategia de clonaje. El vector de recombinación portaba tres secuencias *frt*, flanqueando los exones 2 y 4, así como un cassette de resistencia a hlogomicina para ser usado como marcador de selección positiva. El vector también contiene un cassette *PGK-TK* como marcador de selección negativa. Clones recombinantes de células ES que contenían un alelo *Cdk2<sup>lox</sup>* fueron empleados para generar animales que portaban los alelos *Cdk4<sup>3frt</sup>* y *Cdk2<sup>lox</sup>* en el mismo cromosoma. Los animales generados fueron cruzados sucesivamente con animales transgénicos de Flipasa (*pCAG-FLPe*) y de Cre (*CMV-Cre*) para generar, primero, descendencia *Cdk4<sup>-/-</sup>;Cdk2<sup>lox/lox</sup>*. Las secuencias codificantes de *Cdk4* se indican con líneas oblicuas. Los exones no codificantes se indican por el rectángulo hueco. Las secuencias codificantes de *Cdk2* se marcan con rectángulos en blanco y negro, respectivamente. Los no codificantes con color gris. Las secuencias *frt* y *loxP* se indican por triángulos en blanco y negro, respectivamente. Tan sólo se indican las enzimas de restricción empleadas en el análisis de los clones recombinantes. La localización de las sondas a y b empleadas en los análisis por southern se indican por una gruesa línea negra. b) Southern blot para identificar los clones positivos para el alelo *Cdk4<sup>3frt</sup>*. c) Southern blot para identificar los clones portadores del alelo *Cdk4<sup>-/-</sup>*.

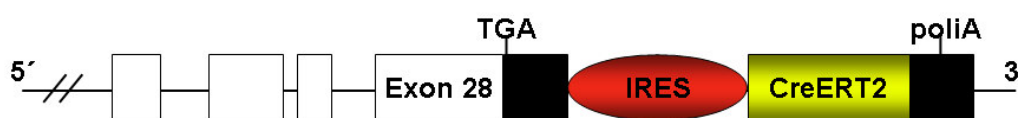
Se optó por esta estrategia debido a que la proximidad física de ambos locus, apenas 1.6Mb, complica la generación de este modelo por cruces entre animales  $Cdk4^{+/-}$  y  $Cdk2^{+/lox}$  sencillos puesto que la frecuencia de recombinación y, por tanto, segregación de los dos locus es muy baja. Las recombinaciones meióticas ocurren con una frecuencia de 1% cada 2Mb en el genoma del ratón (Silver, 1995). Según estos números para el caso de  $Cdk2$  deberíamos esperar una frecuencia de recombinación de tan sólo un 0.8%.

En primer lugar, se partió de un plásmido pBluescript en el cual se había clonado un fragmento de ADN genómico de unas 6.4kb (*EcoRI-BamHI*) que contenía el locus de  $Cdk4$  y que a su vez había sido aislado de una librería de ADN genómico procedente de la cepa murina 129Sv/J. Se insertó un sitio *frt* unas 230pb 5' del exón 2. Adicionalmente, se insertó un casete de resistencia a higromicina *frt-PGK-HygR-frt* a 115pb 3' del exón 4. También se incorporó un casete de selección PGK-timidín quinasa (TK, por Thymidine Kinase) como elemento de selección negativa tal y como se había descrito anteriormente (Rane et al., 1999).

El vector de recombinación homóloga fue electroporado en células ES que portaban un alelo KO condicional para  $Cdk2$  (Ortega et al., 2003). En este alelo, los exones 2 y 3 se encuentran flanqueados por sendas secuencias *loxP*. El análisis por medio de southern blot de aquellos clones que resultaron ser doblemente resistentes a higromicina y ganciclovir (*HygR/GanR*) permitieron la identificación de cuatro recombinantes (Fig. 17b) que fueron agregados a mórulas del tipo CD1. Las quimeras macho derivadas de dos de los clones recombinantes (ESD1.15 y ESDS1.66) cosegregaron los alelos "targueteados"  $Cdk4$  ( $Cdk4^{3frt}$ ) y  $Cdk2$  ( $Cdk2^{lox}$ ) a su descendencia.

La descendencia resultante  $Cdk4^{+3frt};Cdk2^{+/lox}$  fue puesta en cruce con el transgénico pCAG-Flpe (Rodríguez et al., 2000) con el objeto de eliminar el casete de selección PGK-*HygR* y los exones del 2 al 4 (Fig. 17a). Los animales  $Cdk4^{+/-};Cdk2^{+/lox}$  obtenidos fueron puestos en cruce con animales  $RERT^{ert/ert}$  generados en el laboratorio por la Dra. M. Campuzano (Guerra et al., 2003), para obtener animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$ . Los animales  $RERT^{ert/ert}$  poseen una forma de la recombinasa Cre, la CreERT2 (Feil et al. 1996), codificada por el alelo *ert* que ofrece la posibilidad de crear un sistema inducible de escisión de secuencias *loxP* mediante la activación controlada de manera temporal y espacial de la recombinasa. En este modelo, el ADNc correspondiente a la Cre es fusionado al de una forma mutada del receptor de estrógenos, creándose, así, una proteína quimérica de tal manera que la translocación al núcleo y, por tanto, el posterior reconocimiento de sus secuencias *loxP* dianas y su

acción recombinante va a producirse tan sólo en presencia del tamoxifeno, un derivado artificial del estrógeno, o de derivados de éste. En nuestro caso y a lo largo de todos los ensayos descritos en esta memoria será empleado el 4-hidroxitamoxifeno o 4-OHT en lugar del tamoxifeno. Tras el tratamiento con 4-OHT la proteína Cre-ERT2 se unirá al transportador nuclear de estrógenos y translocarse al núcleo. Una vez allí, reconocerá los motivos loxP y deletará toda región genómica que se sitúe entre ellos. Con el objetivo de lograr una expresión lo más obicua posible de nuestra recombinasa quimérica se insertó su ADNc en la región 3'UTR del locus de la ARN polimerasa II, polimerasa encargada de la transcripción de los ARN mensajeros. Puesto que todas las células de cualquier organismo requieren sintetizar este tipo de ARNs, es de suponer que todas ellas expresarán el gen de la ARN polimerasa II. Precediendo a la secuencia de ADNc de la Cre-ERT2 se insertó una secuencia IRES (de Internal Ribosomal Entry Site) para lograr un único ARNm que codificara por separado para las proteínas de las ARN pol II y Cre-ERT2. En conclusión, en el modelo RERT la expresión de la Cre-ERT2 queda bajo el control del promotor de la ARN pol II y su actividad bajo el control de la adición exógena del 4-OHT (Fig. 18).



**Figura 18. Esquema del alelo ert que codifica para la recombinasa CreERT2.** El alelo se sitúa entre el TGA y el poliA del locus de la ARN polimerasa II. Entre el TGA y el ADNc de la recombinasa se inserta una secuencia IRES, responsable de la síntesis de un ARNm bistrónico que codifica por separado para la polimerasa y la recombinasa.

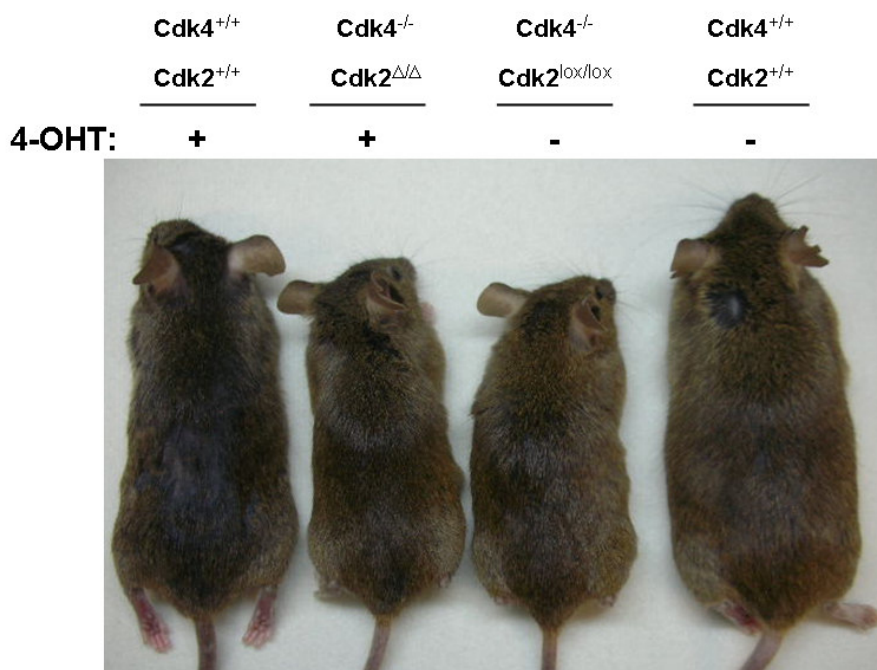
Finalmente, aquellos animales donde se había segregado el transgen de la flipasa (empleado en la selección de recombinantes positivos de células ES) fueron empleados para generar la colonia de animales  $Cdk4^{+/-}; Cdk2^{+/lox}; RERT^{ert/ert}$  a partir de los cuales se establecerían los cruces que generarían los animales de interés.

Los animales  $Cdk4^{+/-}; Cdk2^{+/lox}; RERT^{ert/ert}$  nacen con la frecuencia mendeliana esperada, son del todo viables y no presentan diferencias anatómicas o de comportamiento con respecto a los hermanos de camada silvestres, llegando a tener una vida media exactamente igual (de aproximadamente unas 100-110 semanas).

### 6.2.2. Caracterización fenotípica de los animales doble mutantes para Cdk4 y Cdk2

La mayoría de los estudios que emplean aproximaciones genéticas en ratón suelen limitarse a estudios de desarrollo embrionario, en particular cuando las mutaciones introducidas resultan en un fenotipo letal embrionario. Como ya hemos comentado previamente, la posibilidad de emplear modelos KO condicionales nos permite estudiar posibles diferencias en los requerimientos de Cdk4 y Cdk2 por parte de un organismo según la fase de desarrollo en la que se encuentre éste (embrionaria o post-natal, por ejemplo).

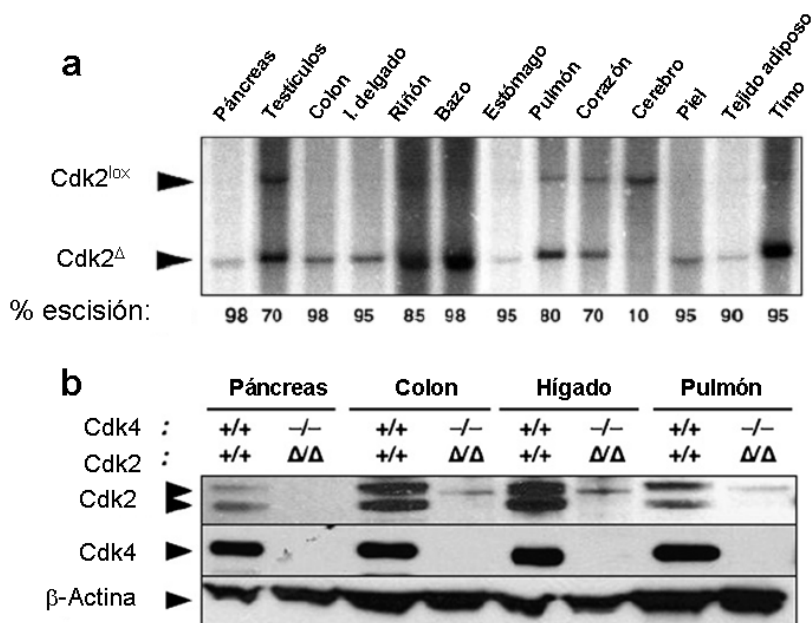
Los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$  nacen de los cruces de animales  $Cdk4^{+/-};Cdk2^{+/lox};RERT^{ert/ert}$  según la frecuencia mendeliana esperada de aproximadamente un 25% (No hay que olvidar que estos dos alelos co-segregan juntos). Este dato no es sorprendente puesto que los animales  $Cdk4^{-/-}$  son viables y nacen, a su vez, con la frecuencia que les corresponde (ver apartado 3.6.1) (Rane et al., 1999; Tutsui et al., 1999).



**Figura 19. Homeostasis normal en animales adultos  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$ .** Animales  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$ ,  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  de 5 meses de edad, tratados durante 4 meses (desde P21) con 4-OHT y animales  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$ ,  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$  de la misma edad y tratados siguiendo el mismo protocolo con aceite de maíz. El genotipo del alelo ert se ha omitido para mayor claridad en la figura.

Tras destetar a los animales a día P21, los ratones  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$  y sus hermanos de camada  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$

comenzaron a ser tratados con 4-OHT (dos inyecciones semanales de 1mg cada una en 100µl de aceite de maíz) y pesados al mismo tiempo (Fig.19). Este tratamiento se prolongó durante 4 meses para permitir una escisión eficiente de Cdk2 por parte de la recombinasa Cre.

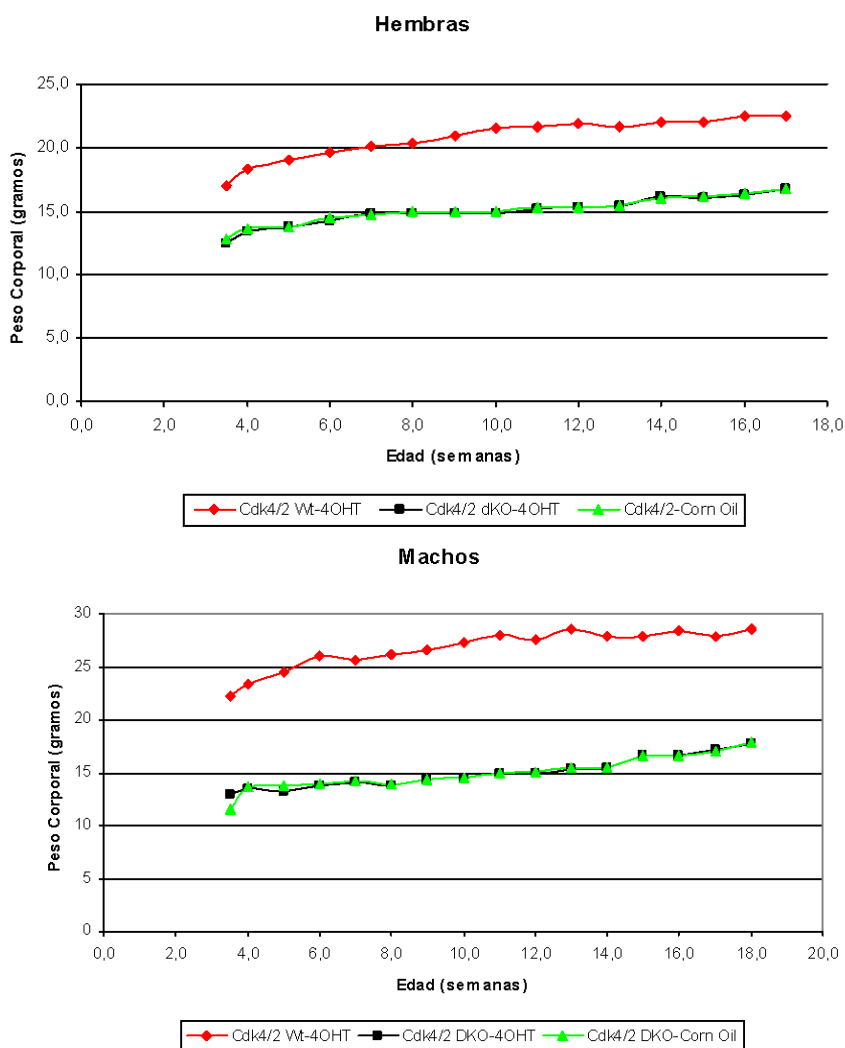


**Figura 20. Eliminación de Cdk2 en animales adultos en fondo nulo para Cdk4.**  
a) Niveles de escisión del alelo condicional Cdk2<sup>lox</sup> en animales Cdk4<sup>-/-</sup>;Cdk2<sup>lox/lox</sup>;RERT<sup>ert/ert</sup> tras el tratamiento durante 4 meses con 4-OHT. El ADN fue aislado del panel de tejidos indicado en la figura de los animales Cdk4<sup>-/-</sup>;Cdk2<sup>Δ/Δ</sup>;RERT<sup>ert/ert</sup> resultantes y analizado por Southern Blot. La migración de los alelos Cdk2<sup>lox</sup> y Cdk2<sup>Δ</sup> se indican por medio de flechas. Al pie de la figura se indica en porcentaje de alelo escindido para cada uno de los tejidos. b) Western blot que refleja los niveles de expresión de Cdk4 y Cdk2 en algunos de los tejidos mostrados en la figura a). Como control se indican los niveles de las mismas proteínas de animales Cdk4<sup>+/+</sup>;Cdk2<sup>+/+</sup>;RERT<sup>ert/ert</sup> tratados también con 4-OHT. La β-actina se empleó como control de carga.

A los 4 meses de tratamiento, los animales fueron sacrificados por CO<sub>2</sub>. Conviene mencionar que los animales Cdk4<sup>-/-</sup>;Cdk2<sup>lox/lox</sup>;RERT<sup>ert/ert</sup> tratados tanto con 4-OHT como con aceite de maíz completaban el tratamiento en un numero similar que los hermanos silvestres de camada. Las únicas muertes producidas eran aquellas debido a un pinchazo incorrecto del compuesto que podía producirles algún daño que obligaba a sacrificarlos. Se procedió a la extracción de todo un panel de tejidos con el objeto de analizar la delección de los dos alelos de *Cdk2*. Tal y como se ilustra en la figura 20 y tras el pertinente análisis por Southern blot, un porcentaje de alrededor del 95% del alelo condicional recombinó en la mayoría de los tejidos recogidos (colon, páncreas, piel, intestino delgado, bazo, estómago y timo). Otros tejidos como el corazón, riñones, pulmón, testículos y tejidos adiposo blanco mostraron unos niveles de recombinación que se extendían desde un 70% hasta un 90%. Tan sólo el cerebro mostró niveles mínimos (alrededor de un 10%) de recombinación del alelo Cdk2<sup>lox</sup>,

una consecuencia debida sin duda alguna a la limitada penetrabilidad del 4-OHT a través de la barrera hematoencefálica.

La reducción en los niveles de expresión de Cdk2 en aquellos tejidos donde se había producido una elevada recombinación del alelo  $Cdk2^{lox}$  (incluyendo colon, hígado, pulmón y páncreas) fue confirmada por western blot (Fig. 20b). La presencia de la proteína Cdk2 se redujo hasta niveles prácticamente indetectables en estos tejidos. A partir de este momento y en adelante, estos animales  $Cdk4^{-/-}; Cdk2^{lox/lox}; RERT^{ert/ert}$  tratados con 4-OHT serán denominados como  $Cdk4^{-/-}; Cdk2^{\Delta/\Delta}; RERT^{ert/ert}$ .



**Figura 21. Peso corporal de los animales en tratamiento.** Evolución del peso de los animales  $Cdk4^{+/+}; Cdk2^{+/+}; RERT^{ert/ert}$  y  $Cdk4^{-/-}; Cdk2^{\Delta/\Delta}; RERT^{ert/ert}$  tratados durante 4 meses con 4-OHT y de los animales  $Cdk4^{-/-}; Cdk2^{lox/lox}; RERT^{ert/ert}$  tratados durante el mismo tiempo con aceite de maíz.

Adicionalmente, un número similar de animales de genotipo doble mutante y silvestre fueron tratados en las mismas condiciones que los anteriores (a partir del día

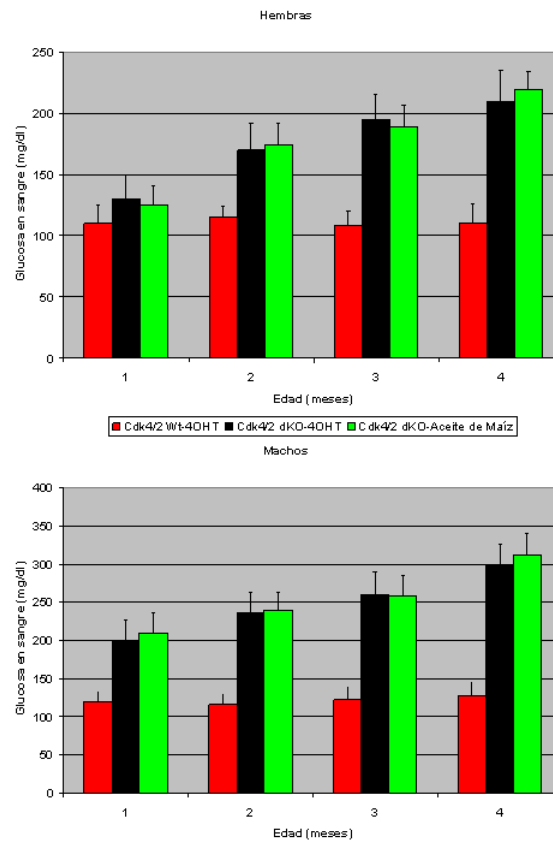


P21, 2 inyecciones de 100µl/semana) con aceite de maíz tan sólo, con el objeto de detectar posibles diferencias entre animales KO sencillos para Cdk4 y doble KO para Cdk4 y Cdk2. Estos animales también fueron pesados previamente a cada inyección.

El análisis del peso y del tamaño de los animales dobles mutantes tratados tanto con 4-OHT como con aceite de maíz (que a partir de este punto y a lo largo del resto de esta memoria se denominarán  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$ ) con respecto a sus hermanos de camada silvestres refleja una reducción en el peso de aproximadamente el 30% en ambos sexos (Fig. 21). Esta reducción se mantiene constante desde el momento en que los animales empiezan a ser tratados hasta que se completa el tratamiento, 4 meses después. Este dato parece apuntar hacia el hecho de que la eliminación de Cdk2 en un fondo nulo para Cdk4 no provoca defectos generalizados ni mayores que los que de por sí provoca la ausencia de Cdk4. La misma reducción en el tamaño que parece producirse en los animales KO sencillos de Cdk4 (reflejada en nuestros animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$ , tratados con aceite de maíz) parece producirse en los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta\Delta};RERT^{ert/ert}$  sin que esta se vea aumentada por la eliminación de Cdk2, lo que confirmaría el anterior dato referente a los pesos.

Puesto que uno de los defectos descritos para los animales KO de Cdk4 (Rane, 1999; Tsutsui, 1999; Martin, 2003) es el desarrollo de diabetes a partir de las 5-6 semanas de edad del animal, aproximadamente, se procedió a la determinación de los niveles de glucosa en sangre de nuestros animales. Dichos niveles fueron medidos mensualmente desde el momento en que comenzó el tratamiento hasta que éste finalizó 4 meses después. Estas mediciones mostraron que tanto para el caso de los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$  como el de los  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta\Delta};RERT^{ert/ert}$ , en comparación con sus hermanos de camada  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$ , habían comenzado a desarrollar hiperglicemia a las 4 semanas de edad. De hecho, los niveles elevados de glucosa en sangre se mantienen similares en ambos grupos de animales mutantes a lo largo de los 4 meses de tratamiento (Fig. 22). Esto quiere decir que la aparición y posterior desarrollo de la diabetes que afecta a los animales KO sencillos para Cdk4 y que ya ha sido estudiada con sumo detalle anteriormente no ve acelerada su aparición ni sus consecuencias son mayores debido a la eliminación de Cdk2. Los datos anteriores parecen señalar de nuevo que la eliminación de manera condicional de Cdk2 no agrava los defectos fenotípicos de por sí presentes ya en el animal KO de Cdk4. Por tanto, podemos concluir que es Cdk4 y no Cdk2 la que juega un papel esencial en la proliferación postnatal de las células  $\beta$  y que ésta última es

dispensable puesto que no realiza ningún papel compensatorio con Cdk4 en el contexto celular del páncreas.



**Figura 22. Valores de glucosa en sangre en ausencia de Cdk4 y Cdk2.** Evolución de la glicemia en los animales  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$  y  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  tratados durante 4 meses con 4-OHT y de los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$  tratados durante el mismo tiempo con aceite de maíz (n=10).

### 6.2.3. Estudio histológico de los animales doble KO para Cdk4 y Cdk2

Con la finalidad de llevar a cabo un estudio más pormenorizado de las características fenotípicas de estos animales se procedió al estudio histopatológico de una variedad de tejidos. Para ello se emplearon animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  y animales silvestres, hermanos de camada. Tras completar los 4 meses de tratamiento con 4-OHT, los animales fueron sacrificados y se extrajo un panel de tejidos similar al descrito en el apartado anterior (gónadas, páncreas, colon, intestino delgado, riñones, bazo...). Las tinciones de las muestras con H&E mostraron que salvo en los casos para los que ya se habían descrito alteraciones en animales KO sencillos de Cdk4 (páncreas, gónadas, pituitaria) no se producían mayores defectos en los tejidos

analizados. En el caso del páncreas, por ejemplo, se detecta la misma reducción en el tamaño y número de islotes endocrinos (Fig. 23).

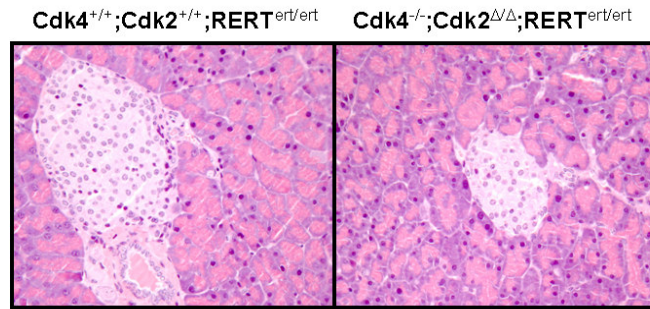


Figura 23. Reducción del tamaño de islotes  $\beta$  en animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta\Delta};RERT^{ert/ert}$ . Tinción H&E de secciones pancreáticas procedentes de animales  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$  y  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta\Delta};RERT^{ert/ert}$  tratados durante 4 meses con 4-OHT. Aumento de 200X.

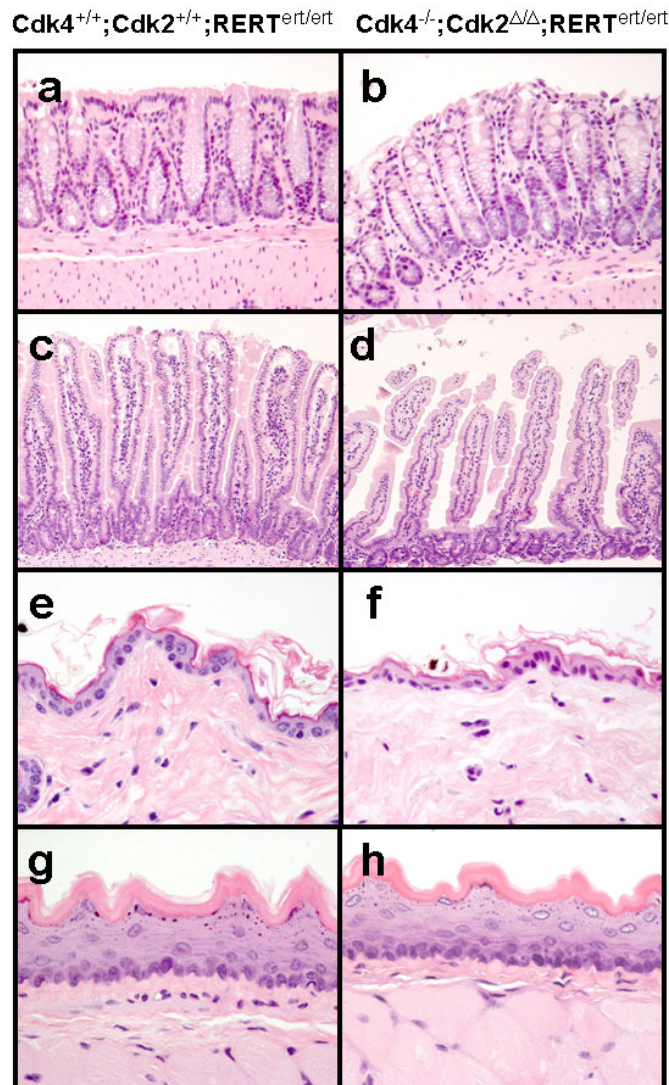
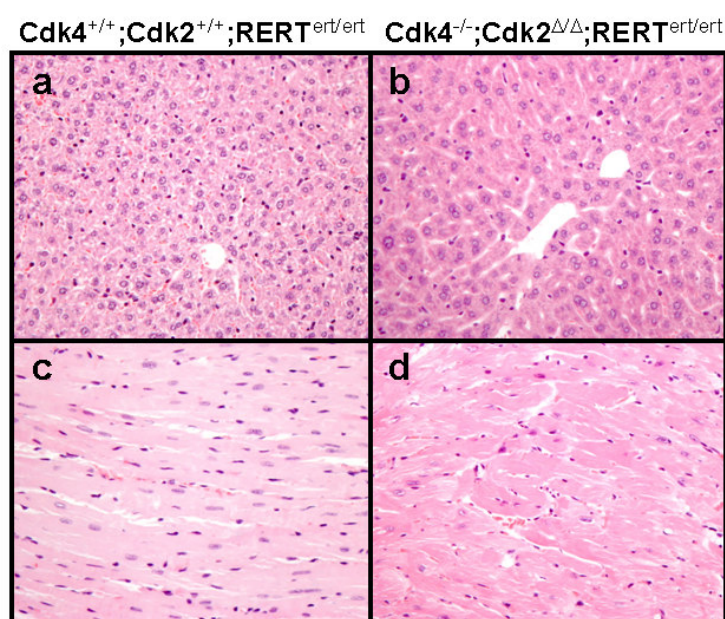


Figura 24. Conservación de la arquitectura celular en ausencia de  $Cdk2$  y  $Cdk4$ . En ausencia de  $Cdk2$  y  $Cdk4$  no se producen alteraciones en tejidos caracterizados por una elevada tasa proliferativa. Tinción de H&E para colon, intestino delgado, piel y esófago de animales  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$  (a, c, e y g) y  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta\Delta};RERT^{ert/ert}$  (b, d, g y h) tratados durante 4 meses con 4-OHT. a, b, e, f, g, y h aumento X200. c y d aumento X100.

Otros tejidos caracterizados por elevados niveles de proliferación como por ejemplo colon e intestino delgado (Fig 24a, b, c y d) mostraban una arquitectura celular normal cuando comparamos los tejidos procedentes de animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  con el procedente de  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$ . Igualmente, la piel y el esófago carecen de defectos obvios al comparar las secciones de tejido procedentes de ambos tipos de animales (Fig. 24e, f, g y h). En el caso de estos cuatro no se han descrito defectos en animales KO de Cdk4 (Rane et al., 1999; Tutsui et al., 1999) o en animales KO de Cdk2 (Ortega et al., 2003; Berthet et al., 2003).



**Figura 25. Ausencia de defectos en tejidos con bajos niveles de proliferación en ausencia de Cdk2 y Cdk4.** Tinción H&E de secciones procedentes de hígado y corazón de animales  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$  (a y c, respectivamente) y de  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  (b y d, respectivamente) tratados 4 meses con 4-OHT. Amplificación x200 en todos los casos.

Tejidos caracterizados por una baja tasa de proliferación como el hígado carecían de defectos obvios en ausencia de Cdk2 y Cdk4 (Fig. 25 a y b). Un tejido al que se le dedicó una especial atención era el corazón. La doble deficiencia de Cdk2 y Cdk4 durante el desarrollo embrionario provoca la muerte de los embriones en las etapas finales (ver sección 7.4) de dicho desarrollo. Esta muerte es debida a un defecto proliferativo de los progenitores de la línea eritroide que, a su vez, provoca anemia. No obstante, un número significativo de estos animales llega a nacer, a pesar de morir a día P1. Los estudios histopatológicos realizados en estos animales muestran como posible causa de la muerte un fallo cardíaco puesto que se produce un estrechamiento de las paredes ventriculares del corazón debido a un descenso en el número de cardiomiocitos que se encuentran en un estado de proliferación (Barrière et

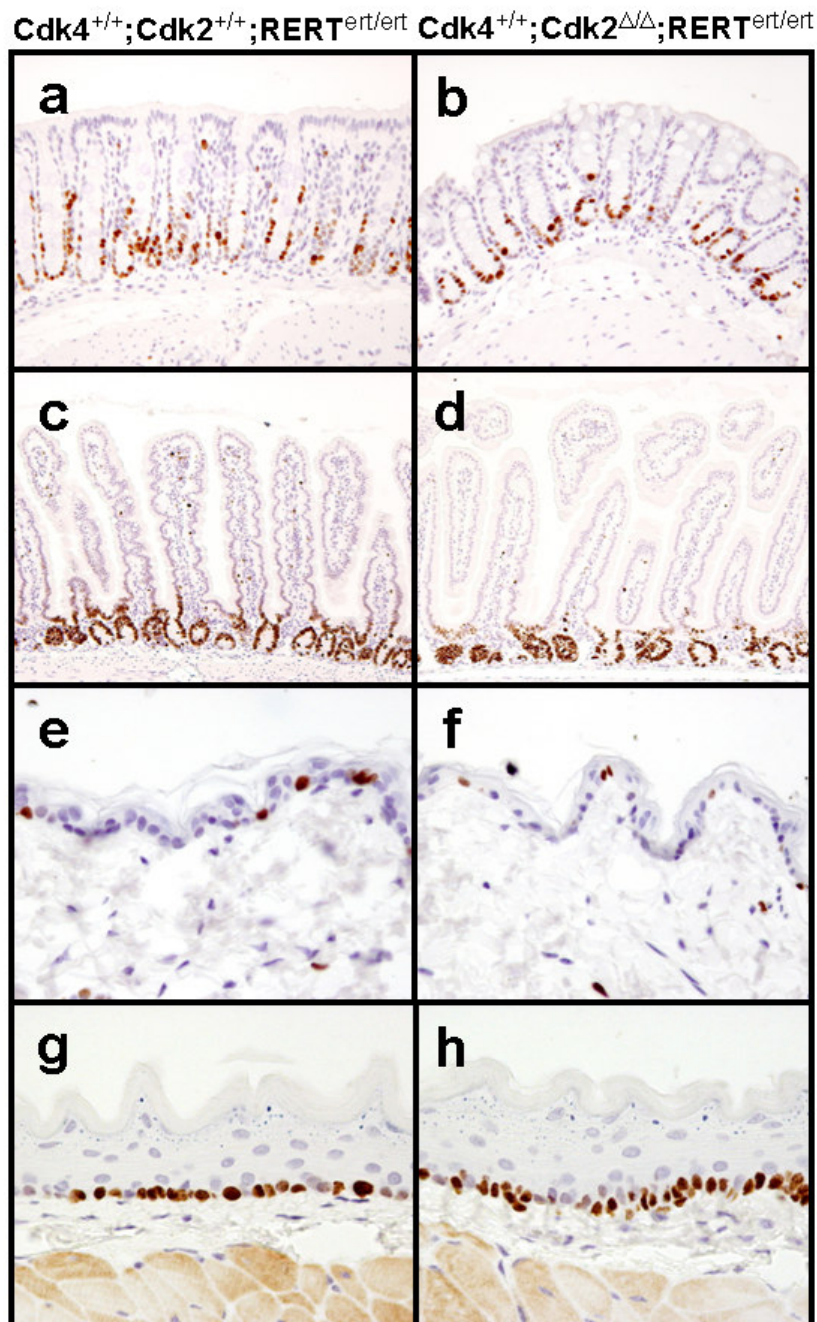
al., 2007). Secciones tomadas del corazón de animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  no reflejan diferencias con respecto a aquellas secciones procedentes de los hermanos silvestres de camada y sometidos al mismo tratamiento con 4-OHT (Fig. 25 c y d). La principal conclusión a la que nos permite llegar este dato es que Cdk4 y Cdk2 juegan un papel esencial en la proliferación prenatal de los cardiomiocitos y que en ausencia de una de las dos, la otra puede compensar su falta. Sin embargo, no nos es posible determinar si ambas quinasas juegan el mismo papel esencial en cardiomiocitos adultos puesto que éstos permanecen en quiescencia en un corazón adulto; más concretamente, a la edad a la que los animales tratados han sido sacrificados y sus tejidos obtenidos analizados.

#### 6.2.4. Estudio de la proliferación y la muerte celular en animales doble KO Cdk4 y Cdk2

Puesto que Cdk4 y Cdk2 son dos quinasas que participan en la regulación de el progreso a través de la fase G1 y de la transición de G1 a fase S, procedimos a un estudio más detallado de la proliferación celular en los diversos tejidos empleando para ello el marcador ki67, marcador que tiñe el núcleo de aquellas células que no se encuentran en quiescencia. El análisis de este marcador determinó que no existían grandes diferencias en los niveles de proliferación en los distintos tejidos de los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  y sus hermanos silvestres de camada . Aquellos tejidos caracterizados por una rápida renovación celular como el esófago (estrato germinal), intestino, colon y la piel poseen un patrón de marcaje de ki67 similar, y por tanto, niveles proliferativos similares, al comparar ambos grupos de animales (Fig 26).

En el caso del páncreas, apenas pudimos apreciar tinción de ki67 y, por tanto, proliferación para el caso de los animales silvestres y el de los doble KO (Fig. 27a y b). Este hecho se ajusta a lo anteriormente descrito para el modelo KO de Cdk4 (Rane et al., 1999; Tutsui et al., 1999). En estos animales la proliferación de las células  $\beta$  (las células productoras de insulina), y que junto a las células  $\alpha$  (productoras de glucagón), a las células  $\delta$  (productoras de somatostatina) y a las células PP (productoras del polipéptido pancreático) conforman los islotes de Langerhans (porción endocrina del páncreas) (Slack, 1995), se activa a partir del día E17.5 de desarrollo embrionario y prosigue después de P1 hasta llegar a los 3 meses de edad. En ese tiempo y aunque el número total de islotes prácticamente no varía, se produce una rápida división celular que provoca un aumento en la proporción de islotes de tamaño medio o grande

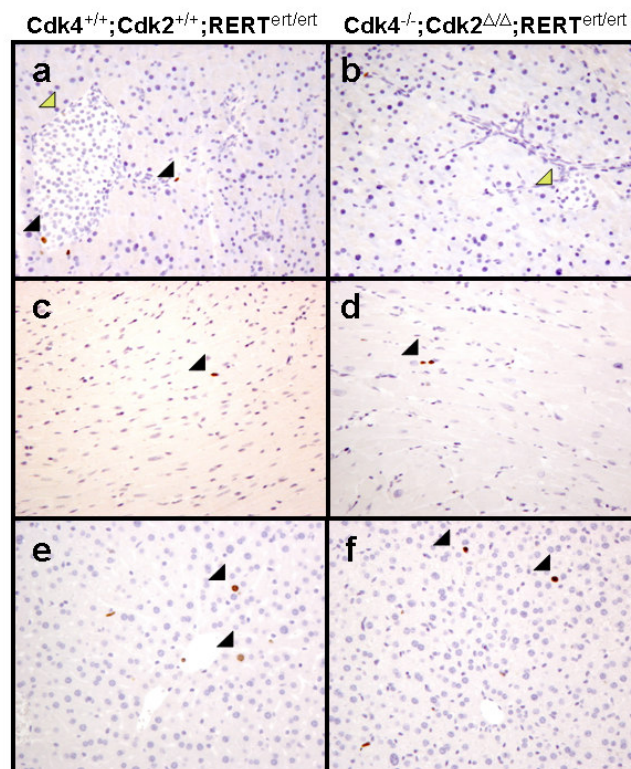
(más de 40 a 400 células por islote, en el primer caso, y más de 400 en el segundo)  
(Martin et al., 2003).



**Figura 26. Proliferación en ausencia de Cdk2 y Cdk4.** En ausencia de Cdk2 y Cdk4 no se producen alteraciones en tejidos caracterizados por una elevada tasa proliferativa. Tinción de ki67 para colon, intestino delgado, piel y esófago de animales  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$  (a, c, e y g, respectivamente) y  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{\Delta\Delta};RERT^{ert/ert}$  (b, d, g y h, respectivamente) tratados durante 4 meses con 4-OHT. a, b, e, f, g, y h aumento X200. c y d aumento X100.

Como hemos comentado en el apartado anterior, los cardiomiocitos son células que a la edad de 5 meses no proliferan pues se encuentran en un estado de quiescencia. Así, apenas encontramos tinción de ki67 en las secciones procedentes de ambos grupos de animales (mutantes y silvestres) (Fig. 27 c y d). El hígado es un tejido donde las células que lo componen mayoritariamente (los hepatocitos) representan un ejemplo de células que permanecen en un estado de quiescencia hasta que éstas reciben una señal externa que les dirige hacia la reentrada en ciclo. Dicha señal puede deberse a numerosas causas (procesos de necrosis y resección de una porción del órgano, por ejemplo). En consecuencia, la tinción de ki67 fue mínima en las secciones procedentes de estos tejidos (Fig. 27 e y f). No así como veremos más adelante en los ensayos de regeneración hepática.

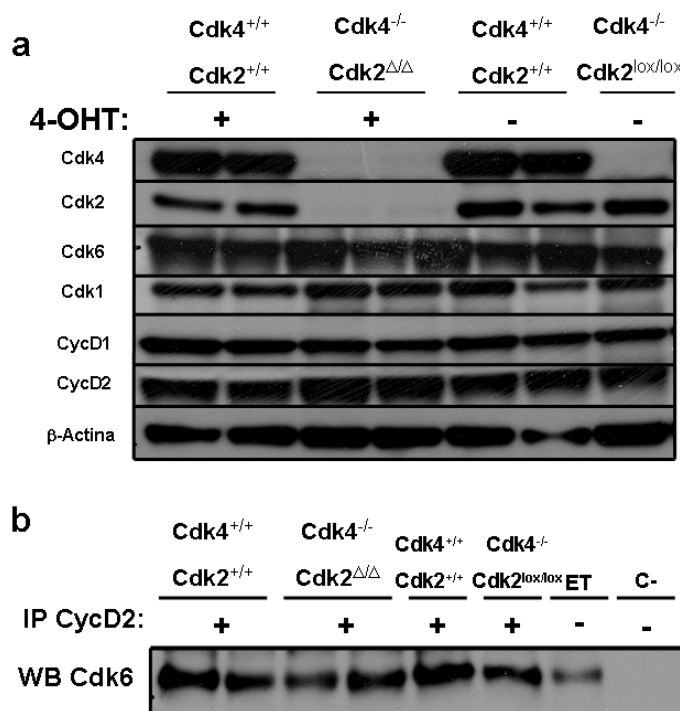
A la hora de analizar el patrón de apoptosis en los diferentes tejidos por inmunotinción de Caspasa3 Activa tampoco pudimos encontrar diferencias obvias entre los dos grupos de animales. Conviene recordar que tampoco se han descrito diferencias en los niveles de apoptosis en las células  $\beta$  de animales KO de Cdk4 en comparación con los de los animales silvestres hermanos de camada.



**Figura 27. Ausencia de diferencias en el marcaje de ki67 en tejidos con baja proliferación.** Tinción de ki67 de secciones procedentes de páncreas, corazón e hígado de animales  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$  (a, c, y e respectivamente) y de  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta\Delta};RERT^{ert/ert}$  (b, d y f respectivamente) tratados 4 meses con 4-OHT. Células positivas para el marcaje de ki67 quedan señaladas con flechas negras. En el caso de a y b, los islotes de Langerhans son marcados con flechas amarillas. Amplificación x200 en todos los casos.

### 6.2.5. Caracterización bioquímica de los reguladores de ciclo celular en los animales doble KO de Cdk4 y Cdk2

Con el objetivo de entender mejor los mecanismos moleculares responsables de la ausencia de defectos obvios (a parte de los ya descritos para los KO sencillos de Cdk4, principalmente, y de Cdk2), fueron examinados los niveles de expresión de los principales reguladores de ciclo celular relacionados con estas dos quinasas. Este análisis bioquímico de los principales reguladores del ciclo celular fue realizado en colon. Puesto que, como ya hemos descrito, el colon es un tejido con una proliferación activa del epitelio intestinal se procedió al aislamiento de las proteínas presentes en este tejido. El análisis por western blot confirmó la doble ausencia de Cdk4 y Cdk2 en los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  y como los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$ , al ser tratados con aceite de maíz tan solo, mantenían la expresión de Cdk2 (Fig. 28a).



**Figura 28: Caracterización de los reguladores de ciclo celular en ausencia de Cdk4 y Cdk2.** a) Niveles de expresión de los principales reguladores de ciclo celular en colon procedente de animales  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$  y  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  tratados durante 4 meses con 4-OHT. Como control se muestran los niveles de dichos reguladores en colon procedentes de animales  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$  y  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$  tratados durante 4 meses con aceite de maíz. Como control de carga se muestra  $\beta$ -actina. b) Análisis de los complejos Cdk6/CycD2 en colon procedentes de los mismos animales que en a). El análisis se ha realizado por medio de una inmunoprecipitación (IP) empleando anticuerpo anti-CyCD2 y de la detección de Cdk6 por medio de western blot de dichas muestras. ET: Extracto total de proteína, C-: Control negativo de la IP llevado a cabo siguiendo el mismo protocolo que en el resto de muestras que han sido inmunoprecipitadas pero donde no se añadió anticuerpo alguno para realizar el paso de IP.



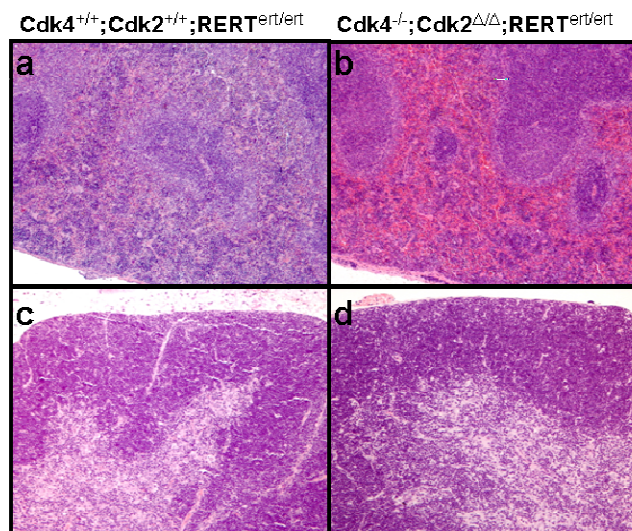
Con respecto a las otras Cdk's relacionadas directamente con la regulación de ciclo celular, se comprobó que ni Cdk6 ni Cdk1 variaban sus niveles de expresión según se tratara de animales silvestres,  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$  o  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$ . Las posibles variaciones en Cdk1 más bien parecían poder proceder de pequeñas diferencias en la carga total de proteína de cada muestra (Fig. 28a). Este dato es importante puesto que, junto a CycA2, Cdk1 constituye uno de los genes cuya expresión depende de la liberación de los factores E2F y por ello de la efectiva fosforilación de pRb. Con respecto a las ciclinas reguladoras, tampoco se detectaron cambios en la expresión de CycD1 o de CycD2 (Fig 28a). La presencia de complejos Cdk6/CycD2 quedaron evidenciados en todos los casos analizados y sin que se encontraran grandes diferencias según el genotipo del animal que se tratara (Fig. 28b).

### 6.2.6. Estudio de la hematopoyesis adulta en los animales doble KO Cdk4 y Cdk2.

Se dedicó una especial atención a los principales órganos linfoides y hematopoyéticos como el bazo y el timo debido a dos razones principales: 1) la continua producción de células sanguíneas en estos órganos, con lo que ello conlleva en términos de división celular y 2) como ya se ha descrito en las secciones 3.6.3 y 3.6.5 las células hematopoyéticas resultan especialmente sensibles a la ausencia de Cdk6 o de Cdk4 y Cdk2. Conviene recordar, adicionalmente, que los niveles de escisión del alelo  $Cdk2^{lox}$  tras el tratamiento con 4-OHT en animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$  es del 98 y 95% en bazo y timo, respectivamente. Cuando comparamos secciones procedentes de animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  con aquellas procedentes de animales silvestres hermanos de camada comprobamos que estos tejidos no presentan defectos obvios como muestran las secciones teñidas con H&E (Fig. 29). Es más, los niveles de proliferación, determinados por marcaje con ki67, son normales (Fig. 30a, b, c, d y e).

En el bazo, la pulpa roja presentó los mayores niveles de tinción para ki67, independientemente de la ausencia de Cdk4 y Cdk2 revelando este dato que la eritropoyesis no se vio afectada en los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$ . Adicionalmente, en la pulpa blanca la mayoría de los linfocitos aparecieron quiescentes a excepción de aquellos presentes en los centros germinales. Otros folículos linfoides secundarios presentes en las paredes intestinales (Placas de Peyer) y en los nódulos linfáticos presentaban niveles de proliferación normales (Fig. 30a, b y

e). Este último dato sugiere que existe una respuesta funcional de linfocitos B normal en los animales doble mutantes tratados con 4-OHT.



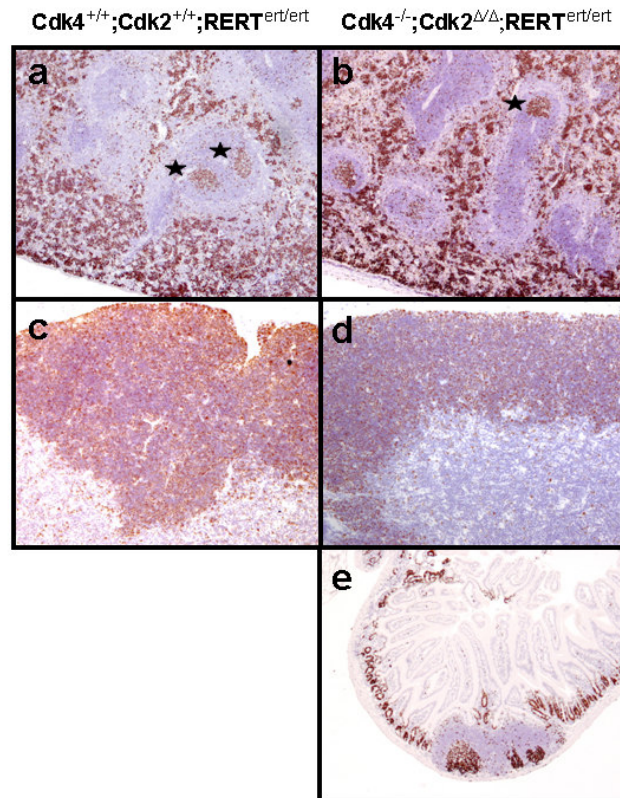
**Figura 29. Estructura normal de órganos linfoides en ausencia de Cdk4 y Cdk2.** Secciones teñidas con H&E procedentes de bazo y timo de animales  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$  (a y c, respectivamente) y  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta\Delta};RERT^{ert/ert}$  (b y d, respectivamente) tratados durante 4 meses con 4-OHT. Aumento X50 en todos los casos.

En el timo, uno de los órganos con mayor índice de renovación celular y que resulta más sensible a defectos en proliferación, la mayoría de los timocitos corticales eran positivos para la tinción con ki67, indicando que existe una producción continua y sostenida de células T en ausencia de Cdk4 y Cdk2 (Fig. 30c y d).

El análisis detallado del sistema hematopoyético adulto en animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta\Delta};RERT^{ert/ert}$  reveló que Cdk4 y Cdk2 son dispensables para la proliferación de los precursores hematopoyéticos y diferenciación de éstos en todas las líneas celulares sanguíneas. La médula ósea de estos animales presenta el mismo número de unidades formadoras de colonias eritroides, de unidades formadoras de colonias granulocíticas, de macrófagos y mezcla de granulocitos/macrófagos cuando se comparan con el mismo tipo de colonias generadas a partir de las médulas de los animales silvestres hermanos de camada (Fig. 31a). Para eliminar la posibilidad de que estas colonias provengan de células madre que han retenido el alelo Cdk2 floxeado se llevaron a cabo PCRs semicuantitativas del ADN genómico extraído de colonias individuales. En todos los casos analizados, se encontró la escisión completa del alelo Cdk2.

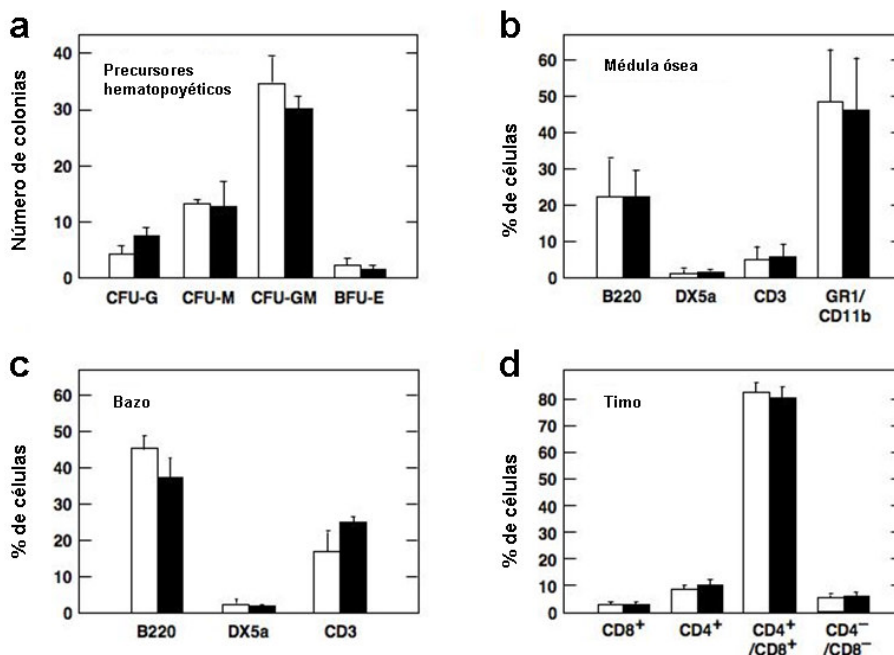
El siguiente paso consistió en el estudio de la contribución de los precursores hematopoyéticos descritos en el párrafo anterior a las diferentes líneas hematopoyéticas maduras empleando una tinción de las células procedentes de la médula ósea con anticuerpos específicamente dirigidos contra las distintas líneas. El

uso del citómetro de flujo determinó que el número de células B (anticuerpos B220), de células NK (anti-DX5 $\alpha$ ), de células T (anti-CD3) y del conjunto granulocitos/monocitos (anti-GR1 y anti-CD11b) eran básicamente el mismo que el número presente en los animales control (Fig. 31b).



**Figura 30. Proliferación positiva en los órganos hematopoyéticos en ausencia de Cdk2 y Cdk4.** Marcaje con ki67 de secciones de bazo y timo procedentes de animales  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$  (a y c, respectivamente) y de  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  (b y d, respectivamente) tratados durante 4 meses con 4-OHT. Los folículos linfoides secundarios del bazo quedan señalados por estrellas negras. También se muestra el marcaje con ki67 de una sección de placas de Peyer (i. delgado) procedente de animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  (e). Ampliación x50 en todos los casos.

El porcentaje de linfocitos B (anti-B220), linfocitos T (anti-CD3) y células NK (anti-DX5 $\alpha$ ) son similares en los bazos de animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  comparados con los animales silvestres hermanos de camada (Fig. 31c). De manera similar, la ausencia de Cdk4 y la pérdida de Cdk2 no provocó alteraciones en los niveles de proliferación del timo. Es más, parece que la ablación de ambos genes no conlleva efectos negativos en el programa de maduración de los linfocitos T en este tejido puesto que los porcentajes de las poblaciones CD8/CD4 doble negativas, doble positivas, y positivas sencillas eran los mismos en ambos grupos de animales (Fig. 31d). Todos los resultados anteriores muestran que la hematopoyesis en animales adultos no depende de la presencia y actividad quinasa de Cdk4 y Cdk2.



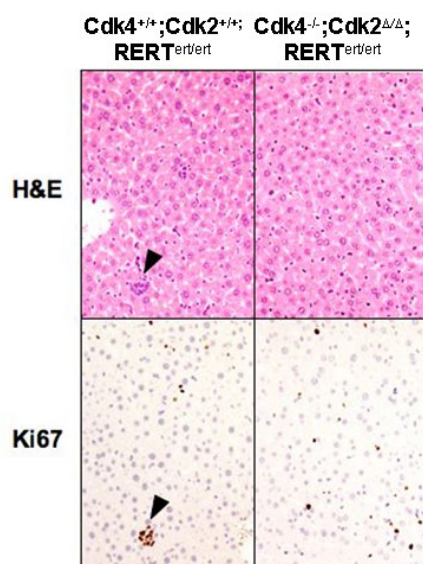
**Figura 31. Poblaciones hematopoyéticas precursoras y adultas en ausencia de Cdk2 y Cdk4.** a) Ensayo de formación de colonias en metilcelulosa de células procedentes de la médula ósea. Las barras muestran las unidades formadoras de colonias granulocíticas (CFU-G), de macrófagos (CFU-M), de mezcla de granulocitos/macrófagos (CFU-GM) y de eritrocitos (BFU-E), todas ellas obtenidas tras sembrar  $5 \times 10^4$  células. b-d) Análisis de citometría de flujo de las principales poblaciones hematopoyéticas maduras en órganos adultos. Se marcaron suspensiones celulares con anticuerpos dirigidos contra los marcadores de superficie indicados. Los porcentajes relativos de las poblaciones específicas fueron cuantificados por citometría. Las barras blancas representan muestras obtenidas y analizadas de animales  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$ . Las barras negras representan muestras obtenidas y analizadas de animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$ . Ambos grupos de animales fueron tratados durante 4 meses con 4-OHT. Las barras de error muestran la desviación estándar ( $n=5$ ).

### 6.2.7. Regeneración hepática en ausencia de Cdk4 y Cdk2

El proceso de regeneración hepática tras realizar una hepatectomía parcial está considerado como uno de los ensayos más severos para determinar la capacidad proliferativa de tejidos en un organismo adulto. En este ensayo, los hepatocitos adultos, que permanecen en quiescencia en ausencia de daño tisular, recuperan su capacidad proliferativa para restaurar la función hepática como respuesta a una reducción en la masa del hígado. Con el objetivo de estudiar más a fondo la división celular en ausencia de Cdk2 y Cdk4 en organismos adultos procedimos a ensayar la capacidad proliferativa de los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  extrayendo dos tercios de su masa hepática y midiendo la regeneración del órgano 9 días después.

La masa hepática en animales silvestres procedentes de un fondo genético mixto 129/Svj x C57BL/6J supone, aproximadamente, un 2.5% de la masa total del animal. Las masas hepáticas regeneradas procedentes de animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  presentaban aspecto y tamaño similar al de las masas

procedentes de animales silvestres hermanos de camada sometidos al mismo tratamiento con 4-OHT ( $2.70 \pm 0.14\%$  en los animales control y  $2.55 \pm 0.21\%$  en los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$ ). La caracterización histológica de las secciones hepáticas obtenidas mostraron una morfología tisular similar independientemente de si la regeneración tisular tuvo lugar en presencia o en ausencia de Cdk4 y Cdk2 (Fig.

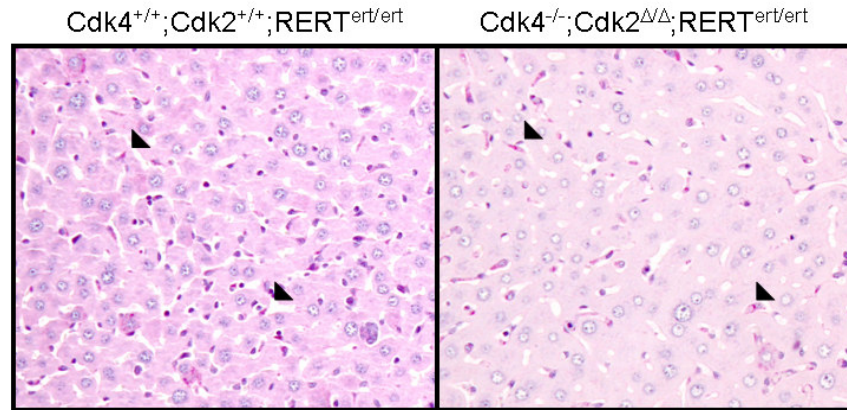


**Figura 32. Regeneración hepática en animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$ .** Animales  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$  y  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  tratados durante 4 meses con 4-OHT fueron sometidos a una operación de hepatectomía parcial. Los hígados regenerados 9 días después de la operación fueron analizados por medio de tinciones con H&E y ki67. Con flechas negras se indica un pequeño grupo de células hematopoyéticas en división.

32).

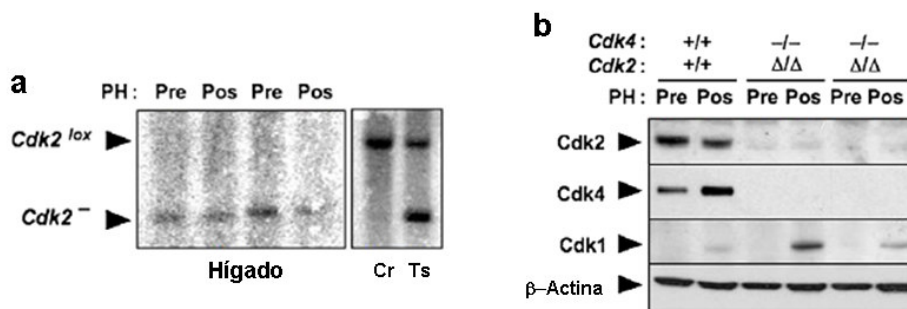
Tan sólo se pudo determinar como principal diferencia entre ambos tipos de secciones, una mayor vacuolización en los hepatocitos procedentes de animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$ . No obstante, tinciones llevadas a cabo para determinar la funcionalidad de las masas hepáticas regeneradas (GAPDH, CD34 y P.A.S) demostraron que no existían diferencias en la funcionalidad de éstas ya se tratara de secciones procedentes de animales silvestres o de animales doble KO de Cdk4 y Cdk2 (Fig. 33).

Los niveles de proliferación de los hepatocitos procedentes de masas regeneradas, determinadas por marcaje de ki67, eran similares tanto en presencia de Cdk4 y Cdk2 como en ausencia de éstas.



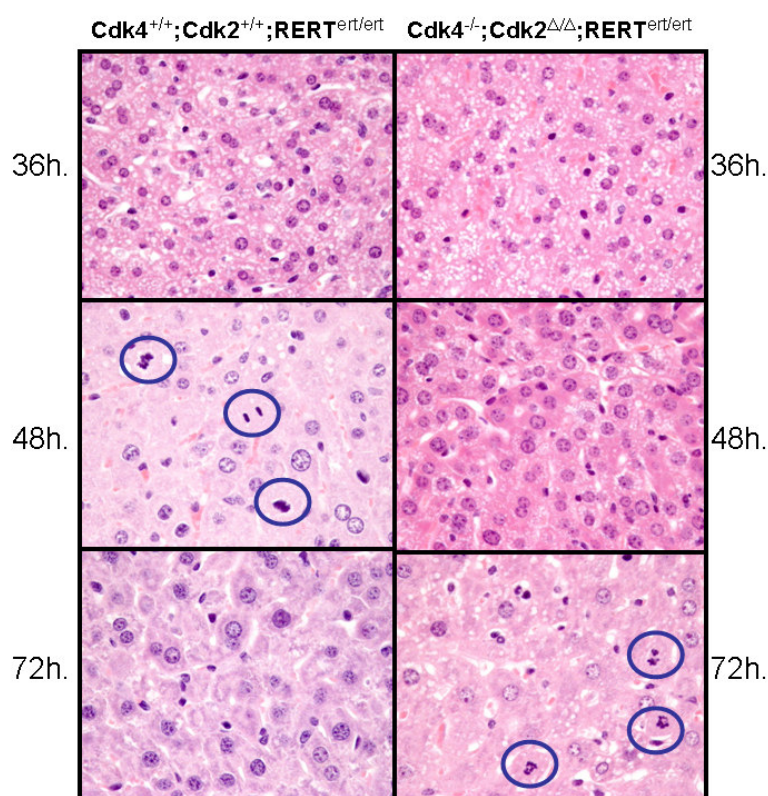
**Figura 33. Funcionalidad de la masa hepática regenerada en ausencia de Cdk2 y Cdk4.** Tinción de P.A.S en secciones de hígado regenerados procedentes de animales  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$  y  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta\Delta};RERT^{ert/ert}$  tratados con 4-OHT durante 4 meses y hepatectomizados una vez completado el tratamiento. Los animales fueron sacrificados 9 días después de la operación. Con flechas negras se indican células positivas para la tinción y que evidencian la presencia de glucógeno en éstas. Aumento en los dos casos x200.

Para eliminar la posibilidad de que la regeneración hepática en los animales doble mutantes pudiera originarse a partir de una pequeña sub-población de células troncales que hubieran retenido el alelo condicional  $Cdk2^{lox}$ , se aisló ADN procedente de las masas hepáticas obtenidas de ambos grupos de animales en el momento de realizar la operación y en el momento de sacrificar los animales, 9 días después. Como muestra la 34a, el análisis de ADN genómico por southern blot de dos animales distintos, mostró que tanto en el momento de llevar a cabo la hepatectomía, como en el momento de sacrificar los animales tan sólo pudo detectarse el alelo KO  $Cdk2^{-}$ . Este hecho demostraba que la regeneración hepática tenía lugar a partir de hepatocitos  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{-/-}$ .



**Figura 34. Análisis bioquímico de la regeneración hepática en ausencia de Cdk2 y Cdk4.** a) Análisis por southern blot de la escisión del alelo condicional  $Cdk2^{lox}$  en muestras procedentes de hígados reseccionados (Pre) y regenerados (Pos) de dos animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta\Delta};RERT^{ert/ert}$  tratados durante 4 meses con 4-OHT. Como controles se emplearon ADNs procedentes de cerebro (Cr) y de testículos (Ts). Estos dos tejidos se caracterizan por una escisión parcial del alelo  $Cdk2^{lox}$  (ver figura 20a). b) Análisis por western blot de la expresión de Cdk4, Cdk2 y Cdk1 en muestras hepáticas reseccionadas (Pre) y regeneradas (Pos) procedentes de los mismos animales que el apartado a), además de una animal  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$ , introducido como control. Como control de carga se empleó  $\beta$ -actina. En b) la presencia de los alelos ert en la descripción de los genotipos fue omitida para mayor claridad.

Finalmente, el análisis por western blot de los extractos de proteínas obtenidos de hígados regenerados confirmó la ausencia de Cdk2 (Fig. 34b). Cabe destacar el hecho de que los hígados regenerados procedentes de animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  expresan niveles de Cdk1 similares, o incluso, más elevados que en los animales control. Estas observaciones indican que la inducción de la expresión de Cdk1 en respuesta a señales mitogénicas en los tejidos que mantienen una proliferación activa es independiente de la presencia de las dos quinasas de G1, Cdk4 y Cdk2.

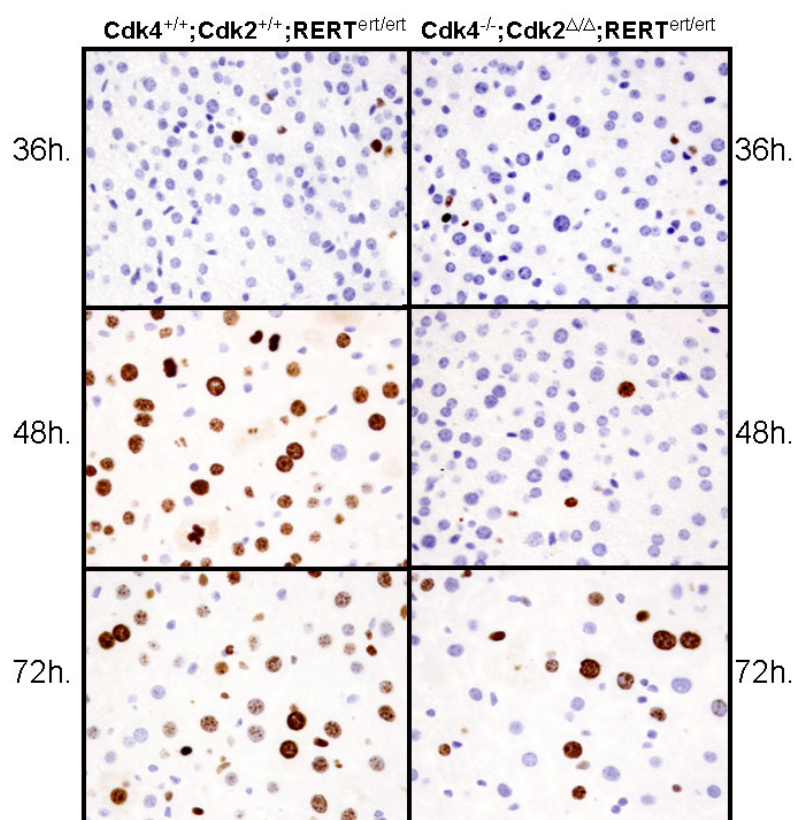


**Figura 35. Desarrollo de la regeneración hepática en ausencia de Cdk2 y Cdk4.**

Tinción de H&E de secciones de hígado regenerado procedentes de animales  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$  y  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  tratados con 4-OHT y hepatectomizados. Los animales fueron sacrificados en los tiempos indicados tras la operación. Se observa una mayor vacuolización en las secciones de animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  comparados con los  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$ . Además, existe un retraso de unas 24 horas en la aparición de células mitóticas (círculos azules) en el segundo grupo de animales con respecto al primero. Todos los aumentos X400.

Para poder estudiar más en detalle posibles diferencias en la regeneración hepática entre los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  y sus hermanos de camada silvestres se sometió a ambos grupos a la operación de resección hepática descrita anteriormente. En esta ocasión, los animales fueron sacrificados a las 36, 48 y 72 horas posteriores a la misma. 2 horas previas al sacrificio, se les inyectó un pulso de 100µg de BrdU por gramo del animal. A partir de las 36 horas post-operatorio podían detectarse en las tinciones de H&E en ambos grupos de animales la aparición de

vacuolas, aunque su número era mayor en el grupo de los doble mutantes (Fig. 35). Adicionalmente, la velocidad de desaparición de dichas vacuolas parecía menor en dicho grupo de animales comparados con el grupo control. Otro resultado a destacar parecía ser cierto retraso (de unas 24 horas) en la aparición de células en estado mitótico en el grupo de  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$ . Este último resultado quedó corroborado con las secciones obtenidas de ki67 y BrdU pues en ambas tinciones aparecía el mismo retraso de 24 horas en el pico de división celular en el grupo mencionado de animales (Fig. 36).

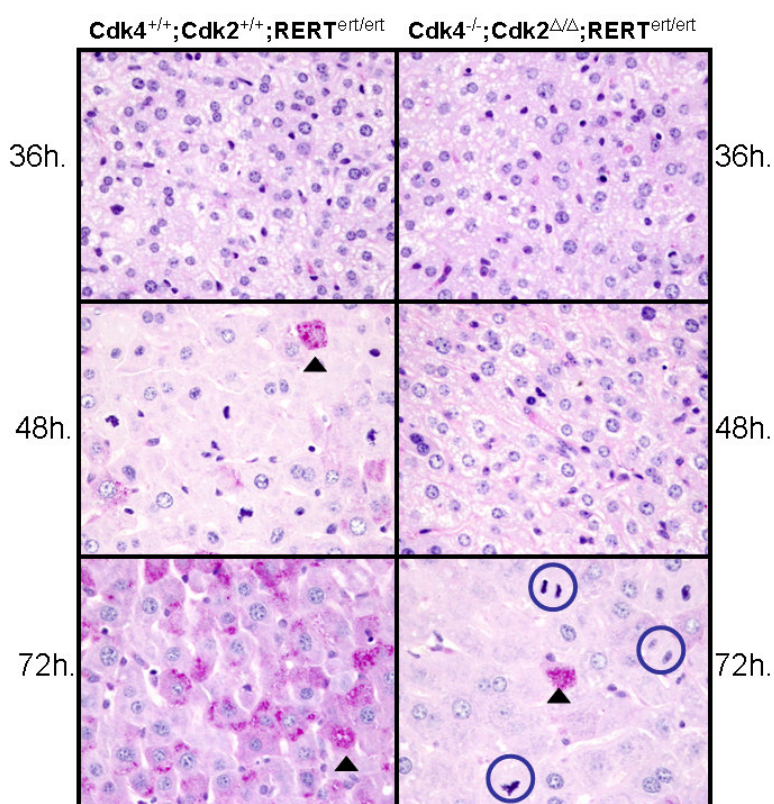


**Figura 36. Niveles de proliferación durante la regeneración hepática.** Tinción de ki67 de secciones de hígado regenerado procedentes de animales  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$  y  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  tratados con 4-OHT y hepatectomizados. Los animales fueron sacrificados en los tiempos indicados tras la operación. Todos los aumentos X400.

Las tinciones con C3A no mostraron de manera consistente ninguna diferencia en los niveles de apoptosis. Tan sólo pudieron detectarse algunas células positivas en uno de los animales doble mutantes sacrificados a 36 horas post-operatorio. En el caso de las tinciones CD34 y GAPDH no pudieron establecerse diferencias entre los dos grupos. En el caso de la tinción de P.A.S que marca para las moléculas de glucógeno, se observó que en ambos grupos de animales se producía una rápida desaparición de la tinción de estas moléculas. Esta desaparición del glucógeno era paralela a la aparición de las vacuolas detectadas por la tinción de H&E. La reaparición de las tinciones positivas de P.A.S, y con ello las moléculas de glucógeno



estaba más retrasada en los animales doble mutantes comparados con los silvestres hermanos de camada (Fig. 37), lo que parece sugerir ciertas diferencias metabólicas entre ambos grupos de animales.



**Figura 37. Recuperación de la funcionalidad hepática en ausencia de Cdk2 y Cdk4.** Tinción de P.A.S de secciones de hígado regenerado procedentes de animales  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$  y  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta\Delta};RERT^{ert/ert}$  tratados con 4-OHT y hepatectomizados. Los animales fueron sacrificados en los tiempos indicados tras la operación. Se detecta un retraso de unas 24 horas en la reaparición de las reservas de glucógeno (flechas negras) de las secciones procedentes de animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta\Delta};RERT^{ert/ert}$  comparados con las procedentes de los  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$ . Además, existe un retraso de unas 24 horas en la aparición de células mitóticas (círculos azules) en el segundo grupo de animales con respecto al primero (ver figura 35). Todos los aumentos X400.

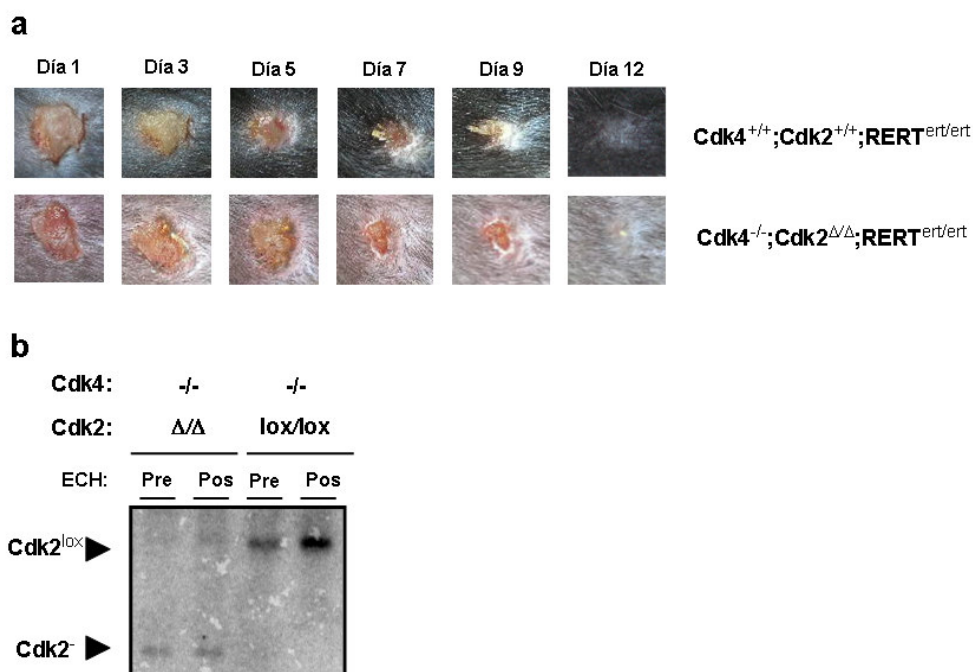
### 6.2.8. Ensayos de cicatrización de heridas en ausencia de Cdk4 y Cdk2

La piel es un tejido caracterizado por la continua regeneración de sus células componentes. Desde las células troncales de la capa basal se producen nuevas células que repoblarán las células de la capa espinosa y granular para, finalmente, morir y conformar la población de escamas queratinizadas. Este hecho hace que la epidermis, debido a su continua proliferación constituya un tejido ideal para estudiar más a fondo la capacidad de proliferación de las células que carecen de Cdk4 y Cdk2. El proceso de cicatrización de heridas reúne todo un conjunto de procesos diferentes (respuesta inflamatoria, angiogénesis, fibroplasia, epitelización, remodelación de la

herida, por ejemplo) cuyo objetivo está dirigido a la recuperación de la estructura continua necesaria para que la piel pueda realizar su función impermeabilizante y protectora del cuerpo (Mijimolle et al., 2005; Cayuela et al., 2005).

En el ensayo de cicatrización de heridas al animal se le practican dos heridas circulares de unos 4 mm. de diámetro cada una en su espalda, empleando para ello un bisturí de sección circular. El tamaño de las heridas y su evolución es medido cada día.

Debido a que la cicatrización de heridas es un proceso que se encuentra comprometida en los enfermos de diabetes, procedimos a realizar medidas de las glicemias en los animales que iban a ser sometidos a la operación para establecer si, en el caso de detectarse alguna diferencia a la hora de regenerar las pieles, pudiera determinarse alguna correlación entre el progreso del proceso de cicatrización y el grado de diabetes.



**Figura 38. Ensayo de cicatrización de heridas en animales Cdk4<sup>-/-</sup>;Cdk2<sup>Δ/Δ</sup>;RERT<sup>ert/ert</sup>.** Los queratinocitos procedentes de animales Cdk4<sup>-/-</sup>;Cdk2<sup>Δ/Δ</sup>;RERT<sup>ert/ert</sup> proliferan normalmente comparados con aquellos procedentes de animales Cdk4<sup>-/-</sup>;Cdk2<sup>lox/lox</sup>;RERT<sup>ert/ert</sup> y de Cdk4<sup>+/+</sup>;Cdk2<sup>+/+</sup>;RERT<sup>ert/ert</sup>. a) Regeneración epitelial de animales Cdk4<sup>+/+</sup>;Cdk2<sup>+/+</sup>;RERT<sup>ert/ert</sup> comparada con la de animales Cdk4<sup>-/-</sup>;Cdk2<sup>Δ/Δ</sup>;RERT<sup>ert/ert</sup>. b) La cicatrización epitelial en los animales Cdk4<sup>-/-</sup>;Cdk2<sup>Δ/Δ</sup>;RERT<sup>ert/ert</sup> se produce a partir de queratinocitos practicar la herida (Pre) y al completarse el proceso de cicatrización (Pos) obtenidas de animales Cdk4<sup>-/-</sup>;Cdk2<sup>Δ/Δ</sup>;RERT<sup>ert/ert</sup> tratados durante 4 meses con 4-OHT y de animales Cdk4<sup>-/-</sup>;Cdk2<sup>lox/lox</sup>;RERT<sup>ert/ert</sup> tratados el mismo tiempo con aceite de maíz tan sólo. ECH: Ensayo de cicatrización de heridas.

La evolución de las heridas practicadas tanto a los animales Cdk4<sup>-/-</sup>;Cdk2<sup>Δ/Δ</sup>;RERT<sup>ert/ert</sup> como a sus hermanos de camada silvestres fue la misma. En unos 12 días, aproximadamente, el 100% de los animales de ambos grupos cicatrizaron las

heridas por completo, independientemente de los niveles de glucosa detectados en sangre (Fig. 38a).

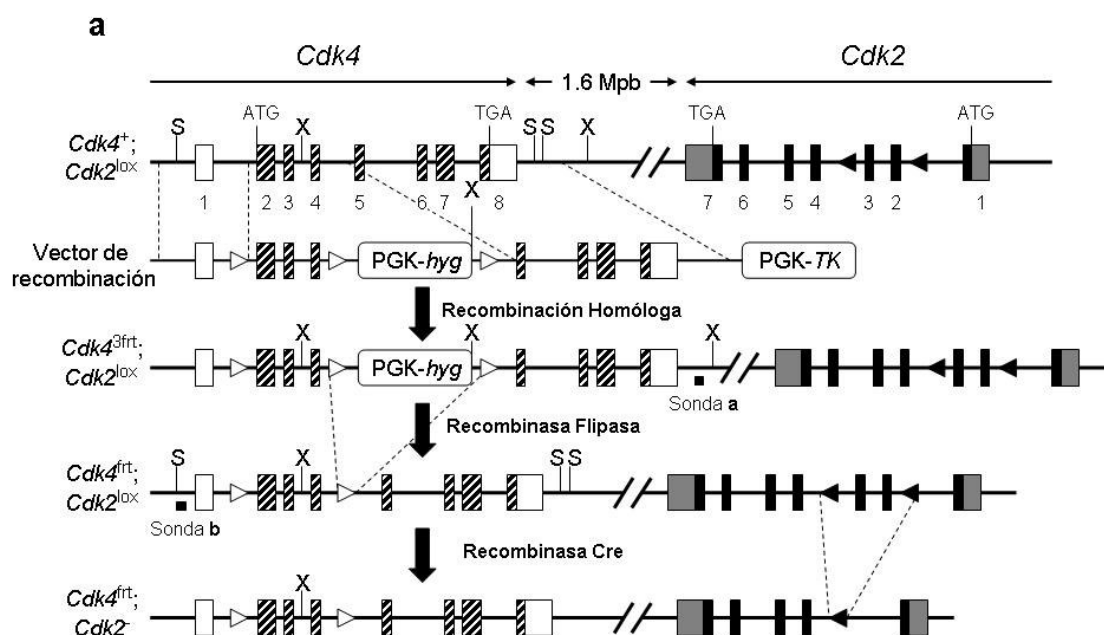
A modo de control y para establecer posibles diferencias en el proceso debido a la diferencia entre la carencia de tan sólo Cdk4 o de Cdk4 y Cdk2 juntas, operamos a un número similar al anterior de animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$ . Dichos animales cicatrizaron sus heridas de manera similar a los dos grupos mencionados en el párrafo anterior.

Para eliminar la posibilidad de que en el caso de los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  la regeneración epitelial se produjera a partir de un conjunto de células troncales que retuvieron el alelo condicional de  $Cdk2^{lox}$ , aislamos el ADN de las secciones de piel extraídas durante la operación. Al día siguiente de completarse el proceso de cicatrización, volvimos a practicar en la misma sección de cada animal una nueva herida del mismo tamaño. Extrajimos el ADN de estas nuevas secciones. Procedimos entonces al análisis por southern del estado de escisión del alelo  $Cdk2^{lox}$ . En ambos casos, en la primera operación y en la segunda, sólo pudimos detectar la banda correspondiente al alelo  $Cdk2^{-}$ . Este hecho señalaba que un tejido de un organismo adulto con una elevada tasa proliferativa, sus células constituyentes pueden proliferar con normalidad no sólo en ausencia de Cdk4 sino también en ausencia de Cdk4 y Cdk2 (Fig. 38b).

### 6.3. Generación de animales deficientes de Cdk4, Cdk6 y Cdk2

La ausencia de defectos dramáticos en la proliferación celular en ausencia de Cdk4 y Cdk2 nos obliga a preguntarnos qué sucedería con la división celular en el caso de producirse una carencia de Cdk4, Cdk6 y Cdk2 y, en consecuencia, de las Cdk encargadas de regular el paso a través de la interfase. Con este objetivo se cruzaron animales  $Cdk4^{+/3frt};Cdk2^{+/lox}$  (ver apartado 6.2.1. y Fig. 39) con los animales transgénicos pCAG-Flpe (Rodríguez et al, 2000). Como resultado de este cruce se seleccionó aquella descendencia donde el evento de recombinación se produjo entre las secuencias frt que flanqueaban el casete de resistencia a higromicina, dejando intactos los exones 2, 3 y 4 de Cdk4. Así se generaron animales  $Cdk4^{+/frt};Cdk2^{+/lox}$ . Estos animales fueron puestos en cruce con los animales CMV-Cre para provocar la escisión del alelo  $Cdk2^{lox}$ . De esta manera, se generó una colonia de animales  $Cdk4^{+/frt};Cdk2^{+/-}$  (Fig. 39). Finalmente, estos animales fueron puestos en cruce en

sucesivas rondas con animales  $Cdk6^{-/-}$  para generar una colonia  $Cdk4^{+/frit};Cdk2^{+/-};Cdk6^{-/-}$ .

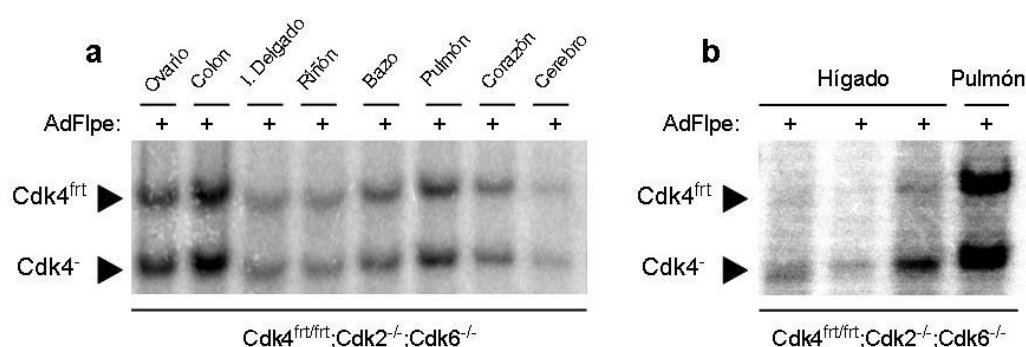


**Figura 39. Generación de los animales  $Cdk4^{frit/frit};Cdk2^{-/-}$ .** Los animales  $Cdk4^{frit/frit};Cdk2^{-/-};Cdk6^{-/-}$  fueron generados a partir de uno de los tres posibles eventos de recombinación que pueden tener lugar al cruzar los animales  $Cdk4^{+/3frit};Cdk2^{+/lox}$  (y cuya generación ha sido descrita en el apartado 6.2.1) con los animales pCAG-FLPe. En este caso se seleccionaron aquellos animales cuyo evento de recombinación había tenido lugar entre las secuencias *frit* que flanqueaban el casete de selección PGK-hyg, dejando intactos los exones 2, 3 y 4, flanqueados a su vez por otro par secuencias *frit*. Los animales  $Cdk4^{+/frit};Cdk2^{+/lox}$  fueron puestos en cruce con los animales CMV-Cre y generar una descendencia  $Cdk4^{+/frit};Cdk2^{+/-}$ . Finalmente, estos animales fueron puestos en cruce con animales  $Cdk6^{-/-}$  y obtener los animales  $Cdk4^{+/frit};Cdk2^{+/-};Cdk6^{+/-}$ . La leyenda de exones, intrones y demás símbolos se corresponden con aquellos de la figura 17.

### 6.3.1. Caracterización de animales deficientes en Cdk4, Cdk6 y Cdk2. Hepatectomías parciales.

Los animales  $Cdk4^{frit/frit};Cdk2^{-/-};Cdk6^{-/-}$  nacen de los cruces de animales  $Cdk4^{+/frit};Cdk2^{+/-};Cdk6^{-/-}$  con la frecuencia mendeliana esperada de un 25%. Estos animales son perfectamente viables y al igual que sucede con los animales  $Cdk2^{-/-};Cdk6^{-/-}$  tan sólo presentan los mismos defectos ya descritos debido a la ausencia individual de Cdk2 (esterilidad) y Cdk6 (defectos en la hematopoyesis). La escisión del alelo  $Cdk4^{frit}$  se llevó a cabo inoculando a los animales con una versión de adenovirus que portaban en su genoma el ADNc que codifica para la enzima recombinante Flipasa. Al contrario de lo que sucedía con los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{lox/lox}$  tan sólo recientemente se ha generado un modelo de flipasa inducible, similar al modelo de recombinasa Cre inducible RERT, que codifican para la Cre-ERT2 (ver apartado 6.2.1

y Hunter NL et al, 2005). Este motivo nos ha obligado a inducir la delección del alelo Cdk4 por medio de la inoculación de adenovirus portadores en su genoma del ADNc que codifica para la recombinasa Flipasa (virus AdFlpe). El principal inconveniente de esta metodología consiste en la limitación del tropismo del virus según la vía de infección y, adicionalmente en el caso de los adenovirus, la rápida respuesta inmunológica que desarrolla el huésped. Esta rápida respuesta de tipo inmunológico reduce drásticamente la eficiencia de sucesivas rondas de infección con el objetivo de mejorar la escisión del alelo en cuestión (Templeton y Lasic, 2000). Se optó por emplear como vía de inoculación la vena caudal o coccígea del animal. Empleando esta vía, el tropismo del virus está dirigido principalmente al hígado (Peeters et al, 1996; Gao et al, 1996).



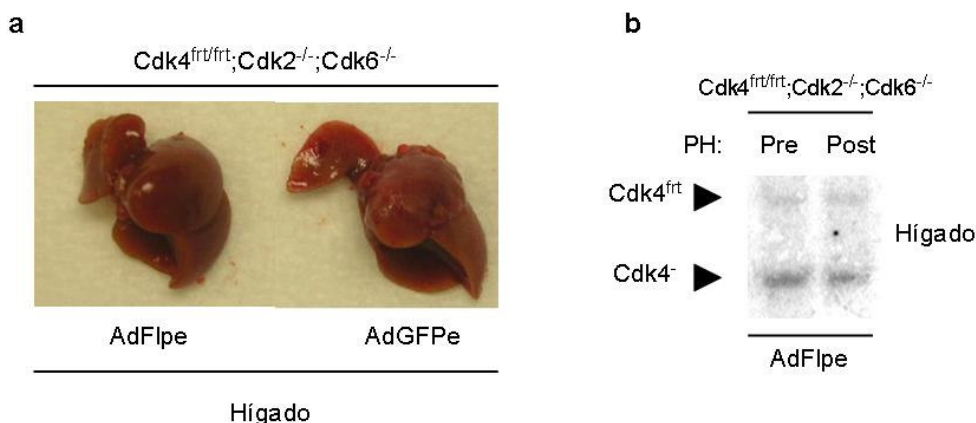
**Figura 40. Eliminación de Cdk4 en animales adultos de fondo para Cdk2 y Cdk6.**

Análisis por southern blot del ADN genómico extraído de diferentes tejidos procedentes de animales Cdk4<sup>frit/frit</sup>;Cdk2<sup>-/-</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup> infectados vía vena caudal con AdFlpe y sacrificados a los 7 días de la infección. La migración de los alelos Cdk4<sup>frit</sup> y Cdk4<sup>-</sup> se muestra mediante flechas. a) Panel de diferentes tejidos procedentes del mismo animal y donde se observa que la escisión ronda unos niveles alrededor del 50%. b) Escisión del alelo Cdk4<sup>frit</sup> en el hígado, principal diana del adenovirus cuando la infección se realiza en vena caudal procedente de tres animales Cdk4<sup>frit/frit</sup>;Cdk2<sup>-/-</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup>. En este caso los niveles de escisión rondan el 90%. Como control para indicar una correcta transferencia del ADN genómico se ha incluido ADN procedente de pulmón para evidenciar la presencia de la banda Cdk4<sup>frit</sup>.

Animales Cdk4<sup>frit/frit</sup>;Cdk2<sup>-/-</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup> de 3 meses de edad fueron infectados vía vena caudal con una cantidad equivalente a 2x10<sup>9</sup> PFU de AdFlpe. Pasados 7 días de la infección, los animales fueron sacrificados y se extrajo un panel de tejidos (entre ellos el hígado) para poder analizar la escisión conseguida del alelo Cdk4<sup>frit</sup>. El análisis por southern blot mostró que en la mayoría de los tejidos extraídos el nivel de escisión se aproximaba al 50% (Fig. 40a). Sin embargo, y reflejando lo comentado en el párrafo anterior, la escisión en el hígado se aproximaba a unos niveles de 80-90% (Fig. 40b). En base a este resultado podemos afirmar que la masa hepática de estos animales se compone en un 90%, aproximadamente, de células que resultan triplemente deficientes para Cdk4, Cdk6 y Cdk2

El siguiente paso consistió en llevar a comprobar la capacidad de división in vivo de los hepatocitos triple KO. Para ello se llevó a cabo la infección en vena de los animales Cdk4<sup>frit/frit</sup>;Cdk2<sup>-/-</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup> empleando la misma cantidad de AdFlpe que la

descrita en el párrafo anterior. Por la misma vía, y a modo de control, fueron inoculados animales del mismo genotipo empleando la misma cantidad de virus AdGFPe (Adenovirus que porta en su genoma el ADNc que codifica para la proteína GFPe). Una vez transcurridos los 7 días desde la infección de los animales, éstos fueron sometidos a una hepatectomía parcial. Pasados 9 días de la operación realizada, los animales fueron sacrificados y se procedió a la medición y al análisis de la masa hepática regenerada. En ambos grupos de animales, infectados con AdFlpe y AdGFPe, los hígados extraídos tenían el mismo aspecto y tamaño (Fig. 41a).



**Figura 41. Regeneración hepática en ausencia de Cdk4, Cdk2 y Cdk6.** a) Masa hepática regenerada extraída de animales  $Cdk4^{frt/frt}; Cdk2^{-/-}; Cdk6^{-/-}$  infectados vía vena caudal empleando AdFlpe o, como control, AdGFPe. A los 7 días de la infección los animales son sometidos a una cirugía de hepatectomía parcial. Pasados los 9 días de la operación, los animales son sacrificados y el hígado regenerado extraído y pesado. b) Análisis por southern blot de la escisión del alelo condicional  $Cdk4^{frt}$  en muestras procedentes de hígados reseccionados (Pre) y regenerados (Pos) de un animal  $Cdk4^{frt/frt}; Cdk2^{-/-}; Cdk6^{-/-}$  infectado vía vena caudal con virus AdFlpe.

El análisis por southern blot de los hígados regenerados en el caso de los animales infectados con AdFlpe, mostró que tanto en el momento de la operación como 9 días después de ésta se encontraron niveles de escisión del alelo  $Cdk4^{frt}$  de alrededor de un 90% (Fig. 41b). Este dato reflejaba el hecho de que el hígado regenerado provenía de una población de hepatocitos mayoritariamente triple KO de Cdk4, Cdk6 y Cdk2. Por tanto, los hepatocitos deficientes en las tres Cdk's encargadas de regular la interfase, son capaces de dividirse normalmente.

# 7. Discusión





## 7.1. Hacia un nuevo modelo del ciclo celular

El avance a través de las diversas etapas que constituyen el ciclo celular está regulado en última instancia por variaciones en los niveles de actividad quinasa de una serie de complejos heterodiméricos Cdk/Ciclina. De esta manera, el aumento ordenado y gradual de dicha actividad enzimática en los distintos complejos haría posible, primero, la copia del material cromosómico y, segundo, la división celular o mitosis. Tras ser completado este último proceso, se produciría un descenso de la actividad quinasa, lo que devolvería a la célula a su situación inicial con la posibilidad, o no, de llevar a cabo una nueva ronda de división celular (Murray, 2004). A lo largo de la evolución, y según han avanzado en complejidad, los organismos han ido desarrollando genomas más elaborados. Cuanto más complejo resulta, en términos evolutivos, un organismo, más presente se hace el hecho de que familias de genes enteras comparten una misma función que en organismos inferiores lleva a cabo un único gen. El control de ciclo celular en eucariotas no es ajeno a este hecho y, así, en levaduras una única Cdk es la encargada de regular el avance a lo largo de todas las etapas del ciclo (Morgan, 1996). En el caso de *S. pombe* tenemos a Cdc2 y en el de *S. cerevisiae* se trata de Cdc28, ambas homólogas a Cdk1 (Fisher y Nurse, 1996). No así del todo en el caso de las ciclinas, donde incluso en los organismos inferiores existe un cierto grado de complejidad para poder llevar a cabo el control eficaz sobre las distintas etapas del ciclo celular. Por ejemplo, en *S. cerevisiae* existen 3 ciclinas que controlan G1 (Cln1, Cln2 y Cln3) y 6 que controlan las fases S y M (Clb1, Clb2, Clb3, Clb4, Clb5 y Clb6) (Bloom y Cross, 2007). En *Drosophila melanogaster* aparecen ya varias Cdks, específicas para cada fase del ciclo. Así, a parte de Cdk1, podemos encontrar a Cdk2 y a Cdk4 como las quinasas encargadas de regular el paso a través de G1 y de S (Sauer et al., 1996; Adams, 2000). En organismos superiores, como ratones y humanos, se han descrito 11 genes que codifican para proteínas Cdks y otros 9 loci que codifican para proteínas con un alto grado de homología a las Cdks (Cdk-like proteins). De estos 20 loci descritos, 5 han sido relacionados de manera detallada con el control del ciclo celular: Cdk1, Cdk2, Cdk3, Cdk4 y Cdk6 (Fig. 2). No podemos descartar, no obstante, que en el futuro sean descritos papeles similares para el resto de loci enumerados más arriba. Según el modelo actual, y más extendido, del ciclo celular son Cdk3 (asociada a Ciclina C), Cdk4 y Cdk6 (asociadas a las ciclinas D1, D2 y D3) las encargadas de recuperar en presencia de las señales mitogénicas adecuadas a las células de su estado de quiescencia y provocar su reentrada en el ciclo. Cdk2 (asociada primero a las ciclinas E y, posteriormente, a las

ciclinas A) sería la encargada de controlar la progresión hacia y a través de la fase S. Finalmente, Cdk1 (asociada a las ciclinas A, primero, y a las ciclinas B, en segundo lugar) va a controlar la progresión a lo largo de G2 y de la fase de mitosis. Conviene recordar, no obstante, que las cepas murinas de laboratorio son portadoras de una mutación espontánea en el locus de Cdk3. Esto provoca la aparición de una versión truncada de ésta que carece de su dominio quinasa. Dicha mutación resulta en, presumiblemente, la falta de actividad catalítica alguna (Ye et al., 2001). A este modelo de ciclo celular descrito se ha llegado a través de numerosos estudios, todos ellos in vitro. Por ejemplo, experimentos en los que Cdk2 lograba superar el bloqueo impuesto en G1 provocado por mutaciones en Cdc28 y en los que, sin embargo, resultaba incapaz de superar el impuesto en la fase de mitosis por mutaciones en Cdc2 (Ninomiya-Tsuji et al., 1991) o experimentos en los que la sobreexpresión de una forma catalíticamente inactiva de Cdk2 detenía la proliferación de células en cultivo en la fase G1 (Tsai et al., 1993) resultaron determinantes a la hora de establecer el papel de Cdk2 como principal regulador de la transición G1/S y progresión a través de S.

A pesar de todo lo comentado en el párrafo anterior, la reciente generación en los últimos años de modelos murinos donde la expresión génica de estos reguladores queda anulada gracias a la inserción de mutaciones deletéreas en los loci correspondientes a dichos genes ha obligado a responder a nuevos interrogantes y a replantearse este modelo tan extendido de ciclo celular. De esta manera, la generación de varios modelos KO de Cdk4 (Rane et al, 1999; Tsutsui et al, 1999) puso en entredicho el aparentemente papel indispensable de Cdk4 en el progreso a través de la fase G1. Los animales Cdk4<sup>-/-</sup> eran viables y esta quinasa resultó ser esencial tan sólo para la proliferación de células altamente especializadas (células  $\beta$  pancreáticas, lo que provocaba la aparición de diabetes, y lactotrofos pituitarios, que provocaba esterilidad completa en hembras y parcial en machos) sin que pudiera encontrarse defectos obvios en la organogénesis de estos animales (a parte de un menor tamaño del animal y sus órganos, debido a una menor celularidad). Menos dramática resultaba aún la ausencia de Cdk6 (Malumbres et al., 2004) y Cdk2 (Ortega et al., 2003; Berthet et al., 2003). En el caso de los animales Cdk6 KO, la presencia de esta quinasa era requerida, sin llegar a ser esencial, para la correcta proliferación de las células hematopoyéticas. Además, en el caso de las hembras un porcentaje importante de éstas poseían un menor tamaño (aproximadamente un 30% más pequeñas que las hermanas de camada silvestres). Los animales KO de Cdk2 eran completamente viables y poseían una vida media idéntica a la de sus hermanos silvestres de camada. El único fenotipo observado consistía en la completa esterilidad de ambos sexos debido a hipertrofia en las gónadas de estos animales. Así, la

deficiencia de Cdk2 provoca fallos en los procesos meióticos que tienen lugar en la maduración de los gametos  $Cdk2^{-/-}$ . Este último resultado, añadido a la ausencia completa de otros defectos obvios, supuso un resultado del todo inesperado.

La ausencia de mayores defectos provocados por la deficiencia en alguna de las Cdk que regulan la interfase del ciclo celular condujo a la hipótesis de que estas quinasas podrían ejercer papeles compensatorios, al menos funcionalmente, entre sí. La generación más recientes de animales doblemente deficientes en Cdk2, 4 y 6 ha permitido establecer la veracidad de semejante afirmación, demostrando que al igual que sucede en el caso de los animales KO sencillos de estas Cdk, la ausencia combinada de al menos dos de las quinasas mencionadas tan sólo provoca defectos en determinados tipos celulares altamente especializados.

## 7.2. Animales doble KO para Cdk2 y Cdk6

La generación de un animal  $Cdk2^{-/-};Cdk6^{-/-}$  (Malumbres et al., 2004) puso de relieve la falta de nuevos defectos que sumar a aquellos producidos por la ausencia de Cdk2 y Cdk6 por separado. Así, estos animales poseían una hematopoyesis comprometida (al igual que en los animales  $Cdk6^{-/-}$ ) y una esterilidad completa tanto en machos como en hembras (como en los animales  $Cdk2^{-/-}$ ). Por tanto, Cdk2 y Cdk6 no realizan papel compensatorio alguno en las células murinas.

## 7.3. Animales Doble KO para Cdk4 y Cdk6

Al contrario de los que sucedía con los animales  $Cdk2^{-/-};Cdk6^{-/-}$ , la ausencia combinada de Cdk4 y Cdk6 provoca letalidad a partir del día E15.5 del desarrollo embrionario (Malumbres et al., 2004). La causa de la muerte se debe a un defecto severo en la hematopoyesis de estos animales, especialmente en la proliferación de los precursores hematopoyéticos responsables de la generación de la línea eritroide, lo que desencadena un proceso de anemia severa. No obstante, la organogénesis del animal resulta aparentemente normal, con lo que ello conlleva en términos de números de divisiones celulares exitosas.

Cdk4 y Cdk6 han sido descritos en varios trabajos (Sherr y Roberts, 2004; Sherr, 1994) como las proteínas responsables de conectar las señales mitogénicas externas con la maquinaria reguladora del ciclo celular, a través de la fosforilación de la proteína Rb, encargada, a su vez, de controlar la actividad transcripcional de los

factores E2F. Por tanto era posible esperar que una ausencia de estas dos quinasas provocara una alteración en los perfiles transcripcionales asociados a ciclo de las células, probablemente y vista la ausencia de grandes defectos en el desarrollo general del animal, algún tipo de compensación en la ruta de Cdk4-6/CycD/Rb. Es por ello que procedimos al estudio de los patrones de expresión génica en MEFs primarios  $Cdk4^{-/-};Cdk6^{-/-}$  y su comparación con los obtenidos para células silvestres del mismo tipo empleando micromatrices o chips de ADNc. Esta tecnología ya ha sido empleada con éxito para estudiar cambios globales en la expresión génica asociados a ciclo celular de una célula (Iyer et al., 1999; Cho et al., 2001; Ishida et al., 2001, Whitfield et al., 2001; Cooper et al., 2003). Debido a la naturaleza funcional descrita para estas dos quinasas, la mejor aproximación consistía en la sincronización de las células en G0, retirando el suero del medio de cultivo, para posteriormente permitir la reentrada en ciclo de éstas por adición de medio fresco con suero. Para llevar a cabo el estudio se obtuvieron muestras de tiempos representativos del ciclo celular.

La comparación de los patrones de expresión de MEFs primarios silvestres a distintos tiempos del ciclo con respecto al tiempo 0 (células en quiescencia) mostró cambios de sobreexpresión y de inhibición en numerosos genes (Fig. 14 y Tabla 1). De hecho, pudimos comprobar que muchos de estos cambios se ajustaban a lo descrito anteriormente en la literatura (como por ejemplo en el caso de la expresión de ciclina E y ciclina A) (Fig. 15). Estos ensayos también fueron capaces de poner de manifiesto cambios en la expresión de genes relacionados con el proceso de cicatrización de heridas y que ya habían sido descritos (Iyer et al., 1999) para fibroblastos primarios humanos. Estos resultados ponían en evidencia el correcto funcionamiento de la técnica y de los chips empleados para los experimentos, chips generados en el propio CNIO. A la hora de llevar a cabo comparaciones entre MEFs silvestres y  $Cdk4^{-/-};Cdk6^{-/-}$  para un mismo tiempo (0h, 8h., 16h. y 24h.) (Fig.14) pudimos detectar una serie de cambios relevantes en la expresión de un determinado número de genes (tanto sobreexpresados en los MEFs silvestres como en las células doble KO) en todos los grupos de hibridaciones que llevamos a cabo (Fig.16). Sin embargo, no parecía existir relevancia estadística en estos datos puesto que los cambios transcripcionales que se detectaron en cada una de las series de hibridaciones Silvestre/ $Cdk4^{-/-};Cdk6^{-/-}$  no se repetían en las otras series restantes de hibridaciones llevadas a cabo. Podríamos pensar que la ausencia de cambios estadísticamente significativos podría deberse a un fallo a la hora de llevar a cabo el experimento pero existen varios hechos que nos hacen pensar lo contrario. 1) La sincronización inicial en G0 de todas las muestras empleadas era correcta como se

desprende de los análisis por citometría de flujo de los perfiles de ciclo celular y no existían diferencias significativas entre ellas. 2) Las hibridaciones realizadas para determinar los cambios transcripcionales asociados a ciclo en células silvestres resaltaron la reproducibilidad entre sí de los resultados y con los datos anteriormente publicados. 3) Al repetir el marcaje e hibridación en días distintos para una misma muestra de ARNm silvestre y de ARNm Cdk4<sup>-/-</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup>, la reproducibilidad de los cambios de expresión era de un 80-90%. 4) En las series restantes de comparaciones silvestres/Cdk4<sup>-/-</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup> (de todos los tiempos, muestras y replicados) Cdk4 y Cdk6 se encontraban sobreexpresados en los MEFs silvestres, comparados con los doble KO (Dato esperable pues, en realidad, no hay expresión alguna de estas dos quinasas en las células doble mutantes), sirviendo este dato como control positivo interno de nuestro experimento. Por tanto, los cambios detectados parecían más bien deberse a una señal de ruido de fondo del experimento. Determinar la naturaleza estocástica o no de esta señal de ruido requeriría ampliar el número de embriones a emplear en los ensayos. Sin embargo, experimentos adicionales llevados a cabo en paralelo por otros miembros del laboratorio pusieron de relevancia el hecho de que en ausencia de Cdk4 y Cdk6, Cdk2 puede complejarse con ciclina D1 y D2, al menos, y fosforilar de manera efectiva a pRb en los residuos Ser/Thr que fosforilarían los complejos Cdk4-6/ciclina D. Este hecho indica que la fosforilación de pRb, la liberación de los factores E2F y la ejecución del programa transcripcional asociados a dichos factores no tiene por qué verse afectado en los MEFs Cdk4<sup>-/-</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup>. Tomando todos los datos anteriores en conjunto se planteó la hipótesis de que los posibles cambios en la expresión génica de células doble KO comparados con células silvestres no posean una relevancia determinante para la progresión a través del ciclo celular y por esta razón se decidió no continuar esta vía de investigación.

#### 7.4. Animales doble KO para Cdk2 y Cdk4

La falta de grandes defectos en el ciclo celular de células Cdk2<sup>-/-</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup> y Cdk4<sup>-/-</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup> planteaba el interrogante lógico de qué sucedería en ausencia de Cdk2 y Cdk4. Sin embargo, la proximidad de los loci correspondientes a estas dos quinasas complicaba la generación de un animal doble KO por cruces de animales mutantes sencillos (Silver, 1995; Berthet et al., 2003). Se optó entonces por una estrategia de recombinación homóloga del locus de Cdk4 en células ES que ya portaban una mutación deletérea condicional para Cdk2. Este abordaje proporcionaba una mayor ventaja sobre el correspondiente a la generación del animal por cruces de animales

mutantes sencillos puesto que permitía la generación de hasta tres modelos distintos: 1) la de un animal doble KO clásico para Cdk4 y Cdk2, 2) la de un animal KO condicional para Cdk2 en un fondo nulo para Cdk4 (Fig. 17) y 3) la de un animal KO condicional para Cdk4 en un fondo nulo para Cdk2 (Fig. 39). Adicionalmente, cruzando estos últimos animales con animales Cdk6<sup>-/-</sup>, nos permitió generar posteriormente los animales Cdk4<sup>frt/frt</sup>;Cdk2<sup>-/-</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup>, descritos en el apartado 6.10. Así, se podría estudiar el efecto de la doble deficiencia de las quinasas Cdk2 y Cdk4 o la triple deficiencia de Cdk2, Cdk4 y Cdk6 durante la vida adulta del animal y comparar los resultados en un caso u otro.

#### 7.4.1. Cdk4 y Cdk2 resultan dispensables durante la vida adulta del ratón.

Esta parte del trabajo de tesis doctoral se centra en determinar el papel de Cdk2 y Cdk4 en animales adultos aunque al final de esta sección de discusión los datos serán cotejados con los obtenidos en embriones para establecer posibles diferencias entre unos animales u otros.

Los animales Cdk4<sup>-/-</sup>;Cdk2<sup>lox/lox</sup>;RERT<sup>ert/ert</sup> nacen con la frecuencia mendeliana esperada, al igual que sucede con los animales Cdk4<sup>-/-</sup> (Rane et al., 1999; Tsutsui et al., 1999; Martin et al., 2003). Una vez que los animales han sido destetados comienza el tratamiento con 4-OHT, el encargado de activar la recombinasa Cre, que se prolongará durante 4 meses para permitir la escisión eficaz del locus de Cdk2. Completado este período de tiempo se pudo comprobar que en la mayoría de los tejidos del animal la escisión conseguida del locus superaba el 90%, siendo la proteína de Cdk2 prácticamente indetectable en estos tejidos, generando de hecho un animal doblemente KO para Cdk4 y Cdk2, denominado Cdk4<sup>-/-</sup>;Cdk2<sup>Δ/Δ</sup>; RERT<sup>ert/ert</sup>. Tan sólo en el caso del cerebro (10% de escisión) y de testículo (70%) se producía una menor eficiencia en el grado de escisión de locus.

Para comprobar si la diabetes veía acelerada su aparición debido a la eliminación progresiva de Cdk2 se procedió a la determinación de niveles de hiperglicemia de manera regular durante todo el tratamiento del animal. Los datos obtenidos reflejan que la hiperglicemia que desarrollan los animales Cdk4<sup>-/-</sup>;Cdk2<sup>Δ/Δ</sup>;RERT<sup>ert/ert</sup> era similar a la desarrollada en los animales Cdk4<sup>-/-</sup>;Cdk2<sup>lox/lox</sup>;RERT<sup>ert/ert</sup>, tratados con aceite tan sólo y que por tanto permanecían como animales KO para Cdk4 tan sólo, y progresaba de la misma manera (Fig 22). De esta manera, y según lo observado hasta el momento, no se detecta una aparición precoz de síntomas asociados a la diabetes en ausencia de Cdk2 y Cdk4 comparado con la ausencia de Cdk4 tan sólo.

Otra de las características observadas en los animales  $Cdk4^{-/-}$  era un menor tamaño, aproximadamente un 30%, comparado con los animales  $Cdk4^{+/+}$ , hermanos de camada. En el trabajo descrito en Martín et al. (2003) se describe como en ausencia de  $Cdk4$  tan sólo, se produce una reducción similar en el tamaño de los animales y que esta reducción se debe a una menor celularidad en los órganos del animal, no debido a un menor tamaño de las células integrantes de los tejidos. Es más, un análisis morfométrico de las células procedentes de animales deficientes en  $Cdk4$  son hasta un 20% más grande que las células procedentes de animales silvestres en aquellos tejidos donde no se ha descrito un defecto fenotípico obvio para el animal  $Cdk4^{-/-}$ . Este aumento llega hasta el 80% en las células de los tejidos, como páncreas, donde sí se ha descrito un defecto fenotípico obvio en el animal  $Cdk4$  KO. No obstante, este dato indica que  $Cdk4$ , aunque dispensable en la mayoría de los tipos celulares y necesario para el desarrollo ciertos tipos celulares especializados tan sólo, ejerce funciones importantes en el ciclo celular de las células somáticas. Por el contrario, en el caso de animales  $Cdk2^{-/-}$  su tamaño es similar al de los hermanos silvestres de camada, lo que indica que  $Cdk2$  no juega ningún papel relevante en el mantenimiento de la homeostasis celular del ratón. La reducción de tamaño encontrada en animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  era muy similar a la encontrada en los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$  (Fig.21) La conclusión de este hecho indica la ausencia de papeles compensatorios entre  $Cdk2$  y  $Cdk4$  en el mantenimiento de la homeostasis celular del animal adulto. Puesto que en el caso de los animales  $Cdk6^{-/-}$ , las hembras también presentan una reducción en el tamaño corporal, de aproximadamente un 30%, resultaría interesante comprobar si la eliminación de manera condicional de  $Cdk6$  en un animal de fondo nulo para  $Cdk4$  provoca una reducción adicional en el tamaño de éste y, de esta manera, poder ahondar en los mecanismos que intervienen en el control de la homeostasis animal y las Cdks.

De lo descrito en los párrafos superiores no parece que se produzcan defectos fenotípicos obvios en los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  que vayan más allá de los presentes en los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$  (y por tanto, KOs sencillos para  $Cdk4$ ).

Con respecto a la ablación de  $Cdk2$  en animales  $Cdk2^{lox/lox}$  sencillos, el tratamiento con 4-OHT provocaba niveles de escisión similares a los descritos para los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$  en el apartado 6.3 (Observaciones no publicadas obtenidas por Dr. Alberto Martín). Así, la escisión de  $Cdk2$  en las gónadas alcanzaba unos valores en torno al 60-70%. En estos animales no se detectaron defectos fenotípicos ni siquiera en este tejido. Conviene recordar que los animales KO

de Cdk2 poseen gónadas atróficas debido a defectos en la meiosis de las células germinales inmaduras (Ortega et al., 2003; Berthet et al., 2003). La ausencia de estos defectos puede deberse a: 1) que una escisión incompleta de Cdk2 permita que la expresión remanente sea suficiente para que en estas células se complete la meiosis correctamente y se alcance maduración normal o 2) que la eliminación de Cdk2 en las gónadas adultas no produzca efecto alguno por lo que Cdk2 sólo sería esencial en las gónadas de los animales durante el desarrollo embrionario.

Para corroborar las anteriores afirmaciones se realizó un análisis detallado de la histología de los animales doble KO y se observó que tan sólo existían defectos fenotípicos en aquellos tejidos para los que ya se habían descrito fallos en los animales  $Cdk4^{-/-}$ . De esta manera, se detectó un descenso en el número y tamaño de los islotes de Langerhans comparados con los animales silvestres. Otros tejidos con una elevada tasa de proliferación como el colon o el timo mantenían una organización tisular semejante a la de los animales silvestres hermanos de camada (ver apartado siguiente).

#### 7.4.2. Cdk4 y Cdk2 resultan dispensables para la proliferación celular en animales adultos

Podría objetarse que la ausencia de defectos obvios en los animales  $Cdk4^{-/-}; Cdk2^{\Delta/\Delta}; RERT^{ert/ert}$ , más allá de los defectos observados en los animales  $Cdk4^{-/-}$ , podría deberse a que la mayoría de los tejidos de un organismo adulto presentan una baja tasa de proliferación. Con el objetivo de determinar posibles defectos en la proliferación de los animales doble KO de Cdk2 y Cdk4 se extrajeron varios tejidos caracterizados por un alto índice de proliferación (Colon, intestino delgado, piel y esófago) y fueron estudiados para el marcaje con ki67, molécula asociada a la división celular y más concretamente a la duplicación del material genético (Fig.26). Todos los tejidos analizados mostraban niveles de proliferación similares a los encontrados para los mismos tejidos en animales silvestres hermanos de camada. Así, en organismos adultos Cdk2 y Cdk4 no parece que jueguen papeles compensatorios en los procesos de proliferación y división celular.

El análisis de marcadores de apoptosis tampoco pudo detectar diferencias entre animales  $Cdk4^{-/-}; Cdk2^{\Delta/\Delta}; RERT^{ert/ert}$  y animales  $Cdk4^{+/+}; Cdk2^{+/+}; RERT^{ert/ert}$ . De nuevo, todos estos datos conjuntamente indican que Cdk2 y Cdk4 son dispensables en organismos adultos y que no ejercen papeles compensatorios entre ellos.



### 7.4.3. Los niveles de reguladores de ciclo celular permanecen inalterados en ausencia de Cdk4 y Cdk2

Como hemos comentado en el apartado 3, la ausencia de Cdk4 y Cdk6 no parece alterar la expresión de los principales reguladores del ciclo celular en parte debido a la compensación ejercida por Cdk2 (Malumbres et al., 2004). De la misma manera podría argumentarse que en el caso de los animales doble KO de Cdk2 y Cdk4, es Cdk6 la quinasa que está ejerciendo un papel compensatorio. El análisis bioquímico de tejidos con una alta actividad proliferativa, además de corroborar la ausencia tanto de Cdk2 como de Cdk4, no estableció diferencias en los niveles de algunos de los principales reguladores del ciclo celular como Cdk6, Cdk1, CycD1, CycD2 (Fig.28a). Una expresión similar de Cdk1, diana transcripcional de los factores E2F, estaría evidenciando una fosforilación normal de la proteína pRb, a pesar del papel aparentemente esencial de Cdk2 y Cdk4 como reguladores de la actividad de pRb. La presencia de complejos Cdk6/CycD2 (Fig. 28b) podrían evidenciar que en la mayoría de los tejidos del animal basta la presencia de Cdk6 para compensar la ausencia de Cdk4 y Cdk2.

### 7.4.4. Estudio de la hematopoyesis adulta en los animales doble KO para Cdk4 y Cdk2

Algunos de los tejidos que mantienen una proliferación activa a lo largo de toda la vida del animal son los tejidos correspondientes a los órganos hematopoyéticos. Además, por lo comentado en el caso de los animales KO para Cdk6, Cdk2/6 y Cdk4/6 (Malumbres, 2004), parece que la hematopoyesis, de una manera u otra es especialmente sensible a la pérdida de Cdks. Por todo ello, se procedió al estudio detallado de las distintas poblaciones hematopoyéticas en timo, bazo y médula ósea. En todos estos tejidos los niveles de poblaciones hematopoyéticas maduras parecían normales al comparar animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  con animales  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$ . Este dato, unido al hecho de que el análisis de los precursores hematopoyéticos obtenidos de la médula ósea de los animales doble KO refleja que éstos proliferan normalmente (Fig.31), indica que Cdk4 y Cdk2 son dos quinasas dispensables para la hematopoyesis y que entre sí no están ejerciendo ningún papel compensatorio. Por tanto, parece que en el caso de las poblaciones hematopoyéticas es Cdk6 la quinasa que juega un papel preponderante, aunque no completamente esencial, controlando el progreso a través de G1 hacia S. No obstante, Cdk4 ejerce algún tipo de compensación funcional con Cdk6 tal y como se desprende del hecho de que los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk6^{-/-}$  mueran por anemia antes de completar el desarrollo embrionario (Malumbres et al., 2004).

#### 7.4.5. Los hepatocitos adultos son capaces de entrar en división y proliferar normalmente en ausencia de Cdk4 y Cdk2.

Otro de los hechos que podría argumentarse a la hora de explicar la ausencia de nuevos defectos en los animales doble KO de Cdk2 y Cdk4 es que durante el tiempo que dura el tratamiento con 4-OHT las células en división del organismo han podido desarrollar mecanismos compensatorios que minimicen el efecto de la eliminación de Cdk2. Sin embargo, en el caso del hígado, los hepatocitos adultos son células que permanecen en quiescencia (sin considerar la división celular que pueda producirse para mantener la homeostasis del órgano) y que frente a un estímulo como pueda ser una necrosis severa o una pérdida importante de masa hepática entran de nuevo en el ciclo celular. Así, la mayoría de las células de este órgano al permanecer en quiescencia no podrían haber desarrollado esta adaptación. Por esta razón, el hígado supone un órgano ideal para testar la capacidad in vivo de re-entrada en ciclo de células que permanecen en quiescencia (Higgins y Anderson, 1931). Así, animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  a los que se les extrajeron 2/3 de la masa hepática al ser sometidos a una hepatectomía parcial eran capaces de regenerar este órgano de la misma manera que los animales  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$ , hermanos de camada. Un análisis detallado de la histología de los hígados regenerados mostraba la ausencia de diferencias en la funcionalidad de los órganos regenerados, a 9 días tras la operación (Fig. 33), sin que pudieran detectarse defectos obvios. Una de las posibles explicaciones a este hecho consiste en que las células a partir de las cuales se produjo la regeneración hepática en los animales doble KO para Cdk2 y Cdk4 fuera un grupo de células que conservan todavía el alelo lox de Cdk2, sin escindir. Sin embargo el análisis de la escisión de Cdk2 en el hígado en el momento de la operación y tras ésta reflejaba que en el caso de los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$ , la población de hepatocitos a partir de la cual se regeneraba el hígado carecía tanto de Cdk4 como de Cdk2.

El estudio de la regeneración hepática a distintos tiempos tras practicar a los animales la cirugía descrita indicaba un cierto retraso de unas 24 horas, aproximadamente, en el pico de proliferación entre los hepatocitos  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  y los  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$  (Fig.36). Otra de las diferencias encontradas y que se correlacionaba con las 24 horas de retraso en la proliferación de las células doble KO era la recuperación de las reservas de glucógeno celulares. Tras la hepatectomía, las reservas de glucógeno de los hepatocitos descendían bruscamente y hasta las 36 horas, aproximadamente, post-cirugía no comenzaban a

incrementar de nuevo sus niveles produciéndose un pequeño retraso en el caso de los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta\Delta};RERT^{ert/ert}$  (Fig.37).

Pudo detectarse, no obstante, en los hígados regenerados de animales deficientes en ambas quinasas un incremento en los niveles de Cdk1 (Fig.34). Ya se ha descrito la posibilidad de que en ausencia, al menos, de Cdk2 y p27, Cdk1 pueda unirse a ciclina E y fosforilar a los mismos sustratos a los que fosforila el complejo Cdk2/ciclina E (Aleem et al., 2005). La generación en nuestro laboratorio de animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{-/-}$  y  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{-/-};Cdk6^{-/-}$  (Barrière et al., 2007; Santamaría et al., 2007 y ver secciones 7.4.7 y 7.5) ha demostrado que la ausencia de Cdk2 y Cdk4 basta para que Cdk1 se una a ciclina E y forme complejos funcionales. En el caso de la ausencia de Cdk2, Cdk4 y Cdk6 está unión se ve potenciada. Pudiera ser que el incremento en los niveles observados de Cdk1 tras la operación en los hígados regenerados de los doble KO de Cdk2 y Cdk4 se debiera a un efecto compensatorio. Sin embargo, una segunda opción consistiría en que debido al retraso de 24 horas que se produce en la regeneración hepática de estos animales (Fig.36) a día 9 post-operatorio, aunque el órgano estuviera completamente regenerado todavía permanecieran elevados los niveles de esta quinasas. Establecer si, efectivamente, el incremento de Cdk1 en condiciones especiales de estrés celular consiste en un mecanismo compensatorio requerirá de futuros ensayos.

Todos los anteriores datos llevan a la conclusión de que, incluso frente a un estrés celular considerable como supone la hepatectomía parcial, Cdk2 y Cdk4 resultan prescindibles para la consecución del ciclo celular (y del resto de procesos morfogenéticos necesarios para la correcta regeneración del hígado).

#### **7.4.6. Los queratinocitos deficientes en Cdk4 y Cdk2 también son capaces de proliferar bajo condiciones de estrés celular**

Uno de los ensayos mejor caracterizados a la hora de establecer la capacidad proliferativa de un grupo de células en un modelo in vivo es el ensayo de cicatrización de heridas. Las células epiteliales son un ejemplo de células en continua división que bajo estímulos como la aparición de una herida potencian la proliferación celular, además de activar otros procesos también de vital importancia para la curación de la herida (Mijimolle et al., 2005; Cayuela et al., 2005). Tras practicar una serie de heridas en la piel de animales silvestres y de animales deficientes de Cdk2 y Cdk4, ambos grupos regeneraban ésta de la misma manera sin diferencia alguna. Al igual que sucedía con los ensayos de hepatectomía era posible que la piel de los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta\Delta};RERT^{ert/ert}$  se regenerara a partir de un grupo de células donde no se hubiera escindido de manera eficiente el alelo  $Cdk2^{lox}$  y todavía conservaran expresión

de la proteína. No era, de nuevo, el caso pues el análisis por southern de las pieles obtenidas al practicar la herida y una vez curada ésta mostraba una escisión cercana al 100% de Cdk2. De esta manera, se puede concluir que los queratinocitos en ausencia de Cdk2 y Cdk4 pueden proliferar correctamente y sin retrasos comparados con células silvestres.

Todos los datos anteriores tomados en su conjunto parecen indicar que Cdk2 y Cdk4 son dispensables para una correcta consecución del ciclo celular. La ausencia de defectos en los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$ , así lo reflejan. Además, ensayos como el de regeneración hepática descartan posibles mecanismos compensatorios que hubieran podido surgir durante el tiempo que dura el tratamiento con 4-OHT para producir la eliminación de Cdk2.

#### 7.4.7. Animales doble KO clásicos para Cdk4 y Cdk2

De los resultados obtenidos a lo largo de los apartados anteriores, se concluye que en los animales adultos Cdk2 y Cdk4 no son esenciales para llevar a cabo la división celular y que no existen nuevos defectos que sumar a los ya existentes debido a la ausencia de Cdk4. La caracterización de animales doble KO clásicos (es decir que portan la mutación en línea germinal) para estas dos quinasas ha mostrado, sin embargo, que durante el desarrollo embrionario la situación difiere a la de adultos (Barrière, 2007). Los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{-/-}$  comienzan a morir en torno al día E15.5, aunque un porcentaje de estos animales llegan a sobrevivir hasta día P1. La causa de la muerte se debe a un defecto proliferativo en los cardiomiocitos, lo que provoca un estrechamiento de las paredes ventriculares del corazón. De esta manera, el corazón no sería capaz de soportar los cambios hemodinámicos que se producen especialmente durante el nacimiento. Un análisis detallado del resto de tejidos, incluyendo los hematopoyéticos, ha demostrado que éstos poseen niveles de proliferación similares a los de tejidos procedentes de animales  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$ . La caracterización bioquímica de los embriones ha mostrado que no se producen cambios en los niveles de los principales reguladores del ciclo celular (Cdk6, Cdk1, CycD1, D2, CycE1, CycA2, p21<sup>Cip1</sup> y p27<sup>Kip1</sup>). Es más la fosforilación en pRb de residuos Ser/Thr específicos de Cdk2 y Cdk4 no se ve alterada. Una posible explicación a esta falta de mayores defectos en estos embriones reside en el hecho de que en ausencia de Cdk2 y Cdk4, los niveles de Cdk6 complejada con CycD2 y los de Cdk1 unida a CycE1 aumentan considerablemente, lo que podría estar indicando un efecto compensatorio. Los datos obtenidos con MEFs  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{-/-}$  aportan evidencias adicionales de que el ciclo celular puede completarse correctamente en ausencia de estas dos quinasas. Los MEFs doble KO

se immortalizan eficazmente con una frecuencia elevada (más del 80%) y la entrada en fase S de estas células immortalizadas se produce con cinéticas similares a la de MEFs silvestres inmortales. De hecho, la única diferencia considerable entre ambos tipos de células (doble KO y silvestres) consiste en una mayor susceptibilidad al estrés impuesto por su adaptación a las condiciones de cultivo in vitro. Bajo estas condiciones de estrés, los MEFs  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{-/-}$  proliferan relativamente más despacio que los MEFs  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+}$ . Sin embargo, una vez que los MEFs se han adaptado al medio de cultivo se comportan como MEFs silvestres. La conclusión de ambos modelos animales,  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{-/-}$  y  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$ , parece indicar que Cdk2 y Cdk4 son dispensables para el desarrollo y avance del ciclo celular. Tan sólo en ciertos tipos celulares especializados y en determinados momentos de la vida del animal parece que Cdk2 y Cdk4 ejercen un papel fundamental y compensatorio entre sí.

## 7.5. Animales triples KO para Cdk2, Cdk4 y Cdk6 y animales KO sencillos para Cdk1. De vuelta al ciclo celular en levaduras.

La generación de animales dobles KO para las distintas combinaciones de Cdks que controlan la interfase del ciclo celular (Cdk2, Cdk4, Cdk6) (Malumbres, 2004; Barrière, 2007; Berthet, 2006) puso de relieve la falta de defectos dramáticos en la organogénesis de los animales y en el avance a través de las distintas etapas del ciclo celular, debido a las posibles compensaciones funcionales que realizan algunas Cdks en ausencia de otras. Tan sólo en el caso de células muy especializadas la ausencia de una de las Cdks de interfase no puede ser compensada por alguna otra (como en el caso de las células  $\beta$  pancreáticas adultas y los defectos proliferativos que se producen en éstas en ausencia de Cdk4 o el defecto proliferativo que se produce en cardiomiocitos embrionarios debido a la ausencia combinada de Cdk4 y Cdk2). Estos resultados plantean la pregunta de hasta qué punto pudiera ser necesaria la presencia de alguna de las Cdks de interfase para completar correctamente el ciclo celular en organismos superiores. Para responder a esta pregunta y como parte del trabajo descrito en esta memoria se ha generado un animal KO condicional para Cdk4 en un fondo nulo para Cdk2 y Cdk6 ( $Cdk4^{ftr/ftr};Cdk2^{-/-};Cdk6^{-/-}$ ) (ver apartado 6.3). El principal inconveniente que presenta este modelo ha sido la ausencia hasta hace tan sólo un par de años de un modelo inducible de Flipasa similar al Cre-ERT2. Es por ello que para inducir la ablación del alelo  $Cdk4^{ftr}$  nos hemos visto obligados a emplear

infecciones con Adenovirus que portan en su genoma el ADNc que codifica para la recombinasa (virus AdFlpe). Dos son los principales inconvenientes que plantea este sistema: 1) La acción de la recombinasa se verá limitada en el espacio por el tropismo del virus; así, en nuestro caso, la infección vía vena caudal dirigirá la infección del virus hacia el hígado, principalmente, lo que restringirá los niveles máximos de ablación del alelo  $Cdk4^{frt}$  a este tejido. 2) La rápida inmunidad que desarrolla el huésped a la infección por adenovirus hace prácticamente ineficaz aplicar sucesivas rondas de infección para mejorar la eficiencia de corte del alelo flanqueado por las secuencias frt. A pesar de estas dos limitaciones, la infección con AdFlpe en vena caudal nos permitió alcanzar un corte máximo comprendido entre 80-90% de las células del hígado y de hasta un 50% en las células de un amplio panel de otros tejidos (Fig. 40). Estos animales no mostraron síntomas de enfermedad antes de ser sacrificados. No sólo eso, las hepatectomías parciales llevadas a cabo en animales infectados con AdFlpe reveló que los hepatocitos son capaces de dividirse en ausencia de Cdk4, Cdk2 y Cdk6 y regenerar la masa hepática perdida de la misma manera que los hepatocitos procedentes de los controles infectados con adenovirus que porta en su genoma el ADNc que codifica para la proteína GFPe (AdGFPe) (Fig. 41). Estos datos demuestran que in vivo, al menos los hepatocitos, son capaces de proliferar en ausencia de las tres Cdks que regulan el paso a través de la interfase del ciclo celular. Estos datos viene reforzados por la generación en el laboratorio de animales triples KO clásicos para Cdk2, Cdk4 y Cdk6 ( $Cdk4^{-/-};Cdk2^{-/-};Cdk6^{-/-}$ ) (Santamaría, 2007) Estos últimos mueren a partir del día E13.5, no encontrándose embriones vivos a día E15.5, un fenotipo más severo que el observado para los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{-/-}$ . La causa de la muerte parece ser un defecto severo en la hematopoyesis de estos animales, sobre todo en la línea mieloide. También se observó el mismo defecto proliferativo detectado en los cardiomiocitos de los animales doble KO de Cdk4 y Cdk2. Puesto que estos animales completaban en un número significativo el desarrollo embrionario parece más probable que este defecto no contribuyera de manera importante a la letalidad de los animales triples KO. El marcaje por ki67 mostraba que las células de la mayoría de los tejidos podían proliferar correctamente en ausencia de Cdk2, Cdk4 y Cdk6 pues la organogénesis de la mayoría de los tejidos parecía normal. No se encontraron diferencias en los niveles de los reguladores principales del ciclo celular (CycD1, D2, E1, A2, B1,  $p21^{Cip1}$  y  $p57^{Kip2}$ ). Tan sólo se encontró un descenso en los niveles de  $p27^{Kip1}$ . Al igual que sucedía con los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{-/-}$ , pRb se fosforilaba de manera eficiente en aquellos residuos diana de Cdk2 y Cdk4/6. A pesar de existir menores niveles de

proliferación en los MEFs triple KO, estos podían immortalizarse con una elevada eficiencia tras pases seriados en cultivos. La justificación a defectos severos en la proliferación en el ciclo celular en ausencia de las tres Cdks de interfase se encontró en un aumento en los niveles funcionales de Cdk1, unida a CycD1, CycD2 y a CycE1. Por tanto, parece que la mera presencia de Cdk1 basta para hacer progresar el ciclo celular, incluso en organismos superiores, aunque la existencia de las demás Cdks sea necesaria para el desarrollo completo y complejo de un organismo multicelular completo.

No obstante, este hecho plantea la pregunta de qué sucede en ausencia de Cdk1. Los animales Cdk1<sup>-/-</sup> son inviables y no se llegan a detectar embriones a día E1.5 (Santamaría, 2007) pues éstos parecen incapaces de llegar más allá del estadio de 4 células. Muy probablemente, las dos rondas de división llevadas a cabo sean logradas gracias a la contribución maternal de la quinasa.

En base a todos los datos anteriores parece confirmarse el hecho de que el ciclo celular en organismos superiores requiere tan sólo de Cdk1 para completarse correctamente. Cdk1 es, a su vez, la Cdk que posee mayor homología con las Cdc2 y Cdc28 de levaduras. En cierta manera, este ciclo se asemeja al ciclo celular de levaduras donde una única Cdk es la encargada de controlar el progreso a través de todas las fases que lo constituyen. Esta única Cdk posee la capacidad de unirse a distintas ciclinas, que serán las encargadas de conferir al complejo la especificidad de sustrato. Así, los organismos más evolucionados mantienen ciertas características que indican su origen a partir de organismos más primitivos y menos evolucionados. Queda por resolver todavía la razón por la que en las rondas de división de ciertas células especializadas como el de las células  $\beta$  del páncreas no se producen estos fenómenos de compensación.

Los resultados obtenidos con modelos KO clásicos y KO condicionales para las Cdks plantea varias preguntas interesantes como las diferencias que se producen en el requerimiento de estas quinasas en las distintas etapas del desarrollo del animal. Así, la ausencia de Cdk4 y de Cdk2 durante la etapa embrionaria resulta en la muerte de los animales nada más nacer, a P1. Los animales que carecen de Cdk4 comienzan a morir debido a la diabetes provocada por dicha deficiencia a partir de los cinco o seis meses de edad. No obstante, la eliminación de Cdk2 en este contexto no provoca ningún incremento de la mortandad puesto que los animales Cdk4<sup>-/-</sup>;Cdk2<sup>lox/lox</sup>;RERT<sup>ertert</sup> pueden completar el tratamiento con 4-OHT sin sufrir muertes. ¿A qué pueden deberse estas diferencias? Parece que el correcto desarrollo de un organismo completo requiere de la división en momentos muy determinados de tipos

celulares concretos. Dos ejemplos lo constituyen las células  $\beta$  del páncreas y los cardiomiocitos del corazón. El desarrollo de las células  $\beta$  no sólo durante el desarrollo embrionario si no también durante el desarrollo post-natal. A día E15.5 ya existen células productoras de insulina presentes en el embrión. A partir del día E17.5 se produce un incremento de los niveles de división celular, incremento que se prolongará en la etapa post-embrionaria desde P1 hasta, al menos, P120. Este aumento de la división celular coincide con la presencia de Cdk4 en el núcleo de las células  $\beta$  (Martin et al., 2003). Por otro lado, los cardiomiocitos necesitan dividirse de manera crítica durante la formación del corazón en el desarrollo embrionario para permitir que una vez que el animal nazca dicho órgano sea capaz de sustentar los cambios hemodinámicos que se van a producir. Sin embargo, una vez ha pasado el pico de proliferación de dicho tipo celular la ausencia de alguna Cdk que pudiera resultar esencial para la división de dichas células podría no tener repercusión alguna. Así, en los animales  $Cdk4^{-/-}; Cdk2^{lox/lox}; RERT^{ertert}$  la presencia de Cdk2 durante el desarrollo embrionario bastaría para la correcta formación del corazón y una vez que el animal ha nacido, los cardiomiocitos abandonan su pico de proliferación y la eliminación en ese momento de Cdk2 en un fondo nulo para Cdk4 no provoca defectos en el corazón del animal.

Otra pregunta muy interesante consiste en determinar cuál es la razón por la que en algunos casos la falta de alguna Cdk no puede ser compensada con la presencia de otras y por qué. A pesar de que Cdk4 y Cdk6 son dos quinasas con propiedades bioquímicas prácticamente indistinguibles entre sí, Cdk6 no parece compensar la ausencia de Cdk4 en las células componentes de los islotes de Langerhans. Un análisis más detallado de las células  $\beta$  muestra que éstas no son capaces de expresar el ARN mensajero que codifica para Cdk6 (Martin et al, 2003). Por tanto, parece que en este caso las diferencias de roles entre ambas Cdks se debe a su patrón de expresión. No obstante, la falta de compensación no puede explicarse tan sólo debido a diferentes patrones de expresión de Cdks puesto que Cdk2 sí se expresa en este tipo celular. Podría aducirse que Cdk4 y Cdk2 controlan diferentes etapas del ciclo celular y que, por tanto, no pueden compensarse la una a la otra sin embargo dos datos ponen en entredicho esta hipótesis: 1) en los MEFs  $Cdk4^{-/-}; Cdk6^{-/-}$  se ha demostrado que Cdk2 puede complejarse con las ciclinas D y fosforilar aquellos sustratos propios de los complejos Cdk4 ó 6/CycD y 2) la ausencia de defectos en los cardiomiocitos en ausencia de Cdk4 o Cdk2 tan sólo y los defectos proliferativos en este tipo celular durante el desarrollo embrionario en ausencia de ambas Cdks muestran que sí existe cierta compensación funcional entre éstas. Igualmente



podríamos preguntarnos cuál es la razón para que Cdk6 no pueda compensar la ausencia de Cdk4 y Cdk2 en los cardiomiocitos de embriones. En extractos proteicos de embriones completos sí se ha mostrado la expresión de Cdk6, sin embargo no se ha estudiado la expresión detallada de esta Cdk en dicho tipo celular. ¿Podría deberse la ausencia de compensación por parte de esta Cdk en los cardiomiocitos a una razón similar a la que se produce en páncreas? Otra posible explicación a la falta de compensación por parte de alguna Cdk en ausencia de otra u otras es la especificidad de sustrato. Ya hemos indicado que la especificidad de sustrato del complejo Cdk/Ciclina lo confiere la subunidad reguladora, la ciclina. Como hemos comentado anteriormente Cdk2 al unirse a las ciclinas D es capaz de fosforilar a pRb y, sin embargo, estos complejos son incapaces de fosforilar a la proteína Histona H1, sustrato de los complejos Cdk2/CycE. Si los estudios con MEFs primarios muestran que Cdk2 puede unirse a las ciclinas D y formar complejos activos, ¿por qué no es capaz de compensar in vivo la doble ausencia de Cdk4 y Cdk6? Una posible explicación residiría en el hecho de que a pesar de formar complejos activos los niveles de actividad quinasa conseguidos no resultarían suficientes para sostener la proliferación de los precursores hematopoyéticos responsables de la generación de la línea eritroide.

Responder a las preguntas planteadas en los párrafos superiores requerirán de experimentos adicionales que nos permitan determinar de manera más detallada los requerimientos precisos de Cdks en aquellas tipos celulares que dependen tan fuertemente de alguna Cdk.

## 7.6. Las Cdks como dianas terapéuticas en los procesos neoplásicos.

Bajo el término de cáncer definimos toda una serie de procesos neoplásicos de origen tisular distinto pero provocados por una serie de mutaciones genéticas distintas que afectan a procesos comunes. Dos de las características esenciales para que toda célula sufra un proceso de transformación neoplásica y pueda provocar la aparición de un tumor son 1) la independencia de factores mitogénicos externos para promover la división celular y 2) la insensibilidad celular a las señales antimitogénicas, que detendrían el ciclo celular (Hanahan y Weinberg, 2000). Por ello, el cáncer podría definirse como una enfermedad del ciclo celular y a lo largo de un amplio número de tumores de origen muy distinto se han encontrado de manera consistente mutaciones en los genes encargados de codificar para los reguladores del ciclo (Malumbres y

Barbacid, 2001). Por esta razón a lo largo de los últimos años se han desarrollado y se siguen desarrollando varias generaciones de compuestos destinados a la inhibición de las Cdks en procesos neoplásicos (Pei, 2005; Shapiro, 2006; Malumbres, 2007). Algunos de estos compuestos se encuentran actualmente en fases avanzadas de ensayos clínicos, como por ejemplo el compuesto flavopiridol (un inhibidor de amplio espectro de Cdks) que se encuentra en fase III de varios ensayos clínicos y que ha mostrado actividad efectiva en pacientes que sufren de leucemias linfocíticas crónicas refractarias a otro tipo de tratamientos (Malumbres, 2007). No obstante, todavía falta por responder a numerosas preguntas en torno al desarrollo de compuestos dirigidos contra las Cdks. Preguntas como la conveniencia de diseñar inhibidores de Cdks de amplio espectro (como en el caso del Flavopiridol) que inhiban a más de una Cdk o de la de diseñar compuestos más específicos de ciertas Cdks, o la relevancia de Cdks particulares en diferentes procesos neoplásicos requieren una respuesta antes de destinar numerosos esfuerzos humanos y materiales para el desarrollo de nuevos fármacos destinados a modular la actividad de estas proteínas en un proceso tumoral. En ese sentido, la generación de animales modelo de estos reguladores del ciclo celular puede aportar numerosos datos previos a la consideración del diseño de una estrategia terapéutica específicamente dirigida contra las Cdks. Por ejemplo, los animales  $Cdk4^{-/-}$  se han mostrado resistentes a la actividad tumorigénica del oncogén c-myc en tejidos epiteliales (Rodríguez Puebla, 2002; Miliani de Marval, 2004). ¿A qué se debe esta reducción en el número de tumores? Una posibilidad es que dicho descenso se deba a un efecto autónomo en la división celular provocado por la deficiencia de Cdk4 en los queratinocitos. Ahora bien, otra posibilidad es que algún defecto metabólico relacionado con la aparición de la diabetes que sufren los animales que carecen de Cdk4 (además del hecho de que estos animales poseen de por sí una menor vida media comparados a sus hermanos silvestres de camada) sea el responsable en esta reducción del número de tumores. No obstante, la generación de una colonia de hembras deficientes de Cdk4 y que no desarrollan diabetes ha permitido demostrar que estos animales resultan resistentes a la aparición de tumores de mama dependientes de Erb2 (Landis et al., 2006) En el caso de Cdk2, la deficiencia de esta quinasa provoca una reducción leve en la aparición de papilomas según el modelo establecido de DMBA/TPA (Balmain y Pragnell, 1983, Observaciones no publicadas obtenidas por el Dr. A. Martín). Uno de los objetivos que se han planteado para proseguir el trabajo iniciado con la caracterización de los modelos murinos descritos en esta memoria consiste en la determinación de si los animales  $Cdk4^{-/-}$ ;  $Cdk2^{lox/lox}$ ;  $RERT^{ert/ert}$  o los  $Cdk2^{-/-}$ ;  $Cdk4^{frit/frit}$ ;  $Cdk6^{-/-}$  resultan más resistentes a la

aparición de ciertos tumores empleando protocolos de carcinogénesis química o el cruce con modelos animales tumorogénicos. Conviene resaltar que los animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$  mantienen el problema de una vida media reducida (lo que puede suponer un problema para ciertos protocolos de carcinogénesis química como el del DEN/Fenobarbital en hígado, que se alarga hasta las 56 semanas antes de la aparición de los tumores), además de los problemas metabólicos derivados de la diabetes.

Otra de las limitaciones que poseen los diferentes modelos KO de Cdks para evaluar el desarrollo de fármacos antineoplásicos dirigidos contra ellas es el hecho de que la inhibición de la actividad enzimática de una proteína que se encuentra plegada correctamente y uniéndose a posibles sustratos y cofactores no tiene por qué resultar en la misma situación que la mera eliminación del medio de ésta, situación que tiene lugar en los modelos KO. ¿Cuáles son las posibles diferencias entre mutaciones deletéreas y mutaciones inactivantes para el caso de las Cdks? El análisis de MEFs  $Cdk4^{-/-}$  en división asincrónica obtención ha revelado que no existe alteración alguna en el perfil del ciclo celular (Tsutsui et al., 1999). Igualmente, la inserción de una mutación inactivante del tipo dominante negativo en varias líneas celulares humanas en división asincrónica tampoco provoca la aparición de un perfil de ciclo celular alterado (van den Heuvel y Harlow, 1993). Ahora bien, en el caso de la mutación inactivante de  $Cdk4$  se ha comprobado que esta forma mutada puede unirse a las ciclinas D de manera normal. Por tanto, parece que  $Cdk4$  resulta una candidata ideal para estudiar de manera genética las posibles diferencias entre los dos escenarios mencionados y la idoneidad de diseñar moléculas inhibitoras de la actividad Cdk en el tratamiento de los tumores. Para superar ello hemos generado en el laboratorio recientemente un modelo de  $Cdk4$  empleando la tecnología pFlex (Schnütgen, 2003). En este modelo KI condicional, en condiciones normales, se expresa la forma silvestre de  $Cdk4$ ; sin embargo, y frente a la activación de la recombinasa Cre por medio del tratamiento con 4-OHT (al igual que en nuestros animales  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$ ), deja de expresarse ésta para comenzar a expresarse una forma que porta la mutación puntual K35M que inactiva su actividad catalítica. Así logramos por medios genéticos aproximarnos lo más posible a la hipotética situación de un tratamiento farmacológico. Este modelo será próximamente empleado para estudiar de manera más fidedigna la conveniencia de diseñar inhibidores dirigidos específicamente contra  $Cdk4$  en el escenario de un proceso neoplásico.



# **8. Conclusiones**



1. No se han detectado cambios sustanciales, estadísticamente significativos, en los perfiles transcripcionales de MEFs primarios, sincronizados en G0, en ausencia de las quinasas Cdk4 y Cdk6 comparados con MEFs primarios silvestres.
2. Cdk2 y Cdk4 resultan dispensables para la vida adulta del ratón.
3. No obstante, los animales que carecen de Cdk4 y Cdk2 desarrollan diabetes, al igual que sucede con los animales que carecen tan sólo de Cdk4. La doble deficiencia de Cdk4 y Cdk2 no incrementa los niveles de hiperglicemia comparados con los niveles desarrollados por los animales KO de Cdk4.
4. La ausencia de Cdk4 y Cdk2 no compromete la homeostasis del ratón adulto más allá de lo que se encuentra en ausencia de Cdk4. La reducción de tamaño observada para los animales deficientes de Cdk4 se mantiene igual en los animales deficientes de Cdk4 y Cdk2.
5. En ausencia de Cdk4 y Cdk2 no existen defectos histológicos adicionales a los ya descritos en los modelos de KO sencillos (Cdk4 o Cdk2lox).
6. Los niveles de proliferación de los tejidos procedentes de animales que carecen de Cdk4 y Cdk2 se mantienen similares a los procedentes de animales silvestres. La única excepción la suponen aquellos tejidos donde ya se ha descrito un defecto proliferativo debido a la carencia de Cdk4 (como por ejemplo, páncreas).
7. La hematopoyesis no se ve comprometida en ausencia de Cdk4 y Cdk2. La determinación de la capacidad de generar colonias por parte de los precursores hematopoyéticos y de generar las distintas líneas hematopoyéticas maduras indica que Cdk2 y Cdk4 son dispensables para mantener el sistema hematopoyético en animales adultos.
8. Frente a condiciones de estrés severo (como la hepatectomía parcial o el ensayo de cicatrización de heridas), los animales que carecen de Cdk4 y Cdk2 son capaces de regenerar la masa hepática perdida o la sección de piel extraída con la misma eficacia que los animales silvestres. Por lo tanto, tanto

hepatocitos como queratinocitos son capaces de dividirse normalmente en ausencia de estas dos quinasas.

9. Aquellos animales cuyos hígados se componen de una población celular mayoritariamente deficiente en Cdk4, Cdk6 y Cdk2 al ser sometidos a una hepatectomía parcial son capaces de regenerar normalmente la masa hepática perdida a partir de células que carecen de las tres quinasas.



# 9. Bibliografía



- Adams MD et al.  
The genome sequence of *Drosophila melanogaster*.  
*Science*. 2000; 287:2185-2195.
- Aktas H, Cai H, Cooper GM.  
Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1.  
*Mol Cell Biol*. 1997; 17(7):3850-3857.
- Aleem E, Kiyokawa H, Kaldis P.  
Cdc2-cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition.  
*Nat Cell Biol*. 2005; 7(8):831-6.
- Alevizopoulos K, Vlach J, Hennecke S, Amati B.  
Cyclin E and c-Myc promote cell proliferation in the presence of p16INK4a and of hypophosphorylated retinoblastoma family proteins.  
*EMBO J*. 1997; 16(17):5322-5333.
- Alt JR, Cleveland JL, Hannink M, Diehl JA.  
Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation.  
*Genes Dev*. 2000 Dec; 14(24):3102-3114.
- An HX, Beckmann MW, Reifenberger G, Bender HG, Niederacher D.  
Gene amplification and overexpression of Cdk4 in sporadic breast carcinomas is associated with high tumor cell proliferation.  
*Am. J. Pathol*. 1999; 154:113-118.
- Bagui TK, Mohapatra S, Haura E, Pledger WJ.  
P27Kip1 and p21Cip1 are not required for the formation of active D cyclin-cdk4 complexes.  
*Mol Cell Biol*. 2003; 23(20):7285-90.
- Balmanno K, Cook SJ.  
Sustained MAP kinase activation is required for the expression of cyclin D1, p21Cip1 and a subset of AP-1 proteins in CCL39 cells.  
*Oncogene*. 1999; 18(20):3085-97.
- Barrière C, Santamaría; Cerqueira, Galán J, Martín A, Ortega S, Malumbres M, Dubus P, Barbacid M.  
Mice thrive without Cdk4 and Cdk2.  
*Molecular Oncology*. 2007; 1:72-83.
- Berthet C, Aleem E, Coppola V, Tessarollo L, Kaldis P.  
Cdk2 knockout mice are viable.  
*Curr Biol*. 2003; 13:1775-1785.
- Berthet C, Klarmann KD, Hilton MB, Suh HC, Keller JR, Kiyokawa H, Kaldis P.  
Combined loss of Cdk2 and Cdk4 results in embryonic lethality and Rb hypophosphorylation.  
*Devlop. Cell*. 2006; 10:563-573.

- Bloom J, Cross FR.  
Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control.  
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2007; 8:149-160.
- Bloom J, Pagano M.  
Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation.  
Semin Cancer Biol.; 13(1):41-47. Review.
- Booher RN, Holman PS, Fattaey A.  
Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity.  
J Biol Chem. 1997; 272(35):22300-6.
- Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T.  
Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription.  
Nature. 1998; 391(6667):597-601.
- Brown NR, Noble ME, Endicott JA, Garman EF, Wakatsuki S, Mitchell E, Rasmussen B, Hunt T, Johnson LN.  
The crystal structure of cyclin A.  
Structure. 1995; 3(11):1235-47.
- Brownawell AM, Kops GJ, Macara IG, Burgering BM.  
Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX.  
Mol Cell Biol. 2001; 21(10):3534-46.
- Bell SP, Dutta A.  
DNA replication in eukaryotic cells.  
Annu Rev Biochem. 2002; 71:333-374. Review.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME.  
Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor.  
Cell. 1999; 96(6):857-68.
- Carleton M, Cleary MA, Linsley PS.  
MicroRNAs and Cell Cycle Regulation.  
Cell Cycle. 2007; 6(17):2127-2132.
- Cayuela ML, Flores JM, Blasco MA.  
The telomerase RNA component Terc is required for the tumour-promoting effects of Tert overexpression.  
EMBO reports. 2005; 6:268-274.
- Chilosi M, Doglioni C, Yan Z, Lestani M, Menestrina F, Sorio C, Benedetti A, Vinante F, Pizzolo G, Inghirami G.  
Differential expresión of cyclin-dependent kinase 6 in cortical thymocytes and T-cell lymphoblastic lymphoma/leucemia.  
Am. J. Pathol. 1998; 152:209-217.

Cho RJ, Huang M, Campbell MJ, Dong H, Steinmetz L, Sapinoso L, Hampton G, Elledge SJ, Davis RW, Lockhart DJ.  
Transcriptional regulation and function during the human cell cycle.  
Nature Genetics. 2001; 27:48-55.

Chu I, Sun J, Arnaout A, Kahn H, Hanna W, Narod S, Sun P, Tan CK, Hengst L, Slingerland J.  
p27 phosphorylation by Src regulates inhibition of cyclin E-Cdk2.  
Cell, 2007; 128(2):241-244.

Ciemerych MA; Kenney AM, Sicinska E, Kalaszczynska I, Bronson RT, Rowitch DH, Gardner H, Sicinski P.  
Development of mice expressing a single D-type cyclin.  
Genes Dev. 2002; 16:3277-3289.

Ciemerych MA, Sicinski P.  
Cell cycle in mouse development.  
Oncogene. 2005; 24:2877-2898.

Clurman BE, Sheaff RJ, Thress K, Groudine M, Roberts JM.  
Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation.  
Genes Dev. 1996; 10(16):1979-1990.

Cooper S, Shedden K.  
Microarray analysis of gene expression during the cell cycle.  
Cell and Chromosome. 2003; 2(1): 1-12.

Costello JF, Plass C, Arap W, Chapman VM, Held WA, Berger MS, Su Huang HJ, Cavenee WK.  
Cyclin-dependent kinase 6 (Cdk6) amplification in human gliomas identified using two dimensional separation of genomic DNA.  
Cancer Res. 1997; 57:1250-1254.

Coverley D, Laman H, Laskey RA.  
Distinct roles for cyclins E and A during DNA replication complex assembly and activation.  
Nat Cell Biol. 2002; 4(7):523-528.

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA.  
Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B.  
Nature. 1995 Dec; 378(6559):785-789.

Cruz JC, Tsai LH.  
A Jekyll and Hyde kinase: roles for Cdk5 in brain development and disease.  
Curr Opin Neurobiol. 2004; 14(3):390-394.

De Bondt HL, Rosenblatt J, Jancarik J, Jones HD, Morgan DO, Kim SH.  
Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2.  
Nature. 1993; 363(6430):595-602.

- DeGregori J, Kowalik T, Nevins JR.  
Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes.  
Mol Cell Biol. 1995;15(8):4215-4224.
- Desai D, Wessling HC, Fisher RP, Morgan DO.  
Effects of phosphorylation by CAK on cyclin binding by CDC2 and CDK2.  
Mol Cell Biol. 1995;15(1):345-50
- Diehl JA, Sherr CJ.  
A dominant-negative cyclin D1 mutant prevents nuclear import of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and its phosphorylation by CDK-activating kinase.  
Mol Cell Biol. 1997; 17(12):7362-7374.
- Donnellan R, Chetty R.  
Cyclin D1 and human neoplasia.  
Mol. Pathol. 1998; 51:1-7.
- Draetta G, Brizuela L, Potashkin J, Beach D.  
Identification of p34 and p13, human homologs of the cell cycle regulators of fission yeast encoded by *cdc2+* and *suc1+*.  
Cell. 1987; 50(2):319-25.
- Dulic V, Lees E, Reed SI.  
Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase.  
Science. 1992; 257(5078):1958-1961.
- Duronio RJ, Bonnette PC, O'Farrell PH.  
Mutations of the *Drosophila* dDP, dE2F, and cyclin E genes reveal distinct roles for the E2F-DP transcription factor and cyclin E during the G1-S transition.  
Mol Cell Biol. 1998; 18(1):141-151.
- Dyson N.  
The regulation of E2F by pRB-family proteins.  
Genes Dev. 1998; 12(15):2245-2262. Review.
- Easton J, Wei T, Lahti JM, Kidd VJ.  
Disruption of the cyclin D/cyclin-dependent kinase/INK4/retinoblastoma protein regulatory pathway in human neuroblastoma.  
Cancer Res. 1998; 25:2624-2632.
- Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushime H, Kato J, Livingston DM.  
Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins.  
Cell. 1993; 73(3):487-497.
- Fantl V, Stamp G, Andrews A, Rosewell I, Dickson C.  
Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development.  
Genes Dev. 1995; 9:2364-2372.

- Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P.  
Ligand-activated site-specific recombination in mice.  
Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93(20):10887-10900.
- Furstenenthal L, Kaiser BK, Swanson C, Jackson PK.  
Cyclin E uses Cdc6 as a chromatin-associated receptor required for DNA replication.  
J Cell Biol. 2001; 152(6):1267-1278.
- Gao GP, Yang Y, Wilson JM.  
Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy.  
J. Virol. 1996; 70:8934-8943.
- Geng Y, Eaton EN, Picon M, Roberts JM, Lundberg AS, Gifford A, Sardet C, Weinberg RA.  
Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein.  
Oncogene. 1996; 12(6):1173-80.
- Geng Y, Yu Q, Sicinska E, Das M, Schneider JE, Bhattacharya S, Rideout WM, Bronson RT, Gardner H, Sicinski P.  
Cyclin E ablation in the mouse.  
Cell. 2003; 114:431-443.
- Geng Y, Whoriskey W, Park MY, Bronson RT, Medema RH, Li T, Weinberg RA, Sicinski P.  
Rescue of cyclin D1 deficiency by knockin cyclin E.  
Cell. 1999; 97(6):767-777.
- Georgia S, Bhushan A.  
Beta cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal beta cell mass.  
J. Clin. Invest. 2004; 114:963-968.
- Girard F, Strausfeld U, Fernandez A, Lamb NJ.  
Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts.  
Cell. 1991; 67(6):1169-1179.
- Grimmler M, Wang Y, Mund T, Cilensek Z, Keidel EM, Waddell MB, Jäkel H, Kullmann M, Kriwacki RW, Hengst L.  
Cdk-inhibitory activity and stability of p27Kip1 are directly regulated by oncogenic tyrosine kinases.  
Cell. 2007; 128(2):269-80.
- Guerra C, Mijimolle N, Dhawahir A, Dubus P, Barradas M, Serrano M, Campuzano V, Barbacid M.  
Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context.  
Cancer Cell. 2003; 4:111-120.
- Guo Y, Stacey DW, Hitomi M.  
Post-transcriptional regulation of cyclin D1 expression during G2 phase.  
Oncogene. 2002; 21(49):7545-7556.

Hanahan D, Weinberg RA.  
The Hallmarks of Cancer.  
Cell. 2000; 100: 57-70.

Hanks SK, Quinn AM, Hunter T.  
The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains.  
Science. 1988; 241(4861):42-52. Review.

Hara T, Kamura T, Nakayama K, Oshikawa K, Hatakeyama S, Nakayama K.  
Degradation of p27(Kip1) at the G(0)-G(1) transition mediated by a Skp2-independent ubiquitination pathway.  
J Biol Chem. 2001; 276(52):48937-48943.

Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, Dean DC.  
Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1.  
Cell. 1999; 98(6):859-869.

Harper JW, Burton JL, Solomon MJ.  
The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more.  
Genes Dev. 2002; 16(17):2179-2206. Review.

Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell-Crowley L, Swindell E, et al.  
Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21.  
Mol Biol Cell. 1995; 6(4):387-400.

Hartwell LH, Weinert TA.  
Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events.  
Science. 1989 ;246(4930):629-34. Review.

He J, Allen JR, Collins VP, Allalunis-Turner J, Godbout R, Day III RS, James CD.  
Cdk4 amplification is an alternative mechanism to p16 gene homozygous deletion in glioma cell lines.  
Cancer Res. 1994; 54:5804-5807.

Herman JG, Jen J, Merlo A, Baylin SB.  
Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15<sup>INK4b</sup>.  
Cancer Res. 1996; 56:722-727.

Hoffmann I, Clarke PR, Marcote MJ, Karsenti E, Draetta G.  
Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis.  
EMBO J. 1993; 12(1):53-63.

Hsu JY, Reimann JD, Sorensen CS, Lukas J, Jackson PK.  
E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1).  
Nat Cell Biol. 2002; 4(5):358-366.

Hua XH, Yan H, Newport J.  
A role for Cdk2 kinase in negatively regulating DNA replication during S phase of the cell cycle.  
J Cell Biol. 1997; 137(1):183-192.



- Huard JM, Forster CC, Carter ML, Sicinski P, Ross ME.  
Cerebellar histogenesis is disturbed in mice lacking cyclin D2.  
*Development*. 1999; 126: 1927-1935.
- Hunter NL, Awatramani RB, Farley FW, Dymecki SM.  
Ligand-Activated Flpe for temporally regulated gene modifications.  
*Genesis*. 2005; 41:99-109.
- Hwang HC, Clurman BE.  
Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles.  
*Oncogene*. 2005; 24(17):2776-2786. Review.
- Inazawa J, Inoue J, Imoto I.  
Comparative genomic hybridization (CGH)-arrays pave the way for identification of novel cancer-related genes.  
*Cancer Sci*. 2004; 95(7):559-563.
- Ishida S, Huang E, Zuzan H, Spang R, Leone G, West M, Nevins JR.  
Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis.  
*Mol Cell Biol*. 2001; 21(14):4684-4699.
- Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JCF, Trent JM, Staudt LM, Hudson jr. J, Boguski MS, Lashkari D, Shalon D, Botstein D, Brown PO.  
The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum.  
*Science*. 1999; 283:83-87.
- Izumi T, Walker DH, Maller JL.  
Periodic changes in phosphorylation of the *Xenopus cdc25* phosphatase regulate its activity.  
*Mol Biol Cell*. 1992; 3(8):927-939.
- Jackson PK, Chevalier S, Philippe M, Kirschner MW.  
Early events in DNA replication require cyclin E and are blocked by p21<sup>CIP1</sup>.  
*J Cell Biol*. 1995; 130(4):755-769.
- James MK, Ray A, Leznova D, Blain SW.  
Differential Modification of p27<sup>Kip1</sup> controls its CyclinD-Cdk4 Inhibitory Activity.  
*Mol Cell Biol*. 2008; 28(1): 498-510.
- Jeffrey PD, Russo AA, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massague J, Pavletich NP.  
Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex.  
*Nature*. 1995 Jul 27;376(6538):313-20.
- Jinno S, Hung S, Okayama H.  
Cell cycle start from quiescence controlled by tyrosine phosphorylation of Cdk4.  
*Oncogene*. 1999; 18: 565-571.
- Kaldis P.  
Another piece of the p27<sup>Kip1</sup> puzzle.  
*Cell*. 2007; 128(2):241-4. Review.

Kamura T, Hara T, Matsumoto M, Ishida N, Okumura F, Hatakeyama S, Yoshida M, Nakayama K, Nakayama KI.

Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase.

Nat Cell Biol. 2004; 6(12):1229-1235.

Kato J, Matsushime H, Hiebert SW, Ewen ME, Sherr CJ.

Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4.

Genes Dev. 1993; 7(3):331-342.

Kawamura K, Izumi H, Ma Z, Ikeda R, Moriyama M, Tanaka T, Nojima T, Levin LS, Fujikawa-Yamamoto K, Suzuki K, Fukasawa K.

Induction of centrosome amplification and chromosome instability in human bladder cancer cells by p53 mutation and cyclin E overexpression.

Cancer Res. 2004; 64(14):4800-4809.

Kesavapany S, Li BS, Amin N, Zheng YL, Grant P, Pant HC.

Neuronal cyclin-dependent kinase 5: role in nervous system function and its specific inhibition by the Cdk5 inhibitory peptide.

Biochim Biophys Acta. 2004; 1697(1-2):143-153.

Kerkhoff E, Rapp UR.

Induction of cell proliferation in quiescent NIH 3T3 cells by oncogenic c-Raf-1.

Mol Cell Biol. 1997; 17(5):2576-2586.

Keyomarsi K, O'Leary N, Molnar G, Lees E, Fingert HJ, Pardee AB.

Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer.

Cancer Res. 1994; 54(2):380-385.

Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, Callister M, Ding Y, Hortobagyi GN, Bedrosian I, Knickerbocker C, Toyofuku W, Lowe M, Herliczek TW, Bacus SS.

Cyclin E and survival in patients with breast cancer.

N Engl J Med. 2002; 347(20):1566-1575.

Khatib ZA, Matsushime H, Valentine M, Shapiro DN, Sher CJ, Look AT.

Coamplification of the Cdk4 gene with MDM2 and Gli in human sarcomas.

Cancer Res. 1993; 53:5535-5541.

King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW.

How proteolysis drives the cell cycle.

Science. 1996; 274(5293):1652-1659. Review.

Kitagawa M, Higashi H, Suzuki-Takahashi I, Segawa K, Hanks SK, Taya Y, Nishimura S, Okuyama A.

Phosphorylation of E2F-1 by cyclin A-cdk2.

Oncogene. 1995; 10(2):229-236.

Kobayashi H, Stewart E, Poon R, Adamczewski JP, Gannon J, Hunt T.

Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits.

Mol Biol Cell. 1992; 3(11):1279-94.

- Koepp DM, Schaefer LK, Ye X, Keyomarsi K, Chu C, Harper JW, Elledge SJ. Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science*. 2001; 294(5540):173-177.
- Koff A, Giordano A, Desai D, Yamashita K, Harper JW, Elledge S, Nishimoto T, Morgan DO, Franza BR, Roberts JM. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science*. 1992 ;257(5077):1689-1694.
- Kondo M, Matsuoka S, Uchida K, Osada H, Nagatake M, Takagi K, Harper JW, Takahashi T, Elledge SJ, Takahashi T. Selective maternal-allele loss in human lung cancers of the maternally expressed p57KIP2 gene at 11p15.5. *Oncogene*. 1996; 12:1365-1368.
- Kowalczyk A, Filipkowski RK, Rylski M, Wilczynski GM, Konopacki FA, Jaworski J, Ciemerych MA, Sicinski P, Kaczmarek L. The critical role of cyclin D2 in adult neurogenesis. *J. Cell Biol*. 2004; 167:209-213.
- Kozar K, Ciemerych MA, Rebel VI, Shigematsu H, Zagozdzon A, Sicinska E, Geng Y, Yu Q, Bhattacharya S, Bronson RT, Akashi K, Sicinski P. Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell*. 2004; 118:477-491.
- Krude T. Initiation of human DNA replication in vitro using nuclei from cells arrested at an initiation-competent state. *J Biol Chem*. 2000; 275(18):13699-13707.
- Krude T, Jackman M, Pines J, Laskey RA. Cyclin/Cdk-dependent initiation of DNA replication in a human cell-free system. *Cell*. 1997; 88(1):109-119.
- Kumagai A, Dunphy WG. Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts. *Cell*. 1992; 70(1):139-151.
- LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A, Harlow E. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev*. 1997; 11(7):847-62.
- Lam EW, Glassford J, Banerji L, Thomas NS, Sicinski P, Klaus GG. Cyclin D3 compensates for loss of cyclin D2 in mouse B-lymphocytes activated via the antigen receptor and CD40. *J. Bio. Chem*. 2000; 275:3479-3484.
- Landis MW, Pawlyk BS, Li T, Sicinski P, Hinds PW. Cyclin D1-dependent kinase activity in murine development and mammary tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2006; 9:13-22.

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(34):20608-16.

Lee MG, Nurse P.  
Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*.  
Nature. 1987; 327(6117):31-5.

Lees EM, Harlow E.  
Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of *cdc2* kinase.  
Mol Cell Biol. 1993;13(2):1194-201.

Li J, Meyer AN, Donoghue DJ.  
Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94(2):502-507.

Li JQ, Miki H, Ohmori M, Wu F, Funamoto Y.  
Expression of cyclin E and cyclin-dependent kinase 2 correlates with metastasis and prognosis in colorectal carcinoma.  
Hum Pathol. 2001; 32(9):945-953.

Liu F, Stanton JJ, Wu Z, Piwnicka-Worms H.  
The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex.  
Mol Cell Biol. 1997;17(2):571-83.

Lloyd RV, Erickson LA, Jin L, Kulig E, Qian X, Cheville JC, Scheithauer BW.  
p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers.  
Am J Pathol. 1999; 154(2):313-323. Review.

Loyer P, Trembley JH, Katona R, Kidd VJ, Lahti JM.  
Role of CDK/cyclin complexes in transcription and RNA splicing.  
Cell Signall. 2005; 17(9):1033-1051.

Losick R, Shapiro L.  
Checkpoints that couple gene expression to morphogenesis.  
Science, 1993; 262:1227-1228. Review.

Lukas J, Herzinger T, Hansen K, Moroni MC, Resnitzky D, Helin K, Reed SI, Bartek J.  
Cyclin E-induced S phase without activation of the pRb/E2F pathway.  
Genes Dev. 1997; 11(11):1479-92.

Luo RX, Postigo AA, Dean DC.  
Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription.  
Cell. 1998; 92(4):463-473.

- Mailand N, Falck J, Lukas C, Syljuâsen RG, Welcker M, Bartek J, Lukas J. Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science*. 2000; 288(5470):1425-1429.
- Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001; 1(3):222-31. Review.
- Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci*. 2005 Nov;30(11):630-41. Epub 2005 Oct 19.
- Malumbres M, Sotillo R, Santamaría D, Galán J, Cerezo A, Ortega S, Dubus P, Barbacid M. Mammalian cell cycles without Cyclin-Dependent Kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell*. 2004; 118:493-504.
- Malumbres M, Pérez de Castro I, Santos J, Meléndez B, Mangues R, Serrano M, Pellicer A, Fernández-Piqueras J. Inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p15<sup>INK4b</sup> by deletion and de novo methylation with independence of p16<sup>INK4a</sup> alterations in murine primary T-cell lymphomas. *Oncogene*. 1997; 14:1361-1370.
- Malumbres M, Pevarello P, Barbacid M, Bischoff JR. Cdk inhibitors in cancer therapy: what is next? *Trends in Pharm. Sci*. 2007; 29:16-21.
- Mantripragada KK, Buckley PG, de Ståhl TD, Dumanski JP. Genomic microarrays in the spotlight. *Trends. Genet*. 2004; 20(2):87-94.
- Marone M, Scambia G, Giannitelli C, Ferrandina G, Masciullo V, Bellacosa A, Benedetti-Panici P, Mancuso S. Analysis of cyclin E and CDK2 in ovarian cancer: gene amplification and RNA overexpression. *Int J Cancer*. 1998; 75(1):34-39.
- Martin J, Hunt SL, Dubus P, Sotillo R, Néhmé-Péllouard F, Magnuson MA, Parlow AF, Malumbres M, Ortega S, Barbacid M. Genetic rescue of Cdk4 null mice restores pancreatic beta-cell proliferation but not homeostatic cell number. *Oncogene*. 2003; 22(34):5261-5629.
- Matsushime H, Rousset MF, Ashmun RA, Sherr CJ. Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell*. 1991; 65(4):701-713.
- Matsuura I, Denissova NG, Wang G, He D, Long J, Liu F. Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature*. 2004; 30:226-231.

- Medema RH, Herrera RE, Lam F, Weinberg RA.  
Growth suppression by p16ink4 requires functional retinoblastoma protein.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92(14):6289-6293.
- Meyerson M, Enders GH, Wu CL, Su LK, Gorka C, Nelson C, Harlow E, Tsai LH.  
A family of human cdc2-related protein kinases.  
EMBO J. 1992; 11(8):2909-17.
- Mihara M, Shintani S, Nakahara Y, Kiyota A, Ueyama Y, Matsumura T, Wong DT.  
Overexpression of CDK2 is a prognostic indicator of oral cancer progression.  
Jpn J Cancer Res. 2001; 92(3):352-360.
- Mijimolle N, Velasco J, Dubus P, Guerra C, Weinbaum CA, Casey PJ, Campuzano V, Barbacid M.  
Protein farnesyltransferase in embryogenesis, adult homeostasis and tumor development.  
Cancer Cell. 2005.
- Minella AC, Swanger J, Bryant E, Welcker M, Hwang H, Clurman BE.  
p53 and p21 form an inducible barrier that protects cells against cyclin E-cdk2 deregulation.  
Curr Biol. 2002; 12(21):1817-1827.
- Moberg KH, Bell DW, Wahrer DC, Haber DA, Hariharan IK.  
Archipelago regulates Cyclin E levels in Drosophila and is mutated in human cancer cell lines.  
Nature. 2001; 413(6853):311-316.
- Morgan DO.  
The dynamics of cyclin dependent kinase structure.  
Curr Opin Cell Biol. 1996; 8(6):767-72. Review.
- Mueller PR, Coleman TR, Dunphy WG.  
Cell cycle regulation of a Xenopus Wee1-like kinase.  
Mol Biol Cell. 1995; 6(1):119-34.
- Murray AW.  
Creative blocks: cell cycle checkpoints and feedback controls.  
Nature. 1992; 359:599-604.
- Nieduszynski CA, Murray J, Carrington M.  
Whole-genome analysis of animal A- and B-type cyclins.  
Genome Biology. 2002; 3(12): research0070.1-research0070.8.
- Nigg EA.  
Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control?  
Curr Opin Cell Biol. 1996; 8(3):312-317. Review.
- Nguyen TB, Manova, K, Capodici P, Lindon C, Bottega S, Wang XY, Refik-Rogers J, Pines J, Wolgemuth DJ, Koff A.  
Characterization and expression of mammalian cyclin b3, a prepachytene meiotic cyclin.  
J. Biol. Chem. 2002; 277: 41960-41969.

Ninomiya-Tsuji J, Nomoto S, Yasuda H, Reed SI, Matsumoto K.  
Cloning of a human cDNA encoding a cdc2-related kinase by complementation of a  
pudding yeast cdc28 mutation.  
Proc. Natl Acad Sci USA. 1991; 88(20):9006-9010.

Norbury C, Nurse P.  
Animal cell cycles and their control.  
Annu Rev Biochem. 1992; 61:441-70. Review.

Ortega S, Prieto I, Odajima J, Martin A, Dubus P, Sotillo R, Barbero JL, Malumbres M,  
Barbacid M.  
Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in  
mice.  
Nat. Genet. 2003; 35:25-31.

Paggi, MG, Giordano A.  
Who is the boss in the retinoblastoma family? The point of view of Rb2/p130, the little  
brother.  
Cancer Res. 2001; 61:4651-4654.

Pardee AB.  
G1 events and regulation of cell proliferation.  
Science. 1989; 246(4930):603-608. Review.

Parisi T, Beck AR, Rougier N, McNeil T, Lucian L, Werb Z, Amati B.  
Cyclins E1 and E2 are required for endoreplication in placental trophoblast giant cells.  
EMBO J. 2003; 22:4794-4803.

Pavletich NP.  
Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their  
cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors.  
J Mol Biol. 1999; 287(5):821-8. Review.

Peeper DS, Upton TM, Ladha MH, Neuman E, Zalvide J, Bernards R, DeCaprio  
JA, Ewen ME.  
Ras signalling linked to the cell-cycle machinery by the retinoblastoma  
protein.  
Nature. 1997; 386(6621):177-81. Erratum in: Nature 1997 Apr  
3;386(6624):521.

Peeters MJ, Patijn GA, Lieber A, Meuse L, Kay MA, .  
Adenovirus-mediated hepatic transfer in mice: comparison of intravascular and biliary  
administration.  
Human Gene Ther. 1996; 7:1693-1699.

Pines J, Hunter T.  
Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently  
from cyclin B.  
Nature. 1990; 346(6286):760-763.

Poon RY, Hunter T.  
Dephosphorylation of Cdk2 Thr160 by the cyclin-dependent kinase-interacting  
phosphatase KAP in the absence of cyclin.  
Science. 1995;270:90-93.

- Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, Alexander GM, Gatti LA, Firpo EJ, Daling JR, Roberts JM.  
Expression of cell-cycle regulators p27Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients.  
Nat Med. 1997; 3(2):222-225.
- Qi Z, Huang QQ, Lee KY, Lew J, Wang JH.  
Reconstitution of neuronal Cdc2-like kinase from bacteria-expressed Cdk5 and an active fragment of the brain-specific activator. Kinase activation in the absence of Cdk5 phosphorylation.  
J Biol Chem. 1995; 270(18):10847-54.
- Rane SG, Dubus P, Mettus RV, Galbreath EJ, Boden G, Reddy EP, Barbacid M.  
Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in  $\beta$ -islet cell hyperplasia.  
Nature Genetics. 1999; 22:44-52.
- Ren S, Rollins BJ.  
Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit.  
Cell 2004; 117(2):239-51.
- Reimann JD, Freed E, Hsu JY, Kramer ER, Peters JM, Jackson PK.  
Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex.  
Cell. 2001; 105(5):645-655.
- Rodríguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, Stewart AF, Dymecki SM.  
High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP.  
Nat. Genet. 2000; 25:139-140.
- Rosales JL, Lee KY.  
Extraneuronal roles of cyclin-dependent kinase 5.  
Bioessays. 2006; 10:1023-1024.
- Ruas M, Peters G.  
The p16<sup>INK4a</sup>/CDKN2A tumor suppressor and its relatives.  
Biochim. Biophys. Acta. 1998; 1378: F115-F117.
- Russell P, Nurse P.  
Schizosaccharomyces pombe and Saccharomyces cerevisiae: a look at yeasts divided.  
Cell. 1986; 45:781-782.
- Russo AA, Jeffrey PD, Patten AK, Massague J, Pavletich NP.  
Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex.  
Nature. 1996; 382(6589):325-31.
- Santamaría D, Barrière C, Cerqueira A, Hunt S, Tardy C, Newton K, Cáceres JF, Dubus P, Malumbres M, Barbacid M.  
Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle.  
Nature. 2007; 448:811-816.



Santamaría D, Ortega S.  
Cyclins and Cdks in development and cancer: lessons from genetically modified mice.  
Frontiers in Bioscience. 2006; 11:1164-1188.

Sauer K, Weigmann K, Sigrist S, Lehner CF.  
Novel members of the cdc2-related kinase family in Drosophila: cdk4/6, cdk5, and PLSTIRE kinase.  
Mol. Biol. Cell. 1996; 7:1736-1741.

Schmidt EE, Ichimura K, Reifenberger G, Collins VP.  
CdkN2 (p16/MTS1) gene deletion or Cdk4 amplification occurs in the majority of glioblastomas.  
Cancer Res. 1994; 54:6321-6324.

Shapiro G.  
Cyclin-Dependent Kinase pathways as targets for cancer treatment.  
J. Clin. Onc. 2006; 24:1770-1783.

Sherr CJ.  
G1 phase progression: cycling on cue.  
Cell. 1994; 79(4):551-555. Review.

Sherr CJ.  
Cancer cell cycles.  
Science. 1996; 274(5293):1672-7. Review.

Sherr CJ.  
D1 in G2.  
Cell Cycle. 2002; 1:36-38.

Sherr CJ, Roberts JM.  
CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression.  
Genes Dev. 1999; 13(12):1501-12. Review.

Sherr CJ, Roberts JM.  
Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases.  
Genes Dev. 2004; 18(22):2699-711. Review.

Sicinska E, Aifantis I, Le Cam L, Swat W, Borowski C, Yu Q, Ferrando AA, Levin SD, Geng Y, von Boehmer H, Sicinski P.  
Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias.  
Cancer Cell. 2003; 4:451-461.

Sicinski P, Donaher JL, Parker SB, Li T, Fazeli A, Gardner H, Haslam SZ, Bronson RT, Elledge SJ, Weinberg RA.  
Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast.  
Cell. 1995; 82:621-630.

Sicinski P, Donaher JL, Geng Y, Parker SB, Gardner H, Park MY, Robker RL, Richard JS, McGinnis LK, Biggers JD, Epping JJ, Bronson RT, Elledge SJ, Weinberg RA.  
Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis.  
Nature. 1996; 384:470-474.

- Silver L.  
Mouse Genetics.  
Oxford University Press. Oxford:UK.
- Singer JD, Gurian-West M, Clurman B, Roberts JM.  
Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells.  
Genes Dev. 1999; 13(18):2375-2387.
- Slack JM.  
Developmental Biology of the pancreas.  
Development. 1995;121. 1569-1580.
- Solvason N, Wu WW, Parry D, Mahony D, Lam EW, Glassford J, Klaus GG, Sicinski P, Weinberg R, Liu YJ, Howard M, Lees E.  
Cyclin D2 is essential for BCR-mediated proliferation and CD5 B cell development.  
Int. Immunol. 2000; 12:631-638.
- Sonoda Y, Yoshimoto T, Sekiya T.  
Homozygous deletion of the MST1/p16 and MST2/p15 genes and amplification of the Cdk4 gene in glioma.  
Oncogene. 1995; 11: 2145-2149.
- Soos TJ, Kiyokawa H, Yan JS, Rubin MS, Giordano A, DeBlasio A, Bottega S, Wong B, Mendelsohn J, Koff A.  
Formation of p27-CDK complexes during the human mitotic cell cycle.  
Cell Growth Differ. 1996; 7(2):135-46.
- Sotillo R, Dubus P, Martín J, de la Cueva E, Ortega, Malumbres M, Barbacid M.  
Wide spectrum of tumors in knock-in mice carrying a Cdk4 protein insensitive to INK4 inhibitors.  
EMBO J. 2001; 20:6637:6647.
- Soucek T, Pusch O, Hengstschlager-Ottner E, Adams PD, Hengstschlager M.  
Deregulated expression of E2F-1 induces cyclin A- and E-associated kinase activities independently from cell cycle position.  
Oncogene. 1997; 14(19):2251-2257.
- Span PN, Tjan-Heijnen VC, Manders P, Beex LV, Sweep CG.  
Cyclin-E is a strong predictor of endocrine therapy failure in human breast cancer.  
Oncogene. 2003; 22(31):4898-4904.
- Spruck CH, Won KA, Reed SI.  
Deregulated cyclin E induces chromosome instability.  
Nature. 1999; 401(6750):297-300.
- Stacey D, Kazlauskas A.  
Regulation of Ras signalling by the cell cycle.  
Curr. Opin. Genet. Dev. 2002; 12:44-46.
- Strohmaier H, Spruck CH, Kaiser P, Won KA, Sangfelt O, Reed SI.  
Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line.  
Nature. 2001; 413(6853):316-322.

Tanaka TS, Jaradat SA, Lim MK, Kargul GJ, Wang X, Grahovac MJ, Pantano S, Sano Y, Piao Y, Nagaraja R, Doi H, Wood III WH, Becker KG, Ko MSH.

Genome-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15000 mouse developmental cDNA microarray.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97: 9127-9132.

Tsai LH, Lees E, Faha B, Harlow E, Riabowol K.

The cdk2 kinase is required for the G1-to-S transition in mammalian cells.

Oncogene. 1993; 8(6):1593-1602.

Tsilhias J, Kapusta L, Sligenrland J.

The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer.

Annu. Rev. Med. 1999; 50:401-423.

Tsutsui T, Hesabi B, Moons DS, Pandolfi PP, Hansel KS, Koff A, Kiyokawa H.

Targeted disruption of Cdk4 delays cell cycle entry with enhanced p27<sup>kip1</sup> activity.

Mol Cell Biol. 1999; 19:7011-7019.

Van den Heuvel S y Harlow E.

Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control.

Science. 1993; 262:2050-2054.

Vigo E, Muller H, Prosperini E, Hateboer G, Cartwright P, Moroni MC, Helin K.

Cdc25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase.

Mol. Cell Biol. 1999; 19:6379-6395.

Wei G, Lonardo F, Ueda T, Kim T, Huvos AG, Healey JH, Ladanyi M.

Cdk4 gene amplification in osteosarcoma: reciprocal relationship with INK4A gene alterations and mapping of 12q13 amplicons.

Int. J. Cancer. 1999; 80:199-204.

Weinberg, RA.

The retinoblastoma protein and cell cycle control.

Cell. 1995; 81:323-330.

Whitfield ML, Sherlock G, Saldanha AJ, Murray JI, Ball CA, Alexander KE, Matese JC, Perou CM, Hurt MM, Brown PO, Botstein D.

Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors.

Mol Biol Cell. 2002; 13:1977-2000.

Wunder JS, Eppert K, Burrow SR, Gogkoz N, Bell RS, Andrulis LL.

Coamplification of Cdk4, SAS and MDM2 occurs frequently in human parosteal osteosarcomas.

Oncogene. 1999; 18:783-788.

Ye X, Zhu C, Harper JW.

A premature-termination mutation in the Mus musculus cyclin-dependent kinase 3 gene.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001; 98(4):1682-1686.

Zarkowska T, Mittnacht S.

Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G1/S cyclin-dependent kinases.

J Biol Chem. 1997; 272(19):12738-12746.

Zhang HS, Gavin M, Dahiya A, Postigo AA, Ma D, Luo RX, Harbour JW, Dean DC.

Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF.

Cell. 2000;101(1):79-89.

Zhang P, Liegeois NJ, Wong C, Finegold M, Hou H, Thompson JC, Silverman A, Harper JW, DePinho RA, Elledge SJ.

Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome.

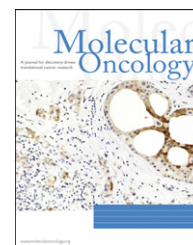
Nature. 1997; 387(6629):151-8.

Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, Hayward N, Dracopoli NC.

Germline mutations in the p16<sup>INK4a</sup> binding domain of Cdk4 in familial melanoma.

Nat. Genet. 1996; 12:97-99.

# 10. Anexo

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)[www.elsevier.com/locate/molonc](http://www.elsevier.com/locate/molonc)

## Mice thrive without Cdk4 and Cdk2

Cédric Barrière<sup>a,c,1</sup>, David Santamaría<sup>a,1</sup>, Antonio Cerqueira<sup>a</sup>, Javier Galán<sup>a</sup>,  
Alberto Martín<sup>a</sup>, Sagrario Ortega<sup>b</sup>, Marcos Malumbres<sup>a</sup>, Pierre Dubus<sup>c</sup>,  
Mariano Barbacid<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Molecular Oncology, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, E-28029 Madrid, Spain

<sup>b</sup>Biotechnology Program, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, E-28029 Madrid, Spain

<sup>c</sup>EA2406 University of Bordeaux 2, F-33076 Bordeaux, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 December 2006

Received in revised form

15 February 2007

Accepted 15 February 2007

Available online 14 March 2007

#### Keywords:

Cyclin-dependent kinases

Mouse development

Cell proliferation

Conditional knock outs

Liver regeneration

### ABSTRACT

Mammalian cell division is thought to be driven by sequential activation of several Cyclin-dependent kinases (Cdk), mainly Cdk4, Cdk6, Cdk2 and Cdk1. Since mice lacking Cdk4, Cdk6 or Cdk2 are viable, it has been proposed that they play compensatory roles. We report here that mice lacking Cdk4 and Cdk2 complete embryonic development to die shortly thereafter presumably due to heart failure. However, conditional ablation of Cdk2 in adult mice lacking Cdk4 does not result in obvious abnormalities. Moreover, these double mutant mice recover normally after partial hepatectomy. In culture, Cdk4<sup>-/-</sup>;Cdk2<sup>-/-</sup> embryonic fibroblasts become immortal, display robust pRb phosphorylation and have normal S phase kinetics. These observations indicate that Cdk4 and Cdk2 are dispensable for the mammalian cell cycle and for adult homeostasis.

© 2007 Federation of European Biochemical Societies.

Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The widely accepted model for the mammalian cell cycle involves sequential activation of related heterodimeric protein kinases, composed of a catalytic subunit, the Cyclin-dependent kinase (Cdk), and a regulatory subunit known as Cyclin (reviewed in Malumbres and Barbacid, 2005). Two of these Cdks, Cdk4 and Cdk6, are activated by the D-type Cyclins and have been implicated in the early phases of the cycle, particularly during exit from quiescence. Cdk4/6-Cyclin D heterodimeric kinases are supposed to promote re-entry into the cycle by initiating phosphorylation of the retinoblastoma (Rb) protein family, pRb, p107 and p130 (reviewed in Adams, 2001; Sherr and Roberts, 1999). Rb phosphorylation

results in the liberation of transcription factors, such as members of the E2F family (reviewed in Dyson, 1998; Trimarchi and Lees, 2002), which are bound to the hypophosphorylated Rb proteins in non-proliferating cells. These transcription factors are responsible for directing the expression of a variety of genes essential for advancing cells through the S phase of the cell cycle (Adams, 2001). Two of these genes encode Cyclins E1 and E2 which specifically bind to Cdk2. Active Cdk2-Cyclin E complexes further phosphorylate the Rb protein family, resulting in their complete inactivation. This process is considered to be essential for the liberation of transcription factors that mediate the synthesis of other cell cycle regulators such as the A-type Cyclins and Cdk1. Sequential activation of Cdk2 and Cdk1 by the A-type Cyclins is believed to be

\* Corresponding author. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Melchor Fernández Almagro 3, E-28029 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 2246900; Fax: +34 91 7328033.

E-mail address: [mbarbacid@cnio.es](mailto:mbarbacid@cnio.es) (M. Barbacid).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

essential for the successful duplication of the cellular genome during the S phase and for progression into mitosis (Dyson, 1998; Trimarchi and Lees, 2002).

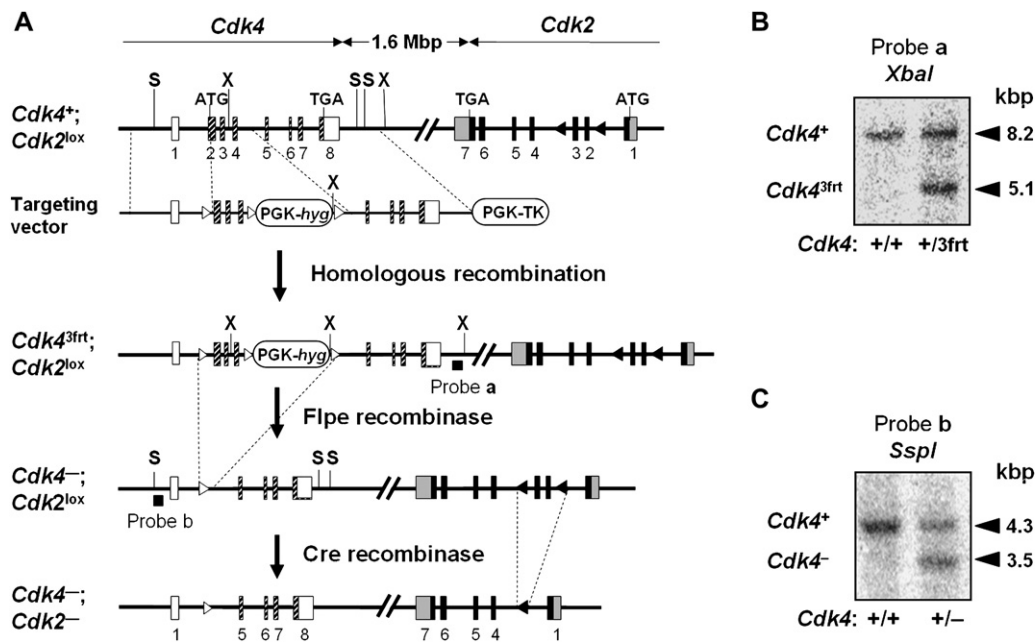
This model, mainly deduced from biochemical evidence, has not sustained genetic scrutiny. For instance, all mouse cell types, with the exception of pancreatic beta cells and pituitary lactotrophs proliferate normally in the absence of Cdk4 (Rane et al., 1999; Tsutsui et al., 1999). Likewise, ablation of Cdk6 only results in reduction of a subset of hematopoietic cells (Malumbres et al., 2004). Loss of both of these enzymes causes a much more dramatic phenotype that limits the proliferation of hematopoietic cell lineages leading to late embryonic lethality (Malumbres et al., 2004). Yet, double mutant embryos show normal proliferation rates in other tissues, indicating that Cdk4 and Cdk6 only play compensatory roles in cells of hematopoietic lineages. In agreement with these observations, mouse embryonic fibroblasts (MEFs) lacking Cdk4 and Cdk6 proliferate well and become immortal upon continuous culture in vitro. More importantly, they exit quiescence upon mitogenic stimuli and enter S phase with normal kinetics (Malumbres et al., 2004). Similar results have been obtained in mice lacking the three D-type Cyclins (Kozar et al., 2004). Likewise, Cdk2, a kinase previously thought to be essential for driving cells through the G1/S transition, is dispensable for normal embryonic development and adult homeostasis (Berthet et al., 2003; Ortega et al., 2003). Unexpectedly, Cdk2 is essential for the first meiotic division of both male and female germ cells, an activity that cannot be compensated by any of the other Cdks (Ortega et al., 2003).

These observations have been attributed, at least in part to compensatory activities between Cdk2 and Cdk4. In this manuscript, we report the generation and characterization of mice carrying germ line as well as conditional mutations in the loci encoding these kinases. Mice lacking Cdk4 and Cdk2 in the germ line complete embryonic development and are born alive. Although they die soon thereafter possibly due to their limited numbers of cardiomyocytes, the rest of the tissues display normal levels of cell proliferation. More importantly, conditional ablation of Cdk2 in adult Cdk4 knock out mice does not result in detectable abnormalities even in highly proliferating tissues. Indeed, these double mutant mice efficiently regenerate their livers after partial hepatectomy (PH). These observations indicate that Cdk4 and Cdk2 are dispensable for mammalian cell division and raise further questions about their proposed role in driving the mammalian cell cycle.

## 2. Results

### 2.1. Complete embryonic development in the absence of Cdk4 and Cdk2

We have generated double mutant  $Cdk4^{+/-};Cdk2^{+/lox}$  and  $Cdk4^{+/-};Cdk2^{+/-}$  mice by targeting the *Cdk4* locus in ES cells carrying a conditional  $Cdk2^{lox}$  allele (Figure 1). Intercrosses between  $Cdk4^{+/-};Cdk2^{+/-}$  double heterozygous animals result in the generation of midgestation ( $E13.5$ )  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{-/-}$

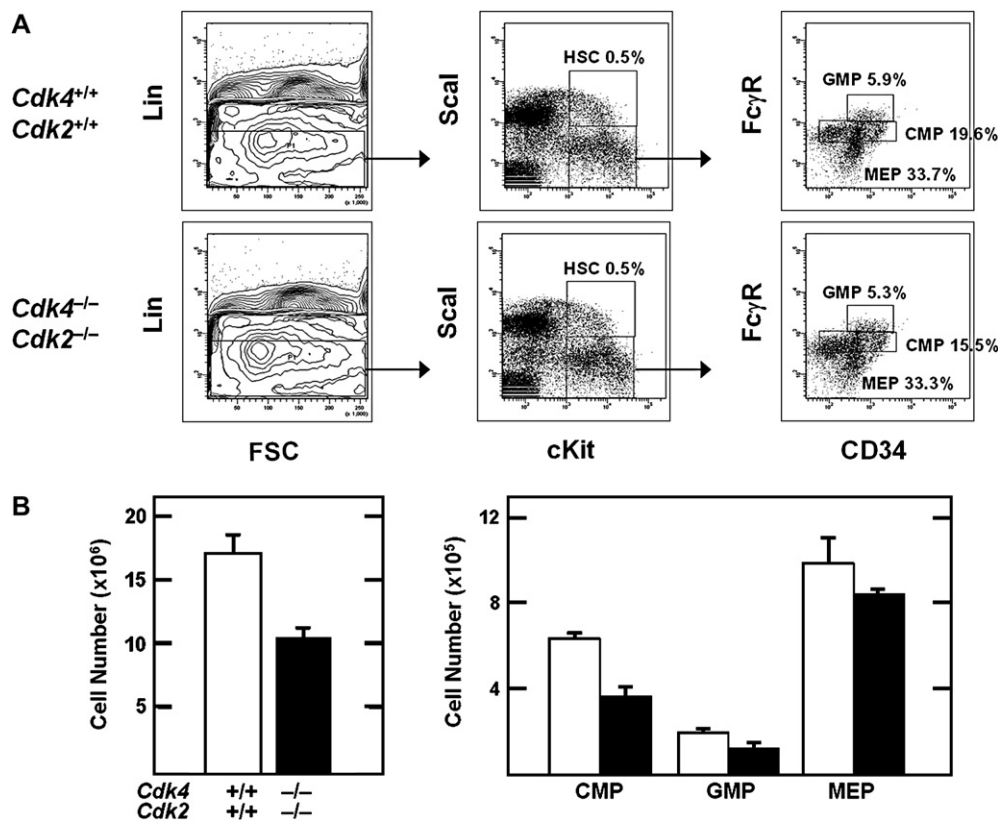


**Figure 1** – Generation of  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{lox/lox}$  and  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{-/-}$  mice. (A) Targeting strategy. The targeting vector carries three *firt* sequences flanking exons 2 and 4 as well as a PGK-HygR cassette used for positive selection. The vector also contains a PGK-TK cassette used for negative selection. Recombinant ES cell clones containing a floxed  $Cdk2^{lox}$  allele were used to generate mice carrying the  $Cdk4^{3firt}$  and  $Cdk2^{lox}$  alleles in the same chromosome. These mice were sequentially crossed with transgenic mice expressing the Flpe (pCAG-Flpe) and Cre (CMV-Cre) recombinases to generate heterozygous  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{-/-}$  mice. *Cdk4* coding sequences are indicated by hatched boxes. *Cdk4* non-coding exons are indicated by open boxes. *Cdk2* coding sequences are indicated by black boxes. *Cdk2* non-coding exons are indicated by grey boxes. *firt* and *loxP* sites are indicated by open and closed triangles, respectively. Only the restriction sites used in these diagnostic hybridizations are indicated. The location of probes a and b used in Southern blot analysis is indicated by a thick line. (B) Southern blot analysis to identify the  $Cdk4^{3firt}$  recombinant allele. (C) Southern blot analysis to identify the  $Cdk4^{-}$  null allele.

embryos with Mendelian ratios (41/165, 25%). More importantly, a significant percentage of these embryos (about 40%) complete embryonic development. Newborn  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{-/-}$  mice weigh 25–40% less than their wild type littermates, a reduction in weight slightly more pronounced than that reported for mice lacking  $Cdk4$  alone (20–25%) (Tsutsui et al., 1999; our unpublished observations). Importantly, neonatal  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{-/-}$  animals move normally and ingest milk. Yet, they die within 24 h after birth.

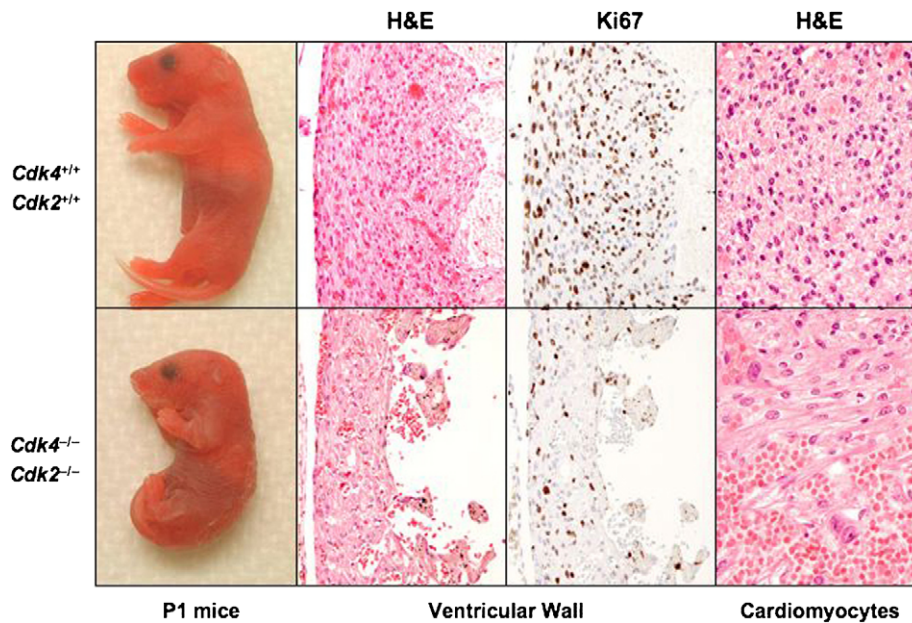
Histological analysis indicate that organogenesis is not significantly affected in newborn  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{-/-}$  mice. Moreover, they display normal levels of proliferating (Ki67) and apoptotic (TUNEL, active Caspase 3) cells in all tissues examined (data not shown), except in heart (see below). Previous studies with double  $Cdk$  mutant mice have revealed strong compensatory activities in the hematopoietic system between  $Cdk4$  and  $Cdk6$ , but not between  $Cdk2$  and  $Cdk6$  (Malumbres et al., 2004). To determine the extent of compensation between  $Cdk2$  and  $Cdk4$  in hematopoietic cells we analyzed peripheral blood and fetal liver from late embryos for comparative purposes.  $Cdk4^{-/-};Cdk6^{-/-}$  embryos die during late embryonic development due to anemia caused by limited proliferation of erythroid progenitors (Malumbres et al., 2004). In contrast, the relative levels of white and red blood cells in E17.5  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{-/-}$  embryos were basically normal

except for a small decrease in the number of red blood cells ( $1.27 \times 10^6 \pm 0.14$  RBC/mm<sup>3</sup> versus  $1.45 \times 10^6 \pm 0.11$  RBC/mm<sup>3</sup> in wild type mice,  $n = 3$ ) that did not affect viability. Analysis of hematopoietic precursors by flow cytometry revealed that the relative percentages of hematopoietic stem cells (HSC), granulocyte-macrophage progenitors (GMP), common myeloid progenitors (CMP) and megakaryocyte-erythroid progenitors (MEP) in  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{-/-}$  embryos were very similar to those of wild type littermates (Figure 2A). Similar results were obtained with P1 neonatal mutants (data not shown).  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{-/-}$  fetal livers displayed about 60% the number of cells of livers isolated from wild type embryos, a reduction proportional to the smaller size of these double mutant embryos (Figure 2B, left). Accordingly, the total numbers of hematopoietic progenitors per liver was also reduced to a similar extent (Figure 2B, right). These observations contrast with those observed in embryos defective for  $Cdk4$  and  $Cdk6$  which displayed about one-tenth the numbers of GMP and CMP precursors and about half of MEP progenitors (Malumbres et al., 2004). Thus,  $Cdk4$  and  $Cdk2$  do not play compensatory roles in embryonic and neonatal hematopoietic cells, indicating that these cells proliferate well with just one interphase kinase, either  $Cdk4$  (in  $Cdk6$  and  $Cdk2$  double knock out mice) or  $Cdk6$  (in the  $Cdk4$  and  $Cdk2$  double knock out mice described here).



**Figure 2** – Analysis of hematopoietic stem cells and lineage committed progenitors in late gestation embryos. (A) Cells were isolated from fetal livers of E17.5 embryos and analysed by flow cytometry. Relative percentages of hematopoietic stem cells (HSC), granulocyte-macrophage progenitors (GMP), common myeloid progenitors (CMP) and megakaryocyte-erythroid progenitors (MEP) are shown. (B) Left panel shows absolute cell numbers per fetal liver of wild type (empty boxes) and  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{-/-}$  (solid boxes) embryos. Right panel shows total numbers of GMP, CMP and MEP populations calculated per liver. Solid boxes represent samples obtained from  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{-/-}$  embryos and empty boxes represent wild type littermates. Error bars: SD.





**Figure 3** – Mice lacking *Cdk4* and *Cdk2* develop to term but die soon after birth due to cardiac failure. (Left) Representative images of *Cdk4*<sup>+/+</sup>; *Cdk2*<sup>+/+</sup> (top) and *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>-/-</sup> (bottom) P1 mice. Microscopic images from these mice showing (center left) H&E staining ( $\times 200$ ) and (center right) Ki67 immunostaining of serial sections of ventricular walls ( $\times 200$ ), and (right) H&E staining of the myocardium showing partially disorganized and enlarged cardiomyocytes with prominent capillaries ( $\times 400$ ).

Newborn *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>-/-</sup> mice show thinning of their ventricular walls due to a decrease in the number of proliferating cardiomyocytes (Figure 3). Quantitative analysis of Ki67 staining revealed about one-third the number of proliferating cells in the ventricular walls of mutant hearts (Figure 3). No significant differences in apoptosis levels were observed between mutant and wild type hearts (data not shown). In some cases, *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>-/-</sup> cardiomyocytes had an enlarged phenotype suggesting a hypertrophic, adaptive response (Figure 3). Moreover, these cardiomyocytes were partially disorganized by prominent capillaries. These observations suggest that *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>-/-</sup> mice may not be able to sustain the major hemodynamic changes that take place at birth and die of cardiac failure. Indeed, newborn *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>-/-</sup> mice have congestive livers (data not shown), a defect that reinforces the cardiac failure hypothesis.

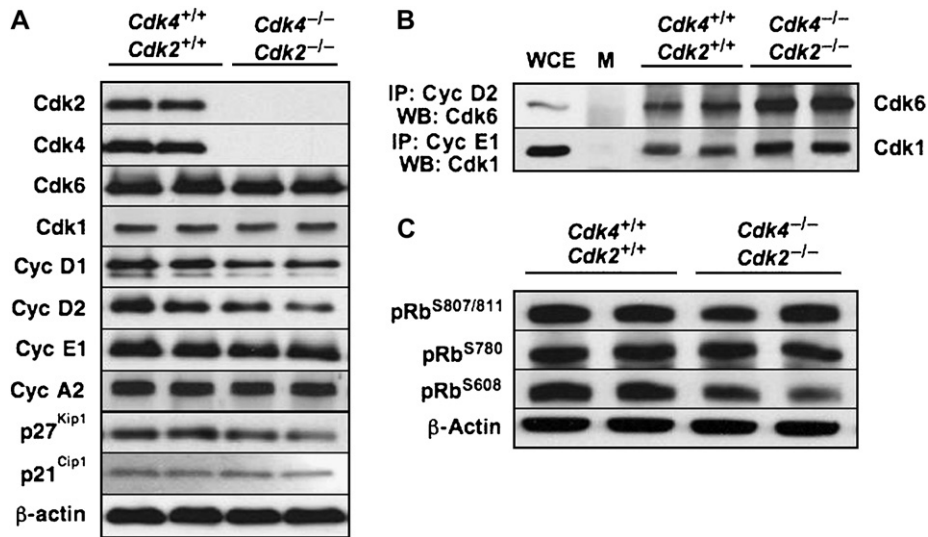
## 2.2. Expression of cell cycle regulators

To understand the molecular mechanisms responsible for the absence of major developmental and proliferative defects in *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>-/-</sup> double mutant mice, we examined the expression levels of other cell cycle regulators. To prevent possible indirect effects of damage suffered during delivery, we used late embryos (E17.5 or E18.5) to carry out these studies. As illustrated in Figure 4A, concomitant loss of *Cdk4* and *Cdk2* does not result in significant changes in the levels of *Cdk6* and *Cdk1*, the two additional kinases implicated in driving the cell cycle. Likewise, all the Cyclins tested, including Cyclin D1 and D2, Cyclin E1 and Cyclin A2, display normal levels of expression. The steady state levels of the cell cycle inhibitors p21<sup>Cip1</sup> and p27<sup>Kip1</sup> also remain unchanged (Figure 4A).

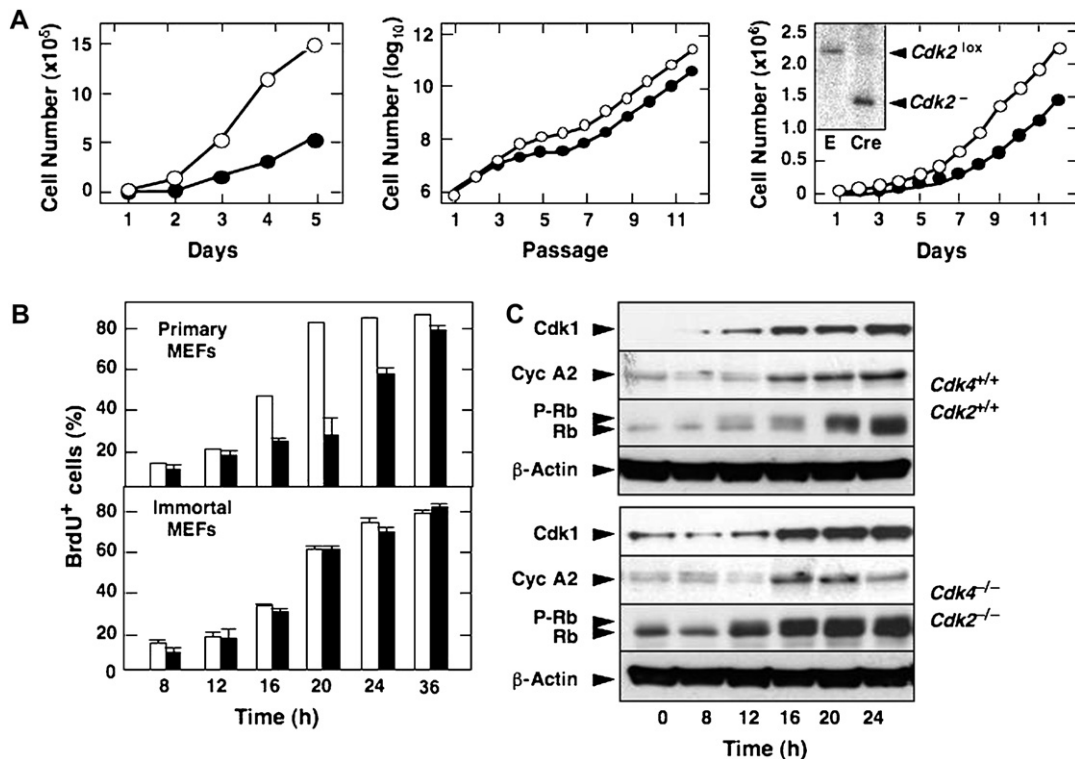
We also examined how the absence of *Cdk4* and *Cdk2* affected the formation of Cyclin–Cdk complexes and the inactivation of pRb, a requirement for progression into the S phase. As shown in Figure 4B, we observed increased levels of Cyclin D2 complexed with *Cdk6* and increased binding of Cyclin E1 to *Cdk1*, a non-canonical Cyclin–Cdk complex recently reported by Aleem et al. (2005). Surprisingly, these double mutant embryos displayed normal levels of pRb phosphorylation. Moreover, phosphorylation of pRb occurs at residues S807/811 and S780, three sites known to be specifically phosphorylated by Cyclin D–Cdk4 complexes (Figure 4C). Likewise, pRb is also phosphorylated at residue S608 in *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>-/-</sup> late embryos, a residue known to be the target of *Cdk2* (Figure 4C). These observations suggest that Cyclin D–Cdk6 and Cyclin E–Cdk1 complexes may contribute to drive cell division by phosphorylating pRb at canonical sites in the absence of *Cdk4* and *Cdk2*.

## 2.3. immortalization of mouse embryonic fibroblasts

Proliferation of primary MEFs lacking either *Cdk4* or *Cdk2* is less robust than proliferation of wild type cells (Berthet et al., 2003; Ortega et al., 2003; Rane et al., 1999; Tsutsui et al., 1999). Concomitant loss of both kinases results in further decrease in their proliferation rate (Figure 5A, left). Primary *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>-/-</sup> MEFs display delayed entry into S phase, although the percentage of cells that enter S phase eventually equals that of wild type MEFs (Figure 4B, top). More importantly, most of our cultures, 8 out of 10 embryos under classical culture conditions using 20% oxygen and four out of four embryos in low percent (3%) oxygen, became immortal upon continuous passage following a standard 3T3 protocol (Figure 4A,



**Figure 4** – Biochemical characterization of cell cycle regulators in embryos lacking Cdk4 and Cdk2. (A) Expression levels of cell cycle regulators in wild type (*Cdk4*<sup>+/+</sup>;*Cdk2*<sup>+/+</sup>) and mutant (*Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>-/-</sup>) E17.5 embryos. Protein extracts were analyzed by immunoblotting with antibodies elicited against the indicated proteins. (B) Cyclin D2/Cdk6 and Cyclin E1–Cdk1 complexes were immunoprecipitated with antibodies against Cyclin D2 or Cyclin E1 and analyzed by immunoblotting using antisera against Cdk6 or Cdk1, respectively. M: mock immunoprecipitates; WCE: whole cell extract at 1:20 of starting material prior to immunoprecipitation. (C) Analysis of pRb phosphorylation levels using antibodies specific for phosphorylated residues S807/811, S780 or S608.



**Figure 5** – Proliferative properties of primary and immortal MEFs. (A) Left panel shows proliferation of primary MEFs at passage 2. Center panel shows immortalization of primary MEFs by continuous passage following a classical 3T3 protocol. *Cdk4*<sup>+/+</sup>;*Cdk2*<sup>+/+</sup> (open circles) and *Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>-/-</sup> (filled circles). Left panel shows proliferation of immortal *Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>lox/lox</sup> MEFs infected with empty virus (open circles) or with virus expressing Cre recombinase (filled circles). Insert shows a Southern blot depicting complete cleavage of the *Cdk2*<sup>lox</sup> allele in MEFs infected with virus expressing Cre recombinase (E, empty infected). (B) Percentage of quiescent *Cdk4*<sup>+/+</sup>;*Cdk2*<sup>+/+</sup> (open bars) and *Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>-/-</sup> (filled bars) MEFs entering S phase upon addition of serum in the presence of 50 μM BrdU. Top panel shows results with primary MEFs. Bottom panel shows results with immortal MEFs. Error bars: SD. (C) Expression of Cdk1, Cyclin A2 (Cyc A2), hypophosphorylated (Rb) and phosphorylated (P-Rb) forms of pRb in immortal MEFs at the indicated times after the addition of serum. β-Actin serves as loading control.

middle). These observations indicate that embryonic cells in culture can proliferate and become immortal in spite of lacking the two main Cdks implicated in the interphase (G1 phase, G1/S transition and S phase) of the cell cycle.

To rule out that the ability of these cells to proliferate in culture was due to the rapid accumulation of mutations and/or epigenetic alterations during the immortalization protocol, we acutely ablated the *Cdk2* locus in immortal *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>lox/lox</sup> MEFs. These cells do not contain mutations in either the INK4a/Arf or the P53 loci (data not shown). As illustrated in Figure 5A (right), acute removal of the floxed *Cdk2* locus by infecting *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>lox/lox</sup> MEFs with a retrovirus expressing the bacteriophage Cre recombinase failed to significantly reduce their proliferation rate. Thus, Cdk4 and Cdk2 ameliorate the adaptation process, also known as “culture shock”, that MEFs must endure when transferred from the developing embryo to a Petri dish. However, these kinases are dispensable for proper proliferation of these cells once they have become adapted to grow under *in vitro* culture conditions.

Immortal *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>-/-</sup> MEFs respond efficiently to mitogenic signals as illustrated by their normal kinetics in entering S phase (Figure 5B, bottom). These double mutant cells also display robust and timely pRb phosphorylation following serum stimulation (Figure 5C). E2F targets such as Cyclin A2 are also expressed with kinetics indistinguishable from wild type controls. Interestingly, induction of Cdk1, which has been shown to be partially dependent on E2F activity, also occurs normally (Figure 5C).

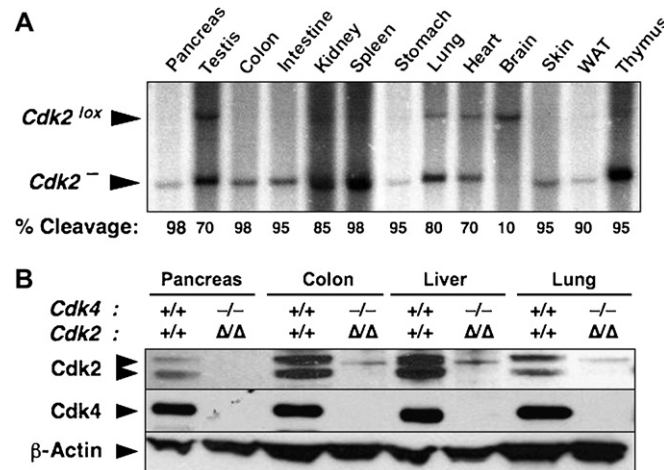
#### 2.4. Ablation of *Cdk4* and *Cdk2* in adult mice

Most studies using genetic approaches in mice are limited to embryonic development, in particular when the targeted mutations result in a lethal phenotype. Thus, we examined whether the early postnatal death of *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>-/-</sup> double mutant mice was due to an intrinsic cell cycle deficiency or

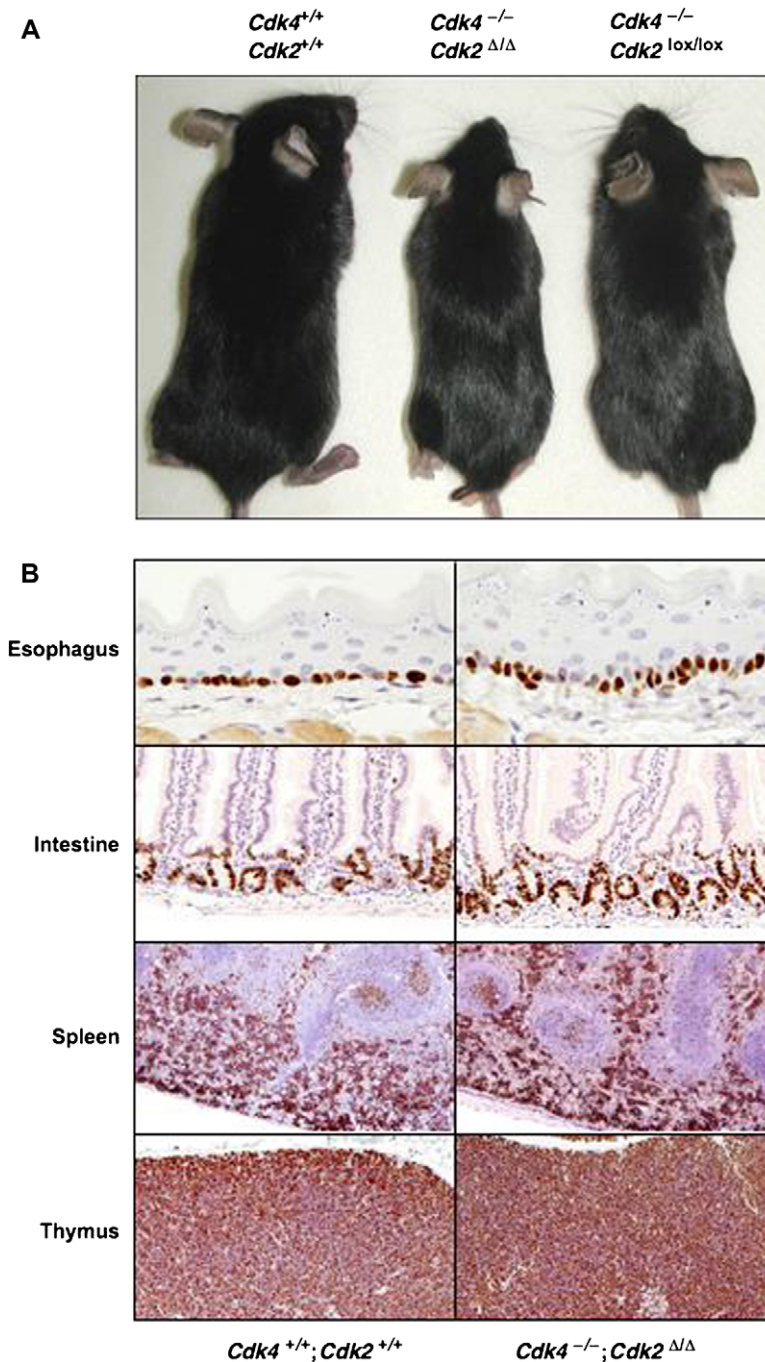
to a developmental defect in specific lineages such as cardiomyocytes by ablating the *Cdk2* locus in adult mice. To this end, we generated compound *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>lox/lox</sup>; *RERT*<sup>ert/ert</sup> animals (see Section 4) in which the *Cdk2*<sup>lox</sup> alleles can be knocked out upon activation of the inducible CreERT2 recombinase (Feil et al., 1996) encoded by the *ert* allele. This allele drives CreERT2 expression from the locus encoding the large subunit of RNA polymerase II by an IRES-dependent bi-cistronic strategy and it is expressed in most, if not all cell types (Guerra et al., 2003).

Weaned (P21) *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>lox/lox</sup>; *RERT*<sup>ert/ert</sup> mice were exposed to 4-hydroxy-tamoxifen (4OHT) for 4 months (1 mg, twice a week) to allow efficient cleavage of the conditional *Cdk2*<sup>lox</sup> alleles. As illustrated in Figure 6A, ≥95% of the conditional *Cdk2*<sup>lox</sup> has recombined to generate the null allele in many tissues, including colon, pancreas, skin, small intestine, spleen, stomach and thymus. Other tissues such as heart, kidney, lung, testis and white adipose tissue displayed recombination levels ranging from 70 to 90%. Only brain contained minimal levels of recombined *Cdk2*<sup>-</sup> allele, a consequence of the limited penetrability of 4OHT through the blood/brain barrier (Figure 6A). Ablation of Cdk2 expression in some of the tissues displaying high percentage of *Cdk2*<sup>lox</sup> recombination, including colon, liver, lung and pancreas was confirmed by Western blot analysis (Figure 6B). These 4OHT-treated *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>Δ/Δ</sup>; *RERT*<sup>ert/ert</sup> mice will be designated from now on as *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>Δ/Δ</sup>; *RERT*<sup>ert/ert</sup>. *Cdk4*<sup>+/+</sup>; *Cdk2*<sup>+/+</sup>; *RERT*<sup>ert/ert</sup> animals submitted to the same 4OHT treatment were used as controls.

Despite complete or near complete ablation of *Cdk2* in most tissues, *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>Δ/Δ</sup>; *RERT*<sup>ert/ert</sup> mice did not display obvious phenotypic deficiencies when compared to control *Cdk4*<sup>+/+</sup>; *Cdk2*<sup>+/+</sup>; *RERT*<sup>ert/ert</sup> mice submitted to the same 4OHT treatment (Figure 7A), except for those defects associated with loss of Cdk4 such as small size and diabetes (Rane et al., 1999; Tsutsui et al., 1999). Moreover, comparative



**Figure 6** – Generation of adult mice lacking Cdk4 and Cdk2. (A) Levels of excision of the conditional *Cdk2*<sup>lox</sup> alleles in *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>lox/lox</sup>; *RERT*<sup>ert/ert</sup> exposed to 4OHT for 4 months. DNA was isolated from the indicated tissues of the resulting *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>Δ/Δ</sup>; *RERT*<sup>ert/ert</sup> mice and analyzed by Southern blot. The migration of the conditional *Cdk2*<sup>lox</sup> and null *Cdk2*<sup>-</sup> alleles is indicated by arrowheads. The percentage of recombined *Cdk2*<sup>-</sup> allele in each of the tissues is indicated at the bottom. (B) Immunoblot analysis of the levels of expression Cdk4 and Cdk2 in some of the tissues shown in (A). As controls, we used extracts from the same tissues obtained from *Cdk4*<sup>+/+</sup>; *Cdk2*<sup>+/+</sup>; *RERT*<sup>ert/ert</sup> mice treated with 4OHT. β-Actin served as loading control.



**Figure 7** – Normal adult homeostasis and cell proliferation levels in tissues of *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>ΔΔ</sup>; *RERT*<sup>ert/ert</sup> mice. (A) Five-month-old *Cdk4*<sup>+/+</sup>; *Cdk2*<sup>+/+</sup>; *RERT*<sup>ert/ert</sup>, *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>ΔΔ</sup>; *RERT*<sup>ert/ert</sup> and *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>lox/lox</sup>; *RERT*<sup>ert/ert</sup> mice. The *Cdk4*<sup>+/+</sup>; *Cdk2*<sup>+/+</sup>; *RERT*<sup>ert/ert</sup> and the *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>ΔΔ</sup>; *RERT*<sup>ert/ert</sup> mice were treated with 4OHT, whereas the *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>lox/lox</sup>; *RERT*<sup>ert/ert</sup> mouse was treated with oil. (B) Ki67 immunostaining of the indicated tissues obtained from 5-month-old 4OHT-treated *Cdk4*<sup>+/+</sup>; *Cdk2*<sup>+/+</sup>; *RERT*<sup>ert/ert</sup> and *Cdk4*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>ΔΔ</sup>; *RERT*<sup>ert/ert</sup> mice. Esophagus: most of the stratum germinativum cells are proliferative (×400). Small intestine: proliferative cells are restricted to the lower part of the intestinal crypts (×200). Spleen: strong proliferation in the red pulp indicative of an active hematopoiesis. Most of the lymphoid cells in the white pulp are quiescent except those forming germinal centers (×50). Thymus: most thymocytes in the cortex are positive for Ki67 immunostaining (×100). The presence of the *ert* alleles in the description of the genotypes in the figure has been omitted for clarity.

analysis of the proliferation rates in all tissues examined by Ki67 immunostaining did not reveal significant differences. These results were most illustrative in tissues such as the esophagus (stratum germinativum) or intestine known for their active epithelial cell renewal (Figure 7B).

### 2.5. Adult hematopoiesis in the absence of *Cdk4* and *Cdk2*

Likewise, lympho-hematopoietic organs such as spleen and thymus known for their continuous production of lymphoid

or hematopoietic cells, also display normal proliferation levels (Figure 7B). In the spleen, the red pulp displayed the strongest Ki67 staining regardless of the presence or absence of Cdk4 and Cdk2 revealing that active erythropoiesis was not affected. Moreover, in the white pulp most of the lymphocytes appeared quiescent with the exception of several germinal centers. Other secondary lymphoid follicles present in the intestinal wall (Peyer's patches) and in lymph nodes displayed normal proliferation rates (data not shown), suggesting a functional B-cell response in  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  animals. Moreover, in the thymus, one of the tissues with faster cell turnover and most sensitive to cell division defects, almost all cortical thymocytes were positive for Ki67 immunostaining, indicating that the continuous and sustained production of naive T cells was preserved in the absence of Cdk4 and Cdk2.

In depth analysis of the adult hematopoietic system of  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  mice revealed that Cdk4 and Cdk2 were dispensable for proliferation and differentiation of all lineages. As illustrated in Figure S1A, bone marrow of  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  mice had the same number of burst-forming erythroid units, and colony-forming units for granulocyte, macrophage, and mixed granulocyte/macrophage lineages as wild type controls. To rule out the possibility that these colonies arose from stem cells that retained  $Cdk2^{lox}$  alleles, we performed semi-quantitative PCR analysis on genomic DNA extracted from individual colonies. In all cases, we found complete excision of the floxed  $Cdk2$  sequences (data not shown). Next, we examined the contributions of these hematopoietic precursors to the various cell lineages by staining bone marrow cells with lineage-specific antibodies. Flow cytometry analysis indicated that the percentage of B-cells (B220 antibodies), NK-cells (DX5 $\alpha$  antibodies), T-cells (CD3 antibodies) and granulocyte/monocytes (GR1 and CD11b antibodies) were basically the same as in the bone marrow of  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$  mice (Figure S1B).

The percentage of lymphoid B-cells (B220 antibodies), T-cells (CD3 antibodies) and NK-cells (DX5 $\alpha$  antibodies) were also similar to those obtained in control spleen (Figure S1C). Likewise loss of Cdk4 and Cdk2 did not alter cell proliferation in the thymus. Moreover, ablation of these genes did not appear to have a negative effect on the maturation program of T lymphocytes since the percentages of double negative, double positive and single positive populations were the same as in wild type mice (Figure S1D). These results conclusively demonstrate that adult hematopoiesis is not dependent on the kinase activity of both Cdk4 and Cdk2.

### 2.6. Normal liver regeneration in the absence of Cdk4 and Cdk2

Liver regeneration following PH is considered one of the most stringent assays to assess the proliferative capacity of adult tissues. In this assay, adult hepatocytes regain proliferative properties to restore hepatic function as a response to the reduction in liver mass. Thus, we decided to test the proliferative properties of  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  mice by resecting two-thirds of their livers and measuring hepatic regeneration 9 days later. Liver mass in the mixed 129/SvJ  $\times$  C57BL/6J background in which the  $Cdk4$  and  $Cdk2$  strains are maintained is

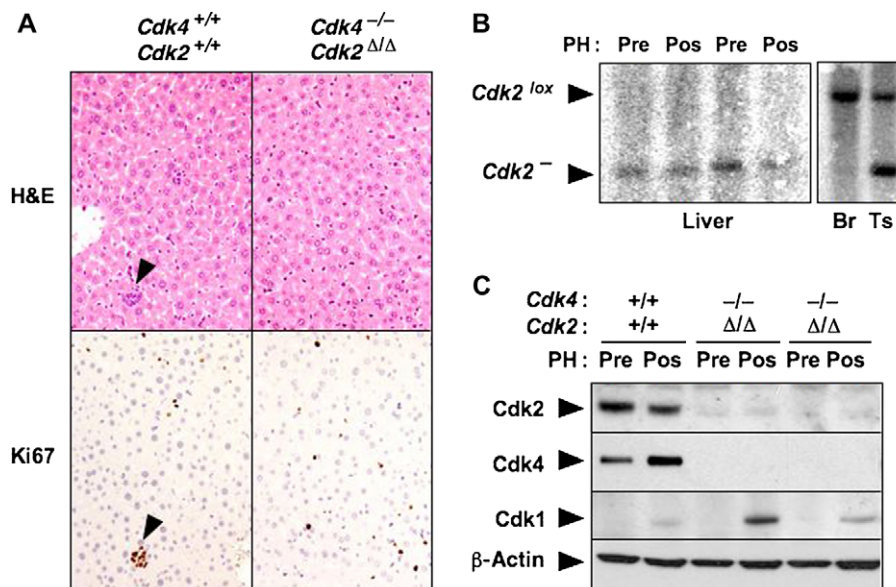
around 2.5% of the total body weight. Regenerated livers of 4-OHT-treated  $Cdk4^{+/+};Cdk2^{+/+};RERT^{ert/ert}$  and  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  mice ( $n = 3$ ) displayed similar overall appearance and size ( $2.70 \pm 0.14\%$  in the control mice and  $2.55 \pm 0.21\%$  in  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  animals). Histological characterization of sections from the regenerated livers showed normal morphology regardless of whether tissue regeneration occurred in the presence or absence of Cdk4 and Cdk2 (Figure 8A). Moreover, the levels of cell proliferation, determined by Ki67 immunostaining, were similar in the regenerated livers of control and  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  mice (Figure 8A).

To eliminate the possibility that liver regeneration in mutant mice may originate from a small subpopulation of stem cells that retained the conditional  $Cdk2^{lox}$  allele, we isolated DNA from regenerated livers of control and mutant mice and submitted them to Southern blot analysis. As shown in Figure 8B, DNA isolated from two independent mice only displayed the DNA band corresponding to the null  $Cdk2^{-}$  allele, thus indicating that hepatic regeneration occurred from  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{-/-}$  hepatocytes. Finally, western blot analysis of liver protein extracts obtained from the regenerated livers also showed absence of Cdk2 expression (Figure 8C). Interestingly, regenerated livers of mutant  $Cdk4^{-/-};Cdk2^{\Delta/\Delta};RERT^{ert/ert}$  mice expressed Cdk1 levels similar or possibly higher than those of control mice. These observations indicate that induction of Cdk1 expression in response to mitogenic signaling in proliferating tissues is independent of the presence of the two G1/S kinases, Cdk4 and Cdk2. These findings, taken together, provide convincing evidence that adult mammalian cells proliferate normally in the absence of Cdk4 and Cdk2.

## 3. Discussion

During evolution, eukaryotes have increased the number of Cdks according to their structural and functional complexity. Whereas yeasts have a single cell cycle Cdk, Cdc2/Cdc28, the mammalian genome has accumulated at least five loci encoding cell cycle Cdks (reviewed in Malumbres and Barbacid (2005)). They include Cdk1, most likely the functional orthologue of yeast Cdc2/Cdc28, Cdk2, Cdk3, Cdk4 and Cdk6. Widely accepted models propose that the increased Cdk complexity of higher eukaryotes is due to their need to have a more precise control of the various phases of the cell cycle. According to this model, Cdk3, Cdk4 and Cdk6 would be responsible for getting cells out of quiescence and driving them through G1, whereas Cdk2 and Cdk1 would be essential for the two most fundamental aspects of cell division, DNA synthesis and mitosis, respectively.

Recent genetic evidence, however, has challenged this model. We and others have targeted the genes encoding Cdk2, Cdk4 and Cdk6, to show that they are dispensable for cell proliferation, as well as for embryonic development and adult homeostasis (Berthet et al., 2003; Malumbres et al., 2004; Ortega et al., 2003; Rane et al., 1999; Tsutsui et al., 1999; Ye et al., 2001). Exceptions include the essential role of Cdk2 for meiotic cell division (Ortega et al., 2003), a fact often ignored when studying this kinase, and of Cdk4 for postnatal proliferation of specialized endocrine cells types such as



**Figure 8** – Liver regeneration in *Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>Δ/Δ</sup>;*RERT*<sup>ert/ert</sup> mice. (A) 4OHT-treated *Cdk4*<sup>+/+</sup>;*Cdk2*<sup>+/+</sup>;*RERT*<sup>ert/ert</sup> and *Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>Δ/Δ</sup>;*RERT*<sup>ert/ert</sup> mice were submitted to partial hepatectomy (PH) as indicated in Section 4 and the regenerated livers analyzed 9 days later by H&E and Ki67 immunostaining. A small hematopoietic cluster is indicated by arrowheads. (B) Southern blot analysis of the excision of conditional *Cdk2*<sup>lox</sup> alleles in resected (Pre) and regenerated (Pos) liver samples from two independent *Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>Δ/Δ</sup>;*RERT*<sup>ert/ert</sup> mice. DNAs from brain (Br) and testis (Ts) tissue from one of these mice were also tested as controls. These tissues are known to undergo limited cleavage of the *Cdk2*<sup>lox</sup> allele (see Figure 5). (C) Immunoblot analysis of the expression of Cdk4, Cdk2 and Cdk1 in resected (Pre) and regenerated (Pos) livers of 4OHT-treated *Cdk4*<sup>+/+</sup>;*Cdk2*<sup>+/+</sup>;*RERT*<sup>ert/ert</sup> and *Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>Δ/Δ</sup>;*RERT*<sup>ert/ert</sup> mice. β-Actin served as loading control. The presence of the *ert* alleles in the description of the genotypes has been omitted for clarity.

insulin producing pancreatic beta cells and pituitary lactotrophs responsible for production of prolactin (Martin et al., 2003; Moons et al., 2002; Rane et al., 1999; Tsutsui et al., 1999).

It has been argued that the lack of requirement of individual Cdks for mammalian cell division is due to functional compensation by other Cdks. Indeed, concomitant ablation of the genes encoding Cdk4 and Cdk6 in the mouse germ line results in embryonic lethality, a more dramatic phenotype than that induced by ablating each locus independently (Malumbres et al., 2004). Cdk4 and Cdk6 are highly related kinases activated by the same D-type Cyclins (Malumbres and Barbacid, 2005). *Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk6*<sup>-/-</sup> embryos die during late gestation due to limited proliferation of hematopoietic precursors, particularly those responsible for populating the erythroid lineage (Malumbres et al., 2004). Yet, *Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk6*<sup>-/-</sup> embryos display normal rates of cell proliferation in other tissues. Moreover, MEFs derived from these mutant embryos grow well in culture and enter the cell cycle upon mitogenic stimuli with normal kinetics (Malumbres et al., 2004). Similar results have been obtained in mice lacking the three D-type Cyclins (Kozar et al., 2004). Thus, Cdk4 and Cdk6 play compensatory roles but only in highly specialized cell types.

In contrast, a recent report by Berthet et al. (2006) indicates that Cdk4 and Cdk2, the main G1/S kinases, have significant overlapping roles. In this study, *Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>-/-</sup> embryos die during midgestation due to heart defects not too different from those described here for newborn *Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>-/-</sup> mice. However, according to this report, combined absence of Cdk4 and Cdk2 results in limited phosphorylation, and hence deficient inactivation of pRb. This defect leads to

limited expression of E2F targets essential for cell cycle progression such as Cyclin A and Cdk1. Indeed, in this study, *Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>-/-</sup> MEFs proliferate poorly and do not become immortal upon continuous passage in culture. Interestingly, the proliferative defects observed in these double mutant mice only occurred after midgestation, since E12.5 *Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>-/-</sup> embryos appeared to be normal (Berthet et al., 2006). The authors speculated that during early embryogenesis, either Cdk6 complexed to D-type Cyclins or Cdk1 can inactivate pRb. A decrease in Cyclin D1 during midgestation would result in impaired pRb phosphorylation with subsequent inhibition of E2F-dependent Cdk1 expression, leading to an overall decrease in cell proliferation that becomes incompatible with life (Berthet et al., 2006).

Our results are at variance with these findings. Whereas we observed embryonic lethality of *Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>-/-</sup> embryos, a significant percentage of them develop to term. Newborn *Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>-/-</sup> mice die shortly thereafter presumably due to cardiac insufficiency, a consequence of their limited number of cardiomyocytes. Yet, all other tissues, including those of hematopoietic origin, display normal proliferative levels. These observations indicate that Cdk2 does not play significant compensatory roles with Cdk4 in hematopoietic cells or any other cell type except for embryonic cardiomyocytes. *Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>-/-</sup> embryos are slightly smaller than those lacking Cdk4 alone (Rane et al., 1999; Tsutsui et al., 1999). However, the mixed background used in these studies prevents us to ascribe this small difference to loss of Cdk2.

Loss of viability during embryonic or early postnatal development often masks the overall phenotypic consequences of

gene targeting. Generation of mice carrying a conditional mutation in the *Cdk2* locus in a *Cdk4* null background has allowed us to overcome this limitation by ablating *Cdk2* in adult tissues. The absence of any overt phenotype in *Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>Δ/Δ</sup>;RERT<sup>ert/ert</sup> mice, other than those observed in single *Cdk4* and *Cdk2* null animals, is not compatible with the central role proposed for these kinases during interphase. It could be argued that *Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>Δ/Δ</sup>;RERT<sup>ert/ert</sup> mice do not display obvious abnormalities due to the low proliferation rates of most adult tissues. However, as illustrated here, a battery of highly proliferating adult tissues such as skin or small intestine as well as hematopoietic organs, display normal proliferation rates. Even hematopoietic precursors proliferate normally and retain the capacity to generate a normal mature hematopoietic system in the absence of *Cdk4* and *Cdk2*. Moreover, adult hepatocytes deficient for these kinases can respond to severe stress conditions such as liver regeneration upon PH.

At the present time we can only speculate about the reasons for the different results obtained by us and Berthet et al. (2006). Both mice have similar genetic backgrounds, composed mainly of those of 129J and C57Bl6 origin, albeit our animals contain a limited contribution from CD1 mice. Whether this difference accounts for survival beyond mid-gestation remains to be determined. It is also possible that the mice described by Berthet et al. have accumulated additional mutations either by chance or during selection of mice that underwent the rare recombination required to co-segregate the neighboring *Cdk4* and *Cdk2* targeted loci. In any case, our results illustrate that mice can thrive without *Cdk4* and *Cdk2*, specially during adult homeostasis.

Our *in vitro* studies with MEFs provide additional evidence that *Cdk4* and *Cdk2* are dispensable for the mammalian cell cycle. *Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>-/-</sup> MEFs become immortal with high (>80%) frequency when maintained in culture. These immortal MEFs have normal proliferation rates including S phase kinetics. Indeed, the only substantial difference between wild type and *Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>-/-</sup> MEFs resides in their increased susceptibility to the stress imposed by their adaptation to *in vitro* culture conditions. Under these stress conditions, MEFs lacking *Cdk4* and *Cdk2* proliferate significantly more slowly than MEFs expressing both enzymes. Yet, once *Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>-/-</sup> MEFs become adapted to culture, they behave as wild type cells. Additional proof of the selective requirement for *Cdk4* or *Cdk2* during adaptation to culture conditions was provided by the efficient proliferation of immortal *Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>lox/lox</sup> MEFs upon acute removal of *Cdk2*. Although the molecular mechanisms by which *Cdk4* and *Cdk2* facilitate cell division under *in vitro* stress conditions remain to be worked out, our results clearly illustrate that *Cdk4* and *Cdk2* are dispensable for mammalian cell division.

In summary, our results provide genetic evidence that *Cdk4* and *Cdk2* are dispensable for mammalian cell division, both during embryonic development and in adult homeostasis. These results are reminiscent of those previously reported for mice lacking *Cdk6* and *Cdk2* (Malumbres et al., 2004). Only loss of *Cdk4* and *Cdk6* expression is incompatible with life, at least during embryogenesis. Yet, most cell types proliferate well in the absence of these kinases, indicating that they play a developmental role in hematopoietic lineages, but are not essential for the basic process of mammalian cell division

(Malumbres et al., 2004). Next, it will be necessary to determine to what extent interphase Cdks are essential for mammalian cell division by generating triple mutant mice deficient for *Cdk4*, *Cdk6* and *Cdk2*. Targeting the *Cdk3* locus will not be necessary since the strains used for these studies already carry a germ line mutation for *Cdk3* (Ye et al., 2001). In addition, it will be essential to determine whether *Cdk1*, the proposed orthologue for the yeast Cdc2/Cdc28 kinase, is also indispensable for mammalian cell division or can be compensated by other Cdks, by targeting this locus. This information will help us to better understand the role of Cdks in driving mammalian cell proliferation.

## 4. Experimental procedures

### 4.1. Gene targeting and mouse strains

The *Cdk4* targeting vector was prepared as described in Figure 1. Briefly, a 6.4 kbp EcoRI–BamHI genomic fragment containing the *Cdk4* locus was isolated from a 129Sv/J genomic library and subcloned in pBluescript (Rane et al., 1999). An *frt* site was inserted 230 bp upstream of exon 2. In addition, an *frt*-PGK-HygR-*frt* hygromycin resistance cassette was inserted 115 bp downstream of exon 4. A PGK-thymidine kinase (TK) cassette was incorporated into the targeting vector for negative selection as previously described (Rane et al., 1999). The targeting vector was electroporated into ES cells carrying a *Cdk2* conditional knock out allele (Ortega et al., 2003). Southern blot analysis of 120 HygR/GanR clones identified four recombinants (Figure 1B,C) that were aggregated to CD1 morulas. Male chimeras derived from two clones (ESDS1.15 and ESDS1.66) co-segregated the targeted *Cdk4* (*Cdk4*<sup>3frt</sup>) and *Cdk2* (*Cdk2*<sup>lox</sup>) alleles to their offspring. The resulting *Cdk4*<sup>+3frt</sup>;*Cdk2*<sup>+lox</sup> mice were crossed to pCAG-Flpe transgenics (Rodriguez et al., 2000) to excise the PGK-HygR cassette and the exons 2–4 (Figure 1A). The resulting *Cdk4*<sup>+/-</sup>;*Cdk2*<sup>+lox</sup> mice were crossed to CMV-Cre transgenics (Schwenk et al., 1995) to generate double heterozygous *Cdk4*<sup>+/-</sup>;*Cdk2*<sup>+/-</sup> animals. These heterozygous mice were crossed with wild type C57Bl6 animals to segregate the Flpe and Cre transgenes. *Cdk4*<sup>+/-</sup>;*Cdk2*<sup>+lox</sup> mice were also mated with RERT<sup>ert/ert</sup> mice (Guerra et al., 2003) to generate the *Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>lox/lox</sup>;RERT<sup>ert/ert</sup> animals used to ablate *Cdk2* postnatally. These mice were also crossed with wild type C57Bl6 animals to segregate the Flpe transgene. *Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>lox/lox</sup>;RERT<sup>ert/ert</sup> mice were treated at weaning (P25) with 4-OHT for 2–4 months (1 mg, twice a week) to ensure efficient ablation of the conditional *Cdk2*<sup>lox</sup> allele. These treated mice were designated as *Cdk4*<sup>-/-</sup>;*Cdk2*<sup>Δ/Δ</sup>;RERT<sup>ert/ert</sup>. Routine genotyping of *Cdk4*<sup>-</sup>, *Cdk2*<sup>-</sup> and *Cdk2*<sup>lox</sup> alleles was carried out by PCR amplification using specific oligonucleotides (primer sequences are available from the authors upon request). Mice were maintained according to the animal care standards established by national and international institutions including the European Union.

### 4.2. Histopathology and immunohistochemistry

Embryos or organs dissected from mice were fixed in 10% buffered formalin (Sigma) and embedded in paraffin. Three- or

five-micrometer-thick sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E). For proliferation studies, tissues or embryos were stained with Ki67 specific antibodies (MIB-1; Dako). Detection of apoptotic cells on tissue sections was carried out using the TUNEL assay (Apoptag Peroxidase, Intergen) or anti-active Caspase 3 antibodies (R&D Systems).

#### 4.3. Cell culture assays

Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were isolated from E13.5 embryos and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2 mM glutamine, 1% penicillin/streptomycin and 10% fetal bovine serum (FBS). MEFs were propagated in culture according to standard 3T3 protocols. For proliferation assays,  $5 \times 10^4$  cells were plated on 6-well plates in duplicate essentially as previously described (Martín et al., 2005). To analyse S phase entry, MEFs ( $10^6$  cells/10 cm dish) were deprived of serum for 72 h in DMEM + 0.1% FBS and re-stimulated with 10% FBS to enter the cell cycle. Cells were continuously labeled with 50  $\mu$ M bromodeoxyuridine (BrdU; Sigma), harvested at the indicated times and stained with anti-BrdU antibodies (Becton Dickinson) and propidium iodide. DNA content was analyzed by flow cytometry (FACSScalibur from Becton-Dickinson). MEFs were infected with retroviral vectors expressing the Cre recombinase as previously described (Martín et al., 2005).

To study proliferation of hematopoietic precursors, livers were collected from E17.5 embryos, single cell suspensions prepared and  $5 \times 10^4$  cells plated in methylcellulose (Stem Cell Technologies #03434) as suggested by the manufacturer. For each sample, two duplicate dishes were analyzed 9 days after plating.

#### 4.4. FACS analysis

Livers were collected from E17.5 embryos and single cell suspensions were prepared.  $2 \times 10^6$  cells/liver were immunostained and hematopoietic progenitors were identified as previously described (Malumbres et al., 2004). HSCs were gated as Lin<sup>-</sup> IL7R $\alpha$ <sup>-</sup> c-Kit<sup>+</sup> Sca1<sup>+</sup>; CMPs as Lin<sup>-</sup> IL7R $\alpha$ <sup>-</sup> c-Kit<sup>+</sup> Sca1<sup>-</sup> Fc $\gamma$ R<sup>low</sup> CD34<sup>+</sup>; GMPs as Lin<sup>-</sup> IL7R $\alpha$ <sup>-</sup> c-Kit<sup>+</sup> Sca1<sup>-</sup> Fc $\gamma$ R<sup>hi</sup> CD34<sup>+</sup>; and MEPs as Lin<sup>-</sup> IL7R $\alpha$ <sup>-</sup> c-Kit<sup>+</sup> Sca1<sup>-</sup> Fc $\gamma$ R<sup>low</sup> CD34<sup>-</sup>. Cell surface markers used to identify the specific hematopoietic populations in adult bone marrow, thymus or spleen include CD3, CD4, CD8, CD11B, CD16/32, CD19, CD45, B220, DX5 $\alpha$ , GR1 and Ter119 (all from Pharmingen). Their relative numbers were quantified using FACSScalibur and FACSaria (Becton Dickinson) cytometers.

#### 4.5. Liver regeneration

Animals were anesthetized using inhalation of 2% isoflourane after which resection of two-thirds of total liver mass (left lateral, left median and right median lobectomy) was performed. All animals were treated with 0.05 mg/kg of buprenorphine following PH. The mass of the resected liver tissue was measured right after surgery, and that of the regenerated liver was determined after sacrificing the animals 9 days after the PH.

#### 4.6. Protein analysis

Protein lysates were isolated and used for protein analysis by immunoblotting as previously described (Martín et al., 2005). Antibodies against the following proteins were used: Cdk2 (M2; Santa Cruz), Cdk1 (17; Santa Cruz), Cdk4 (C22; Santa Cruz), Cyclin A (H432; Santa Cruz), Cyclin E (M20; Santa Cruz), Cyclin D1 (DCS6; Neo Markers), Cyclin D2 (Santa Cruz), p21<sup>Cip1</sup> (C19; Santa Cruz), p27<sup>Kip1</sup> (Transduction Laboratories),  $\beta$ -Actin (AC15, Sigma) and pRb (BD Pharmingen). pRb phosphospecific antibodies to S608 (#2181), S780 (#9307) and S807/811 (#9308) were from Cell Signalling. As secondary antibodies, peroxidase-conjugated IgG (Dako) were used, followed by chemiluminescence detection (ECL; Amhersam).

#### Acknowledgements

We thank Rut González, Marta San Román, Blanca Velasco, and Raquel Villar for excellent technical assistance and Arancha García for invaluable help with the cytometer. We also value the excellent support provided by the Transgenic and Comparative Pathology Units of the CNIO. This work was supported by grants from the Plan Nacional de Investigación Científica to D.S. (GEN2003-20243-C08-02), M.M. (BMC2003-06098) and M.B. (SAF2000-0009-CO2-01, SAF2002-10374-E, SAF1999-1825-CE and SAF2004-20477-E), Fondo de Investigación Sanitaria to D.S. (PI031527), V Framework Programme of the European Union to M.B. (QLK3-1999-00875, QLG2-CT-2002-00930, LSHC-CT-2004-503438), INSERM and Association pour la Recherche contre le Cancer (Région Aquitaine) to P.D. C.B. and A.C. were supported by fellowships from la Ligue contre le Cancer (Comité de la Dordogne) and FPI (Ministerio de Educación y Ciencia), respectively. The CNIO was partially supported by the RTICCC (Red de Centros de Cáncer; FIS C03/10).

#### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.molonc.2007.03.001](https://doi.org/10.1016/j.molonc.2007.03.001).

#### REFERENCES

- Adams, P.D., 2001. Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks. *Biochim. Biophys. Acta* 1471, 123–133.
- Aleem, E., Kiyokawa, H., Kaldis, P., 2005. Cdc2–Cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. *Nat. Cell. Biol.* 7, 831–836.
- Berthet, C., Aleem, E., Coppola, V., Tessarollo, L., Kaldis, P., 2003. Cdk2 knockout mice are viable. *Curr. Biol.* 13, 1775–1785.
- Berthet, C., Klarmann, K.D., Hilton, M.B., Suh, H.C., Keller, J.R., Kiyokawa, H., Kaldis, P., 2006. Combined loss of Cdk2 and Cdk4 results in embryonic lethality and Rb hypophosphorylation. *Dev. Cell* 10, 563–573.
- Dyson, N., 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 12, 2245–2262.



- Feil, R., Brocard, J., Mascres, B., LeMeur, M., Metzger, D., Chambon, P., 1996. Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10887–10890.
- Guerra, C., Mijimolle, N., Dhawahir, A., Dubus, P., Barradas, M., Serrano, M., Campuzano, V., Barbacid, M., 2003. Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* 4, 111–120.
- Kozar, K., Ciemerych, M.A., Rebel, V.I., Shigematsu, H., Zagozdzon, A., Sicinska, E., Geng, Y., Yu, Q., Bhattacharya, S., Bronson, R.T., et al., 2004. Mouse development and cell proliferation in the absence of D-Cyclins. *Cell* 118, 477–491.
- Malumbres, M., Barbacid, M., 2005. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci.* 30, 630–641.
- Malumbres, M., Sotillo, R., Santamaria, D., Galan, J., Cerezo, A., Ortega, S., Dubus, P., Barbacid, M., 2004. Mammalian cells cycle without the D-type Cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* 118, 493–504.
- Martin, J., Hunt, S.L., Dubus, P., Sotillo, R., Nehme-Pelluard, F., Magnuson, M.A., Parlow, A.F., Malumbres, M., Ortega, S., Barbacid, M., 2003. Genetic rescue of Cdk4 null mice restores pancreatic  $\beta$ -cell proliferation but not homeostatic cell number. *Oncogene* 22, 5261–5269.
- Martín, A., Odajima, J., Hunt, S.L., Dubus, P., Ortega, S., Malumbres, M., Barbacid, M., 2005. Cell cycle inhibition and tumor suppression by p21<sup>Cip1</sup> and p27<sup>Kip1</sup> are independent of Cdk2. *Cancer Cell* 7, 591–598.
- Moons, D.S., Jirawatnotai, S., Parlow, A.F., Gibori, G., Kineman, R.D., Kiyokawa, H., 2002. Pituitary hypoplasia and lactotroph dysfunction in mice deficient for Cyclin-dependent kinase-4. *Endocrinology* 143, 3001–3008.
- Ortega, S., Prieto, I., Odajima, J., Martin, A., Dubus, P., Sotillo, R., Barbero, J.L., Malumbres, M., Barbacid, M., 2003. Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat. Genet.* 35, 25–31.
- Rane, S.G., Dubus, P., Mettus, R.V., Galbreath, E.J., Boden, G., Reddy, E.P., Barbacid, M., 1999. Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in  $\beta$ -cell hyperplasia. *Nat. Genet.* 22, 44–52.
- Rodriguez, C.I., Buchholz, F., Galloway, J., Sequerra, R., Kasper, J., Ayala, R., Stewart, A.F., Dymecki, S.M., 2000. High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat. Genet.* 25, 139–140.
- Schwenk, F., Baron, U., Rajewsky, K., 1995. A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res.* 23, 5080–5081.
- Sherr, C.J., Roberts, J.M., 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501–1512.
- Trimarchi, J.M., Lees, J.A., 2002. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3, 11–20.
- Tsutsui, T., Hesabi, B., Moons, D.S., Pandolfi, P.P., Hansel, K.S., Koff, A., Kiyokawa, H., 1999. Targeted disruption of Cdk4 delays cell cycle entry with enhanced p27<sup>Kip1</sup> activity. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7011–7019.
- Ye, X., Zhu, C., Harper, J.W., 2001. A premature-termination mutation in the *Mus musculus* cyclin-dependent kinase 3 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 1682–1686.

# Mammalian Cells Cycle without the D-Type Cyclin-Dependent Kinases Cdk4 and Cdk6

Marcos Malumbres,<sup>1,\*</sup> Rocío Sotillo,<sup>1</sup>  
David Santamaría,<sup>1</sup> Javier Galán,<sup>1</sup> Ana Cerezo,<sup>1</sup>  
Sagrario Ortega,<sup>1,3</sup> Pierre Dubus,<sup>2</sup>  
and Mariano Barbacid<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Molecular Oncology Program  
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)  
E-28029 Madrid  
Spain

<sup>2</sup>EA2406 University of Bordeaux 2  
F-33076 Bordeaux  
France

## Summary

Cdk4 and Cdk6 are thought to be essential for initiation of the cell cycle in response to mitogenic stimuli. Previous studies have shown that Cdk4 is dispensable for proliferation in most cell types, an observation attributed to a putative compensatory role by Cdk6. *Cdk6*-null mice are viable and develop normally although hematopoiesis is slightly impaired. Embryos defective for Cdk4 and Cdk6 die during the late stages of embryonic development due to severe anemia. However, these embryos display normal organogenesis and most cell types proliferate normally. In vitro, embryonic fibroblasts lacking Cdk4 and Cdk6 proliferate and become immortal upon serial passage. Moreover, quiescent Cdk4/Cdk6-null cells respond to serum stimulation and enter S phase with normal kinetics although with lower efficiency. These results indicate that D-type cyclin-dependent kinases are not essential for cell cycle entry and suggest the existence of alternative mechanisms to initiate cell proliferation upon mitogenic stimulation.

## Introduction

Progression throughout the mammalian cell cycle is driven by heterodimeric kinases made of a regulatory subunit, designated as cyclin, and a catalytic subunit known as cyclin-dependent kinase or Cdk. Two of these Cdks, Cdk4 and Cdk6, bind to and are activated by the D-type family of cyclins, D1, D2, and D3 (reviewed in Sherr and Roberts [1999]). In their active form, these kinases phosphorylate members of the retinoblastoma (Rb) protein family, pRb, p107, and p130. The Rb family of proteins are tumor suppressors that in their active, nonphosphorylated form prevent expression of genes necessary for DNA replication (S phase of the cell cycle) and mitosis (M phase) (reviewed in Classon and Harlow [2002]). In quiescent cells, Rb proteins repress transcription by a complex mechanism that involves inactivation of transcription factors such as the E2F family and bind-

ing to histone deacetylases and chromatin remodeling proteins (reviewed in Harbour and Dean [2000]; Stevaux and Dyson [2002]). The complexity of Rb function is highlighted by the fact that pRb can bind more than 120 cellular proteins (Morris and Dyson, 2001).

Phosphorylation of pRb by D-type cyclin/Cdk4 or Cdk6 complexes results in its partial inactivation, which in turn allows expression of a limited number of transcriptional targets needed to drive cells through the G1 phase of the cell cycle. For instance, some of these targets are additional cyclins, such as the E-type cyclins (E1 and E2), whose primary role is to activate Cdk2. Active E-type cyclin/Cdk2 complexes further phosphorylate pRb (Lundberg and Weinberg, 1998; Harbour et al., 1999) leading to a wave of transcriptional activity essential to proceed through the G1/S transition. However, recent genetic evidence indicating that Cdk4 and E-type cyclins are not required for mitotic cell division has challenged this model (Berthet et al., 2003; Ortega et al., 2003; Geng et al., 2003; Parisi et al., 2003). Additional work will be necessary to determine the precise role of Cdk2 and E-cyclins as well as the contribution of other compensatory kinases before the molecular events that regulate the G1/S transition are fully understood.

The molecular link between mitogenic signaling and cell cycle progression started to take shape when several groups reported the induction of D-type cyclins after growth factor signaling or Ras oncogenic activity (reviewed in Stacey and Kazlauskas [2002]). Moreover, the *cyclin D1* promoter contains sequences recognized by several transcription factors such as AP-1 or NF- $\kappa$ B, known to be activated upon mitogenic signaling (reviewed in Amanatullah et al. [2001]). These and other related observations have led to the widely held hypothesis that D-type cyclins, in complex with Cdk4 or Cdk6, are the molecular sensors that activate cell cycle progression in response to mitogenic stimuli (Sherr and Roberts, 1999). Likewise, antimetabolic signals, such as contact inhibition, senescence, or exposure to TGF- $\beta$ , frequently inactivate the formation of D-type cyclin/Cdk4 or Cdk6 complexes by inducing expression of a family of cell cycle inhibitors known as INK4 (*Inhibitor of Cdk4*). The members of this protein family, p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup>, and p19<sup>INK4d</sup>, are competitive inhibitors of D-type cyclins for binding to Cdk4 and Cdk6 (reviewed in Pavletich [1999]; Sherr and Roberts [1999]).

The relevance of D-type cyclin/Cdk4 and Cdk6 complexes in the control of cell proliferation has been underscored by their frequent deregulation in human cancer. Most, if not all human tumor cells have altered their D-type cyclin-Cdk4/6-INK4-pRb pathway either by mutations that activate D-type cyclin/Cdk4 or Cdk6 activity or by mutations that eliminate INK4 or pRb (reviewed in Malumbres and Barbacid [2001]). These observations suggest that mutations that render cells less dependent of growth factor requirements for cell cycle progression are more likely to become tumorigenic. Likewise, these mutations presumably make cells less responsive to antimetabolic signals, one of the hallmarks of cancer cells (reviewed in Hanahan and Weinberg [2000]).

\*Correspondence: malumbres@cnio.es (M.M.), barbacid@cnio.es (M.B.)

<sup>3</sup>Present address: Biotechnology Program, CNIO, E-28029 Madrid, Spain.

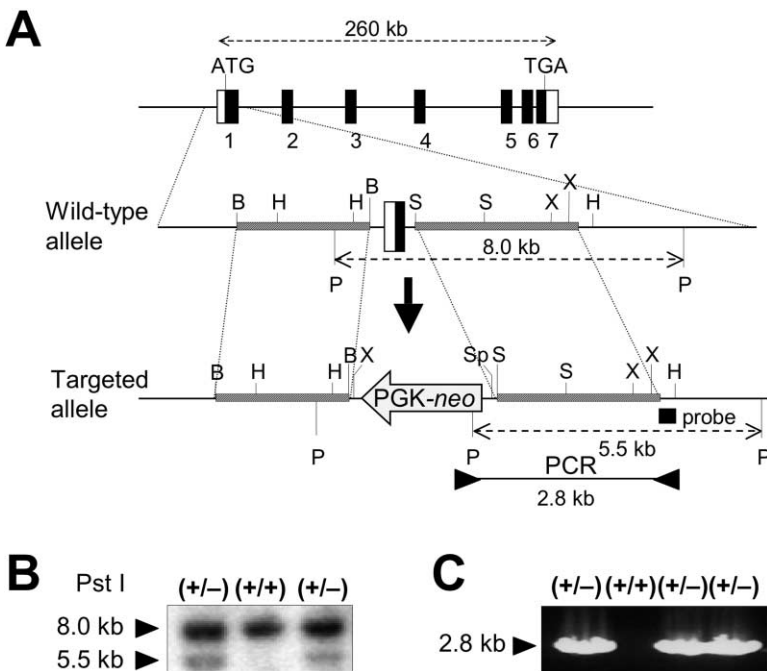


Figure 1. Gene Targeting of the Mouse *Cdk6* Locus

(A) Gene targeting strategy. The mouse *Cdk6* locus contains seven exons (boxes) spanning about 260 kbp. Noncoding sequences (open boxes), coding sequences (filled boxes), and translational initiator (ATG) and terminator (TGA) codons are indicated. Sequences present in the targeting vector are indicated by a thick hatched bar. The phosphoglycerol kinase promoter (PGK)-neomycin resistance gene (*neo*) cassette is indicated by a gray box. The arrow indicates the transcriptional orientation of the cassette. The probe used to identify the diagnostic *Pst*I (P) fragments is indicated by a thick bar. Other restriction sites include BamHI (B), HindIII (H), Sall (S), XbaI (X), and SphI (Sp). The position of oligonucleotides used for PCR analysis of the recombinant allele is shown by triangles. Representative (B) Southern blot and (C) PCR analysis of recombinant ES cell clones carrying the indicated alleles is shown. Migration of the corresponding DNA fragments is indicated by arrowheads.

However, these observations do not establish whether D-type cyclins and/or their cognate catalytic partners, Cdk4 and Cdk6, are the only elements that mediate the cell cycle response to mitogenic and antimitogenic signaling. In an effort to address this question, gene-targeted mice deficient for each, or even two, D-type cyclins have been generated (Fantl et al., 1995; Sicinski et al., 1995, 1996; Ciemerych et al., 2002; Sicinska et al., 2003). In general, D-type cyclins have overlapping roles in those tissues where more than one family member is expressed. Similarly, mice deficient in Cdk4 (Rane et al., 1999; Tsutsui et al., 1999) are viable and only display proliferative defects in specific endocrine cell types (Martín et al., 2003; Moons et al., 2002). Whereas at least some of these defects could be attributed to the absence of Cdk6 expression in the affected cell types, it is unlikely that the lack of widespread proliferative defects in Cdk4-null animals can be solely explained by the compensatory activity of Cdk6.

To analyze the physiological roles of Cdk4 and Cdk6 in vivo as well as to dissect their specific contributions to cell cycle progression after mitogenic stimuli, we have generated mice defective for Cdk6 as well as double mutant mice lacking both Cdk4 and Cdk6. Here, we report that Cdk6-deficient mice are viable and display mild defects in defined hematopoietic cell populations. Double deficiency in Cdk4 and Cdk6 results in either late embryonic or postnatal lethality, most likely due to a defect in the erythroid lineage that results in severe anemia. However, Cdk4- and Cdk6-null embryos display normal organogenesis and cell proliferation levels. We also report here that Cdk4 and Cdk6 double mutant mouse embryonic fibroblasts (MEFs) proliferate in response to serum stimulation and become immortalized upon continuous passage. These observations suggest that D-type cyclin-dependent kinases are not essential for cell cycle progression of quiescent cells upon exposure to mitogenic stimuli.

## Results

### Generation of Cdk6 Knockout Mice

To ablate the functional mouse *Cdk6* locus, we replaced its first coding exon with a PGK-*neo* cassette by homologous recombination in embryonic stem (ES) cells. This exon encodes the ATG initiation codon and the PLSTIRE domain essential for cyclin binding (Figure 1). Identification of recombinant *neo*<sup>R</sup> ES cell clones was determined by DNA hybridization and PCR amplification (Figures 1A–1C). Two independent ES cell clones carrying the expected recombination event were aggregated with CD1 morulae or microinjected into C57BL/6J blastocysts to generate *Cdk6*<sup>+/-</sup> mice. Heterozygous mice developed normally and did not show obvious abnormalities. Matings between these mice yielded homozygous *Cdk6*<sup>-/-</sup> animals at the expected Mendelian ratio (79/279 [28%] *Cdk6*<sup>-/-</sup> mice versus 66/279 [24%] *Cdk6*<sup>+/+</sup> animals). Mice lacking Cdk6 did not display gross anatomical abnormalities or increased mortality for up to two years of life. However, mutant females were slightly smaller than their wild-type littermates (15% lower weight at 12 weeks of age) and about 30% were sterile, a defect likely due to a decreased number of mature follicles (about 20%–50% of those present in wild-type ovaries) (data not shown). Whether these defects, along with the reduced size of Cdk6-null females, are due to a hormonal deficiency remains to be determined.

### Defective Hematopoiesis in *Cdk6*<sup>-/-</sup> Mice

Cdk6 is expressed in most mammalian tissues although it is most abundant in lymphoid organs (Meyerson et al., 1992; Meyerson and Harlow, 1994). As illustrated in Figure 2A, Cdk6 was expressed in wild-type but not in Cdk6-null lymphocytes. In Cdk6-deficient mice, the thymus was reduced in size due to lower cellularity ( $0.96 \pm 0.3 \times 10^6$  cells in mutant mice versus  $1.7 \pm 0.4 \times$

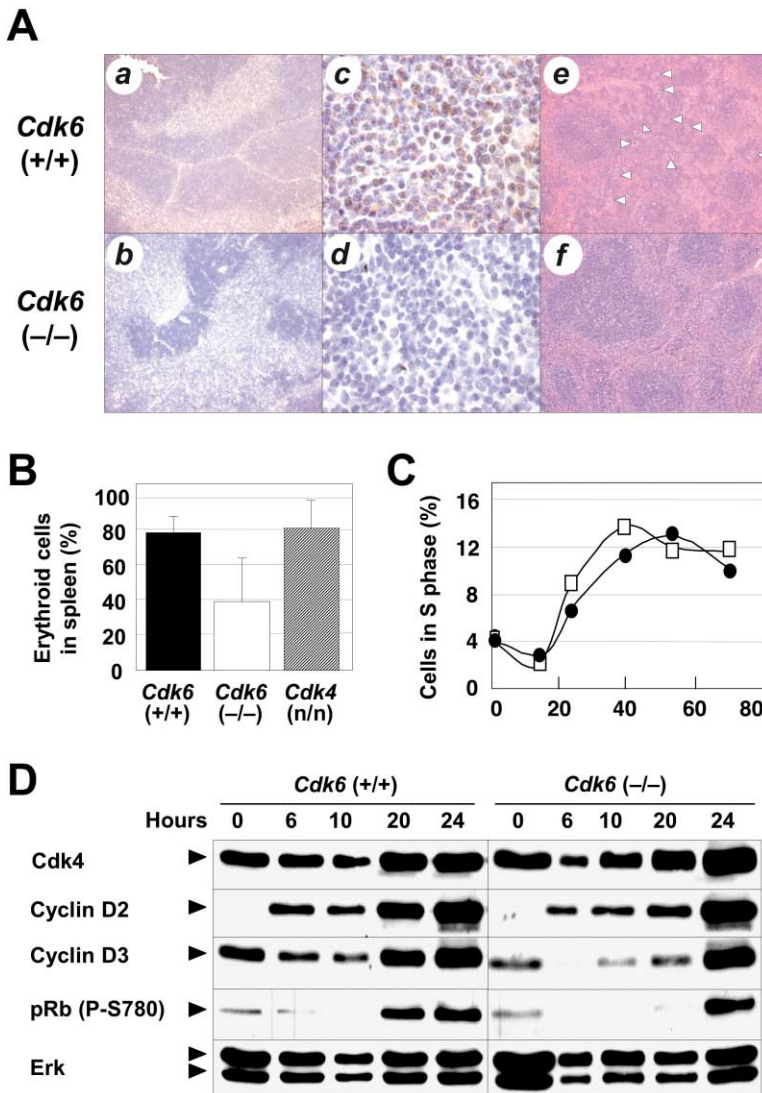


Figure 2. Hematopoietic Defects in *Cdk6*<sup>-/-</sup> Mice

(A) Immunohistochemical identification of Cdk6 in thymus from (a and c) wild-type and (b and d) and *Cdk6*<sup>-/-</sup> mice. Representative sections of (e) wild-type and (f) *Cdk6*<sup>-/-</sup> spleens showing a defect in the red pulp of *Cdk6*-null mice. Arrowheads indicate megakaryocytes. (a, b, e, and f) 100 $\times$ ; (c and d) 630 $\times$ .

(B) Percentage of erythroid cells in the spleen of (filled column) *Cdk6*<sup>+/+</sup>, (open column) *Cdk6*<sup>-/-</sup>, and (hatched column) *Cdk4*<sup>n/n</sup> mice. (C) Percentage of (open squares) *Cdk6*<sup>+/+</sup> and (filled circles) *Cdk6*<sup>-/-</sup> lymphocytes in S phase at the indicated times after stimulation with PMA + Ionomycin.

(D) Expression of cell cycle regulators in lymphocytes from *Cdk6*<sup>+/+</sup> and *Cdk6*<sup>-/-</sup> mice stimulated with PMA + Ionomycin. Cell extracts were analyzed by Western blot at the indicated times using antibodies against Cdk4, cyclin D2, cyclin D3, and Erk and against a phosphorylated serine residue (Ser780) of pRb.

10<sup>8</sup> cells in wild-type littermates, [n = 12]), and its cortical area was atrophic in about one third of the mutant animals (Figures 2Aa and 2Ab). The spleen of *Cdk6*<sup>-/-</sup> mice was also reduced in size due to decreased cellularity (1.8  $\pm$  0.4  $\times$  10<sup>8</sup> cells in mutant versus 3.0  $\pm$  0.5 cells in wild-type spleens, [n = 12]). Histological examination revealed normal white pulp but decreased cell density in the red pulp (Figures 2Ae and 2Af). Whereas in wild-type mice 70%–75% of all spleen cells belong to the erythroid lineage, these figures decreased to 35%–40% in *Cdk6*<sup>-/-</sup> littermates (Figure 2B). Similarly, the number of megakaryocytes was severely reduced to less than one third of those present in wild-type spleens (Figures 2Ae and 2Af).

Red cells in peripheral blood were also decreased in *Cdk6*-null mice by about 15%. This reduction, however, did not have major physiological consequences since *Cdk6*<sup>-/-</sup> mice had basically normal levels of hemoglobin in their blood. This compensatory effect is due to an increase in the volume of *Cdk6*<sup>-/-</sup> erythrocytes and a higher concentration of hemoglobin within red cells (data not shown). The number of granulocytes, macro-

phages, neutrophils, and platelets was also reduced in the peripheral blood of some, but not all mutant mice (data not shown). The reason for this variability remains to be determined.

*Cdk6*<sup>-/-</sup> mice did not display obvious deficiencies in the bone marrow. The medullary space of the femur was filled with densely cellular marrow interspersed with sinusoidal channels as in control mice. Erythroid, myeloid, and lymphoid lineages were represented without maturation gap (data not shown). Medullary fat was also present in the bone marrow of *Cdk6*<sup>-/-</sup> mice. These observations suggest that Cdk6 is required for expansion of certain differentiated compartments rather than for proliferation of early hematopoietic precursors.

#### Delayed S Phase Entry in *Cdk6*<sup>-/-</sup> Lymphocytes

No significant deficiencies were observed in the number of peripheral lymphocytes in *Cdk6*<sup>-/-</sup> mice. Moreover, B cells and T cells were present at the expected ratios (data not shown). Within thymic T cells, however, there was a slight but consistent increase of CD4 (from 24.5% to 30.6%) and CD8 (from 7.4% to 13.2%) single positive

populations and a consequent decrease of immature double positive cells (from 67.8% to 56.0%). Since Cdk6 is thought to play a key role in the proliferative response of T cells upon mitogenic stimulation, we treated T cells from *Cdk6*<sup>-/-</sup> mice and control littermates with PMA and ionomycin. Under these conditions, wild-type lymphocytes reached a peak of DNA synthesis in 36–40 hr after mitogenic stimulation. In contrast, the percentage of *Cdk6*<sup>-/-</sup> lymphocytes in S phase reached maximum levels at 54 hr after treatment (Figure 2C). Similar results were obtained after stimulation with anti-CD3, concanavalin A, or PHA (data not shown). Induction of cyclin D3 expression and, to a lesser extent, cyclin D2 expression were also found to be delayed (Figure 2D). Finally, pRb phosphorylation, a marker of Cdk6 kinase activity, was delayed 10 to 14 hr, at least as determined by phosphorylation of Ser780, a residue thought to be specific for D-type cyclin-dependent Cdks (Figure 2D). These observations provide genetic evidence for the concept that Cdk6 is a regulator of the proliferative response of T lymphocytes upon mitogenic stimuli. Moreover, they illustrate the existence of functional, albeit less efficient compensatory mechanisms that allow proliferation of resting T lymphocytes in the absence of Cdk6.

Unlike *Cdk6*<sup>-/-</sup> lymphocytes, primary (P2) *Cdk6*-null MEFs grew well in culture and did not display significant proliferative defects (not shown). In addition, serum-starved P2 *Cdk6*<sup>-/-</sup> MEFs entered S phase with normal kinetics upon serum stimulation. Finally, *Cdk6*<sup>-/-</sup> MEFs underwent cell culture crisis after a few passages and became immortal upon continuous passage with efficiencies similar to those of wild-type MEFs.

#### Absence of Synergism between Cdk6 and Cdk2 Deficiencies

Next, we investigated whether concomitant loss of Cdk6 and Cdk2 may have synergistic effects. Double *Cdk6*<sup>+/-</sup>; *Cdk2*<sup>+/-</sup> heterozygous mice developed normally. Moreover, crosses between these mice yielded all possible genotypes at the expected Mendelian ratios. Mice defective for Cdk6 and Cdk2 display those phenotypical abnormalities previously observed in Cdk2 and Cdk6 single mutants (Ortega et al., 2003; this study). Briefly, *Cdk6*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>-/-</sup> animals are sterile and show marked defects in spermatogenesis and oogenesis, basically indistinguishable to those reported for Cdk2-deficient mice (Ortega et al., 2003). They have limited defects in hematopoietic cells similar to those described above for Cdk6-null mice. Cdk2 and Cdk6 double mutant animals have reduced weight due to a decrease in size similar to that observed in Cdk6 and Cdk2 single mutants. Finally, *Cdk6*<sup>-/-</sup>; *Cdk2*<sup>-/-</sup> animals survive for up to 1.5 years without developing any obvious additional abnormalities.

#### Late Embryonic Lethality of *Cdk4*; *Cdk6* Double Mutant Mice

To obtain mice without functional cyclin D-dependent kinases, we crossed *Cdk6*<sup>-/-</sup> mice with animals heterozygous for a *Cdk4*-null allele, *Cdk4*<sup>+/-</sup> (Rane et al., 1999). Double heterozygous *Cdk4*<sup>+/-</sup>; *Cdk6*<sup>+/-</sup> mice developed

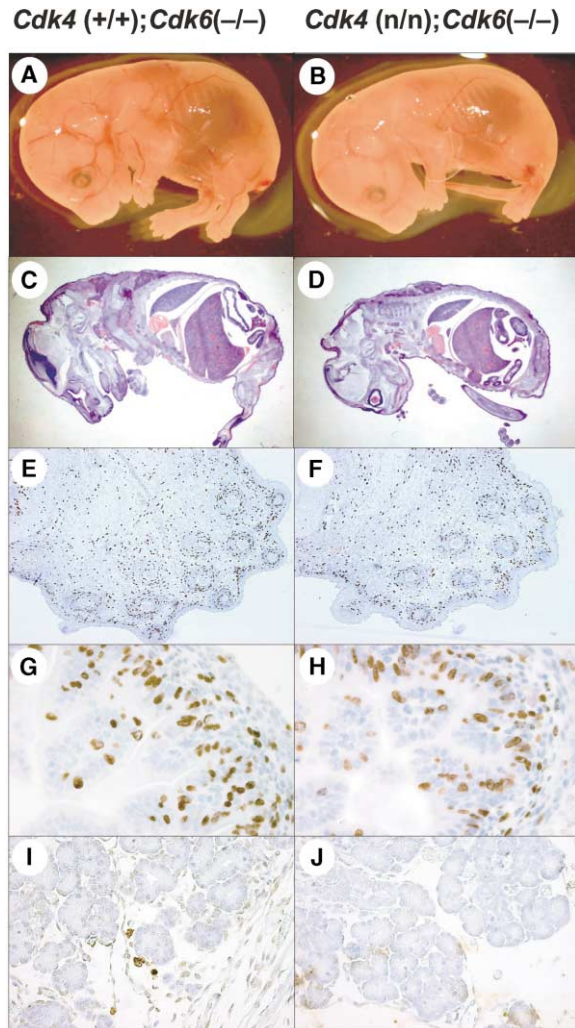


Figure 3. Characterization of Cdk4 and Cdk6 Double Mutant Embryos

E16.5 embryos deficient in (A, C, E, G, and I) Cdk6 or (B, D, F, H, and J) both Cdk4 and Cdk6 display normal organogenesis and cell proliferation in most tissues. (A and B) Wholemount preparation under the binocular microscope; (C and D) Hematoxylin and eosin staining of a sagittal section of the above embryos (16 $\times$ ); BrdU incorporation in (E and F) the skin and whisker follicles (100 $\times$ ) and (G and H) in the intestine (400 $\times$ ); and (I and J) TUNEL assay in the pancreas (100 $\times$ ).

normally and were indistinguishable from wild-type littermates. Crosses between these mice yielded the expected ratio of double heterozygous and *Cdk4*<sup>+/-</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup> animals. However, *Cdk4*<sup>n/n</sup>; *Cdk6*<sup>+/-</sup> mice were born at about one fourth the expected ratio and, so far, we have not obtained any live *Cdk4*<sup>n/n</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup> pups.

To determine the reasons for the lack of viability of *Cdk4*<sup>n/n</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup> double knockout mice, embryos derived from crosses between *Cdk4*<sup>+/-</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup> mice were collected at various stages of development, ranging from embryonic stages 10.5 to 18.5 (E10.5 to E18.5). E10.5–E12.5 *Cdk4*<sup>n/n</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup> embryos were generated at the expected Mendelian ratio. The number of E14.5–E18.5 embryos was also normal. However, a significant percentage of them were found dead whereas all *Cdk4*<sup>+/-</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup> embryos were alive. The percentage

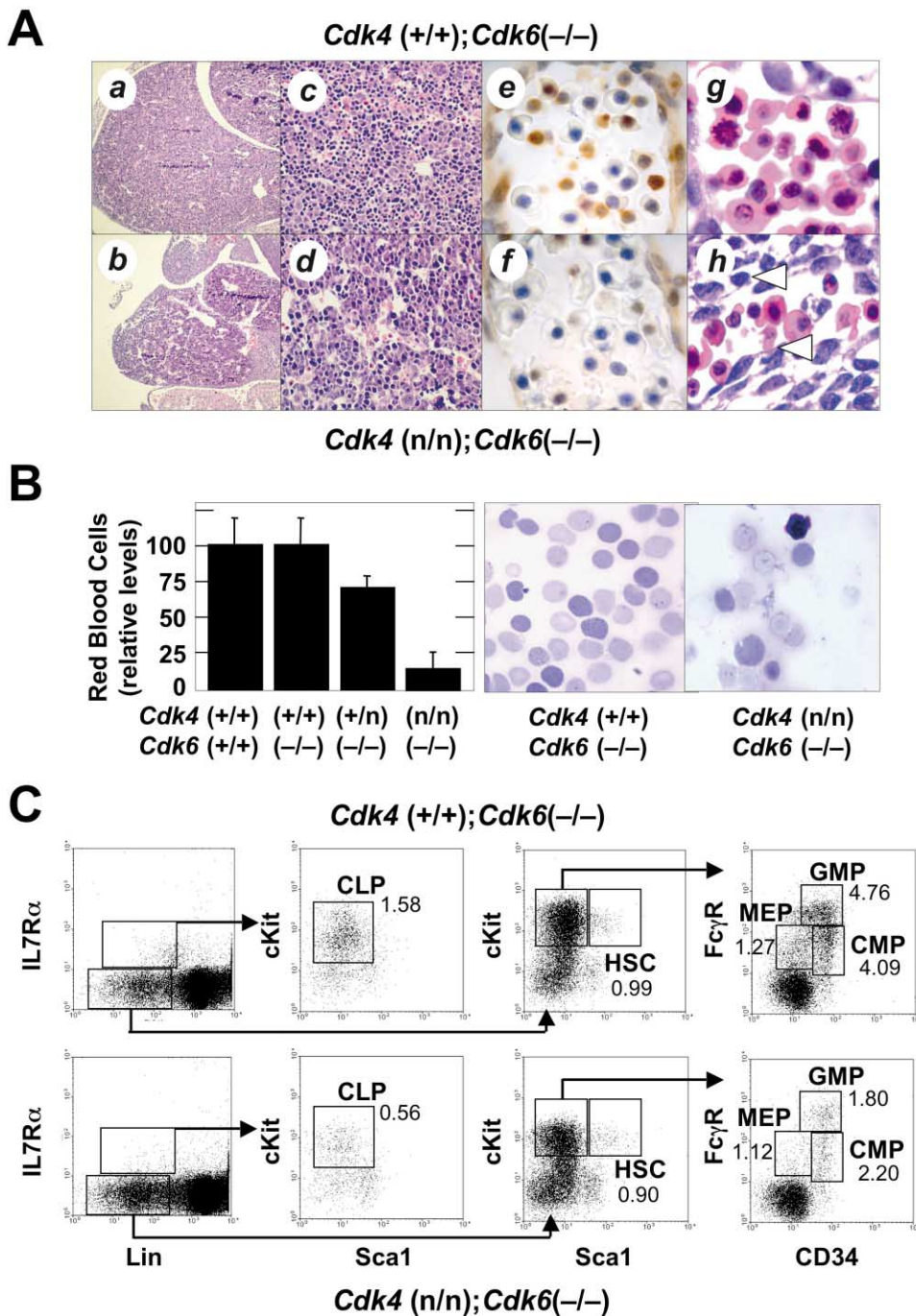


Figure 4. Defective Hematopoiesis in *Cdk4<sup>n/n</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup>* Double Mutant Embryos

(A) E16.5 (a, c, e, g, and i) *Cdk4<sup>+/+</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup>* and (b, d, f, h, and j) *Cdk4<sup>n/n</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup>* embryos. Liver sections stained with H&E (a and b) 50 $\times$ ; (c and d) 200 $\times$ . (e and f) Ki67 staining of erythroblasts (1000 $\times$ ); (g and h) blood cells stained with H&E (1000 $\times$ ) showing occasional apoptosis in *Cdk4<sup>n/n</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup>* erythroblasts (arrowheads).

(B) Relative levels of red blood cells in E16.5 embryos of the indicated genotypes. Representative Wright-Giemsa staining of peripheral blood smears is also shown (1000 $\times$ ).

(C) Staining for hematopoietic stem cells (HSC), common lymphoid progenitors (CLP), common myeloid progenitors (CMP), granulocyte-macrophage progenitors (GMP), and megakaryocyte-erythroid progenitors (MEP) in fetal liver. The relative percentage of selected cell populations in (top) *Cdk4<sup>+/+</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup>* and (bottom) *Cdk4<sup>n/n</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup>* embryos is shown.

of dead embryos increased with developmental stage. Whereas at E14.5, only 25% of the *Cdk4<sup>n/n</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup>* embryos were found dead, this percentage increased to 50% at E18.5. A few *Cdk4<sup>n/n</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup>* pups were born.

However, all of them were dead when observed a few hours after delivery.

Histological examination of these double null embryos and their corresponding placentas revealed that they

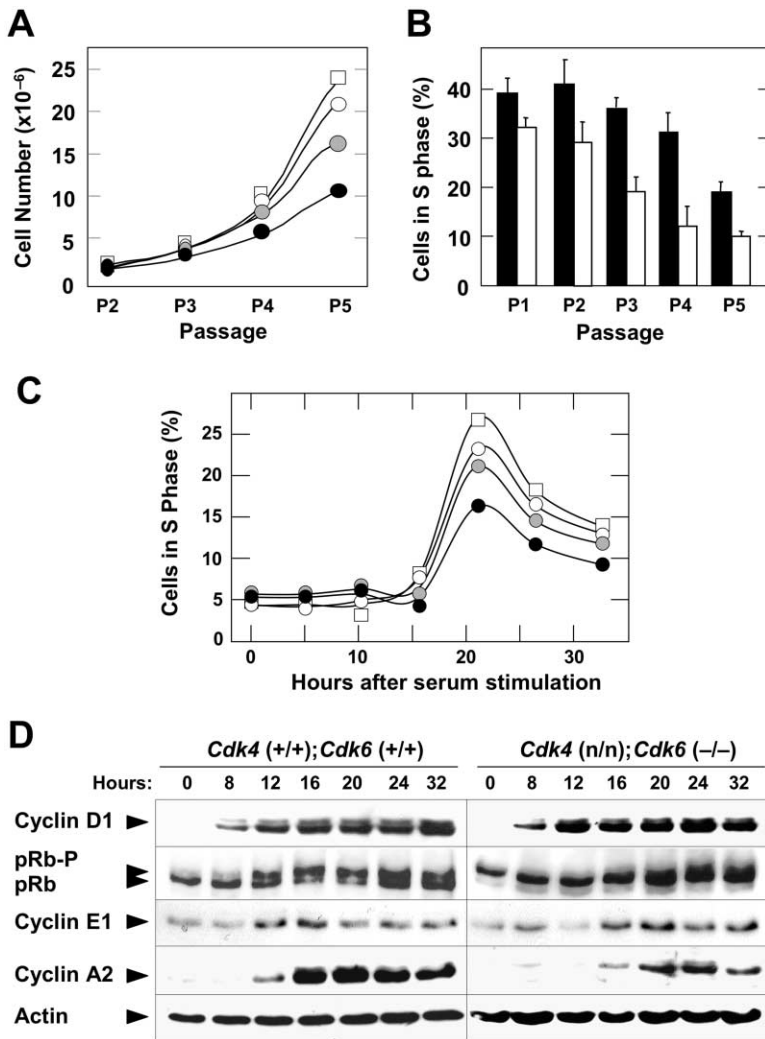


Figure 5. Cell Proliferation in MEFs Lacking Cdk4 and Cdk6

(A) Proliferation of early passage (P2–P5) MEFs derived from (open squares) *Cdk4*<sup>+/+</sup>; *Cdk6*<sup>+/+</sup>; (open circles) *Cdk4*<sup>+/+</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup>; (gray circles) *Cdk4*<sup>n/n</sup>; *Cdk6*<sup>+/+</sup>; and (filled circles) *Cdk4*<sup>n/n</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup> embryos.

(B) Percentage of (filled columns) *Cdk4*<sup>+/+</sup>; *Cdk6*<sup>+/+</sup> and (open columns) *Cdk4*<sup>n/n</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup> MEFs in S phase at the indicated passages (P1 to P5).

(C) Percentage of quiescent MEFs in S phase at the indicated times after serum stimulation. Symbols are those described in (A).

(D) Levels of cyclin D1, phosphorylated and unphosphorylated pRb, cyclin E, cyclin A, and  $\beta$ -actin proteins at the indicated times after serum stimulation of quiescent MEFs derived from *Cdk4*<sup>+/+</sup>; *Cdk6*<sup>+/+</sup> or *Cdk4*<sup>n/n</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup> embryos.

were well formed and did not present significant abnormalities, except for a consistent reduction in size (about 15% to 20%; Figures 3A–3D). All tissues examined displayed normal levels of Ki67-positive cells (not shown) and BrdU incorporation (Figures 3E–3H). Similarly, these double knockout embryos had normal levels of apoptotic cells in all tissues examined (Figures 3I and 3J). However, starting at developmental stage E14.5, we consistently observed a percentage of dead embryos. E14.5 to E18.5 *Cdk4*<sup>n/n</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup> embryos had structurally aberrant livers that contained decreased levels (40 to 60%) of Ter119<sup>+</sup> erythroid precursors (Figures 4Aa–4Ad). This atrophy was associated with dilated and less populated blood vessels. Moreover, less than 2% of these mutant erythroid progenitor cells (erythroblasts) were in a proliferative stage whereas in wild-type or single mutant embryos, 20%–50% of their erythroblasts displayed mitotic figures and were positive for Ki67 (Figures 4Ae and 4Af). We also observed occasional apoptotic figures in erythroblasts of *Cdk4*<sup>n/n</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup> mice but not in littermates with other genotypes (Figures 4Ag and 4Ah).

Analysis of peripheral blood in E16.5–E18.5 *Cdk4*<sup>n/n</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup> embryos revealed a dramatic decrease in the

number of red blood cells (Figure 4B). Moreover, these cells depicted a megaloblastic feature typically seen in anemia caused by impaired division of erythroid precursors (Figure 4B). These findings suggest that *Cdk4*<sup>n/n</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup> embryos die during the late stages of embryonic development due to limited proliferation of erythroid progenitors. Interestingly, this phenotype is highly reminiscent of the profound anemia described in embryos deficient for cyclin D2 and cyclin D3, the two D-type cyclins known to be expressed in hematopoietic cells (Ciemerych et al., 2002).

To understand the origin of these hematopoietic abnormalities, we analyzed different hematopoietic stem cells (HSC) and progenitors in fetal livers. By E15.5, *Cdk4*<sup>n/n</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup> livers display a significant reduction in cellularity ( $7.1 \times 10^6$  cells versus  $20\text{--}22 \times 10^6$  cells in *Cdk4*<sup>+/+</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup> and wild-type livers). The relative levels of double mutant HSCs were not reduced although their absolute numbers were decreased due to the lower cellularity of the mutant livers (Figure 4C). However, the levels of other Cdk4/6-null lineage-committed progenitors, such as common lymphoid progenitors (CLP), common myeloid progenitors (CMP), and granulocyte-macrophage progenitors (GMP), were reduced beyond those

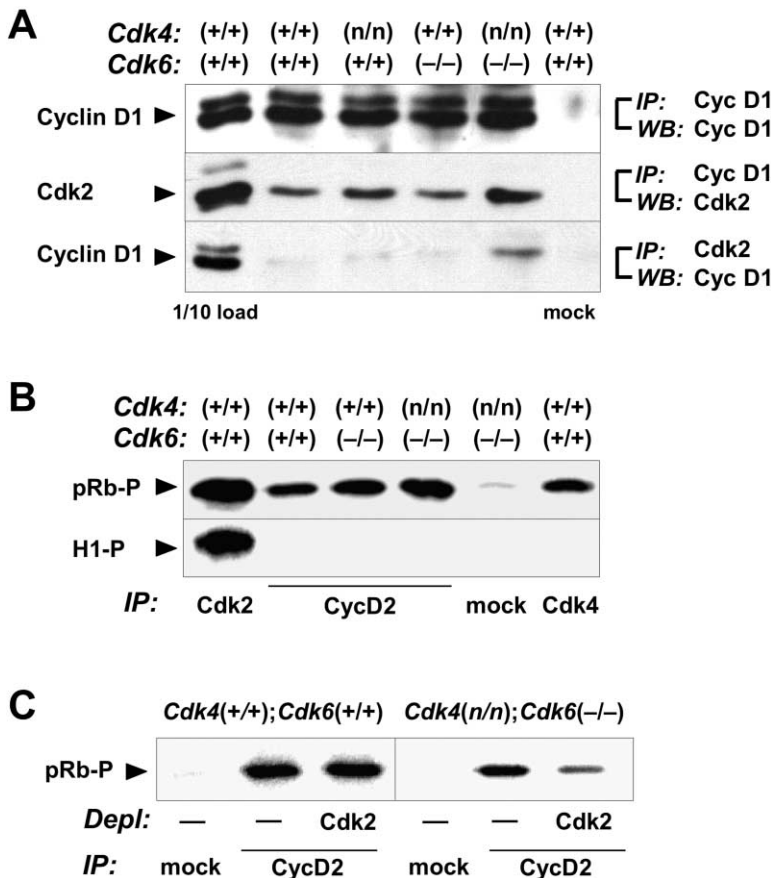


Figure 6. D-Type Cyclin/Cdk Complexes in MEFs Lacking Cdk4 and Cdk6

(A) Identification of cyclin D1/Cdk2 complexes in MEFs derived from embryos with the indicated genotypes. The migration of cyclin D1 and Cdk2 is indicated by arrowheads. One tenth of the total cell extract used for immunoprecipitation was loaded as a control. Another control using an unrelated antibody for immunoprecipitation is also included (mock).

(B) In vitro kinase activity of cyclin D2/Cdk2 immunoprecipitates obtained from *Cdk4*<sup>+/+</sup>; *Cdk6*<sup>+/+</sup>, *Cdk4*<sup>+/+</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup>, and *Cdk4*<sup>n/n</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup> MEFs using a fragment of pRb and histone H1 as substrates. Kinase activity of immunoprecipitates obtained from wild-type MEFs with antisera raised against Cdk2 and Cdk4 are included as controls.

(C) In vitro kinase activity in cyclin D2 immunoprecipitates from MEFs derived from *Cdk4*<sup>+/+</sup>; *Cdk6*<sup>+/+</sup> and *Cdk4*<sup>n/n</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup> embryos after immunodepletion of Cdk2 with anti-Cdk2 antibodies. IP, immunoprecipitation; WB, Western blot; Depl., immunodepletion. Mock indicates immunoprecipitation with an unrelated antibody.

levels expected from the decreased cellularity (Figure 4C). Indeed, the absolute numbers of double mutant CLPs, CMPs, and GMPs were around 15% of those of control livers. Accordingly, the numbers of more mature hematopoietic cells such as monocytes, macrophages, or lymphocytes were also reduced (data not shown). Surprisingly, the reduction of double mutant megakaryocyte-erythroid progenitors (MEP) was less severe (about 40% of controls). Whether this is due to a feedback mechanism that favors the formation of these intermediate precursors in an attempt to compensate for the anemia observed in these double mutant embryos remains to be determined. Finally, a dramatic defect in the proliferative potential of all these precursors was observed using fetal liver cell preparations for functional colony formation assays in methylcellulose. The number of colony-forming units for granulocytes, macrophages, mixed granulocytes/macrophages, and mixed granulocytes/macrophages/erythrocytes/megakaryocytes was severely reduced in *Cdk4*<sup>n/n</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup> livers (less than 5% of controls), whereas the number of erythroid burst-forming units was about 10% of control livers.

#### MEFs Cycle and Exit Quiescence without Cdk4 and Cdk6

Early passage *Cdk4*<sup>n/n</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup> MEFs proliferate well albeit at a slower rate than control cells (Figure 5A). Whereas the doubling time of P2 double mutant MEFs was similar to that of wild-type MEFs (about 28 hr), P4

*Cdk4*<sup>n/n</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup> MEFs required a considerably longer time for cell doubling (72 versus 52 hr). Moreover, the percentage of *Cdk4*<sup>n/n</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup> MEFs progressing through S phase dropped from 28% at P2 to 14% at P4, a drop not observed in wild-type MEFs (39% versus 36%) (Figure 5B). Finally, at P4–P5, a time when control cells were still proliferating actively, double mutant MEFs begin to display features of senescent cells. Yet, all *Cdk4*<sup>n/n</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup> MEFs became immortalized upon continuous passage in culture following a classical 3T3 protocol. For reasons unknown to us, the timing at which these cultures became immortal varied significantly from embryo to embryo. In addition, *Cdk4*<sup>n/n</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup> MEFs were also able to proliferate in low serum conditions (2%–5% fetal calf serum) and respond to mitogenic stimuli induced by addition of EGF and IGF-1. However, the rate of proliferation was consistently lower than that observed in control cultures (data not shown). These observations, taken together, indicate that D-type cyclin-dependent kinases are required but not essential for proliferation of embryonic fibroblasts.

Since Cdk4 and Cdk6 complexes have been proposed to be the major sensors for integrating mitogenic signaling during exit from quiescence, we analyzed the response of quiescent *Cdk4*<sup>n/n</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup> MEFs to serum stimulation. As illustrated in Figure 5C, serum-starved P2 *Cdk4*<sup>n/n</sup>; *Cdk6*<sup>-/-</sup> MEFs enter S phase with kinetics similar to those of wild-type MEFs. However, the percentage of cells progressing through the S phase at a given time was only half of that in normal MEFs (Figure



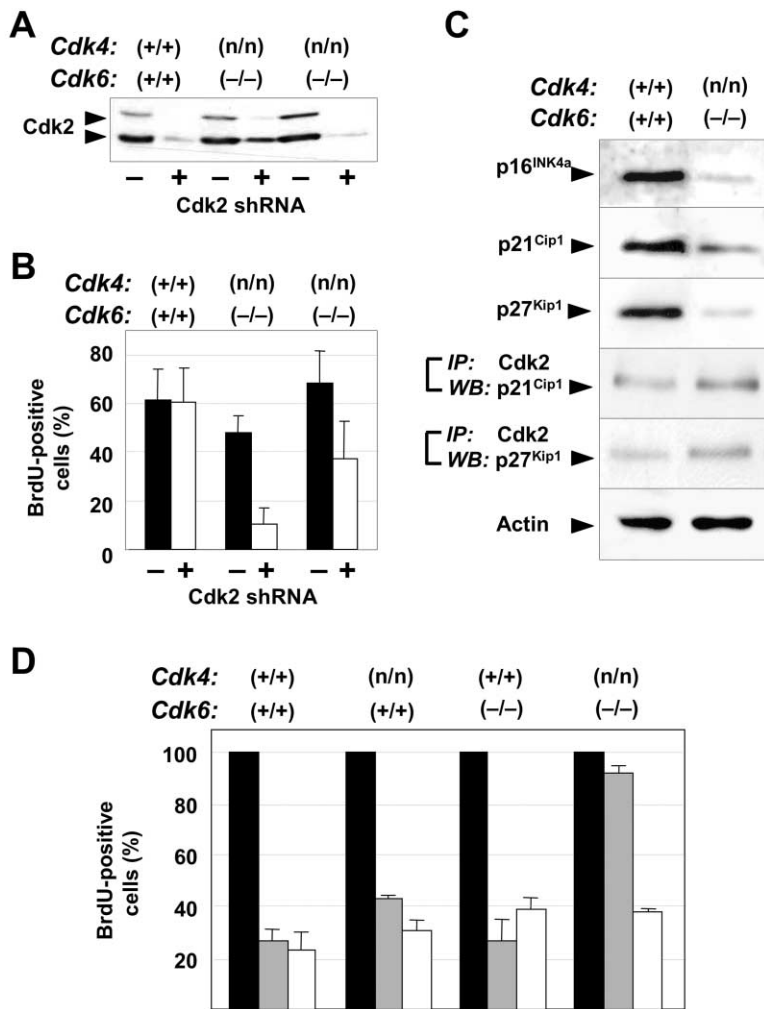


Figure 7. Cell Cycle Arrest by Cdk2 Interference or Cell Cycle Inhibitors in Cdk4/Cdk6-Deficient MEFs

(A) Empty retroviruses (-) or retroviruses expressing a shRNA against Cdk2 (+) were used to infect wild-type or two independent Cdk4 and Cdk6 double mutant MEFs. The migration of the long and short forms of Cdk2 is indicated by arrowheads.

(B) BrdU incorporation in wild-type or Cdk4 and Cdk6 double mutant MEFs infected with (filled columns) empty (-) or (open columns) Cdk2 shRNA (+) retroviruses.

(C) Levels of expression of p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>Cip1</sup>, and p27<sup>Kip1</sup> cell cycle inhibitors in Cdk4<sup>+/+</sup>; Cdk6<sup>+/+</sup> and Cdk4<sup>n/n</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup> MEFs. The levels of p21<sup>Cip1</sup> and p27<sup>Kip1</sup> complexed with Cdk2 were also determined by immunoprecipitation of Cdk2 with specific antibodies. The migration of these inhibitors and control actin protein is indicated by arrowheads.

(D) Relative levels of BrdU incorporation in MEFs with the indicated genotypes after infection with retroviruses encoding (gray columns) p16<sup>INK4a</sup> or (open columns) p21<sup>Cip1</sup> inhibitors with respect to MEFs infected with (filled columns) the retroviral vector alone.

5C). Moreover, primary Cdk4<sup>n/n</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup> MEFs displayed a delay in overall pRb phosphorylation (Figure 5D) as well as in phosphorylation of specific residues such as Ser780 and Ser807/811 (not shown). In agreement with these observations, expression of cyclin E and cyclin A was concomitantly delayed (about 4 hr) in these double mutant MEFs (Figure 5D).

Ablation of Cdk4 and Cdk6 does not affect the expression of D-type cyclins (Figure 5D). Therefore, we examined whether these cyclins could be bound to other partners in the absence of their cognate kinases. Indeed, previous studies have shown that a fraction of cyclin D1 is bound to Cdk2, at least in certain cells (Matsushime et al., 1992; Xiong et al., 1992; Lukas et al., 1995). As illustrated in Figure 6A, D-type cyclins can complex with Cdk2 in wild-type MEFs. These complexes appear to be more abundant in Cdk4<sup>n/n</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup> mutant MEFs. To analyze whether these D-type cyclin/Cdk2 complexes had kinase activity, we immunoprecipitated protein lysates derived from double mutant MEFs with anti-cyclin D2 antibodies (Figure 6B). These immunoprecipitates phosphorylated pRb but not histone H1, a phosphorylation pattern characteristic of D-type cyclin/Cdk4 and Cdk6 complexes. As expected, control Cdk2 immunoprecipitates phosphorylated both pRb and histone H1

(Figure 6B). In Cdk4<sup>n/n</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup> mutant MEFs, pRb kinase activity by cyclin D immunoprecipitates is at least partially due to Cdk2 since immunodepletion with Cdk2 antibodies decreased the levels of pRb phosphorylation (Figure 6C).

To further analyze the possible role of Cdk2 in the proliferation of Cdk4<sup>n/n</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup> MEFs, we infected wild-type and double mutant cells with retroviruses encoding a shRNA against Cdk2. These viruses reduced the amount of Cdk2 protein by 70%–90% (Figure 7A). As illustrated in Figure 7B, Cdk2 shRNA did not affect proliferation of wild-type cells but produced a significant decrease in the rate of BrdU incorporation in Cdk4<sup>n/n</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup> MEFs. These observations suggest that in the absence of Cdk4 and Cdk6, Cdk2 associates with D-type cyclins inducing pRb phosphorylation and cell proliferation.

We have also examined the levels of Cdk inhibitors in cells lacking Cdk4 and Cdk6. As shown in Figure 7C, Cdk4<sup>n/n</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup> MEFs have reduced levels of p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>Cip1</sup>, and p27<sup>Kip1</sup> inhibitors. These observations could be due to decreased protein stability or to a feedback mechanism that reduces the overall levels of cell cycle inhibitors in the absence of Cdk4 and Cdk6. To distinguish between these two possibilities, we analyzed the

levels of p21<sup>Cip1</sup> and p27<sup>Kip1</sup> bound to Cdk2. As illustrated in Figure 7C, Cdk2 immunoprecipitates contained the same levels of these inhibitors as in control MEFs, suggesting that the differences observed in their overall levels are due to the fraction bound to Cdk4 and Cdk6, which is missing in these double mutant cells.

Finally, we investigated whether *Cdk4<sup>n/n</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup>* cells were still sensitive to the inhibitory properties of p16<sup>INK4a</sup> and p21<sup>Cip1</sup>. To this end, we infected wild-type, *Cdk4<sup>n/n</sup>;Cdk6<sup>+/+</sup>*, *Cdk4<sup>+/+</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup>*, and *Cdk4<sup>n/n</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup>* mutant MEFs with retroviruses encoding either p16<sup>INK4a</sup> or p21<sup>Cip1</sup>. Whereas p16<sup>INK4a</sup> strongly inhibited DNA replication (measured as BrdU incorporation) in 60%–80% of wild-type and single mutant MEFs, it failed to block cell cycle progression in *Cdk4<sup>n/n</sup>;Cdk6<sup>-/-</sup>* double mutant cells (Figure 7D). In contrast, p21<sup>Cip1</sup> was able to block BrdU incorporation in all cells. These observations provide genetic evidence for the specificity of p16<sup>INK4a</sup> in the inhibition of D-type cyclin-dependent kinases, Cdk4 and Cdk6.

## Discussion

Cdk4 and Cdk6 are closely related proteins with basically indistinguishable biochemical properties. Thus, the specific roles of these catalytic subunits are most likely determined by their differential patterns of expression. Since Cdk6 is preferentially expressed in hematopoietic cells, it has been proposed as the kinase that initiates pRB phosphorylation in T lymphocytes (Meyerson and Harlow, 1994). Likewise, the differential expression of Cdk4 and Cdk6 has led to the proposal that they regulate cell division at different stages of erythroid maturation (Matushansky et al., 2000). In MEL erythroleukemia cells—transformed erythroid precursor cells blocked at the proerythroblast stage—differentiation requires inhibition of Cdk6 but not of Cdk4 (Matushansky et al., 2000). Accordingly, erythropoietin-dependent terminal differentiation of primary erythroblasts correlates with an early decline of Cdk6 activity followed by a later decline in Cdk4 activity (reviewed in Steinman [2002]).

Our observations indicating that loss of Cdk6 primarily affects the hematopoietic system are, for the most part, in agreement with these observations. For instance, loss of Cdk6 leads to delayed G1 progression in lymphocytes but not in MEFs. In vivo, Cdk6 deficiency results in lower cellularity in hematopoietic tissues such as thymus and spleen. Peripheral blood of Cdk6-deficient mice also had reduced numbers of red blood cells. These observations suggest that Cdk6 is required for expansion of differentiated populations rather than for proliferation of early hematopoietic precursors. Whereas these observations underscore the need of Cdk6 for proper hematopoietic homeostasis, they also indicate that Cdk6 is not essential for proliferation of any specific cell lineage.

Previous genetic studies in *C. elegans* and *D. melanogaster* cyclin D-Cdk4 homologs have shown that these proteins are primarily involved in the regulation of post-embryonic growth in specific cell types since ablation of the corresponding genes is compatible with embryonic development (Park and Krause, 1999; Meyer et al., 2000). In contrast, mice lacking Cdk4 and Cdk6 are not viable. Yet, these embryos die during the late stages of embry-

onic development and display normal cell proliferation and apoptosis in most cell types. Instead, the main defects observed in these double mutant embryos are limited to the compromised maturation of different hematopoietic lineages and severely reduced numbers (about 15% of normal levels) of circulating red blood cells. These defects, which lead to severe anemic conditions, are most likely to be responsible for the death of these double mutant embryos. These observations, taken together, indicate that D-type cyclin-dependent kinases are not essential for proliferation of most cell types, at least during embryonic development. Since these proteins are thought to play a key role in bringing quiescent cells back to the cycle upon mitogenic stimuli, it could be argued that during embryonic development, cells do not withdraw from the cycle or, if they do, they withdraw to a resting state fundamentally distinct from the quiescence state characteristic of nonproliferating adult cells.

These arguments, however, cannot be substantiated by in vitro studies. Cdk4- and Cdk6-deficient MEFs proliferate well, undergo senescence, and become immortal upon continuous passage in a fashion very similar to wild-type MEFs. More importantly, these mutant MEFs become quiescent upon serum withdrawal and re-enter the cycle upon mitogenic stimulation with normal kinetics. Interestingly, these cells display reduced levels of pRb phosphorylation and delayed expression of cyclins E and A, the activating partners of Cdk2. These observations argue against the commonly accepted hypothesis that couples activation of Cdk2 with the start of DNA synthesis. Moreover, they also challenge the widely held concept that full pRb phosphorylation by both Cdk4/6 and Cdk2 kinases is required for proper G1/S transition (Lundberg and Weinberg, 1998; Harbour et al., 1999). Additional studies involving a more detailed characterization of pRb and other transcriptional regulators in these Cdk4/Cdk6 double mutant MEFs will be required to understand the precise role of D-type cyclin/Cdk complexes in cell cycle progression.

Our results establish that D-type-dependent Cdk4 and Cdk6 are not essential for exit from quiescence or for cell cycle progression. Yet, the percentage of MEFs lacking Cdk4 and Cdk6 that re-enter the cycle at a given time upon serum stimulation is about half of those expressing one or both Cdks. Thus, whatever mechanisms may be responsible for compensating the lack of these Cdks are not as efficient in rescuing cells from quiescence. A molecule possibly responsible for this compensatory activity is Cdk2. In agreement with previous reports (Matsushime et al., 1992; Xiong et al., 1992; Meyerson and Harlow, 1994; Lukas et al., 1995; Sweeney et al., 1997), we have observed the association of Cdk2 with D-type cyclins. These complexes are more abundant in the absence of Cdk4 and Cdk6 and, more importantly, have pRb kinase activity. The specificity of this kinase corresponds to that of D-type cyclin/Cdk4 or Cdk6 rather than to E-type cyclin/Cdk2 complexes, an observation consistent with the concept that substrate specificity of Cdks is primarily determined by their partner cyclins (Pavletich, 1999). Moreover shRNA specific for *Cdk2* inhibits proliferation of double mutant but not wild-type MEFs. These results implicate Cdk2 in the proliferation of Cdk4- and Cdk6-deficient cells. However, our observations do not prove that Cdk2 fully compensates

the lack of these Cdks since other kinases might be present in cyclin D immunoprecipitates. Likewise, the used Cdk2 shRNA may also affect expression of other related proteins. In an attempt to resolve this issue, we have undertaken the task of generating triple Cdk4, Cdk6, Cdk2 knockout mice. Unfortunately, loci encoding Cdk4 and Cdk2 map too closely within the mouse genome to allow *in vivo* recombination at acceptable frequency. Thus, generation of triple recombinant mice requires targeting the *Cdk4* locus within a Cdk2-null background.

Regardless of the outcome of these results, it is unlikely that Cdk2 is sufficient to compensate for the absence of Cdk4 and Cdk6, at least by a mechanism involving interaction with D-type cyclins. In an accompanying manuscript, Sicinski and coworkers (Kozar et al., 2004 [this issue of *Cell*]) report that MEFs lacking the three D-type cyclins grow well in culture and can be rescued from quiescence by mitogenic stimulation with kinetics similar to those observed in Cdk4/Cdk6-deficient MEFs. Thus, it is unlikely that whatever mechanisms are responsible for compensating the lack of Cdk4 and Cdk6 involve D-type cyclins. However, D-type cyclins deficient mice die a couple of days earlier than those lacking their cognate Cdk4 and Cdk6 catalytic subunits. Whereas these subtle differences might be due, at least in part, to different genetic backgrounds, it is also possible that the limited kinase activity provided by D-type cyclin/Cdk2 complexes in Cdk4/Cdk6-null cells may account for the longer life span of the Cdk4/Cdk6 double mutant embryos.

It has recently been reported that Cdk3/cyclin C complexes promote G0/G1 transition in a pRb-dependent manner in several different human cell lines (Ren and Rollins, 2004). This kinase, however, is not active in most laboratory mouse strains (Ye et al., 2001), including those used in this study (our unpublished observations). Therefore, Cdk3 cannot contribute to the observed levels of cell proliferation in the absence of Cdk4 and Cdk6. Whether loss of these kinases in a strain that carries a functional Cdk3 may display a less severe phenotype remains to be determined.

Taken together, our studies, along with those of Kozar et al. (2004), challenge the concept that D-type cyclin/Cdk4 and Cdk6 complexes are the only sensors of mitogenic signaling to rescue cells from quiescence. These findings are reminiscent of recent observations that Cdk2 (Ortega et al., 2003; Berthet et al., 2003) and E-type cyclins (Geng et al., 2003; Parisi et al., 2003) are also dispensable for mitotic cell division. Conditional Cdk4/Cdk6 double mutant mice or triple cyclin D mutant animals will provide additional tools to dissect the role of D-type cyclin/Cdk kinases in mammalian postnatal development and adult homeostasis.

## Experimental Procedures

### Gene Targeting of *Cdk6*

Mouse *Cdk6* cDNAs and genomic sequences were cloned by plate hybridizations from a mouse testis cDNA library and a lambda genomic library, respectively. For excision of the first exon of *Cdk6*, which contains the PLSTIRE sequences, we subcloned upstream and downstream genomic fragments in the pPNT vector (Tybulewicz et al., 1991) (Figure 1). The resulting targeting vector, pMM450, was

linearized and electroporated into mouse R1 ES cells, and recombinant clones were selected in the presence of G418 and gancyclovir. Seven G418<sup>r</sup>/Gan<sup>r</sup> clones were identified by Southern hybridization using probes external to the targeting vector (Figure 1). Since the mouse genome contains several *Cdk6* genomic pseudogenes (data not shown), those recombinant clones (ESMM1-76 and ESMM1-332) used to generate chimeric mice were further characterized by sequencing of adjacent regions after long-template PCR amplification. These clones were aggregated to CD1 or microinjected into C57BL/6J blastocysts to generate chimeras. No significant differences have been observed between mice derived from these independent clones in 129 × CD1 or 129 × C57BL6/J genetic backgrounds. These heterozygous mice were intercrossed to generate mouse colonies in the 129 × CD1 background or backcrossed to generate a pure C57BL/6J colony. Most of the experiments described in this manuscript were carried out with animals in the 129 × CD1 background. Mice were maintained according to the animal care standards established by the European Union. Genotyping of Cdk6-null mice was carried out by PCR amplification using specific oligonucleotides for the normal or mutant allele (primer sequences are available from the authors upon request). Cdk4 and Cdk2 mutant mice were genotyped as previously described (Rane et al., 1999; Ortega et al., 2003).

### Histopathologic Analyses

Embryos or organs dissected from mice were fixed in 10%-buffered formalin (Sigma) and embedded in paraffin. Three or five micrometer-thick sections were stained with hematoxylin and eosin. Peripheral blood was obtained from the eye of 2- to 4-month-old mice or from carotid arteries of embryos. Blood smears were prepared using the wedge technique, followed by air-drying and Wright-Giemsa staining. Blood populations were quantified using a blood analyzer (Diatron Messtechnik, Wien) and a flow cytometer (see below).

### Immunohistochemistry and Cytometry

For proliferation studies, tissues or embryos were stained with Ki67-specific antibodies (Dako) or labeled with BrdU (Sigma). Pregnant females were injected intraperitoneally with BrdU at 100 μg/g of body weight and embryos and placentas were collected after 2 hr and fixed in formalin. Paraffin sections were stained with anti-BrdU antibody (Becton Dickinson), followed by detection with the Vectastain ABC kit (Vector Laboratories). Detection of apoptotic cells on tissue sections was carried out using the TUNEL assay (Apoptag Peroxidase, Intergen). Cell surface markers used to identify the specific hematopoietic populations in thymus, spleen, bone marrow, or peripheral blood include CD3, CD4, CD8, CD11B, CD25, CD34, CD44, CD69, IL-7, IgM, GR1, Ter119, B220, and F4/80 (Pharmingen). The hematopoietic progenitors in fetal liver were stained as previously described (Akashi et al., 2000; Traver et al., 2001). HSCs were identified as Lin<sup>-</sup> IL7Rα<sup>-</sup> c-Kit<sup>+</sup> Sca1<sup>+</sup>; CLPs as Lin<sup>-</sup> IL7Rα<sup>+</sup> c-Kit<sup>low</sup> Sca1<sup>low</sup>; CMPs as Lin<sup>-</sup> IL7Rα<sup>-</sup> c-Kit<sup>+</sup> Sca1<sup>-</sup> FcγR<sup>low</sup> CD34<sup>+</sup>; GMPs as Lin<sup>-</sup> IL7Rα<sup>-</sup> c-Kit<sup>+</sup> Sca1<sup>-</sup> FcγR<sup>hi</sup> CD34<sup>+</sup>; and MEPs as Lin<sup>-</sup> IL7Rα<sup>-</sup> c-Kit<sup>+</sup> Sca1<sup>-</sup> FcγR<sup>low</sup> CD34<sup>-</sup>. Their relative numbers were quantified by using Coulter (XL) or BD Biosciences cytometers.

### Cell Culture Assays

Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were isolated from E13.5 embryos and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2 mM glutamine, 1% penicillin/streptomycin, and 10% fetal bovine serum (FBS) or 10% calf serum (CS). MEFs were maintained in culture using a standard 3T3 protocol. Proliferation and immortalization assays were performed as previously described (Sotillo et al., 2001). To analyze S phase entry, passage 2 MEFs (10<sup>6</sup> cells per 10 cm dish) were deprived of serum for 48 hr in DMEM + 0.1% FBS and restimulated with 10% FBS to enter the cell cycle. DNA content was analyzed by flow cytometry after propidium iodide staining (Coulter XL or FACScan from Becton-Dickinson). Retroviral infection of primary MEFs was performed using pBabe-puro-p16<sup>INK4a</sup>, pBabe-puro-p21<sup>Cip1</sup>, or the empty vector. After infections, cells were selected in puromycin for 2 days and stained for BrdU incorporation after 12 hr in the presence of 50 μM BrdU. For *Cdk2* knockdown experiments, primary MEFs were infected with Cdk2-C, a retroviral construct expressing a shRNA against the

murine *Cdk2* (a gift of P. Sicinski). Primary lymphocytes were isolated from spleen or thymus of 3-month-old mice and cultured in RPMI + 10% FBS. For proliferation studies, T cells were stimulated with PMA and ionomycin, concanavalin A or PHA (Sigma), or anti-CD3 (Pharmingen), and cell cycle profiles analyzed by cytometry. For hematopoietic colony formation assays, fetal livers were collected from E15.5 embryos, and 2–6 × 10<sup>4</sup> cells were plated in duplicates in methylcellulose supplemented with stem cell factor, interleukin (IL)3, IL6, and erythropoietin (Stem Cell Technologies). Colonies were scored at day 12 as indicated by the manufacturer.

#### Protein Analysis

Protein lysates were isolated and used for protein analysis by immunoblotting as previously described (Sotillo et al., 2001). Antibodies against the following proteins were used: Cdk2, Cdk1, Cdk4, cyclin A, cyclin E, cyclin D2, p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>Cip1</sup>, Erk (all from Santa Cruz Biotechnology), cyclin D1, (Neo Markers), p27<sup>Kip1</sup> (Transduction Laboratories), β-actin (Sigma), P-Rb-S780, P-Rb-S795 and P-Rb807/811 (Cell Signaling), and P-Rb-T821 (Biosource International). For kinase assays, 1 μg of mouse pRb protein fragment (amino acids 769–921; Santa Cruz Biotechnology) and histone H1 from calf thymus (Roche Biochemicals) were used as substrates.

#### Acknowledgments

We thank C. Gómez, R. González, M. San Román, B. Velasco, and R. Villar for excellent technical assistance; E. Baeza, I. Moreno de Alborán y C. Martínez-A. (Centro Nacional de Biotecnología) for advice on immunology; and P. Sicinski (Harvard Medical School) for communicating unpublished data and for helpful discussions. The early phases of this work were carried out at the Centro Nacional de Biotecnología. We are indebted to M. Esteban and the rest of the Faculty for making their facilities available to us. This work was supported by grants from the Comunidad Autónoma de Madrid, Fundación Ramón Areces, Fundación La Caixa, and Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) to M.M. and from Fundación Pzifer, the V Framework Programme of the European Union, and the CICYT to M.B. P.D. was supported by the Association pour la Recherche contre le Cancer. The CNIO is partially supported by the Red de Centros de Cáncer (FIS C03/10).

Received: April 3, 2004

Revised: June 21, 2004

Accepted: June 28, 2004

Published: August 19, 2004

#### References

Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**, 193–197.

Amanatullah, D.F., Zafonte, B.T., Albanese, C., Fu, M., Messiers, C., Hassell, J., and Pestell, R.G. (2001). Ras regulation of cyclin D1 promoter. *Methods Enzymol.* **333**, 116–127.

Berthet, C., Aleem, E., Coppola, V., Tessarollo, L., and Kaldis, P. (2003). Cdk2 knockout mice are viable. *Curr. Biol.* **13**, 1775–1785.

Ciemerych, M.A., Kenney, A.M., Sicinska, E., Kalaszczynska, I., Bronson, R.T., Rowitch, D.H., Gardner, H., and Sicinski, P. (2002). Development of mice expressing a single D-type cyclin. *Genes Dev.* **16**, 3277–3289.

Classon, M., and Harlow, E. (2002). The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 910–917.

Fantl, V., Stamp, G., Andrews, A., Rosewell, I., and Dickson, C. (1995). Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development. *Genes Dev.* **9**, 2364–2372.

Geng, Y., Yu, Q., Sicinska, E., Das, M., Schneider, J.E., Bhattacharya, S., Rideout, W.M., Bronson, R.T., Gardner, H., and Sicinski, P. (2003). Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* **114**, 431–443.

Hanahan, D., and Weinberg, R. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70.

Harbour, J.W., and Dean, D.C. (2000). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* **14**, 2393–2409.

Harbour, J.W., Luo, R.X., Dei Santi, A., Postigo, A.A., and Dean, D.C. (1999). Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* **98**, 859–869.

Kozar, K., Ciemerych, M.A., Rebel, V.I., Shigematsu, H., Zagozdzon, A., Sicinska, E., Geng, Y., Yu, Q., and Bhattacharya, S., Bronson, R.T., Akashi, K., and Sicinski, P. (2004). Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* **118**, this issue, 477–491.

Lukas, J., Bartkova, J., Welcker, M., Petersen, O.W., Peters, G., Strauss, M., and Bartek, J. (1995). Cyclin D2 is a moderately oscillating nucleoprotein required for G1 phase progression in specific cell types. *Oncogene* **10**, 2125–2134.

Lundberg, A.S., and Weinberg, R.A. (1998). Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 753–761.

Malumbres, M., and Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 222–231.

Martín, J., Hunt, S.L., Dubus, P., Sotillo, R., Néhémé-Pélluard, F., Magnuson, M.A., Parlow, A.F., Malumbres, M., Ortega, S., and Barbacid, M. (2003). Genetic rescue of Cdk4 null mice restores pancreatic β-cell proliferation but not homeostatic cell number. *Oncogene* **22**, 5261–5269.

Matsushime, H., Ewen, M.E., Strom, D.K., Kato, J.K., Hanks, S.K., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1992). Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell* **71**, 323–334.

Matushansky, I., Radparvar, F., and Skoultchi, A.I. (2000). Reprogramming leukemic cells to terminal differentiation by inhibiting specific cyclin-dependent kinases in G1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 14317–14322.

Meyer, C.A., Jacobs, H.W., Datar, S.A., Du, W., Edgar, B.A., and Lehner, C.F. (2000). *Drosophila* Cdk4 is required for normal growth and is dispensable for cell cycle progression. *EMBO J.* **19**, 4533–4542.

Meyerson, M., and Harlow, E. (1994). Identification of G<sub>1</sub> kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2077–2086.

Meyerson, M., Enders, G., Wu, C.L., Su, L.K., Gorka, C., Nelson, C., Harlow, E., and Kato, J.Y. (1992). A family of human cdc2-related protein kinases. *EMBO J.* **11**, 2909–2917.

Moons, D.S., Jirawatnotai, S., Parlow, A.F., Gibori, G., Kineman, R.D., and Kiyokawa, H. (2002). Pituitary hypoplasia and lactotroph dysfunction in mice deficient for cyclin-dependent kinase-4. *Endocrinology* **143**, 3001–3008.

Morris, E.J., and Dyson, N.J. (2001). Retinoblastoma protein partners. *Adv. Cancer Res.* **82**, 1–54.

Ortega, S., Prieto, I., Odajima, J., Martín, A., Dubus, P., Sotillo, R., Barbero, J.L., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat. Genet.* **35**, 25–31.

Parisi, T., Beck, A.R., Rougier, N., McNeil, T., Lucian, L., Werb, Z., and Amati, B. (2003). Cyclins E1 and E2 are required for endoreplication in placental trophoblast giant cells. *EMBO J.* **22**, 4794–4803.

Park, M., and Krause, M.W. (1999). Regulation of postembryonic G(1) cell cycle progression in *Caenorhabditis elegans* by a cyclin D/CDK-like complex. *Development* **126**, 4849–4860.

Pavletich, N.P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdk, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J. Mol. Biol.* **287**, 821–828.

Rane, S.G., Dubus, P., Mettus, R.V., Galbreath, E.J., Boden, G., Reddy, E.P., and Barbacid, M. (1999). Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in β-cell hyperplasia. *Nat. Genet.* **22**, 44–52.

Ren, S., and Rollins, B.J. (2004). Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell* **117**, 239–251.

Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1999). Cdk inhibitors: positive and

negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* *13*, 1501–1512.

Sicinska, E., Aifantis, I., Le Cam, L., Swat, W., Borowski, C., Yu, Q., Ferrando, A.A., Levin, S.D., Geng, Y., von Boehmer, H., and Sicinski, P. (2003). Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias. *Cancer Cell* *4*, 451–461.

Sicinski, P., Donaher, J.L., Parker, S.B., Li, T., Fazeli, A., Gardner, H., Haslam, S.Z., Bronson, R.T., Elledge, S.J., and Weinberg, R.A. (1995). Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* *82*, 621–630.

Sicinski, P., Donaher, J.L., Geng, Y., Parker, S.B., Gardner, H., Park, M.Y., Robker, R.L., Richards, J.S., McGinnis, L.K., Biggers, J.D., et al. (1996). Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature* *384*, 470–474.

Sotillo, R., Dubus, P., Martín, J., de la Cueva, E., Ortega, S., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2001). Wide spectrum of tumors in knock in mice carrying a Cdk4 protein insensitive to INK4 inhibitors. *EMBO J.* *20*, 6637–6647.

Stacey, D., and Kazlauskas, A. (2002). Regulation of Ras signaling by the cell cycle. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *12*, 44–46.

Steinman, R.A. (2002). Cell cycle regulators and hematopoiesis. *Oncogene* *21*, 3403–3413.

Stevaux, O., and Dyson, N.J. (2002). A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr. Opin. Cell Biol.* *14*, 684–691.

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*, 1329–1340.

Traver, D., Miyamoto, T., Christensen, J., Iwasaki-Arai, J., Akashi, K., and Weissman, I.L. (2001). Fetal liver myelopoiesis occurs through distinct, prospectively isolatable progenitor subsets. *Blood* *98*, 627–635.

Tsutsui, T., Hesabi, B., Moons, D.S., Pandolfi, P.P., Hansel, K.S., Koff, A., and Kiyokawa, H. (1999). Targeted disruption of Cdk4 delays cell cycle entry with enhanced p27Kip1 activity. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 7011–7019.

Tybulewicz, V.L., Crawford, C.E., Jackson, P.K., Bronson, R.T., and Mulligan, R.C. (1991). Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell* *65*, 1153–1163.

Xiong, Y., Zhang, H., and Beach, D. (1992). D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* *71*, 505–514.

Ye, X., Zhu, C., and Harper, J.W. (2001). A premature-termination mutation in the *Mus musculus* cyclin-dependent kinase 3 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *98*, 1682–1686.